



HAL
open science

Mécanismes et contrôle de la réaction inflammatoire précoce au cours de la greffe d'îlots pancréatiques dans un modèle de lignée de cellules bêta de rat : rôle et modulation de la libération des microparticules

Céline Gleizes

► **To cite this version:**

Céline Gleizes. Mécanismes et contrôle de la réaction inflammatoire précoce au cours de la greffe d'îlots pancréatiques dans un modèle de lignée de cellules bêta de rat : rôle et modulation de la libération des microparticules. Endocrinologie et métabolisme. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ082 . tel-01187628

HAL Id: tel-01187628

<https://theses.hal.science/tel-01187628>

Submitted on 27 Aug 2015

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.

Ecole doctorale 414- Sciences de la vie et de la santé

EA7293 : Stress vasculaire et tissulaire en transplantation

THÈSE

présentée par

Céline GLEIZES

soutenu le 23 octobre 2014

Pour obtenir le grade de **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : **Biologie**

Mécanismes et contrôle de la réaction inflammatoire précoce au cours de la greffe d'îlots pancréatiques, dans un modèle de lignée de cellules β de rat : rôle et modulation de la libération des microparticules

Thèse dirigée par :

Mme Laurence KESSLER

Professeur, Université de Strasbourg

Rapporteurs externes :

M. Edouardo ANGLES-CANO

Directeur de Recherche, INSERM UMR 1140,
Université de Paris

M. Domenico BOSCO

Directeur de Recherche, Université de Genève

Rapporteur interne :

M. Philippe BACHELLIER

Professeur, Université de Strasbourg

« Chacun des grains de cette pierre, chaque éclat minéral de cette montagne pleine de nuit, à lui seul, forme un monde. La lutte elle-même vers les sommets suffit à remplir un cœur d'homme. Il faut imaginer Sisyphe heureux »

Albert Camus, 1942

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à Mr Edouardo Angles-Cano, Mr Domenico Bosco et Mr Philippe Bachellier qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Bien plus que les mots ne peuvent le dire, je souhaite remercier Laurence Kessler et Florence Toti pour... pour... pour tout ! Duo de choc, duo en or ! Vous avez mis au cœur de votre vie professionnelle la formation de vos étudiants avant toute autre chose. Et cet enseignement, ce dévouement dépasse la simple transmission de savoir scientifique. Laurence, vous avez su saisir pour ma thèse toutes les opportunités qui se sont présentées à elle et m'avez offert les moyens de m'épanouir scientifiquement et professionnellement, bien au-delà de mes travaux de paillasse. Vous m'avez aidée et accompagnée dans le dépassement de mes limites. Merci pour toutes ces chances saisies... Florence, merci pour votre investissement infatigable et votre soutien inconditionnel au quotidien, on ne peut rêver mieux pour bien vivre sa thèse. Quel plaisir ces échanges scientifiques (et non scientifiques !) que nous avons eu ensemble ! Comme une véritable mère de famille, vous prodiguez à vos étudiants attention, réconfort, protection, conseils et gentils coups de gueule. Ne changez rien !

Ce travail de thèse n'aurait pu se réaliser de manière aussi épanouissante sans les personnes qui m'ont entourée durant ces trois années. Je souhaite donc remercier sincèrement mes collègues de travail Andrei, Malak, Mohamad, Alexandre, Fatiha, Blandine, Cyril, Mélanie, Jérémie, Stéphanie, Julie, et François qui ont contribué, chacun à leur manière, à l'avancement de ce travail. J'ai une pensée particulière pour mes étudiants, Louise et Lucas, avec qui j'ai vécu cette troisième année sur fond de partage, de confiance et de complicité.

Sans originalité mais avec beaucoup de sincérité, je tiens à remercier mes parents pour leur soutien quotidien et pour cette persévérance et cette force qu'ils m'ont transmises. Merci à mon frère Julien, ma sœur Fanny ainsi que leurs moitiés pour ce qu'ils sont et ce qu'ils apportent chaque jour à notre famille. Mes amies fidèles, Pau, Moino, Bru et Béné merci pour votre présence et votre amitié revigorante ! Merci aussi à Virginie pour sa force 4G qui m'a sauvée, à Benjamin mon acolyte saïen et à Koko pour son enthousiasme imbattable.

Enfin et surtout, Merci Merci Merci à mon compagnon de route, Samuel, pour son écoute inépuisable, sa patience hors norme et sa compréhension. Bien plus qu'une présence, c'est de la couleur que tu apportes à ma vie. La mythologie me prête le Soleil pour frère, je dirais plutôt que j'en suis la compagne. « Malgré le temps qu'il fait, malgré le temps qui passe... Je t'aime ».

Tables des matières

Remerciements	v
Tables des matières.....	vii
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
INTRODUCTION.....	- 17 -
I. La greffe d'îlots de Langerhans : une thérapie cellulaire substitutive dans le traitement du diabète de type 1.....	- 19 -
I.1. Le diabète : un dérèglement métabolique	- 19 -
I.2. Le diabète de type 1 : une pathologie complexe liée au contrôle de la glycémie .	- 20 -
I.3. Approches thérapeutiques dans le traitement du DT1	- 25 -
I.4. La greffe d'îlots pancréatiques : thérapie substitutive d'intérêt clinique.....	- 35 -
II. La réaction IBMIR : altération précoce non-immune des îlots pancréatiques greffés	- 48 -
II.1. Mécanismes physiopathologiques de la réaction IBMIR.....	- 48 -
II.2. Le contrôle de la réaction IBMIR.....	- 58 -
III. Les microparticules.....	- 63 -
III.1. Les microparticules : marqueurs d'un stress et effecteurs cellulaires	- 63 -
III.2. Les microparticules dans le diabète.....	- 76 -
III.3. Les microparticules et la transplantation.....	- 81 -
III.4. Les microparticules et la régénération tissulaire	- 84 -
IV. Les analogues du GLP-1 : une utilisation potentielle en transplantation d'îlots de Langerhans.....	- 87 -
IV.1. Rôle physiologique du GLP-1 et de ses analogues	- 87 -
IV.2. Le Liraglutide dans la greffe d'îlots pancréatiques.....	- 101 -
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL	- 103 -

TRAVAUX PERSONNELS	- 107 -
PARTIE 1	
I. Objectifs	- 111 -
II. Caractérisation du modèle de stress	- 111 -
II.1. Utilisation d'un modèle cellulaire	- 111 -
II.2. Induction du stress oxydant	- 112 -
II.3. Induction du stress cytokinique	- 113 -
II.4. Protocole de stimulation	- 114 -
II.5. Protocole de production et d'isolement des MPs	- 115 -
III. Contenu de l'article n°1.....	- 115 -
IV. Données complémentaires.....	- 124 -
IV.1. Evaluation de l'effet dose des MPs sur l'apoptose	- 124 -
IV.2. Implication de la PKA dans l'émission des MPs.....	- 125 -
IV.3. Implication de la voie UPR dans l'apoptose induite par les MPs.....	- 127 -
V. Discussion et conclusion	- 129 -
PARTIE 2	
I. Objectifs	- 135 -
II. Etude de la sécrétion d'insuline dans le modèle de stress	- 135 -
II.1. Effet du stress oxydant et inflammatoire sur l'insulino-sécrétion et sa modulation par le Liraglutide	- 136 -
II.2. Implication de la PKA dans l'insulino-sécrétion.....	- 137 -
III. Contenu de l'article n°2.....	- 137 -
IV. Données complémentaires.....	- 165 -
IV.1. Evaluation de l'effet dose des MPs sur l'insulino-sécrétion.....	- 165 -
IV.2. Évaluation de l'effet dose du Liraglutide sur l'activité TF des MPs	- 166 -
IV.3. Evaluation de l'effet cytoprotecteur du Liraglutide sur le fonctionnement des canaux ioniques suite à l'application de MPs	- 167 -

IV.4. Implication du GLP-1 et de l'acide palmitique dans l'effet cytoprotecteur du Liraglutide	- 169 -
V. Discussion et conclusion	- 173 -
DISCUSSION GÉNÉRALE	- 177 -
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	- 185 -
COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS	- 191 -
RÉFÉRENCES	- 195 -
ANNEXES	- 219 -
RÉSUMÉ	- 229 -

Liste des Figures

Figure 1 : Les iPSC : source de progéniteurs endocrines β -like.	- 32 -
Figure 2 : Isolement et transplantation d'îlots pancréatiques : du donneur au receveur	- 37 -
Figure 3 : Schéma des réactions inflammatoires et thrombotique de la réaction IBMIR ...	- 49 -
Figure 4 : Implication de HMGB1 dans l'enclenchement de l'IBMIR	- 52 -
Figure 5 : Le facteur tissulaire : initiateur de la cascade de coagulation.....	- 53 -
Figure 6 : Ensemble des réactions d'activation de la cascade du complément	- 55 -
Figure 7 : Mise en évidence de l'expression du facteur tissulaire dans des vésicules à insuline, glucagon et des microvésicules.	- 56 -
Figure 8 : Bactéries capturées dans le maillage des NETs.....	- 57 -
Figure 9 : Les MPs, un réservoir circulant d'effecteurs bioactifs.....	- 64 -
Figure 10 : Fonctionnement des transporteurs de phospholipides	- 67 -
Figure 11: Mécanismes membranaires à l'origine de l'émission des MPs	- 70 -
Figure 12 : Remaniement du cytosquelette au cours de l'apoptose.....	- 71 -
Figure 13 : Composition d'un radeau lipidique	- 73 -
Figure 14 : Mécanismes impliqués dans la clearance des MPs circulantes	- 74 -
Figure 15 : Variations du C-peptide, du besoin en insuline et des microparticules circulantes lors de la greffe d'îlots pancréatiques	- 83 -
Figure 16 : Les différentes étapes et acteurs de la fibrinolyse	- 85 -
Figure 17 : Mécanismes cellulaires de la sécrétion d'insuline	- 89 -
Figure 18 : Formation du complexe <i>trans</i> -SNARE impliqué dans l'exocytose des granules à insuline	- 91 -
Figure 19 : Mécanismes cellulaires impliqués dans la sécrétion d'insuline et médiés par le GLP-1	- 92 -
Figure 20 : Les différentes voies de la réponse UPR	- 94 -
Figure 21 : Comparaison des structures des différents analogues du GLP-1 par rapport au GLP-1 endogène.....	- 96 -
Figure 22 : Structure du Liraglutide	- 97 -
Figure 23 : Concentration plasmatique du Liraglutide en fonction des doses (0, 6 mg, 1,2 mg et 1,8mg) chez des sujets sains.....	- 98 -
Figure 30 : Evaluation de la concentration du H ₂ O ₂ sur l'apoptose (A), l'insulino-sécrétion (B) et l'émission des MPs (C).....	- 112 -

Figure 31 : Evaluation du temps d'incubation du cocktail de cytokines sur l'apoptose (A), l'insulino-sécrétion (B) et l'émission des MPs (C).....	- 113 -
Figure 32 : Schématisation du modèle de stress	- 114 -
Figure 33 : Effet des MPs sur l'apoptose des cellules β	- 124 -
Figure 34 : Mécanismes cellulaires impliqués dans la sécrétion d'insuline et médiés par le GLP-1	- 125 -
Figure 35 : Implication de l'inhibition de la PKA sur l'émission des MPs et l'apoptose..	- 126 -
Figure 36 : Effet des MPs sur l'activation de la voie UPR dans la cellule β	- 128 -
Figure 37 : Résumé de l'effet du stress oxydant (A) et du stress cytokinique (B) sur la libération des MPs, l'activité TF et la réponse apoptotique. Modulation par le Liraglutide (C) -	131 -
Figure 38 : Effet du stress oxydant et inflammatoire sur l'insulino-sécrétion et modulation par le Liraglutide	- 136 -
Figure 39 : Effet de l'inhibition de la PKA sur l'insulino-sécrétion et sa modulation par le Liraglutide	- 137 -
Figure 40 : Effet dose des MPs sur l'insulino-sécrétion.....	- 165 -
Figure 41 : Evaluation de l'effet dose du Liraglutide sur l'activité TF portée par les MPs émises à la suite d'un stress oxydant (A) ou cytokinique (B).....	- 166 -
Figure 42 : Effet de l'inhibiteur des canaux calciques (A) ou potassiques (B) sur la cytoprotection du Liraglutide dans l'insulino-sécrétion	- 168 -
Figure 43 : Effet du GLP-1 purifié et de l'acide palmitique sur l'apoptose des Rin-m5f après application de H ₂ O ₂ ou d'IL-1 β + TNF- α	- 170 -
Figure 44 : Effet du GLP-1 purifié et de l'acide palmitique sur l'insulino-sécrétion en présence de H ₂ O ₂ ou de la combinaison d'IL-1 β + TNF- α	- 171 -
Figure 45 : Effet du GLP-1 et de l'acide palmitique du Liraglutide sur l'émission des MPs après application de H ₂ O ₂ ou d'IL-1 β + TNF- α	- 172 -
Figure 46 : Résumé de l'effet du stress oxydant et du stress cytokinique (A) sur les remodelages membranaires, l'activité TF et la sécrétion d'insuline. Modulation par le Liraglutide (B).....	- 175 -

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Clearance des MPs	- 76 -
-------------------------------------	--------

Liste des abréviations

ABC : ATP Binding Cassette
ADA : American Diabetes Association
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADO : Anti-Diabétiques Oraux
Akt : Protéine Kinase B
AMO : Anti-miRNA Oligonucléotides
AMPC : Adénosine Monophosphate cyclique
AOP-RANTES : Antagonist Amino-Oxypentane RANTES
APC : Antigen Presenting Cell
ARN : Acide Ribonucléique
AT : Anti-Thrombine
ATF6 : Activating Transcription Factor 6
ATP : Adénosine-5'-Triphosphate
C5aIP : C5a Inhibitory Peptid
CCR : C-C Chemokine Receptor
CD : Cluster de Différenciation
CHOP : C/EBP HomolOgous Protein
CITR : Collaborative Islet Transplant Registry
CSE : Cellules Souches Embryonnaires
CXCL : C-X-C motif chémokine
Del-1 : Developmental endothelial locus-1
DPP-IV : Dipeptidyl Peptidase-4
DT1 : Diabète de Type 1
DT2 : Diabète de Type 2
EGF : Epidermal Growth Factor
eIF2 α : Eukaryotic translation Initiation Factor 2 alpha
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Epac : Exchange Protein directly Activated by cAMP
EPC : Endothelial Progenitor Cell
ERSE : ER Stress response Element
Fas : CD95 ou APO-1 : Apoptosis Antigen-1

FasL : Fas Ligand
FGF : Fibroblast Growth Factor
GAD65 : Glutamine Acide Décarboxylase 65
GIP : Gastric Inhibitory Polypeptide
GLP-1 : Glucagon Like Peptid-1
GPIb : Platelet glycoprotein Ib
HAT : Histone Acétyl Transférase
HbA1c : Hémoglobine glyquée
HDAC : Histone deacetylase
HDL : High Density Lipoprotein
HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
HLA : Human Leukocyte Antigen
HMGB1 : High-Mobility Group Box 1 Protein
IBMIR : Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction
IEQ : îlot équivalent
IFN- γ : Interferon gamma
IKRs : Killer Cell Ig-Like Receptor
IL : Interleukin
IMC : Indice de Masse Corporelle
IP : Intrapéritonéal
IPC : Insulin Producing Cell
iPSC : induced Pluripotent Stem Cell
IRE1 : Inositol-Requiring Enzyme 1
JNK : C-Jun N-terminal Kinase
Kir 6.2 : inwardly rectifying K⁺ channel 6.2
LB : Lymphocytes B
LEAD : Liraglutide Effect and Action in Diabetes
lncRNA : long non coding RNA
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
LTC : Lymphocyte T Cytotoxique
MafA : V-maf musculoaponeurotic
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1 : Monocyte chimoattractant protein 1 (ou CCL2)

MEC : Mucosae-associated Epithelial Chemokine
MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Proteins-1 α
miRNA, miR : microRNA
MMP : Matrix Metalloproteinase-1
MPs : Microparticules
MRI : Magnetic Resonance Imaging
MSCs : Mesenchymal Stem Cells
Neuro D1 : Neurogenic Differentiation 1
NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B
NK : Natural Killer
NKp : Natural Killer protein
NO : Nitric Oxyde
NOD : Non-Obese Diabetic
NOX ; Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate Oxidase
NUDE mouse : souris athymique
PAI : Plasminogen Activator Inhibitor
PAK2 : Protein p21 Activated K
PDK-1 : Phosphoinositide-Dependent Kinase-1
PDX-1 : Pancreatic And Duodenal Homeobox 1
PERK : Protein kinase (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PET : Positron Emission Tomography
PGRMC1 : Progesterone Receptor Membrane Component 1
PhCol : Phosphatidylcholine
PhEth : Phosphatidyléthanolamine
PhSer : Phosphatidylsérine
PI3 Kinase : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
PSA-NCAM : Polysialylated Neuronal Cell Adhesion Molecule
PVC : Polychlorure de vinyle
RANTES : Regulated On Activation, Normal T Cell Expressed And Secreted
RE : Reticulum Endoplasmique
ROCK : Rho Kinase

ROS : Reactive Oxygen Species
SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor 1
SNAP-25 : Synaptosomal-Associated Protein 25
SNARE : SNAP (Soluble NSF Attachment Protein Receptor
SOCE : Store-Operated Calcium Entry
STAT 3 : Signal Transducers And Activators Of Transcription
SUR1 : sulfonylurea receptor
TAT : Thrombine Anti-Thrombine
TF : Tissue Factor
TGF- β : Transforming Growth Factor beta
Th : lymphocytes T helper
TIS : Traitement ImmunoSupresseurs
TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha
tPA : tissue-type Plasminogen Activator
Treg : Lymphocytes T régulateur
TRPC6 : Transient Receptor Potential Cation Channel 6
TSA : Trichostatin A
uPA : urokinase-type Plasminogen Activator
UPR : Unfolded Protein Response
UTR : UnTranslated Region
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
XRP8 : Xk Related Protein 8

INTRODUCTION

I. La greffe d'îlots de Langerhans : une thérapie cellulaire substitutive dans le traitement du diabète de type 1

I.1. Le diabète : un dérèglement métabolique

I.1.1. Définition et épidémiologie du diabète

Le diabète est une affection métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique secondaire à une déficience de sécrétion d'insuline et/ou une anomalie de l'action de l'insuline au niveau des tissus cibles en particulier le foie, le muscle, le tissu adipeux.

Le diabète est actuellement un authentique problème de santé publique de par le nombre de personnes concernées et la sévérité des complications de la maladie. L'OMS fait état actuellement de 347 millions de personnes diabétiques de type 2 (DT2) dans le monde. L'OMS prévoit qu'en 2030 le diabète sera la 7^{ème} cause de décès dans le monde. En France entre 2,9 et 3 millions de personnes sont diabétiques selon les données de l'assurance maladie avec une augmentation de plus de 6 % du nombre de patients atteints par le diabète entre 2000 et 2009. Deux millions sept cents mille sujets sont atteints de DT2, 160 000 présentent un diabète de type 1 (DT1). On estime également qu'il existe entre 1 à 2 % de la population diabétique soit 70 000 à 350 000 sujets présentant un autre type de diabète ou des diabètes méconnus. Si le nombre de personnes présentant un DT1 est en augmentation modérée (actuellement 480 000 enfants de 0 à 14 sont atteints de DT1 avec une augmentation annuelle de l'incidence de 3 % soit environ 70 000 nouveaux cas par an), c'est surtout le DT2 dont la fréquence augmente considérablement. . En France, la prévalence du diabète est de 6 % en moyenne avec une augmentation de la prévalence à 8 % dans le Nord, l'Est et les départements d'Outremer.

I.1.2. Physiopathologie des diabètes

Le DT1, qui concerne l'adulte jeune et de plus en plus l'enfant, est dû à une destruction auto-immune des cellules à insuline des îlots pancréatiques. L'hyperglycémie apparaît lorsqu'il reste moins de 10% des cellules β fonctionnelles. Le processus auto-immun responsable d'une insuffisance de sécrétion insulinaire endogène se déroule sur de nombreuses années 5 à 10 ans, voire plus. Cet état physiopathologique chronique hyperglycémiant engendre des

complications sévères à long terme, touchant principalement les endothéliums vasculaires. Ces complications dégénératives majeures entraînent une altération des micro-vaisseaux menant à des micro-angiopathies. Celles-ci se traduisent par des rétinopathies, des néphropathies ainsi qu'une altération des nerfs des membres inférieurs. Plus tardivement, l'atteinte rénale conduit à une macro-angiopathie consécutive à une hypertension artérielle. Le diagnostic du DT1 passe par la détection systémique d'autoanticorps à l'insuline, d'autoanticorps IA2 (phosphatase membranaire des cellules β) et d'autoanticorps contre la glutamine acide décarboxylase (GAD 65) [1,2].

Le DT2 est une maladie polygénique résultant de la conjonction de plusieurs gènes de susceptibilité dont l'expression dépend de facteurs d'environnement au premier rang desquels la consommation excessive de graisses saturées et de sucres rapides et la sédentarité. Au plan physiopathologique, il s'agit d'une maladie complexe qui associe une insulino-déficience qui précède généralement de 10 à 20 ans l'hyperglycémie et une insulino-résistance périphérique le plus souvent dans un contexte d'obésité ou de surcharge pondérale. Cette insulino-résistance précède l'apparition du diabète de type 2 et survient sur un terrain génétique de susceptibilité. L'hyperglycémie induite est la conséquence d'une diminution de l'utilisation musculaire du glucose et d'une augmentation de la production hépatique du glucose. L'insulino-résistance se traduit au plan clinique par une obésité androïde et s'accompagne souvent d'hypertension artérielle, d'hypertriglycéridémie et d'hypoHDLémie.

1.2. Le diabète de type 1 : une pathologie complexe liée au contrôle de la glycémie

1.2.1. Epidémiologie du DT1

L'épidémie mondiale actuelle de diabète touche principalement le DT2 (DT2) mais n'épargne pas le diabète de type 1 (DT1). En effet, il touche principalement les sujets de moins de 15 ans et chez ces patients son incidence a augmenté de 0,6% en 1989 à 9,3% en 2003 [3]. De plus, d'après l'étude EuroDiab, le nombre de nouveaux cas de diabète en Europe est estimé à 15 000 en 2005 et à 24 400 en 2020 [4]. Ces données suggèrent que la prévalence du DT1 chez les moins de 15 ans passera de 94 000 en 2005 à 160 000 en 2020 en Europe. La conséquence de telles données épidémiologiques est une ancienneté de diabète de plus en plus grande chez le jeune adulte avec un risque augmenté de complications dégénératives en cas d'hyperglycémie non contrôlée. Cette augmentation de l'incidence du DT1 pourrait

s'expliquer par une modification progressive de la réaction immunitaire de l'homme comme peuvent en témoigner l'augmentation du nombre de maladies auto-immunes et des réactions allergiques. D'autre part, le DT1 tend actuellement à apparaître plus précocement. En effet, on observe une augmentation importante de la prévalence chez les enfants de moins de 5 ans et un nombre de diabétiques diagnostiqués avant 5 ans qui aura doublé d'ici 2020 [5]. Tous les chiffres concernant le DT1 évoluant très vite, la compréhension des mécanismes physiopathologiques apparaît comme cruciale dans le traitement et la gestion du DT1.

I.2.2. Le DT1 : une maladie auto-immune

L'apparition de la réaction auto-immune caractéristique du DT1 et à l'origine de la destruction des cellules β n'est pas entièrement connue mais serait liée à l'association de gènes de prédisposition. Une susceptibilité à développer un DT1 serait associée à 40 loci dont les plus connus sont ceux du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (HLA-DQ2), impliqués dans la tolérance immunitaire [5,6]. La chronologie des événements immunologiques à l'origine de la destruction de la masse β insulaire n'est pas encore clairement établie. Toutefois, la compréhension du fonctionnement et de l'implication de chaque acteur immunologique sont autant de pistes thérapeutiques potentielles à étudier.

Les lymphocytes T (LT), responsables de l'immunité cellulaire, sont les acteurs principaux de la destruction des cellules β à l'origine du DT1 mais les études tendent à montrer qu'ils sont d'avantage les exécuteurs finaux du processus engrangé d'une part, par les cellules dendritiques appartenant à la famille des cellules de présentation de l'antigène (APC : *antigen presenting cells*) et d'autre part, par les cellules *natural killer* (NK) [7]. En effet, la reconnaissance du non soi par les cellules dendritiques entraîne leur migration vers les organes lymphoïdes où la production d'IL-1 β , TNF- α et IL-12 sont les inducteurs spécifiques de la maturation des LT naïfs en LT helper auto-réactifs. L'accumulation des APC dans le pancréas est liée à la pathogénicité du DT1 et elles seraient responsables de la présentation d'antigènes des cellules de l'îlot aux LT.

De plus, l'infiltration des cellules NK dans la masse pancréatique, avant celle des LT, déclenche la phase initiale inflammatoire de la maladie à l'origine de l'insulite [8]. Elles expriment des récepteurs cytotoxiques tels que les *killer cell Ig-like receptor* (IKRs) et NKp30, NKp44, NKp46, ce dernier reconnaissant spécifiquement des ligands de la cellule β . Elles expriment des activités cytolytiques et sécrètent de la perforine, des cytokines (IFN γ ,

TNF- α , IL-1, IL-10, IL-13) et des chémokines (MIP-1 α). Leur détection est rare dans les îlots de patients diabétiques adultes, confirmant leur rôle à la phase initiale de la maladie [9,10].

Dans ce contexte inflammatoire et suite à leur stimulation par les APC, les LT enclenchent la destruction directe des cellules β . Il a été démontré que la précipitation ou la prévention du DT1 est liée respectivement au transfert ou à l'élimination des LT CD4⁺ ou CD8⁺ [11]. Les LT CD4⁺ sont principalement impliqués dans la réaction immunitaire par l'activation et la prolifération des LT CD8⁺ et les lymphocytes B.

Les LT CD4⁺ pancréatiques de patients diabétiques sont auto-réactifs contre 15 acides aminés de l'insuline [12]. Ils peuvent être divisés en deux catégories : Thelper (Th1, Th2 et Th17) et Régulateur (Treg) ayant chacun une implication propre dans la pathogénicité du DT1 en fonction des cytokines qu'ils sécrètent [7]. Nous pouvons noter en complément que les Treg assurent le maintien de la tolérance immunitaire en limitant une réponse excessive du système immunitaire. En effet, ils assurent leur fonction immunosuppressive par sécrétion de TGF- β , impliqué dans le contrôle de la maturation de Th1 auto-réactifs, par production d'IL-10 anti-inflammatoire et d'IL-35 qui limite la prolifération des LT et favorise la conversion de LT naïfs en Treg fortement immunosuppresseurs [13-16]. De manière intéressante, différentes études s'accordent à montrer qu'il n'y a pas de variations significatives dans la quantité de Treg entre les patients DT1 et les contrôles sains soulignant que le problème majeur du diabète serait une activation massive de LT auto-réactifs, résistants aux Treg, plutôt qu'à une diminution des Treg [17].

Les LT CD8⁺ se différencient en LT cytotoxiques (LTC) auto-réactifs, sous l'influence de IL-21[18]. Leur cytotoxicité s'exprime par la sécrétion de perforine, d'IFN γ , de TNF- α , d'IL-1 β et de Fas-Fas-L [19].

Enfin, les cellules de l'immunité humorale, les lymphocytes B (LB) ne seraient pas directement liés à la destruction de la masse β insulaire mais plutôt à la progression de la maladie en favorisant l'auto-immunité. En effet, ils stimulent la production d'autoanticorps dont la présentation génère l'auto-réaction des LT. Ils promeuvent la survie des LT CD8⁺ et leur transition en LTC [20]. Ils joueraient toutefois aussi un rôle dans la phase initiale de la pathologie en assurant la présentation d'antigènes des cellules de l'îlot mais de manière moins efficace que les cellules dendritiques.

Le système immunitaire inné porté par les macrophages et les neutrophiles est aussi impliqué dans l'initiation du DT1 chez des souris NOD (*non-obese diabetic*) [21]. Ainsi, une altération intrinsèque du système immunitaire inné et adaptatif contribue collectivement à la destruction des cellules β .

I.2.3. Objectifs thérapeutiques et traitements actuels du DT1

Atteindre une HBA1c inférieur à 7% tout en limitant le nombre d'hypoglycémies et en préservant la qualité de vie du patient, constitue l'objectif de la prise en charge du DT1. Un contrôle intensif de la glycémie permet de réduire les complications à long terme. Pour cela, le traitement du DT1 doit se rapprocher le plus possible de l'insulino-sécrétion physiologique. Ainsi, l'insulinothérapie repose sur l'injection exogène d'insuline, effectuée par le patient, sous forme de multi-injections ou de pompes à insuline. Ce traitement permet chez la plupart des patients un contrôle sûr de la glycémie, limitant le nombre d'hypoglycémies sévères. Toutefois, Les contraintes liées à la lourdeur du traitement et à l'attention constante demandée au patient, sont parfois difficilement compatibles avec une bonne qualité de vie. De plus, l'insulinothérapie ne permet pas de supprimer ou de limiter de manière conséquente les complications dégénératives associées au DT1. Or l'objectif thérapeutique dans le traitement du DT1 tend actuellement à prévenir les complications aiguës et chroniques invalidantes de la maladie, tout en assurant une qualité de vie optimale au patient. Pour cela l'atteinte d'une normoglycémie le plus précocement possible et le plus longtemps possible est nécessaire et seules les thérapies substitutives technologiques ou biologiques permettent d'atteindre cet objectif.

La thérapie substitutive technologique repose sur la mise en place d'un pancréas artificiel associant des systèmes sanguins d'analyse en continu de la glycémie et des systèmes d'administration automatique d'insuline. Les avancées biotechnologiques ont permis le développement des systèmes de contrôle en continu du glucose interstitiel, couplés à des pompes à insuline externes, ouvrant la porte d'un pancréas artificiel externe miniaturisé.

L'approche substitutive biologique du DT1 vise à restaurer une sécrétion insulinaire endogène physiologique. Plusieurs alternatives se sont développées :

- les traitements visant à prévenir la destruction de la cellule β et/ou à mobiliser les autres cellules ou progéniteurs pancréatiques.
- les traitements visant à remplacer la cellule à insuline par une greffe de pancréas, de cellules souches ou d'îlots pancréatiques.

I.3. Approches thérapeutiques dans le traitement du DT1

I.3.1. Thérapies préventives

I.3.1.1. Immunothérapie

L'immunothérapie consiste à restaurer la tolérance immunitaire vis-à-vis des cellules β du patient ou de limiter la réaction immunitaire. Cela permet ainsi d'intervenir en amont du DT1, avant l'installation du syndrome hyperglycémique.

L'importance des Treg dans le maintien de la tolérance au soi en fait de bons candidats dans le traitement par immunothérapie du DT1. En effet, il a été démontré qu'un déficit sévère en Treg dû à la présence de mutations dans Foxp3, gène codant pour un facteur de transcription nécessaire à la maturation des Treg, conduit à un syndrome léthal chez l'homme et la souris. De plus, une accélération et une aggravation du DT1 est observable chez des souris NOD déficientes en Treg [22]. A l'inverse, l'injection de Treg permet de prévenir le diabète et même d'induire une rémission des signes cliniques chez des souris NOD [23]. Toutefois, à l'heure actuelle, il est impossible de développer des Treg porteurs d'autoantigènes spécifiques d'un tissu. L'alternative est d'administrer des molécules stimulant préférentiellement un compartiment des Treg pour augmenter leur capacité à contrôler une auto-réactivité pathogène. Il a ainsi été démontré que l'IL-2 et le TNF- α sont capables de stimuler les Treg spécifiquement dans le pancréas de souris NOD, témoignant d'un potentiel rôle régulateur dans le DT1 [24,25]. De plus, l'IL-2 serait nécessaire à la survie et au fonctionnement des Treg et une déficience locale en IL-2 dans le pancréas de souris NOD induirait une perte des Treg pancréatiques et une destruction des îlots [26]. Dans ce modèle murin, l'injection prolongée de faibles quantités d'IL-2 diminue l'incidence du DT1 en diminuant de 60% les hyperglycémies, augmente le nombre et la survie des Treg infiltrés dans le pancréas et diminuent la production cytotoxique d'IFN- γ par les LT CD8⁺. Ce traitement n'est efficace que si la glycémie est basse, ce qui impose une application thérapeutique à un stade précoce de la maladie. Il est important de noter que les faibles doses d'IL-2 utilisées ne semblent pas avoir d'effet systémique, témoignant d'une relative innocuité de l'administration. L'équipe de Grindberg-Bleyer a mis en évidence une relation de cross-talk entre Treg et LT CD8⁺. En effet, le transfert de Treg seul ne permet pas de prévenir l'induction du diabète médiée par l'injection de LT CD8⁺ trois semaines après ce transfert. Toutefois si les Treg sont co-transférés avec des LT CD8⁺, les souris sont protégées de l'induction de la maladie trois

semaines plus tard et au long terme. Ainsi, les LT CD8⁺ limitent leur propre effet pathogène en activant les Treg spécifiques de l'îlot pancréatique [27]. De plus, certains gènes associés à une prédisposition au DT1 seraient liés au récepteur de l'IL-2 dont l'expression est variable selon le type cellulaire (augmentée chez les LT CD4⁺ et diminuée chez les monocytes) [28].

En parallèle de l'utilisation des Treg, d'autres approches d'immunothérapie ont été développées concernant les autres types cellulaires du système immunitaire. D'une part, le traitement intraveineux d'anti-CD20 et oral d'anti-CD3, dirigés contre les LB, retarde significativement le développement du DT1 chez des souris NOD et réverse le DT1 chez 60% des animaux. Cette déplétion en LB semble augmenter les fonctions suppressives des Treg [29]. D'autre part, l'inhibition des récepteurs cytotoxiques KIRs, exprimés par les cellules NK, prévient la progression du DT1 chez des souris NOD de 6 et 10 semaines [30]. De manière générale, peu d'études d'immunothérapie sont actuellement à l'œuvre sur des modèles de primates ou en clinique.

I.3.1.2. Epigénétique

L'approche épigénétique propose d'aborder la question du diabète non pas en étudiant séparément un des 3 acteurs de la pathologie : le système immunitaire inné, acquis et le pancréas endocrine, mais en modulant globalement l'épigénome. L'épigénétique est l'étude des changements héréditaires de l'expression des gènes non induits par une altération de la séquence d'ADN [5]. L'altération épigénétique du génome pourrait être en lien avec certaines maladies auto-immunes [31-33]. Elle porte principalement sur l'étude des mécanismes impliquant l'acétylation des histones et le rôle des miRNAs.

1. L'acétylation des histones

Les histones sont les principaux constituants protéiques des chromosomes. Les modifications post-traductionnelles de l'ADN (méthylation, acétylation, phosphorylation et ubiquitination) conditionnent la structure des histones et influencent la transcription des gènes [34]. La combinaison de ces modifications, connue sous le nom de « code de l'histone » représente un mécanisme important de régulation, affectant le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN et son système de réparation, le vieillissement et les processus pathologiques [35]. L'acétylation est la modification post-traductionnelle la plus étudiée et est catalysée par l'*histone acetyl transferase* (HAT). L'activité des HATs entraîne une relaxation de la chromatine, associée à une activation de la transcription des gènes. Celle-ci est compensée par l'action des *histone*

deacetylases (HDACs) dont certains types sont particulièrement exprimés dans les cellules cancéreuses [36].

Patel T propose que le remodelage de la chromatine pourrait fournir des pistes thérapeutiques dans le traitement du DT1 et particulièrement, l'utilisation du Trichostatin A (TSA), un inhibiteur des HDACs [37]. En effet, elle a montré que l'injection de TSA chez des souris NOD pré-diabétiques réduit l'incidence du diabète (diminution de l'infiltration cellulaire au niveau des îlots, préservation de la masse β insulaire et restauration de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose). Ces résultats ne sont plus observables à un stade avancé du diabète, lorsqu'une inflammation sévère et invasive des îlots est observable [37]. Ces données suggèrent qu'une fenêtre de manipulation épigénétique est possible entre la détection des anticorps et le développement complet du DT1 [38]. *In vivo* et *in vitro*, l'inhibition des HDACs réduit la sécrétion de cytokines, l'apoptose et restaure l'insulino-sécrétion [37,39,40]. L'utilisation de puces ADN ou DNA-microarray combinée à l'approche épigénétique a permis de mettre en évidence que le traitement par TSA chez les souris NOD diminue l'expression de gènes pro-inflammatoires et du facteur inhibiteur de migration associé à l'insulino-résistance [41]. De plus, l'utilisation de TSA augmente l'expression d'IFN- γ et de son ARN dont l'effet protecteur dans le DT1 a déjà été mis en évidence selon d'autres techniques [42,43]. Ainsi, les propriétés bénéfiques du TSA sur la tolérance immunitaire, le contrôle de la glycémie, la sensibilité à l'insuline et la physiologie des îlots et l'absence d'effets toxiques observables sont en faveur de son étude en clinique.

2. *Les miRNAs*

Les microARN (miRNAs) jouent un rôle majeur dans la régulation de la relation entre le code génétique et les protéines [44]. Ce sont des brins non-codants d'ARN, d'une longueur d'environ 22 nucléotides, dont la fonction régulatrice repose sur leur fixation à la région 3'UTR d'un ARNm entraînant leur déstabilisation ou inhibant leur traduction [45]. Bien que leur rôle ne soit clairement établi, de nombreuses études montrent que les miRNAs sont impliqués dans l'étiologie et la pathologie du DT1. Ils apparaissent ainsi comme des cibles thérapeutiques potentiels mais aussi comme des biomarqueurs diagnostics et pronostics dans le DT1 [44].

L'implication des miRNAs a été établie à de nombreux points du métabolisme de l'insuline et de la survie β cellulaire : ratio ATP/ADP (miR-15a, miR29 et miR-9), exocytose de l'insuline (miR-375 et miR-9), synthèse de l'insuline (miR-375 et miR-30d), formation des cellules à insuline et maintien de la masse endocrine (miR-375, miR-146 et miR-21) et

insulino-résistance (foie : miR-143, , tissus adipeux : miR-21, muscle squelettique : miR-29) [44].

L'altération de l'expression de certains miRNAs est à l'origine de dysfonctionnements cellulaires. La démarche thérapeutique consiste à ramener à un taux basal l'expression de ces miRNAs. Pour cela plusieurs approches ont été développées : les anti-miRNAs oligonucléotides (AMOs), la transfection de gènes par retrovirus et l'application de certains composés chimiques comme les polyphénols [46] et l'acide linoléique [47].

Les AMOs sont des analogues d'oligonucléotides chimiquement modifiés, pouvant traverser la membrane plasmique et qui se lient spécifiquement aux miRNAs d'intérêt, bloquant ainsi leurs propre fixation aux ARNm [48]. L'application des AMOs est encore au stade expérimental mais les résultats *in vitro* montrent que l'application de 2'-O-methyl-miR-375 restaure l'expression de *PDK1* ainsi que la sécrétion d'insuline dans des cellules INS-1E [49]. Les même résultats sont observés avec des cellules β MIN-6 en bloquant miR-21, miR-34a, ou miR-146a en condition inflammatoire [50]. *In vivo*, l'application de 2'-O-methyl-miR-103 et -107 chez des souris *ob/ob* améliore l'homéostasie du glucose et l'insulino-résistance [51]. Malgré des résultats prometteurs, la résistance des tissus à la capture des AMOs est l'obstacle majeur de cette stratégie.

La transfection de type viral d'un plasmide est une technique très utilisée de par son taux élevé de transfections, en comparaison des AMOs. Elle permet de moduler l'expression de miRNAs, principalement dans le sens de la surexpression. Toutefois, l'obstacle majeur de cette procédure est la toxicité du traitement, le déclenchement de la réaction immunitaire et son effet potentiellement mutagène [52]. Ainsi le développement d'une thérapie génique non toxique, hautement efficace et reposant sur des miRNAs spécifiques d'un tissu demeure l'objectif principal de cette approche.

Les miRNAs, en plus d'être des cibles thérapeutiques, peuvent aussi être des biomarqueurs d'un état pathologique. En effet, le taux circulant de miR-375 est le témoin d'une altération cellulaire et augmente de manière significative deux semaines avant l'apparition du diabète chez des souris NOD [53]. Une étude clinique, effectuée sur 400 enfants diagnostiqués diabétiques de type 1 depuis 3 mois, a montré une augmentation significative de 12 miRNAs circulants (miR-152, miR-30a-5p, miR-181a, miR-24, miR-148a, miR-210, miR-27a, miR-29a, miR-26a, miR-27b, miR-25, miR-200a) [54]. De plus, cette équipe a identifié le miR-25 comme étant associé à une fonctionnalité résiduelle de cellule β (C-peptide) et à un contrôle glycémique (HbA1c). Cette équipe suggère que le miR-25 pourrait être spécifique du tissu pancréatique et qu'il serait un bon candidat comme biomarqueur pathologique du DT1 [54].

Malgré ces résultats prometteurs, la sensibilité et la spécificité des miRNAs mis en évidence dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ne sont pas assez satisfaisantes pour une application concrète en clinique.

De nombreuses pistes thérapeutiques sont étudiées afin de prévenir l'apparition des symptômes du DT1 en améliorant la tolérance immunitaire vis-à-vis des cellules β et en maintenant fonctionnelle la masse β insulaire résiduelle. Toutefois, malgré les résultats obtenus, peu de traitement se démarquent et ceux étudiés sont souvent toxiques ou ne permettent pas toujours un maintien à long terme du fonctionnement des cellules β [55]. De plus, ces études présentent tout leur intérêt dans la prise en charge précoce de la maladie, soulignant la nécessité d'avoir des marqueurs spécifiques et précoces utilisables en clinique. Dans le cadre d'une prise en charge majoritairement plus tardive du DT1, le remplacement des cellules β défectueuses se présente comme une stratégie thérapeutique incontournable.

I.3.2. Thérapies cellulaires régénératives

Chez le patient diabétique de type 1, la mesure d'une concentration très faible du C-peptide plasmatique témoigne de la destruction quasi-totale des cellules β du patient. A ce stade, il est possible de mobiliser certaines cellules pancréatiques vers une différenciation cellulaire de type « cellules β -like ».

I.3.2.1. Les progéniteurs pancréatiques

Les progéniteurs pancréatiques peuvent être une source intéressante de cellules β -like. En effet, l'équipe de Smukler en 2011 a montré que le pancréas humain abrite des cellules souches multipotentes. Une fois mises en culture, ces cellules présentent une forte capacité de prolifération et s'assemblent automatiquement en structure de type « îlot » exprimant les différents marqueurs des cellules β , α et δ . Leur transplantation limite la progression du diabète dans un modèle murin [56]. Actuellement, aucune étude n'a permis de mettre en évidence une technique de mobilisation de ces cellules afin d'enclencher leur différenciation et leur prolifération dans le pancréas.

I.3.2.2. La transdifférenciation

La transdifférenciation de cellules non souches ou de cellules déjà différenciées consiste en la perte de leurs caractères initiaux et en l'acquisition de nouveaux. La reprogrammation la plus connue est celle des cellules α en cellules β . La transdifférenciation en cellule β a été évaluée à partir de différents types cellulaires : cellules α [57,58], cellules exocrines [59], cellules acinaires [60] et cellules hépatiques [61]. Les approches utilisées, qu'elles soient *in vitro* ou *in vivo*, reposent principalement sur des modifications génétiques par transfection de vecteurs viraux mais aussi par exposition à des cytokines (EGF) [60] ou par intervention chirurgicale (ligature partielle du canal de Wirsung) [62]. Pdx1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) et la neurogénine 3 sont largement impliqués dans les phénomènes de reprogrammation en cellules β -like. Leur expression assure la prolifération de cellules β préexistantes et nouvellement formées ainsi que la reprogrammation de cellules non- β en cellule β -like [62]. De manière générale, les transfections aboutissent à une reprogrammation d'avantage partielle que totale de ces cellules β -like qui présentent principalement la capacité de sécréter de l'insuline. L'absence de l'expression complète du phénotype de la cellule β ne permet actuellement pas le maintien des fonctions à long terme de ces nouvelles cellules β [59].

I.3.3. Thérapies cellulaires substitutives

Historiquement la greffe de pancréas constitue la technique de référence dans la greffe de tissus insulino-sécrétant. Mais la morbi-mortalité liée à l'intervention chirurgicale ainsi que la limite dans le recueil des organes constituent les obstacles majeurs de cette approche. Bien que la greffe d'îlots soit aussi assujettie aux contraintes liées au recueil d'organes, elle présente l'avantage d'une faible morbidité et la possibilité d'étendre la source du recueil des îlots. De plus, même si les améliorations des techniques d'isolement et de purification des îlots permettent d'espérer de meilleurs rendements avec une plus grande reproductibilité, le manque de pancréas disponibles constituera une sévère limitation à l'extension des indications de la greffe d'îlots. Ainsi, le développement de nouvelles sources de tissus insulino-sécréteurs pouvant fournir suffisamment de cellules β -like représente un avenir prometteur dans la réussite de ces thérapies substitutives. Dans ce cadre, il existe un vaste champ de techniques de substitution cellulaire en dehors de la greffe de pancréas et d'îlots libres, comme la différenciation et la maturation de cellules souches embryonnaires ou pluripotentes, la xéno greffe d'îlots pancréatiques ou la greffe d'îlots encapsulés.

I.3.3.1. Les cellules souches

Les techniques les plus étudiées actuellement se centrent principalement sur l'utilisation de cellules souches de différentes origines. L'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines (CSE) a permis d'obtenir des cellules dites *insulin-producing cells* (IPCs). La transplantation d'IPCs permet de corriger les hyperglycémies, dans un modèle murin combinant immunodéficience et expression du DT1 (SCID/NOD) [63] ainsi que dans un modèle de souris soumises à la streptozotocine [64]. De plus, l'application d'un traitement hyperbare suite à l'injection d'IPCs améliore la prise de la greffe et le taux de réversion du diabète dans un modèle murin [65]. Dans la continuité de l'étude de l'effet des modifications post-traductionnelles dans le DT1, une étude récente a montré que la méthylation de l'ADN ou plutôt la dé-méthylation de l'ADN dans des CSE permettait d'obtenir des cellules β -like [66].

Face aux problèmes éthiques soulevés par l'utilisation de CSE et grâce aux avancées de la biotechnologie, la recherche a maintenant accès à d'autre source de cellules, exprimées chez l'adulte et qui s'affranchissent des questions éthiques : les cellules pluripotentes induites (iPSC : *induced pluripotent stem cells*). Les iPSC sont principalement produites à partir de

fibroblastes cutanés mais aussi de kératinocytes, d'adipocytes et de cellules hématopoïétiques. L'induction d'une dédifférenciation cellulaire vers un état pluripotent, découverte par Shinya Yamanaka en 2006, repose sur l'introduction de 4 facteurs de transcription Sox2, Oct3/4, Klf4 et c-Myc [67]. L'application de ces iPSC à des fins de thérapie cellulaire est vaste et pourrait constituer une source illimitée de cellules β -like. En effet, divers traitements appliqués *in vitro* permettent leur re-différenciation en progéniteurs endocrines avant leur éventuelle transplantation dans un organisme diabétique de type 1. Par exemple, la transfection d'un adénovirus exprimant les gènes de PDX-1, NeuroD1 et MafA dans des iPSC entraîne une différenciation cellulaire proche du génotype de la lignée cellulaire β MIN-6 et leur transplantation reverse les hyperglycémies, dans un modèle murin [68]. Un autre équipe a proposé, en 2012, un procédé appliqué à des iPSC pour obtenir des cellules β -like n'utilisant pas de transfections et reposant sur les différentes étapes du développement embryonnaire du pancréas (Figure 1). L'injection des iPSC ainsi obtenues dans la capsule rénale entraîne une réponse au test de tolérance au glucose et à une diminution des hyperglycémies [69].

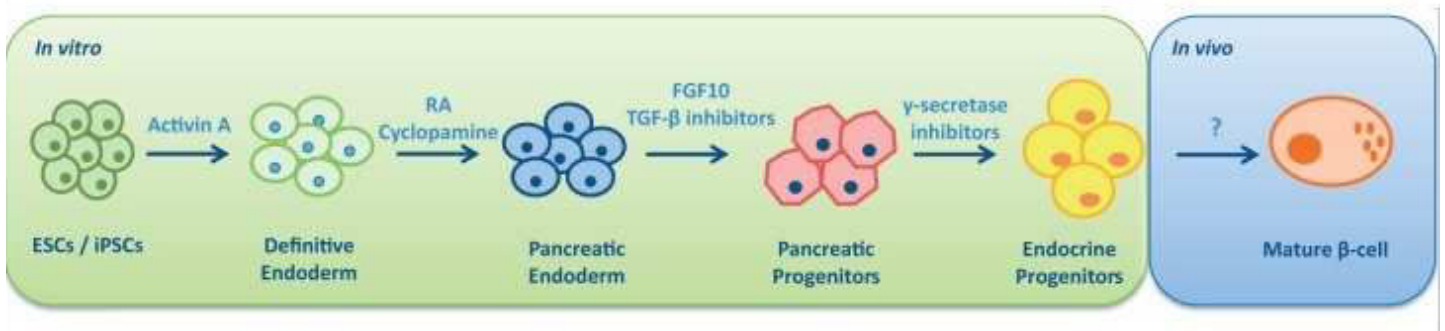


Figure 1 : Les iPSC : source de progéniteurs endocrines β -like.
(d'après Muir KR et al., 2014)

La première étape de différenciation repose sur l'application d'activine A qui mime le signal nodal dans la phase précoce du développement embryonnaire. La deuxième étape cible la spécification du pancréas en appliquant de l'acide rétinoïque (RA) et l'inhibition du signal hedgehog par la cyclopamine. La formation de cellules pancréatiques-like est ensuite obtenue par l'application de FGF (Fibroblast Growth Factor) et l'inhibition de l'activine A. Enfin l'utilisation d'inhibiteurs de la γ -sécrétase permet d'enrichir la population cellulaire en cellules endocrines.

La différenciation des iPSC en progéniteurs endocrines est aussi un atout majeur dans l'obtention de progéniteurs autologues, c'est-à-dire obtenus à partir du tissu même du patient à traiter. Les patients ne seraient ainsi pas exposés au rejet immunologique. Toutefois, à l'heure actuelle, il est impossible de différencier ces progéniteurs endocrines en cellules β entièrement fonctionnelles. De plus, la possibilité pour ces cellules de développer des tumeurs n'est pas écartée. En effet, la transfection des 4 facteurs de transcription à la cellule hôte pour

sa dédifférenciation entraîne une augmentation de l'expression de gènes oncogènes [70]. La transfection par virus soulève aussi le problème mutagène de cette technique. D'autres approches ont été développées pour contourner ces deux obstacles mais en obtenant un taux de dédifférenciation plus faible qu'avec les méthodes précédentes [71,72].

I.3.3.2. La xénogreffe d'îlots pancréatiques

L'absence d'une expression complète du phénotype de la cellule β dans les approches décrites précédemment a orienté la recherche vers le développement de la xénogreffe d'îlots de Langerhans. Le porc constitue actuellement la meilleure source d'îlots car il présente l'avantage de sécréter une insuline dont la structure est quasi identique à celle de l'humain, d'être une source potentiellement suffisante de cellules, d'être génétiquement modifiable en vue d'une immuno-modulation et de soulever très peu de problèmes éthiques [73]. Des résultats encourageants sur des primates non-humains ont pu être obtenus à partir de greffes d'îlots de porc «*wild type*» [74,75] ou génétiquement modifiés [76]. La xénogreffe doit toutefois faire face aux mêmes problèmes que la greffe d'îlots à savoir les réactions inflammatoires précoces et de rejet et les difficultés à obtenir un isolement performant d'îlots fonctionnels. Mais elle doit aussi faire face aux difficultés qui lui sont propres, à savoir la transmission de pathogènes spécifiques de l'espèce porcine et la lourdeur des traitements immunosuppresseurs (TIS) nécessaires dans les modèles de xénogreffes [73]. Une autre étude intéressante propose l'utilisation d'îlots du poisson tilipida, dont l'isolement est moins onéreux et plus facile à mettre en œuvre que chez le porc [77]. De par sa phylogénie le tilipida n'exprime pas le α (1,3) Galactose qui est à l'origine de production d'autoanticorps et est la principale cause de rejet de xénogreffes chez l'humain et le primate [78]. Par ailleurs, la vie marine du tilipida rend ses îlots pancréatiques moins sensibles à l'hypoxie consécutive à l'injection des îlots et sa modification génétique permet de produire une insuline semblable à celle de l'homme. Enfin, la transplantation de ces îlots encapsulés a montré des effets prometteurs chez le primate diabétique [77].

Le problème majeur de la xénogreffe est le rejet xénogénique discordant nécessitant un TIS très lourd. La réussite de cette procédure reposerait, entre autre, sur l'utilisation d'îlots encapsulés.

I.3.3.3. La greffe d'îlots encapsulés

L'objectif principal de l'encapsulation est de mimer les propriétés physiques des barrières naturelles biologiques. Elle assure ainsi une perméabilité sélective qui autorise le passage vers l'intérieur des nutriments et de l'oxygène et vers l'extérieur des sécrétions cellulaires et qui protègerait de l'influx des molécules sécrétées par le système immunitaire. L'intérêt majeur de l'encapsulation dans la transplantation d'îlots serait la possibilité de ne plus utiliser de TIS ou du moins de réduire considérablement leur emploi. La composition du matériel d'encapsulation, la taille des capsules et le site d'implantation sont déterminants dans l'obtention d'un système fonctionnel. L'alginate est le matériau le plus couramment utilisé car il résiste à l'oxydation et assure une perméabilité sélective. Toutefois, la stabilisation du gel nécessite l'utilisation de polymères polycationiques qui peut être associée à une altération de la fonction du greffon. Deux types de systèmes ont été développés, le système intravasculaire et le système extravasculaire. Dans le système intravasculaire, les îlots encapsulés sont injectés directement dans le sang. Ce système assure un contact direct des îlots avec les nutriments et l'oxygène mais il peut entraîner la formation d'un thrombus, nécessitant d'adjoindre à ce système un traitement anticoagulant lourd. Le système extravasculaire pallie ces phénomènes de thrombose mais limite l'approvisionnement en nutriments et en oxygène des îlots encapsulés. Dans ce système, deux types de capsules ont été développés, des microcapsules de 100 nm à 1 mm de diamètre, assurant une faible distance de diffusion pour l'oxygène et les nutriments, et des macrocapsules, de l'ordre du centimètre, dont la rugosité facilite la néovascularisation [79]. Les études sur le primate diabétique montrent que les macrocapsules sont plus performantes que les microcapsules quand elles sont implantées dans la capsule sous-rénale. Et les microcapsules s'avèrent aussi efficaces que les îlots non encapsulés lorsqu'elles sont implantées en intrapéritonéal (IP) à 10.000 IEQ (îlot équivalent)/kg [80]. Sur la base de ces derniers résultats, des études cliniques sur de petites cohortes de patients utilisant des microcapsules injectées en IP ou des macrocapsules injectées dans la paroi abdominale montrent une amélioration du contrôle glycémique et une diminution de la prise d'insuline exogène, sans utiliser de TIS [79]. Toutefois, toutes études confondues, très peu de patients atteignent l'insulino-indépendance et un tissu fibreux est détectable à la périphérie des capsules. De plus, l'observation d'îlots nécrotiques au sein des capsules témoigne d'un déficit dans la diffusion des nutriments et de l'oxygène jusqu'au centre de la capsule. Par ailleurs, malgré cette hypoxie nécrotique, l'importance du volume à transplanter restreint le site d'implantation à la cavité péritonéale. Les résultats prometteurs de

ces essais cliniques suggèrent une approche plus transversale de l'utilisation de l'encapsulation, en combinant, par exemple, l'encapsulation d'îlots pancréatiques et de facteurs endothéliaux de croissance comme le VEGF ou le FGF-1 [81,82].

Malgré un nombre élevé d'études sur le développement d'une source quasi illimitée de cellules β fonctionnelles et immunocompétentes, leurs applications à l'homme sont limitées par la nécessité de greffer une quantité suffisante de cellules et qui présentent une fonctionnalité cellulaire complète. C'est dans ce contexte que s'est développée la transplantation de pancréas et alternativement la greffe d'îlots pancréatiques qui permettent de greffer l'unité fonctionnelle de sécrétion d'insuline directement dédiée au contrôle de la glycémie.

I.4. La greffe d'îlots pancréatiques : thérapie substitutive d'intérêt clinique

I.4.1. Indications à la greffe d'îlots pancréatiques

I.4.1.1. Indication chez le diabétique de type 1 instable et le greffé rénal

1. Le patient diabétique de type 1 instable

La greffe d'îlots pancréatiques représente une indication légitime chez le diabétique de type 1 à grande instabilité glycémique. En effet, si la prévalence du diabète instable est faible (3 pour 1000 cas de diabète de type 1), ces patients présentent des risques de complications micro-vasculaires augmentés, un risque de mortalité accru et une détérioration majeure de leur qualité de vie avec de fréquentes hospitalisations [83]. L'étude française multicentrique TRIMECO en cours depuis 2010, dont le but est d'évaluer l'impact médico-économique de la transplantation d'îlots pancréatiques, montre que trois patients présentant un diabète instable sont décédés en liste d'attente de greffe d'îlots.

2. Le patient diabétique de type 1 greffé du rein

L'amélioration des résultats métaboliques de la greffe d'îlots pancréatiques permet de placer la greffe d'îlots pancréatiques comme une indication logique chez le diabétique de type 1 greffé du rein ou pouvant bénéficier d'une greffe simultanée de rein-îlots dans la mesure où son âge supérieur à 45 ans et ses complications macro-vasculaires contre-indiquent la transplantation pancréatique. Dans cette indication, le patient est déjà sous TIS pour sa greffe

de rein. L'obtention d'un équilibre métabolique optimal, dans cette indication, permet une préservation du greffon rénal, la survie du greffon rénal étant observée chez 73 % des patients bénéficiant d'une greffe simultanée de rein et d'îlots contre 42 % lorsqu'ils bénéficient d'une greffe de rein seule [84].

I.4.1.2. Indication dans le cas de diabètes secondaires

1. Diabète secondaire à une pancréatectomie

Si le bénéfice métabolique de la transplantation d'îlots pancréatiques s'avère supérieur à l'insulinothérapie optimisée et est en passe d'égaliser la transplantation pancréatique avec une morbidité moindre, son bénéfice à long terme soulève la question des effets secondaires des TIS. Dans ce contexte, la greffe d'îlots pancréatiques est une indication pertinente dans le diabète post-pancréatectomie pour lequel il est possible de proposer au patient une autogreffe d'îlots [85,86]. Les principales indications de l'autogreffe d'îlots pancréatiques sont les tumeurs bénignes du pancréas et les pancréatites chroniques sévères ou idiopathiques. L'autogreffe présente les meilleurs résultats en matière de greffe d'îlots avec 75 % des patients insulino-indépendants, trois ans après la greffe. Il est à noter que le bénéfice métabolique observé dans l'autogreffe d'îlots est obtenu avec moitié moins d'îlots greffés du fait de l'absence de rejet allogénique des îlots et de la non-utilisation du TIS dans l'autogreffe d'îlots [87].

2. Diabète de la mucoviscidose

La transplantation pulmonaire représente l'ultime possibilité de traitement chez le patient mucoviscidosique au stade de l'insuffisance respiratoire terminale. A ce stade, un patient sur deux présente un diabète particulier, difficile à équilibrer. L'existence d'un diabète antérieur à la greffe pulmonaire augmente la morbi-mortalité post-greffe [88]. Du fait de sa faible morbidité, la greffe d'îlots pancréatiques, combinée à celle du poumon issu du même donneur, est apparue comme une nouvelle approche du traitement de la mucoviscidose. Des observations récentes de greffes combinées de poumon et d'îlots pancréatiques ont été rapportées chez le patient atteint de mucoviscidose au stade de l'insuffisance respiratoire terminale. La greffe d'îlots a permis d'obtenir un contrôle glycémique optimal, la disparition des hypoglycémies et une réduction de 50% des besoins en insuline [89].

De manière générale et en dehors de l'autogreffe, la nécessité de recourir à un TIS globalement diabétogène et associé à de lourds effets secondaires, conduit à mettre en balance le bénéfice risque de la greffe pour le patient [90].

I.4.2. La procédure clinique de la transplantation d'îlots

La transplantation d'îlots comprend deux étapes, la première réalisée au laboratoire où sont pratiqués l'isolement des îlots à partir du pancréas d'un donneur en mort cérébrale, leur purification du tissu exocrine et leur mise en culture. La seconde est une étape hospitalière où est réalisée la greffe chez le patient diabétique, le plus souvent sous anesthésie locale. Elle est pratiquée par injection intraportale de la suspension d'îlots au moyen d'un cathétérisme transhépatique et sous contrôle échographique (Figure 2). Certaines équipes réalisent l'injection des îlots chirurgicalement par cathétérisation d'une veine épiploïque au cours d'une incision de Mac Burney.

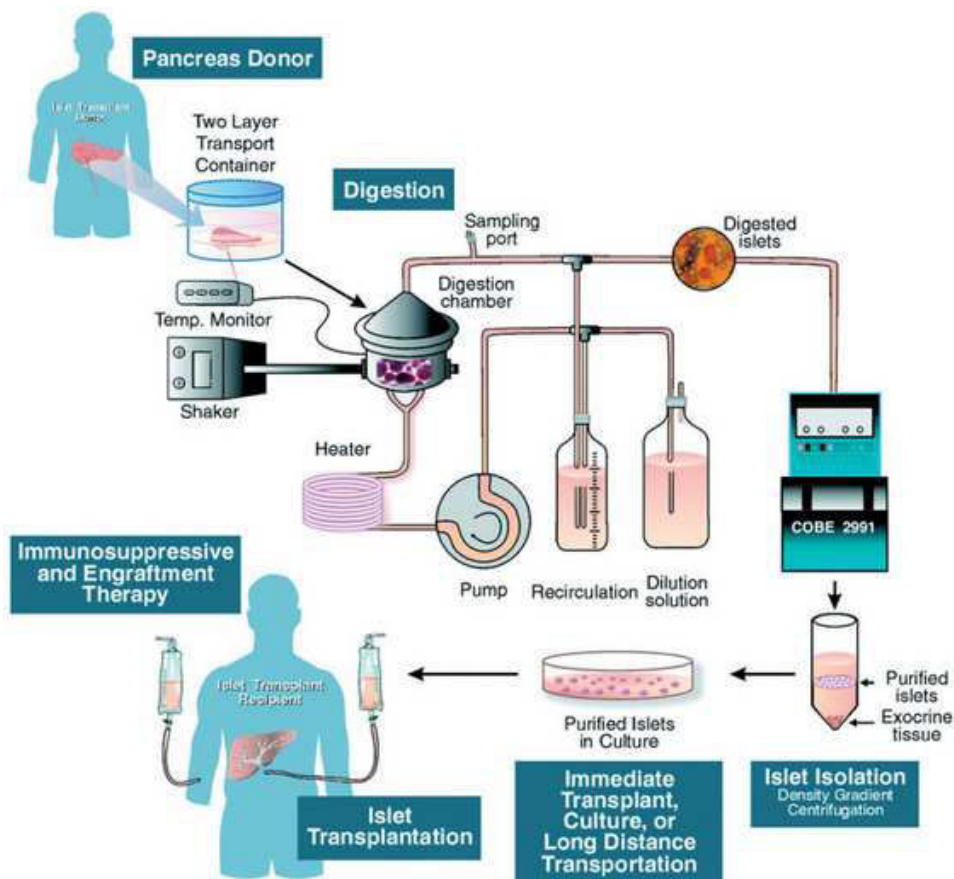


Figure 2 : Isolement et transplantation d'îlots pancréatiques : du donneur au receveur (d'après Merani S et Shapiro AM, 2006)

L'amélioration de la procédure d'isolement et de purification des îlots, de la technique de transplantation et des TIS ont permis de faire passer la transplantation d'îlots pancréatiques du statut de concept expérimental à un traitement clinique efficace pour un ensemble donné de patients [91,92]. Face au manque important de pancréas disponibles à la greffe d'îlots et au statut expérimental des autres sources de cellules β , l'optimisation du taux, de la viabilité, de l'intégrité et de la fonctionnalité des îlots à chaque étape de la procédure apparaît comme cruciale dans la réussite à long terme de la greffe d'îlots de Langerhans.

I.4.2.1. Critères de sélection du donneur

L'établissement des critères de sélection du donneur d'organes en mort cérébrale est le premier des piliers sur lequel repose le succès de la greffe d'îlots de Langerhans. Les critères d'inclusion sont relatifs à l'âge du donneur (<70 ans), la cause de la mort, l'index de masse corporelle (IMC), le temps d'ischémie froide (< 8h), le temps d'hospitalisation, l'utilisation de vasoconstricteurs ou la glycémie (< 16,7 mmol/L) [91]. A l'heure actuelle, les pancréas « optimaux » sont alloués à la greffe de pancréas et les pancréas de donneurs plus vieux ou à l'IMC plus élevé sont alloués à la greffe d'îlots. L'utilisation de donneurs à cœur arrêté pourrait constituer une autre source d'organes même si celle-ci se heurte à une ischémie précoce faisant suite à l'arrêt circulatoire. Quoique marginale, cette source d'organes, utilisée par l'équipe de Kyoto, a montré des résultats intéressants dans la greffe d'îlots à donneur unique [93].

I.4.2.2. Isolement et purification des îlots

Les expériences pionnières de Lacy et Kostianovsky en 1967 ont permis de montrer, pour la première fois, qu'il était possible d'isoler suffisamment d'îlots métaboliquement actifs à partir d'un pancréas de rat [94]. L'amélioration de l'isolement et de la purification des îlots n'a cessé de s'améliorer depuis afin de le rendre applicable à celui d'îlots humains. La procédure d'isolement actuelle repose sur la méthode semi-automatique développée par Camillo Ricordi en 1988 [95]. Elle minimise l'altération des îlots et l'intervention des chirurgiens et permet d'obtenir un taux élevé d'îlots purs. La première étape de l'isolement consiste en l'injection intraductale de collagénase qui entraîne la digestion enzymatique du tissu [96]. Combinée à une agitation mécanique, cette première étape permet de fractionner le tissu et de débiter la séparation du tissu endocrine de l'exocrine. La digestion enzymatique est une étape cruciale dans l'extraction d'un maximum d'îlots et dans le maintien de leur intégrité. La collagénase

serva est classiquement utilisée comme enzyme de digestion et est à l'heure actuelle le mélange enzymatique présentant les meilleurs résultats en clinique [97-99]. Toutefois, une des limites actuelles de la technique d'isolement est sa faible prédictibilité du fait d'importantes variations de l'activité de la collagénase en fonction des lots utilisés. Ainsi, une étude chez le porc propose d'accompagner la digestion enzymatique d'un inhibiteur de la trypsin, α 1-antitrypsin, ce qui permet d'augmenter la pureté des îlots [100]. L'isolation des îlots par cryogénie est une alternative à la procédure classique qui permet de ne pas utiliser d'enzyme de dégradation, parfois toxique pour la cellule et pouvant endommager l'intégrité de l'îlot. Cette technique a permis d'obtenir des îlots intacts plus larges et fonctionnels chez le porc [101].

La phase de digestion est ensuite suivie d'une phase de purification qui permet de séparer les cellules endocrines des cellules exocrines. Elle repose sur la différence de densité de ces deux populations cellulaires et utilise un gradient de densité de Ficoll. Les îlots ainsi purifiés sont ensuite immédiatement transplantés sur place ou transportés vers le receveur ou bien encore mis en culture.

1.4.2.3. Rendement de l'isolement d'îlots

Le rendement de l'isolement d'îlots est de 200.000 à 400.000 îlots par pancréas soit environ 50% des îlots totaux présents dans le pancréas. Le niveau de pureté des îlots greffés est situé entre 60 et 70% c'est-à-dire que la solution d'îlots greffés contient entre 30 et 40% de tissu endocrine. Le patient reçoit en moyenne entre 10.000 et 13.000 îlots équivalent/kg, ce qui nécessite, compte tenu du rendement de l'isolement, en moyenne deux injections pour reverser le diabète [102]. Toutefois, l'origine multi-donneur des îlots greffés expose le receveur à de multiples antigènes HLA. L'accumulation de mismatch avec les allèles HLA à chaque injection d'îlots est liée au risque de perdre le greffon [103]. La pénurie de donneurs s'ajoutant à ce constat, certaines équipes ont proposé d'utiliser un seul pancréas tout en améliorant la qualité des îlots greffés [104]. A ce titre, 10 centres ont rapporté une amélioration de la greffe à donneur unique et une atteinte de l'insulino-indépendance après une seule injection d'îlots [105]. L'utilisation d'Etanercept a particulièrement contribué à la réussite des greffes d'îlots à donneur unique et en particulier son association avec l'Exénatide a permis d'atteindre l'insulino-indépendance avec moitié moins d'îlots greffés [106-108]. L'étude d'Al-Adra décrit différents facteurs impliqués dans la réussite d'une greffe à donneur unique [109] dont l'injection peri-transplantation d'insuline et d'héparine pourrait être un facteur directement lié à l'atteinte de l'insulino-indépendance [110].

I.4.2.4. Mise en culture des îlots

La mise en culture pré-transplantation des îlots est une étape classique de la procédure de la greffe d'îlots. Actuellement, le débat sur l'utilisation d'îlots « frais » c'est-à-dire n'ayant pas été mis en culture plutôt que l'utilisation d'îlots pré-cultivés reste toutefois ouvert. En effet, la mise en culture confronte les îlots à la difficulté de maintenir leur viabilité en l'absence de leur vascularisation, détériorée lors de l'isolement. Certaines études sur des îlots humains ont montré une perte de 35% des îlots humains après trois jours de culture et une augmentation de l'expression des gènes de l'apoptose. De plus, la greffe d'îlots humains frais chez une souris NUDE présentée de meilleurs résultats que la greffe d'îlots mis en culture [111]. Toutefois, la mise en culture des îlots permet à la fois de réaliser les tests microbiologiques et fonctionnels des îlots, d'augmenter leur pureté et de compenser les dommages cellulaires engendrés par l'isolement. La mise en culture des îlots avant leur greffe est donc utilisée dans la procédure standard et l'enjeu est d'apporter aux cellules suffisamment de nutriments et d'oxygène pour se maintenir fonctionnelles.

La recherche d'un protocole optimal de culture a conduit au développement de co-cultures, de compléments chimiques ou de modifications génétiques.

1. *Co-culture et co-transplantation*

La culture d'îlots légèrement impurs [112] ainsi que la co-culture avec des cellules ductales [113] limitent l'apoptose des îlots isolés et améliore leur fonctionnalité pré-greffe. Dans la continuité de l'utilisation de cellules souches, la co-culture et la co-transplantation des îlots avec des cellules facilitant la prise de la greffe, comme les cellules souches mésenchymateuses (MSCs : *mesenchymal stem cells*) ou des progéniteurs endothéliaux ont été étudiées. Les MSCs sont des cellules stromales non-hématopoïétiques multipotentes se trouvant principalement dans la moelle osseuse et en plus faible quantité dans le muscle squelettique, les tissus adipeux, le liquide amniotique et le cordon ombilical [114]. Elles peuvent se différencier en cellules d'origine mésenchymateuse comme les ostéoblastes, les adipocytes et les chondrocytes mais aussi en cellules d'origine endodermale comme les cellules à insuline [115]. En plus de ces capacités de différenciation, les MSCs sécrètent des facteurs pro-angiogéniques [116] et présentent des propriétés d'immuno-modulation [117]. De part ces deux particularités, la co-transplantation d'îlots de Langerhans avec des MSCs s'avère particulièrement intéressante. A ce titre, les MSCs améliorent la prise de la greffe en favorisant la mise en place d'une nouvelle vascularisation insulaire et en limitant les effets

cytotoxiques de l'hypoxie. De plus, les cytokines sécrétées par les MSCs contrôlent localement la différenciation des monocytes auto-réactifs, prévenant ainsi la destruction auto-immunitaire des îlots greffés [117]. Avec le même objectif d'assurer une vascularisation rapide des îlots greffés, une étude récente a montré que la co-transplantation d'îlots pancréatiques avec des progéniteurs endothéliaux chez un rat diabétique rétablissait un contrôle glycémique ainsi que la mise en place d'un réseau vasculaire *de novo* 6 mois après la greffe [118]. Des protocoles cliniques sont actuellement en cours afin d'étudier la co-transplantation de cellules souches mésenchymateuses médullaires et d'îlots pancréatiques.

2. Complémentation du milieu de culture et modifications génétiques

L'ajout de composants de la matrice extracellulaire comme le collagène ou la laminine améliore la viabilité des îlots en culture [119]. D'autres molécules anti-apoptotiques ou anti-inflammatoires peuvent aussi être utilisées en pré-traitement avant la greffe (cf partie II.2). L'état d'hypoxie consécutif à la destruction de la vascularisation des îlots est un des facteurs limitant de la prise de la greffe. Ainsi, il a été proposé de limiter les effets délétères de l'hypoxie par la transfection de gènes associés à des facteurs de croissance ce qui améliore la revascularisation de l'îlot [120]. Mais cette approche génétique ne présente pas encore toutes les assurances nécessaires à une utilisation en clinique. D'autre part, pour éviter les risques liés à la thérapie génique, la surexpression du facteur de transcription HIF-1 α , responsable de la transcription du gène du VEGF est possible par application de déféroxamine. Ce pré-traitement stimule la revascularisation des îlots et permet la restauration du nombre de cellules fonctionnelles productrices d'insuline [121].

A l'heure actuelle de nombreux protocoles de culture ont été étudiés pour maintenir l'intégrité dimensionnelle et fonctionnelle des îlots et il apparaît maintenant nécessaire de standardiser ces protocoles de culture dans tous les centres d'isolement.

I.4.2.5. Site d'implantation des îlots

La suspension d'îlots est diluée dans 150 ml de serum physiologique complétée avec 19,6% d'albumine humaine, puis conditionnée sous poche de transfusion. L'injection des îlots s'effectue classiquement dans la veine porte par cathétérisme transhépatique. Les 150cc de milieu contenant les îlots et 70 unités/kg d'héparine sont introduits par gravité sous contrôle échographique et contrôle de la pression veineuse portale. Le cathéter est ensuite retiré et une colle biologique (Avitene) est insérée pour limiter l'hémorragie au point d'injection. Le traitement à l'héparine est maintenu pendant 48h en post-greffe puis pendant 7 jours avec une héparine de faible poids moléculaire (enoxaparine) [105]. La faible morbidité caractéristique de la greffe d'îlots pancréatiques est principalement due à la maîtrise de cette étape. En effet, le risque hémorragique au point de ponction oscille entre 6 et 10 % et ceci grâce à l'expertise des centres, l'utilisation de protocoles d'héparinothérapie de mieux en mieux définis et enfin l'utilisation de colle biologique le long du trajet percutané.

Le site hépatique d'injection assure à la procédure d'être peu invasive et la possibilité de réguler la glycémie par production portale d'insuline. Toutefois, le risque de thrombose et d'hémorragie reste important. La tension de l'oxygène plus faible dans le foie que dans le pancréas ainsi que la réaction inflammatoire précoce consécutive au contact des îlots avec le sang du receveur, connue sous le nom d'IBMIR (*Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction*) résulte en une perte précoce des îlots. Des études actuelles reposent sur la recherche d'un site optimal extrahépatique qui puisse recevoir un large volume d'îlots, limiter la réaction de l'hôte, être proche du réseau vasculaire, être facile d'accès et éventuellement explantable. De nombreux sites ont été étudiés comme la capsule rénale, la rate, le pancréas, l'omentum, la cavité péritonéale, la moelle osseuse et l'espace sous-cutané [122]. Toutefois, pour certains de ces sites le passage de l'expérimental au clinique est parfois limité. Par exemple, l'utilisation de la capsule rénale comme site d'implantation nécessite moins d'îlots pour réverser l'hyperglycémie chez la souris. Chez l'homme, une quantité plus importante d'îlots est nécessaire dans la capsule rénale en comparaison de l'injection intraportale et l'intervention est plus invasive [123]. L'espace sous-cutané comme site alternatif présente actuellement une piste particulièrement intéressante. En effet, ce site est facile d'accès et pourrait permettre des biopsies, particulièrement difficiles à mettre en œuvre avec l'injection intraportale. Certaines équipes ont ainsi développé des dispositifs sous-cutanés variés et explantables ou des systèmes d'encapsulation d'îlots ou bien encore une combinaison des

deux. L'objectif est d'offrir à l'îlot un environnement nutritionnel et gazeux suffisant et de le préserver des réactions immunes et inflammatoires. A ce titre, un dispositif pré-vascularisé associé à une chambre oxygénée a été développé par Barkai et est actuellement à l'essai [124]. L'implantation dans la cavité péritonéale de cette chambre oxygénée, contenant des îlots pancréatiques, chez un patient diabétique de type 1 assure le maintien des fonctions des îlots, pendant 10 mois, sans TIS [125]. Le développement de tels dispositifs présente un intérêt majeur du fait qu'ils assureraient un accès et un retrait facile du dispositif, une réduction conséquente du TIS rendant d'autant plus possible l'utilisation de cellules- β like décrites précédemment [91].

I.4.2.6. Monitoring des îlots greffés

A l'heure actuelle, le suivi de la fonction des îlots greffés est difficile à mettre en œuvre. En effet, la biopsie est la méthode la plus couramment utilisée dans le cadre du suivi du greffon d'organe. Or dans le cas de la greffe d'îlots elle est peu informative et aléatoire du fait de la dispersion des îlots dans l'arbre vasculaire hépatique. De plus, la variation des marqueurs liés à l'état du greffon, comme le besoin en insuline ou le C-peptide, ne sont observables que lorsque que 95% du greffon est détruit. Ainsi, actuellement, il n'existe pas de marqueurs précoces cliniques permettant le suivi de la greffe.

1. Approche par imagerie

Le développement de l'imagerie pourrait apporter une solution non invasive, non toxique pour les îlots et de routine au monitoring des îlots. A l'heure actuelle, les techniques d'imagerie par résonance magnétique (MRI : *magnetic resonance imaging*) et tomographie par émission de positrons (PET : *positron emission tomography*) sont les plus avancées. Les obstacles majeurs rencontrés par ces techniques sont liés au type de traceur utilisé, à leur capture par les îlots et à leur perte progressive après contact des îlots avec le sang, limitant ainsi le monitoring à long terme des îlots [126,127].

2. Marqueurs circulants de l'état du greffon

En parallèle, les recherches portent sur le développement de marqueurs de suivi de la masse et de la fonction β insulaire. Bien que des études complémentaires soient nécessaires, les miRNAs pourraient s'avérer être des marqueurs prometteurs du suivi de l'état des cellules β greffées comme c'est déjà le cas dans le monitoring du DT1 [128]. De la même manière, l'équipe genevoise a montré que le dosage de l'ARNm de l'insuline pouvait être informatif

sur l'altération de la fonction des îlots mais ne permet pas de déterminer la cause de la perte cellulaire [129].

Par ailleurs, notre équipe a montré que le taux de microparticules (MPs), microvésicules émises par une cellule en condition de stress et circulantes chez le patient greffé d'îlots, varie en accord avec l'état du greffon. En effet, un pic de MPs totales précède la chute du C-peptide témoignant de la perte de fonctionnalité du greffon [130] (Figure 16). Ainsi les MPs circulantes chez le patient greffé pourraient constituer un marqueur précoce de la perte du greffon.

En complément, une étude clinique très récente chez des patients recevant une autogreffe d'îlots après pancréatectomie totale a montré une augmentation importante du taux circulant de HMGB1 (*High-mobility group protein B1*) en peri-transplantation et 24h après la greffe. On ne retrouve pas une telle augmentation dans le groupe des pancréatectomies seules [131]. L'HMGB1 est un médiateur de l'inflammation sécrété par les îlots et les macrophages et particulièrement lors de la réaction inflammatoire précoce ayant lieu immédiatement après la greffe. De manière intéressante, il y a une différence significative dans la sécrétion de HMGB1 circulant chez les patients qui atteignent l'insulino-indépendance et ceux qui ont de nouveau recours à l'insuline. Ces récents résultats avec ceux déjà obtenus *in vitro*, suggèrent que le HMGB1 trouvé dans le sérum des patients pourrait être un biomarqueur clinique de la destruction des îlots de Langerhans.

I.4.2.7. Traitement immunosuppresseur

Afin de prévenir d'un rejet post-greffe, le patient est traité par un TIS induisant la diminution de la réponse immunitaire du receveur vis-à-vis du greffon. La maîtrise du TIS est un paramètre déterminant dans la réalisation et la réussite à long terme de la greffe car la plupart des molécules immunosuppressives sont délétères pour la cellule β . Son utilisation est donc à mettre en regard d'un équilibre entre efficacité et toxicité. C'est pourquoi le cocktail d'immunosuppresseurs utilisé est en permanence amélioré. En effet, à la suite des 267 greffes réalisées en 1990 qui ont abouti à seulement 8,4% d'insulinodépendance à 1 an post-greffe, la composition du TIS a été revue. En 1990, le TIS était composé d'un antilymphocyte, de cyclosporine (inhibiteur de la calcineurine), d'azathioprine (inhibiteur de la biosynthèse des nucléotides) et de glucocorticoïdes [102]. En 2000, le protocole d'Edmonton apporte sa plus grande contribution en supprimant les corticoïdes du TIS. Il est alors composé d'une combinaison de sirolimus (Rapamun®, inhibiteur de mTOR) à forte dose et de faibles doses

de tacrolimus (Prograf®, inhibiteur de la calcineurine). L'induction de la greffe se fait par injection de thymoglobuline pour la première injection d'îlots puis par injection de daclizumab, un anti-récepteur de l'IL-2, lors de la deuxième injection d'îlots. Depuis 2000, ce protocole s'est affiné en ajoutant un anti-TNF- α (Etanercept) et en remplaçant, dans certains protocoles, le sirolimus par un inhibiteur de la déshydrogénase inosine monophosphate comme l'acide mycophénolique [107]. En effet, le sirolimus diminue la prolifération des cellules endothéliales donc limite la revascularisation des îlots chez le receveur. De plus, il ne permet pas de limiter la prolifération des LT auto-réactifs en post-greffe d'îlots, ce que permet l'acide mycophénolique [132]. L'équipe de Posselt. a montré qu'en absence d'inhibiteur de la calcineurine, l'utilisation de belatacept (inhibiteur de l'interaction CD80-CD-86) associée à une déplétion des LT suffisait à atteindre l'insulino-indépendance à 1 an et 2 ans, à partir d'un ou deux donneurs [133].

I.4.3. Résultats et limites de la greffe d'îlots de Langerhans

I.4.3.1. Avancées importantes ces 10 dernières années

750 transplantations d'îlots ont été réalisées ces 10 dernières années dans 30 centres de transplantation dont celui de l'Université d'Alberta à Edmonton est le plus actif. Cette pratique est ainsi passée d'une stratégie expérimentale à une thérapie clinique standard reconnue. Les données du CITR (*Collaborative Islet Transplant Registry*) les plus récentes indiquent que sur 677 greffes totales 66%, 55% et 44% des receveurs sont insulino-dépendants à 1 an, 2 ans et 3 ans respectivement après la greffe, entre 2007 et 2010 contre 27% à 3 ans entre 1999 et 2002 [107]. Ces améliorations sont à associer à un maintien du taux de C-peptide, une réduction de HbA1c et du taux de ré-injection (48% en 2007-2010 vs. 60-65% en 1999-2002 à 3 ans) et à l'absence d'hypoglycémies sévères dans 90% des cas. On observe une survie du greffon (C-peptide \geq 0,3ng/ml) à 1 an de 92% et à 3 ans de 83%. De plus, l'utilisation d'Etanercept et d'alemtuzumab (anti-CD52) pour la déplétion en LT ont permis d'atteindre un pourcentage d'insulino-indépendance à 5 ans entre 50 et 60 % [106,107]. D'autre part, les données du GRAGIL (Groupe Rhin-Rhône-Alpes-Genève pour la transplantation d'Îlots de Langerhans) indiquent que la disparition des hypoglycémies améliore de façon significative la qualité de vie des patients, même chez le patient pour qui la reprise d'un traitement insulinique à petite dose est nécessaire. Cette amélioration repose sur une meilleure satisfaction de l'état de santé globale et une diminution du retentissement du diabète [134].

Peu de résultats sont actuellement accessibles concernant la survie des patients à long terme. Mais quelques études suggèrent un effet protecteur de la greffe sur les complications dégénératives du diabète. Il s'agit principalement d'études sur une durée d'1 an concernant de petits échantillons de patients et pour la plupart non contrôlées et rétrospectives. Sur un plan macrovasculaire, le groupe de Fiorina rapporte une augmentation de l'épaisseur de l'intima et de la média chez le diabétique de type 1 greffé du rein en échec de greffe d'îlot, en comparaison avec un groupe présentant les mêmes caractéristiques mais présentant une greffe fonctionnelle d'îlots [135]. Sur un plan rénal, ce dernier groupe montre une augmentation de la survie du greffon rénal lorsque le greffon cellulaire pancréatique est fonctionnel. De plus, la survie des patients est améliorée dans le cas d'une transplantation rein-îlots avec 90% de survie à 7 ans contre 51% en greffe de rein seul [136]. Enfin au plan ophtalmique, la greffe d'îlots pancréatique seule est associée à une stabilité de la rétinopathie diabétique [137].

I.4.3.2. Comparaison avec l'insulinothérapie et la greffe de pancréas

1. Greffe d'îlots versus insulinothérapie

La question actuelle est celle de l'efficacité de la greffe d'îlots par rapport à la greffe de pancréas et aux thérapeutiques d'insulinothérapie optimisées, représentées par la pompe à insuline implantée et la pompe externe couplée à la mesure continue du glucose. Une étude prospective comparant la greffe d'îlots pancréatiques à l'insulinothérapie intensive (multi injections ou pompe à insuline) chez 42 diabétiques de type 1 instables montre dans le groupe « greffe d'îlots », après trois ans de suivi, une amélioration de l'HbA1C à 6,7 % contre 7,5 % dans le groupe « insulinothérapie ». Cette amélioration métabolique est associée à une diminution de la progression de la rétinopathie [138]. L'équipe de Lille a également montré une supériorité de la greffe d'îlots par rapport au traitement par pompe à insuline implantée, du point de vue du contrôle métabolique avec une amélioration de l'HbA1C, une disparition des hypoglycémies et une diminution des besoins en insuline. Tous ces résultats sont à mettre en regard d'une augmentation des effets indésirables liés au TIS dans le groupe « greffe îlots » par rapport au groupe « pompe implantée » [139]. Actuellement, nous ne disposons pas de données comparant la greffe d'îlots à la pompe externe à insuline couplée à la mesure continue du glucose qui tend à devenir le standard du traitement diabétique de type 1 à grande variabilité glycémique.

2. *Greffe d'îlots pancréatiques ± rein versus greffe du pancréas ± rein*

L'équipe de Shapiro, en utilisant un nouvel immunomodulateur lymphocytaire, l'Alemtuzumab, rapporte à cinq ans 62 % d'insulino-indépendance après la greffe d'îlots à donneur unique. Ces résultats sont en passe d'égaliser la greffe de pancréas qui fait état de 75 % d'insulino-indépendance à cinq ans. Enfin, l'équipe de Zürich rapporte à cinq ans un profil métabolique comparable entre la greffe de rein-pancréas et la greffe simultanée de rein-îlots pancréatiques chez le diabétique de type 1. En effet, on observe une HbA1C inférieure à 6 %, dans les deux groupes alors que seulement 30 % des patients sont insulino-indépendants dans le groupe rein-îlots contre 90 % dans le groupe rein-pancréas. La morbidité de la transplantation pancréatique est particulièrement élevée puisque 40 % de ré-intervention chirurgicale ont été nécessaires dans le groupe rein-pancréas et 0% dans le groupe rein-îlots [140].

I.4.3.3. Limites de la greffe d'îlots pancréatiques

Les limites de la greffe d'îlots pancréatiques se situent aux différentes phases de la procédure : pré-transplantation, peri-transplantation et post-transplantation. Ainsi, la source restreinte et la variabilité du recueil des organes apparaissent comme les limites pré-greffe ainsi que l'évaluation de la qualité des cellules greffées. En effet, il n'existe pas de lien direct entre le test de production d'insuline et la fonction des cellules une fois greffées. En péri-transplantation, le site d'implantation hépatique de la greffe est une limite majeure de la procédure, le foie concentrant les drogues immunosuppressives, délétères à la cellule β . Enfin, la réaction inflammatoire précoce, la difficulté des îlots à établir une nouvelle vascularisation, la récurrence de l'auto-immunité, l'allo-réactivité, le TIS et l'absence de marqueurs précoces de la perte du greffon s'ajoutent à ces limites.

Parmi l'ensemble des facteurs auxquels se heurtent la greffe d'îlots de Langerhans, la réaction inflammatoire précoce est un élément déterminant pour la survie des îlots au long terme. En effet, cette réaction inflammatoire limite les résultats des approches utilisant l'injection intraportale des îlots comme la xéno greffe, l'autogreffe et l'allogreffe d'îlots libres. Une meilleure connaissance des mécanismes de cette réaction et de son contrôle pourrait permettre d'améliorer les résultats cliniques de la greffe d'îlots libres et permettre aux thérapies nouvelles de véritablement émerger.

II. La réaction IBMIR : altération précoce non-immune des îlots pancréatiques greffés

II.1. Mécanismes physiopathologiques de la réaction IBMIR

II.1.1. Définition

La réaction inflammatoire précoce IBMIR (*Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction*) est mise en jeu lors du contact des îlots avec le sang portal du receveur. Cette réponse inflammatoire et thrombotique est spécifique de la greffe d'îlots pancréatique et est caractérisée par l'infiltration leucocytaire, l'expression de facteur tissulaire (TF : *Tissue Factor*), l'activation et l'adhérence des plaquettes à la surface des îlots et l'activation de la coagulation et du complément (Figure 3). L'enclenchement de ces différents mécanismes cellulaires conduit à l'altération précoce de l'intégrité et de la fonctionnalité des îlots. L'IBMIR est la cause principale de la perte précoce des îlots au cours d'une xéno greffe, d'une allogreffe ou d'une autogreffe [141]. Le marquage des îlots et leur suivi par imagerie a permis de mettre en évidence une perte de 25% des îlots immédiatement après la greffe [142]. En clinique, l'IBMIR est caractérisée par une augmentation systémique de la concentration en cytokines IL-6 et Il-8, du complexe thrombine-anti-thrombine (TAT) et du taux de C-peptide sanguin immédiatement après la greffe [143]. L'IBMIR prend naissance dans les phénomènes pro-inflammatoires pré-greffe qui maximisent le potentiel inflammatoire des îlots puis se déclenche en peri-transplantation pour s'amplifier en post-transplantation.

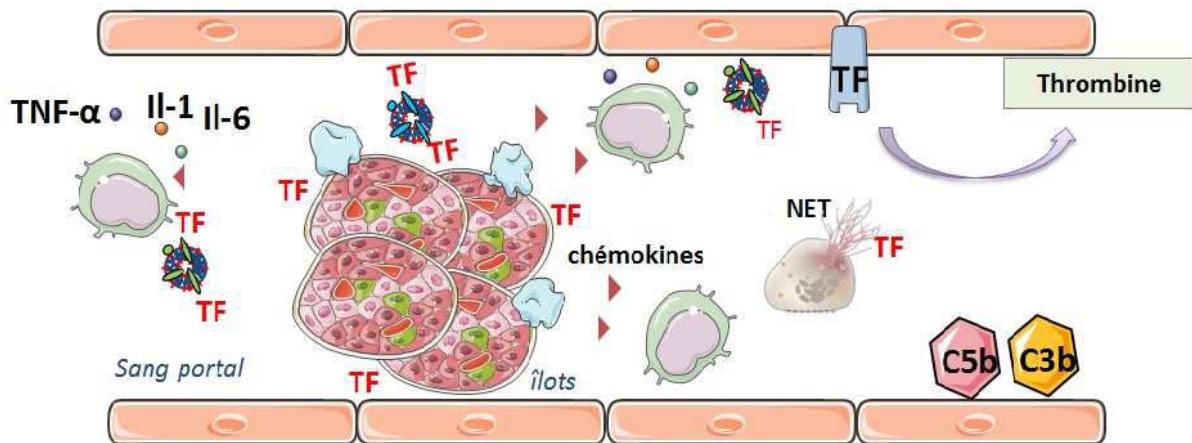


Figure 3 : Schéma des réactions inflammatoires et thrombotiques de la réaction IBMIR

La réaction IBMIR est le siège d'un recrutement chimiotactique des macrophages au voisinage de l'îlot après le relargage de chémokines par les îlots et les fragments cellulaires de tissu exocrine. Elle est caractérisée par la production locale de cytokines, d'activation systémique de la coagulation, et du complément, l'expression du TF et l'activation de la NETose par les neutrophiles.

II.1.2. L'IBMIR : une réaction inflammatoire

II.1.2.1. Une réaction inflammatoire présente en pré-transplantation

1. *L'orage cytokinique chez le donneur*

A la mort cérébrale du donneur, les modifications hémodynamiques et métaboliques entraînent une sécrétion systémique importante de cytokines, connue sous le nom d'orage cytokinique. Ce contexte pro-inflammatoire est à l'origine d'une altération globale des organes du donneur pouvant mettre en péril la réussite des transplantations ultérieures [144]. Au niveau du pancréas, les cellules de l'immunité infiltrent le tissu et des médiateurs inflammatoires sont alors sécrétés, entraînant dès lors une dysfonction et une apoptose β cellulaire. L'injection d'un inhibiteur de l'élastase, le Sodium Sivelestat, chez le donneur en mort cérébrale, permet, en limitant l'activité de cette enzyme sécrétée par les neutrophiles activés, d'améliorer le rendement de l'isolement d'îlots ainsi que leur viabilité [145].

2. *L'ischémie, début de l'hypoxie insulaire*

Les îlots sont en condition d'hypoxie dès le début du clampage de l'organe jusqu'au déclampage et la revascularisation chez le receveur. La maîtrise du temps d'ischémie apparaît donc importante dans l'obtention d'îlots de qualité. Un temps d'ischémie froide supérieure à 8h entraîne d'importants dommages, une perte de fonctionnalité des îlots humains et une baisse du rendement de l'isolement [146]. L'hypoxie entraîne une apoptose, l'activation de la

voie NF- κ B ainsi que la sécrétion de MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) permettant l'infiltration des macrophages au sein des îlots.

3. *L'isolement et la culture des îlots*

La procédure d'isolement d'îlots entretient l'état pro-inflammatoire dans lequel se trouve les îlots dans le pancréas du donneur. En effet, la digestion enzymatique ainsi que le stress mécanique induisent la sécrétion de médiateurs inflammatoires. Il a été ainsi montré qu'immédiatement après l'isolement et la mise en culture, les îlots expriment du TF et sur-expriment des gènes associés à l'inflammation et à l'apoptose *via* l'activation de la voie NF- κ B. De plus, la sécrétion de molécules pro-inflammatoires telles que l'IL-8, IL-6, MCP-1, SFD-1, MEC, cyclo-oxygénase-2 et HMGB1 est particulièrement élevée 1 jour après la mise en culture [147]. Cette dernière protéine est particulièrement intéressante et son implication dans la greffe d'îlots a été récemment mise en évidence. Le HMGB1 appartient à la famille des protéines de la chromatine et interagit avec les histones, les facteurs de transcription et les nucléosomes. Elle est sécrétée par les macrophages et les monocytes activés et se comporte comme un médiateur de l'inflammation. Récemment, il a été démontré que la sécrétion d'HMGB1 était directement associée aux modifications métaboliques ayant lieu à la mort du donneur, à la procédure de digestion enzymatique et à la sécrétion en culture d'IL-8, CXCL1, IFN- γ et de chémokines CXCL10 et CXCL9 [148].

Les voies des MAPK p38 et JNK sont aussi activées après l'isolement des îlots et sont majorées lors de la perte des îlots en culture [149]. Comme la plupart de ces médiateurs inflammatoires sont produits immédiatement après l'isolement, la co-culture des îlots avec des traitements anti-inflammatoires apparaît intéressante pour diminuer leur potentiel pro-inflammatoire.

II.1.2.2. Une réaction inflammatoire exacerbée en péri- et post-transplantation

1. *La réaction inflammatoire*

Lors de l'IBMIR, l'activation majeure de l'inflammation se traduit par des concentrations circulantes de médiateurs de l'inflammation et se combine à la présence de marqueurs de l'activation de la coagulation. Une hausse des concentrations circulantes d'IL-6, d'IL-8 et d'interferon γ *induced protein* (CXCL10) a été rapportée dans une cohorte de 24 patients greffés d'îlots [150]. Les macrophages infiltrants sécrètent de l'IL-1 β qui induit la sécrétion d'autres médiateurs inflammatoires par les îlots comme l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α et le MCP-1

[149]. En plus de ces cytokines, les îlots pancréatiques sécrètent des chémokines comme CXCL10, CXCL8 et MCP-1. Ces molécules sont déterminantes dans la migration macrophagique à l'origine de l'infiltration délétère des leucocytes au sein des îlots greffés [151]. De plus, l'activation des plaquettes joue un rôle direct dans la réaction inflammatoire en libérant des médiateurs de l'inflammation, des récepteurs de chémokines, des prostaglandines et des microparticules. Elles jouent aussi un rôle indirect en activant le système du complément et la cascade des kinines. Ce contexte inflammatoire induit une production importante de ROS auxquels les cellules β sont particulièrement sensibles du fait de leur faible expression d'enzymes anti-oxydantes comme la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase.

2. *Implication du système immunitaire*

Les cellules de l'immunité jouent un majeur dans l'amplification de l'IBMIR. La sécrétion importante d'IL-1 β et de TNF- α par les macrophages résiduels des îlots, les neutrophiles ainsi que les cellules hépatiques de Kupffer est à l'origine d'une altération de l'insulino-sécrétion et d'apoptose β cellulaire lors de l'IBMIR. Les causes de l'activation des cellules de Kupffer sont multiples. La présence de résidus de tissu exocrine et en particulier la libération du contenu enzymatique des cellules acinaires entrainerait l'activation de ces cellules [149]. De plus, la libération de chémokines comme le CCL-3 et CCL-5 par les îlots entraine une migration et une activation importante des cellules de Kupffer [149]. Enfin, dans un modèle murin de greffe syngénique, il a été montré que les îlots endommagés contiennent un taux élevé de HMGB1 qu'ils libèrent immédiatement après la greffe. Cette libération entraine l'activation des cellules de Kupffer qui sécrètent à leur tour de l'HMGB-1, de l'IL-12 et de l'IL-6. L'IL-12 constitue une boucle d'amplification délétère favorisant l'activation des cellules NK et la production d'INF- γ délétère pour les îlots (Figure 4). Un traitement par un anti-HMGB1 permet un meilleur contrôle glycémique chez les souris greffées d'îlots [152].

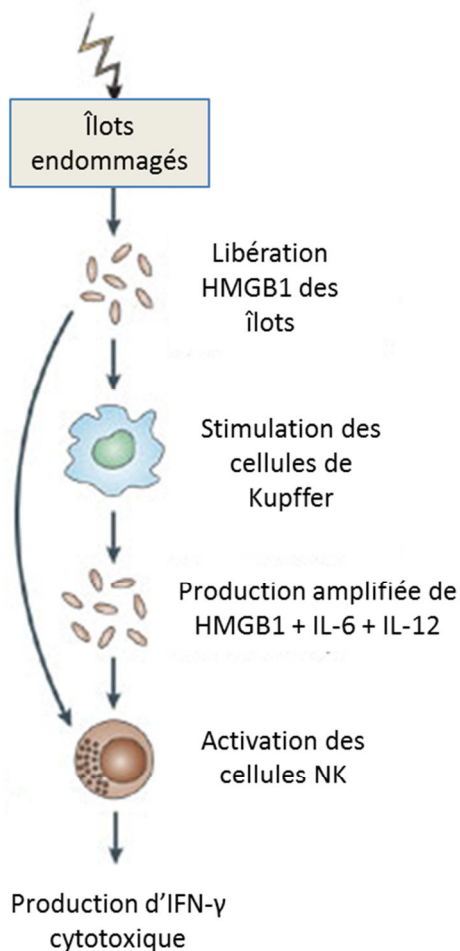


Figure 4 : Implication de HMGB1 dans l'enclenchement de l'IBMIR

D'autre part, la présence d'APCs à l'intérieure des îlots serait responsable d'une amplification de la réaction inflammatoire par les lymphocytes. En effet, une étude récente montre que 67% des cellules immunitaires contenues dans les îlots sont des APCs et 50% de ces APCs sont des LB [153]. Dans un contexte auto-immun comme celui du DT1, la sécrétion des cytokines IL-15 et IL-7, élevée immédiatement après la greffe contribue à la persistance de l'auto-immunité en augmentant le nombre de LT enrichis en GAD65 auto-réactifs [132].

II.1.3. L'IBMIR : une activation de la coagulation et du système du complément

II.1.3.1. **Activation majeure de la coagulation durant l'IBMIR**

La réaction pro-thrombotique caractérisant l'IBMIR est la conséquence d'un déclenchement anormal de l'hémostase au sein de la micro-vascularisation hépatique. La coagulation met en jeu des facteurs (F) plasmatiques circulant sous la forme de zymogènes (FII, VII, IX, X et XI) qui développent une activité catalytique de type sérine-protéase en présence de deux cofacteurs (FV et FVIII) (Figure 5).

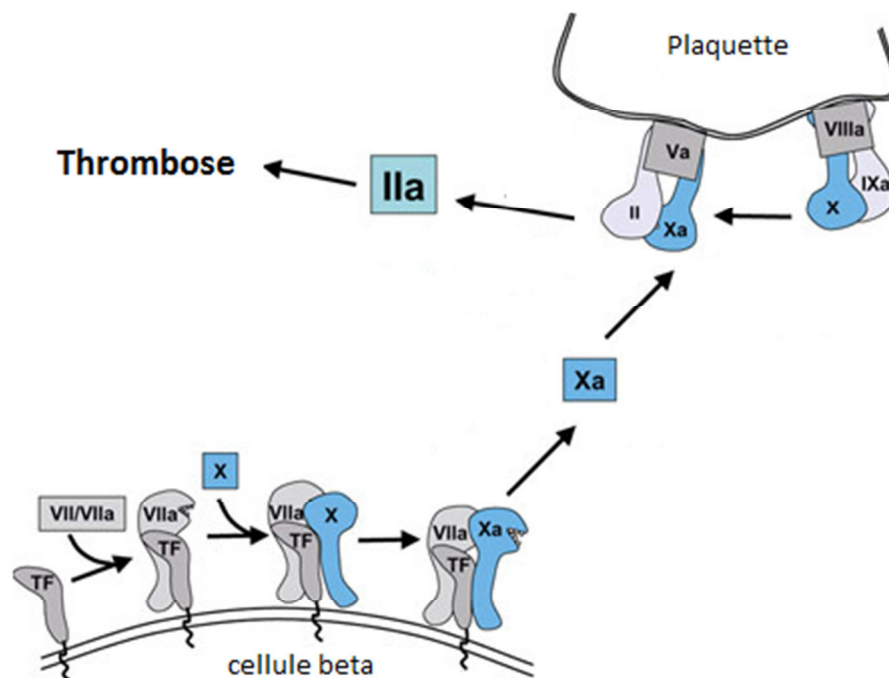


Figure 5 : Le facteur tissulaire : initiateur de la cascade de coagulation
(d'après Riewald M et Ruf W, 2002)

L'initiation de la coagulation se fait grâce au TF, une protéine membranaire dont l'expression est inductible dans les monocytes macrophages et les cellules endothéliales vasculaires. Dans les conditions inflammatoires de l'IBMIR, l'exposition de phospholipides anioniques comme la phosphatidylsérine (PhSer), par les macrophages stimulés ou apoptotiques, potentialise l'activité du TF et entraîne la fixation du FVII et son activation en FVIIa. Les complexes FT-FVIIa activent alors les FVII et FX. Les premières traces de thrombine formée par l'action du FXa sur la prothrombine vont conduire à des boucles d'amplification : (1) l'activation des

plaquettes exposant de la PhSer, (2) l'activation du cofacteur V qui se fixe sur les phospholipides anioniques et avec le FXa constitue le complexe enzymatique prothrombinase capable d'activer beaucoup plus efficacement la prothrombine, (3) l'activation du cofacteur VIII qui s'assemble alors avec le FIXa sur les phospholipides anioniques et accélère la conversion du FX en FXa. L'activation de ce système d'interactions complexes, initiée par le TF à la surface des cellules et des microparticules (chapitre III), entraîne la production accrue de thrombine capable de transformer le fibrinogène soluble en un réseau de fibrine polymérisée. Ce réseau de fibrine participe à la formation, à la croissance du thrombus et isole l'îlot embolisé dans le microvaisseau.

II.1.3.2. Activation du système du complément lors de l'IBMIR

L'activation du complément est une autre composante de l'IBMIR. Le système du complément est composé de 9 protéines plasmatiques (C1 à C9). Son activation se fait en cascade soit après la fixation d'un complexe Ag-Ac sur la fraction C1 soit par des substances variées (endotoxines ou enzymes lysosomales). Cet assemblage permet la lyse d'agents bactériens ou le recrutement de polynucléaires et de monocytes (Figure 6). L'activation du complément est mise en évidence dans le serum de patients transplantés d'îlots par l'augmentation des protéines du complément [154]. L'activation des protéines C5a et C3a du complément entraîne le recrutement et l'activation de leucocytes, l'adhésion des plaquettes, la production de ROS et de cytokines. De plus, la protéine du complément C5a est responsable de l'activation de la coagulation et de l'inflammation en modulant l'expression du TF dans les neutrophiles [155].

B. Voie alterne

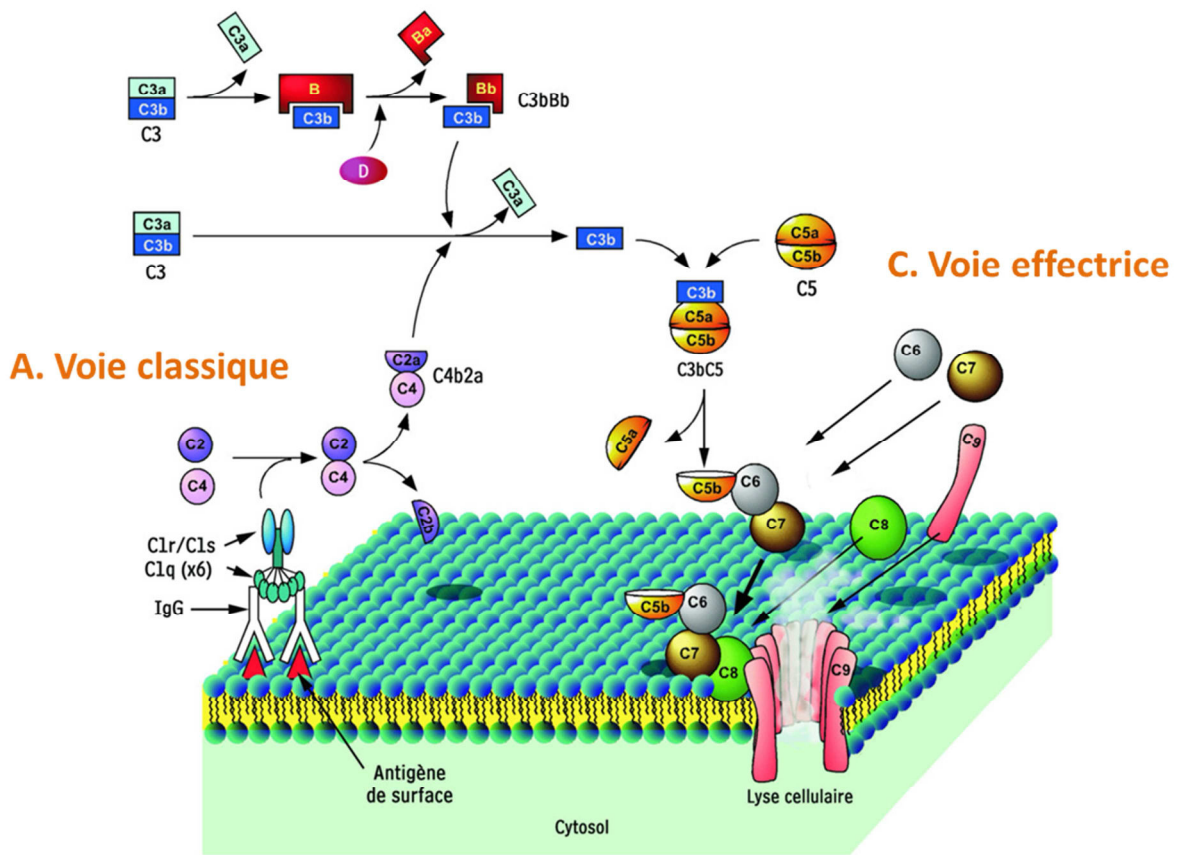


Figure 6 : Ensemble des réactions d'activation de la cascade du complément

(D'après Roselyne L'Italien, 2008)

La cascade de l'activation du complément résulte de l'activation de 3 voies. Par la voie classique, le complexe C1 activé par sa fixation aux immunoglobulines les complexes C2 et C4 et les clivent pour former le complexe C4b2a appelé C3 convertase. Cette dernière clive C3 en C3a et C3b. Dans la voie alterne, activée par différents germes, C3 est clivé en C3a et C3b soluble capable de fixer le facteur B. Le facteur D clive le facteur B en Bb et Ba et forme la convertase alterne (C3bBb). La voie effectrice est activée par la fixation des fragments C3b à la membrane conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire par clivage de C5 en C5a et C5b. Ce dernier forme alors le complexe C5b678. La liaison du facteur C9 au complexe entraîne son changement de configuration et son insertion dans la membrane plasmique grâce à l'exposition d'une région hydrophobe, formant un canal qui perméabilise et altère la fonction de la cellule.

II.1.4. Le TF, acteur central de l'IBMIR dans le couplage thrombose-inflammation

Le TF joue un rôle primordial dans le déclenchement des mécanismes pro-thrombotiques de l'IBMIR. Le TF est un récepteur transmembranaire appartenant à la super famille des récepteurs aux cytokines. Il est exprimé de façon constitutive dans les capsules d'organes et est inductible dans les cellules de l'endothélium, les monocytes et les macrophages. Son expression, sa synthèse et sa sécrétion ont aussi été mise en évidence dans les cellules

endocrines de l'îlot de Langerhans [143]. Son expression n'est toutefois pas retrouvée dans les cellules exocrines pancréatiques. Dans les conditions inflammatoires de l'IBMIR, l'expression du TF est fortement induite à la surface des cellules β stimulées et son activité est potentialisée par la translocation de la PhSer du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Dans le vaisseau, le TF est aussi et principalement exprimé sous forme active dans les microparticules. Des microparticules porteuses de TF ont été suspectées dans l'environnement des îlots au cours de l'IBMIR [156]. Elles seraient émises par les cellules de l'îlot (α et β) (Figure 7).

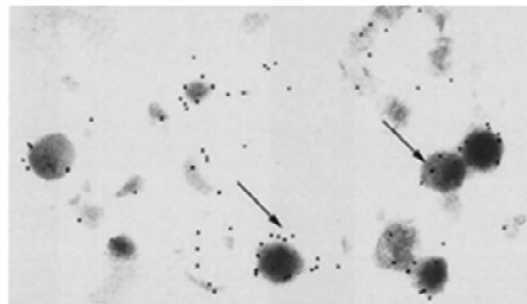


Figure 7 : Mise en évidence de l'expression du facteur tissulaire dans des vésicules à insuline, glucagon et des microvésicules.

(d'après Johansson H et al., 2005)

L'observation microscopique combinée au marquage du facteur tissulaire à l'aide de billes d'or colloïdal met en évidence son expression dans des microvésicules à la périphérie des îlots.

Moberg a démontré que le contenu en TF des îlots est corrélé à l'intensité de l'IBMIR [157]. De plus, la formation de complexe TAT et FVIIa-AT, sont négativement corrélés avec une concentration abaissée de C-peptide circulant à 7 jours post-greffe [156]. Ces résultats mettent ainsi en exergue le rôle délétère de l'expression du TF sur la réussite de la greffe et montrent que l'activation rapide et forte de l'IBMIR limite la production d'insuline par les îlots. Pour cela deux explications sont proposées : la première suggère que l'IBMIR a un effet direct sur la dysfonction sécrétrice des îlots par le biais de médiateurs inflammatoires et la deuxième que la formation d'un caillot sanguin limite l'accès aux nutriments et à l'oxygène des îlots. La quantité de TF exprimée à la surface des îlots en culture pourrait être un marqueur pertinent de l'état de stress des îlots pré-greffe. Ainsi, une valeur élevée de TF serait indicative de la nécessité d'un pré-traitement cytoprotecteur des îlots [156].

II.1.5. Implication de s neutrophiles et de la NETose dans l'immuno-thrombose

Les polynucléaires neutrophiles constituent le type cellulaire prédominant infiltrant les îlots de Langerhans [158]. Le rôle des neutrophiles dans l'immuno-thrombose a été récemment évoqué par Engelmann en 2013 [159,160], suggérant leur implication possible dans les réactions thrombotiques de l'IBMIR. En effet, les neutrophiles activés émettent un maillage extracellulaire de fragments d'ADN décondensé, connus sous le nom de NETs (neutrophils extracellular trap) et initialement décrits comme ayant une fonction antibactérienne capable de piéger les fragments microbiens (Figure 8). De plus, les NETs ont récemment été impliqués dans les réactions inflammatoires et décrits comme un composant clé de la séquence aboutissant à la formation des dépôts fibrineux sur les parois vasculaires, les neutrophiles interagissant avec les plaquettes *via* différents récepteurs dont celui de l'intégrine [161].

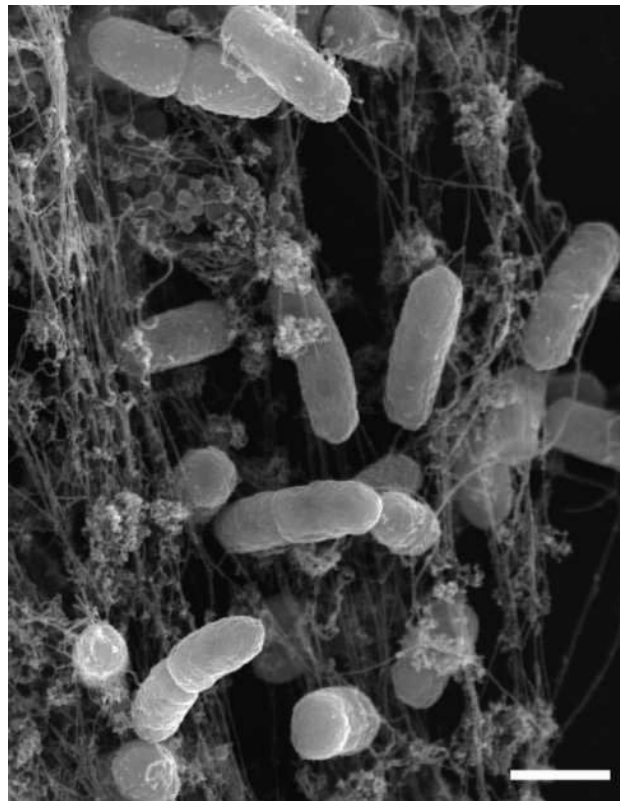


Figure 8 : Bactéries capturées dans le maillage des NETs
(d'après Brinkmann et al., 2012)

Bactérie Salmonelle pris dans le maillage de chromatine décondensée constituent les NETs (neutrophil extracellular trap). Microscopie à électrons.

Ainsi au sein des interactions cellulaires complexes de l'IBMIR il est possible que des neutrophiles suractivés par l'environnement inflammatoire forment des NETs favorisant la croissance du thrombus en raison de l'activité d'histones citrullinées, de la séquestration d'élastase et de myéloperoxydase ou de cathepsine G dans le maillage de chromatine [162]. De plus, les NETs participent à la production de thrombine *via* l'activation plaquettaire [163] et interagissent directement avec le facteur multimérique de Von Willebrand facilitant ainsi l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales [164]. Des études récentes suggèrent que la NETose pourrait être impliquée dans la microangiopathie thrombotique associée à la thérapie cellulaire de greffe de cellules souches [165,166]. De plus, il a été mis en évidence que les MPs et les NETs émis par les neutrophiles sont porteurs de TF actifs et sont impliqués dans l'inflammation et les phénomènes prothrombotiques associées à la vascularite [167].

II.2. Le contrôle de la réaction IBMIR

Le contrôle de l'IBMIR permet de limiter la perte précoce des îlots et s'avère crucial dans le maintien à long terme d'une quantité suffisante d'îlots fonctionnels. Deux stratégies sont mises en œuvre pour limiter l'IBMIR : le pré-traitement des îlots afin de les rendre moins thrombogéniques et limiter leur potentiel pro-inflammatoire et le traitement systémique du patients immédiatement après la greffe.

II.2.1. Contrôle de l'inflammation

II.2.1.1. Pré-traitements anti-inflammatoires et anti-apoptotiques

L'étude *in vitro* des processus inflammatoires et thrombotiques de l'IBMIR se fait généralement par utilisation d'un modèle de « tubing loop » constitué d'un tube en PVC recouvert d'héparine, dans lequel circulent, en boucle fermée, les îlots, du sang compatible ABO et les molécules d'intérêt. L'utilisation de molécules limitant la sécrétion de cytokines et de chémokines a été étudiée dans le but de préserver les îlots fonctionnels. L'inhibition de la voie NF- κ B a été largement étudiée. En particulier, le traitement des îlots par la Withaferin A avant leur passage dans la « tubing loop » permet de limiter la sécrétion des complexes TAT, de cytokines et l'infiltration de neutrophiles [141].

L'application de curcumine et de Bortezomib, un inhibiteur du protéasome limite l'activation de la voie NF- κ B et de l'apoptose dans les îlots en culture [147]. L'utilisation de la rapamycine en prétraitement des îlots permet de diminuer la survie des monocytes *in vitro*

et *in vivo* chez le patient après la greffe [168]. Ce dernier présente l'avantage de limiter la différenciation des monocytes en macrophages et donc leur infiltration insulaire. Enfin, deux études menées par l'équipe de Shapiro ont montré que le prétraitement des îlots par un inhibiteur pan-caspases, l'IDN6556, permet d'améliorer la viabilité des îlots greffés [169].

II.2.1.2. Contrôle péri- et post-greffe de l'inflammation

L'utilisation de l'anti-TNF- α Etanercept fait actuellement partie du traitement de routine post-greffe. Les essais cliniques qui lui sont associés ont permis de passer de 34-43% à 50-62% le nombre de patients insulino-indépendants à 5 ans [107]. Ce succès témoigne de l'impact des phénomènes initiaux sur l'état du greffon à long terme. L'IL-1 β sécrétée par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles constitue une cytokine centrale dans l'IBMIR. Des études précliniques chez la souris démontrent que l'utilisation d'un antagoniste du récepteur à l'IL-1 β (IL-1Ra) améliore la greffe d'îlots injectés dans la capsule sous rénale. Une étude récente, menée chez la souris par McCall, a mis en évidence que l'association d'Anakinra, un IL-1Ra avec de l'Etanercept améliorerait la réussite de la greffe des îlots dans la capsule sous rénale, par rapport à l'Etanercept seul [170]. Toutefois, toutes ces données précliniques ne portent pas sur la transplantation intraportale et ne reproduisent donc pas l'IBMIR observée en clinique. Malgré ce manque de données précliniques robustes, un essai clinique porte actuellement sur l'évaluation de la tolérance et l'efficacité de l'association d'Anakinra et d'Etanercept sur une petite cohorte de patients greffés [171]. Dans la continuité des résultats obtenus *in vitro* par l'équipe de Shapiro avec l'inhibiteur pan-caspases IDN6556, son utilisation peri-transplantation a montré des effets prometteurs dans des modèles de greffes syngéniques chez la souris [169]. Sa tolérance et son efficacité chez l'homme sont autant de facteurs supplémentaires en faveur de futures études cliniques.

La migration et l'infiltration des macrophages dans les îlots en réponse aux chémokines et aux cytokines altèrent la fonction et la structure des îlots. Ainsi, l'utilisation d'AOP-RANTES, un antagoniste du récepteur à la chémokine CCR5 diminue *in vitro* la migration des macrophages ainsi que la sécrétion de cytokines, soulevant une possible utilisation en clinique [151]. De plus, dans un modèle murin de greffe syngénique, l'utilisation d' α 1-antitrypsine améliore la réussite de la greffe en limitant la réponse immunitaire innée par répression des voies de signalisation associées à la production de cytokines et de molécules pro-inflammatoires [172]. Enfin, au vu des résultats obtenus *in vitro*, *in vivo* et en clinique récents sur l'implication de la protéine HMGB1 dans le déclenchement de l'IBMIR et la stimulation majorée de la sécrétion

d'IL-6 par les macrophages, l'équipe d'Itoh a montré que l'injection peri-transplantation d'anti-récepteur de l'IL-6 améliore les hyperglycémies des souris greffées d'îlots [173].

II.2.2. Contrôle de la coagulation

II.2.2.1. **Prétraitements anticoagulants**

1. *Substituts de l'héparine et « coating » des îlots*

Dans la procédure standard, les îlots sont injectés avec un milieu héparinisé, à la fois pour limiter le risque de thrombose lié à l'injection mais aussi pour limiter la réaction IBMIR. En effet, l'héparine modifie la configuration de l'antithrombine, un inhibiteur naturel des sérines protéases impliqué dans la coagulation, et accélère ainsi la vitesse d'inactivation des enzymes de la coagulation. Elle réduit aussi l'activité délétère chémoattractrice des îlots et donc la migration macrophagique [151]. Le dextrane sulfaté de faible poids moléculaire a été proposé comme substitut à l'héparine du fait de propriétés inhibitrices de la coagulation plus importantes que l'héparine [174]. Le dextrane sulfaté agit directement en se fixant aux plaquettes ou indirectement en diminuant la sécrétion endothéliale de facteur de Von Willebrand, ce qui entraîne dans les deux cas, une diminution de l'adhésion et de l'activation plaquettaire. *In vitro*, son utilisation améliore la prise de la greffe dans un modèle de souris [175]. Par ailleurs, le melagatran, un inhibiteur de la thrombine, utilisé actuellement en clinique comme traitement anticoagulant, permettrait, *in vitro*, de limiter l'IBMIR avec notamment une moindre activation plaquettaire et du complément [176]. Une autre étude *in vitro* montre qu'une surexpression dans les îlots de CD39, une ectonucléase qui dégrade l'ATP, nécessaire à l'activation plaquettaire, limiterait la coagulation dans le modèle de la « tubing loop » [177].

D'autre part, l'héparinisation des îlots est une alternative à l'injection d'héparine soluble qui expose le patient à un risque systémique d'hémorragie. Cette technique est applicable à tous types d'organes ou de cellules en vue d'une transplantation [147]. Elle rend hémocompatible la surface d'une cellule et limite ainsi la réaction de coagulation. L'équipe de Cabric, en 2008, a développé une technique d'héparinisation d'îlots humains en utilisant le complexe de forte affinité biotine-avidine. Les îlots, après une biotinylation et une incubation avec de l'avidine, sont « coatés » avec un complexe de 70 molécules d'héparine liées de manière covalente à un vecteur inerte [178]. La production réduite de complexes TAT et de C3a a été démontré *in vitro* et *in vivo* après une greffe allogénique de ces îlots héparinisés chez le porc [179]. Les

mêmes résultats *in vitro* sont observés lorsque des îlots porcins sont coâtés avec des cellules endothéliales humaines grâce à un milieu de culture spécifique [180].

2. *L'inhibition du TF*

Le TF étant l'initiateur majeur de la coagulation et donc à l'origine d'une perte précoce de la fonction des îlots, de nombreuses études portent sur l'inhibition spécifique de son activité. Ainsi, l'application aux îlots en culture d'un anticorps anti-TF bloque son activité et limite l'activation de la coagulation dans le modèle de « tubing loop » [143]. Les mêmes résultats sont observés en appliquant un inhibiteur de la traduction de l'ARNm du TF, la N-acetylcystéine, actuellement utilisé contre les complications liées à l'ischémie reperfusion en greffe de foie [181]. Enfin, l'application de nicotinamide, un antioxydant, ou des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine peuvent moduler l'expression de TF et de son ARNm dans les îlots en culture [157,182].

II.2.2.2. Péri-traitements anticoagulants et inhibition du complément

1. *Anticoagulants*

Dans la continuité des pré-traitements ciblant la voie du TF, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-TF (CNTO859), dans un modèle de primate, en pré- et péri-traitement améliore les fonctions du greffon et diminue les marqueurs associés à la coagulation [183]. De même, l'utilisation d'un inhibiteur du site actif du FVIIa, Ro69, limite l'IBMIR dans le modèle de « tubing loop » [156]. Dans l'objectif de cibler en aval la réaction de coagulation, au niveau de la thrombine, l'équipe de Cui a développé des îlots coâtés avec un polymère contenant de la thrombomoduline, une protéine des cellules endothéliales capable de transformer l'activité procoagulante de la thrombine en activité anticoagulante par le biais de l'activation du système anticoagulant naturel de la protéine C. L'injection intraportale de ces îlots dans des souris diabétiques améliore la prise de la greffe en modulant à la fois la coagulation et l'inflammation [184]. En effet, la thrombomoduline a aussi été rapportée comme ayant des propriétés anti-inflammatoires.

2. *Inhibition de l'activation du complément*

Différents composants dirigés contre le système du complément ont été développés comme le C5aIP (*C5a inhibitory peptid*), le sCR1 et le TP10 des inhibiteurs du récepteur 1 du complément [185]. Particulièrement, l'utilisation de C5aIP permet d'améliorer la réussite de la greffe en atténuant le cross-talk entre la coagulation et le système du complément. Cette

modulation est permise par la formation du complexe C5a-C5ar et en diminuant l'expression de TF dans les granulocytes du receveur [186].

Les différentes approches développées pour le contrôle de l'IBMIR confirment l'importance du contrôle des mécanismes pro-inflammatoires et pro-apoptotiques initiaux de la greffe. De plus, ces études sont en faveur de l'utilisation d'une combinaison d'anticoagulants et d'anti-inflammatoires ainsi que de l'association du pré-traitement des îlots et du post-traitement du patient. Toutefois, la plupart des thérapeutiques utilisées en clinique agissent de manière globale et aspécifique et ne permettent pas un contrôle complet de l'IBMIR. Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors de cette réaction permettrait de développer des approches plus spécifiques. Le TF est l'élément central de l'IBMIR, à l'interface entre inflammation et coagulation. Sa capacité à amplifier les mécanismes délétères repose en partie sur son expression élevée dans les îlots mais aussi et surtout sur sa dissémination sous sa forme active, les microparticules.

III. Les microparticules

III.1. Les microparticules : marqueurs d'un stress et effecteurs cellulaires

III.1.1. Caractéristiques des microparticules

III.1.1.1. Les microparticules : témoins d'un stress cellulaire

Les MPs sont des fragments submicroniques de membrane plasmique (entre 50 nm et 1000 nm de diamètre) émises dans l'espace extracellulaire par une cellule parentale sous l'effet d'un stress [187]. Les MPs expriment à leur surface un phospholipide anionique, la PhSer, qui lui confère des propriétés procoagulantes. En effet, son expression à la surface de la MPs constitue une surface catalytique pour l'assemblage des facteurs de la coagulation. A l'état physiologique, les MPs sont émises en faible quantité pour offrir une surface catalytique suffisante à l'activation de la coagulation, dans le cas de lésions minimales au niveau du vaisseau. Les MPs assurent donc au système vasculaire une réponse rapide procoagulante au site de la brèche vasculaire. En condition de stress physiopathologique, la libération de MPs supplémentaires, émises par les cellules ou les tissus et déversées dans le compartiment vasculaire, entraîne une rupture dans l'équilibre hémostatique qui tend alors vers un état procoagulant et pro-thrombotique. A ce titre, une augmentation des MPs circulantes a été observée dans les maladies cardiovasculaires, ce qui a conduit à les qualifier d'effecteurs procoagulants et thrombogènes [188]. Les propriétés hémostatiques des MPs ont été démontrées grâce à un modèle de souris hémophiles chez lesquelles l'injection de MPs fournit une surface catalytique suppléant au désordre hémorragique [189]. Qui plus est, la quantité de MPs émises dans la circulation systémique est directement corrélée à la sévérité de la maladie [190]. Par ailleurs, la quantité de MPs émises étant directement proportionnelle à l'apoptose cellulaire, les MPs apparaissent donc comme de véritables marqueurs d'un stress cellulaire et tissulaire [191].

Bien que les MPs les plus étudiées soient celles émises par les cellules vasculaires, les plaquettes, les leucocytes, les érythrocytes et les cellules endothéliales, toute cellule peut émettre des MPs en réponse à différents stimuli et avec des cinétiques de libération distinctes. Elles peuvent ainsi être circulantes ou contenues dans un tissu. Dans ce contexte, elles expriment des antigènes de surface et des biomolécules actives caractéristiques de la cellule

parentale et du stress initiateur. Elles apparaissent donc comme des réservoirs dynamiques de bioeffecteurs, spécifiques d'un tissu et d'un type de stress (Figure 9).

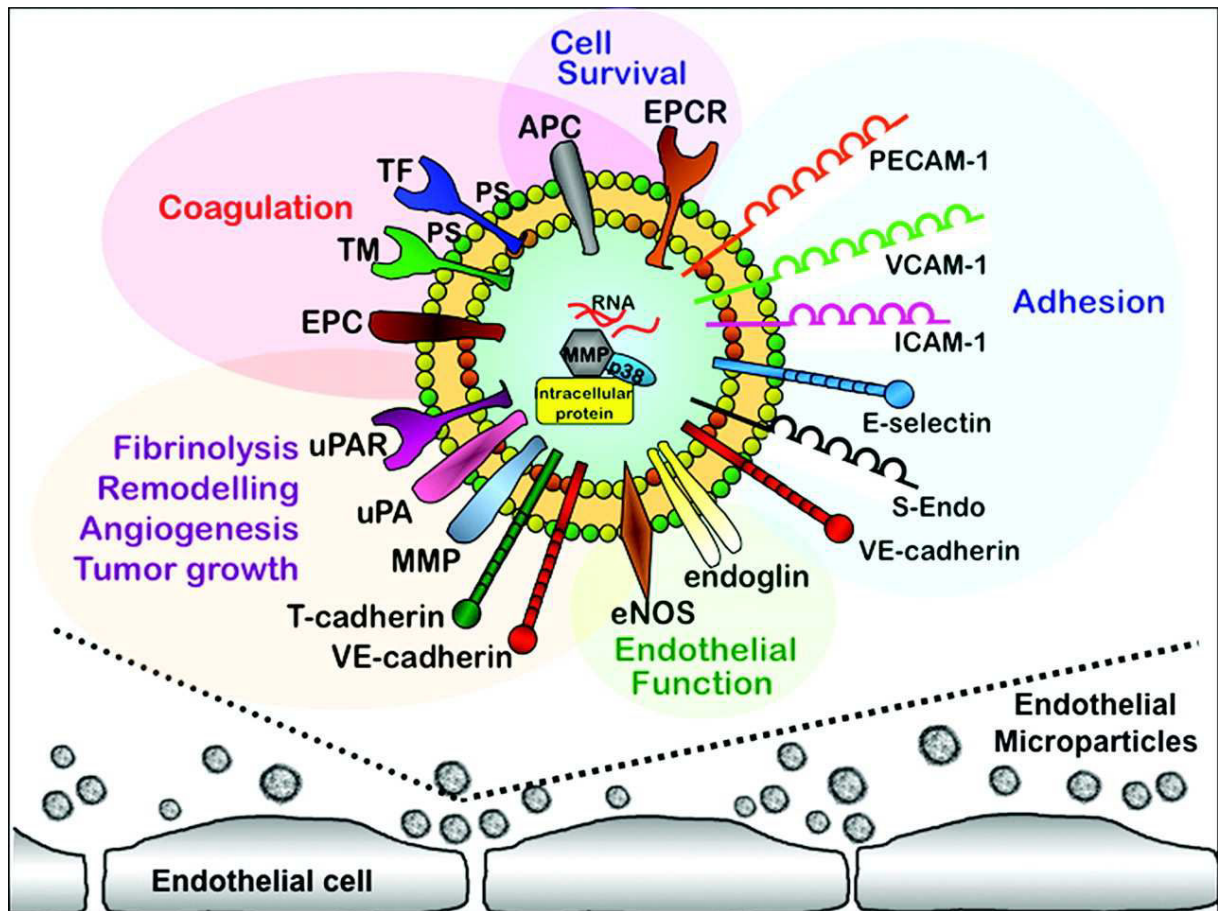


Figure 9 : Les MPs, un réservoir circulant d'effecteurs bioactifs
(d'après Dignat-Georges F et Boulanger C, 2011)

EPCR : endothelial protein C receptor; PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule-1; VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1; ICAM-1 : intercellular cell adhesion molecule-1; E-selectin : endothelial selectin; S-Endo : CD146/melanoma cell adhesion molecule; VE-cadherin : vascular endothelial cadherin; eNOS : endothelial NO synthase; MMP : matrix metalloproteases; uPA : urokinase plasminogen activator; uPAR : urokinase plasminogen activator receptor; EPC : endothelial protein C; TM : thrombomodulin.

III.1.1.2. Les microparticules : des effecteurs cellulaires

En plus d'être le marqueur d'un stress cellulaire, les MPs possèdent la capacité de fusionner avec la membrane plasmique de cellules cibles et d'agir en tant qu'effecteurs cellulaires [192]. Elles peuvent ainsi transmettre à la fois des protéines et des récepteurs actifs membranaires ainsi que leur contenu intra-microparticulaire. Les interactions peuvent être autocrines ou bien paracrines notamment dans le cas de MPs circulantes. Ainsi, par fusion ou internalisation, les MPs transmettent des récepteurs de l'adhésion (E-sélectine et VCAM), des lipides bioactifs, des calpaïnes [193], des activateurs du plasminogène [194], des métalloprotéinases [195], des chémokines (RANTES) [196] et des molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1 β [197], pro-apoptotiques comme les caspases [198] ou procoagulantes comme le TF [156]. Les MPs transportent et transfèrent aussi du matériel génétique comme des ARNm et des miRNAs [199,200]. Certains miRNAs seraient transportés dans les MPs complexés à des protéines comme Argonaute 2, assurant leur stabilité et limitant leur dégradation par l'ARNase [201]. Les MPs sont capables d'activer les voies associées aux récepteurs microparticulaires mais aussi d'autres voies de la cellule cible sensibles au contenu cytosolique de la MP ou aux protéines qu'elles convoient. Ainsi, les MPs induisent une réponse spécifique à la composition de la MPs. Par exemple, l'incorporation dans des cellules endothéliales de MPs d'origine tumorale porteuses de TF induit un recyclage du TF microparticulaire à la surface de la cellule cible, augmentant ainsi le potentiel procoagulant de la surface de la cellule cible [202]. La polyvalence dans le contenu et les protéines de surface fait de la MP un témoin précis de la cellule émettrice et du stress qui lui a donné naissance. En clinique, la variété des MPs étudiée est à l'image de la variété des pathologies dans lesquelles elles sont impliquées.

Dans chaque compartiment cellulaire, les MPs sont le témoin d'un subtil équilibre entre stimulation, recapture, prolifération et mort cellulaire. En excès, elles peuvent ainsi être délétères mais parfois aussi constituer une réponse biologique dans le maintien de l'homéostasie [203]. Ainsi certaines MPs produites à partir de neutrophiles présentent des propriétés anti-inflammatoires en exprimant de l'annexine 1[204]. Selon leurs origines, les MPs présentent des propriétés anticoagulantes. Elles peuvent ainsi exprimer de la thrombomoduline, des activateurs du plasminogène, des inhibiteurs de la voie du TF ou des récepteurs de la protéine C activée [205,206]. En effet, dans certaines conditions, la stimulation de cellules endothéliales par de la protéine C activée entraîne l'émission de MPs porteuses du récepteur à la protéine C activée et ces MPs bloquent l'activation du FVII [207].

III.1.1.3. Microparticules et autres vésicules

Les MPs sont à distinguer d'un autre type de vésicules, plus petites (> 50 nm de diamètre), les exosomes, qui n'expriment que faiblement la PhSer mais sont enrichis en tétraspanine [208]. Les exosomes sont des vésicules d'origine endosomale qui sont libérés par exocytose après fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique. Leur émission ne relève donc pas d'un remodelage de la membrane plasmique *stricto sensu* et leur contenu, leurs marqueurs de surface et leurs propriétés sont différentes de celles des MPs.

III.1.2. Mécanismes de formation des microparticules

C'est le remaniement des phospholipides de la membrane plasmique suite à une activation cellulaire ou à un stress apoptotique qui constitue le mécanisme central de la vésiculation.

III.1.2.1. La membrane plasmique, un acteur central de la vésiculation

1. Asymétrie de la membrane plasmique

La fluidité de la membrane plasmique est un facteur essentiel dans le maintien du fonctionnement de la cellule. Elle est dépendante à la fois de la température et de sa composition. La composition en phospholipides, cholestérol et glycolipides assure ses propriétés de perméabilité/barrière. Les phospholipides majeurs de la membrane plasmique sont : la phosphatidylcholine (PhCol), la phosphatidyléthanolamine (PhEth), la PhSer et la sphingomyéline. La nature des acides gras, à savoir la longueur de leur chaîne et leur nombre d'insaturations détermine la flexibilité et l'épaisseur locale de la membrane. L'asymétrie de la membrane plasmique repose sur leur disposition particulière dans chacun des feuilletts. Les sphingomyélines et la PhCol sont principalement localisées sur le feuillet externe tandis que la PhSer et la PhEth se retrouvent sur le feuillet interne [209]. Les autres lipides, comme les stérols et les céramides, sont distribués de façon homogène entre les feuilletts car ils sont capables de diffuser spontanément au sein de la membrane.

Cette asymétrie de la membrane présente une importance fonctionnelle. En effet, l'assemblage dense de sphingolipides et de stérols assure la stabilité de la membrane vis-à-vis du sang circulant, alors que l'accumulation d'aminophospholipides et notamment de PhSer dans le feuillet cytosolique des membranes plasmiques et des vésicules d'exocytose pourrait permettre à ces membranes de fusionner. De plus, certaines protéines cytosoliques, comme la

protéine kinase C, se fixent sur le feuillet interne de la membrane où se concentre la PhSer et leur activité nécessite la présence de ces lipides anioniques.

Les mouvements latéraux des protéines et des phospholipides au sein de la même monocouche peuvent avoir lieu et assure ainsi la fluidité de la membrane. Cette diffusion transversale permet transitoirement une réorganisation particulière de la membrane plasmique en entités fonctionnelles connues sous le nom de « radeaux lipidiques » (ou raft) qui permettent la concentration locale de récepteurs et phospholipides particuliers [210].

2. Les transporteurs de phospholipides

A l'état basal, les mouvements transversaux de phospholipides entre les deux feuillets de la membrane plasmique (diffusion transverse ou « flip-flop ») sont rares et lents. Toutefois, le transport transmembranaire de phospholipides joue un rôle important dans divers processus cellulaires comme la synthèse de la membrane plasmique, le maintien de son asymétrie, le trafic vésiculaire, la régulation des fonctions des protéines de membranes, la phagocytose, la coagulation et l'apoptose [211].

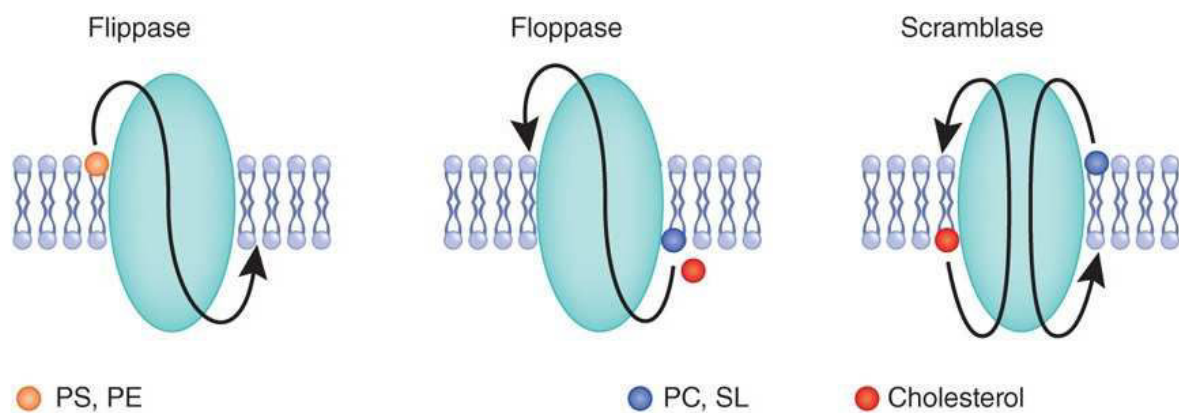


Figure 10 : Fonctionnement des transporteurs de phospholipides (d'après Clarck M, 2011)

La flippase utilise l'ATP pour rabattre la phosphatidylsérine (PS) et de manière moins importante, la phosphatidyléthanolamine (PE) du feuillet externe vers le feuillet interne, contre le gradient de concentration. La floppase utilise l'ATP pour transporter la phosphatidylcholine (PC), la sphingomyéline (SL) et le cholestérol du feuillet cytoplasmique vers le feuillet extracellulaire, contre le gradient de concentration. L'activité de la scramblase dépend du calcium et assure le mouvement non spécifique des phospholipides selon leur gradient de concentration

On distingue trois types de transporteurs : les transporteurs spécifiques comprenant les transporteurs ABC (*ATP binding cassette*) dits « floppases » qui transportent la PhCol et le cholestérol du feuillet interne vers le feuillet externe et les transporteurs P(4)-ATP dits

« flippases » qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transférer la PhSer du feuillet externe vers le feuillet interne (Figure 10). Enfin le troisième transporteur, la scramblase, est un transporteur non spécifique qui assure une distribution homogène des lipides néoformés dans le réticulum endoplasmique ou au sein de la membrane plasmique d'une cellule activée [212]. Ce dernier transporteur n'utilise pas l'ATP comme source

En condition de stress et d'influx calcique, l'inactivation de la flippase et l'activation de la floppase et de la scramblase entraîne une altération de l'asymétrie membranaire et l'exposition de PhSer dans le feuillet externe de la membrane [213]. Cette externalisation de PhSer est l'expression d'une apoptose précoce ou de l'activation cellulaire. Cette perturbation membranaire entraîne des changements dans les propriétés de surface des cellules, avec le passage à un état procoagulant et pro-adhérent et l'enclenchement d'un signal de phagocytose [214].

Récemment d'autres transporteurs de type scramblase, ont été mis en évidence, les protéines TMEM16F et *Xk related protein 8* (XRP8) [215]. TMEM16F est une anoctamine présentant 8 domaines transmembranaires. Ses fonctions métaboliques ne sont pas encore clairement déterminées mais ce transporteur pourrait jouer le rôle de canal à chlore dépendant du calcium et de transporteur aléatoire de phospholipides. Il serait aussi impliqué dans la vésiculation de MPs, déficitaire dans le syndrome hémorragique du syndrome de Scott [216]. En effet, ces patients présentent une mutation au niveau du gène codant pour TMEM16F. Lors d'une lésion vasculaire ils sont incapables de réaliser le flip-flop nécessaire à l'émission des MPs afin d'augmenter la surface catalytique dédiée à l'activation de la coagulation. Toutefois, *in vitro* les cellules de ces patients sont capables de vésiculer en condition de stress apoptotique. Ceci suggère que TMEM16F est impliqué dans la phase initiale de l'activation cellulaire car sa mutation conduit à une absence précoce de flipflop alors que le flipflop est observable à un stade apoptotique plus tardif [217].

La protéine XRP8 est un transporteur membranaire du système Kell. En condition apoptotique, il est activé par le clivage de la caspase-3 et permet l'exposition de PhSer à la surface de la cellule [218].

III.1.2.2. Remodelage membranaire à l'origine de la vésiculation

1. *Influx calcique et rupture de l'asymétrie membranaire*

Des stimuli variés peuvent conduire à l'activation cellulaire et à l'émission de MPs comme la thrombine, le cholestérol non esterifié, les endotoxines, l'hypoxie, des facteurs de croissance et des molécules inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , Fas, etc..). L'activation ou l'apoptose cellulaire s'accompagne alors d'une élévation importante et soutenue du calcium intracellulaire (30 à 350 μ M contre 1 μ M à l'état basal). L'ouverture des canaux ioniques ainsi que la libération des stocks intracellulaires conduit à une augmentation importante de la concentration intracellulaire du calcium [219]. Les canaux SOCE (*Store operated channel entry*), TRPC6 (*transient receptor potential channel*) mais aussi d'autres canaux calciques, comme P2X1 dans les plaquettes, assurent l'entrée massive de calcium dans la cellule [220,221]. De plus, la dépolarisation de la membrane externe des mitochondries entraîne l'ouverture des pores mitochondriaux et l'augmentation du calcium intracellulaire. Cette augmentation du calcium ainsi que l'inhibition de la translocase conduit à l'activation de la floppase, de la scramblase et à l'inhibition de la flippase [222] (Figure 11). Ainsi, l'activation cellulaire conduit à un transport plus rapide de la PhSer dans le feuillet externe tandis que la PhCol est transférée moins rapidement vers le feuillet interne. Il en résulte une surcharge lipidique au niveau du feuillet externe qui se résout par la vésiculation. C'est en partie la rupture de l'asymétrie membranaire qui entraîne l'émission de MPs.

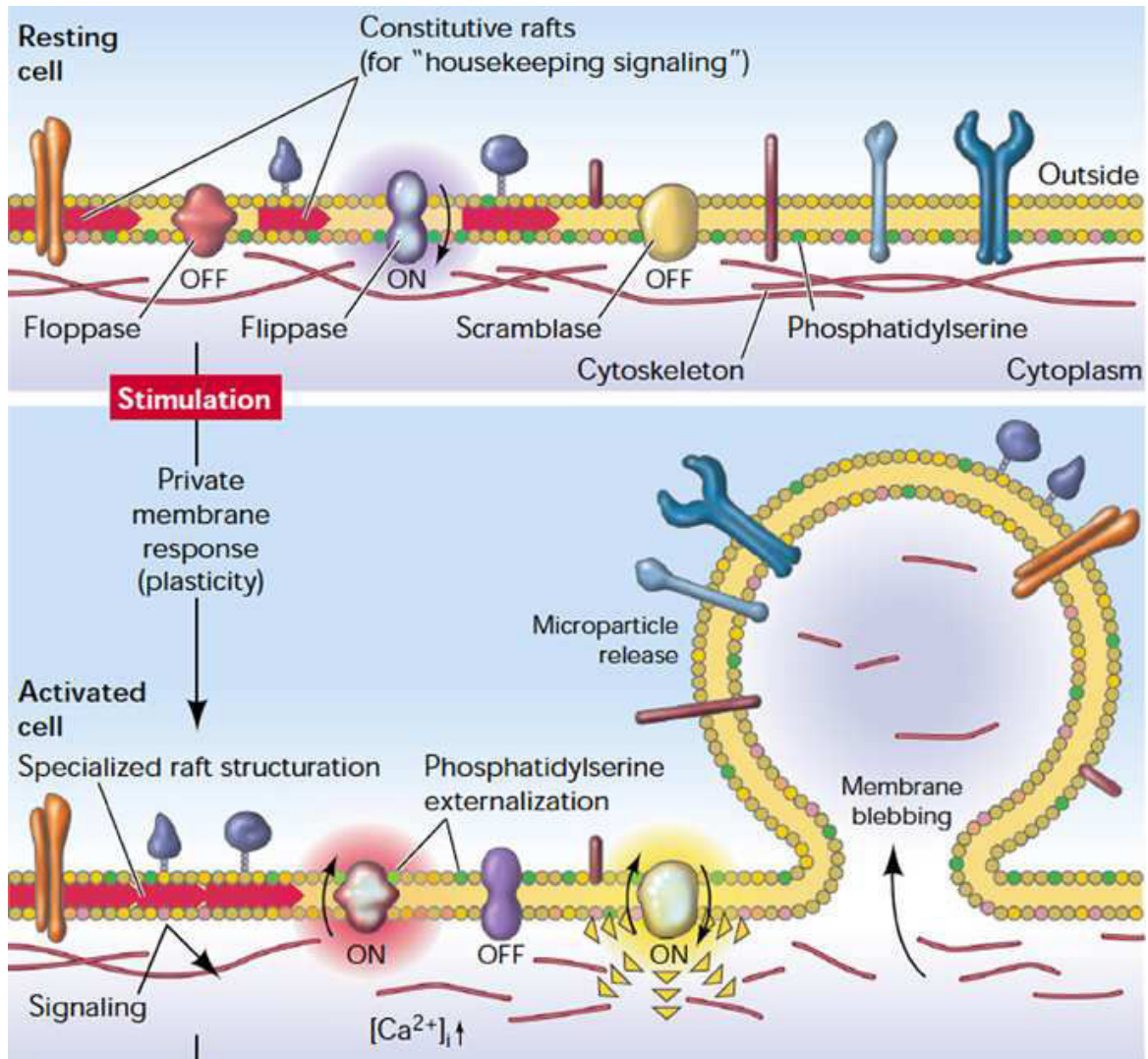


Figure 11: Mécanismes membranaires à l'origine de l'émission des MPs

(d'après Hugel et al., 2005),

A la suite d'une activation cellulaire et à l'augmentation intracellulaire du calcium, l'activité des transporteurs de phospholipides s'inverse. En effet, l'activation de la floppase et l'inhibition de la flippase entraînent une accumulation de PhSer sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Ce déséquilibre local dans membrane plasmique. Ce déséquilibre local dans la répartition des phospholipides, la destruction locale du cytosquelette et la formation de rafts fonctionnels conduit à l'émission de MPs .

Les mécanismes mettant en jeu les différents transporteurs impliqués dans le flip-flop sont dépendants du type de stress et de sa durée. En effet, dans le cas du syndrome de Scott, les cellules des patients sont capables d'exposer de la PhSer suite à un stress apoptotique alors qu'elles en sont incapable, *in situ*, en présence d'un agoniste comme la thrombine [217].

2. *Influx calciques et dégradation du cytosquelette*

L'augmentation intracellulaire du calcium est associée à une activité protéolytique des calpaïnes et des cystéines-protéases. Cette activation entraîne une protéolyse locale du cytosquelette en dégradant la filamine-1, la gélosine, la taline et la myosine. Cette altération des protéines du cytosquelette facilite le bourgeonnement [193]. L'activation des caspases sous l'effet du stress apoptotique est aussi impliquée dans la vésiculation des MPs. En effet, la caspase 3 activée clive la Rho-kinase-1 (ROCK-1) de son domaine inhibiteur libérant sa forme tronquée active. Celle-ci entraîne alors la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine qui, associée à l'action des calpaïnes, conduit à la déstabilisation du cytosquelette et donc à l'émission de la MPs dans les cellules endothéliales (Figure 12) [223].

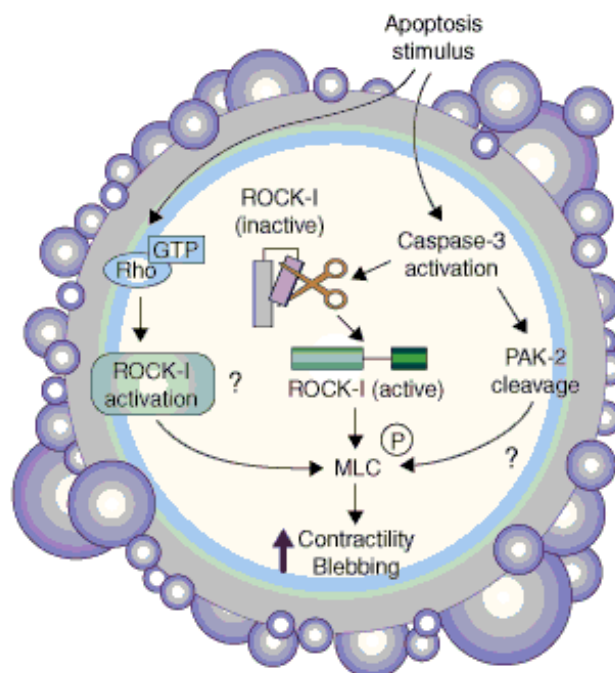


Figure 12 : Remaniement du cytosquelette au cours de l'apoptose

(d'après Leverrier Y and Ridley AJ, 2001)

Au cours d'un stress apoptotique, l'émission des MPs est directement liée à l'activation des caspases : la caspase-3 clive la Rho-kinase (ROCK-1) qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine (MLC), induisant la contraction de la cellule et la libération de MPs. Les p21-activated kinases (PAK-2) pourraient aussi être impliquées dans les remaniements du cytosquelette selon des mécanismes mal connus

Dans les cellules épithéliales, la caspase-2 pourrait cliver une autre protéine de la famille ROCK, la ROCK-2, qui induirait ensuite l'émission de MPs [224]. L'implication de la ROCK-2 dans la vésiculation membranaire de cellules endothéliales s'observe sous l'effet de thrombine, dans des conditions non apoptotiques [225]. Les protéines p21-activated kinases (PAK2) seraient aussi impliquées dans l'émission de MPs selon des mécanismes dépendants de ROCK-1[226]. De manière intéressante, l'inhibition de ROCK-1, dans des cellules endothéliales activées, bloque l'émission de MPs riches en caspase-3 et entraîne le détachement puis la mort des cellules. Ainsi, dans un premier temps, l'émission de MPs serait un mécanisme de survie cellulaire pour limiter l'accumulation intracellulaire de molécules cytotoxiques ainsi que leur libération sous leur forme soluble dans le milieu extracellulaire [227].

3. *Remodelage membranaire et rafts*

Le remodelage membranaire associé à l'émission des MPs s'effectue entre les deux feuillettes de la membrane mais aussi dans le plan de celle-ci. Il repose en partie sur la formation de radeaux lipidiques, appelés « rafts ». La fluidité membranaire des composants membranaires et leur mobilité latérale autorise transitoirement et localement une compartimentation de la membrane plasmique. Cette dynamique se traduit par l'interaction transitoire de lipides aux chaînes d'acyles saturés et assure leur compactage avec les autres composants des rafts : le cholestérol, les sphingolipides, les gangliosides et des protéines transmembranaires ayant une affinité particulière pour ces composants lipidiques comme les protéines à ancre GPI (Figure 13).

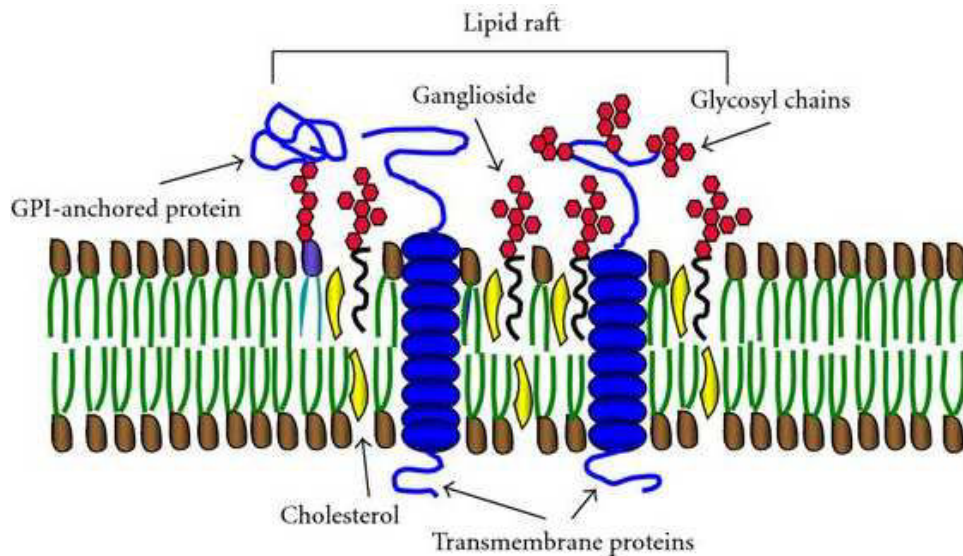


Figure 13 : Composition d'un radeau lipidique

(d'après Malchiodi F et al., 2011)

Composition membranaire des rafts

Initialement, les rafts ont été considérés comme des témoins structurels de transitions de phases typiques de la structuration des membranes biologiques. Récemment, cette structure organisationnelle a été associée à un rôle biologique propre nécessaire au fonctionnement de la cellule [228]. En effet, ils assurent le tri, la stabilisation et l'interaction privilégiée des protéines et des lipides qui les composent. Ces domaines protéolipidiques constituent des plateformes au sein desquelles l'activité des récepteurs est modulée ainsi que les voies métaboliques en aval, autorisant le couplage entre signal extracellulaire et les voies de signalisation intracellulaire. Ces radeaux lipidiques sont particulièrement impliqués dans l'adhésion cellulaire et les phénomènes de vésiculation. Ainsi, il a été mis en évidence que l'émission de MPs de monocytes et porteuses de TF s'effectuent à partir de rafts enrichis en TF et en P-selectin glycoprotein ligand-1 [229]. De même, l'émission de MPs d'érythrocytes consécutives à une augmentation intracellulaire de calcium est liée à la formation de rafts enrichis en stomatine, synexine et sorcine [230].

Dans un contexte de stress cellulaire, l'émission de MPs est la réponse déployée par la cellule pour « évacuer » les molécules cytotoxiques alors activées ou produites. Les tensions de surface entre les deux feuilletts, créées par l'accumulation de PhSer dans le feuillet externe, favorise la libération d'une partie de la membrane plasmique sous la forme de vésicules englobant le contenu local cytoplasmique. L'émission de MPs apparait donc comme une séquestration sélective de protéines cytoplasmiques, de lipides bioactifs et de miRNAs.

III.1.3. Clearance des microparticules

Bien que les MPs expriment la PhSer et que celle-ci soit associée à un signal « eat me » reconnu par le phagocyte, elles échappent transitoirement à la phagocytose du fait de leur petite taille et de la faible expression d'antigènes reconnus par le phagocyte. Elles peuvent ainsi pleinement remplir leur rôle paracrine d'effecteurs cellulaires.

Une voie d'élimination des MPs circulantes a été décrite par l'équipe de Dasgupta en 2009 et repose sur la liaison de la lactadhérine avec la PhSer des cellules apoptotiques et des MPs (Figure 14).

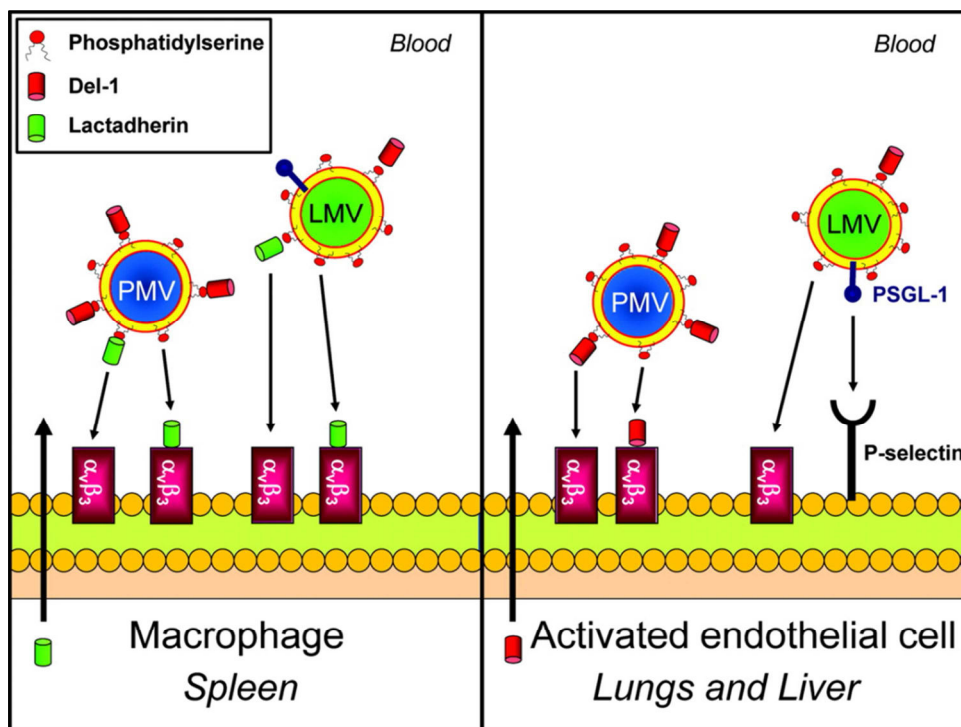


Figure 14 : Mécanismes impliqués dans la clearance des MPs circulantes

(d'après Rautou PE et Mackman N, 2012)

Les macrophages et les cellules dendritiques sécrètent de la lactadhérine et facilitent ainsi l'interaction et la phagocytose des MPs par les macrophages spléniques. Dans un contexte d'endotoxémie, la voie impliquant Del-1 (developmental endothelial locus-1) assure la clearance des MPs. Ce mode de clearance pourrait être activé après l'augmentation de l'expression d' $\alpha_v\beta_3$ à la surface des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales activées expriment des molécules d'adhésion comme la P-sélectine et peuvent ainsi capturer les MPs leucocytaires qui expriment la P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). (LMV : leukocyte microvesicle; PMV, platelet microvesicle)

La lactadhérine est une glycoprotéine bifonctionnelle présentant un domaine *discoïin I-like* qui se lie à la PhSer et un motif tripeptidique Arg-Gly-Asp (RGD) qui se lie aux intégrines comme les $\alpha_v\beta_3$ [231]. Elle est sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques

immatures, jouant un rôle clef dans l'épuration des MPs par les macrophages spléniques. *In vitro*, la lactadhérine améliore l'adhésion des MPs aux macrophages et leur phagocytose [231]. En clinique, la lactadhérine n'est pas détectée chez les patients sains mais est exprimée à la surface des MPs plaquettaires. De plus, des souris déficientes pour le gène de la lactadhérine présentent un niveau plus élevé de MPs circulantes conduisant à un état hypercoagulant, réversible par complémentation en lactadhérine [231]. Plus récemment, la même équipe a décrit une nouvelle voie de clearance des MPs qui impliquerait la glycoprotéine *developmental endothelial locus-1* (Del-1) [232]. Del-1 est sécrétée par l'endothélium et comme la lactadhérine, possède un domaine I et un motif RGD qui lui permet de se fixer à la PhSer des MPs et à l'intégrine $\alpha\beta3$ des cellules (Figure 15). Contrairement à la lactadhérine, Del-1 est retrouvée chez les patients sains et les souris déficientes en Del-1 ne montrent pas d'augmentation du taux de MPs circulantes par rapport au groupe contrôle [232]. Toutefois, après application d'un stress endotoxique, les souris déficientes en Del-1 présentent un taux plus élevé de MPs circulantes. Ces résultats suggèrent que la clearance des MPs médiée par Del-1 est activée en condition de stress. La clearance médiée par Del-1 est dépendante du phénotype des MPs car elle ne permet pas l'élimination des MPs endothéliales et plaquettaires et aussi du tropisme tissulaire car la protéine Del-1 n'est exprimée que dans l'endothélium de certains tissus (dans le cerveau et les poumons mais pas dans la rate et le foie chez la souris).

De manière intéressante, certains organes sont d'avantage impliqués dans l'épuration des MPs en fonction de l'origine cellulaire des MPs (voir Tableau 1). En effet, 55% des MPs érythrocytaires sont phagocytées dans le foie, par les cellules de Kupffer à 92% *via* l'établissement de liaisons avec la PhSer [233]. Enfin, le mode de clearance des MPs dépendrait du contexte physiopathologique. En effet l'équipe de Dasgupta ont montré qu'en condition de stress endotoxique l'expression de la lactadhérine est diminuée alors que celle de Del-1 est augmentée dans les cellules endothéliales [232].

Le temps de clearance des MPs dépend de l'origine cellulaire des MPs, de l'espèce étudiée et du stimulus provoquant la vésiculation. Ainsi, la demi-vie des MPs varie de quelques minutes à plusieurs heures. Chez l'homme il a été mis en évidence, suite à l'injection de MPs plaquettaires, que 70% des MPs étaient retrouvées 3h après l'injection [234], alors qu'elles seraient éliminées en moins de 30 minutes chez la souris [235] et de 10 minutes chez le lapin [236].

Tableau 1 : Clearance des MPs
(d'après Rautou PE et Mackman N, 2012)

Microparticules	Organes impliqués	Cellules impliquées	Molécules impliquées
Plaquettaires	Rate Poumons, Foie	Macrophages C. endothéliales	Lactadhérine Del-1 (sauf rate)
Endothéliales	Rate, Poumons et Foie	Monocytes, Macrophages	Pas d'études
Erythrocytaires	Surtout Foie ± Poumons, Rate, Rein	C. de Kupffer	PhSer

III.2. Les microparticules dans le diabète

Les MPs sont principalement étudiées dans les pathologies vasculaires comme l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'infarctus du myocarde, l'angine de poitrine, le syndrome coronarien aigu mais aussi dans le sepsis, la drépanocytose, l'hyperlipidémie et le diabète [237]. Ce dernier étant associé à un dysfonctionnement de l'endothélium et à un état inflammatoire, l'étude des MPs dans le diabète semble pertinente.

III.2.1. Le diabète : source importante de microparticules circulantes

L'étude des MPs circulantes en clinique repose sur le prélèvement de sang par ponction veineuse. Différentes techniques sont ensuite utilisées pour le dosage et le phénotypage des MPs dont les principales sont le dosage enzymatique fonctionnel et l'immunomarquage par cytométrie. L'utilisation d'anticorps spécifiques à un type cellulaire permet la caractérisation de l'origine cellulaire des MPs. La méthode par cytométrie en flux nécessite un équipement conséquent et ne permet pas la détection de MPs de taille inférieure à 500 nm. D'autre part, les méthodes basées sur la reconnaissance de la PhSer sont plus adaptées au dosage en routine mais nécessitent des précautions liées aux interférences avec d'autres ligands, à la sensibilité au calcium ou à la protéolyse.

Une étude récente, menée par l'équipe de Kurtzman, a montré que les diabétiques de type 2 présentaient une augmentation significative de la quantité circulante de MPs totales,

plaquettaires et monocytaires par rapport à un groupe contrôle [238]. De manière intéressante, les patients diabétiques de type 1 et de type 2 présentent des quantités et des phénotypes de MPs différents. En effet l'étude de Sabatier, montre que les patients diabétiques tous types confondus, ont des taux circulants de MPs plus élevés que les patients sains. Mais chez les patients diabétiques de type 2 seules les MPs totales sont significativement augmentées alors que les MPs totales, endothéliales et plaquettaires sont plus élevées dans le diabète de type 1 [239]. Par ailleurs, les MPs porteuses du récepteur aux acides gras CD36 ou *fatty acid translocase* sont plus élevées chez les patients diabétiques de type 2 et obèses par rapport aux diabétiques de type 2 minces et aux patients obèses non diabétiques [240].

III.2.2. Effets pathogéniques des microparticules dans les complications vasculaires associées au diabète

L'hyperglycémie caractéristique du diabète entraîne des complications liées à un état pro-thrombotique, pro-inflammatoire, pro-angiogénique et à un dysfonctionnement de l'endothélium.

III.2.2.1. Microparticules et thrombose

Les propriétés procoagulantes des MPs, principalement dues à l'exposition de la PhSer et/ou du TF, jouent un rôle central dans l'effet pro-thrombotique des MPs. Des études *in vivo* sur la souris et le primate ont montré par imagerie que les TF⁺-MPs s'intègrent dans le thrombus en formation [241]. L'expression de P-selectine, de PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) et des récepteurs aux facteurs VIII et Va à la surface des MPs sont autant de protéines impliquées dans leurs effets pro-thrombotiques [237]. Des études pionnières ont montré que le TF porté par les MPs est l'élément clef de la croissance du thrombus [242]. Cette population particulière a été désignée sous le nom de « blood-borne TF » par comparaison avec le TF ancré dans les membranes cellulaires. Le niveau de MPs procoagulantes est plus élevé chez les patients diabétiques. En effet, Cimmino et al. ont montré que le taux de TF⁺-MPs fortement procoagulantes est plus élevé chez les patients diabétiques de type 2 que chez les sujets sains et que cette élévation est corrélée avec une augmentation des marqueurs de la coagulation [243]. De plus, dans l'étude de Sabatier, l'activité procoagulante des MPs chez le patient diabétique de type 1 est significativement plus importante et cette élévation est corrélée avec l'HbA1C, suggérant que le potentiel procoagulant des MPs est associé à

l'équilibre glycémique [239]. Par ailleurs, bien que la concentration en MPs totales augmente chez les patients diabétiques de type 2, cette augmentation n'est pas associée à une augmentation de l'activité procoagulante des MPs [244]. De plus, le taux de MPs endothéliales et monocytaires est plus élevé chez les patients diabétiques de type 2 sans complications associées et présentant un bon contrôle glycémique par rapport aux sujets sains. Ces observations suggèrent que malgré un contrôle glycémique efficace, il persiste un stress cellulaire latent chez le patient diabétique à l'origine de l'émission de ces MPs. Cette hypothèse est confirmée par l'augmentation du taux de MPs procoagulantes chez les patients diabétiques qui présentent des complications vasculaires. Par ailleurs, les traitements antiplaquettaires diminuent significativement le taux de MPs circulantes [245].

III.2.2.2. Microparticules, inflammation et dysfonction endothéliale

L'interaction entre les leucocytes et l'endothélium puis leur infiltration dans le tissu participe à la mise en place d'un état pro-inflammatoire vasculaire. Les MPs peuvent amplifier cet état pro-inflammatoire en transportant et transférant des molécules pro-inflammatoires et des récepteurs de l'adhésion [246]. *In vitro*, les MPs plaquettaire isolées de patients diabétiques favorisent l'interaction entre cellules endothéliales et monocytes [248]. La présence de MPs plaquettaires ou monocytaires à la surface endothéliale soumise à un flux sanguin augmente l'interaction plaquette-cellules endothéliales. Cette interaction est dépendante de l'expression du facteur de Von Willebrand, de la glycoprotéine Ib (GPIb) et de la P-selectine. Le transfert de ces MPs aux cellules endothéliales implique la PhSer, la lactadhérine et l'intégrine $\alpha v \beta 3$ et induit une production de ROS dans la cellule cible elle-même nécessaire à l'activation du facteur de Von Willebrand [247].

In vitro, les MPs pourraient induire une dysfonction de l'endothélium en diminuant la production d'oxyde nitrique (NO) et la production de prostaglandine I₂ dans les cellules endothéliales. La prostaglandine I₂ est un lipide vasoconstricteur qui limite l'agrégation plaquettaire. De plus, la co-incubation de MPs endothéliales avec une portion d'aorte de rat induit une production d'ions superoxydes, une diminution de la production de NO et un dysfonctionnement dans la relaxation médiée par l'acétylcholine [248]. De la même manière, l'application de MPs de lymphocytes T, isolées de patients diabétiques, induit une diminution de la production de la NO synthase se traduisant par une diminution de la relaxation vasculaire [249]. Récemment, une étude chez la souris a montré que l'injection de MPs émises après un stress hyperglycémique par des cellules épithéliales entraîne un

dysfonctionnement endothélial, une augmentation de l'infiltration des macrophages et de l'expression de molécules d'adhésion. Ces mécanismes seraient médiés par le transfert de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NOX) à la cellule cible et par la génération de ROS dans la cellule [250].

Ces études suggèrent l'importance des MPs dans les mécanismes d'activation de l'endothélium, de recrutement des leucocytes et de l'inflammation vasculaire qui ont lieu dans le diabète.

III.2.2.3. Microparticules et angiogenèse dans le diabète

En plus de ces propriétés sur l'inflammation vasculaire, les MPs peuvent participer à l'angiogenèse. En effet, deux études ont montré que des MPs de patients diabétiques ayant soit les symptômes du pied diabétique soit une rétinopathie induisaient la formation d'un réseau vasculaire stable [237]. Les mécanismes impliquant l'effet pro-angiogénique des MPs restent encore à éclaircir. Toutefois, certaines études proposent que le TF porté par les MPs ou les cytokines, les facteurs de croissances, les protéines impliquées dans la destruction de la matrix extracellulaire comme les matrix metalloprotéinases (MMP) et les miRNAs contenus dans la MP seraient à l'origine de telles propriétés [251]. En particulier, ces miRNAs, dénommés angiomiRNA, contenus dans les MPs sont, en fonction de leur rôle, soit augmentés chez des souris *ob/ob* comme le miRNA-150 soit diminués chez les patients diabétiques de type 2 comme le miRNA-126 [252,253].

Toutefois, certaines études révèlent aussi un effet anti-angiogénique des MPs qui pourrait dépendre de leur concentration. En effet, des MPs endothéliales appliquées en faible quantité sur des cellules endothéliales seraient pro-angiogéniques et à forte dose seraient à l'inverse anti-angiogéniques [251]. Cette dualité reposerait sur la quantité de MMP, des protéases de la matrix extracellulaire, convoyées par les MPs et délivrées à la cellule cible.

III.2.2.4. Microparticules et micro-angiopathie

Les micro-angiopathies sont des complications qui affectent principalement les diabétiques de type 1 alors que les macro-angiopathies apparaissent plus tardivement pour ces patients et sont majoritaires chez les patients diabétiques de type 2. Les propriétés pro-thrombotiques, procoagulantes et pro-inflammatoires des MPs, décrites précédemment, peuvent contribuer à

l'installation des complications macro-vasculaires mais aussi micro-vasculaires associées au diabète.

1. Microparticules et rétinopathie

La rétinopathie est une atteinte de la micro-vascularisation de la rétine. L'hypoxie rétinienne chronique entraîne la production de VEGF et la mise en place de nouveaux vaisseaux fragiles et hémorragiques caractéristiques du stade prolifératif de la rétinopathie.

Ogata a mis en évidence que la quantité circulante de MPs monocytaires augmente graduellement avec la progression de la rétinopathie. Ainsi la mesure de ces MPs pourrait avoir une valeur pronostic dans cette atteinte [254]. De plus, les échantillons d'humeur vitrée contiennent des MPs plaquettaires, endothéliales, de photorécepteurs et de cellules microgliales et la prolifération de la rétinopathie serait associée à une augmentation d'émission locale des MPs par les néo-vaisseaux. Ces MPs stimulent la prolifération cellulaire et pourraient donc être impliquées dans la progression de la rétinopathie à son stade prolifératif [255].

III.2.2.5. Microparticules et néphropathie

La néphropathie est l'atteinte de la micro-vascularisation rénale menant à une altération de l'endothélium et donc au rôle barrière du rein. Comme pour la rétinopathie, des études ont montré que la quantité de MPs monocytaires était corrélée à l'atteinte rénale des patients diabétiques [237]. La dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) est sécrétée dans les urines associée aux MPs et témoignerait d'une atteinte précoce vasculaire rénale. Ainsi la mesure du taux de MPs porteuses de DPP-IV pourrait être un marqueur précoce de l'atteinte rénale avant l'apparition de l'albuminurie [256].

L'altération vasculaire du DT1 constitue un stress tissulaire à l'origine d'une émission importante de MPs circulantes pouvant participer à la progression des complications du diabète. Ce pool potentiellement pathogène de MPs pourrait constituer un environnement délétère pour la greffe à venir et amplifier les phénomènes cytotoxiques enclenchés lors de l'IBMIR.

III.3. Les microparticules et la transplantation

Actuellement le monitoring de l'organe transplanté est réalisé à partir de biopsies du greffon. Toutefois, cette technique peut s'avérer invasive pour le patient ou peu informative (en particulier dans le cas de la greffe d'îlots de Langerhans). Ainsi la détection dans la circulation de molécules et/ou de composants cellulaires normalement absents et témoignant de processus physiopathologiques, peuvent être considérés comme des biomarqueurs d'intérêt. Les MPs émises par les cellules activées correspondent à cette définition et sont, de plus, spécifiques de la cellule activée dont elle reflète l'état. Actuellement peu d'études portent sur le monitoring post-greffe par le biais du dosage des MPs et concernent principalement la greffe cardiaque, rénale et d'îlots pancréatiques.

III.3.1. Les microparticules et la greffe cardiaque

L'étude menée par Morel et al., en 2008 montre, sur une cohorte de 64 patients dont 23 en rejet aigu, que les MPs porteuses de Fas et TF sont significativement augmentées lors d'un rejet aigu [188]. Ces résultats suggèrent que la phase de rejet aigu est associée à une activation cellulaire, médiée par l'activation de l'apoptose *via* Fas et se caractérisant par une production importante de MPs circulantes. De plus, une corrélation a été observée entre le temps d'ischémie et la production de MPs deux jours après une greffe cardiaque. En effet, plus le temps d'ischémie est important moins il y a de MPs émises 2 jours après la greffe suggérant une activation plus précoce des plaquettes [257]. Enfin, le ratio E-selectine⁺-MPs/PECAM⁺-MPs serait un indicateur d'activation cellulaire (valeur élevée) ou d'apoptose (valeur faible). Ainsi, chez 23 des patients greffés, un basculement post-transplantation vers un profil d'apoptose endothéliale a pu être mis en évidence [258].

III.3.2. Les microparticules et la greffe de rein

Une étude très récente, chez des patients transplantés du reins a montré qu'une diminution significative des MPs endothéliales est observable 2 mois après la greffe, uniquement chez les patients dont l'insuffisance rénale était secondaire à un diabète [259]. De la même manière, l'équipe d'Al-Massarani a mis en évidence que la greffe de rein permettait de diminuer significativement la quantité de MPs circulantes en post-greffe comparativement au taux en pré-greffe, témoignant de la diminution du stress tissulaire liée à la restauration des fonctions rénales. L'activité procoagulante des MPs reste importante immédiatement après la greffe pour rejoindre un plateau inférieur et stable après 1 an. De plus, 12 mois après la greffe la

diminution du taux de MPs et de leur activité procoagulante est d'autant plus importante que le patient ne présente pas d'antécédents cardiaques [260]. Les MPs sont aussi un témoin de l'effet du TIS. En effet, l'équipe d'Al-Massarani a aussi montré que le retour à l'état basal du taux de MPs circulantes était observé à 9 mois dans le cas de l'utilisation de cyclosporine et d'azathiopine alors qu'il est observé à 12 mois dans le cas de l'utilisation de tacrolimus et de mycophenolate mofetil [261]. De plus, l'augmentation de MPs endothéliales observée dès deux semaines de traitement par tacrolimus est associée à une accumulation délétère de la protéine C3 du système du complément à la surface de ces MPs [262].

III.3.3. Les microparticules et la greffe d'îlots de Langerhans

Le C-peptide sanguin diminue significativement lorsque 95% du greffon est détruit et constitue donc un marqueur tardif de la dysfonction insulaire. Du fait de la difficulté à réaliser des biopsies informatives des îlots dispersés dans l'arbre vasculaire hépatique, un suivi efficace de la greffe d'îlots s'avère difficile à mettre en œuvre. Les MPs apparaissent donc particulièrement intéressantes dans le cas de la greffe d'îlots comme marqueurs non invasifs de l'état du greffon. A ce titre, notre équipe a étudié les variations de C-peptide, de MPs et du besoin en insuline chez des patients greffés d'îlots [130] (Figure 15).

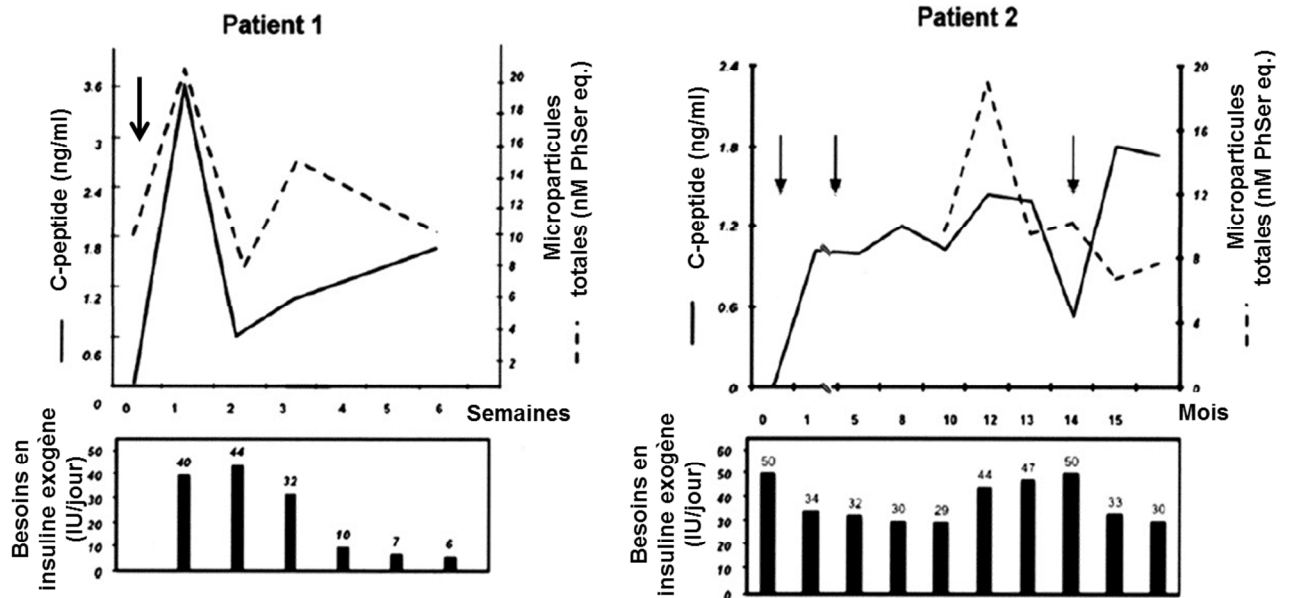


Figure 15 : Variations du C-peptide, du besoin en insuline et des microparticules circulantes lors de la greffe d'îlots pancréatiques

(d'après Toti F et al., 2011)

Le C-peptide (traits pointillés), les MPs (trait plein) et le besoin en insuline exogène (panneau du bas) ont été mesurés chez deux patients greffés d'îlots pancréatiques (Patient 1 dans les 6 semaines post-greffe, Patient 2 dans les 12 mois post-greffe). Les flèches représentent les injections d'îlots.

Dans le cas du patient 1, l'injection d'îlots est immédiatement suivie d'une augmentation simultanée du C-peptide plasmatique et du taux de MPs, témoignant de la fonctionnalité des îlots greffés et d'un remodelage membranaire intense au cours de la première semaine post-greffe. Dans le cas du patient 2, l'injection d'îlots pancréatiques permet un retour à l'état basal du C-peptide stabilisé après 6 semaines. Puis, lors d'un éventuel rejet, la quantité de MPs et de C-peptide varient de manière opposée. En effet, une chute du C-peptide est associée à une augmentation des besoins en insuline, tandis qu'un pic de MPs circulantes avait été détecté un mois auparavant. Ces résultats suggèrent que ce pic de MPs pourrait avoir valeur de pronostic d'un rejet aigu et témoignerait de l'apoptose des îlots transplantés. La perte des îlots fonctionnels a pu être compensée par une nouvelle injection d'îlots (cas du patient 2) ou par un bolus de stéroïdes chez une autre patient en probable rejet cellulaire, ramenant alors le taux de MPs et de C-peptide à leur valeur basale et témoignant ainsi d'une restauration des fonctions du greffon [130].

III.4. Les microparticules et la régénération tissulaire

Parmi les nombreuses propriétés effectrices des MPs décrites dans cette partie, l'effet des MPs sur l'angiogenèse s'avère particulièrement intéressant dans le cas de la transplantation. En effet, l'aspect pro-angiogénique des MPs peut s'avérer délétère dans le cas d'une prolifération anarchique ou peu soutenue comme c'est le cas dans la rétinopathie diabétique mais peut aussi s'avérer bénéfique dans le cas de la régénération de tissu altéré comme c'est le cas en transplantation.

III.4.1. Les microparticules et la revascularisation post-greffe

III.4.1.1. Effets paracrines des MPs de cellules mésenchymateuses sur la régénération tissulaire

Le contenu des MPs de cellules souches mésenchymateuses (CSM) est riche en miRNAs impliqués dans le développement, la survie et la différenciation cellulaire [263] et en protéines dont l'EGF (epidermal growth factor), le récepteur PDGF (platelet-derived growth factor) et le récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase. Les études tendent à montrer que les MPs de CSM miment les effets angiogéniques des CSM. En effet, l'injection de MPs de CSM dans des modèles murin de stress ischémique du myocarde [264] ou rénal [265] transmettent un signal pro-angiogénique de réparation tissulaire et limitent la propagation du stress. *In vitro*, elles diminuent l'apoptose des cellules tubulaires endothéliales du rein et favorisent leur survie et leur prolifération [3]. Ces résultats suggèrent que ces MPs pourraient limiter les dommages liés à l'ischémie reperfusion aiguë et favoriser la réparation tissulaire.

III.4.1.2. Effets paracrines des MPs de cellules progénitrices endothéliales sur la régénération tissulaire

Les MPs de cellules progénitrices endothéliales (EPC) améliorent la revascularisation des îlots chez la souris après leur greffe, leur fonctionnalité et limite l'apoptose [266]. De la même manière, l'état du greffon est altéré par des complications liées à l'ischémie reperfusion et différentes études ont montré *in vivo* et *in vitro* que l'injection locale de MPs plaquettaires favorisait la revascularisation du tissu myocardique après une ischémie [267]. Les mêmes résultats sont obtenus dans le cas de MPs d'EPC injectées chez le rat dans un modèle d'ischémie reperfusion affectant le rein [268]. Les auteurs suggèrent que l'angiogenèse

secondaire à l'intégration de ces MPs pourrait s'expliquer par le transfert d'angiomiRNAs comme miR-126 et mirR-296. Lacroix apporte des éléments supplémentaires sur la compréhension des propriétés angiogéniques des MPs endothéliales en proposant que celles-ci expriment des molécules impliquées dans la fibrinolyse [194].

III.4.2. Les microparticules : transporteurs de systèmes fonctionnels liés à la fibrinolyse

La fibrinolyse est un processus physiologique qui assure la dissolution de caillots sanguins composés de fibrine, limitant ainsi le processus de la coagulation sanguine et rétablissant le flux sanguin (Figure 16).

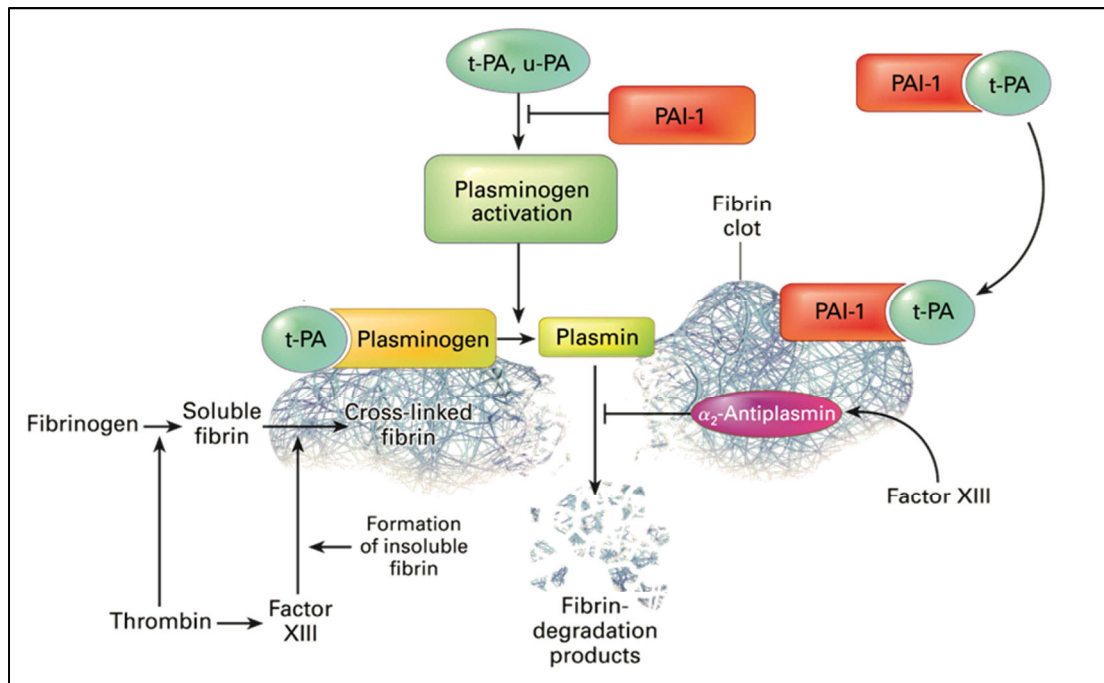


Figure 16 : Les différentes étapes et acteurs de la fibrinolyse (d'après Kohler H, 2000)

Les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA) ou tissulaire (tPA) circulent dans le plasma assemblés de manière réversible aux inhibiteurs du plasminogènes (PAI-1). Quand le caillot de fibrine est formé, suite à l'activation de la coagulation, le plasminogène et les tPA se fixent à la fibrine pour produire la plasmine. Celle-ci dégrade alors la fibrine et dissout le caillot. La réaction est ensuite stoppée par inactivation de la plasmine par la 2-anti-plasmine et par la fixation des PAI aux tPA.

Le plasminogène présente une affinité modérée avec la fibrine qui lui permet de s'intégrer au caillot sanguin. La pro-urokinase est activée en urokinase par la kallistéine et selon une boucle d'amplification de la fibrinolyse, par la plasmine. Après réparation de la lésion, l'activateur du plasminogène (tPA ou uPA) est sécrété par l'endothélium. Le plasminogène est alors activé en plasmine par l'urokinase et le tPA ou l'uPA. L'activité protéasique de la

plasmine induit une dégradation de la fibrine. La réaction est régulée par l'inactivation de la plasmine par l' α 2-antiplasmine et de l'urokinase et du tPA et uPA par les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI).

Lacroix a ainsi montré *in vitro* que les MPs émises par des cellules épithéliales après une exposition au TNF- α portent du uPA ainsi que leurs récepteurs et que leur intégration à des EPC favorise l'angiogenèse [194]. Cet effet pro-angiogénique n'est observable qu'à des concentrations faibles de MPs et est reversé à des concentrations fortes, entraînant alors un détachement des cellules et leur apoptose. Ainsi les MPs pourraient influencer et moduler les processus de réparation initialisés par les EPC. Dejouvencel et collègues suggèrent que les MPs constitueraient une surface d'activité fibrinolytique, au même titre que le TF pour la coagulation, en permettant l'assemblage d'activateurs du plasminogène liés à la surface des MPs et du plasminogène exprimé par les plaquettes, la matrice extracellulaire et la fibrine [269]. Ces MPs porteuses d'activité fibrinolytique d'origine leucocytaire ou endothéliale compenseraient localement l'activité procoagulante des MPs, participant ainsi à l'hémostase [270]. Leur phénotypage selon leur expression en uPA ou tPA constituerait un marqueur de l'activité fibrinolytique et refléterait ainsi l'état de l'équilibre entre thrombose et régénération tissulaire, donnée particulièrement précieuse dans le cas du suivi post-transplantation. De plus, l'association entre un taux élevé circulant d'anticorps anti-tPA et une diminution de la survie du greffon cardiaque a été mise en évidence, appuyant l'importance de tels marqueurs dans le monitoring du greffon [271].

La mesure des MPs circulantes porteuses de PhSer à partir d'échantillons de sang de patients renseigne sur la quantité de MPs totales circulantes et indirectement sur la fonctionnalité du greffon. D'après les différentes études cliniques, ces MPs pourraient être un outil précieux pour le pronostic et l'évaluation d'une perte précoce de fonction du greffon. Comme suggéré par d'autres équipes, le phénotypage des MPs s'avérerait d'avantage informatif sur les mécanismes cellulaires mis en jeu ainsi que sur l'effet des traitements utilisés. Ce rôle de biomarqueur est à associer avec un rôle effecteur majeur contribuant au maintien du dysfonctionnement de l'endothélium dans le DT1. Le taux élevé de MPs circulantes chez le patient diabétique de type 1, le pic de MPs observé immédiatement après la greffe d'îlots et la forte expression du TF à la surface des îlots et des MPs, constituent un terrain particulièrement propice à l'enclenchement et à l'amplification de l'IBMIR.

IV. Les analogues du GLP-1 : une utilisation potentielle en transplantation d'îlots de Langerhans

IV.1. Rôle physiologique du GLP-1 et de ses analogues

IV.1.1. L'effet incrétine médié par le GLP-1 et le GIP

La prise d'un repas déclenche une réponse hormonale complexe, dont le but est de minimiser les oscillations de la glycémie. La sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas joue un rôle majeur dans cette réponse. L'augmentation du glucose sanguin est le principal stimulus de l'insulino-sécrétion. Toutefois, des hormones intestinales, libérées par des cellules endocrines de l'épithélium intestinal lors du passage du bol alimentaire, jouent un rôle important dans l'augmentation de l'insulinémie dépendante du glucose. Cet effet est nommé « effet incrétine ». Ces hormones, appelées gluco-incrétones, sont principalement le GLP-1 (*glucagon like peptide-1*) et le GIP (*glucose- dependent insulinotropic polypeptide*). Le GIP est constitué de 42 acides aminés et est produit par les cellules K du duodénum après leur stimulation par le glucose et les acides gras. Le GLP-1 est produit dans les cellules L du jéjunum et de l'iléon par un mécanisme de clivage protéolytique différentiel de la molécule de prépro-glucagon. La sécrétion de GLP-1 se fait par des mécanismes directs médiés par le glucose au niveau des cellules L et indirects médiés par le système nerveux entérique. En effet, après le passage du bol alimentaire une simultanéité de la sécrétion de GIP et de GLP-1 est observée alors que les cellules qui les produisent sont respectivement localisées dans les régions proximales et distales de l'intestin.

Le GLP-1 présente un rôle intégré dans l'organisme en montrant des effets dans le maintien de l'homéostasie du glucose. En effet, il ralentit la vidange gastrique en induisant, au niveau de l'endothélium intestinal, une diminution de la vitesse d'absorption du glucose, ce qui entraîne une réduction des oscillations de la glycémie post-prandiale. De plus, le GLP-1 diminue la prise alimentaire qui peut être la conséquence du ralentissement de la vidange gastrique mais aussi d'un contrôle des circuits neuronaux liés à la prise alimentaire. Ce mécanisme est soutenu par la présence de récepteurs au GLP-1 dans l'hypothalamus et les neurones producteurs de GLP-1 dans le tronc cérébral [272]. Et l'injection intracérébroventriculaire de GLP-1 chez le rat induit une diminution de la prise alimentaire [273]. Le GLP-1 participe à la

clearance du glucose sanguin en favorisant le stockage de glucose dans le foie, l'utilisation de glucose par certains muscles et le tissu adipeux brun et il supprime la sécrétion de glucagon.

Chez les patients diabétiques, les effets physiologiques du GIP sont perdus et le taux de GLP-1 est plus faible mais ses effets fonctionnels sont maintenus. Pour cette raison le GLP-1 a été d'avantage étudié que le GIP dans le but de développer un traitement du DT2. Toutefois son activité est limitée par sa dégradation rapide par la DPP-IV. En effet, une administration intraveineuse de GLP-1 indique une demi-vie d'environ 2 min.

IV.1.2. L'effet du GLP-1 dans la sécrétion d'insuline

IV.1.2.1. Mécanismes cellulaires de la sécrétion d'insuline

1. *Formation de l'insuline*

L'insuline est produite sous la forme de préproinsuline, une chaîne unique de 110 acides aminés. Après le clivage de son peptide signal et son acheminement dans l'appareil de Golgi, elle acquiert sa configuration finale par la formation de deux ponts disulfures et est empaquetée dans des vésicules de sécrétion. La maturation de l'insuline se conclue par la libération du peptide C.

2. *Mécanismes cellulaires de la sécrétion d'insuline*

L'augmentation du glucose sanguin entraîne le basculement de la cellule β d'un état de « repos » (Figure 17 A) vers un état activé (Figure 17 B) destiné à la sécrétion d'insuline en réponse à la hausse de la glycémie

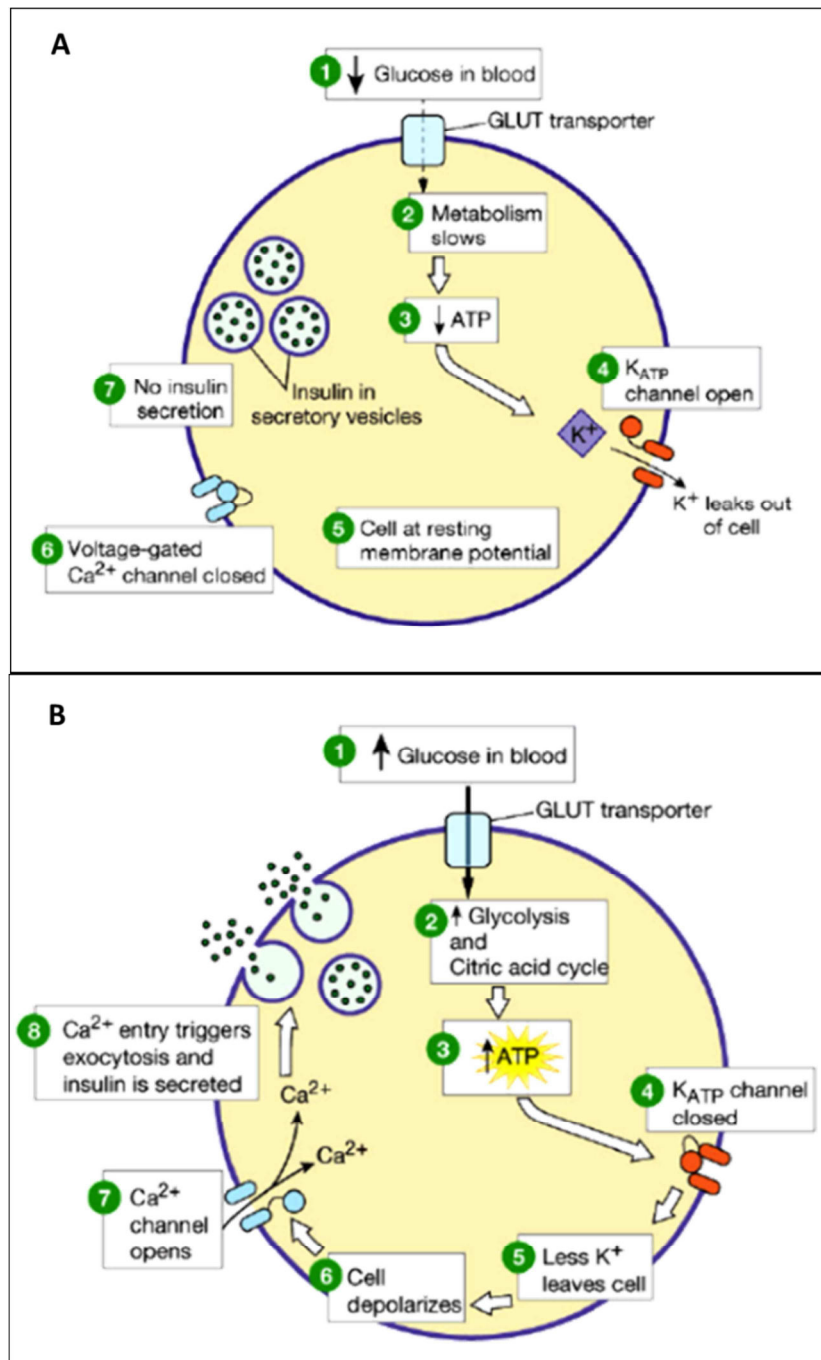


Figure 17 : Mécanismes cellulaires de la sécrétion d'insuline

(d'après Porcher C, 2013)

Le schéma A représente une cellule β « au repos » et le schéma B représente les différents mécanismes qui conduisent à la libération d'insuline suite à une hausse du glucose par la cellule β .

La fixation du glucose à son transporteur GLUT-2 permet son transfert dans le cytosol, sa phosphorylation en glucose-6P par la glucokinase puis son oxydation dans le cycle de Krebs. L'ATP alors produit induit l'augmentation du ratio ATP/ADP déclenchant la fermeture des canaux K^+ dépendants de l'ATP (K^+ -ATP). Ces canaux potassiques sont des hétéro-octamères formés de quatre sous-unités appelés Kir 6.2 (*inwardly rectifying K^+ channel*) constituant le

canal ionique et de quatre sous-unités régulatrices appelées SUR 1 (*sulfonylurea receptor*) appartenant à la famille des transporteurs ABC. La dépolarisation de la membrane, consécutive à la fermeture des canaux K⁺-ATP, entraîne une entrée importante de calcium dans la cellule *via* les canaux calciques voltage dépendant. Dans la cellule β, ces canaux calciques sont de trois types L, R et P/Q. L'augmentation du calcium intracellulaire entraîne alors l'exocytose des vésicules à insuline [274]. La libération de l'insuline est biphasique, avec une première phase de courte durée, liée à l'exocytose des granules immédiatement disponibles et une deuxième phase, de plus longue durée, associée à la libération de vésicules néoformées. Les canaux calciques de type L seraient impliqués dans la 1^{ère} phase de la sécrétion tandis que les canaux calciques de type R seraient sollicités lors de la 2^{ème} phase [275].

3. Mécanismes de l'exocytose des granules à insuline

Les protéines qui assurent le contrôle des mécanismes de l'exocytose des granules à insuline sont majoritairement les protéines SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*) comprenant la syntaxine, la SNAP-25 et la synaptobrevine. Elles contiennent toutes un motif SNARE d'environ 60 à 70 acides aminés dont 8 répétitions de 7 acides aminés. L'assemblage des v-SNARE (SNARE portée par la vésicule, la synaptobrevine) et des t-SNARE (SNARE portées par la membrane plasmique, la syntaxine et la SNAP-25) conduit à la formation d'un complexe nommé *trans*-SNARE qui déclenche la fusion des membranes (Figure 18).

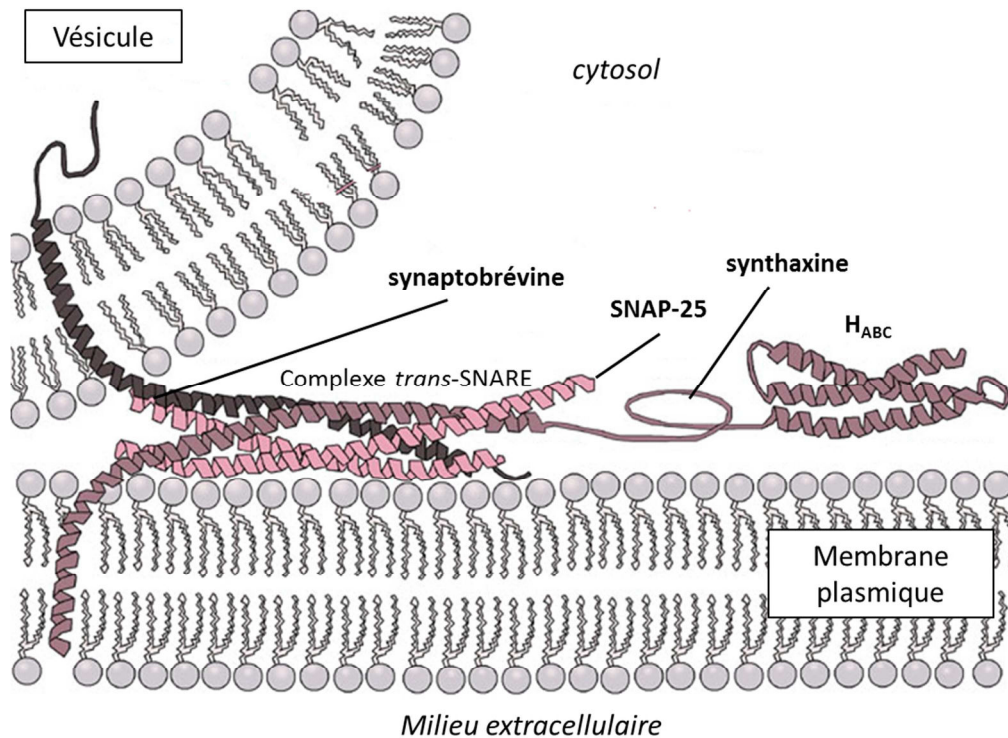


Figure 18 : Formation du complexe *trans*-SNARE impliqué dans l'exocytose des granules à insuline
(d'après : <http://biochimej.univ-angers.fr>)

La stabilité de ce complexe est assurée par la fixation de la protéine Munc18 au domaine H_{ABC} de la syntaxine. Cette stabilité fournit assez d'énergie pour permettre la fusion des deux membranes et la libération de l'insuline contenue dans les vésicules.

IV.1.2.2. Rôle du GLP-1 dans la sécrétion d'insuline

Au niveau des cellules β pancréatiques, le GIP et le GLP-1 se lient à des récepteurs heptahéliques distincts, couplés à l'activation de l'adénylate-cylase et à la production d'AMP cyclique [276]. Ces hormones potentialisent les mécanismes d'actions mis en jeu lors de la fixation du glucose à son récepteur (Figure 19). Ainsi la fixation du GLP-1 à son récepteur induit l'activation de 3 voies distinctes: la voie de la protéine kinase A dépendante de l'AMPc entrainant une augmentation du ratio ATP/ADP; la voie d'Epac (*regulated guanine nucleotide exchange factors*) aussi dépendante de l'AMPc, qui entraine la formation du complexe AMPc-Epac capable de stimuler l'activité d'une petite protéine G (Rab3) impliquée dans l'exocytose des granules d'insuline; et la voie de la PI3 kinase/PKC impliquée dans l'activation des canaux potassiques voltage-dépendants eux même impliqués dans l'activation des canaux K⁺-ATP [277,278].

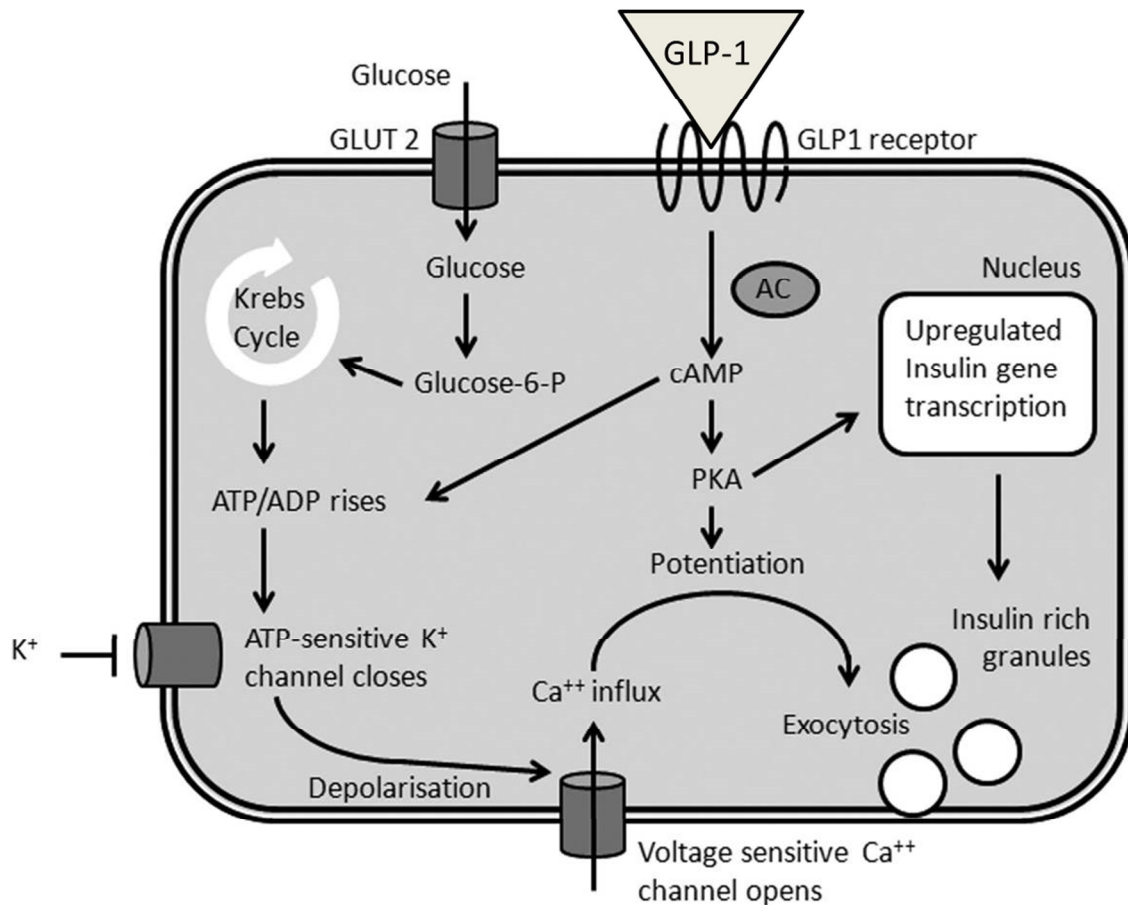


Figure 19 : Mécanismes cellulaires impliqués dans la sécrétion d'insuline et médiés par le GLP-1 (d'après Vangoitsenhoven R et al., 2008)

AC : adenylate cyclase; GLUT2 : glucose transporter 2, PKA : protéine kinase A

Le GLP-1 stimule la sécrétion d'insuline en potentialisant les voies métaboliques activées par le glucose et plus particulièrement, au niveau des canaux K^+ -ATP et de l'exocytose des granules à insuline.

IV.1.2.3. La réponse UPR : mécanismes de contrôle de la fonction sécrétrice de la cellule β , modulation par le GLP-1

1. Mécanismes cellulaires de la réponse UPR

La cellule β , de par son rôle central dans le contrôle de la glycémie, doit assurer une importante capacité de sécrétion protéique. A ce titre, elle est particulièrement sensible à l'activation de la voie UPR (*unfolded protein response*) lors d'un stress du réticulum endoplasmique. En effet, le RE est le lieu de la synthèse et du repliement des protéines. Une altération de sa fonction peut entraîner l'accumulation de protéines mal conformées et l'activation de la réponse UPR. La réponse UPR a pour but : (1) de ralentir la synthèse

protéique globale et de limiter l'arrivée d'autres protéines dans la lumière du RE, (2) de synthétiser de nouvelles protéines chaperons ou des « foldases » pour activer les processus de repliement, (3) d'engager la dégradation des protéines mal repliées par ERAD (*ER associated-degradation*), (4) de déclencher l'apoptose de la cellule en l'absence de réussite des voies précédentes.

L'activation de la réponse UPR entraîne l'activation de deux voies : une voie traductionnelle et une voie transcriptionnelle. Elle implique l'activation de trois protéines transmembranaires du RE : PERK, ATF6 et IRE-1. L'activation de ces trois protéines nécessite leur dissociation de la protéine chaperon BiP/GRP78 qui les maintient dans un état inactif dans les membranes du RE (Figure 20). L'activation de la voie traductionnelle est assurée par PERK et l'activation de la voie transcriptionnelle par ATF6 et IRE1.

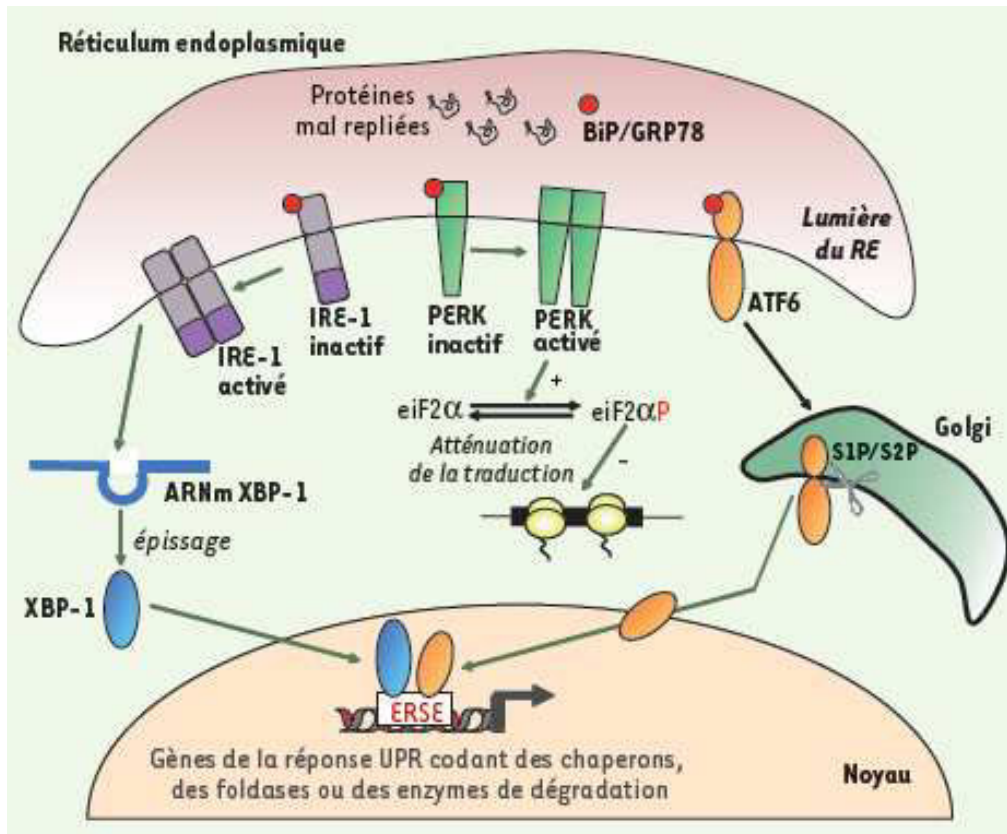


Figure 20 : Les différentes voies de la réponse UPR

(d'après Foufelle F et Ferré P, 2007)

L'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE entraîne dans un premier temps la dissociation de BiP/GRP78 et de PERK, entraînant sa dimérisation et son autophosphorylation. Ainsi activé, PERK phosphoryle la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF-2 (eukaryotic translation initiation factor 2). Il empêche alors la formation du complexe de pré-initiation de la traduction et donc l'interaction des ARNm avec la sous-unité 40S du ribosome. La dissociation de BiP/GRP78 et d'ATF6 entraîne sa migration vers le Golgi où son clivage conduit à son déplacement dans le noyau. Il active alors la transcription de protéines chaperons afin d'accroître les capacités de repliement des protéines. Enfin, La dissociation de Bip/GRP78 entraîne l'autophosphorylation d'IRE-1 provoquant l'épissage de l'ARNm d'un facteur de transcription appelé XBP-1. Celui-ci entraîne la transcription de gènes codant des enzymes impliquées dans la voie de dégradation ERAD.

Lorsque l'activation de ces trois branches ne permet pas de limiter l'excès de protéines mal conformées, la réponse UPR conduit à l'activation de l'apoptose. Trois mécanismes sont alors mis en œuvre : l'activation de Bak et Bax entraînant l'activation de la caspase-12, l'inhibition de Bcl2 par la protéine CHOP et l'activation la c-Jun kinase.

Les souris invalidées pour le gène *PERK* (*PERK*^{-/-}) naissent avec des îlots de Langerhans normaux, mais développent dans les premières semaines de vie un diabète impliquant une destruction des cellules β [279]. Les souris sauvages, en réponse au glucose, active la sécrétion d'insuline et déclenchent dans le même temps une réponse UPR afin de limiter l'accumulation de pro-insuline dans le RE. Au contraire, chez les souris *PERK*^{-/-}, cette

réponse adaptative est absente et la pro-insuline s'accumule dans le RE entraînant l'apoptose des cellules β . Ces résultats témoignent de l'importance de la réponse UPR dans le maintien de la fonctionnalité et de la viabilité de la cellule β .

2. *Modulation de la réponse UPR par le GLP-1*

En condition physiopathologiques, les cellules β sont particulièrement sensibles à l'activation du stress du RE. Ainsi il a été montré qu'un analogue du GLP-1 pouvait limiter l'apoptose induite par ce stress *in vivo* et *in vitro* [280]. De plus, l'effet du GLP-1 sur le stress du RE ne se limite pas aux cellules pancréatiques mais s'applique aussi aux cellules cardiaques, hépatiques, neuronales et macrophagiques [281-284]. Il agit sur les différentes branches de la réponse UPR ainsi que par la voie de l'AMPC/PKA. Ainsi, *via* son récepteur, le GLP-1 stimule la sécrétion d'insuline en modulant la réponse UPR et assure ainsi un équilibre dans la conversion de la pro-insuline en insuline selon les besoins de l'organisme.

IV.1.3. L'effet du GLP-1 sur la masse β insulaire

L'effet du GLP-1 sur la cellule β ne se limiterait pas à un maintien adéquat de la sécrétion d'insuline mais porterait aussi sur le maintien de la masse β insulaire. Des études ont mis en évidence une prolifération β cellulaire après un traitement par le GLP-1 ou un agoniste du récepteur suite à une pancréatectomie partielle [285] ou chez des rats diabétiques [286]. Les mécanismes par lesquels l'activation du récepteur du GLP-1 stimule la prolifération des cellules β sont peu connus. Toutefois, l'activation du facteur de transcription Pdx-1, essentiel au maintien de l'état différencié des cellules β , pourrait être impliqué dans l'un de ces mécanismes [287]. De même, la voie des MAPK ERK1/2 impliquée dans la prolifération cellulaire pourrait être activée suite à l'activation du récepteur au GLP-1 [288].

IV.1.4. Les différents analogues du GLP-1

Les effets pléiotropes du GLP-1 en fait un bon candidat dans le traitement du DT2. Toutefois, sa faible demi-vie limite son utilisation en clinique. Ainsi, deux approches ont été développées, une consiste à inhiber l'action de la DPP-IV permettant ainsi de rallonger la durée de vie du GLP-1 endogène. La deuxième consiste à utiliser un GLP-1 modifié de manière à assurer sa résistance vis-à-vis de la DPP-IV. Cette dernière catégorie constitue la classe des analogues du GLP-1 ou incrétinomimétiques. Actuellement, trois analogues du GLP-1 sont commercialisés en France : l'Exénatide (BYETTA®, Bristol Myers Squibb) le

Liraglutide (VICTOZA®, Novo Nordisk) et le Lixisenatide (LYXUMIA®, Sanofi-aventis) (Figure 21). Ces analogues sont des molécules utilisées dans le traitement du DT2 et ont une efficacité similaire sur la réduction de l'hémoglobine glyquée. Ils augmentent la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques de manière glucose-dépendante, ralentissent la vidange gastrique et diminuent la sécrétion de glucagon. Ils s'administrent par voie injectable.

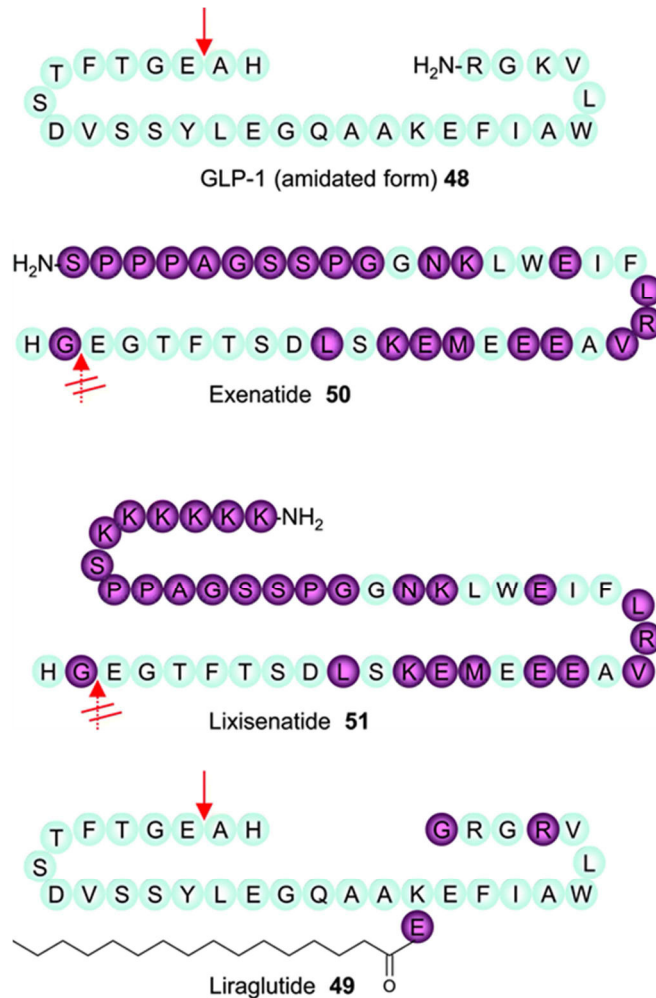


Figure 21 : Comparaison des structures des différents analogues du GLP-1 par rapport au GLP-1 endogène

(d'après Bauer A et al., 2014)

Les acides aminés en violet représentent des substitutions ou des ajouts réalisés vis-à-vis des acides aminés composant la structure du GLP-1 endogène.

IV.1.4.1. L'Exénatide

L'Exénatide, commercialisé en 2005, présente 53% d'homologie de séquence avec le GLP-1 endogène (Figure 27). Il possède un temps de demi-vie de 2h et nécessite donc deux injections par jour. La concentration plasmatique maximum de l'Exénatide est de 235 pM chez un sujet sain et pour une dose de 10µg. Il peut être utilisé en monothérapie ou en combinaison avec la metformine avec ou sans sulfonylurées. Sa dégradation se fait au niveau du rein.

IV.1.4.2. Le Liraglutide

Le Liraglutide, commercialisé en 2010, possède 97% d'homologie avec le GLP-1 endogène (Figure 27) dont il se distingue par une substitution de la lysine en position 34 par une arginine et par la fixation d'un acide palmitique (C :16) associé à un spacer à la lysine en position 26 (Figure 22).

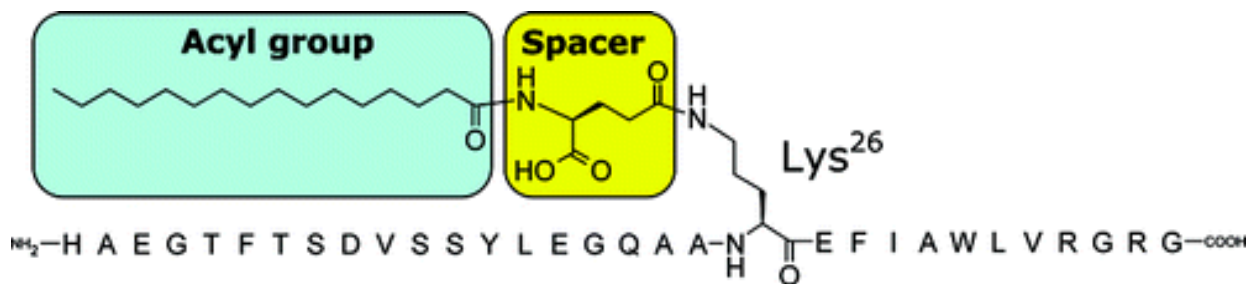


Figure 22 : Structure du Liraglutide
(d'après Madsen K et al., 2007)

La fixation d'un acide palmitique associé à un spacer à la lysine en position 26 permet au Liraglutide d'allonger son temps de demi-vie.

Cette structure modifiée du GLP-1 confère au Liraglutide, d'une part, une résistance à l'action de l'enzyme DPP-IV et d'autre part une capacité de liaison à l'albumine par l'intermédiaire d'une liaison non covalente avec l'acide palmitique. De plus, la chaîne d'acide gras permet aux molécules de Liraglutide de s'associer entre elles sous formes d'heptamères au niveau du site d'injection et de pouvoir être ainsi libéré en continu dans le sang. Cette configuration particulière du Liraglutide lui assure un temps de demi-vie d'environ 12 h et permet donc au patient une seule injection par jour. En clinique, le Liraglutide est utilisé en monothérapie ou

en association avec d'autres antidiabétiques oraux (ADO) [289]. Les concentrations d'utilisation sont 0,6 mg, 1,2 mg ou 1,8 mg en fonction du DT2 et de la tolérance du patient. La concentration plasmatique maximum du Liraglutide est de 40 nM chez un sujet sain (Figure 23). Sa métabolisation est hépatique.

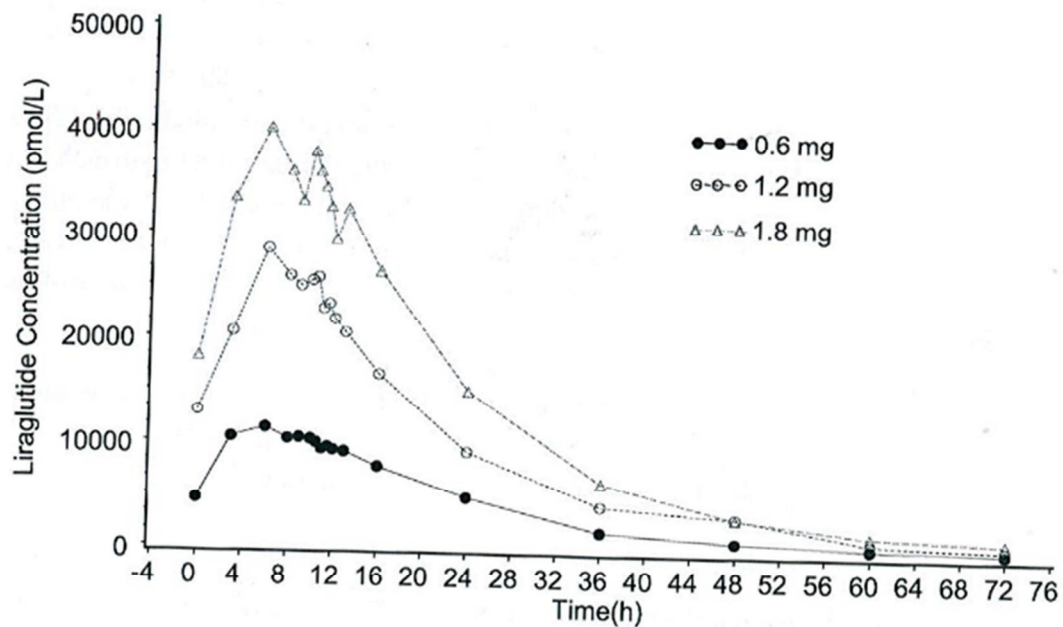


Figure 23 : Concentration plasmatique du Liraglutide en fonction des doses (0, 6 mg, 1,2 mg et 1,8mg) chez des sujets sains

(d'après la brochure d'investigateur, Novo Nordisk)

IV.1.4.3. Le Lixisenatide

Le Lixisenatide, commercialisé en 2013, présente une structure équivalente à celle de l'Exénatide avec pour seule modification, la délétion de la proline en C-terminal et l'ajout de 6 résidus de lysine (Figure 27). Il possède un temps de demi-vie de 3h mais sa forte interaction avec le récepteur du GLP-1 (4 fois plus élevée que celle du GLP-1 endogène) permet une seule injection par jour [290]. La quantité injectée varie de 5 à 20 μ g par injection. La concentration plasmatique maximum du Lixisenatide est de 235 pM chez un sujet sain et pour une dose de 20 μ g. Il est utilisé en monothérapie ou en association avec d'autres ADO. Comme l'Exénatide, sa dégradation se fait au niveau du rein.

Dans ce travail, nous avons choisi d'étudier les propriétés du Liraglutide au vu de ses effets bénéfiques en clinique, *in vivo* et *in vitro* et de sa structure quasi équivalente à celle du GLP-1 endogène.

IV.1.5. L'efficacité du Liraglutide dans le traitement du diabète

L'étude clinique randomisée LEAD (Liraglutide Effect and Action in Diabetes Studies) évalue la sécurité et l'efficacité d'un traitement par Liraglutide chez les patients diabétiques de type 2. Le programme compare l'effet du Liraglutide en monothérapie vs. glimepiride (LEAD-3), Liraglutide + glimepiride vs. rosiglitazone (LEAD-1), Liraglutide + metformine vs. glimepiride (LEAD-2), Liraglutide + Metformine + rosiglitazone vs. Placebo (LEAD-4), Liraglutide + Metformine + glimepiride vs. Insuline glargine (LEAD-5) et Liraglutide + Metformine ± glimepiride vs. Exénatide (LEAD-6).

IV.1.5.1. Effet du Liraglutide en monothérapie ou en association avec les ADOs

Le programme LEAD (1-5) a établi que le Liraglutide permet une diminution significative de l'HbA1c par rapport aux traitements, qu'il soit utilisé en monothérapie ou associé à d'autres ADOs. De manière générale, le traitement par Liraglutide assure à un plus grand nombre de patients l'atteinte l'objectif fixé par l'ADA, à savoir une Hb1Ac < 7%. L'efficacité du Liraglutide sur l'HbA1c, après 8 à 12 semaines, est particulièrement importante pour les doses de 1,2 et 1,8 mg [291]. La monothérapie à 1,8 mg est la plus efficace dans la diminution de l'HbA1c et dans la perte de poids. De plus, l'utilisation du Liraglutide en monothérapie n'entraîne pas d'hypoglycémie et lorsqu'il est associé à des ADOs, il réduit les hypoglycémies que ces ADOs peuvent induire. Par ailleurs, l'association du Liraglutide avec la metformine et le glimepiride ou la rosiglitazone permet de compenser la prise de poids associée à ces deux ADOs. Le Liraglutide diminue la pression systolique et les marqueurs de risques cardiovasculaires comme la protéine C-activée et l'inhibiteur du plasminogène-1. Par ailleurs, il améliore la fonctionnalité des cellules β (diminution du ratio proinsuline/insuline) par rapport au placebo ou à l'utilisation de rosiglitazone. Le traitement par Liraglutide n'a pas montré d'effet cancérigène notable malgré quelques cas de pancréatites (<0,2%) observés. Toutefois, une relation de cause à effet entre Liraglutide et pancréatite ne peut être ni établie ni écartée et nécessite des études complémentaires. Des données supplémentaires à l'étude LEAD, ont montré que le traitement par Liraglutide permet de diminuer de moitié le traitement insulinique chez les patients diabétiques de type 2 [291].

IV.1.5.2. Effet du Liraglutide *versus* Exénatide

L'étude LEAD-6 a montré que le Liraglutide et l'Exénatide ont une efficacité comparable vis-à-vis d'une diminution de l'HbA1c [292]. Les deux produits sont relativement bien tolérés par les patients mais l'apparition de nausées constitue les effets secondaires principaux des deux traitements. Durant les 4 premières semaines du traitement par Liraglutide, 5 à 40% des patients présentent des nausées. Ce pourcentage diminue à 10% six semaines après un traitement par le Liraglutide contre 22 semaines dans le cas de l'Exénatide. Les deux traitements ont un effet comparable sur la perte de poids des patients (- 2,9kg pour l'Exénatide et - 3,2 kg pour le Liraglutide). Par ailleurs, l'échappement glycémique observé dans le cas du traitement par l'Exénatide pourrait se rapporter à un taux circulant d'anticorps anti-GLP-1 plus élevé chez ces patients.

IV.1.5.3. Effet du Liraglutide dans le DT1

Malgré l'absence de cellule β chez les patients diabétiques de type 1, l'effet pléiotropes du Liraglutide permet d'améliorer l'effet de l'insulinothérapie chez ces patients. 24 semaines de traitement au Liraglutide chez un patient diabétique de type 1 diminue significativement l'Hb1Ac de 6,5% à 6,1% [293]. Dès 4 semaines de traitement, on peut observer une diminution des doses d'insuline quotidiennes [294]. De plus, la diminution de l'Hb1Ac peut être associée à une diminution des fluctuations du glucose, des hypoglycémies, du poids des patients et à une amélioration de la qualité de vie [295]. Dans le cas des patients diabétiques de type 1 obèses, le Liraglutide peut moduler le syndrome métabolique en améliorant le contrôle glycémique sans augmenter la fréquence des hypoglycémies. De plus, il entraîne une perte de poids d'environ 4,5 kg et une diminution des besoins en insuline et de la pression artérielle [296].

L'ensemble de ces données cliniques mettent en évidence l'effet bénéfique des analogues du GLP-1 sur le contrôle de la glycémie. Toutefois, dans ces études leur rôle dans la préservation de la cellule β est difficile à évaluer. Ainsi, l'utilisation de modèles expérimentaux permet de mieux appréhender les mécanismes cytoprotecteurs de ces molécules.

IV.2. Le Liraglutide dans la greffe d'îlots pancréatiques

IV.2.1. Effets cytoprotecteurs des analogues du GLP-1 sur les îlots en culture

Au vu de l'antériorité de la mise sur le marché de l'Exénatide, les premiers résultats concernant l'effet cytoprotecteur des analogues du GLP-1 se rapportent à cette molécule. L'utilisation d'Exénatide sur des îlots humains en culture pendant 2 et 7 jours montre une diminution du dépôt amyloïde, de l'activation de JNK et de la caspase 3, de l'apoptose et une augmentation de la prolifération cellulaire, de l'insuline sécrétée en réponse au glucose et du contenu en insuline des cellules β [297]. L'Exénatide présente aussi des propriétés anti-inflammatoires en diminuant le contenu des îlots en TF, IFN- γ , IL-17, IL-1 β et IL-2 et en augmentant la phosphorylation d'Akt [298]. Ces effets anti-inflammatoires sont aussi observés après l'application de Liraglutide à 100 nM sur des cellules endothéliales. Elle permet la diminution de l'expression de VCAM et de l'E-sélectine et l'adhérence des monocytes, par des mécanismes impliquant l'AMP Kinase [299]. Enfin, l'application de conditions hypoxiques combinée à un traitement par l'Exénatide diminue l'apoptose et la quantité de ROS produits. De plus, ce traitement augmente l'insulino-sécrétion et l'activité des enzymes redox dans des îlots de souris et se traduit par une amélioration de la réussite de la greffe [300].

Dans les cellules β , le Liraglutide augmente l'activité des enzymes de conversion de la proinsuline en insuline *via* la voie de la AMPc/PKA [301]. L'utilisation de Liraglutide permet de limiter l'apoptose induite par l'application d'un stress du RE *in vitro*, en inhibant les voies PERK et IRE-1. *In vivo*, l'inhibition de la voie PERK et de p-JNK a été aussi observée [280]. L'équipe de Shapiro a mis en évidence que l'application d'1 μ M de Liraglutide à des îlots humains pendant 24 et 48h réduit significativement l'apoptose et augmente le nombre et la taille des îlots [302]. Toutefois, la transcription du génome d'îlots humains soumis à un milieu hyperglycémique et contenant 10 nM de Liraglutide, pendant 22 h, montre que les gènes activés sont d'avantage liés à l'insulino-sécrétion qu'à la viabilité cellulaire [303].

IV.2.2. Effets cytoprotecteurs des analogues du GLP-1 au cours de la greffe d'îlots

Les résultats *in vitro* obtenus par Shapiro, combinés aux observations cliniques sont en faveur d'une utilisation du Liraglutide en pré-et post-greffe. En effet, l'injection d'îlots humains

prétraités par le Liraglutide améliore l'efficacité de la greffe chez des souris C57Bl/6-RAG (-/-) traitées au Liraglutide. De la même manière, dans un modèle porcin, le pré- et post-traitement au Liraglutide augmente l'insulino-sécrétion mais ne modifie pas le pourcentage d'animaux insulino-indépendants [304]. L'importance de cette continuité dans le traitement est confirmée par le travail de Merani, en 2008, qui met en évidence l'efficacité du pré- et post-traitement du Liraglutide sur la tolérance au glucose. De plus, il met l'accent sur l'efficacité du Liraglutide à la phase aigüe de la greffe [305]. Par ailleurs, le prétraitement des îlots avec 1 μ M de Liraglutide suivi de leur transplantation dans un dispositif sous cutané dorsal chez des souris traitées ou non par Liraglutide ne montre pas d'effet significatif sur la revascularisation des îlots [306].

Dans un modèle murin de greffe d'îlots, l'injection de trois fois moins d'îlots, associée à l'utilisation de l'Exénatide en post-greffe, permet de restaurer le nombre et la masse d'îlots transplantés et de diminuer l'apoptose induite à la phase précoce de la greffe [307]. Dans la continuité de ces résultats, l'équipe d'Oberholzer a mis en évidence que l'association d'Etanercept et d'Exénatide au TIS permet d'atteindre l'insulino-indépendance avec 2 fois moins d'îlots greffés [108].

D'autre part, le Liraglutide présenterait des effets cardiovasculaires protecteurs sur le dysfonctionnement de l'endothélium, qui pourraient présenter un intérêt supplémentaire dans son utilisation en transplantation d'îlots [308]. De manière intéressante, cet effet cytoprotecteur vasculaire pourrait être médié par une activité liée à sa fixation au récepteur du GLP-1 mais aussi par des mécanismes indépendants de ce récepteur [309].

Les propriétés anti-apoptotiques, anti-inflammatoires et stimulantes de l'insulino-sécrétion du Liraglutide, mises en évidence *in vitro* et *in vivo*, sont en faveur de son utilisation combinée en pré- et post-traitement de la greffe d'îlots. De plus, actuellement, le contrôle de la réaction IBMIR repose sur des thérapies globales de diminution du stress inflammatoire. Ainsi, les propriétés cytoprotectrices du Liraglutide pourraient être efficaces dans le contrôle spécifique de l'IBMIR, en maintenant la fonction et la masse β cellulaire greffée.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Ce travail est consacré à l'étude des mécanismes cellulaires qui régissent la réaction IBMIR au cours de la greffe d'îlots pancréatiques et représentent une étape déterminante pour la survie des îlots transplantés. Compte-tenu de l'importance des remodelages de la membrane plasmique et des MPs dans la réponse cellulaire, leur éventuelle contribution à la réaction IBMIR est centrale. En effet, qu'elles soient d'origine monocytaire ou insulaire, elles pourraient se comporter comme des effecteurs cellulaires disséminant les propriétés procoagulantes et pro-inflammatoires promues par les cytokines et le stress ischémique caractéristiques de la réaction IBMIR.

Ce travail repose sur l'hypothèse que les remodelages membranaires dans le plan de la membrane ou entre les feuillettes sont déterminants pour la fonction de la cellule β et qu'ils favorisent la libération des microparticules. De plus, ce travail s'appuie sur la notion que l'ischémie des îlots induit l'apoptose des cellules β et que cette dernière peut être limitée pharmacologiquement par les analogues du GLP-1 dont les propriétés anti-apoptotiques ont été récemment démontrées.

Ainsi, nous avons étudié *in vitro* les conditions de stress inflammatoire caractéristique de l'IBMIR, leurs conséquences sur la cellule β et les éventuelles boucles d'amplification de la réponse cellulaire promues par les MPs.

Deux objectifs ont été poursuivis :

- ❖ L'étude des MPs de la cellule β et leurs effets autocrines dans la réponse inflammatoire ainsi que la modulation pharmacologique de leur émission et de leurs propriétés pro-apoptotiques et procoagulantes par le Liraglutide.
- ❖ L'étude des remodelages membranaires et des mécanismes de la sécrétion d'insuline des cellules β en réponse au stress cytokinique et leur modulation par le Liraglutide.

TRAVAUX PERSONNELS

PARTIE 1

**Emission et propriétés effectrices des MPs de la cellule β au cours
du stress oxydant et cytokinique : étude de l'apoptose et de
l'activité TF, modulation par le Liraglutide**

I. Objectifs

Dans cette première partie, notre travail s'est attaché à caractériser un modèle de stress cellulaire mimant les conditions de l'IBMIR. L'apoptose, l'activité du TF à la surface des cellules β et l'émission des MPs ont été évaluées dans ce modèle ainsi que leur modulation par le Liraglutide. L'intégration des MPs aux cellules cibles a été observée par microscopie à fluorescence grâce à la sonde lipidique fluorescente PKH26. Enfin, les propriétés effectrices des MPs sur l'apoptose et l'activation des voies NF- κ B et UPR dans les cellules cibles ont été recherchées. La modulation de chacune de ces voies par le Liraglutide a été évaluée.

II. Caractérisation du modèle de stress

II.1. Utilisation d'un modèle cellulaire

Dans le contexte de l'architecture multicellulaire de l'îlot pancréatique, l'étude *in vivo* des MPs issues de cellules β est difficile à mettre en œuvre du fait de l'absence de marqueurs spécifique de la cellule β qui permettrait leur identification par phénotypage. A ce titre, l'approche cellulaire nous a permis d'évaluer les propriétés effectrices de MPs dans un système de réponse autocrine mais aussi d'étudier l'effet spécifique du Liraglutide sur le maintien de la fonction de la cellule β . Nous avons choisi les cellules β de rat Rin-m5f, particulièrement étudiées dans les processus d'apoptose, en comparaison de l'autre lignée de cellules β , les INS-1, d'avantage utilisées dans les tests de sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Les expériences et les données obtenues ont reposé sur la caractérisation initiale du modèle choisi pour permettre d'apprécier des variations de l'apoptose, de l'insulino-sécrétion et d'émission des MPs. Ces variations devaient être observables dans les conditions de stress inflammatoire et oxydant et après traitement pharmacologique. Toutes les manipulations décrites ci-après ont été réalisées en triplicat.

II.2. Induction du stress oxydant

Dans notre modèle, l'application d'un stress oxydant repose sur l'utilisation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pendant 6 h. La concentration d'utilisation a été déterminée à partir d'une courbe dose-réponse évaluant l'apoptose, l'insulino-sécrétion et l'émission des MPs (Figure 30). Un allongement du temps de traitement n'est pas pertinent dans le cas du H_2O_2 qui, après 6 h, est très rapidement dégradé dans les milieux de culture.

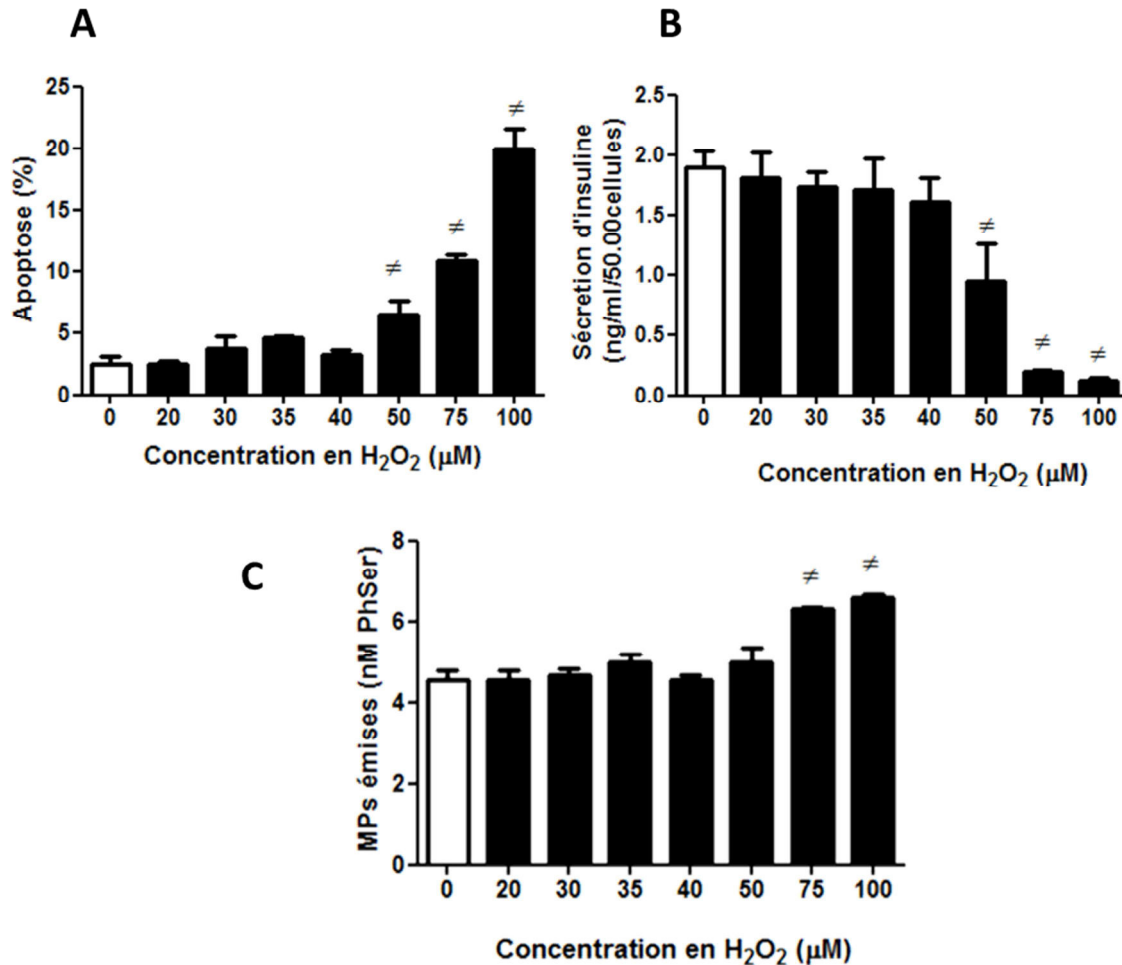


Figure 24 : Evaluation de la concentration du H_2O_2 sur l'apoptose (A), l'insulino-sécrétion (B) et l'émission des MPs (C)

Après application de H_2O_2 pendant 6h (barres noires), l'apoptose (A) est évaluée par marquage de l'ADN hypodiploïde à l'aide d'iodure de propidium et analysée en cytométrie de flux. Dans le surnageant, l'insuline (B) est dosée par ELISA et les MPs (C) par test enzymatique fonctionnel prothrombinase. ($n=4$, \neq : différence significative par rapport aux cellules contrôle non stimulées (barres blanches)).

A partir de 75 μM de H_2O_2 , les trois paramètres varient de manière significative par rapport aux cellules non stimulées. D'après la littérature, lors de la mise en culture des îlots isolés

une perte d'environ 15 à 20% des cellules est observée. Ainsi, la dose de 100 μ M été choisie au vu des 19,6% d'apoptose obtenus dans notre modèle avec cette concentration (Figure 26).

II.3. Induction du stress cytokinique

Le choix des cytokines et de leur concentration a été déterminé à partir de données de la littérature décrivant des modèles *in vitro* d'îlots en culture ou de la réaction IBMIR [310-313]. Ainsi, l'application du stress cytokinique repose sur l'utilisation d'IL-1 β à 50U/ml et de TNF- α à 1000U/ml. De la même manière que précédemment, le temps d'incubation des cytokines a été déterminé à partir de la variation significative des trois paramètres suivants : apoptose, insuline sécrétée et MPs émises (Figure 31).

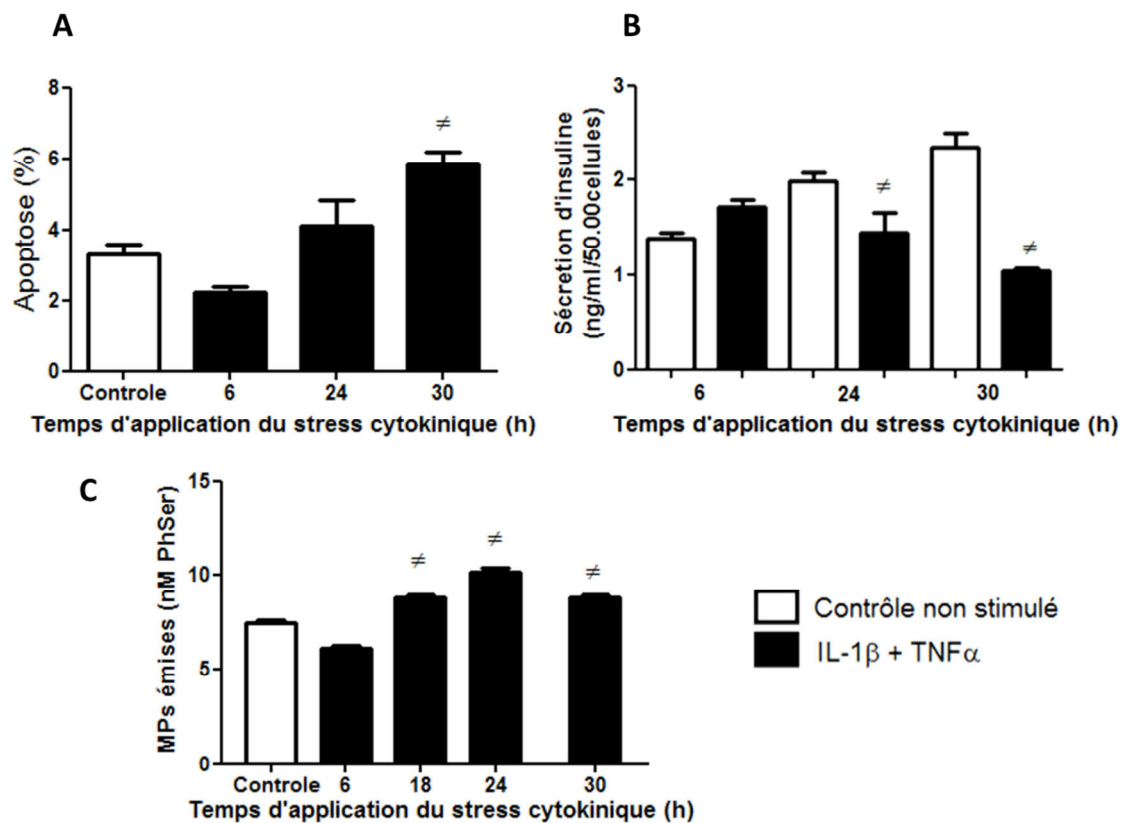


Figure 25 : Evaluation du temps d'incubation du cocktail de cytokines sur l'apoptose (A), l'insulino-sécrétion (B) et l'émission des MPs (C)

Après l'application d'IL-1 β à 50U/ml et de TNF- α à 1000U/ml (barres noires), l'apoptose (A) est évaluée par marquage de l'ADN hypodiploïde à l'aide d'iodure de propidium et analyse en cytométrie de flux. Dans le surnageant, l'insuline (B) est dosée par ELISA et les MPs (C) par test enzymatique fonctionnel prothrombinase. (n=3, # : différence significative par rapport aux cellules contrôle non stimulées (barres blanches)).

A partir de 24 h de stimulation, l'émission des MPs et l'insulino sécrétion varient de manière significative par rapport aux cellules non stimulées. Une détection significative d'apoptose est

possible à partir de 30 h d'incubation. On observe une diminution de la quantité des MPs émises dans le surnageant à 30 h par rapport à la quantité présente à 24 h (Figure 27C). Cette diminution peut être expliquée par un basculement de l'équilibre de la production vers la recapture des MPs. Ainsi, notre choix s'est porté sur 24 h de stimulation afin de se situer au pic de production de MPs avec une recapture minimale. De plus, cette durée offrait l'avantage de se différencier du stress oxydant en se plaçant en situation d'une apoptose encore non significative (Figure 27A). Toutefois, au vu de nos résultats, il est probable qu'à 24 h de stimulation les processus apoptotiques soient déjà engagés dans les cellules pour devenir significatifs à 30 h.

II.4. Protocole de stimulation

Dans la continuité des travaux de Shapiro sur le pré- et post-traitement au Liraglutide dans la greffe d'îlots, la concentration de 1 μ M de Liraglutide a été utilisée dans tout ce travail pour évaluer la modulation pharmacologique par cet analogue du GLP-1 [302,304].

De la même manière, afin de se rapprocher du protocole de la greffe d'îlots et de la continuité du traitement proposé par l'équipe de Shapiro, le stress oxydant a été appliqué selon un protocole séquentiel (Figure 32A). Ainsi, les cellules β ont été prétraitées pendant 4 h avec du Liraglutide pour mimer le prétraitement des îlots en culture, puis ont subi 6 h de stress oxydant pour mimer le stress ischémique lié à l'isolement. Enfin, 14 h de traitement par Liraglutide sont appliquées pour mimer le traitement post-opératoire des patients par le Liraglutide.

Dans le cas du stress cytokinique, le cocktail de cytokines est appliqué pendant 24 h pour mimer la réaction inflammatoire de l'IBMIR et le Liraglutide est appliqué en même temps que le stress (Figure 32B).

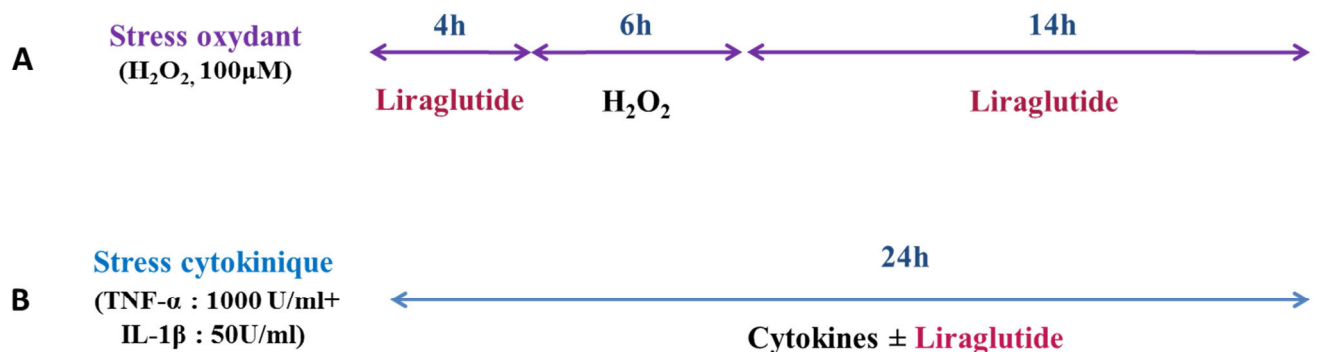


Figure 26 : Schématisation du modèle de stress

Le modèle de stress est appliqué sur un tapis cellulaire à 70% de confluence. L'apoptose, l'insuline sécrétée et les MPs émises sont dosées à la fin des 24 h de traitement dans le cas des deux stress.

II.5. Protocole de production et d'isolement des MPs

Notre travail s'attache à évaluer les propriétés autocrines des MPs effectrices dans un contexte inflammatoire et oxydant. Ainsi deux types de MPs ont été produits à partir des deux stress oxydant et cytokinique. Les MPox ont été récoltées après l'application du stress oxydant et les MPcyt après l'application du stress cytokinique. Les MPox sont produites à partir d'un tapis cellulaire à 90% de confluence, par un traitement de 6 h par 100 μ M d' H_2O_2 , suivies de 14 h d'incubation dans du milieu frais. Les MPcyt sont produites par traitement d'IL-1 β à 50 U/ml et de TNF- α à 1000 U/ml pendant 24 h. Après élimination des cellules apoptotiques et des débris cellulaires par une centrifugation courte du surnageant (5 min, 13 000g) pour éliminer les cellules apoptotiques et les débris cellulaires, les MPs sont sédimentées par une centrifugation longue (1 h, 13 000 g) et conservées à 4°C dans du milieu sans SVF. Celles-ci sont ensuite appliquées à des cellules cibles Rin-m5f pendant 24 h afin d'évaluer leurs propriétés effectrices. Des résultats préliminaires montrent que le surnageant de cette dernière centrifugation n'a pas d'effet effecteur.

III. Contenu de l'article n°1

Titre : "Liraglutide protects Rin-m5f β cells by reducing procoagulant tissue factor activity and apoptosis prompted by microparticles under conditions mimicking Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction" Article publié dans *Transplant International*

CONGRESS PAPER

Liraglutide protects Rin-m5f b cells by reducing procoagulant tissue factor activity and apoptosis prompted by microparticles under conditions mimicking Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction

Celine Gleizes,¹ Andrei Constantinescu,^{1,2} Malak Abbas,^{1,3} Houda Bouhadja,⁴ Fatiha Zobairi,¹ Laurence Kessler^{1,5*} and Florence Toti^{4*}

1 EA 7293, Vascular and Tissular Stress in Transplantation, Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, Strasbourg, France

2 Department of Parasitology and Parasitic Diseases and Animal Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Agronomical Sciences and Veterinary Medicine, Bucharest, Romania

3 Faculty of Sciences, Lebanon University, Hadath, Lebanon

4 Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, UMR7213 CNRS, Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, Illkirch, France

5 Department of Diabetology, University Hospital, Strasbourg Cedex, France

Keywords

beta cell, Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction, liraglutide, membrane microparticles, tissue factor.

Correspondence

Florence Toti, UMR7213 CNRS, Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, 74 route du Rhin F - 67401 Illkirch, France.

Tel.: (+33) 3 68 85 41 95;

fax: (+33) 3 68 85 43 13;

e-mail: toti@unistra.fr

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

*These two authors contributed equally to this work.

Received: 31 October 2013

Revision requested: 2 December 2013

Accepted: 14 February 2014

doi:10.1111/tri.12286

Introduction

Pancreatic islets transplantation is a highly promising procedure with advantages over whole pancreas transplantation, predominantly because it is a noninvasive and diabetogenic effects pertaining to the immunosuppressive

Summary

Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR) occurs at the vicinity of transplanted islets immediately after intraportal infusion and is characterized by cytokine secretion, tissue factor (TF) expression, and β cell loss. Microparticles (MPs) are cellular effectors shed from the plasma membrane of apoptotic cells. Modulation of the properties of β cell-derived MPs by liraglutide was assessed in a cellular model designed to mimic IBMIR oxidative and inflammatory conditions. Rin-m5f rat b cells were stimulated by H_2O_2 or a combination of IL-1b and TNF-a. Cell-derived MPs were applied to naive Rin-m5f for 24 h. Apoptosis, MF release, TF activity, P-I κ B expression, and MP-mediated apoptosis were measured in target cells. Direct protection by liraglutide was shown by a significant decrease in the oxidative stress-induced apoptosis (18.7% vs. 7.6%, $P < 0.0001$ at 1 μ M liraglutide) and cellular TF activity (40% at 100 nM liraglutide). Indirect cytoprotection led to 20% reduction in MP generation, thereby lowering MP-mediated apoptosis (6.3% vs. 3.7%, $P = 0.022$) and NF- κ B activation (50%) in target cells. New cytoprotective effects of liraglutide were evidenced, limiting the expression of TF activity by β cells and the generation of noxious MPs. Altogether, these data suggest that liraglutide could target pro-apoptotic and pro-inflammatory MPs in transplanted islets.

treatment are lowered [1,2]. Furthermore, improvements in islets isolation and therefore enhanced engraftment efficacy can be foreseen in clinical practice on a short term [3]. According to data from the Collaborative Islet Transplant Registry in 2012, one-year insulin independence was reached in 80% of transplanted patients, and 44%

maintained a three-year insulin independence [4]. Despite these encouraging data, the destruction of a proportion of the islets at the early stages of transplantation remains a major issue. Indeed, engraftment and/or survival of a sufficient β cell mass are mandatory for long-term graft function. Ischemia/reperfusion may occur as a result of the isolation procedure when islets are disconnected from their vascular bed and immediately after portal injection when they are again in contact with the recipient blood flow. In particular, cell apoptosis during the isolation procedure or in the conservation medium before infusion [5,6], and the Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR) immediately after transplantation are thought to be early causes of the loss of graft function [7]. IBMIR is prompted by the contact of infused islets with portal blood [8]. It is characterized by a drastic cytokine secretion and a high expression of tissue factor (TF) at islets' vicinity [9]. TF, a member of the type-1 cytokine receptor superfamily and a trigger of the coagulation cascade [10], has previously been associated with transplantation failure, particularly because of its prothrombotic properties that are enhanced after plasma membrane remodeling at the surface of stressed cells [11–13]. In islet transplantation, the loss of graft function 7 days after infusion has been associated with the degree of activation of the blood cascade immediately after islet infusion [9]. Indeed, factor VIIa antithrombin complexes (FVIIa-AT) and thrombin–antithrombin complexes (TAT) are readily elevated in the plasma 50 min after infusion. Furthermore C-peptide levels 7 days after infusion are inversely correlated with levels of FVIIa-AT and TAT, indicating the major role of TF and its ligand factor VIIa in the coagulation events triggered by IBMIR [9].

In the vessel, TF is a plasma membrane protein expressed by endothelial cells and monocytes. The active form of TF is conveyed by microparticles (MPs) [14,15]. MPs are sub-micron plasma membrane fragments shed by stressed or apoptotic cells and their release in cell supernatant is proportional to the degree of apoptosis [16]. MPs contribute to cell cross-talk because they bear active proteins and lipid mediators from the parental stimulated cells that they can deliver to naïve target cells [17]. In addition to phosphatidylserine, the anionic phospholipid exposed by stressed membranes, TF constitutes another procoagulant entity borne by MPs. When delivered by MPs, TF increases the procoagulant surface potential of target cells at early and later stages. Recent data suggest that TF-bearing MPs could contribute to a sustained procoagulant activity at endothelial cell surface through the recycling of TF⁺-MPs [18].

In transplantation, MPs have been scarcely studied. Endothelial circulating MPs were shown reliable markers of patients' recovery after renal transplantation and promising tools for the monitoring of immunosuppressive treatment [19,20]. Furthermore, they were associated with the occur-

rence of acute myocardial graft rejection [21]. Circulating MPs could also prove useful to detect graft loss when biopsies are not informative or impossible. Indeed, an early rise in plasma MPs was evidenced in islet-transplanted patients undergoing rejection [22,23].

It was recently proposed that liraglutide could be of benefit in islet transplantation through the cytoprotection of the graft by islet preconditioning combined with peri-operative treatment. Liraglutide is a GLP-1 analog that belongs to the incretinomimetics new class of drugs. In the treatment of type 2 diabetes, beneficial effects of incretinomimetic rely on their ability to enhance insulin secretion and to promote β cell survival. Recently, their anti-apoptotic properties and ability to favor the proliferation of insulin-secreting β cells was evidenced. *In vitro*, liraglutide protects isolated islets from apoptosis [24], and several animal studies have already shown an improvement in islet engraftment and functions by liraglutide treatment [24,25]. Nevertheless, information on the cellular actors that could mediate liraglutide cytoprotective effects at the early stages of islet transplantation is still lacking.

The present *in vitro* study investigates the effects of liraglutide on MPs with a particular emphasis on their role on β cell function and survival. Cells were submitted to cytokine and oxidative stress conditions to mimic IBMIR and the stress generated by ischemia /reperfusion during islet transplantation. TF activity at cell surface, properties of MPs on the target cell survival, and their modulation were assessed using a MP-mediated cell cross-talk model.

Material and methods

Cell culture

Rin-m5f, rat β cells line (CRL-11605TM, ATCC, Manassas, VA, USA), was seeded at 125 000 cells/cm² in RPMI 1640 (PANTM Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) medium containing 4.5g/l glucose, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate and supplemented with 10% of bovine fetal serum (Gibco, Saint Aubin, France) and 20 μ g/ml of gentamicin (Lonza, Basel, Switzerland). Cells were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere.

Cellular model of cytokine and oxidative stress and pharmacological modulation

Stress was applied when cells had reach 70% of confluence as reported elsewhere [26]. For each stress procedure, a specific pharmacological modulation was applied. Cytokine stress was induced by the addition of 50 U/ml of IL-1 β (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 1000 U/ml of TNF- α (Sigma) for 24 h in the presence or absence of 1 μ M of liraglutide (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) as proposed by other investigators [27–30]. Oxidative stress was induced

by the sequential application of H₂O₂ (Sigma) mimicking the conditions of the islet graft procedure: Rin-m5f cells were first pretreated by 1 μ M liraglutide for 4 h, a concentration proposed in clinical settings for the preconditioning of islets maintained in culture medium 24 h before transplantation [24]. Medium was removed at the end of the first incubation time, and 100 μ M of H₂O₂ in fresh medium was added for 6 h to mimic the oxidative stress in the islet graft prompted by ischemia/reperfusion. MPs were collected in the supernatant at the end of the 6-h incubation and kept at 4 °C until measurement. Cells were further incubated with fresh medium containing 1 μ M liraglutide for 14 h to mirror the treatment of the transplanted patients. Cell supernatant was finally collected and kept at 4 °C.

MP generation, collection, and quantification

Microparticles (MPs) were collected from the supernatant by differential centrifugation. Detached cells and debris were discarded (13 000 g for 5 min) and MPs were further isolated and washed by two centrifugation steps (13 000 g for 1 h). Total MP concentration was determined by prothrombinase assay after capture onto insolubilized Annexin V. In this assay, blood clotting factors (FXa, FVa, FII) and calcium concentrations were determined to ensure that phosphatidylserine (PhtdSer) borne by MPs is the rate-limiting parameter in the generation of soluble thrombin from prothrombin. Immobilized MPs were incubated with factor Xa (11.2 μ M, Biogenic, Perols, France), factor Va (33.3 μ M, American Diagnostica, Stamford, CT, USA), prothrombin (1.2 μ M, Hyphen BioMed, Paris, France), and 2.2 mM CaCl₂ in Tris buffer saline for 10-min incubation at 37 °C. Conversion of prothrombin to thrombin was revealed after 15 min by the cleavage of a specific chromogenic thrombin substrate (1.52 mM final concentration, paranitroaniline peptide (pNAPEP), CRYOPEP, Montpellier, France) using a microplate spectrophotometric reader set in kinetic mode, at 405 nm. Results were expressed as nanomolar PhtdSer equivalent (nM PhtdSer eq.) with reference to a standard curve constructed using liposomes of known concentration and PhtdSer eq. proportion [31].

MP-mediated cell cross-talk

Microparticles (MPs) generated by oxidative stress (MPox) and MPs generated by cytokine stress (MPcyt) were applied to naive Rin-m5f cells at a final concentration of 10 nM PhtdSer eq. for 24 h with or without 1 μ M liraglutide.

Assessment of MP transfer to target cells

Collected MPs were labeled by 2 μ M of a red fluorescent lipid probe PKH26 (Sigma, L'isle d'Abeau Chesnes,

France), washed twice by centrifugation (13 000 g, 60 min), and 10 nM PhtdSer eq. finally applied to Rin-m5f for 24 h. Accumulation of the probe on target cell surface was observed by fluorescent confocal microscopy and quantified by flow cytometry with a FACS-scan cytometer (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) set at logarithmic gain. 10 000 events were recorded for each sample

Quantification of apoptosis

After stimulation, cells were washed and permeabilized by a 70% ethanol solution at 4 °C for at least 24 h. After three washing steps, cells were resuspended in a solution containing I-A RNase A (Sigma) for 15 min at 37 °C. Saturating concentration of propidium iodide (Sigma) was applied (0.1 mg/ml) and the degree of apoptosis evaluated by the quantification of hypodiploid DNA by flow cytometry (Becton Dickinson).

Measurement of TF activity

After 24 h of stimulation, TF activity at cell surface was evaluated by Tenase enzymatic assay. TF activity was measured on washed cells through its ability to promote the activation of factor X (150 nM, Hyphen Biomed, Neuville, France) by factor VII(a) (5 nM, Novoseven, Denmark) in the presence of 1 mM CaCl₂. The reaction was allowed to proceed for 15 min at 37 °C. CS11 (65), a chromogenic substrate for factor Xa (Hyphen Biomed), was then added at a final concentration of 0.1 mM and variations in absorbance were recorded at 405 nm after 20-min incubation. Results were expressed as fm TF activity per 50 000 living cells reference to a standard curve established with known amounts of highly purified lipidated recombinant human tissue factor (ADF Biomedical, France).

Western blot analysis

After treatment, cells were washed twice with PBS and then lysed in TRIS buffer containing protease inhibitors (5 μ g/mL leupeptin, 5 mM benzamidine) and 2% Triton X-100 on ice. Total proteins (30 μ g) were separated by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide (Sigma) gels as previously described [32]. Blotting membranes were incubated with the primary mouse antibody for p-I β Ba (US Biological, Swampscott, MA, USA; 1:1000 dilution) or total I β Ba (Millipore, Molsheim, France, 1:1000 dilution) overnight at 4 °C. Detection of b-tubulin protein was used for normalization and quantification. After washing, membranes were incubated with the anti-mouse IgG antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, 1:10 000 dilution) at room temperature for 60 min. Prestained markers

(Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) were used for molecular mass determinations. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Density analysis was performed using ImageQuant LAS 400C imager (GE Healthcare). For each specific labeling, values were expressed as the ratio of protein to β tubulin densities.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of mean (SEM) and were analyzed using GraphPad Prism5. Statistical analysis between the two groups was carried out using unpaired Student's test, and all experiments were performed at least three times; a P value < 0.05 was considered significant.

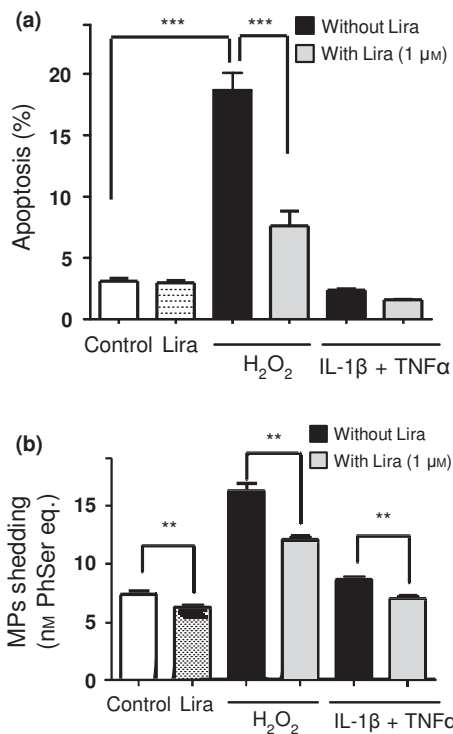


Figure 1 Liraglutide decreases β cell apoptosis (a) and microparticle (MP) shedding (b). Cell stress was achieved by H₂O₂ or IL-1 β + TNF- α combination in the presence (gray bars) or absence (black bars) of 1 μ M liraglutide. MPs generated in the supernatant were measured by solid-phase prothrombinase enzymatic assay under conditions where phospholipids are the rate-limiting parameter of the conversion of prothrombin into thrombin. Data are expressed as nM PhdSer eq. by reference to a standard curve constructed with known amounts of synthetic phospholipid vesicles. Empty bars represent unstimulated cells, and dotted bars represent cells treated by liraglutide alone. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 6; Lira: liraglutide; **: P < 0.01; ***: P < 0.001). Untreated cells: 3.1 \pm 0.06%.

Results

Liraglutide protects b cells from apoptosis and limits the release of MPs
 Liraglutide reduced the degree of apoptosis prompted by the oxidative stress from 18.69 \pm 1.9% to 7.63 \pm 1.2% (P < 0.0001). Modulation of apoptosis by liraglutide in cells submitted to IL-1 β +TNF- α was hardly detectable due to the very low values of apoptosis generated by the cytokine stress (Fig. 1a). A significant increase in MP shedding

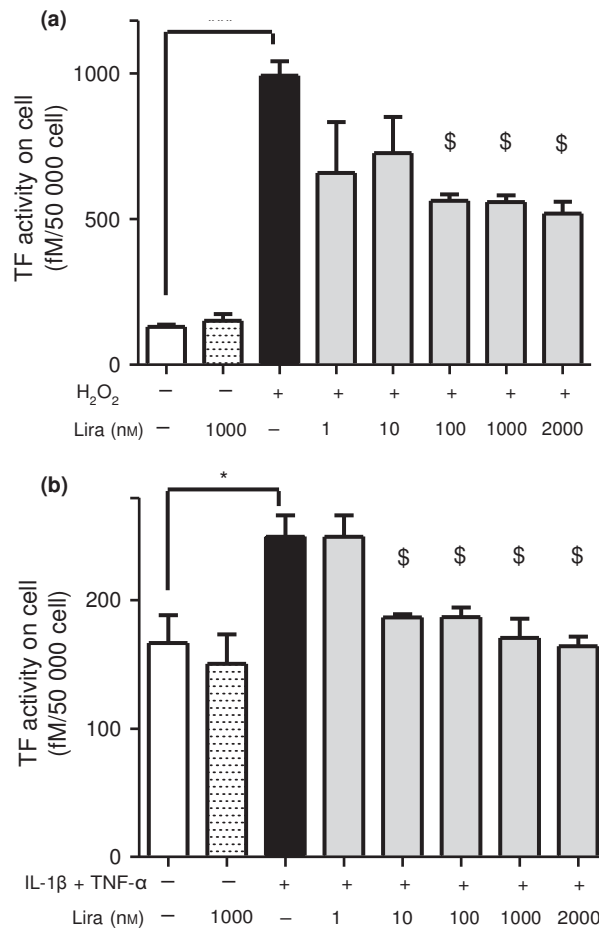


Figure 2 Liraglutide decreases tissue factor (TF) activity at b cells surface after oxidative (a) and cytokine (b) stress. After stimulation by H₂O₂ or IL-1 β + TNF- α in presence (gray bars) or absence (black bars) of 1 μ M Liraglutide, the supernatant was withdrawn. TF activity was assessed by Tenase assay in which TF catalyzes the formation of the Tenase complex in the presence of exogenous factor X and factor VIIa, calcium. The conversion of factor X into factor Xa was measured by chromogenic assay using a specific substrate. Values are expressed as fM of TF activity by reference to a standard curve established with known amounts of highly purified lipidated recombinant human TF. Data are normalized as fM of TF per 50 000 cells. Empty bars represent unstimulated cells, and dotted bars represent cells treated by liraglutide alone. Data are represented mean \pm SEM (n = 6; Lira: liraglutide; \$: comparison with the negative control *: P < 0.05; ***: P < 0.001).

was, however, detectable after both treatments (16.17 \pm 0.7 nM PtdSer eq. in H₂O₂-treated cells $P = 0.0042$ and 8.83 \pm 0.1 nM PtdSer eq. in IL-1b+TNF- α -treated cells $P = 0.0026$ vs. 7.58 \pm 0.1 nM PtdSer eq. in untreated cells) and was limited by 1 μ M liraglutide with MP values decreasing to 12.13 \pm 0.2 nM PtdSer eq. ($P = 0.0064$) in H₂O₂-treated cells and to 7.20 \pm 0.2 nM PtdSer eq. in IL-1b+TNF- α -treated cells ($P = 0.0049$; Fig. 1b)

Liraglutide limits TF activity at b cell surface

Tissue factor (TF) activity at cell surface was increased under both conditions of stress with values that reached 992.1 \pm 49.4 fM TF ($P = 0.0014$) in H₂O₂-treated cells and 249.9 \pm 16.5 fM TF ($P = 0.0431$) in IL-1b+TNF- α -treated cells compared with 129.0 \pm 8.3 fM TF in untreated control cells. Liraglutide counteracted the induction of TF activity under both conditions of stress. Significant reductions were evidenced at low liraglutide concentrations after cytokine stress (10 nM liraglutide) and from 100 nM after oxidative stress (Fig. 2). In addition, a significant difference in TF activity generated by cytokine stress could be observed between 10 nM and 2000 nM liraglutide treatment ($P = 0.047$), suggesting a possible dose-dependent effect.

MPs interaction with target Rin-m5f cells

Red fluorescent PKH26 lipid probe was used to assess MP transfer. Confocal microscopy revealed optimal staining after 24 h indicating that PKH26-MPox and target cells were co-localized (Fig. 3a; MPcyt: data not shown).

Quantitative assessment by flow cytometry revealed that MPox and MPcyt were captured to the same extent by targeted cells as shown by similar shifts of fluorescence (Fig. 3b). Statistical analysis by the cytometer CellQuest software revealed that 50% of cells had integrated MPs (Fig. 3c). Liraglutide did not modify the proportion of MPs transferred to target cells (data not shown).

MPs induce the activation of apoptosis in b cells

In target cells, a 24-h incubation with 10 nM MPox induced a significant increase in apoptosis (6.37 \pm 0.4% in MPox-

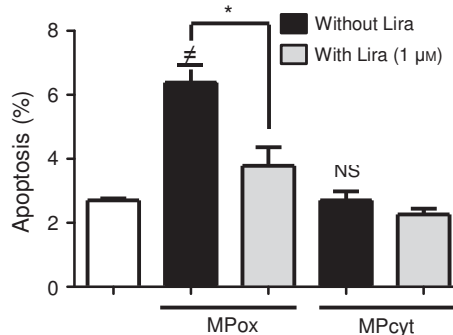


Figure 4 Microparticules (MPs) induce b cell apoptosis. Cells were incubated with 10 nM PtdSer eq. MPs generated by oxidative or cytokine stress in the presence (gray bars) or absence (black bars) of 1 μ M liraglutide. Apoptosis was assessed by IP labeling in ethanol-permeabilized cells using flow cytometry. Empty bars represent unstimulated cells. Data are presented as mean \pm SEM. (n = 3, Lira: liraglutide; \neq : comparison with the positive control *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.0001$).

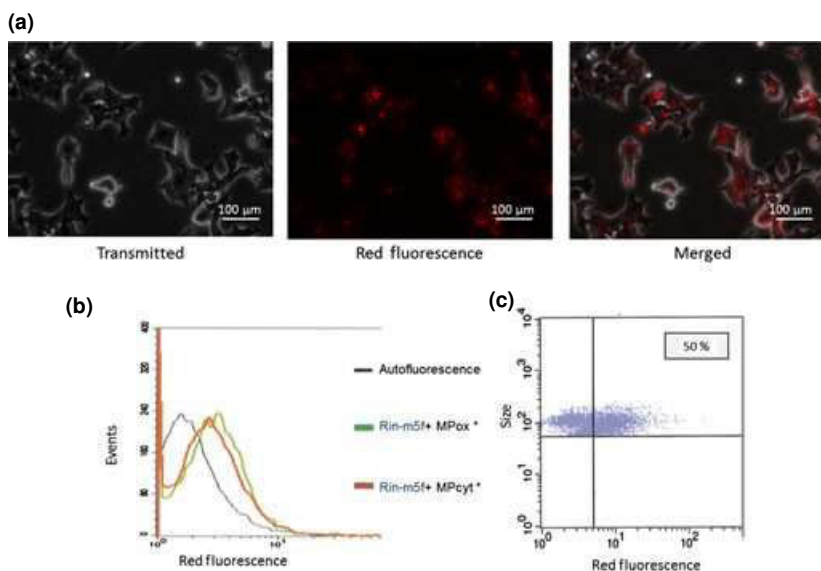


Figure 3 MPox and MPcyt are equally transferred to target RIN-m5F cells. Cells were incubated with 10 nM PKH26-labeled microparticles (MPs) for 24 h and observed by fluorescent microscopy. A representative observation of MPox transfer is shown (a). A shift in cell fluorescence brought by red fluorescence-labeled MPs was evidenced by flow cytometry (b) and plotted using 10 000 recorded events per sample (c).

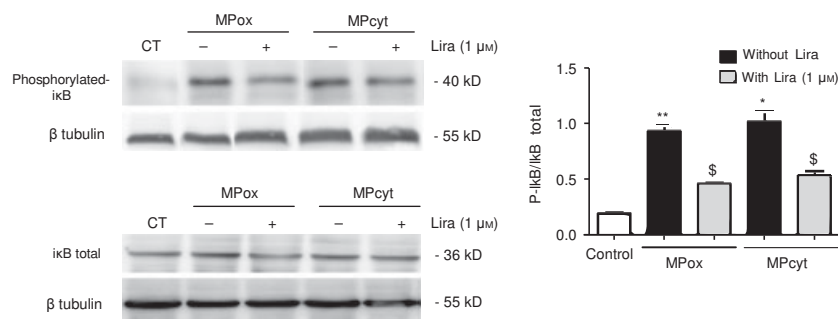


Figure 5 Microparticle (MP) transfer activates NF- κ B pathway. I κ B phosphorylation and total I κ B- α expression in Rin-m5f cells treated for 24 h by 10 nM PhtdSer eq. MPs were assessed by Western blotting (Left panel). Analysis was performed by calculating the P-I κ B/ total I κ B density ratio as described in M&M (right panel). MPox: MPs generated by oxidative stress; MPcyt: MPs generated by cytokine stress; Lira: liraglutide.

treated cells compared with 2.69 \pm 0.06% in untreated cells) to an extent close to the range observed after treatment by H₂O₂ alone (18.69% in H₂O₂-treated cells compared with 3.1 \pm 0.06% in untreated cells; Figs 1a and 4). Liraglutide was able to counteract the MP-driven apoptosis down to 3.78 \pm 0.5% ($P = 0.022$). Interestingly, treatment by 10 nM PhtdSer eq. MPs generated from cytokine stress did not induce any significant variation of apoptosis (Fig. 4), in accordance with the above observation on cytokine-treated cells (Fig. 1a).

Higher phosphorylation of I κ B, an indicator of NF- κ B activation, was observed in MP-treated cells and was limited by the addition of liraglutide (Fig. 5). Because results were normalized with respect to total I κ B- α , the specificity of this phosphorylation pattern is confirmed.

Discussion

Our cross-talk model was set to investigate the effects of MP of endocrine origin under apoptotic conditions. For this purpose, endocrine Rin-m5f cells were considered because of their susceptibility to apoptosis as previously reported [33,34]. Our data confirm other observations of β cell cytoprotection by liraglutide, predominantly through the reduction in apoptosis [35–37]. Indeed, they clearly evidenced a reduction in the Rin-m5f cell response to oxidative stress. Importantly, procoagulant MPs shed from apoptotic Rin-m5f cells were identified as a new target of liraglutide. In our MP-mediated cell cross-talk model, liraglutide modulated the noxious action of MPs. Most interestingly, we evidenced TF activity as a new marker of β cell damage that was also modulated by liraglutide.

Our data question the mechanism by which liraglutide exerts its control on MP generation. In view of the oxidative stress response, one tempting explanation would be a direct anti-apoptotic effect, thereby lowering MP release. Nevertheless, although apoptosis was not observed after cytokine treatment, liraglutide was still able to reduce MP

shedding, indicating a specific effect. Possible downstream events mediated by liraglutide could involve p-38 MAP kinase phosphorylation, already identified in MP release processes in endothelial cells submitted to TNF- α [28].

Tissue factor (TF) activity has been proposed as a major contributor to early coagulation events at the vicinity of the islet and thereby to the loss of graft functions [9]. Because TF expression can be induced by cytokine stress and its activity enhanced by the presence of PhtdSer in the outer leaflet of the plasma or MP membranes [38,39], we hypothesized a possible role of TF on β cell damage. Indeed, liraglutide could contribute to diminished TF activity through two nonexclusive mechanisms: a decrease in PhtdSer exposure due to its anti-apoptotic properties and the reduction of TF expression at the cell surface. Further investigations are needed to examine the role of liraglutide on TF mRNA in our model of pro-inflammatory and pro-apoptotic stress.

The MP-mediated cross-talk model points at MPs as contributors to the amplification of the inflammatory endocrine cell response (see Fig. 5). Previous data have already shown the delivery of a pro-inflammatory signal by MPs from patients with diabetes to endothelial cells [40]. We have also reported that MPs, shed by pancreatic exocrine cells isolated from a patient with cystic fibrosis, are able to activate the NF- κ B pathway under pro-apoptotic conditions [26]. In the present model, because we could evidence MP recapture by by-stander cells after 28-h treatment (data not shown), we decided to focus on the variations of MP release that were already significantly elevated after 24 h, while recapture was still undetectable. These conditions allowed the discrimination between cell responses to cytokine and oxidative stress after 24 h. Only the oxidative stress-induced apoptosis seems to generate MPs able to impair β cell survival. Conversely, cytokine stress did not lead to early apoptosis but rather promoted early MP-mediated pro-inflammatory NF- κ B response. Indeed, we evidenced I κ B phosphorylation in Rin-m5f target cells, while the level of the total protein remained unchanged.

In the present work, kinetics of b cell apoptosis were different with respect to the treatment, and the apoptosis elevation was significant only after 32 h of stimulation by cytokines. Our observations are in accordance with other reports of delayed apoptosis under cytokine treatment [27]. We cannot, however, exclude that PhtdSer exposure leading to MP generation in Rin-m5f cells could result from both cytokine stimulation and apoptosis processes [16].

Altogether, the present work underlines the feasibility of a pharmacological modulation of MP shedding from endocrine cells by liraglutide and its beneficial effects through the reduction in the expression of TF activity. Moreover, liraglutide was efficient in the circulating concentration range reported in treated type 2 diabetes patients, or even lower when it was applied in the cross-talk model. In clinical settings, one could anticipate an early blunting of TF activity and of the deleterious pro-inflammatory signals disseminated by MPs at the vicinity of transplanted islets. Further *in vivo* investigations are, however, needed to establish the optimal liraglutide concentrations for graft preconditioning and for recipients' treatment to reach an efficient limitation of the IBMIR and preservation of graft function.

Authorship

CG: performed research and wrote the paper. AC: performed important part of the cell research. MA: performed important part of the Western blots. HB: performed part of the pharmacological study and Western blot. FZ: performed microparticle measurements. LK and FT: designed research and corrected the paper.

Funding

This study was funded by Novo Nordisk and Societe Francophone du Diabete.

Acknowledgements

This project received financial support from Novo Nordisk, the Societe Francophone du Diabete, and the Association Aide aux Traitements a Domicile (ADIRAL). We thank the Quantitative Imaging Plateforme of the Faculty of Pharmacy of Strasbourg and Romain Vauchelles for his expert technical assistance. We thank Mrs. Laura A. Parker for her kind help in checking the English of the manuscript.

References

1. Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, Shapiro AJ. Current status of clinical islet transplantation. *World J Transplant* 2013; 3: 48.

2. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355: 1318.
3. Lakey JR, Burridge PW, Shapiro AM. Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transpl Int* 2003; 16: 613.
4. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care* 2012; 35: 1436.
5. Paraskevas S, Maysinger D, Wang R, Duguid TP, Rosenberg L. Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. *Pancreas* 2000; 20: 270.
6. Kin T, Senior P, O'Gorman D, et al. Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. *Transpl Int* 2008; 21: 1029.
7. Citro A, Cantarelli E, Piemonti L. Anti-inflammatory strategies to enhance islet engraftment and survival. *Curr Diab Rep* 2013; 13: 733.
8. Nilsson B, Ekdahl KN, Korsgren O. Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 620.
9. Johansson H, Lukinius A, Moberg L, et al. Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 1755.
10. Sullivan BP, Kopec AK, Joshi N, et al. Hepatocyte tissue factor activates the coagulation cascade in mice. *Blood* 2013; 121: 1868.
11. Robins RS, Lemarie CA, Laurance S, et al. Vascular Gas6 contributes to thrombogenesis and promotes tissue factor up-regulation after vessel injury in mice. *Blood* 2013; 121: 692.
12. Baas MC, Gerdes VE, Ten Berge IJ, et al. Treatment with everolimus is associated with a procoagulant state. *Thromb Res* 2013; 132: 307.
13. Bulato C, Radu C, Simioni P. Studies on coagulation incompatibilities for xenotransplantation. *Methods Mol Biol* 2012; 885: 71.
14. Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, et al. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis* 2013. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203430.
15. Garcia Rodriguez P, Eikenboom HC, Tesselaar ME, et al. Plasma levels of microparticle-associated tissue factor activity in patients with clinically suspected pulmonary embolism. *Thromb Res* 2010; 126: 345.
16. Morel O, Toti F, Jesel L, Freyssinet JM. Mechanisms of microparticle generation: on the trail of the mitochondrion!. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36: 833.
17. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 392.

18. Collier ME, Mah PM, Xiao Y, Maraveyas A, Ettelaie C. Microparticle-associated tissue factor is recycled by endothelial cells resulting in enhanced surface tissue factor activity. *Thromb Haemost* 2013; 110: 966.
19. Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, et al. Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 2360.
20. Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, et al. Kidney transplantation decreases the level and procoagulant activity of circulating microparticles. *Am J Transplant* 2009; 9: 550.
21. Morel O, Ohlmann P, Epailly E, et al. Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27: 38.
22. Toti F, Bayle F, Berney T, et al. Studies of circulating microparticle release in peripheral blood after pancreatic islet transplantation. *Transplant Proc* 2011; 43: 3241.
23. Moreau F, Toti F, Bayle F, et al. Rescue of a pancreatic islet graft after steroid therapy. *Transplantation* 2012; 93: e10.
24. Toso C, McCall M, Emamaullee J, et al. Liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide 1 analogue, improves human islet survival in culture. *Transpl Int* 2010; 23: 259.
25. Merani S, Truong W, Emamaullee JA, et al. Liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide 1 analog, improves glucose homeostasis in marginal mass islet transplantation in mice. *Endocrinology* 2008; 149: 4322.
26. Constantinescu AA, Gleizes C, Alhosen M, et al., Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis *J Cyst Fibros* 2013; 13: 219.
27. Hindlycke H, Lu T, Welsh N. Cytokine-induced human islet cell death in vitro correlates with a persistently high phosphorylation of STAT-1, but not with NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 418: 845.
28. Matsuda T, Omori K, Vuong T, et al. Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. *Am J Transplant* 2005; 5: 484.
29. Cardozo AK, Proost P, Gysemans C, et al. IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. *Diabetologia* 2003; 46: 255.
30. Cardozo AK, Kruhoffer M, Leeman R, Orntoft T, Eizirik DL. Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. *Diabetes* 2001; 50: 909.
31. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1842.
32. Alhosen M, Ibrahim A, Boukhari A, et al. Anti-neoplastic agent thymoquinone induces degradation of alpha and beta tubulin proteins in human cancer cells without affecting their level in normal human fibroblasts. *Invest New Drugs* 2012; 30: 1813.
33. Sampson SR, Bucris E, Horovitz-Fried M, et al. Insulin increases H₂O₂-induced pancreatic beta cell death. *Apoptosis* 2010; 15: 1165.
34. Ding Y, Zhang ZF, Dai XQ, Li Y. Myricetin protects against cytokine-induced cell death in RIN-m5f beta cells. *J Med Food* 2012; 15: 733.
35. Zhao L, Guo H, Chen H, et al. Effect of Liraglutide on endoplasmic reticulum stress in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441: 133.
36. Chen ZF, Li YB, Han JY, et al. Liraglutide prevents high glucose level induced insulinoma cells apoptosis by targeting autophagy. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126: 937.
37. Miao XY, Gu ZY, Liu P, et al. The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide regulates pancreatic beta-cell proliferation and apoptosis via an AMPK/mTOR/P70S6K signaling pathway. *Peptides* 2013; 39: 71.
38. Wolberg AS, Kon RH, Monroe DM, et al. Deencryption of cellular tissue factor is independent of its cytoplasmic domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 332.
39. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, et al. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106: 2442.
40. Martin S, Tesse A, Hugel B, et al. Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation* 2004; 109: 1653.

IV. Données complémentaires

IV.1. Evaluation de l'effet dose des MPs sur l'apoptose

L'article n°1 met en évidence l'effet des MPox et des MPcyt sur l'apoptose dans les cellules cibles après l'application de 10 nM de MPs (Figure 4 de l'article n°1). D'autres concentrations de MPox et MPcyt ont été étudiées (Figure 33).

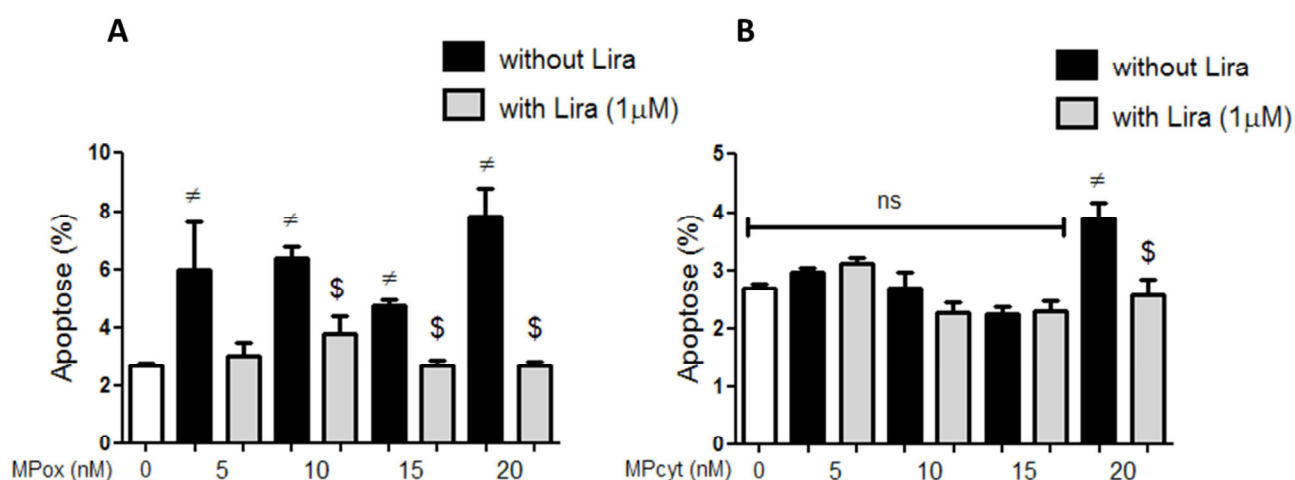


Figure 27 : Effet des MPs sur l'apoptose des cellules β

Après l'application de MPox (A) et MPcyt (B) pendant 24 h en présence (barres grises) ou en absence (barres noires) de Liraglutide (Lira), l'apoptose dans les cellules cibles est évaluée par mesure de l'ADN hypodiploïde par marquage à l'iodure de propidium et après analyse par cytométrie en flux. ($n=3$, #: différence significative par rapport aux cellules contrôle non stimulées (barres blanches); \$: différence significative par rapport aux cellules stimulées par les MPs seules (barres noires)).

L'application des MPox augmente significativement l'apoptose dans les cellules cibles, à l'image du stress oxydant qui leur a donné naissance, mais dans une moindre mesure. Cette hausse de l'apoptose n'est pas dose-dépendante de la concentration en MPox appliquée (Figure 33A). Le Liraglutide diminue significativement l'apoptose induite par les MPox à partir de 10 nM de MPox. L'important écart-type des valeurs liées au traitement par 5 nM de MPox ne permet pas d'observer d'effet significatif du Liraglutide.

De manière intéressante, l'application de MPcyt entre 5 et 15 nM n'induit pas de variation significative de l'apoptose, tout comme le stress cytokinique qui leur a donné naissance. Les MPcyt n'induisent de l'apoptose que pour la plus forte concentration de 20 nM de MPcyt, valeur pour laquelle le Liraglutide diminue significativement cette apoptose (Figure 33B).

Cette observation est toutefois à remettre en contexte des faibles valeurs et variation d'apoptose relevées en réponse aux MPcyt par rapport aux MPox.

Le message transféré par les MPcyt semble donc différent de celui véhiculé par les MPox. Il reflète l'apoptose modérée et plus tardive induite par le stress cytokinique.

L'ensemble de ces résultats permettent d'asseoir l'hypothèse selon laquelle les propriétés effectrices des MPs dans les cellules cibles sont dépendantes du type de stress initiateur de la vésiculation et de l'état d'activation de la cellule émettrice.

IV.2. Implication de la PKA dans l'émission des MPs

La PKA joue un rôle majeur dans l'activation des voies médiées par la fixation du GLP-1 à son récepteur, en particulier sur la sécrétion d'insuline (Figure 34).

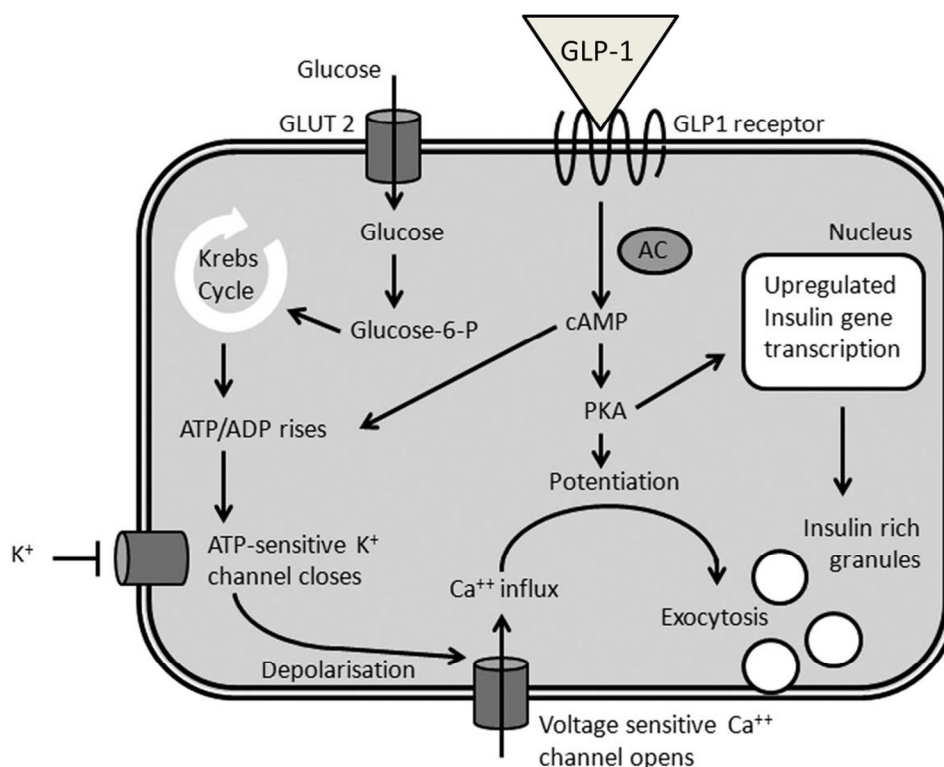


Figure 28 : Mécanismes cellulaires impliqués dans la sécrétion d'insuline et médiés par le GLP-1 (d'après Vangoitsenhoven R et al., 2008)

AC : adénylate cyclase; GLUT2 : glucose transporter 2, PKA : protéine kinase A

Comme le Liraglutide diminue l'apoptose et l'émission des MPs, nous nous sommes interrogés sur le rôle de la PKA, potentiellement mobilisée par la fixation de l'analogue du GLP-1 sur son récepteur.

IV.2.1. Matériels et Méthodes

Les cellules β Rin-m5F ont été prétraitées pendant 30 min avec 10 μ M d'un inhibiteur de la sous-unité catalytique de la PKA, le H89. Après le lavage des cellules, du milieu frais a été ajouté pendant 24 h en présence ou non de concentrations variables de Liraglutide (10-1000 nM). Les cellules sont détachées puis perméabilisées et fixées dans de l'éthanol à 70% pendant 24 h avant d'être marquées par l'iodure de propidium et analysées par cytométrie en flux (Figure 35A). Le surnageant est conservé à 4°C avant d'être utilisé pour le dosage des MPs (Figure 35B).

IV.2.2. Résultats

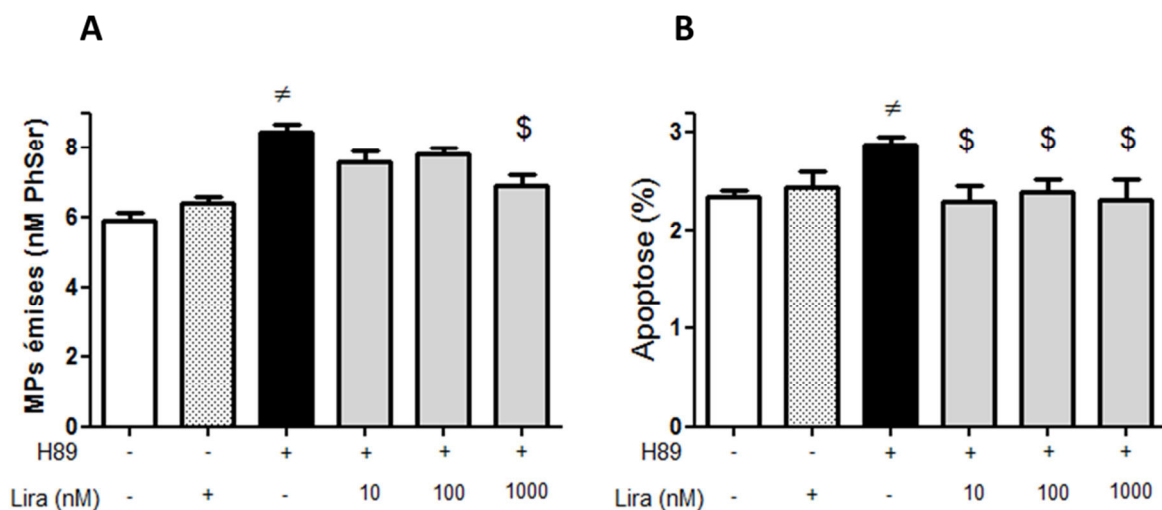


Figure 29 : Implication de l'inhibition de la PKA sur l'émission des MPs et l'apoptose

Les Rin-m5f sont prétraitées pendant 30 min avec H89 à 10 μ M avant d'être lavées puis mises en présence (barres grises) ou non (barres noires) de Liraglutide (Lira) pendant 24 h dans du milieu frais. Les MPs émises (A) dans le surnageant sont dosées par test enzymatique et l'apoptose mesurée par cytométrie en flux (B) ($n=3$, #: différence significative par rapport aux cellules contrôle non stimulées (barres blanches); barres quadrillées: cellules traitées avec uniquement du Liraglutide sans pré-traitement par H89; \$: différence significative par rapport aux cellules prétraitées par H89 uniquement).

L'inhibition de la PKA entraîne une augmentation significative de l'émission des MPs, témoignant de son implication dans les phénomènes de remodelages membranaires (Figure 35A). Le Liraglutide à la concentration d'1 μ M permet de pallier cette émission de MPs médiée par l'inhibition de la PKA.

Malgré les faibles valeurs d'apoptose, du fait de l'état basal dans lequel se trouvent les cellules, une augmentation significative de l'apoptose est néanmoins observée après inhibition

de la PKA (Figure 35B). Le traitement par le Liraglutide limite l'apoptose induite dès la concentration de 10 nM.

Ces résultats suggèrent que la diminution de l'émission des MPs et de l'apoptose par le Liraglutide pourrait être médiée par l'activation de la PKA soit en agissant sur ses effecteurs, comme l'AMPc par exemple, soit sur ses inhibiteurs, comme les phosphodiésterases qui dégradent l'AMPc.

IV.3. Implication de la voie UPR dans l'apoptose induite par les MPs

La cellule β produit des quantités importantes de protéines pour assurer une réponse rapide en accord avec les besoins métaboliques de l'organisme, ce qui la rend particulièrement sensible au stress du RE médié par l'activation de la réponse UPR. Cette dernière traite les protéines mal repliées ou défectueuses. Les mécanismes mobilisés et les interactions entre les 3 voies majeures de la réponse UPR varient selon l'état de la cellule et la présence de stress exogène. Nous nous sommes concentrés sur XBP-1 impliqué dans la voie IRE1, sur la phosphorylation de eIF2 α impliquée dans la voie PERK et GRP-78 une protéine chaperon impliquée dans le repliement des protéines. En effet, la réponse UPR est mise en jeu, à la fois dans le contrôle de l'apoptose basale liée à l'homéostasie cellulaire mais aussi en condition de stress d'apoptotique durant laquelle certaines voies sont majorées dont la voie PERK, IRE-1 et la production de protéines chaperons.

IV.3.1. Matériels et Méthodes

Les cellules Rin-m5f sont soumises à l'application de MPs pendant 24h avant d'être lavées, détachées puis lysées dans un tampon TRIS. L'expression des protéines a été étudiée par Western Blot à partir des différentes conditions de stimulation, selon le protocole décrit dans le paragraphe Matériels et Méthodes de l'article n°1. Le taux des protéines est évalué par densitométrie. Les anticorps ont été achetés chez Santacruz.

IV.3.2. Résultats

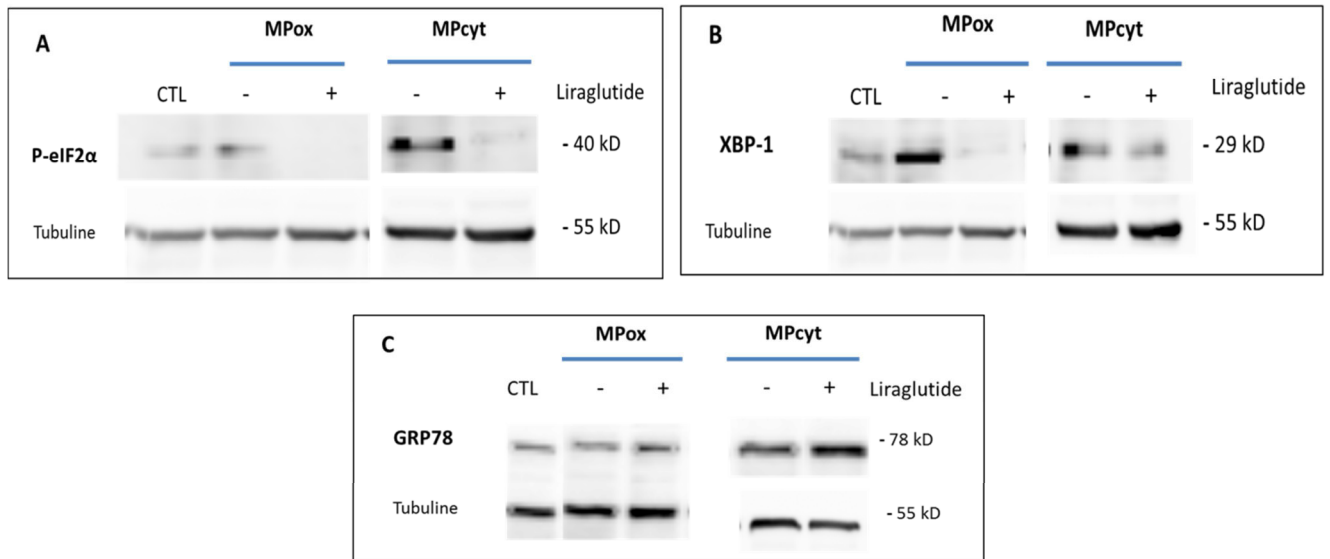


Figure 30 : Effet des MPs sur l'activation de la voie UPR dans la cellule β

Après stimulation pendant 24 h avec des MPox ou des MPcyt à la concentration finale 10nm en présence ou non de $1\mu\text{M}$ de Liraglutide, le taux de protéines p-eIF2 α (A), de XBP-1 (B) et de GRP78 (C) a été évalué par Western Blot et densitométrie en comparant avec le marquage de la β -tubuline. Ici est présentée une immunoempreinte ($n=2$, CTL : cellules non stimulées).

Les résultats, qui devront être complétés pour permettre une analyse des variations significatives de la densitométrie, suggèrent un effet des MPs sur la voie UPR. Les MPs et particulièrement les MPcyt activent la voie PERK, par l'intermédiaire de la phosphorylation d'eIF2 α (Figure 36A), tandis que les MPox semblent plus particulièrement favoriser la production de XBP-1 (Figure 36B). Dans les deux cas, le Liraglutide contrecarre l'effet des MPs. On peut noter que le Liraglutide limite la quantité d'XBP-1 en particulier quand son expression est fortement induite par l'intégration des MPs. Le Liraglutide favoriserait la production de la protéine chaperon GPR78 suggérant qu'un de ses effets anti-apoptotique serait d'améliorer le trafic des protéines (Figure 36C).

En conclusion, les MPs émises lors d'un stress oxydant ou cytokinique sont capables d'induire un stress du RE dans les cellules cibles et le Liraglutide contrecarre l'activation apoptotique de la réponse UPR.

V. Discussion et conclusion

Dans cette première partie du travail, un modèle cellulaire mimant la partie inflammatoire de l'IBMIR a été établi et a permis d'obtenir des données sur le rôle des MPs et des remodelages membranaires dans la survenue de réactions procoagulantes et sur la survie des cellules à insuline. Le travail a mis en évidence, que les cellules β sont capables d'émettre des MPs dans un contexte inflammatoire et pro-oxydant, qu'elles soient engagées ou non dans un processus d'apoptose. Par ailleurs, le stress appliqué aux cellules β semble déterminant pour le devenir de la cellule et pour les propriétés effectrices des MPs. Seul le stress oxydant induit une apoptose à 24 h et une émission de MPs capables d'altérer la survie de la cellule β . A l'opposé, le stress cytokinique ne conduit pas à une apoptose rapide à 24 h mais à une émission précoce de MPs capables d'activer la voie apoptotique NF- κ B, sans induire d'apoptose significative à 24 h. De plus, en parallèle de la voie NF- κ B, l'apoptose induite par l'intégration des MPox et MPcyt dans les cellules cibles serait aussi médiée par une activation de la réponse UPR (Figure 36). Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature concernant le traitement des INS-1 par le Liraglutide. Ce dernier supprime l'activation des voies PERK et IRE-1 induite par la thapsigargine [314]. De plus, nos résultats montrent que le stress initiateur de la production des MPs serait également déterminant pour la mobilisation des différentes voies.

Ce travail met en évidence, de manière originale, qu'un stress inflammatoire ou oxydant induit une augmentation de l'activité TF à la surface des cellules β et la génération de MPs qui véhiculent le TF. Ces résultats complètent et précisent une première observation de Johansson décrivant des vésicules porteuses de FT observé aux abords des îlots pancréatiques en culture et la mise en évidence indirecte d'une activité TF chez les patients transplantés d'îlots par la mesure des complexes FVIIa-AT [156].

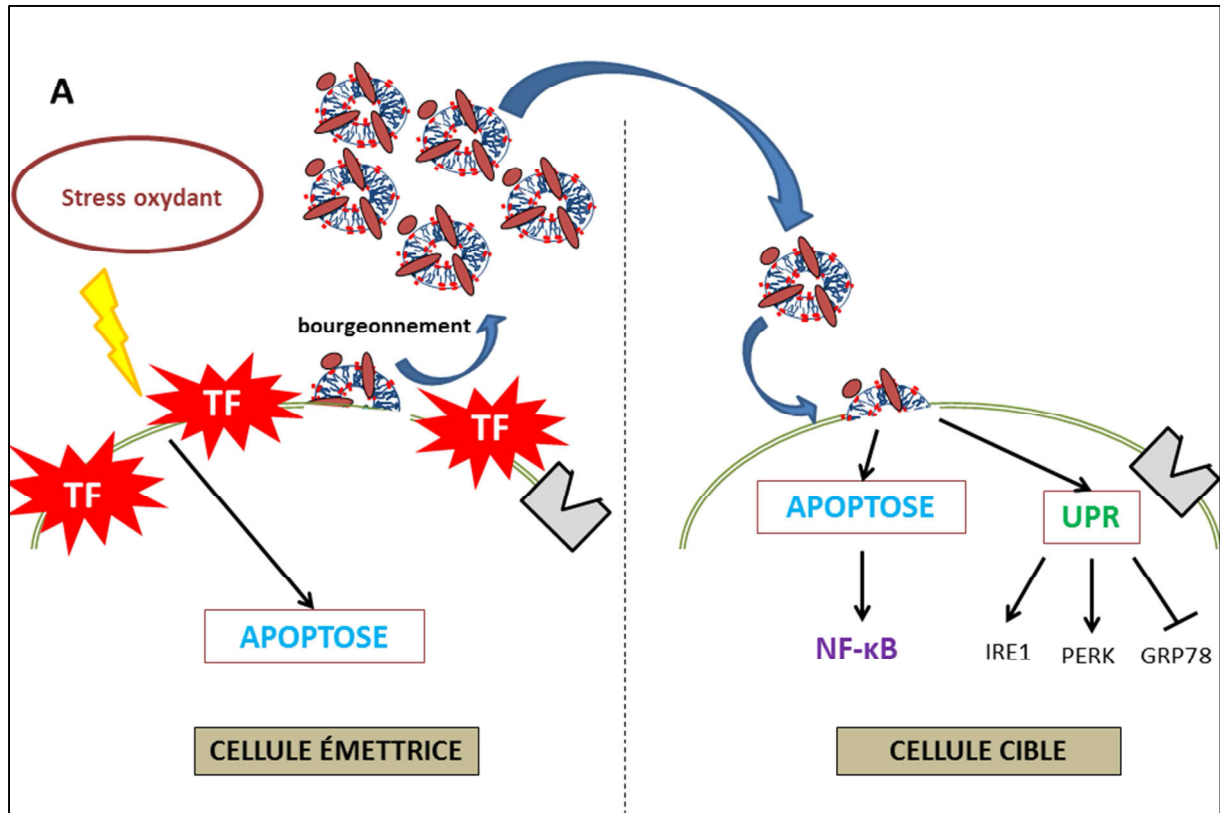
Nos résultats confirment l'effet anti-apoptotique du Liraglutide décrit dans la littérature et en précisent la nature. Ainsi, le Liraglutide assure une protection directe sur la cellule β en diminuant l'apoptose induite par le stress oxydant mais aussi indirect en diminuant la quantité de MPs pro-apoptotiques émises et leur actions sur les cellules naïves cibles.

Le Liraglutide réduirait l'émission des MPs *via* des mécanismes impliquant l'activation de la PKA et est capable de limiter l'activation des voies pro-apoptotiques dans les cellules

émettrices et dans les cellules cibles des MPs. De manière originale, nos résultats montrent que le Liraglutide permet de limiter l'activité TF procoagulante à la surface des cellules β (Figure 2 de l'article n°1). Il reste à établir si cette action repose sur une moindre disponibilité de la PhSer connue pour potentialiser l'activité du TF. En effet, les propriétés anti-apoptotiques du Liraglutide limitent l'exposition de la PhSer par les cellules traitées en limitant l'influx calcique nécessaire à son exposition, ce qui n'exclut pas une action indirecte des voies de signalisation dépendantes du récepteur du GLP-1 sur les remodelages membranaires.

En conclusion, les MPs amplifient le stress pro-apoptotique initié par le contexte pro-inflammatoire et pro-oxydant et le transmettent aux cellules β voisines. L'application du Liraglutide permet de limiter à la fois l'apoptose, l'émission des MPs mais aussi le profil procoagulant des cellules β dans ce contexte de stress caractéristique de l'IBMIR (Figure 37).

La figure suivante reprend les principaux résultats dégagés dans cette première partie du travail en condition de stress (A et B) et dans le cas de la modulation pharmacologique par le Liraglutide (C).



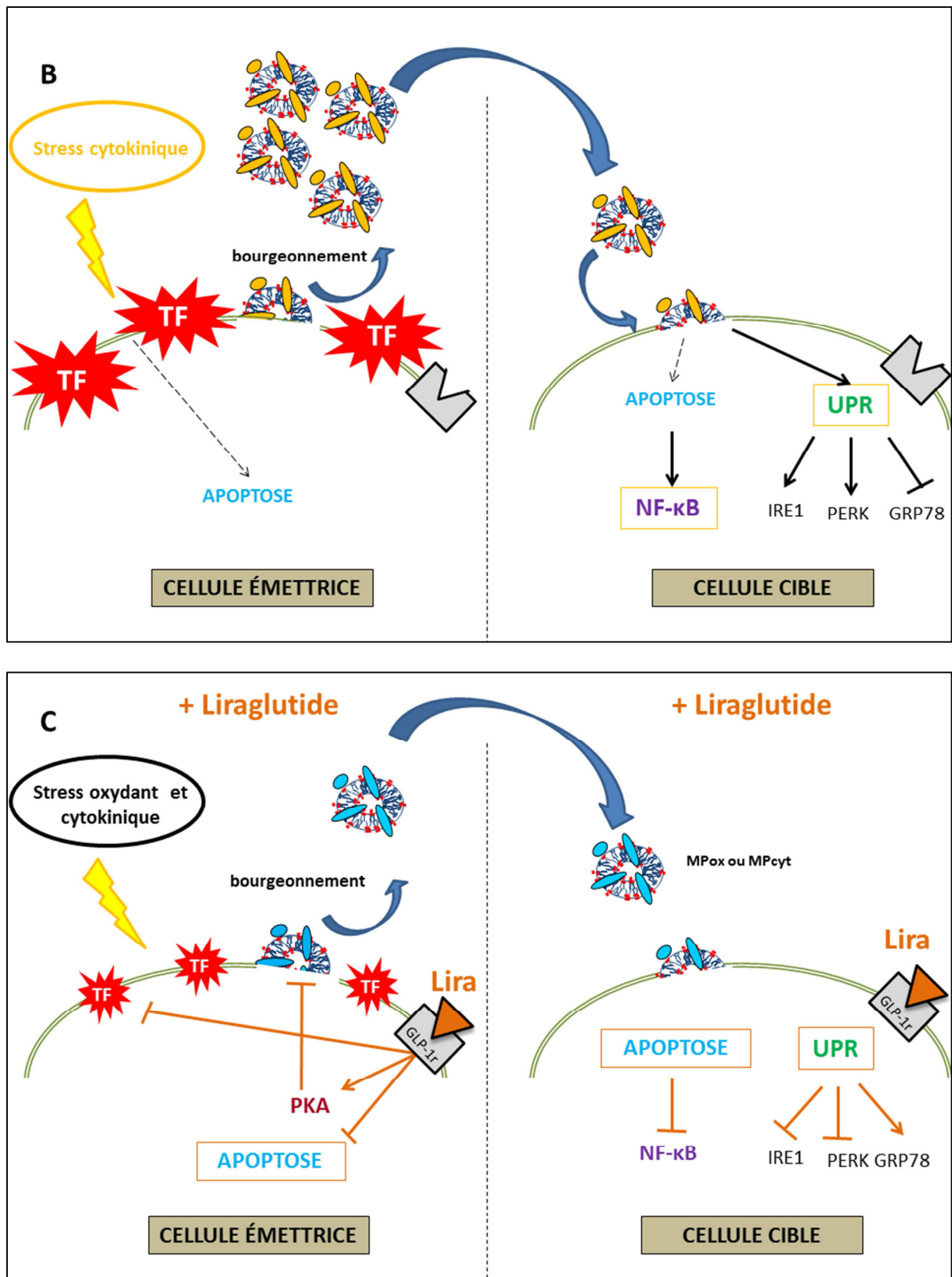


Figure 31 : Résumé de l'effet du stress oxydant (A) et du stress cytokinique (B) sur la libération des MPs, l'activité TF et la réponse apoptotique. Modulation par le Liraglutide (C)

PARTIE 2

**Mécanismes membranaires et cellulaires impliqués dans la
sécrétion d'insuline et modulations par le Liraglutide, dans un
contexte inflammatoire**

I. Objectifs

Cette deuxième partie du travail s'est orientée vers l'étude de la sécrétion d'insuline dans notre modèle de stress. Ainsi, l'effet des stress cytokinique, oxydant et des MPox et MPcyt sur l'insulino-sécrétion a été évalué et, en particulier, le rôle éventuel de la PKA et de la phosphorylation de la MAPK p38, connue pour favoriser l'émission des MPs dans un contexte inflammatoire [315]. L'impact du TF porté dans sa forme active par les MPs sur l'insulino-sécrétion est également étudié. L'ensemble des études préliminaires et des données de l'article n°1 indiquant que la modulation pharmacologique avait un impact sur la sécrétion d'insuline et l'émission des MPs, nous avons poursuivi l'étude des relations entre remodelage membranaire et sécrétion d'insuline dans l'article n°2. De plus, en raison de la démonstration, plus ancienne par le laboratoire, du rôle de la PhSer dans le recrutement des rafts [210], nous nous sommes posé la question de l'implication des rafts dans la sécrétion d'insuline, l'émission des MPs et l'activité du TF. Nous avons mis en évidence l'effet du Liraglutide sur l'intégrité des rafts et sur les autres acteurs membranaires de la sécrétion d'insuline, à savoir les canaux K^+ -ATP et Ca^{2+} voltage dépendants et l'exocytose des granules à insuline. Enfin, nous avons évalué la contribution du récepteur du GLP-1 et des différents composants du Liraglutide dans ses effets cytoprotecteurs.

II. Etude de la sécrétion d'insuline dans le modèle de stress

Notre observation d'une diminution de la survie cellulaire médiée par le stress inflammatoire, pro-oxydant ou par les MPs, nous a conduits à nous interroger sur l'atteinte de la fonction sécrétrice de la cellule β dans ce modèle de stress, en particulier au vu de l'activation de la réponse UPR étroitement liée à la sécrétion d'insuline. Les manipulations préliminaires ont vérifié que le modèle présentait des variations de sécrétion d'insuline sensibles à l'action des modulateurs pharmacologiques.

II.1. Effet du stress oxydant et inflammatoire sur l'insulino-sécrétion et sa modulation par le Liraglutide

II.1.1. Matériels et Méthodes

Les cellules β Rin-m5f sont soumises au protocole de stress détaillé dans la Partie 1 I.4. . L'insuline sécrétée accumulée dans le surnageant est dosée par ELISA et sa concentration rapportée à 50.000 cellules vivantes à la fin de la manipulation (Figure 38).

II.1.2. Résultats

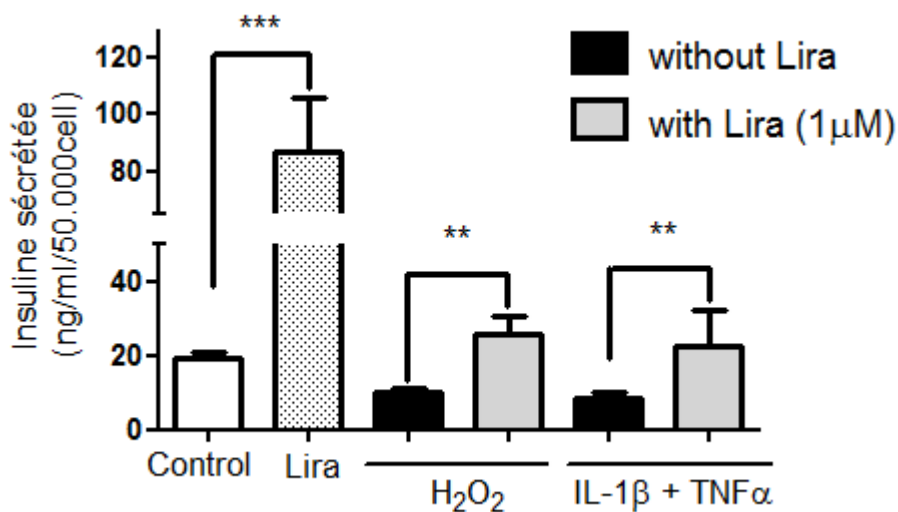


Figure 32 : Effet du stress oxydant et inflammatoire sur l'insulino-sécrétion et modulation par le Liraglutide

Après l'application d' H_2O_2 ou d' $IL-1\beta + TNF-\alpha$ en présence (barres grises) ou non (barres noires) de Liraglutide (Lira), l'insuline sécrétée dans le surnageant est dosée par ELISA et sa valeur est ramenée à une concentration d'insuline pour 50.000 cellules ($n=4$, \neq : différence significative par rapport aux cellules contrôle non stimulées (barres blanches) ; $\$$: différence significative par rapport aux cellules stimulées par H_2O_2 ou les cytokines ; barres quadrillées : cellules traitées uniquement par $1\mu M$ de Liraglutide ; *** : $P<0,001$).

Les deux types de stress induisent une diminution significative de la sécrétion d'insuline dans les cellules β . L'application du Liraglutide à $1\mu M$ permet de restaurer l'insulino-sécrétion altérée après l'application d'un stress oxydant ou cytokinique.

Ces résultats confirment les données décrites dans la littérature sur l'effet des analogues du GLP-1 sur la stimulation de l'insulino-sécrétion en condition de lipotoxicité et *in vivo* dans un modèle de souris insulino-résistante ou de rat ZDF [316-318].

II.2. Implication de la PKA dans l'insulino-sécrétion

II.2.1. Matériel et Méthodes

Les Rin-m5f ont été prétraitées pendant 30 min avec l'inhibiteur de la PKA, H89, lavées puis soumises à des concentrations croissantes de Liraglutide appliquées pendant 6 h. L'insuline sécrétée dans le surnageant est dosée par ELISA et sa concentration est rapportée à 50.000 cellules (Figure 39).

II.2.2. Résultats

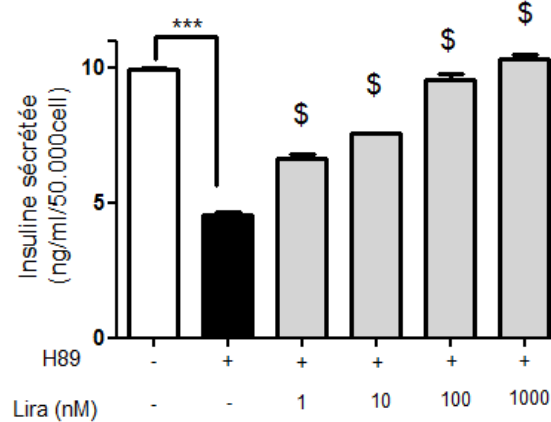


Figure 33 : Effet de l'inhibition de la PKA sur l'insulino-sécrétion et sa modulation par le Liraglutide

Les Rin-m5f sont prétraitées pendant 30 min avec H89 à 10 μ M avant d'être lavées et mises en présence (barres grises) ou non (barres noires) de Liraglutide (Lira) pendant 6 h. L'insuline sécrétée dans le surnageant est dosée par ELISA et le nombre de cellules contenues dans chaque puits est compté ($n=3$, *** : $P<0,001$; \$: différence significative par rapport aux cellules stimulées par les MPs seules).

L'inhibition de la PKA par H89 induit une forte diminution de l'insulino-sécrétion. Celle-ci est ramenée à son taux basal après l'application d'1 μ M de Liraglutide.

Ces résultats confirment le rôle central de la PKA à la fois dans la sécrétion d'insuline mais aussi dans les voies métaboliques activées par la fixation du Liraglutide au récepteur du GLP-1

III. Contenu de l'article n°2

Titre : "Impairment of insulin production under inflammatory conditions is associated with β cell Rin-m5f membrane remodeling and tissue factor activity". Article soumis à *Journal of Cellular and Molecular Medicine*

Impairment of insulin production under inflammatory conditions is associated with β cell Rin-m5f membrane remodeling and tissue factor activity

Céline Gleizes ^a, Malak Abbas ^{a,b}, Andrei Alexandru Constantinescu ^{a,c}, Julie Boisramé-Helms ^{d,e}, Blandine Yver ^a, Florence Toti ^{f*}, Laurence Kessler ^{a,g}

^a EA7293, Vascular and Tissular Stress in Transplantation, Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, 74 route du Rhin F - 67401 Illkirch, France

^b Lebanese University, doctoral school of Sciences and Technologies, University campus of Rafic Hariri, Beiruth-Hadath, Lebanon

^c Department of Parasitology and Parasitic Diseases and Animal Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Agronomical Sciences and Veterinary Medicine, 105 spl. Independentei, sector 5, 050097 Bucharest, Romania

^d Department of reanimation, Nouvel hopital civil,1, place de l'Hopital, 67091 Strasbourg CEDEX, France

^e Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, France

^f UMR7213 CNRS, Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, 74 route du Rhin F - 67401 Illkirch, France

^g Department of Diabetology, University Hospital, 1 place de l'Hôpital, CHU de Strasbourg - BP421, 67091 Strasbourg cedex, France.

Corresponding author:

Pr Florence Toti

UMR7213 CNRS, Laboratory of Biophotonics and Pharmacology

Faculty of pharmacy, University of Strasbourg,

74 route du Rhin F - 67401 Illkirch, France

Phone: +33- 3 68 85 41 95, Fax (+33) 3 68 85 43 13. *E-mail:* toti@unistra.fr

Abstract

Aims: In type 2 diabetes mellitus, inflammation and hyperglycemia are associated with a prothrombotic state. Cell-derived microparticles (MPs) are the conveyors of active procoagulant tissue factor (TF) and circulate at high concentration in diabetic patients. Liraglutide, a GLP-1 analog, is known to promote insulin secretion and β cell preservation. In this *in vitro* study, we examined the link between insulin impairment, procoagulant activity and plasma membrane remodeling, under inflammatory conditions.

Methods: The alteration of β cell function and TF activity mediated by MPs and their modulation by 1 μ M Liraglutide were examined in a cell cross-talk model. Methyl- β -cyclodextrine (MCD), a cholesterol depletor, was used to evaluate the involvement of raft on TF activity, MP shedding and insulin secretion as well as SNARE dependent exocytosis.

Results: Application of cytokine stress increased TF activity at MP surface that was counteracted by Liraglutide. MPs significantly increased TF activity to target cells and impaired insulin secretion *via* PKA and p38 signaling, also abolished by Liraglutide treatment. Large lipid raft clusters were formed in response to cytokine and Liraglutide or MCD-treated cells showed similar patterns. Cells pretreated by saturating concentration of the GLP-1r antagonist exendin (9-39), showed a partial abolishment of the Liraglutide-driven insulin secretion and Liraglutide-decreased TF activity. These data confirmed the contribution of GLP-1 receptor-dependent and -independent pathways.

Conclusion: Our results confirm an integrative β cell response to GLP-1 that targets receptor-mediated signaling and membrane remodeling pointing at the coupling of insulin secretion and inflammation-driven procoagulant events.

Key terms

insulin, β cell, microparticles, tissue factor, lipid raft, exocytosis, ion channels

Introduction

Hyperglycemia and chronic inflammation are associated with type-2 diabetes mellitus (T2DM) and insulin resistance [1-3]. Microparticles (MPs), that are surrogates of cell activation, circulate at high concentration in diabetic patients, even in well-controlled T2DM patients [4-7]. MPs are submicron fragments of the plasma membrane released by cells in biological fluids and the peri-cellular environment under conditions of metabolic or apoptotic stress [8,9]. They contain a broad array of imbedded active proteins and therefore act as cellular effectors through the delivery of biological signals to target cells. In the vessel, MPs support coagulation owing to the exposure of negatively charged membrane lipid phosphatidylserine (PhSer) and to the presence of active tissue factor (TF) [10,11]. TF is the membrane initiator of coagulation and an early responsive gene, the expression of which is induced under pro-inflammatory conditions [12]. Furthermore, highly procoagulant TF-bearing MPs of endothelial origin are increased in patients with diabetes [13] and are associated with prothrombotic state [14-16] and vascular damages in T2DM patients. In stimulated cells, TF activity at cell surface is potentiated when PhSer is exposed in the outer membrane leaflet. Lipid rafts are dynamic cholesterol-enriched microdomains and contribute to TF activity and to its regulation by ensuring the spatial clustering of TF and PhSer [17-19]. Relationships between lipid rafts and insulin secretion have been reported in studies [20-23], describing the regulation of ion channels and exocytosis, particularly *via* raft-embedded SNARE proteins [24,25].

Liraglutide is a GLP-1 analog that belongs to the incretinomimetics class of drugs. In the treatment of T2DM, the beneficial effects of Liraglutide rely on their ability to improve glycemic control, hypertension, dyslipidemia, insulin secretion and to promote β cell survival [26-28]. In a previous work, we have shown that Liraglutide decreases TF activity at β cell

Rin-m5f surface and reduces MPs shedding under oxidative and cytokine stress conditions [29].

In the present work we investigated the role of TF-bearing MPs on the impairment of insulin secretion by β cells, submitted to hyperglycemic and pro-inflammatory conditions. Because MP shedding is the consequence of membrane remodeling and TF activity is potentiated by PhSer translocation across the membrane as well as raft concentration, we investigated the effect of Liraglutide and raft disruption on TF activity and insulin secretion. The incidence of GLP-1 receptor (GLP-1r) signaling was investigated by treatment with the GLP-1r antagonist, exendin (9-39).

Materials and Methods

Cell culture

Rat β cells, Rin-m5f (CRL-11605TM, ATCC, Manassas, USA), were seeded at 125,000 cells/cm² in RPMI 1640 (PANTM Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) medium containing 4.5% glucose, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate and supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Saint Aubin, France) and 20 μ g/ml gentamycine (Lonza, Basel, Switzerland). Cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere.

Cellular models of stress and pharmacological modulation

Stress was applied when cells reached 70% of confluence as reported elsewhere [30]. Cytokine stress was induced during 24h by the combination of 50 U/ml of IL-1 β (Sigma, St. Louis, USA) and 1000U/ml of TNF- α (Sigma), further referred to as “cytokines” overall the manuscript. Oxidative stress was induced by 100 μ M H₂O₂ in fresh medium during 6h. Cell supernatants were collected at the end of each stress procedure and kept at 4°C until measurement.

Pharmacological inhibition of PKA was achieved by pretreatment with 10 μ M H89 during 30min before 24h incubation with MPs. Inhibition of K⁺-ATP channels and Ca²⁺ channels was performed by continuous exposure to 10 μ M Amlodipine and 0.25 mM Diazoxide, respectively during 24h with cytokines or 6h incubation with H₂O₂. In all experiments, Liraglutide (Novo Nodisk, Bagsvaerd, Denmark) was added at the concentration of 1 μ M as proposed by other investigators [31-34].

Insulin measurement

Insulin released in supernatant after 24h, was assessed by ELISA assay with the matrix solution, according to supplier recommendations (ELISA Kit Rat/Mouse Insulin, Millipore, Molsheim, France).

MP generation, harvest, and quantification

MPs were harvested from the supernatants by differential centrifugation under sterile conditions 24h after the initiation of cell stimulation, treated either by H₂O₂ for 6h or cytokines for 24h (see above and as described elsewhere [29]). Detached cells and debris were discarded, MPs further isolated and washed in HBSS by one centrifugation (13,000g, 1h) and kept at 4°C for not more than 3 weeks.

Total MP concentration was determined by prothrombinase assay as previously reported [29]. Briefly, MP captured onto insolubilized Annexin-5 were incubated with blood clotting factors (FXa, FVa, FII) and CaCl₂ [35]. Conversion of prothrombin to thrombin was revealed by chromogenic substrate, using a spectrophotometric reader at 405 nm. Results were expressed as nanomolar PhtdSer equivalent (nM PhtdSer eq.) by reference to a standard curve constructed using liposomes of known concentration and PhtdSer eq. proportion [36].

MP-mediated cell cross-talk

MPs generated by oxidative stress (MPox) and by cytokine stress (MPcyt) were applied to naïve Rin-m5f cells (70% confluence) at a final concentration of 10 nM PhtdSer eq. during 24h. In some experiments, 1 µM Liraglutide was added to the cell medium and isolated MPs could be pre-incubated with an antibody to Tissue Factor (HTF-1, kind gift of Pr N. Mackmann, Chapel Hill).

Measurement of TF activity

After 6h stimulation, TF activity was measured in supernatants and at the surface of washed target cells through its ability to promote the activation of factor X (150 nM, Hyphen Biomed) by factor VII(a) (5 nM, Novoseven, Denmark). The reaction was allowed to proceed for 15 min at 37 °C. 0,1 mM CS11, a chromogenic substrate for factor Xa (Hyphen Biomed), were added and absorbance recorded at 405 nm (65). Results were expressed as fM TF activity per 50.000 living cells by reference to a standard curve established with known amounts of highly purified lipidated recombinant human tissue factor (ADF Biomedical, France).

Western blot analysis

After treatment, cells were washed twice with PBS and then lysed in TRIS buffer containing protease inhibitors (5 µg/mL leupeptin, 5 mM benzamidine) and 2% Triton® X-100 on ice. Total proteins (30 µg) were separated by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide (Sigma) gels as previously described [37]. Blotting membranes were incubated with the primary mouse anti-rat phosphorylated p38 antibody (SantaCruz, USA, 1:1000 dilution) overnight at 4°C. Detection of β-tubulin was used for normalization. After washing, membranes were incubated with the secondary anti-mouse IgG antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, USA, 1:10 000 dilution) at room temperature for 60 min. Pre-stained markers (Invitrogen™, Carlsbad, USA) were used for molecular mass determinations.

Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham, GE Healthcare). Density analysis was performed using ImageQuant LAS 4000 imager (GE Healthcare).

TF labelling

After application of both stress during different times (1h-8h), cells were washed, fixed with Fix and Perm® (Sigma), and kept at 4°C. Cells were further incubated with FITC conjugated rabbit anti-rat TF (Life Science, dilution: 1:50) during 30 min in darkness. TF expression-associated green fluorescence was quantified by flow cytometry (FACS-scan cytometer, Becton Dickinson, San José, USA) set at logarithmic gain. 10.000 events were recorded for each sample.

Raft labelling

Cells were cultured in 8-well tissue culture chambers (Sarstedt, Numbrecht, Germany) and pretreated during 1h with 10 mg/ml of methyl- β -cyclodextrine (MCD) before application of H₂O₂ (1h) or cytokines (4h) and with continuous treatment by MCD or by Liraglutide. After treatment, cells were washed, fixed and kept at 4°C. Cells were further labelled with 2 μ g/ml of biotinylated subunit B of toxin cholera (Sigma) for 30 min, washed and then stained with streptavidine-phycoerythrine (Sigma) for 30min. After washing and strip mounting, cells were observed by fluorescent confocal microscopy. Insulin secretion and MP shedding were assessed in harvested supernatant. In some experiments TF activity was measured at the surface at unfixed cells.

Insulin exocytosis blockage and labelling

Rin-m5f were cultured on 8-well tissue culture chambers and 20 nM tetanus toxin were added during 30 min in a depolarization medium prepared from RPMI medium, to enable toxin

internalization [38]. Supernatant was withdrawn, fresh medium added and oxidative or cytokine stress applied during 6h. Cells were washed, fixed and permeabilized using Fix and Perm® and kept at 4°C. After 3 washes, guinea pig anti-rat insulin antibody (Abcam, Cambridge, UK, dilution: 1:100, 30min, RT) was applied. Washed cells were incubated with FITC-goat anti-Guinea pig IgG (Abcam, dilution: 1/130, 30min, RT). Control conditions consisted of the labelled unstimulated or stimulated cells incubated with the secondary antibody (data not show). After washing and strip mounting, cells were observed by fluorescent microscopy. The proportion of cells exhibiting normal pattern of exocytosis was counted and expressed as percents of total cells.

Blockade of the GLP-1r

Cells were pretreated for 1h with 200mg/ml of the GLP-1r antagonist, exendin fragment (9-39) (Sigma) [39]. The supernatant was withdrawn and exendin (9-39) continuously applied with either cytokines or H₂O₂ in fresh medium during 6h.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard error of mean (SEM) and analyzed using GraphPad Prism5®. Statistical analysis between two groups was carried out using unpaired Student test. A *P* value < 0.05 was considered significant. Experiments were performed in triplicate.

Results

MPs released in response to oxidative and cytokine stress carry active TF and Liraglutide reduces TF activity.

Compared to MPs shed from untreated cells, MPs released after oxidative and cytokine treatment bore highly active TF (MPox: 247.7±1.6 fM/50.000 cells and MPcyt: 63.3±5.9

fM/50.000 cells vs. 37.6 ± 2.4 , $P < 0.0001$ and $P = 0.003$ respectively). Incubation of the cells with Liraglutide prevented the generation of TF activity in the supernatant with a significant two-fold decrease in TF activity, regardless of the nature of the stress (MPox : 175.0 ± 15.4 fM/50.000 cells, $P = 0.01$ and MPcyt: 38.0 ± 3.9 fM/50.000 cells, $P = 0.008$, Fig. 1A). MPox collected in the supernatant from cells treated by H_2O_2 were also able to prompt TF activity at the surface of naive target cells (from 149.6 ± 13.3 fM/50.000 cells to 285.0 ± 14.3 fM/50.000 cells ($P < 0.0001$)) that was reduced in the presence of Liraglutide, TF activity decreasing to 185.1 ± 10.8 fM/50.000 cells ($P = 0.0001$, Fig. 1B).

Liraglutide prevents the impairment of insulin secretion induced by TF⁺-MPs

MPs also behaved as cellular modulators of the insulin production, concentrations of insulin being significantly reduced in the supernatants of cells treated by MPox or MPcyt (MPox: 28.8 ± 2.1 ng/ml/50.000 cells, MPcyt: 39.1 ± 0.3 ng/ml/50.000 cells vs. 52.1 ± 1.8 ng/ml/50.000 cells, $P < 0.0001$ and $P = 0.02$ respectively). Liraglutide counteracted the MP-driven impairment of insulin secretion and prompted a high yield of insulin secretion as also observed in control cells (MPox: 88.3 ± 6.0 ng/ml/50.000 cells, MPcyt: 58.2 ± 1.4 ng/ml/50.000 cells, Figure 2A). Nevertheless, Liraglutide was more efficient in MPox-treated cells (4 fold yield for MPox, 30% yield for MPcyt).

Pretreatment of MPs by an anti-TF antibody before incubation with target cells prevented the MP-driven drop in insulin secretion, concentrations in supernatant being significantly increased from 26.8 ± 3.6 ng/ml/50.000 cells to 89.6 ± 4.8 ng/ml/50.000 cells in MPox-treated cells ($P < 0.0001$) and from 38.6 ± 2.2 ng/ml/50.000 cells to 49.7 ± 3.7 ng/ml/50.000 cells in MPcyt-treated cells ($P = 0.02$) (Figure 2B). These data indicate a contribution of the active TF borne by MPs to the target cell response. Addition of H89, a PKA inhibitor, to MP-treated cells led to an approximate 30% decrease in insulin secretion that was completely reversed by Liraglutide, regardless of the stress condition (Figure 2C). Western blots of MP- targeted cell

lysates indicated an elevated phosphorylation of p38, a MAP Kinase involved in the regulation of insulin secretion and inflammatory MP release, that was also limited by Liraglutide (Figure 2D).

Liraglutide does not modify the expression of TF at cell membrane

Because the enhanced TF activity at cell and MP surface could be the result of an up-regulation of TF expression, the kinetics of TF exposure by the parental cells was examined in both stress conditions. After 1h oxidative stress, TF expression was dramatically elevated (from 11.5 ± 0.2 MFI a.u. in untreated cells to 26.1 ± 0.2 MFI a.u. in 1h-treated cells $P < 0.0001$) and remained significantly higher than baseline thereafter (Figure 3A). Optimal expression of TF was observed after 4h exposure to cytokines up to 24.5 ± 0.9 MFI in 4h-treated cells versus 11.5 ± 0.2 MFI A.U. in untreated ($P = 0.001$) and TF expression level returned to baseline after 8h (Figure 3B). No effect of Liraglutide on TF expression could be observed whatever the stress (Figure 3A-B). These data indicate that Liraglutide does not modify the expression and exposure of TF but only alters its activity.

Raft integrity is targeted by Liraglutide in stimulated cells and is critical to MP release, TF activity and insulin secretion

Treatment of Rin-m5f with MCD completely abolished cellular TF activity (Figure 4A) and MP shedding in both stress conditions (Figure 4B). In addition, raft disruption restored insulin secretion (7.2 ± 0.2 ng/ml/50.000 cells in H_2O_2 -treated cells vs. 12.9 ± 0.06 ng/ml/50.000 cells in MCD- H_2O_2 -treated cells, $P = 0.002$; 10.1 ± 0.5 ng/ml/50.000 cells in cytokine-treated cells vs. 26.0 ± 1.3 ng/ml/50.000 cells in MCD-cytokine-treated cells, $P = 0.007$) (Figure 4C). Staining of the GM1 ganglioside, a marker of lipid rafts, using the fluorescent cholera toxin evidenced the formation of large lipid raft clusters in response to cytokine stress by confocal microscopy (Figure 5B). This major membrane remodeling could

not be detected in MCD-treated stimulated cells in which the raft disruption led to a pattern of small rafts spread over the cell surface (Figure 5C). Raft staining of Liraglutide-treated cells revealed patterns close to those of MCD-treated stimulated cells (Figure 5C-D).

Liraglutide modulates insulin exocytosis and K_{ATP} and Ca^{2+} channels activity

To further investigate the role of raft clustering on insulin secretion and its modulation by Liraglutide, ionic channels activity and exocytosis were assessed through pharmacological inhibition and direct staining.

Addition of the K^+ channel inhibitor, Diazoxide, to H_2O_2 or cytokine-treated cells led to an approximate 85% decrease in insulin secretion that was counteracted by Liraglutide. Similar results were obtained with the Ca^{2+} channel inhibitor, Amlodipine (Figure 6A-B). The alteration of insulin secretion prompted by MPs was also mediated through K_{ATP} and Ca^{2+} channels (data not shown).

Insulin staining revealed a typical pattern of abnormal exocytosis, the protein accumulating close to the inner leaflet of the membrane and the insulin cytosol content appearing low by comparison. Conversely, treatment by Liraglutide led to a homogenous distribution of the β cell insulin content with a decreased proportion of cells that expressed an abnormal exocytosis pattern (Figure 7A-C). Moreover, 1 μ M Liraglutide allowed a higher insulin release in supernatant (10.2 ± 0.1 ng/ml/50.000 cells in H_2O_2 -treated cells vs. 13.5 ± 0.6 ng/ml/50.000 cells in Liraglutide-treated counterparts, $P=0.04$; 10.5 ± 1.3 ng/ml/50.000 cells in cytokine-treated cells vs. 16.4 ± 0.9 ng/ml/50.000 cells in Liraglutide-treated counterparts, $P=0.03$, Figure 7D).

The beneficial effect of Liraglutide on TF activity and insulin secretion rely on GLP-1r -dependent and -independent pathways

Because the effects of Liraglutide seemed dependent on membrane remodeling, we hypothesized that part of them are independent of GLP-1r. Pretreatment of the cells by saturating concentration of the GLP-1r antagonist, exendin (9-39), led to a partial abolishment of the Liraglutide-driven insulin secretion, by approximately 50% in H₂O₂--treated cells and 23% in cytokine-treated cells (Figure 8A). Interestingly, exendin (9-39) abolished the Liraglutide-driven reduction of TF activity under oxidative stress but not under inflammatory conditions with values remaining significantly lower (cytokines: 95.6±6.0 fM/50.000cells vs. cytokines-exendin-Liraglutide: 71.8±3.3 fM/50.000 cells, $P=0.007$) (Figure 8B).

Discussion

In the present work, we evidenced that TF borne by MPs modulate insulin secretion in targeted β cells. Because TF activity is highly dependent on membrane remodeling, we questioned the significance of membrane alteration in the cytoprotection by Liraglutide [29]. Under cytokine and oxidative stress conditions, our data indicate that raft disruption abolishes the raise in TF activity and MP shedding, and restores insulin secretion. Liraglutide treatment led to a disrupted raft-pattern similar to that observed after MCD treatment. Pharmacological inhibition of raft-embedded SNARE proteins and Ca²⁺ and K_{ATP} channels showed that Liraglutide treatment could maintain insulin secretion. Nevertheless, pretreatment at saturating concentration of exendin (9-39) before application of Liraglutide, did not completely abolish Liraglutide effects on TF activity and insulin secretion.

TF is an early actor in β cell dysfunction while MPs maintain durable stress

Because MPs are pathogenic markers of cellular stress that are elevated in T2DM patients, we hypothesized that β cells are constantly submitted to their deleterious effects. We therefore evaluated MP effects on target cells over one cell cycle duration (24h, see Figure 2). We

indeed identified TF activity and expression as early key players in insulin impairment, time course studies revealing an early cell response (1h-8h, see Figure 3). Therefore, mechanisms of TF-mediated insulin secretion impairment were assessed after short time stimulation (from 1h-6h). Distinct Liraglutide modes of action could be observed, thanks to our dual functional and labelling approaches. Indeed, Liraglutide could only reduce TF activity but was ineffective on TF expression up to 8h treatment (see Figure 1 and 3 and previous report [29]).

MAP Kinase p38 phosphorylation as a key step in MP-mediated insulin impairment

Our data are suggestive of multiple pathways targeted by Liraglutide in MP-mediated or direct stress. First, we showed that Liraglutide counteracted the p38 MAP Kinase phosphorylation by MPox and MPcyt (see Figure 2D). On line with our data, p38 was reported to favor endothelial MP shedding in a pro-inflammatory context [40] and insulin impairment by oxidative stress was associated with increased p38 phosphorylation [41]. Moreover, MPs seem to amplify the signal in target cells since MPox and MPcyt mirrored the cell response to the initial stress. Furthermore their deleterious effects could be counteracted by Liraglutide, making them a pharmacological target as reported by our team [29]. A similar MP modulation of insulin pathways was observed by pharmacological inhibition of PKA (see Figure 2C).

Are raft critical for the membrane protein control of insulin secretion?

Aside from signaling pathways, the β cell membrane remodeling is another possible target of Liraglutide. Indeed, we could evidence that Liraglutide altered raft clustering prompted by inflammatory stress (see Figure 5). These data point at an eventual modulation of the functions of raft-embedded proteins, among which SNARE proteins (syntaxin 1A, SNAP-25, and VAMP-2) and voltage dependent K^+ channels (K(V)) [25,42]. Furthermore, insulin secretion was restored by Liraglutide treatment after SNARE protein inhibition by the tetanus

toxin. In view of previous reports showing an enhanced insulin exocytosis after raft disruption [25], it is tempting to conclude that Liraglutide maintains exocytosis by acting on raft integrity. This hypothesis is strengthened by our measurement of enhanced insulin secretion after raft disruption by MCD (see Figure 4C), as reported in INS-1 and MIN-6 rat β cell lines [25].

Independently of raft distribution, one could consider that Ca^{2+} and K_{ATP} channels, involved in insulin secretion signaling, could constitute a target for Liraglutide. We indeed demonstrated that pharmacological inhibition of these two channels led to insulin secretion impairment that was partially counteracted by Liraglutide (see Figure 6). The moderate effect however questions an eventual physiological role of rafts. Indeed, other authors has demonstrated that K_{ATP} channels are not embedded in rafts and that Ca^{2+} channels function are not altered by raft disruption [25].

In our model, the remaining Liraglutide-driven cell response after treatment by the GLP-1r antagonist exendin (9-39), is suggestive of a GLP-1r independent cytoprotection by Liraglutide (see Figure 7), on line with recent murine models [43,44]. However the alternate target of GLP-1 remains to be characterized more precisely.

Taken together, the above data indicate an integrative β cell response to GLP-1 that combines receptor-mediated signaling and membrane remodeling. One illustration of such combined modulation was described by another team, showing that GLP-1r activation and raft disruption both lead to an inhibition of raft embedded-K(V) channels, the maintenance of β cell excitability and consecutive of insulin secretion [25,45].

Study limitation

The inflammatory and hyperglycemic conditions of patients with T2DM are widely demonstrated [1,3]. Nevertheless, little is known on the molecular link between chronic

proinflammatory signals and prolonged hyperglycemia on cell function. Therefore, to investigate the role of TF on insulin secretion, we applied a pro-inflammatory stress and hyperglycemic conditions to Rin-m5f β cells rather than short metabolic glucose stimulation. Cytokine related data were compared to those obtained by H₂O₂ application, a well-established treatment leading to Rin-m5f dysfunction. Further *ex vivo* studies of cultured islets and animals models are needed to examine the membrane-related mechanisms of Liraglutide cytoprotection.

In conclusion, our work demonstrates that TF activity borne by MP released from β cells constitute an amplification loop in the insulin impairment mediated by inflammation. In addition, the ability of Liraglutide to limit the raft clustering that promote MP shedding, insulin impairment, and TF activity, points at membrane remodeling as a new target in insulin management.

Acknowledgments

This project received financial support from Novo Nordisk, the Société Francophone du Diabète. We are indebted to Pr. N. Mackmann for his kind gift of HTF-1 antibody, and grateful to Pr. G. Ubeaud-Séquier and Dr. C. Muller from the eBIOCYT cytometry platform of Strasbourg University and to Mr. R. Vauchelles from the quantitative imaging platform (PIQ) of Strasbourg University. This work was supported by Novo Nordisk and the Association *Aide aux Traitements à Domicile* (ADIRAL)

Conflict of Interest Statement

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

Figures and Legends

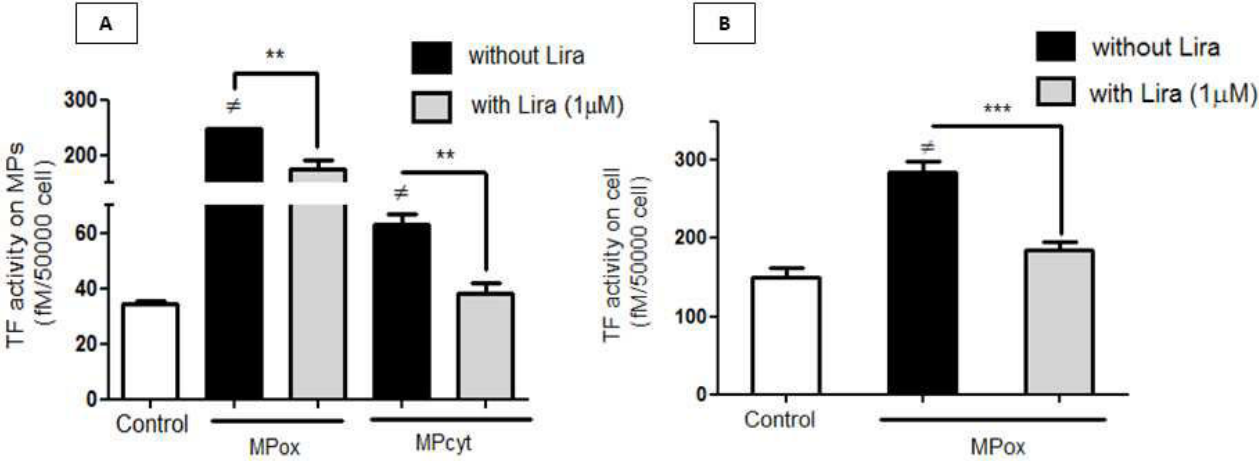


Figure 1: Liraglutide decreases TF activity borne by MPs (A) and on target cells (B). (A) MPs were harvested from supernatants of H₂O₂ or cytokine-treated cells incubated in presence (grey bars) or not (black bars) of Liraglutide (Lira). TF activity was assessed by Tenase assay. (B) 10 nM MPox were applied to naïve Rin-m5f cells in the presence or absence of Lira. Empty bars: unstimulated cells. Data normalized as fM TF per 50.000 cells and expressed as mean ± SEM (MPox, MPcyt: MPs produced by H₂O₂ or cytokine stimulation; n=6 ≠: vs. unstimulated cells; *: P<0.05, **: P<0.01)

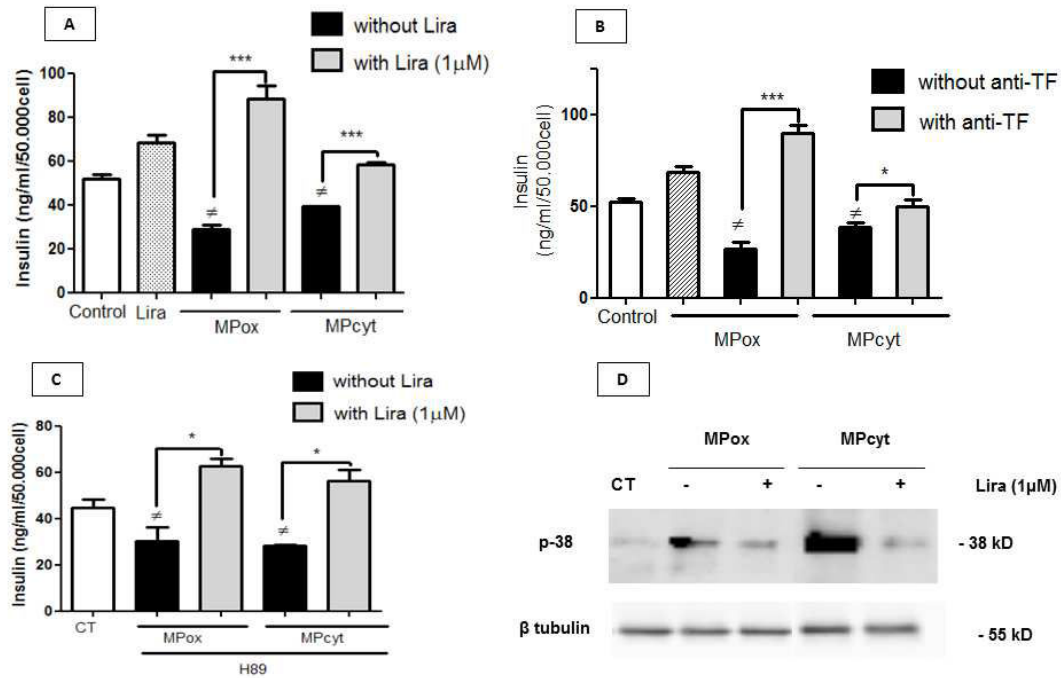


Figure 2: Liraglutide prevents the TF⁺-MP mediated impairment of insulin secretion (A-B) through PKA (C) and MAP Kinase p38 signaling (D). (A) Rin-m5f were incubated with 10 nM MPox or MPcylt in the presence (grey bars) or absence (black bars) of Liraglutide (Lira) during 24h hours. (B) 10 nM MPs were pretreated with anti-TF (grey bars) or irrelevant antibody (black bars). Secreted insulin was measured in the supernatant. (C) Cells were pretreated with H89, washed and submitted to 10nM MPox or MPcylt in the presence or absence of Lira. (D): Western Blot of MPox- and MPcylt- treated cells lysates. Empty bars: unstimulated cells. Data presented as mean \pm SEM. (n=4; \neq : vs. unstimulated cells; MPox, MPcylt: MP produced by H₂O₂ or cytokine stimulation *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.0001$).

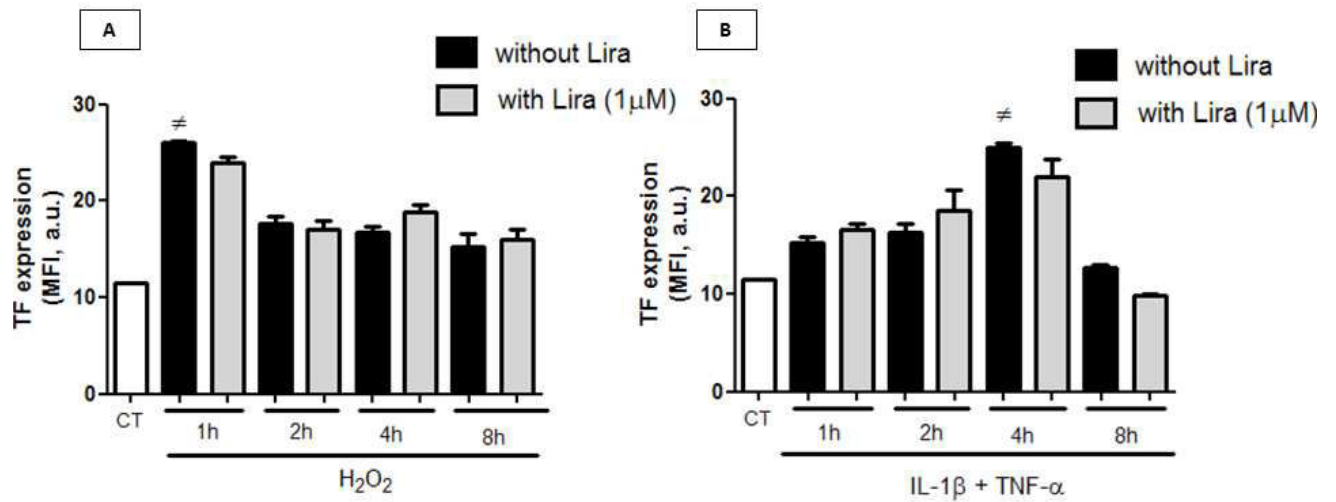


Figure 3: Expression of TF after oxidative (A) and cytokine stress (B). Oxidative (A) and cytokine (B) stress, were applied to Rin-m5f (1-8h). Fluorescence intensity was quantified by flow cytometry after TF-immunostaining. Data presented as mean \pm SEM (n=3; Lira: Liraglutide; MFI: Mean Fluorescence Intensity; \neq : vs. unstimulated cells).

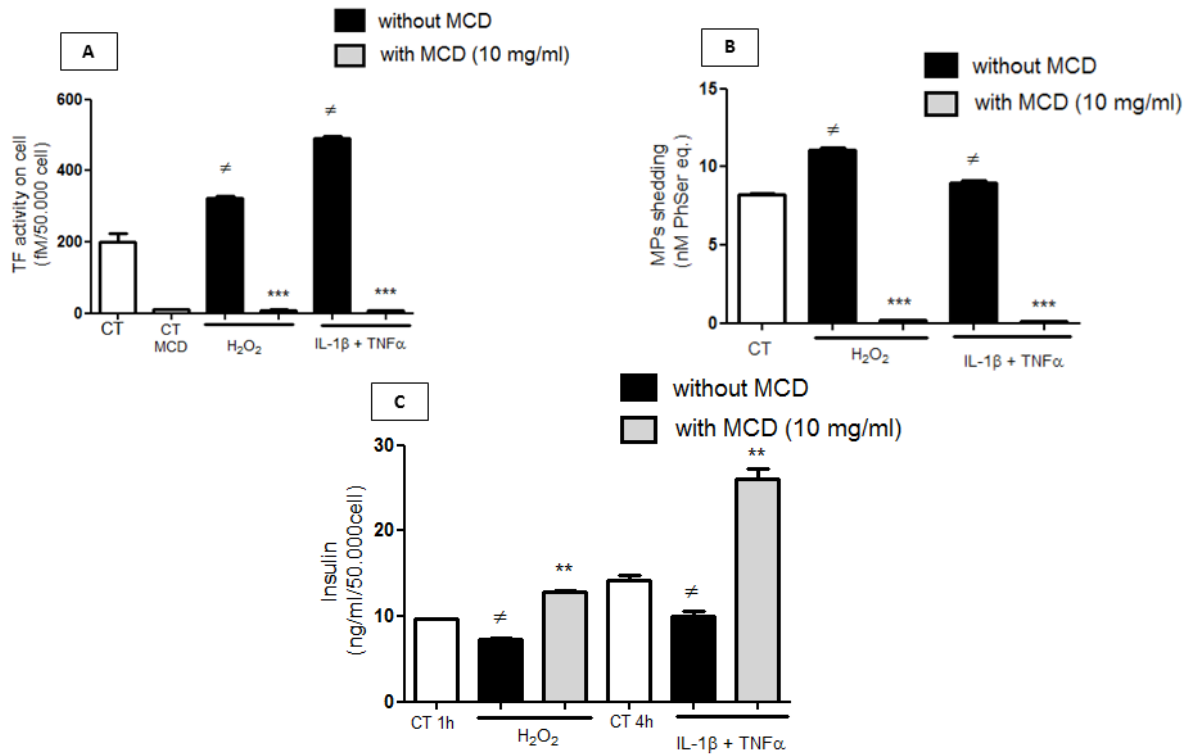


Figure 4: Raft disruption by MCD inhibits TF activity (A), MP shedding (B) and restores insulin secretion (C). Cells were treated by H₂O₂ during 1h, or cytokines during 4h, in presence (grey bars) or absence (black bars) of MCD. Empty bars: unstimulated cells, dotted bars: cells treated by MCD alone. Data presented as mean \pm SEM (n=5; MCD: methyl- β -cyclodextrin; Lira: Liraglutide; \neq : vs. unstimulated cells; **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.0001$).

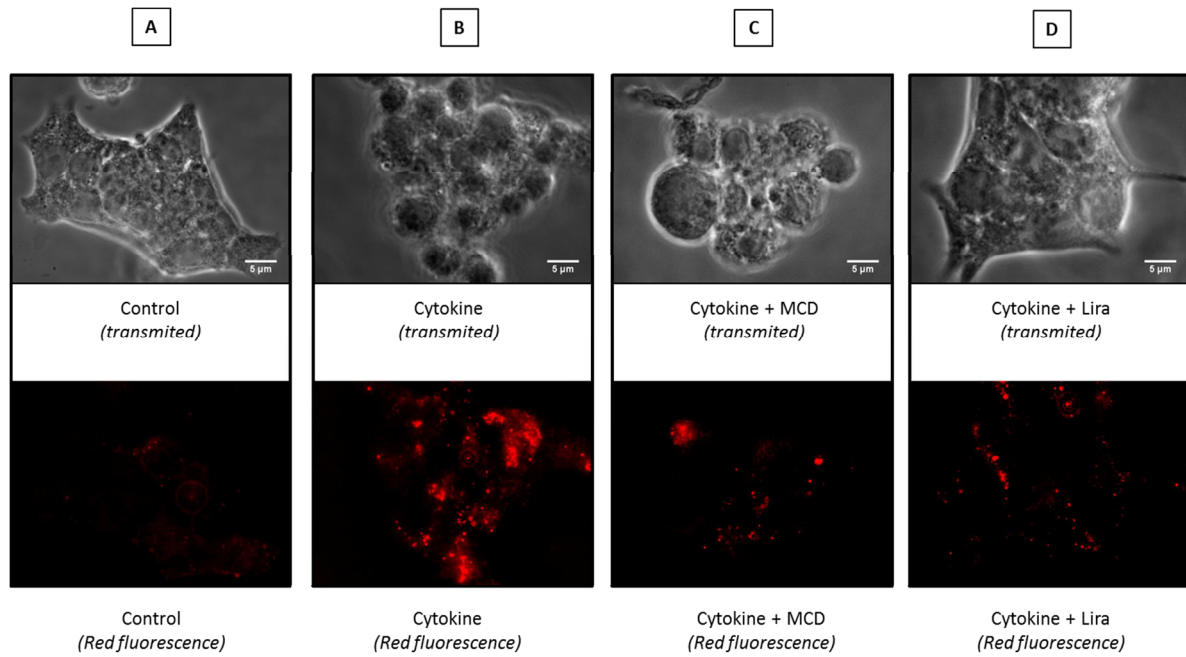


Figure 5: Lipid rafts cluster under inflammatory conditions and are disrupted by Liraglutide. After stimulation by cytokines, in the presence (B) or absence of MCD (C) or Liraglutide (D), cells were fixed and raft labelled by PE-cholera toxin. Stimulated and unstimulated (A) cells were observed by fluorescent confocal microscopy (x100).

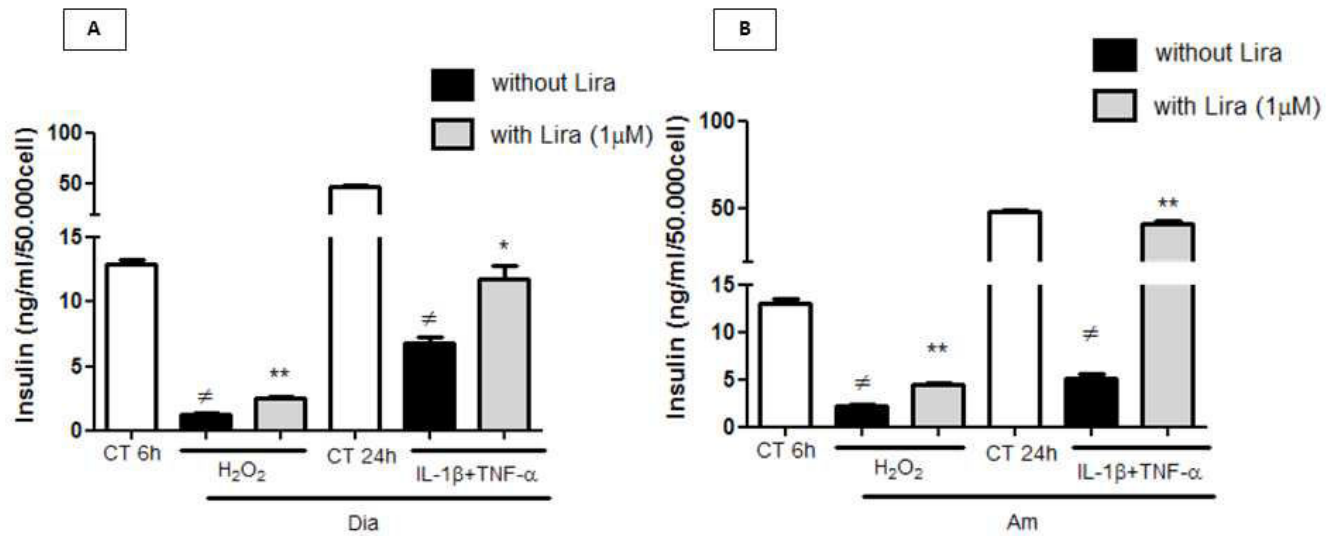


Figure 6: Liraglutide maintains insulin secretion after pharmacological inhibition of K^+ (A) and Ca^{2+} (B) channels. Cells were treated with Diazoxide (A) or Amlodipine (B) and H_2O_2 during 6h or cytokines during 24h, in the presence (grey bars) or absence (black bars) of Liraglutide (Lira). Insulin secretion was assessed by ELISA. Empty bars: unstimulated cells. Data represent the mean \pm SEM (n=3; \neq : vs. unstimulated cells; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$).

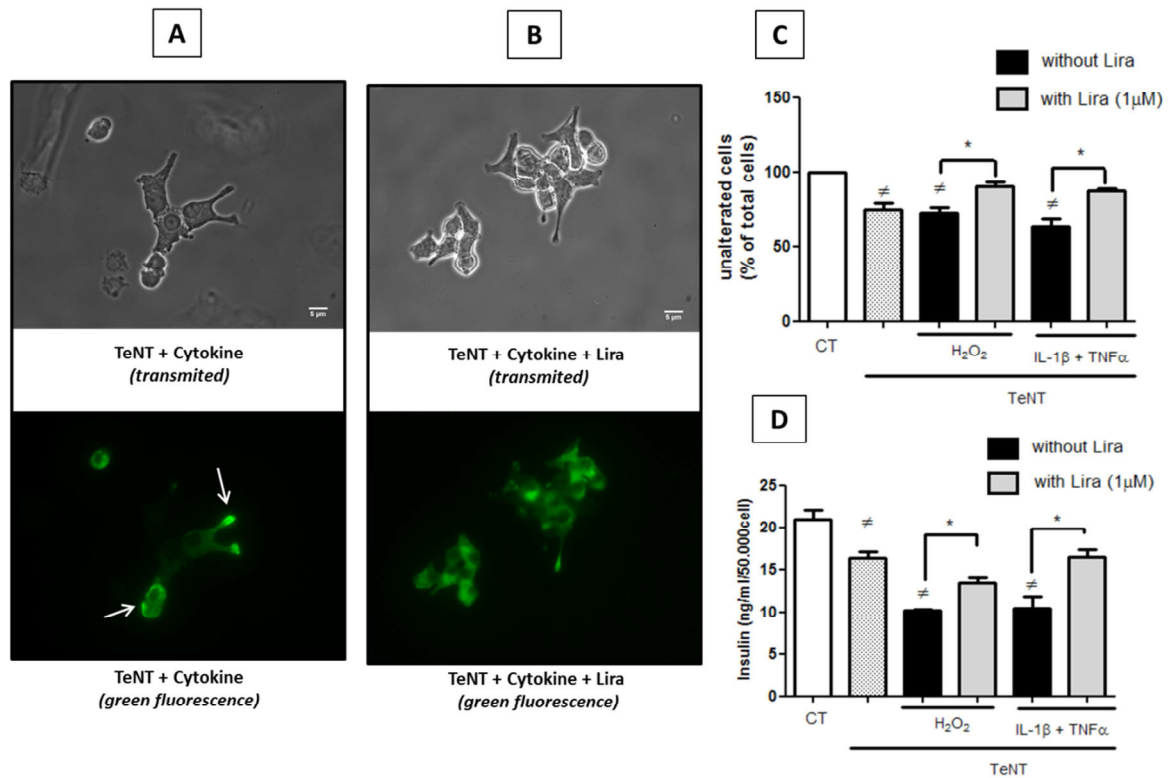


Figure 7: Liraglutide restores insulin release after SNARE blockade by tetanus toxin.

Pretreated cells with tetanus toxin (TeNT) were incubated with cytokines in presence (B) or absence (A) of Liraglutide (Lira) during 6h. Fixed cells were observed by fluorescent confocal microscopy (x100) after insulin immunostaining. (C): Percentage of unaltered cells. (D): Insulin released after 6h stress in supernatant. Empty bars: unstimulated cells, dotted bars: cells treated by TeNT alone. Data represent the mean \pm SEM (n=3; \neq : vs. unstimulated cells; *: $P < 0.05$).

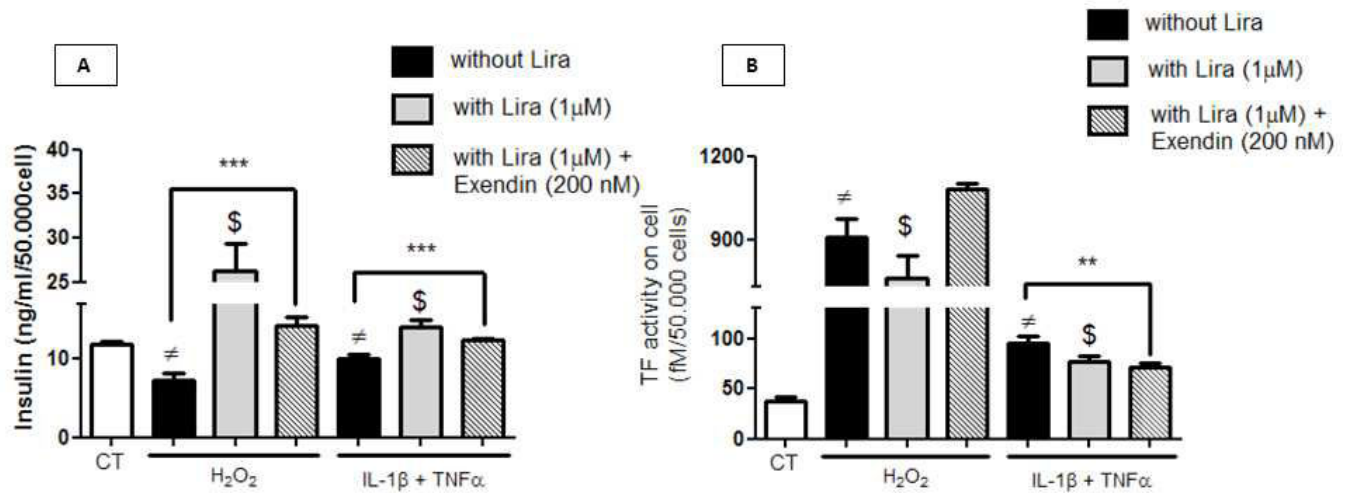


Figure 8: Liraglutide effects on insulin secretion (A) and TF activity (B) rely on GLP-1r -dependent and -independent pathways. Cells were submitted to 1h treatment with the GLP-1r antagonist exendin (9-39), before application of H₂O₂ or cytokines and exendin during 6h, in presence (grey bars) or absence (black bars) of Liraglutide (Lira). Insulin secretion (A) and TF activity (B) were assessed. Empty bars: unstimulated cells, striped bars: exendin (9-39). Data presented as mean ± SEM (n=3; #: vs. unstimulated cells; \$: vs. H₂O₂- or cytokine-treated cells; **: P<0.01; ***: P<0.0001).

REFERENCES

1. **Isordia-Salas I, Galvan-Plata ME, Leanos-Miranda A, et al.** Proinflammatory and prothrombotic state in subjects with different glucose tolerance status before cardiovascular disease. *J Diabetes Res.* 2014; 2014: 631902.
2. **Samad F, Ruf W.** Inflammation, obesity, and thrombosis. *Blood.* 2013; 122: 3415-22.
3. **Zhang M, Chen P, Chen S, et al.** The association of new inflammatory markers with type 2 diabetes mellitus and macrovascular complications: a preliminary study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014; 18: 1567-72.
4. **Kurtzman N, Zhang L, French B, et al.** Personalized cytomic assessment of vascular health: Evaluation of the vascular health profile in diabetes mellitus. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013; 84: 255-66.
5. **Wang Y, Chen LM, Liu ML.** Microvesicles and diabetic complications--novel mediators, potential biomarkers and therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin.* 2014; 35: 433-43.
6. **Feng B, Chen Y, Luo Y, et al.** Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 2010; 208: 264-9.
7. **Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al.** Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes.* 2002; 51: 2840-5.
8. **Aupeix K, Hugel B, Martin T, et al.** The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest.* 1997; 99: 1546-54.
9. **Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM.** [Plasma membrane remodelling and cell stimulation]. *Med Sci (Paris).* 2004; 20: 189-95.
10. **Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, et al.** Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest.* 2004; 34: 392-401.
11. **Morel O, Jesel L, Abbas M, et al.** Prothrombotic changes in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost.* 2013; 39: 477-88.
12. **Morel O, Morel N, Jesel L, et al.** Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol.* 2011; 33: 469-86.
13. **Cimmino G, D'Amico C, Vaccaro V, et al.** The missing link between atherosclerosis, inflammation and thrombosis: is it tissue factor? *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2011; 9: 517-23.
14. **Konieczynska M, Fil K, Bazanek M, et al.** Prolonged duration of type 2 diabetes is associated with increased thrombin generation, prothrombotic fibrin clot phenotype and impaired fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 2014; 111: 685-93.
15. **Baron M, Boulanger CM, Staels B, et al.** Cell-derived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J Cell Mol Med.* 2012; 16: 1365-76.
16. **Rautou PE, Vion AC, Amabile N, et al.** Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res.* 2011; 109: 593-606.
17. **Bond LM, Brandstaetter H, Kendrick-Jones J, et al.** Functional roles for myosin 1c in cellular signaling pathways. *Cell Signal.* 2013; 25: 229-35.
18. **Davizon P, Munday AD, Lopez JA.** Tissue factor, lipid rafts, and microparticles. *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36: 857-64.
19. **Kunzelmann-Marche C, Freyssinet JM, Martinez MC.** Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity. Role of transient receptor potential channels and ERK pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277: 19876-81.
20. **Perez-Cervera Y, Dehennaut V, Aquino Gil M, et al.** Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *FASEB J.* 2013; 27: 3478-86.
21. **Kim YJ, Sano T, Nabetani T, et al.** GPRC5B activates obesity-associated inflammatory signaling in adipocytes. *Sci Signal.* 2012; 5: ra85.

22. **Oh YS, Khil LY, Cho KA, et al.** A potential role for skeletal muscle caveolin-1 as an insulin sensitivity modulator in ageing-dependent non-obese type 2 diabetes: studies in a new mouse model. *Diabetologia*. 2008; 51: 1025-34.
23. **Lipina C, Hundal HS.** Sphingolipids: agents provocateurs in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetologia*. 2011; 54: 1596-607.
24. **Salaun C, James DJ, Chamberlain LH.** Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*. 2004; 5: 255-64.
25. **Xia F, Gao X, Kwan E, et al.** Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *J Biol Chem*. 2004; 279: 24685-91.
26. **Yamazaki S, Satoh H, Watanabe T.** Liraglutide Enhances Insulin Sensitivity by Activating AMP-Activated Protein Kinase in Male Wistar Rats. *Endocrinology*. 2014: 2013-157.
27. **de Wit HM, Vervoort GM, Jansen HJ, et al.** Liraglutide reverses pronounced insulin-associated weight gain, improves glycaemic control and decreases insulin dose in patients with type 2 diabetes: a 26 week, randomised clinical trial (ELEGANT). *Diabetologia*. 2014.
28. **Miao XY, Gu ZY, Liu P, et al.** The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide regulates pancreatic beta-cell proliferation and apoptosis via an AMPK/mTOR/P70S6K signaling pathway. *Peptides*. 2013; 39: 71-9.
29. **Gleizes C, Constantinescu A, Abbas M, et al.** Liraglutide protects Rin-m5f beta cells by reducing procoagulant tissue factor activity and apoptosis prompted by microparticles under conditions mimicking Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction. *Transpl Int*. 2014; 27: 733-40.
30. **Constantinescu AA, Gleizes C, Alhosin M, et al.** Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2014; 13: 219-26.
31. **Hindlycke H, Lu T, Welsh N.** Cytokine-induced human islet cell death in vitro correlates with a persistently high phosphorylation of STAT-1, but not with NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 418: 845-50.
32. **Matsuda T, Omori K, Vuong T, et al.** Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. *Am J Transplant*. 2005; 5: 484-93.
33. **Cardozo AK, Proost P, Gysemans C, et al.** IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. *Diabetologia*. 2003; 46: 255-66.
34. **Cardozo AK, Kruhoffer M, Leeman R, et al.** Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. *Diabetes*. 2001; 50: 909-20.
35. **Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, et al.** Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1846-47.
36. **Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al.** Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1842-51.
37. **Alhosin M, Ibrahim A, Boukhari A, et al.** Anti-neoplastic agent thymoquinone induces degradation of alpha and beta tubulin proteins in human cancer cells without affecting their level in normal human fibroblasts. *Invest New Drugs*. 2012; 30: 1813-9.
38. **Bacova Z, Orecna M, Hafko R, et al.** Cell swelling-induced signaling for insulin secretion bypasses steps involving G proteins and PLA2 and is N-ethylmaleimide insensitive. *Cell Physiol Biochem*. 2007; 20: 387-96.
39. **Guo LX, Xia ZN, Gao X, et al.** Glucagon-like peptide 1 receptor plays a critical role in geniposide-regulated insulin secretion in INS-1 cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2012; 33: 237-41.
40. **Curtis AM, Wilkinson PF, Gui M, et al.** p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J Thromb Haemost*. 2009; 7: 701-9.

41. **Youl E, Magous R, Cros G, et al.** MAP Kinase cross talks in oxidative stress-induced impairment of insulin secretion. Involvement in the protective activity of quercetin. *Fundam Clin Pharmacol.* 2014.
42. **Xia F, Leung YM, Gaisano G, et al.** Targeting of voltage-gated K⁺ and Ca²⁺ channels and soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins to cholesterol-rich lipid rafts in pancreatic alpha-cells: effects on glucagon stimulus-secretion coupling. *Endocrinology.* 2007; 148: 2157-67.
43. **Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hofer J, et al.** Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation.* 2008; 117: 2340-50.
44. **Ban K, Kim KH, Cho CK, et al.** Glucagon-like peptide (GLP)-1(9-36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin(9-39) yet does not require the known GLP-1 receptor. *Endocrinology.* 2010; 151: 1520-31.
45. **MacDonald PE, Wang X, Xia F, et al.** Antagonism of rat beta-cell voltage-dependent K⁺ currents by exendin 4 requires dual activation of the cAMP/protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *J Biol Chem.* 2003; 278: 52446-53.

IV. Données complémentaires

IV.1. Evaluation de l'effet dose des MPs sur l'insulino-sécrétion

L'article met en évidence l'effet des MPox et des MPcyt sur l'insuline sécrétée dans le surnageant après l'application de 10 nM de MPs pendant 24 h (Figure 2A de l'article n°2). D'autres concentrations de MPox et MPcyt ont été étudiées (Figure 40).

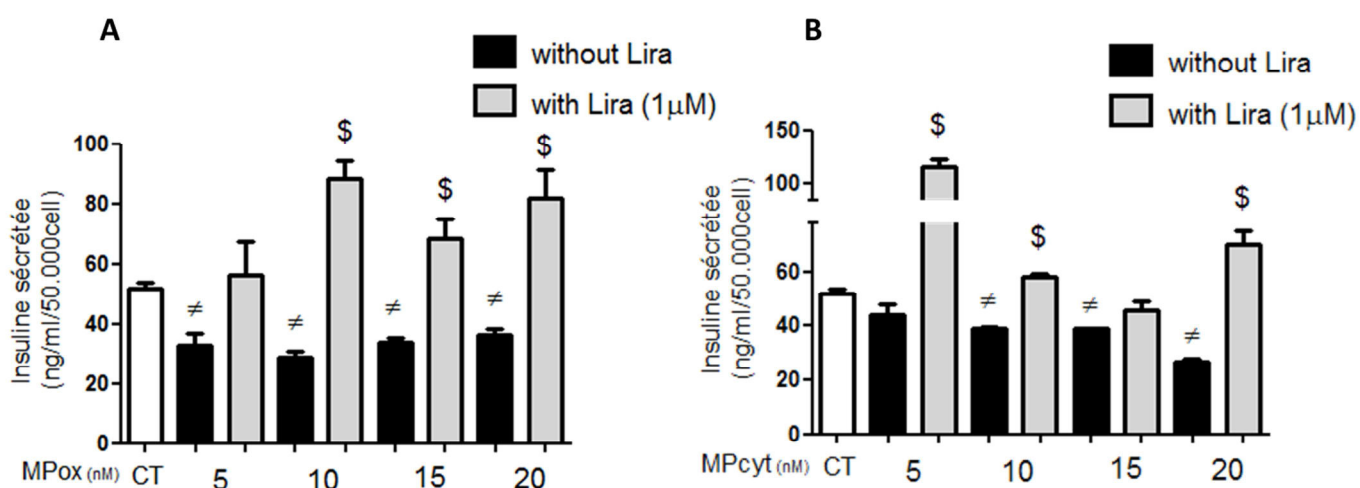


Figure 34 : Effet dose des MPs sur l'insulino-sécrétion

Après l'application de MPox (A) et MPcyt (B) pendant 24h en présence (barres grises) ou en absence (barres noires) de Liraglutide (Lira), l'insuline sécrétée dans le milieu de culture est dosée par ELISA et ramenée à une concentration pour 50.000 cellules. (n=3, #: différence significative par rapport aux cellules contrôle non stimulées (barres blanches); \$: différence significative par rapport aux cellules stimulées par les MPs seules (barres noires)).

L'application de MPox et MPcyt diminue significativement l'insuline sécrétée dans le milieu de culture, tout comme les deux types de stress qui leur ont donné naissance (Figure 38 et Figure 40). Dans la gamme de concentration étudiée, la diminution de la sécrétion d'insuline n'est pas dose-dépendante de la concentration en MPox mais une tendance à la diminution est observée pour une concentration de 20 nM de MPcyt. Le Liraglutide restaure l'insulino-sécrétion des cellules traitées par les MPs dès les concentrations de 10 nM de MPox et 5 nM de MPcyt. Les courbes permettent d'apprécier les différences d'action du Liraglutide sur les MPox et les MPcyt. La concentration de 10 nM de MPs a été retenue pour apprécier la modulation des effets des MPs par le Liraglutide.

Ces résultats mettent en évidence un effet similaire des MPox et MPcyt sur l'insulino-sécrétion et indiquent qu'un contrôle de cette altération est possible par le Liraglutide.

IV.2. Évaluation de l'effet dose du Liraglutide sur l'activité TF des MPs

L'article n°2 met en évidence l'activité TF portée par les MPs émises à la suite de l'application d'H₂O₂ ou de cytokines et sa modulation par 1µM de Liraglutide (Figure 1A de l'article n°2). D'autres concentrations de Liraglutide ont été appliquées et l'activité TF portée par les MPs émises a été évaluée (Figure 41).

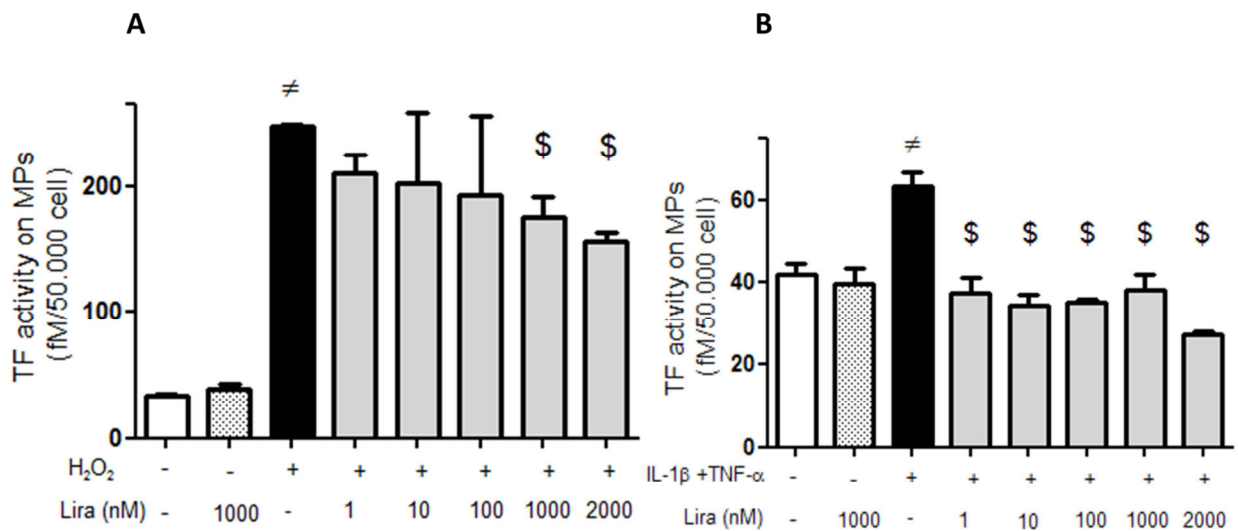


Figure 35 : Evaluation de l'effet dose du Liraglutide sur l'activité TF portée par les MPs émises à la suite d'un stress oxydant (A) ou cytokinique (B)

Après l'application d'un stress oxydant (A) ou cytokinique (B) selon le modèle de stress décrit en I.4. en présence (barres grises) ou non (barres noires) de Liraglutide (Lira), l'activité TF a été évaluée sur le surnageant des cellules, à partir d'un test enzymatique fonctionnel, dit « Tenase ». (n=3, # : différence significative par rapport aux cellules contrôles non stimulées (barres blanches) ; \$: différence significative par rapport aux cellules stimulées par les MPs seules ; barres quadrillées : cellules traitées par uniquement 1µM de Liraglutide).

Ces résultats confirment que l'application d'un stress oxydant ou cytokinique conduit à l'émission de MPs présentant une forte activité TF (Figure 41). Lorsque le Liraglutide est ajouté simultanément au stress, les MPs émises expriment une activité TF significativement plus faible. Cette diminution est effective à partir d'1µM de Liraglutide dans le cas du stress oxydant et atteint un palier dès 1 nM de Liraglutide dans le cas du stress cytokinique. Les différences d'activité TF observées entre les MPox et le MPcyt peuvent être imputées soit à un enrichissement des MPox en TF par rapport aux MPcyt soit à un degrés d'externalisation de PhSer plus important dans les MPox que les MPcyt. En effet, l'activité TF est potentialisée par la PhSer et cette potentielle différence d'externalisation de PhSer entre les deux types de MPs pourrait être mis en évidence en utilisant l'annexine 5 (capture sur plaque ou cytométrie) De plus, un pic d'expression du TF apparaît plus précocement dans le cas de l'application

d'un stress oxydant pouvant entraîner une externalisation plus rapide de la PhSer (Figure 3A de l'article n°2) alors que dans le cas du stress cytokinique l'expression de TF est retardée (Figure 3B de l'article n°2) et pourrait expliquer l'activité TF moindre exprimée à la surface des MPcyt (Figure 41). Enfin, la différence d'activité TF observée entre les deux types de MPs pourrait aussi s'expliquer par le fait que la quantité de MPs totales émises suite à l'application d'un stress oxydant est plus importante qu'après l'application du stress cytokinique (Figure 1B de l'article n°1)

En conclusion, le Liraglutide diminue l'activité procoagulante des MPs émises sous l'effet d'un stress oxydant ou cytokinique, probablement grâce à ses propriétés anti-apoptotiques qui limiteraient l'exposition de PhSer et la potentialisation de l'activité TF

IV.3. Evaluation de l'effet cytoprotecteur du Liraglutide sur le fonctionnement des canaux ioniques suite à l'application de MPs

L'article n°2 montre un effet cytoprotecteur du Liraglutide sur l'insulino-sécrétion pouvant être médié par une action sur le fonctionnement des canaux ioniques K^+ et Ca^{2+} (Figure 6 de l'article n°2). Ce rôle bénéfique du Liraglutide a été mis en évidence en présence d'un stress oxydant ou cytokinique dans l'article n°2 mais il a aussi été établi dans le cas où le stress est induit par les MPs (Figure 42).

IV.3.1. Matériels et Méthodes

Les Rin-m5f ont été traitées durant 24 h, en présence de 10 nM de MPox ou MPcyt et d'un inhibiteur des canaux calciques, l'amlodipine à 10 μ M qui induit la fermeture du canal calcique ou d'un inhibiteur des canaux potassiques, le diazoxide à 0,25 mM qui induit le maintien de l'ouverture du canal potassique. Le Liraglutide à 1 μ M a été ajouté simultanément au milieu de culture. L'insuline sécrétée dans le surnageant a été dosée par ELISA et sa concentration rapportée à 50.000 cellules.

IV.3.2. Résultats

Les résultats rapportés dans l'article n°2 (Figure 2C) concernant l'effet des MPs sur l'insulino-sécrétion et leur modulation par le Liraglutide, sont rappelés dans la Figure 42 afin de les comparer avec ceux obtenus en présence des inhibiteurs des canaux ioniques.

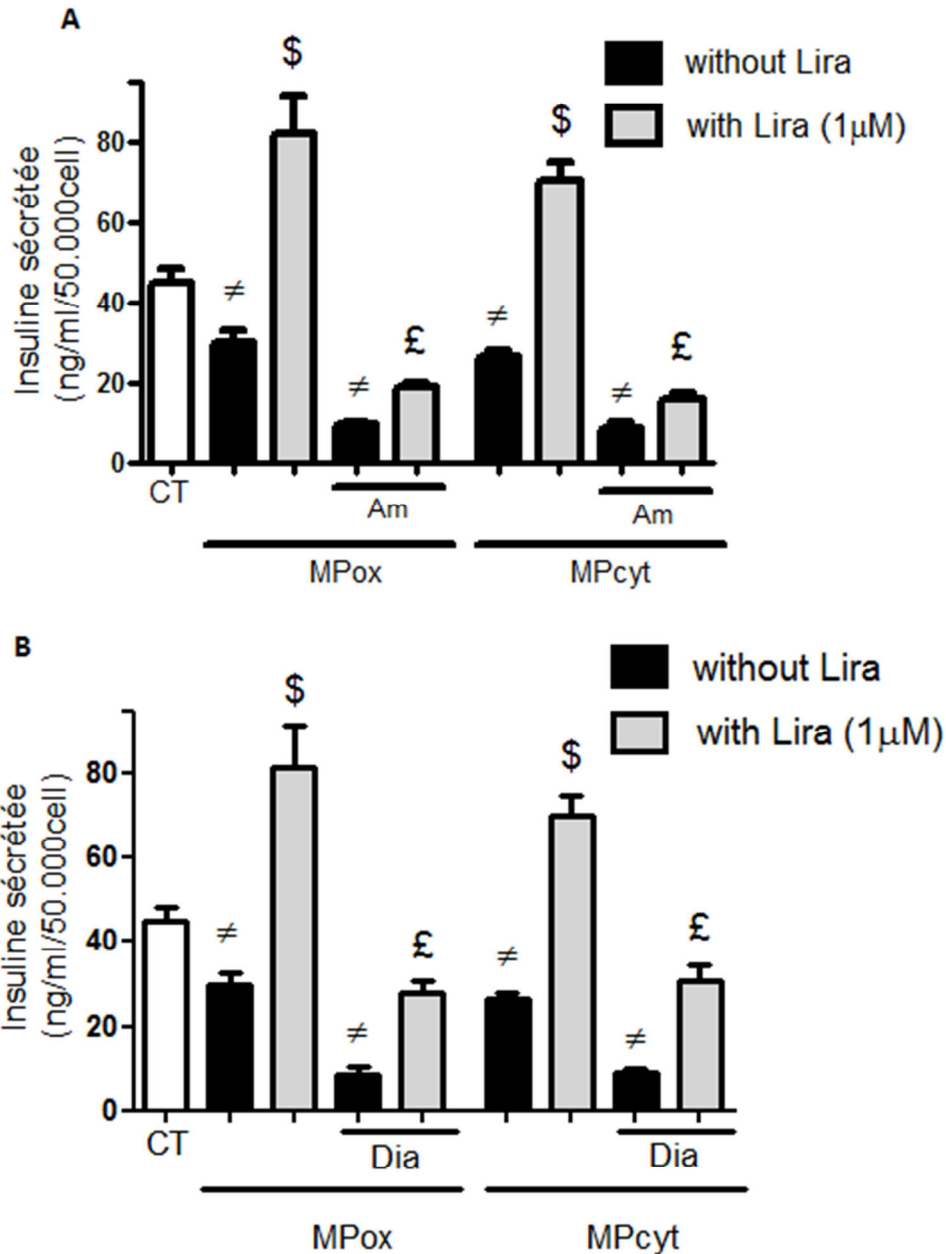


Figure 36 : Effet de l'inhibiteur des canaux calciques (A) ou potassiques (B) sur la cytoprotection du Liraglutide dans l'insulino-sécrétion

Les MPox et les MPcyt sont appliquées pendant 24 h à une concentration finale de 10 nM sur les Rin-m5F en présence (barres grises) ou non (barres noires) de Liraglutide (Lira). Les cellules peuvent être traitées pendant avec de l'amlodipine (Am) (A) ou du diazoxide (Dia) (B). L'insuline sécrétée dans le surnageant est mesurée par ELISA. (n=3, \neq : différence significative par rapport aux cellules contrôle non stimulées (barres blanches) ; \$: différence significative par rapport aux cellules stimulées par les MPs seules ; £ : différence significative entre les cellules traitées par un inhibiteur et stimulées par les MPs en l'absence de Liraglutide par rapport à ces mêmes cellules et mises en présence de Liraglutide).

La modulation du fonctionnement des deux types de canaux entraîne une accentuation de l'effet délétère des MPs sur la sécrétion d'insuline. La restauration de l'insulino-sécrétion par le Liraglutide est plus faible lorsque les cellules sont traitées par les inhibiteurs des canaux, probablement en raison du fait qu'ils sont nécessaires aux processus d'exocytose des granules à insuline.

Les résultats posent la question des effets du Liraglutide liés à la stimulation de la sécrétion d'insuline *via* les canaux K⁺-ATP et Ca²⁺ voltage dépendants et/ou liés à ses propriétés anti-apoptotiques. En effet, les processus apoptotiques entraînent des modifications des concentrations calciques intracellulaires capables d'affecter le fonctionnement de ces canaux.

IV.4. Implication du GLP-1 et de l'acide palmitique dans l'effet cytoprotecteur du Liraglutide

Les travaux de l'article n°2 ont mis en évidence un effet cytoprotecteur du Liraglutide indépendamment de sa fixation au récepteur du GLP-1. Nous nous sommes donc interrogés sur les cibles alternatives du Liraglutide et donc sur le rôle éventuel de la structure de la molécule dans son effet bénéfique. En particulier, des travaux préliminaires ont questionné l'implication de l'acide palmitique (C16) dans l'effet bénéfique du Liraglutide, qui pourrait étayer l'observation de l'effet bénéfique indépendant du récepteur au GLP-1 mis en évidence dans l'article n°2 (Figure 8 de l'article n°2).

IV.4.1. Matériels et Méthodes

Les cellules Rin-m5f ont été stimulées par un stress oxydant ou un stress cytokinique selon le modèle de stress établi en I.4 et en présence d'1µM de Liraglutide, de GLP-1 purifié, de C16 ou de la combinaison équimolaire de GLP-1 + C16, correspondant à la proportion retrouvée dans le Liraglutide. Le surnageant a été centrifugé pendant 5 min à 13000g et conservé à 4°C. Les cellules lavées ont été détachées puis fixées et perméabilisées en présence d'éthanol froid à 70%. Les MPs et l'insuline ont été dosées dans le surnageant et l'apoptose des cellules β mesurée par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium de l'ADN hypodiploïde.

IV.4.2. Résultats

IV.4.2.1. Apoptose

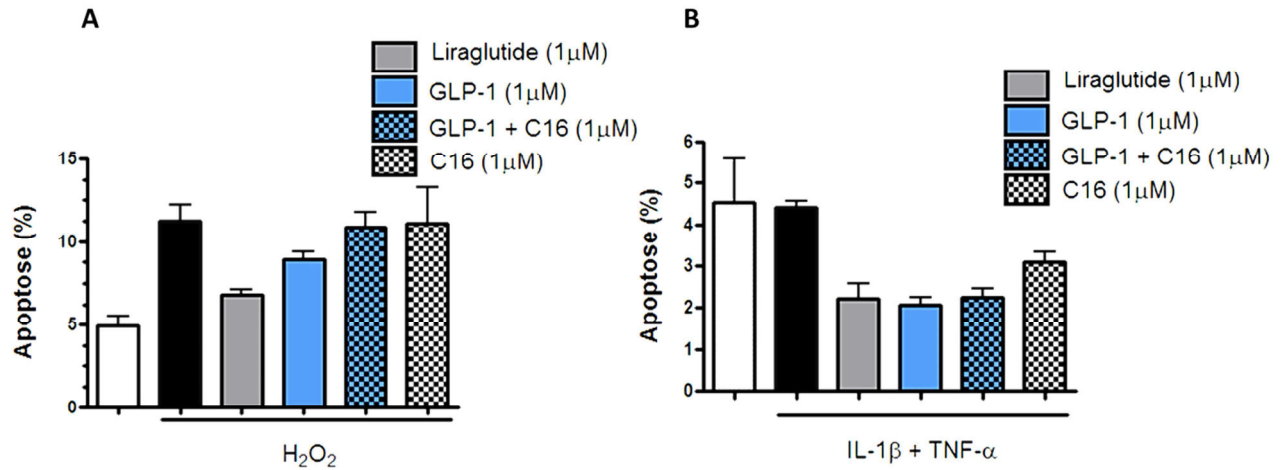


Figure 37 : Effet du GLP-1 purifié et de l'acide palmitique sur l'apoptose des Rin-m5f après application de H₂O₂ ou d'IL-1β + TNF-α

Après application d'un stress oxydant (A) ou cytokinique (B) en présence d'1μM de Liraglutide, GLP-1, d'acide palmitique (C16) ou GLP-1 + C16, les cellules sont fixées et perméabilisées dans l'éthanol et le degré d'apoptose mesuré par cytométrie en flux des cellules après marquage par IP (n=2, barres noires : cellules n'ayant reçu que le stress oxydant ou cytokinique, barres blanches : cellules non stimulées)

Ces résultats doivent être reproduits, néanmoins, ils suggèrent que le Liraglutide, le GLP-1 ou la combinaison GLP-1+ C16 diminuent l'apoptose en réponse au stress oxydant. Par ailleurs, si le Liraglutide tend à contrecarrer l'apoptose de manière plus importante que le GLP-1 seul, l'association GLP1+C16 ou le C16 seul ne modifient pas le degré d'apoptose induite par H₂O₂ (Figure 43A). Dans le cas du stress cytokinique, les faibles valeurs de l'apoptose ne permettaient pas d'observer de variations significatives et l'étude n'a pas été poursuivie (Figure 43B).

IV.4.2.2. Sécrétion d'insuline

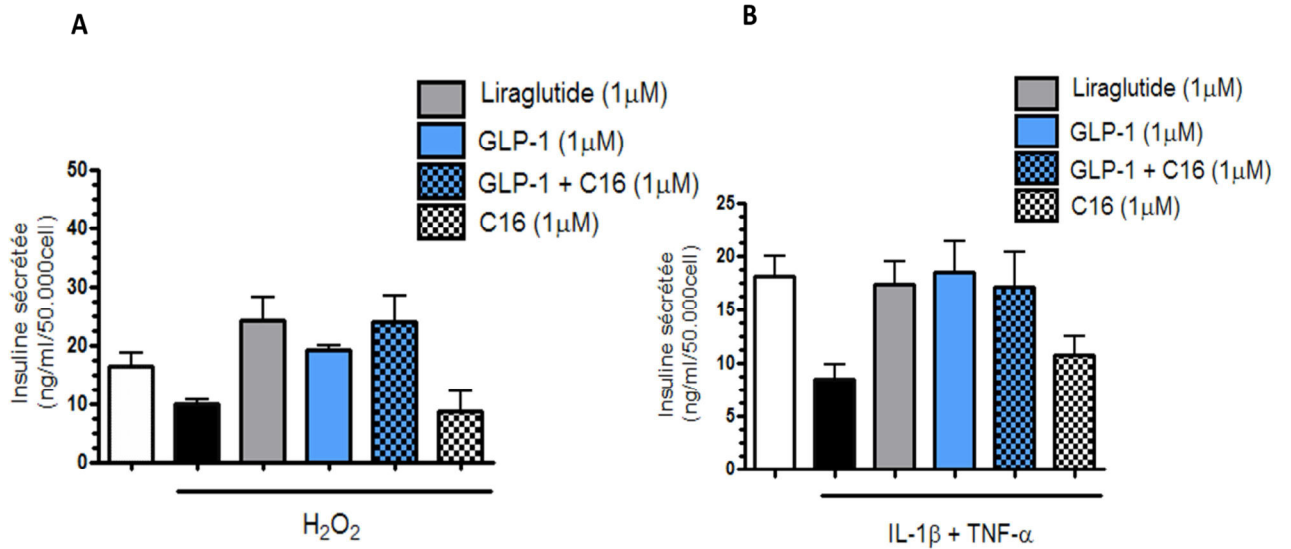


Figure 38 : Effet du GLP-1 purifié et de l'acide palmitique sur l'insulino-sécrétion en présence de H₂O₂ ou de la combinaison d'IL-1β + TNF-α

L'insuline sécrétée accumulée dans le surnageant est mesurée par ELISA après application d'un stress oxydant (A) ou cytokinique (B) en présence d'1μM de Liraglutide, de GLP- purifié 1, de C16 purifié ou de la combinaison GLP-1 + C16 (n=2 ; barres noires : cellules n'ayant reçu que le stress oxydant ou cytokinique, barres blanches : cellules non stimulées)

L'application du Liraglutide, de GLP-1 ou de GLP-1 + C16 tend à restaurer l'insulino-sécrétion. Par contre, l'application seule du C16 reste sans effet (Figure 44).

IV.4.2.3. L'émission des MPs

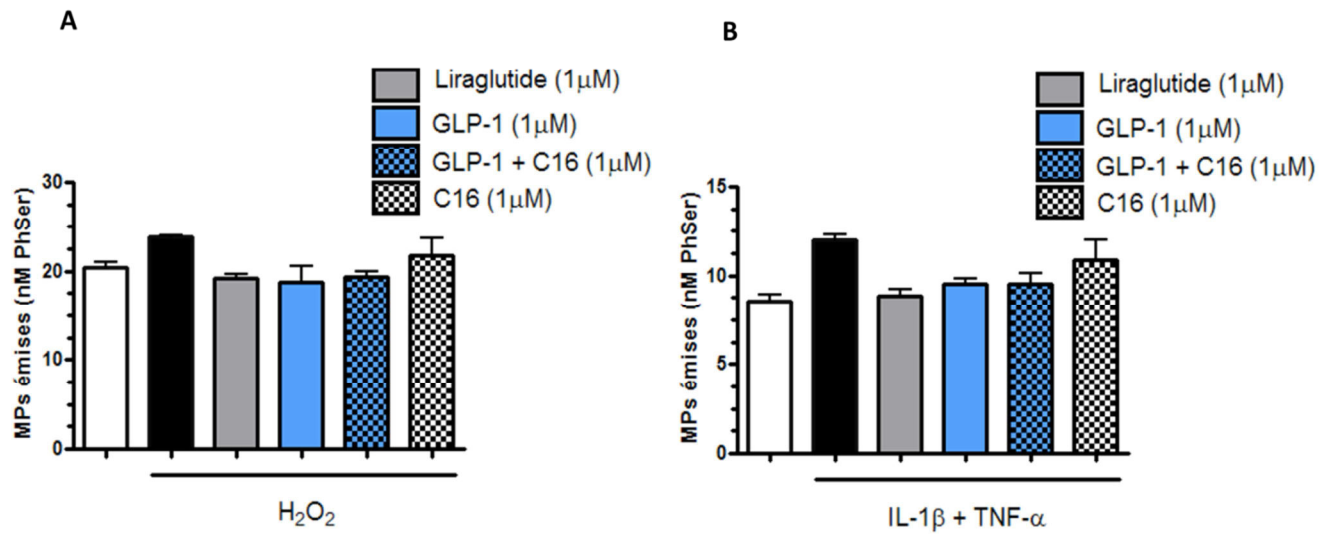


Figure 39 : Effet du GLP-1 et de l'acide palmitique du Liraglutide sur l'émission des MPs après application de H₂O₂ ou d'IL-1β + TNF-α

Les MPs émises dans le surnageant des Rinn-5F sont mesurées par test enzymatique fonctionnel prothrombinase après application d'un stress oxydant (A) ou cytokinique (B) en présence d'1μM de Liraglutide, de GLP-1, de C16 ou de GLP-1 + C16, (n=2 ; barres noires : cellules n'ayant reçu que le stress oxydant ou cytokinique, barres blanches : cellules non stimulées).

Tout comme la sécrétion d'insuline, l'émission des MPs tend à diminuer en présence du Liraglutide, du GLP-1 et du GLP-1 + C16 alors que l'application de C16 seul n'a aucun effet sur l'émission des MPs (Figure 45).

En conclusion, l'acide palmitique porté par le Liraglutide ne semble pas participer à son effet bénéfique sur l'apoptose, l'insulino-sécrétion ou sur l'émission des MPs.

V. Discussion et conclusion

Cette deuxième partie du travail a permis de mettre en évidence qu'un stress inflammatoire ou oxydant promeut des remodelages de la membrane plasmique de la cellule β et influe sur sa fonction. De plus, les MPs émises en réponse à ces stress amplifient le message délétère qui conduit à la réduction de la sécrétion d'insuline. Les MPs sont capables de transmettre ce message délétère aux cellules cibles *via* la phosphorylation de la MAPK p38 (Figure 2D de l'article n°2). Par ailleurs, les MPs émises lors des stress sont porteuses de TF actif et la proportion de TF exprimé par les MPs est liée à l'effet délétère des MPs sur l'insulino-sécrétion.

De manière intéressante, la modulation pharmacologique par le Liraglutide limite l'activité TF des MPs émises lors d'un stress, sans modifier son expression à la surface des cellules β . Cette combinaison de propriétés cytoprotectrices et de diminution de l'activité TF pourraient constituer un atout pour limiter la perte des îlots pancréatiques en réponse à l'IBMIR. En effet, les propriétés anti-apoptotiques des analogues du GLP-1 apparaissent précieuses pour limiter le stress de l'ischémie et restreindre la production de TF actif dans les suspensions d'îlot injectées.

Les remodelages de la membrane plasmique participent au contrôle de la fonction cellulaire. Dans notre modèle, la formation de rafts de grande taille a pu être associée à une réponse de la cellule suite à l'application d'un stress inflammatoire. L'application du Liraglutide s'est traduite par une dispersion des rafts, proche de celle observée en microscopie à fluorescence, après l'application de la MCD (Figure 5 de l'article n°2). Nos résultats suggèrent un lien entre la liaison GLP-1 à son récepteur, la formation des rafts et la réponse au stress de la cellule β . Cette hypothèse est soutenue par le fait que les protéines SNARE, assurant l'exocytose des vésicules à insuline, ont une activité liée à la formation des rafts et en particulier, la dislocation des rafts améliore l'exocytose de l'insuline [319]. De plus, la modulation pharmacologique des canaux membranaires calciques et potassiques impliqués dans la sécrétion d'insuline est levée par l'application de Liraglutide, dans nos expériences, que les cellules soient stimulées par un stress oxydant, cytokinique ou des MPs. Ces résultats sont accord avec ceux obtenus sur des cellules β mettant en évidence un effet direct du Liraglutide et de l'exendine-4 sur le maintien de l'excitabilité de la cellule β *via* l'activation des canaux calciques et ce de manière indépendante à l'activation de la PKA [320].

Si l'ensemble des données confirment le rôle bénéfique des analogues du GLP-1 sur l'insulino sécrétion, les remodelages membranaires et l'activité TF, certains indiquent qu'ils ne seraient pas uniquement dû à des mécanismes dépendants de la liaison de l'analogue au récepteur du GLP-1 (Figure 8 de l'article °2). Cette proposition est retrouvée dans quelques publications, notamment consacrées aux effets cytoprotecteurs du Liraglutide dans les cardiomyocytes [321]. Dans la continuité de cette observation, la question de l'interaction membranaire ou avec le récepteur au GLP-1 de l'acide palmitique a été étudiée et ce dernier ne semble pas impliqué dans l'effet bénéfique du Liraglutide.

La figure suivante reprend les principaux résultats dégagés dans cette deuxième partie en condition de stress (A) et dans le cas de la modulation pharmacologique par le Liraglutide (B).

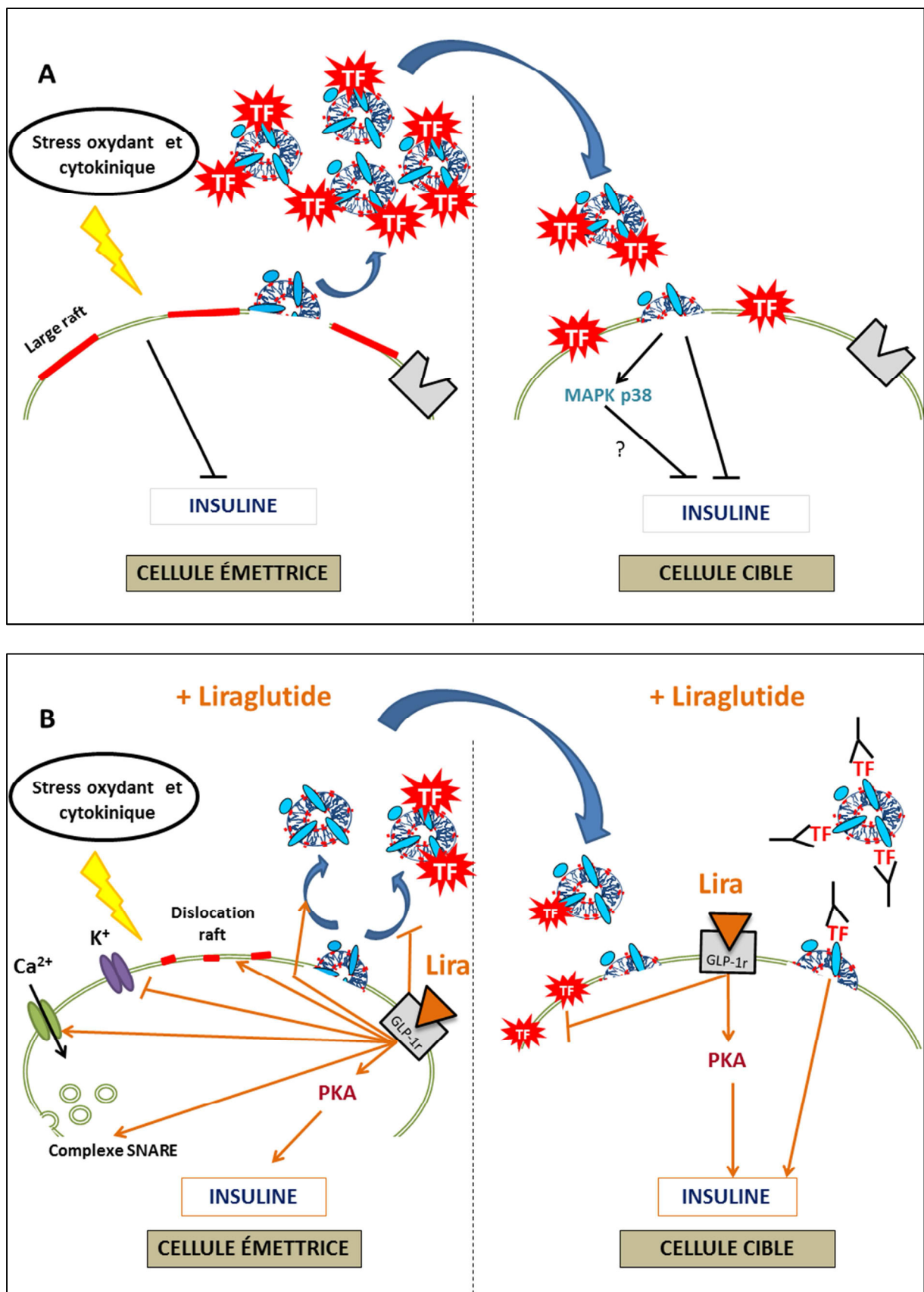


Figure 40 : Résumé de l'effet du stress oxydant et du stress cytokinique (A) sur les remodelages membranaires, l'activité TF et la sécrétion d'insuline. Modulation par le Liraglutide (B)

DISCUSSION GÉNÉRALE

La réaction IBMIR, spécifique de la greffe d'îlots de Langerhans, constitue une étape critique dans la réussite au long terme de cette procédure. Immédiatement après l'injection des îlots dans la veine porte, ceux-ci sont confrontés à un contexte pro-inflammatoire et procoagulant délétère à leur fonction et à leur survie. Dans ce contexte, les microparticules constituent une réponse déployée par la cellule au stress d'ischémie reperfusion. En effet, l'ischémie produit une apoptose importante tandis que l'injection des îlots provoque le stress de reperfusion. Chez les patients transplantés d'îlots, la concentration de MPs circulantes est élevée immédiatement après la greffe. Les microparticules, de par leurs propriétés anticoagulantes et anti-inflammatoires, pourraient constituer un élément majeur de l'IBMIR. Les MPs, en plus d'être des réservoirs de molécules bioactives, jouent un rôle majeur dans l'activation de la coagulation locale et systémique.

Les analogues du GLP-1, par interaction avec le récepteur du GLP-1 sont des acteurs privilégiés de l'activation de la sécrétion d'insuline. Des études *in vitro* leur confèrent aussi des propriétés anti-apoptotiques. Ainsi, la dualité de leurs effets, à savoir un maintien de la fonction mais aussi de la masse β cellulaire, font de ces molécules des candidats de choix pour un contrôle spécifique de l'IBMIR. A l'heure actuelle, les données concernant les propriétés des analogues du GLP-1 portent uniquement sur leurs effets anti-apoptotiques et bénéfiques sur la sécrétion d'insuline. Il nous a donc semblé pertinent d'étudier l'effet d'un analogue du GLP-1 sur l'activité du TF et de pouvoir, ainsi mettre en évidence un effet global des incrétinomimétiques sur les MPs, leur émission, leur activité procoagulante et leurs propriétés effectrices dans la cellule β .

Dans ce travail nous avons caractérisé l'effet des MPs sur la cellule β , dans un modèle cellulaire de stress oxydant et inflammatoire, afin d'évaluer leur rôle potentiel d'effecteurs cellulaires lors de l'IBMIR. D'autre part, il nous a semblé pertinent d'étudier les effets d'un analogue du GLP-1 sur l'émission et les effets autocrines des MPs. La cytoprotection a donc été évaluée en regard des voies intracellulaires activées mais aussi des remodelages membranaires impliqués à la fois dans l'émission des MPs et dans la sécrétion d'insuline.

Avantages et limites du modèle cellulaire

Les études cliniques et les modèles *in vivo* ont permis de dégager un effet des analogues du GLP-1 sur le contrôle glycémique mais très peu permettent de mettre en évidence un effet propre du traitement sur la survie des cellules β . Ainsi, l'utilisation d'un modèle cellulaire, bien qu'il ne reflète pas la complexité des réactions ayant lieu au sein d'un organisme ou d'une structure fonctionnelle comme l'îlot, est nécessaire à l'étude des propriétés et des effets spécifiques d'une molécule sur un type cellulaire. Les MPs étant générées dans le cas d'une apoptose cellulaire, notre choix d'une lignée cellulaire s'est orienté vers l'utilisation de Rin-m5f, particulièrement susceptibles à l'apoptose en condition oxydante et cytokinique [322,323]. Leur culture est plus aisée et plus stable dans le temps que l'autre lignée de cellules β largement utilisée *in vitro*, les INS-1. Toutefois, les Rin-m5f se cultivent en milieu hyperglucosé (4,5g/L de glucose) ce qui limite l'étude du stress métabolique alors que les INS-1 s'y prêtent mieux. Ainsi, notre modèle de stress cellulaire ne permet pas d'évaluer la capacité de la cellule β à sécréter de l'insuline en réponse au glucose mais est plus proche d'un modèle d'étude du stress hyperglycémique prolongé ou chronique. Malgré les limites de cette lignée, la caractérisation de notre modèle de stress reposant sur le choix des agonistes utilisés, leur concentration et leur temps d'incubation a permis d'observer des variations modulables de l'apoptose, de l'insulino-sécrétion, de l'émission des MPs et de l'activité TF, en miroir de ce que l'on peut observer *in vivo* [130,156,291,307].

Les MPs : entités amplificatrices du stress initial

Notre modèle de stress a ainsi permis de mettre en évidence que les MPs sont capables de transmettre aux cellules cibles des messages semblables au stress qui leur a donné naissance. En effet, les MPs émises suite à un stress oxydant pro-apoptotique sont capables d'induire de l'apoptose dans les cellules cibles alors que les MPs émises suite à un stress cytokinique non apoptotique sont incapables de transmettre une activation de l'apoptose. Toutefois, les deux types de MPs activent la voie NF-kB dans les cellules cibles. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature indiquant que les MPs de cellules exocrines émises lors d'un stress induit par LPS peuvent activer la voie NF-kB [324]. De plus, le TF porté par les MPs serait impliqué dans l'effet délétère médié par les MPs sur l'insulino-sécrétion. Ainsi, le TF, davantage impliqué dans l'insulino-résistance contribuerait aussi à une altération de la sécrétion d'insuline [325,326]. Les mécanismes sous-jacents restent à explorer

dans le détail, notamment quant aux molécules actives transmises par les MPs aux cellules cibles et à leur mode d'action. Outre l'éventuelle transmission de caspase-3 mise en évidence dans les cellules endothéliales [327], la possibilité d'une régulation épigénétique reste à explorer. En effet, d'une part, certains miRNAs ont été associés aux MPs émises en réponse au stress apoptotique par le monocyte [328] et d'autre part, les lncRNAs (*long non coding RNAs*), récemment identifiés comme des modulateurs de l'activité de protéines cytoplasmiques [329], pourraient participer à la régulation des protéines effectrices de la sécrétion d'insuline ou de la production de TF.

Implication des rafts dans la voie métabolique de la sécrétion d'insuline

Ce travail confirme l'effet des analogues du GLP-1 sur la sécrétion d'insuline tout en apportant des pistes sur leurs mécanismes d'action. En effet, l'inhibition pharmacologique des différents acteurs de la voie de la sécrétion d'insuline a permis de montrer que le Liraglutide agit directement sur la phosphorylation de la MAPK p38, l'activité de la PKA, le fonctionnement des canaux K^+ -ATP et calciques voltage dépendants. Les analogues du GLP-1 pourraient aussi agir indirectement sur la sécrétion d'insuline, en particulier au niveau de l'exocytose, en modifiant la structure locale de la membrane plasmique. En effet, l'assemblage des protéines SNARE nécessaires à l'exocytose de l'insuline est limité par la formation de rafts au niveau du site d'exocytose [330]. Ainsi, l'analogue du GLP-1, en diminuant l'apoptose, limite l'influx calcique secondaire à l'activation cellulaire et bloquerait les mouvements latéraux de phospholipides conduisant à la formation de clusters de rafts (Figure 13). Ces résultats sont soutenus par ceux de MacDonald qui mettent en évidence que la fixation d'un analogue du GLP-1 facilite la fermeture des canaux potassiques voltage dépendants 2.1, aussi impliqués dans la dépolarisation de la membrane en vue de la sécrétion d'insuline [278]. Or ces canaux peuvent se concentrer au niveau des rafts et la dislocation des radeaux par la MCD entraîne leur fermeture et augmente ainsi l'exocytose de l'insuline [330]. Les données obtenues sur l'exocytose des granules à insuline pourraient être renforcées par l'utilisation d'un marqueur fluorescent témoignant de l'endocytose de la toxine tétanique. Il serait alors possible d'observer la répartition de l'insuline uniquement au sein des cellules présentant un blocage du complexe SNARE.

Mécanismes permettant le contrôle de l'émission des MPs par le Liraglutide

Ce travail a mis en lumière, de manière originale, que les analogues du GLP-1 pouvaient limiter l'émission des MPs dans un contexte de stress cellulaire. Ce résultat pourrait être une des conséquences des propriétés anti-apoptotiques des analogues du GLP-1. En effet, les mécanismes à l'origine de la vésiculation sont dépendants du calcium et les incrétinomimétiques, en diminuant l'apoptose, pourraient limiter l'influx calcique et l'ouverture des pores mitochondriaux qui constitue un "check-point" de la réponse apoptotique. La mesure de l'influx calcique ou la mesure du potentiel mitochondrial en présence ou en absence d'analogue du GLP-1, dans les conditions de stress du modèle, pourraient venir compléter cette assertion.

Par ailleurs, l'émission des MPs, souvent décrites dans les cellules endothéliales, nécessite l'activation de plusieurs étapes dépendantes du calcium dont la dégradation du cytosquelette par l'activation des calpaïnes, de la caspase 3 et la phosphorylation de la MAP kinase p38 [223,331], notamment en condition inflammatoire [315]. Or, nos travaux ont mis en évidence que le Liraglutide diminue la phosphorylation de la MAPK p38 (Figure 2D de l'article n°2) ainsi que l'activation de la voie NF- κ B (Figure 5 de l'article n°1). Cette dernière voie étant médiée par l'activation de la caspase 3 dans les plaquettes, on peut faire l'hypothèse que la diminution de l'activation de la voie NF- κ B médiée par le Liraglutide pourrait passer par une diminution de l'activation de la caspase 3 dans la cellule β [332]. Des travaux très récents rapportent que le stress du RE entraîne une activation des calpaïnes et phosphorylation de la MAPK p38 suivie d'une activation de la caspase 3, dans les cellules stellaires hépatiques [333]. Nos données ont mis en évidence une diminution de la réponse UPR des cellules β après traitement par le Liraglutide. Ainsi, une diminution de la dégradation du cytosquelette médié par une baisse de la voie NF- κ B, de la réponse UPR et de la phosphorylation de la MAPK p38 pourrait être à l'origine des effets des analogues du GLP-1 sur la diminution de l'émission des MPs. La mesure de la quantité de caspases 3 dans les cellules activées permettrait de confirmer cette hypothèse.

L'effet des analogues du GLP-1 sur l'activité TF

De manière intéressante, ce travail met en évidence des propriétés anti-inflammatoires des analogues du GLP-1 dues à leur capacité à diminuer l'activité du TF. En effet, il a été mis en évidence un lien entre l'activation du TF et l'inflammation dans les adipocytes [334]. De

plus, l'activité du TF est potentialisée par la présence de PhSer dans le voisinage du récepteur [335]. Or ce rapprochement spatial est possible par l'externalisation de la PhSer suite à l'inhibition de la flippase et sa concentration au sein de radeaux lipidiques [210]. Dans ce travail, il a été montré que le Liraglutide modifiait, d'une part, l'organisation des rafts et d'autre part, limitait l'apoptose, par un influx calcique nécessaire à l'inhibition de la flippase moindre. Ainsi, le Liraglutide limiterait la translocation de la PhSer et sa clusterisation avec le TF dans les rafts, conduisant à la diminution de l'activité TF observée à la surface des cellules et des MPs émises. De plus, l'étude par cytométrie de l'expression du TF à la surface des cellules β montre que le Liraglutide ne modifie pas son expression, confirmant son rôle au niveau d'un contrôle du remodelage membranaire plutôt qu'une répression de la transcription du TF ou une dégradation endosomique accélérée. Par ailleurs, une autre alternative au contrôle de l'activité du TF par le Liraglutide serait l'étude du recyclage du TF porté par les MPs. En effet, il a été rapporté que le TF porté par les MPs exhibant une forte activité TF pouvait être recyclé après 4 h à la membrane plasmique des cellules cibles et augmenter ainsi la surface procoagulante de la cellule endothéliale [202]. Des premières expériences ont été réalisées afin de mettre en évidence, d'une part, un éventuel recyclage du TF microparticulaire dans les Rin-m5F soumises au modèle de stress et d'autre part, l'effet du Liraglutide sur ce recyclage. Ces premiers résultats obtenus par microscopie à épifluorescence n'ont pu permettre d'observer de manière distincte la localisation du TF microparticulaire dans la cellule cible. L'utilisation d'un microscope confocal plus adapté à une observation précise du TF microparticulaire devra être envisagé pour conclure.

Effet des analogues du GLP-1 non dépendants du récepteur au GLP-1

Enfin, l'effet bénéfique des analogues du GLP-1 est généralement considéré comme une conséquence de sa fixation au récepteur du GLP-1 suivie d'une potentialisation des voies mises en jeu par le glucose. Toutefois, notre étude a mis en évidence que les propriétés du Liraglutide sur l'activité TF et la sécrétion d'insuline ne sont pas exclusivement liées à l'activation des voies associées au récepteur du GLP-1. Cet effet sur l'activité TF indépendant du récepteur du GLP-1 constitue une voie minoritaire dans l'effet du Liraglutide puisqu'elle n'est plus détectée lors d'un stress fort médié par H_2O_2 (Figure 8B de l'article n°2). Ces résultats sont confortés par la publication d'un effet cytoprotecteur du GLP-1 dans des cardiomyocytes qui ne serait pas médié par le récepteur du GLP-1 [309]. Des résultats récents montrent que l'activation du récepteur au GLP-1 est dépendant d'autres récepteurs et en

particulier de PGRMC1 (*progesterone receptor membrane component 1*) qui potentialiserait l'effet du GLP-1 lié à son récepteur [336]. Une autre équipe suggère que l'activation du récepteur du GLP-1 pourrait être modulée *via* une régulation allostérique du récepteur, le nombre de récepteurs du GLP-1 sous forme d'oligomères orientant la réponse au ligand [337,338]. L'ensemble de ces données suggère qu'une modulation des voies activées par le récepteur du GLP-1 est possible par modifications de l'environnement membranaire du récepteur.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La transplantation d'îlots pancréatiques qui se traduit par la greffe de l'unité fonctionnelle de sécrétion d'insuline directement dédiée au contrôle de la glycémie, constitue une thérapie non invasive pour le patient diabétique de type 1 à grande instabilité glycémique. Cette technique est en passe d'égaliser les résultats obtenus par la technique substitutive de référence, la greffe de pancréas. L'amélioration récente de l'efficacité au long terme de la greffe d'îlots repose en partie sur un meilleur contrôle des altérations initiales du greffon cellulaire. En effet, le contact des îlots avec le sang portal déclenche une réaction inflammatoire et procoagulante importante et spécifique à la greffe d'îlots libres. Cette réaction connue sous le nom d'IBMIR constitue la cause principale de la perte précoce des îlots. L'IBMIR est une réaction complexe mettant en jeu des processus inflammatoires promus par le recrutement de cellules monocytaires, par la sécrétion de cytokines, de chémokines et d'autres médiateurs inflammatoires ainsi que l'activation localisée et systémique des réactions de la coagulation reposant en grande partie sur l'expression de TF actif et sur l'activation plaquettaire.

A l'heure actuelle, le contrôle des réactions procoagulantes est assuré par un traitement héparinique en péri-et post-greffe et d'un anti-TNF- α pour limiter la réponse inflammatoire. De nombreuses approches sont à l'étude pour limiter l'IBMIR, en particulier celles alliant un pré-traitement des îlots et un traitement du receveur. Toutefois, ces approches s'orientent principalement vers un contrôle global de la réaction inflammatoire et thrombotique et assez peu vers un traitement ciblant spécifiquement le maintien de la fonction et de la masse β insulaire. Pourtant, cette dernière stratégie semble déterminante pour le devenir du greffon à long-terme. A ce titre, les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* et portant sur l'utilisation des analogues du GLP-1 en greffe d'îlots pancréatiques, s'inscrivent dans cette approche spécifique du contrôle de l'IBMIR. En effet, ces incrétinomimétiques présentent le double avantage de stimuler la fonction sécrétrice de la cellule β mais aussi d'assurer sa survie dans un contexte de stress. Les MPs, vésicules émises par la cellule en situation de stress, sont des acteurs majoritaires dans l'IBMIR, de par leurs propriétés procoagulantes et par les médiateurs inflammatoires et pro-apoptotiques qu'elles véhiculent. Ce travail de thèse s'est donc attaché à évaluer l'émission des MPs et leurs effets autocrines sur la cellule β , dans le contexte inflammatoire mimant celui de l'IBMIR, et d'évaluer si les MPs constituent des cibles thérapeutiques pour les analogues du GLP-1.

Ce travail a permis de montrer que les MPs émises dans un contexte inflammatoire ou oxydant amplifient le stress initiateur de la vésiculation. Les MPs expriment le TF actif dont

le transfert à la cellule cible est directement associé à l'altération de l'insulino-sécrétion médiée par les MPs. Nous avons confirmé les propriétés anti-apoptotiques et stimulatrices de la sécrétion d'insuline des analogues du GLP-1 mais en apportant des pistes nouvelles quant aux mécanismes intracellulaires et membranaires mis en jeu par ces molécules. D'autre part, ce travail regroupe les premiers résultats témoignant de l'effet des analogues du GLP-1 sur l'émission des MPs et leur phénotype procoagulant. En effet, ces résultats suggèrent une modulation quantitative et qualitative de l'émission des MPs par les analogues du GLP-1 qui limitent à la fois la vésiculation membranaire et le profil procoagulant des MPs. La mise en évidence de cette toute nouvelle propriété des analogues du GLP-1 sur l'activité TF est particulièrement intéressante et apporte de nouveaux éléments dans le contrôle de l'IBMIR. Ainsi, les analogues du GLP-1 favorisent une réponse intégrée de la cellule β , en limitant l'activation des voies pro-apoptotiques et pro-inflammatoires ainsi que les remodelages membranaires qui augmentent le caractère procoagulant de la surface cellulaire et qui altèrent à la fois la fonction et la survie de la cellule.

Ce travail ouvre différentes perspectives qui pourront débiter par la caractérisation du contenu des MPs et particulièrement celui en miRNAs. De nombreuses études ont mis en évidence que les MPs endothéliales sont d'importants transporteurs de miRNAs qui peuvent moduler l'expression génétique des cellules cibles [201,339,340]. Plusieurs miRNAs peuvent être envisagés dont l'angiomirNA-126 impliqué dans la préservation de l'endothélium [253,328] et le miRNA-375 impliqué dans la préservation de la masse et de la fonction de la cellule β [44]. Les lncRNAs constituent une catégorie émergente des acteurs de la modulation épigénétique dont la longueur est 10 fois plus élevée que celle des miRNAs (environ 200 paires de bases) et pourraient être transportés dans les MPs [329].

D'autre part, nous souhaitons profiter du modèle de stress établi dans ce travail pour compléter les résultats à l'échelon plus physiologique des îlots en culture. En effet, les îlots constituent une structure fonctionnelle complexe et vascularisée qui contient différents types cellulaires et un endothélium fenestré. L'étude du contrôle pharmacologique de l'IBMIR sera développée en utilisant le modèle de la « tubing loop » qui modélise plus fidèlement l'IBMIR en mettant les îlots au contact d'un flux sanguin [185]. En effet, l'étude *in vivo* de la réaction IBMIR est difficile à mettre en œuvre et l'utilisation de modèles plus complexes d'interactions entre sang et îlots est nécessaire. Nous pourrions confirmer l'effet des analogues du GLP-1 sur l'émission des MPs par les îlots et leurs propriétés sur l'activité TF, dans ce

modèle de flux sanguin, plus proche de l'ischémie/reperfusion et de la réaction IBMIR. Les modulations pharmacologiques pourront être comparées à celles d'autres molécules cytoprotectives récemment proposées, comme la protéine C mutante dépourvue de propriété anticoagulante [341].

L'étude des MPs dans ce modèle nécessitera la caractérisation phénotypique des MPs spécifiques de la cellule β . Pour cela, des travaux préliminaires ont déjà été engagés sur l'étude de marqueurs spécifiques de la cellule β et portent sur la protéine membranaire PSA-NCAM (*Polysialylated-Neural Cell Adhesion Molecule*). Cette protéine est exprimée par les cellules neuronales et par les cellules β . Des travaux sont en cours pour caractériser les variations de MPs circulantes porteuses de PSA-NCAM chez des patients greffés d'îlots enrôlés dans une étude prospective de suivi post-greffe promue par les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. En effet, ces MPs pourraient constituer des marqueurs spécifiques de la cellule β , le passage de la barrière hémato-encéphalique limitant la circulation potentielle de MPs d'origine neuronale.

Enfin, la mise en place d'un modèle *in vivo* de greffe d'îlots chez l'animal diabétique constituera l'étape finale dans l'évaluation de la modulation pharmacologique des MPs au cours de l'IBMIR. Le modèle de greffe intraportale dans le lobe de Spiegel chez le rat constitue une technique de référence permettant l'étude de l'implantation des îlots dans une zone restreinte du foie. Néanmoins, l'utilisation de souris transgéniques à expression conditionné du récepteur au GLP-1 dans les vaisseaux et le pancréas pourrait éclaircir les mécanismes de contrôle mis en jeu dans l'IBMIR. Ces modèles permettraient une étude histologique du greffon ainsi que le monitoring des MPs circulantes totales et spécifiques de la cellule β .

COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

I. Communications

- Communications orales

- **Gleizes C**, AA Constantinescu, F Moreau, F Zobairi, F Toti, L Kessler. *Effet d'un analogue du GLP-1 sur l'apoptose des cellules β en transplantation d'îlots de Langerhans*. Congrès d'Est Transplant. Décembre 2011. Obtention d'une bourse de soutien à des travaux scientifiques : 800 €

- **Gleizes C**, AA Constantinescu, F Zobairi, F Toti, L Kessler. *Liraglutide regulates apoptosis and insulin secretion by insulin secreting Rin-m5f cells, in response to microparticles, implication for islets transplantation*. Congrès bisannuel de l'European Society of Organs Transplantation, Innsbruck du 17 au 20 janvier 2013. Obtention d'une bourse de voyage : 400 €

- **Gleizes C**, AA Constantinescu, F Zobairi, F Moreau, F Toti, L Kessler. *Liraglutide regulates apoptosis and insulin by Rin-m5f cells, in response to microparticles, implication for islets transplantation*. Congrès annuel de l'American Diabetes Association, Chicago du 18 au 23 juin 2013. *Diabetes, 2013*. Bourse de voyage accordée par NovoNordisk dans le cadre du déplacement à ce congrès

- **Gleizes C**, AA Constantinescu, F Zobairi, F Moreau, F Toti, L Kessler. *GLP-1 analog modulates apoptosis and tissue factor in rin-m5f cells, in response to microparticles: implication for islet transplantation*. Congrès bisannuel de l'European Society of Organs Transplantation, Vienne du 8 au 11 septembre 2013.

- **Gleizes C**, Constantinescu A. A, Abbas M, Yver B, Kessler, Toti F, *Liraglutide protects β cells from proinflammatory Tissue Factor bearing Microparticles, interest for pancreatic islets transplantation*. Congrès des jeunes chercheurs. Illkirch du 7 au 8 avril 2014.

- **Gleizes C**, Constantinescu A. A, Abbas M, Yver B, Kessler, Toti F, *Liraglutide protects β cells from proinflammatory Tissue Factor bearing Microparticles in an in vitro model of ischemia reperfusion: interest for pancreatic islets transplantation*. Congrès International d'Ischémie Reperfusion en Transplantation. Poitiers du 24 au 25 avril 2014.

- Posters commentés

- **Gleizes C**, AA Constantinescu, F Zobairi, F Toti, L Kessler. *Effet du Liraglutide sur l'apoptose et l'insulino sécrétion des cellules à insuline Rin-m5f en réponse aux microparticules, dans un modèle de stress inflammatoire et oxydant*. Congrès annuel de la Société Francophone du Diabète, Montpellier du 26 et 29 mars 2013. *Diabete Metab, 2013*.

- **Gleizes C**, AA Constantinescu, F Zobairi, F Toti, L Kessler. *GLP-1 analog modulates apoptosis and tissue factor in rin-m5f cells, in response to microparticles: implication for islet transplantation*. Congrès annuel de l'European Association for the Study of Diabetes, Barcelone du 23 au 27 septembre 2013, *Diabetologia, 2013*.

II. Publications

- Articles en lien direct avec le sujet

- **Gleizes C**, Constantinescu A, Abbas M, Bouhadja H, Zobairi F, Kessler L, Toti F. Liraglutide protects Rin-m5f β cells by reducing procoagulant tissue factor activity and apoptosis prompted by microparticles under conditions mimicking Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction. *Transpl Int*. 2014 Jul; 27(7):733-40. doi: 10.1111/tri.12286. Epub 2014 Mar 24.

- **Gleizes C**, Abbas M, Constantinescu A, Zobairi F, Yver B, Toti F, Kessler L. Impairment of insulin production under inflammatory conditions is associated with β cell Rin-m5f membrane remodeling and tissue factor activity. Soumis à *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.

- Participation aux travaux de l'équipe

- Constantinescu AA, **Gleizes C**, Alhosin M, et al., Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2013, 13(2):219-26.

- Constantinescu AA, Abbas M, Kassem M, **Gleizes C**, Schini-Kerth V, Mitrea IL, Toti F, Kessler L. Differential effects of tacrolimus and sirolimus : a study of apoptosis and senescence in pancreatic rin-m5f, panc-1 and rat islets. Soumis à *Transplantation Journal*

RÉFÉRENCES

1. **Long AE, Gillespie KM, Rokni S, Bingley PJ, Williams AJ.** Rising incidence of type 1 diabetes is associated with altered immunophenotype at diagnosis. *Diabetes*. 2012; 61: 683-6.
2. **Vaziri-Sani F, Delli AJ, Elding-Larsson H, Lindblad B, Carlsson A, Forsander G, Ivarsson SA, Ludvigsson J, Marcus C, Lernmark A.** A novel triple mix radiobinding assay for the three ZnT8 (ZnT8-RWQ) autoantibody variants in children with newly diagnosed diabetes. *Journal of immunological methods*. 2011; 371: 25-37.
3. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet*. 2000; 355: 873-6.
4. **Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G, Group ES.** Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009; 373: 2027-33.
5. **Jayaraman S.** Novel methods of type 1 diabetes treatment. *Discovery medicine*. 2014; 17: 347-55.
6. **Todd JA.** Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*. 2010; 32: 457-67.
7. **Li M, Song LJ, Qin XY.** Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014; 18: 749-58.
8. **Gepts W.** Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. 1965; 14: 619-33.
9. **Brauner H, Elemans M, Lemos S, Broberger C, Holmberg D, Flodstrom-Tullberg M, Karre K, Hoglund P.** Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *Journal of immunology*. 2010; 184: 2272-80.
10. **Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG.** Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clinical and experimental immunology*. 2009; 155: 173-81.
11. **van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG.** Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological reviews*. 2011; 91: 79-118.
12. **Mannering SI, Pang SH, Williamson NA, Naselli G, Reynolds EC, O'Brien-Simpson NM, Purcell AW, Harrison LC.** The A-chain of insulin is a hot-spot for CD4+ T cell epitopes in human type 1 diabetes. *Clinical and experimental immunology*. 2009; 156: 226-31.
13. **Petzold C, Riewaldt J, Watts D, Sparwasser T, Schallenberg S, Kretschmer K.** Foxp3(+) regulatory T cells in mouse models of type 1 diabetes. *Journal of diabetes research*. 2013; 2013: 940710.
14. **Ishigame H, Zenewicz LA, Sanjabi S, Licona-Limon P, Nakayama M, Leonard WJ, Flavell RA.** Excessive Th1 responses due to the absence of TGF-beta signaling cause autoimmune diabetes and dysregulated Treg cell homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110: 6961-6.
15. **Rajagopalan G, Kudva YC, Sen MM, Marietta EV, Murali N, Nath K, Moore J, David CS.** IL-10-deficiency unmasks unique immune system defects and reveals differential regulation of organ-specific autoimmunity in non-obese diabetic mice. *Cytokine*. 2006; 34: 85-95.
16. **Bettini M, Castellaw AH, Lennon GP, Burton AR, Vignali DA.** Prevention of autoimmune diabetes by ectopic pancreatic beta-cell expression of interleukin-35. *Diabetes*. 2012; 61: 1519-26.
17. **Marek-Trzonkowska N, Mysliwec M, Siebert J, Trzonkowski P.** Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes. *Pediatric diabetes*. 2013; 14: 322-32.
18. **Chen XL, Bobbala D, Rodriguez GM, Mayhue M, Chen YG, Ilangumaran S, Ramanathan S.** Induction of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice requires interleukin-21-dependent activation of autoreactive CD8(+) T cells. *Clinical and experimental immunology*. 2013; 173: 184-94.
19. **Barral AM, Thomas HE, Ling EM, Darwiche R, Rodrigo E, Christen U, Ejrnaes M, Wolfe T, Kay TW, von Herrath MG.** SOCS-1 protects from virally-induced CD8 T cell mediated type 1 diabetes. *Journal of autoimmunity*. 2006; 27: 166-73.
20. **Brodie GM, Wallberg M, Santamaria P, Wong FS, Green EA.** B-cells promote intra-islet CD8+ cytotoxic T-cell survival to enhance type 1 diabetes. *Diabetes*. 2008; 57: 909-17.

21. **Diana J, Simoni Y, Furio L, Beaudoin L, Agerberth B, Barrat F, Lehuen A.** Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature medicine*. 2013; 19: 65-73.
22. **Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA.** B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000; 12: 431-40.
23. **Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA.** In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine*. 2004; 199: 1455-65.
24. **Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, Cagnard N, Carpentier W, Tang Q, Bluestone J, Chatenoud L, Klatzmann D, Salomon BL, Piaggio E.** IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2010; 207: 1871-8.
25. **Bilate AM, Lafaille JJ.** Can TNF-alpha boost regulatory T cells? *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120: 4190-2.
26. **Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, Piccirillo CA, Salomon BL, Bluestone JA.** Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity*. 2008; 28: 687-97.
27. **Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, Billiard F, Goldstein JD, Gregoire S, Martin GH, Elhage R, Derian N, Carpentier W, Marodon G, Klatzmann D, Piaggio E, Salomon BL.** Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120: 4558-68.
28. **Plagnol V.** [Haplotypes in the IL2RA region associated with diabetes and expression of the IL2RA protein on lymphocytes populations]. *Medecine sciences : M/S*. 2010; 26: 236-8.
29. **Hu C, Ding H, Zhang X, Wong FS, Wen L.** Combination treatment with anti-CD20 and oral anti-CD3 prevents and reverses autoimmune diabetes. *Diabetes*. 2013; 62: 2849-58.
30. **Qin H, Wang Z, Du W, Lee WH, Wu X, Riggs AD, Liu CP.** Killer cell Ig-like receptor (KIR) 3DL1 down-regulation enhances inhibition of type 1 diabetes by autoantigen-specific regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108: 2016-21.
31. **Mishra N, Reilly CM, Brown DR, Ruiz P, Gilkeson GS.** Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 111: 539-52.
32. **Choi JH, Oh SW, Kang MS, Kwon HJ, Oh GT, Kim DY.** Trichostatin A attenuates airway inflammation in mouse asthma model. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2005; 35: 89-96.
33. **Reddy P, Sun Y, Toubai T, Duran-Struuck R, Clouthier SG, Weisiger E, Maeda Y, Tawara I, Krijanovski O, Gatz E, Liu C, Malter C, Mascagni P, Dinarello CA, Ferrara JL.** Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 2562-73.
34. **Brandl A, Heinzl T, Kramer OH.** Histone deacetylases: salesmen and customers in the post-translational modification market. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 2009; 101: 193-205.
35. **Jenuwein T, Allis CD.** Translating the histone code. *Science*. 2001; 293: 1074-80.
36. **Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK.** Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature reviews Cancer*. 2001; 1: 194-202.
37. **Patel T, Patel V, Singh R, Jayaraman S.** Chromatin remodeling resets the immune system to protect against autoimmune diabetes in mice. *Immunology and cell biology*. 2011; 89: 640-9.
38. **Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Lopponen T, Dyrberg T, Akerblom HK, Knip M.** Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of

- children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *The Journal of clinical investigation*. 1998; 101: 327-36.
39. **Lundh M, Christensen DP, Rasmussen DN, Mascagni P, Dinarello CA, Billestrup N, Grunnet LG, Mandrup-Poulsen T.** Lysine deacetylases are produced in pancreatic beta cells and are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *Diabetologia*. 2010; 53: 2569-78.
 40. **Lewis EC, Blaabjerg L, Storling J, Ronn SG, Mascagni P, Dinarello CA, Mandrup-Poulsen T.** The oral histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces cytokines and protects islet beta cells in vivo and in vitro. *Molecular medicine*. 2011; 17: 369-77.
 41. **Kleemann R, Bucala R.** Macrophage migration inhibitory factor: critical role in obesity, insulin resistance, and associated comorbidities. *Mediators of inflammation*. 2010; 2010: 610479.
 42. **Kanagawa O, Xu G, Tevaarwerk A, Vaupel BA.** Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by gene(s) closely linked to IFN-gamma receptor loci. *Journal of immunology*. 2000; 164: 3919-23.
 43. **Sobel DO, Han J, Williams J, Yoon JW, Jun HS, Ahvazi B.** Gamma interferon paradoxically inhibits the development of diabetes in the NOD mouse. *Journal of autoimmunity*. 2002; 19: 129-37.
 44. **Chen H, Lan HY, Roukos DH, Cho WC.** Application of microRNAs in diabetes mellitus. *The Journal of endocrinology*. 2014; 222: R1-R10.
 45. **Bartel DP.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116: 281-97.
 46. **Joven J, Espinel E, Rull A, Aragonés G, Rodríguez-Gallego E, Camps J, Micol V, Herranz-Lopez M, Menendez JA, Borrás I, Segura-Carretero A, Alonso-Villaverde C, Beltran-Debon R.** Plant-derived polyphenols regulate expression of miRNA paralogs miR-103/107 and miR-122 and prevent diet-induced fatty liver disease in hyperlipidemic mice. *Biochimica et biophysica acta*. 2012; 1820: 894-9.
 47. **Parra P, Serra F, Palou A.** Expression of adipose microRNAs is sensitive to dietary conjugated linoleic acid treatment in mice. *PloS one*. 2010; 5: e13005.
 48. **Czech MP, Aouadi M, Tesz GJ.** RNAi-based therapeutic strategies for metabolic disease. *Nature reviews Endocrinology*. 2011; 7: 473-84.
 49. **El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E.** miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2008; 57: 2708-17.
 50. **Roggli E, Britan A, Gattesco S, Lin-Marq N, Abderrahmani A, Meda P, Regazzi R.** Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2010; 59: 978-86.
 51. **Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, Heim MH, Stoffel M.** MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*. 2011; 474: 649-53.
 52. **Mah C, Byrne BJ, Flotte TR.** Virus-based gene delivery systems. *Clinical pharmacokinetics*. 2002; 41: 901-11.
 53. **Erener S, Mojibian M, Fox JK, Denroche HC, Kieffer TJ.** Circulating miR-375 as a biomarker of beta-cell death and diabetes in mice. *Endocrinology*. 2013; 154: 603-8.
 54. **Nielsen LB, Wang C, Sorensen K, Bang-Berthelsen CH, Hansen L, Andersen ML, Hougaard P, Juul A, Zhang CY, Pociot F, Mortensen HB.** Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Experimental diabetes research*. 2012; 2012: 896362.
 55. **Chen W, Xie A, Chan L.** Mechanistic basis of immunotherapies for type 1 diabetes mellitus. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2013; 161: 217-29.
 56. **Smukler SR, Arntfield ME, Razavi R, Bikopoulos G, Karpowicz P, Seaberg R, Dai F, Lee S, Ahrens R, Fraser PE, Wheeler MB, van der Kooy D.** The adult mouse and human pancreas contain rare multipotent stem cells that express insulin. *Cell stem cell*. 2011; 8: 281-93.

57. **Yang YP, Thorel F, Boyer DF, Herrera PL, Wright CV.** Context-specific alpha- to-beta-cell reprogramming by forced Pdx1 expression. *Genes & development*. 2011; 25: 1680-5.
58. **Bramswig NC, Kaestner KH.** Transcriptional regulation of alpha-cell differentiation. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2011; 13 Suppl 1: 13-20.
59. **Akinci E, Banga A, Greder LV, Dutton JR, Slack JM.** Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (beta) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA. *The Biochemical journal*. 2012; 442: 539-50.
60. **Baeyens L, Lemper M, Leuckx G, De Groef S, Bonfanti P, Stange G, Shemer R, Nord C, Scheel DW, Pan FC, Ahlgren U, Gu G, Stoffers DA, Dor Y, Ferrer J, Gradwohl G, Wright CV, Van de Castele M, German MS, Bouwens L, Heimberg H.** Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice. *Nature biotechnology*. 2014; 32: 76-83.
61. **Blyth NJ.** Mechanisms and techniques of reprogramming: using PDX-1 homeobox protein as a novel treatment of insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes & metabolic syndrome*. 2012; 6: 113-9.
62. **Van de Castele M, Leuckx G, Baeyens L, Cai Y, Yuchi Y, Coppens V, De Groef S, Eriksson M, Svensson C, Ahlgren U, Ahnfelt-Ronne J, Madsen OD, Waisman A, Dor Y, Jensen JN, Heimberg H.** Neurogenin 3+ cells contribute to beta-cell neogenesis and proliferation in injured adult mouse pancreas. *Cell death & disease*. 2013; 4: e523.
63. **Hua XF, Wang YW, Tang YX, Yu SQ, Jin SH, Meng XM, Li HF, Liu FJ, Sun Q, Wang HY, Li JY.** Pancreatic Insulin-Producing Cells Differentiated from Human Embryonic Stem Cells Correct Hyperglycemia in SCID/NOD Mice, an Animal Model of Diabetes. *PloS one*. 2014; 9: e102198.
64. **Rezania A, Bruin JE, Riedel MJ, Mojibian M, Asadi A, Xu J, Gauvin R, Narayan K, Karanu F, O'Neil JJ, Ao Z, Warnock GL, Kieffer TJ.** Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes*. 2012; 61: 2016-29.
65. **Cechin S, Alvarez-Cubela S, Giraldo JA, Molano RD, Villate S, Ricordi C, Pileggi A, Inverardi L, Fraker CA, Dominguez-Bendala J.** Influence of in vitro and in vivo oxygen modulation on beta cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem cells translational medicine*. 2014; 3: 277-89.
66. **Peng L, Wang J, Lu G.** Involvement of Gene Methylation Changes in the Differentiation of Human Amniotic Epithelial Cells into Islet-Like Cell Clusters. *DNA and cell biology*. 2014.
67. **Nakagawa M, Yamanaka S.** Reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010; 695: 215-24.
68. **Wang L, Huang Y, Guo Q, Fan X, Lu Y, Zhu S, Wang Y, Bo X, Chang X, Zhu M, Wang Z.** Differentiation of iPSCs into insulin-producing cells via adenoviral transfection of PDX-1, NeuroD1 and MafA. *Diabetes research and clinical practice*. 2014; 104: 383-92.
69. **Cho CH, Hannan NR, Docherty FM, Docherty HM, Joao Lima M, Trotter MW, Docherty K, Vallier L.** Inhibition of activin/nodal signalling is necessary for pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells. *Diabetologia*. 2012; 55: 3284-95.
70. **Zhang G, Shang B, Yang P, Cao Z, Pan Y, Zhou Q.** Induced pluripotent stem cell consensus genes: implication for the risk of tumorigenesis and cancers in induced pluripotent stem cell therapy. *Stem cells and development*. 2012; 21: 955-64.
71. **Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA.** Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature biotechnology*. 2008; 26: 1269-75.
72. **Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, Ding S.** Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell*. 2009; 4: 381-4.
73. **Zhu HT, Yu L, Lyu Y, Wang B.** Optimal pig donor selection in islet xenotransplantation: current status and future perspectives. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2014; 15: 681-91.

74. **Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hardstedt M, Aasheim TC, Jie T, Ansite JD, Nakano M, Cheng J, Li W, Moran K, Christians U, Finnegan C, Mills CD, Sutherland DE, Bansal-Pakala P, Murtaugh MP, Kirchhof N, Schuurman HJ.** Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nature medicine*. 2006; 12: 301-3.
75. **Thompson P, Badell IR, Lowe M, Turner A, Cano J, Avila J, Azimzadeh A, Cheng X, Pierson RN, 3rd, Johnson B, Robertson J, Song M, Leopardi F, Strobert E, Korbitt G, Rayat G, Rajotte R, Larsen CP, Kirk AD.** Alternative immunomodulatory strategies for xenotransplantation: CD40/154 pathway-sparing regimens promote xenograft survival. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012; 12: 1765-75.
76. **Nagaraju S, Bottino R, Wijkstrom M, Hara H, Trucco M, Cooper DK.** Islet xenotransplantation from genetically engineered pigs. *Current opinion in organ transplantation*. 2013; 18: 695-702.
77. **Wright JR, Jr., Yang H, Hyrtsenko O, Xu BY, Yu W, Pohajdak B.** A review of piscine islet xenotransplantation using wild-type tilapia donors and the production of transgenic tilapia expressing a "humanized" tilapia insulin. *Xenotransplantation*. 2014.
78. **Lutz AJ, Li P, Estrada JL, Sidner RA, Chihara RK, Downey SM, Burlak C, Wang ZY, Reyes LM, Ivary B, Yin F, Blankenship RL, Paris LL, Tector AJ.** Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and galactose alpha-1,3-galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2013; 20: 27-35.
79. **Buder B, Alexander M, Krishnan R, Chapman DW, Lakey JR.** Encapsulated islet transplantation: strategies and clinical trials. *Immune network*. 2013; 13: 235-9.
80. **Elliott RB, Escobar L, Tan PL, Garkavenko O, Calafiore R, Basta P, Vasconcellos AV, Emerich DF, Thanos C, Bimbra C.** Intraperitoneal alginate-encapsulated neonatal porcine islets in a placebo-controlled study with 16 diabetic cynomolgus primates. *Transplantation proceedings*. 2005; 37: 3505-8.
81. **Sigrist S, Mechine-Neuville A, Mandes K, Calenda V, Braun S, Legeay G, Bellocq JP, Pinget M, Kessler L.** Influence of VEGF on the viability of encapsulated pancreatic rat islets after transplantation in diabetic mice. *Cell transplantation*. 2003; 12: 627-35.
82. **Moya ML, Garfinkel MR, Liu X, Lucas S, Opara EC, Greisler HP, Brey EM.** Fibroblast growth factor-1 (FGF-1) loaded microbeads enhance local capillary neovascularization. *The Journal of surgical research*. 2010; 160: 208-12.
83. **Cartwright A, Wallymahmed M, Macfarlane IA, Wallymahmed A, Williams G, Gill GV.** The outcome of brittle type 1 diabetes--a 20 year study. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2011; 104: 575-9.
84. **Fiorina P, Venturini M, Folli F, Losio C, Maffi P, Placidi C, La Rosa S, Orsenigo E, Socci C, Capella C, Del Maschio A, Secchi A.** Natural history of kidney graft survival, hypertrophy, and vascular function in end-stage renal disease type 1 diabetic kidney-transplanted patients: beneficial impact of pancreas and successful islet cotransplantation. *Diabetes care*. 2005; 28: 1303-10.
85. **Ali NS, Walsh RM.** Total pancreatectomy with islet cell auto-transplantation: update and outcomes from major centers. *Current treatment options in gastroenterology*. 2014; 12: 350-8.
86. **Chinnakotla S, Radosevich DM, Dunn TB, Bellin MD, Freeman ML, Schwarzenberg SJ, Balamurugan AN, Wilhelm J, Bland B, Vickers SM, Beilman GJ, Sutherland DE, Pruett TL.** Long-term outcomes of total pancreatectomy and islet auto transplantation for hereditary/genetic pancreatitis. *Journal of the American College of Surgeons*. 2014; 218: 530-43.
87. **Bellin MD, Beilman GJ, Dunn TB, Pruett TL, Chinnakotla S, Wilhelm JJ, Ngo A, Radosevich DM, Freeman ML, Schwarzenberg SJ, Balamurugan AN, Hering BJ, Sutherland DE.** Islet

- autotransplantation to preserve beta cell mass in selected patients with chronic pancreatitis and diabetes mellitus undergoing total pancreatectomy. *Pancreas*. 2013; 42: 317-21.
88. **Bradbury RA, Shirkhedkar D, Glanville AR, Campbell LV.** Prior diabetes mellitus is associated with increased morbidity in cystic fibrosis patients undergoing bilateral lung transplantation: an 'orphan' area? A retrospective case-control study. *Internal medicine journal*. 2009; 39: 384-8.
 89. **Kessler L, Greget M, Metivier AC, Moreau F, Armanet M, Santelmo N, Massard G, Berney T, Kessler R.** Combined pancreatic islets-lung transplantation in cystic fibrosis-related diabetes: case reports. *Transplantation proceedings*. 2010; 42: 4338-40.
 90. **Marzorati S, Melzi R, Citro A, Cantarelli E, Mercalli A, Scavini M, Piemonti L.** Engraftment versus immunosuppression: cost-benefit analysis of immunosuppression after intrahepatic murine islet transplantation. *Transplantation*. 2014; 97: 1019-26.
 91. **Bruni A, Gala-Lopez B, Pepper AR, Abualhassan NS, Shapiro AJ.** Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2014; 7: 211-23.
 92. **Berney T, Buhler L, Caulfield A, Oberholzer J, Toso C, Alejandro R, Cooper DK, Ricordi C, Morel P.** Transplantation of islets of Langerhans: new developments. *Swiss medical weekly*. 2001; 131: 671-80.
 93. **Saidi RF, Bradley J, Greer D, Luskin R, O'Connor K, Delmonico F, Kennealey P, Pathan F, Schuetz C, Elias N, Ko DS, Kawai T, Hertl M, Cosimi AB, Markmann JF.** Changing pattern of organ donation at a single center: are potential brain dead donors being lost to donation after cardiac death? *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010; 10: 2536-40.
 94. **Lacy PE, Kostianovsky M.** Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 1967; 16: 35-9.
 95. **Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW.** Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. 1988; 37: 413-20.
 96. **Shimoda M, Itoh T, Sugimoto K, Iwahashi S, Takita M, Chujo D, Sorelle JA, Naziruddin B, Levy MF, Grayburn PA, Matsumoto S.** Improvement of collagenase distribution with the ductal preservation for human islet isolation. *Islets*. 2012; 4: 130-7.
 97. **Bucher P, Mathe Z, Bosco D, Andres A, Kurfuerst M, Ramsch-Gunther N, Buhler L, Morel P, Berney T.** Serva collagenase NB1: a new enzyme preparation for human islet isolation. *Transplantation proceedings*. 2004; 36: 1143-4.
 98. **Hilling DE, Bouwman E, Terpstra OT, Marang-van de Mheen PJ.** Effects of donor-, pancreas-, and isolation-related variables on human islet isolation outcome: a systematic review. *Cell transplantation*. 2014; 23: 921-8.
 99. **Wang Y, Danielson KK, Ropski A, Harvat T, Barbaro B, Paushter D, Qi M, Oberholzer J.** Systematic analysis of donor and isolation factor's impact on human islet yield and size distribution. *Cell transplantation*. 2013; 22: 2323-33.
 100. **Shimoda M, Noguchi H, Fujita Y, Takita M, Ikemoto T, Chujo D, Naziruddin B, Levy MF, Kobayashi N, Grayburn PA, Matsumoto S.** Improvement of porcine islet isolation by inhibition of trypsin activity during pancreas preservation and digestion using alpha1-antitrypsin. *Cell transplantation*. 2012; 21: 465-71.
 101. **Taylor MJ, Baicu S.** Non-enzymatic cryogenic isolation of therapeutic cells: Novel approach for enzyme-free isolation of pancreatic islets using In Situ cryopreservation of islets and concurrent selective freeze destruction of acinar tissue. *Cell transplantation*. 2013.
 102. **Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV.** Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England journal of medicine*. 2000; 343: 230-8.

103. **Naziruddin B, Wease S, Stablein D, Barton FB, Berney T, Rickels MR, Alejandro R.** HLA class I sensitization in islet transplant recipients: report from the Collaborative Islet Transplant Registry. *Cell transplantation*. 2012; 21: 901-8.
104. **Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, Matsumoto I, Ihm SH, Zhang HJ, Parkey J, Hunter DW, Sutherland DE.** Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2005; 293: 830-5.
105. **Shapiro AM.** Islet transplantation in type 1 diabetes: ongoing challenges, refined procedures, and long-term outcome. *The review of diabetic studies : RDS*. 2012; 9: 385-406.
106. **Bellin MD, Kandaswamy R, Parkey J, Zhang HJ, Liu B, Ihm SH, Ansite JD, Witson J, Bansal-Pakala P, Balamurugan AN, Papas KK, Sutherland DE, Moran A, Hering BJ.** Prolonged insulin independence after islet allotransplants in recipients with type 1 diabetes. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008; 8: 2463-70.
107. **Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, Oberholzer J, Odorico JS, Garfinkel MR, Levy M, Pattou F, Berney T, Secchi A, Messinger S, Senior PA, Maffi P, Posselt A, Stock PG, Kaufman DB, Luo X, Kandeel F, Cagliero E, Turgeon NA, Witkowski P, Naji A, O'Connell PJ, Greenbaum C, Kudva YC, Brayman KL, Aull MJ, Larsen C, Kay TW, Fernandez LA, Vantyghem MC, Bellin M, Shapiro AM.** Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes care*. 2012; 35: 1436-45.
108. **Gangemi A, Salehi P, Hatipoglu B, Martellotto J, Barbaro B, Kuechle JB, Qi M, Wang Y, Pallan P, Owens C, Bui J, West D, Kaplan B, Benedetti E, Oberholzer J.** Islet transplantation for brittle type 1 diabetes: the UIC protocol. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008; 8: 1250-61.
109. **Al-Adra DP, Gill RS, Imes S, O'Gorman D, Kin T, Axford SJ, Shi X, Senior PA, Shapiro AM.** Single-Donor Islet Transplantation and Long-term Insulin Independence in Select Patients With Type 1 Diabetes Mellitus. *Transplantation*. 2014.
110. **Koh A, Senior P, Salam A, Kin T, Imes S, Dinyari P, Malcolm A, Toso C, Nilsson B, Korsgren O, Shapiro AM.** Insulin-heparin infusions peritransplant substantially improve single-donor clinical islet transplant success. *Transplantation*. 2010; 89: 465-71.
111. **Noguchi H, Naziruddin B, Jackson A, Shimoda M, Ikemoto T, Fujita Y, Chujo D, Takita M, Peng H, Sugimoto K, Itoh T, Kobayashi N, Onaca N, Levy MF, Matsumoto S.** Fresh islets are more effective for islet transplantation than cultured islets. *Cell transplantation*. 2012; 21: 517-23.
112. **Webb MA, Dennison AR, James RF.** The potential benefit of non-purified islets preparations for islet transplantation. *Biotechnology & genetic engineering reviews*. 2012; 28: 101-14.
113. **Gatto C, Callegari M, Folini M, Conconi M, Paolin A, Di Falco G, Bredariol S, Spinazzi R, Parnigotto PP, Nussdorfer GG.** Effects of cryopreservation and coculture with pancreatic ductal epithelial cells on insulin secretion from human pancreatic islets. *International journal of molecular medicine*. 2003; 12: 851-4.
114. **Figliuzzi M, Bonandrini B, Silvani S, Remuzzi A.** Mesenchymal stem cells help pancreatic islet transplantation to control type 1 diabetes. *World journal of stem cells*. 2014; 6: 163-72.
115. **Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, Yang LJ.** In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes*. 2004; 53: 1721-32.
116. **Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y.** Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PloS one*. 2008; 3: e1886.
117. **Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F.** Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. 2007; 83: 71-6.

118. **Quaranta P, Antonini S, Spiga S, Mazzanti B, Curcio M, Mulas G, Diana M, Marzola P, Mosca F, Longoni B.** Co-transplantation of endothelial progenitor cells and pancreatic islets to induce long-lasting normoglycemia in streptozotocin-treated diabetic rats. *PLoS one*. 2014; 9: e94783.
119. **Nagata NA, Inoue K, Tabata Y.** Co-culture of extracellular matrix suppresses the cell death of rat pancreatic islets. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2002; 13: 579-90.
120. **Narang AS, Cheng K, Henry J, Zhang C, Sabek O, Fraga D, Kotb M, Gaber AO, Mahato RI.** Vascular endothelial growth factor gene delivery for revascularization in transplanted human islets. *Pharmaceutical research*. 2004; 21: 15-25.
121. **Langlois A, Bietiger W, Seyfritz E, Maillard E, Vivot K, Peronet C, Meyer N, Kessler L, Jeandidier N, Pinget M, Sigrist S.** Improvement of rat islet viability during transplantation: validation of pharmacological approach to induce VEGF overexpression. *Cell transplantation*. 2011; 20: 1333-42.
122. **Merani S, Toso C, Emamaullee J, Shapiro AM.** Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *The British journal of surgery*. 2008; 95: 1449-61.
123. **Jindal RM, Sidner RA, McDaniel HB, Johnson MS, Fineberg SE.** Intraportal vs kidney subcapsular site for human pancreatic islet transplantation. *Transplantation proceedings*. 1998; 30: 398-9.
124. **Barkai U, Weir GC, Colton CK, Ludwig B, Bornstein SR, Brendel MD, Neufeld T, Bremer C, Leon A, Evron Y, Yavriyants K, Azarov D, Zimmermann B, Maimon S, Shabtay N, Balyura M, Rozenshtein T, Vardi P, Bloch K, de Vos P, Rotem A.** Enhanced oxygen supply improves islet viability in a new bioartificial pancreas. *Cell transplantation*. 2013; 22: 1463-76.
125. **Ludwig B, Reichel A, Steffen A, Zimmerman B, Schally AV, Block NL, Colton CK, Ludwig S, Kersting S, Bonifacio E, Solimena M, Gendler Z, Rotem A, Barkai U, Bornstein SR.** Transplantation of human islets without immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110: 19054-8.
126. **Toso C, Vallee JP, Morel P, Ris F, Demuylder-Mischler S, Lepetit-Coiffe M, Marangon N, Saudek F, James Shapiro AM, Bosco D, Berney T.** Clinical magnetic resonance imaging of pancreatic islet grafts after iron nanoparticle labeling. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008; 8: 701-6.
127. **Eriksson O, Alavi A.** Imaging the islet graft by positron emission tomography. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2012; 39: 533-42.
128. **Pileggi A, Klein D, Fotino C, Bravo-Egana V, Rosero S, Doni M, Podetta M, Ricordi C, Molano RD, Pastori RL.** MicroRNAs in islet immunobiology and transplantation. *Immunologic research*. 2013; 57: 185-96.
129. **Berney T, Mamin A, James Shapiro AM, Ritz-Laser B, Brulhart MC, Toso C, Demuylder-Mischler S, Armanet M, Baertschiger R, Wojtusciszyn A, Benhamou PY, Bosco D, Morel P, Philippe J.** Detection of insulin mRNA in the peripheral blood after human islet transplantation predicts deterioration of metabolic control. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006; 6: 1704-11.
130. **Toti F, Bayle F, Berney T, Egelhofer H, Richard MJ, Greget M, Masson D, Zobairi F, Benhamou PY, Kessler L, group G.** Studies of circulating microparticle release in peripheral blood after pancreatic islet transplantation. *Transplantation proceedings*. 2011; 43: 3241-5.
131. **Itoh T, Iwahashi S, Kanak MA, Shimoda M, Takita M, Chujo D, Tamura Y, Rahman AM, Chung WY, Onaca N, Coates PT, Dennison AR, Naziruddin B, Levy MF, Matsumoto S.** Elevation of high-mobility group box 1 after clinical autologous islet transplantation and its inverse correlation with outcomes. *Cell transplantation*. 2014; 23: 153-65.
132. **Monti P, Scirpoli M, Maffi P, Ghidoli N, De Taddeo F, Bertuzzi F, Piemonti L, Falcone M, Secchi A, Bonifacio E.** Islet transplantation in patients with autoimmune diabetes induces

- homeostatic cytokines that expand autoreactive memory T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 1806-14.
133. **Posselt AM, Bellin MD, Tavakol M, Szot GL, Frassetto LA, Masharani U, Kerlan RK, Fong L, Vincenti FG, Hering BJ, Bluestone JA, Stock PG.** Islet transplantation in type 1 diabetics using an immunosuppressive protocol based on the anti-LFA-1 antibody efalizumab. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010; 10: 1870-80.
 134. **Benhamou PY, Milliat-Guittard L, Wojtuszczyz A, Kessler L, Toso C, Baertschiger R, Debaty I, Badet L, Penfornis A, Thivolet C, Renard E, Bayle F, Morel P, Morelon E, Colin C, Berney T, group G.** Quality of life after islet transplantation: data from the GRAGIL 1 and 2 trials. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2009; 26: 617-21.
 135. **Fiorina P, Gremizzi C, Maffi P, Caldara R, Tavano D, Monti L, Socci C, Folli F, Fazio F, Astorri E, Del Maschio A, Secchi A.** Islet transplantation is associated with an improvement of cardiovascular function in type 1 diabetic kidney transplant patients. *Diabetes care*. 2005; 28: 1358-65.
 136. **Fiorina P, Shapiro AM, Ricordi C, Secchi A.** The clinical impact of islet transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008; 8: 1990-7.
 137. **Lee TC, Barshe NR, O'Mahony CA, Nguyen L, Brunicardi FC, Ricordi C, Alejandro R, Schock AP, Mote A, Goss JA.** The effect of pancreatic islet transplantation on progression of diabetic retinopathy and neuropathy. *Transplantation proceedings*. 2005; 37: 2263-5.
 138. **Thompson DM, Meloche M, Ao Z, Paty B, Keown P, Shapiro RJ, Ho S, Worsley D, Fung M, Meneilly G, Begg I, Al Mehthel M, Kondi J, Harris C, Fensom B, Kozak SE, Tong SO, Trinh M, Warnock GL.** Reduced progression of diabetic microvascular complications with islet cell transplantation compared with intensive medical therapy. *Transplantation*. 2011; 91: 373-8.
 139. **Vantuyghem MC, Marcelli-Tourvieille S, Fermon C, Duhamel A, Raverdy V, Arnalsteen L, Kerr-Conte J, Noel C, Fontaine P, Pattou F.** Intraperitoneal insulin infusion versus islet transplantation: comparative study in patients with type 1 diabetes. *Transplantation*. 2009; 87: 66-71.
 140. **Gerber PA, Pavlicek V, Demartines N, Zuellig R, Pfammatter T, Wuthrich R, Weber M, Spinass GA, Lehmann R.** Simultaneous islet-kidney vs pancreas-kidney transplantation in type 1 diabetes mellitus: a 5 year single centre follow-up. *Diabetologia*. 2008; 51: 110-9.
 141. **Kanak MA, Takita M, Itoh T, Sorelle JA, Murali S, Kunnathodi F, Shahbazov R, Lawrence MC, Levy MF, Naziruddin B.** Alleviation of Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction in Autologous Conditions Through Treatment of Human Islets with NF-kappaB Inhibitors. *Transplantation*. 2014.
 142. **Eriksson O, Eich T, Sundin A, Tibell A, Tufveson G, Andersson H, Felldin M, Foss A, Kyllonen L, Langstrom B, Nilsson B, Korsgren O, Lundgren T.** Positron emission tomography in clinical islet transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009; 9: 2816-24.
 143. **Moberg L, Johansson H, Lukinius A, Berne C, Foss A, Kallen R, Ostraat O, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Elgue G, Nilsson Ekdahl K, Korsgren O, Nilsson B.** Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. *Lancet*. 2002; 360: 2039-45.
 144. **Fisher AJ, Donnelly SC, Hirani N, Haslett C, Strieter RM, Dark JH, Corris PA.** Elevated levels of interleukin-8 in donor lungs is associated with early graft failure after lung transplantation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001; 163: 259-65.
 145. **Shinichiro O, Kuroki T, Adachi T, Kosaka T, Okamoto T, Tanaka T, Tajima Y, Kanematsu T, Eguchi S.** The effect of selective neutrophil elastase inhibitor on pancreatic islet yields and functions in rat with hypercytokinemia. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society*. 2011; 16: 99-106.

146. **Kuhtreiber WM, Ho LT, Kamireddy A, Yacoub JA, Scharp DW.** Islet isolation from human pancreas with extended cold ischemia time. *Transplantation proceedings*. 2010; 42: 2027-31.
147. **Citro A, Cantarelli E, Piemonti L.** Anti-inflammatory strategies to enhance islet engraftment and survival. *Current diabetes reports*. 2013; 13: 733-44.
148. **Nano R, Racanicchi L, Melzi R, Mercalli A, Maffi P, Sordi V, Ling Z, Scavini M, Korsgren O, Celona B, Secchi A, Piemonti L.** Human pancreatic islet preparations release HMGB1: (ir)relevance for graft engraftment. *Cell transplantation*. 2013; 22: 2175-86.
149. **Kanak MA, Takita M, Kunnathodi F, Lawrence MC, Levy MF, Naziruddin B.** Inflammatory response in islet transplantation. *International journal of endocrinology*. 2014; 2014: 451035.
150. **Naziruddin B, Iwahashi S, Kanak MA, Takita M, Itoh T, Levy MF.** Evidence for instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical autologous islet transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014; 14: 428-37.
151. **Sigrist S, Oberholzer J, Bohbot A, Esposito G, Mandes K, Lamartine R, Toso C, Bucher P, Pinget M, Kessler L.** Activation of human macrophages by allogeneic islets preparations: inhibition by AOP-RANTES and heparinoids. *Immunology*. 2004; 111: 416-21.
152. **Matsuoka N, Itoh T, Watarai H, Sekine-Kondo E, Nagata N, Okamoto K, Mera T, Yamamoto H, Yamada S, Maruyama I, Taniguchi M, Yasunami Y.** High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120: 735-43.
153. **Coffey LC, Berman DM, Willman MA, Kenyon NS.** Immune cell populations in nonhuman primate islets. *Cell transplantation*. 2009; 18: 1213-22.
154. **Nilsson B, Ekdahl KN, Korsgren O.** Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment. *Current opinion in organ transplantation*. 2011; 16: 620-6.
155. **Ritis K, Doumas M, Mastellos D, Micheli A, Giaglis S, Magotti P, Rafail S, Kartalis G, Sideras P, Lambris JD.** A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *Journal of immunology*. 2006; 177: 4794-802.
156. **Johansson H, Lukinius A, Moberg L, Lundgren T, Berne C, Foss A, Felldin M, Kallen R, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Ekdahl KN, Elgue G, Korsgren O, Nilsson B.** Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005; 54: 1755-62.
157. **Moberg L, Olsson A, Berne C, Felldin M, Foss A, Kallen R, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Nilsson B, Korsgren O.** Nicotinamide inhibits tissue factor expression in isolated human pancreatic islets: implications for clinical islet transplantation. *Transplantation*. 2003; 76: 1285-8.
158. **Moberg L, Korsgren O, Nilsson B.** Neutrophilic granulocytes are the predominant cell type infiltrating pancreatic islets in contact with ABO-compatible blood. *Clinical and experimental immunology*. 2005; 142: 125-31.
159. **Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhakov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT, Engelmann B.** Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nature medicine*. 2010; 16: 887-96.
160. **Engelmann B, Massberg S.** Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2013; 13: 34-45.
161. **Martinod K, Wagner DD.** Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014; 123: 2768-76.
162. **Carestia A, Rivadeneyra L, Romaniuk MA, Fondevila C, Negrotto S, Schattner M.** Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation. *Thrombosis and haemostasis*. 2013; 110: 1035-45.

163. **Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, Dwivedi DJ, Mai SH, Weitz JI, Liaw PC.** Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014; 34: 1977-84.
164. **Grassle S, Huck V, Pappelbaum KI, Gorzelanny C, Aponte-Santamaria C, Baldauf C, Grater F, Schneppenheim R, Obser T, Schneider SW.** von Willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014; 34: 1382-9.
165. **Kim SS, Patel M, Yum K, Keyzner A.** Hematopoietic stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy: review of pharmacologic treatment options. *Transfusion*. 2014.
166. **Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Watanabe T, Sakamoto S, Kitano T, Kondo T, Kawabata H, Kadowaki N, Takaori-Kondo A.** Serum neutrophil extracellular trap levels predict thrombotic microangiopathy after allogeneic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2013; 19: 1683-9.
167. **Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, Apostolidou E, Skendros P, Girod A, Arelaki S, Froudarakis M, Nakopoulou L, Giatromanolaki A, Sidiropoulos P, Koffa M, Boumpas DT, Ritis K, Mitroulis I.** Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014; 73: 1854-63.
168. **Mercalli A, Sordi V, Ponzoni M, Maffi P, De Taddeo F, Gatti G, Servida P, Bernardi M, Bellio L, Bertuzzi F, Secchi A, Bonifacio E, Piemonti L.** Rapamycin induces a caspase-independent cell death in human monocytes. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006; 6: 1331-41.
169. **McCall M, Toso C, Emamaullee J, Pawlick R, Edgar R, Davis J, Maciver A, Kin T, Arch R, Shapiro AM.** The caspase inhibitor IDN-6556 (PF3491390) improves marginal mass engraftment after islet transplantation in mice. *Surgery*. 2011; 150: 48-55.
170. **McCall M, Pawlick R, Kin T, Shapiro AM.** Anakinra potentiates the protective effects of etanercept in transplantation of marginal mass human islets in immunodeficient mice. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012; 12: 322-9.
171. **Takita M, Matsumoto S, Shimoda M, Chujo D, Itoh T, Sorelle JA, Purcell K, Onaca N, Naziruddin B, Levy MF.** Safety and tolerability of the T-cell depletion protocol coupled with anakinra and etanercept for clinical islet cell transplantation. *Clinical transplantation*. 2012; 26: E471-84.
172. **Koulmanda M, Bhasin M, Fan Z, Hanidziar D, Goel N, Putheti P, Movahedi B, Libermann TA, Strom TB.** Alpha 1-antitrypsin reduces inflammation and enhances mouse pancreatic islet transplant survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109: 15443-8.
173. **Itoh T, Nitta T, Nishinakamura H, Kojima D, Mera T, Ono J, Kodama S, Yasunami Y.** HMGB1-Mediated Early Loss of Transplanted Islets Is Prevented by Anti-IL-6R Antibody in Mice. *Pancreas*. 2014.
174. **Johansson H, Goto M, Dufrane D, Siegbahn A, Elgue G, Gianello P, Korsgren O, Nilsson B.** Low molecular weight dextran sulfate: a strong candidate drug to block IBMIR in clinical islet transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006; 6: 305-12.
175. **Goto M, Johansson H, Maeda A, Elgue G, Korsgren O, Nilsson B.** Low-molecular weight dextran sulfate abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction induced by adult porcine islets both in vitro and in vivo. *Transplantation proceedings*. 2004; 36: 1186-7.
176. **Ozmen L, Ekdahl KN, Elgue G, Larsson R, Korsgren O, Nilsson B.** 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*. 2002; 51: 1779-84.
177. **Dwyer KM, Mysore TB, Crikis S, Robson SC, Nandurkar H, Cowan PJ, D'Apice AJ.** The transgenic expression of human CD39 on murine islets inhibits clotting of human blood. *Transplantation*. 2006; 82: 428-32.
 178. **Cabric S, Eich T, Sanchez J, Nilsson B, Korsgren O, Larsson R.** A new method for incorporating functional heparin onto the surface of islets of Langerhans. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2008; 14: 141-7.
 179. **Cabric S, Sanchez J, Lundgren T, Foss A, Felldin M, Kallen R, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Larsson R, Korsgren O, Nilsson B.** Islet surface heparinization prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation. *Diabetes*. 2007; 56: 2008-15.
 180. **Kim HI, Yu JE, Lee SY, Sul AY, Jang MS, Rashid MA, Park SG, Kim SJ, Park CG, Kim JH, Park KS.** The effect of composite pig islet-human endothelial cell grafts on the instant blood-mediated inflammatory reaction. *Cell transplantation*. 2009; 18: 31-7.
 181. **Beuneu C, Vosters O, Ling Z, Pipeleers D, Pradier O, Goldman M, Verhasselt V.** N-Acetylcysteine derivative inhibits procoagulant activity of human islet cells. *Diabetologia*. 2007; 50: 343-7.
 182. **Johansson U, Olsson A, Gabrielsson S, Nilsson B, Korsgren O.** Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; 308: 474-9.
 183. **Berman DM, Cabrera O, Kenyon NM, Miller J, Tam SH, Khandekar VS, Picha KM, Soderman AR, Jordan RE, Bugelski PJ, Horninger D, Lark M, Davis JE, Alejandro R, Berggren PO, Zimmerman M, O'Neil JJ, Ricordi C, Kenyon NS.** Interference with tissue factor prolongs intrahepatic islet allograft survival in a nonhuman primate marginal mass model. *Transplantation*. 2007; 84: 308-15.
 184. **Cui W, Wilson JT, Wen J, Angsana J, Qu Z, Haller CA, Chaikof EL.** Thrombomodulin improves early outcomes after intraportal islet transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009; 9: 1308-16.
 185. **Bennet W, Sundberg B, Lundgren T, Tibell A, Groth CG, Richards A, White DJ, Elgue G, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O.** Damage to porcine islets of Langerhans after exposure to human blood in vitro, or after intraportal transplantation to cynomolgus monkeys: protective effects of sCR1 and heparin. *Transplantation*. 2000; 69: 711-9.
 186. **Tokodai K, Goto M, Inagaki A, Nakanishi W, Ogawa N, Satoh K, Kawagishi N, Sekiguchi S, Nilsson B, Okada N, Okada H, Satomi S.** Attenuation of cross-talk between the complement and coagulation cascades by C5a blockade improves early outcomes after intraportal islet transplantation. *Transplantation*. 2010; 90: 1358-65.
 187. **Freyssinet JM.** Cellular microparticles: what are they bad or good for? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003; 1: 1655-62.
 188. **Morel O, Ohlmann P, Epailly E, Bakouboula B, Zobairi F, Jesel L, Meyer N, Chenard MP, Freyssinet JM, Bareiss P, Mazzucotelli JP, Toti F.** Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2008; 27: 38-45.
 189. **Hrachovinova I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, Kappelmayer J, Camphausen RT, Widom A, Xia L, Kazazian HH, Jr., Schaub RG, McEver RP, Wagner DD.** Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nature medicine*. 2003; 9: 1020-5.
 190. **Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, Zupan M, Canuet M, Grunebaum L, Brunette A, Desprez D, Chabot F, Weitzenblum E, Freyssinet JM, Chaouat A, Toti F.** Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary

- arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008; 177: 536-43.
191. **Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, Freyssinet JM.** The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *The Journal of clinical investigation*. 1997; 99: 1546-54.
 192. **Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Losche W.** Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thrombosis and haemostasis*. 2002; 88: 1033-8.
 193. **Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F.** Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011; 31: 15-26.
 194. **Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, Robert S, Lamy E, Plawinski L, Camoin-Jau L, Gurewich V, Angles-Cano E, Dignat-George F.** Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2007; 110: 2432-9.
 195. **Angles-Cano E, Vivien D, Strokavenir.** [Cellular microparticles, potential useful biomarkers in the identification of cerebrovascular accidents]. *Medecine sciences : M/S*. 2009; 25: 843-6.
 196. **Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C.** Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005; 25: 1512-8.
 197. **Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PC, Nogueira RM, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza PT, Bozza FA.** Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013; 11: 951-62.
 198. **Schock SC, Edrissi H, Burger D, Cadonic R, Hakim A, Thompson C.** Microparticles generated during chronic cerebral ischemia deliver proapoptotic signals to cultured endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014; 450: 912-7.
 199. **Hulsmans M, Holvoet P.** MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovascular research*. 2013; 100: 7-18.
 200. **Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F.** Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Seminars in immunopathology*. 2011; 33: 469-86.
 201. **Li L, Zhu D, Huang L, Zhang J, Bian Z, Chen X, Liu Y, Zhang CY, Zen K.** Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PLoS one*. 2012; 7: e46957.
 202. **Collier ME, Mah PM, Xiao Y, Maraveyas A, Ettelaie C.** Microparticle-associated tissue factor is recycled by endothelial cells resulting in enhanced surface tissue factor activity. *Thrombosis and haemostasis*. 2013; 110: 966-76.
 203. **Morel O, Toti F, Morel N, Freyssinet JM.** Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica*. 2009; 94: 313-7.
 204. **Dalli J, Norling LV, Renshaw D, Cooper D, Leung KY, Perretti M.** Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood*. 2008; 112: 2512-9.
 205. **Satta N, Freyssinet JM, Toti F.** The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *British journal of haematology*. 1997; 96: 534-42.
 206. **Boisrame-Helms J, Delabranche X, Degirmenci SE, Zobairi F, Berger A, Meyer G, Burban M, Mostefai HA, Levy B, Toti F, Meziani F.** Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats. *Thrombosis and haemostasis*. 2014; 111: 154-64.
 207. **Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH.** Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood*. 2005; 105: 1515-22.

208. **They C, Zitvogel L, Amigorena S.** Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews Immunology*. 2002; 2: 569-79.
209. **Devaux PF.** Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*. 1991; 30: 1163-73.
210. **Kunzelmann-Marche C, Freyssinet JM, Martinez MC.** Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity. Role of transient receptor potential channels and ERK pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277: 19876-81.
211. **Coleman JA, Quazi F, Molday RS.** Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. *Biochimica et biophysica acta*. 2013; 1831: 555-74.
212. **Daleke DL.** Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *Journal of lipid research*. 2003; 44: 233-42.
213. **Segawa K, Kurata S, Yanagihashi Y, Brummelkamp TR, Matsuda F, Nagata S.** Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science*. 2014; 344: 1164-8.
214. **Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM.** CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *Journal of immunology*. 1998; 161: 6250-7.
215. **Suzuki J, Nagata S.** Phospholipid scrambling on the plasma membrane. *Methods in enzymology*. 2014; 544: 381-93.
216. **Kunzelmann K, Nilius B, Owsianik G, Schreiber R, Ousingsawat J, Sirianant L, Wanitchakool P, Bevers EM, Heemskerk JW.** Molecular functions of anoctamin 6 (TMEM16F): a chloride channel, cation channel, or phospholipid scramblase? *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2014; 466: 407-14.
217. **Lhermusier T, Chap H, Payrastre B.** Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011; 9: 1883-91.
218. **Suzuki J, Denning DP, Imanishi E, Horvitz HR, Nagata S.** Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science*. 2013; 341: 403-6.
219. **Martinez MC, Freyssinet JM.** Deciphering the plasma membrane hallmarks of apoptotic cells: phosphatidylserine transverse redistribution and calcium entry. *BMC cell biology*. 2001; 2: 20.
220. **Munnix IC, Harmsma M, Giddings JC, Collins PW, Feijge MA, Comfurius P, Heemskerk JW, Bevers EM.** Store-mediated calcium entry in the regulation of phosphatidylserine exposure in blood cells from Scott patients. *Thrombosis and haemostasis*. 2003; 89: 687-95.
221. **Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B.** Calcium signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009; 7: 1057-66.
222. **Wolfs JL, Comfurius P, Rasmussen JT, Keuren JF, Lindhout T, Zwaal RF, Bevers EM.** Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2005; 62: 1514-25.
223. **Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF.** Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature cell biology*. 2001; 3: 339-45.
224. **Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, Solary E, Breard J.** Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *The Journal of experimental medicine*. 2005; 201: 465-71.
225. **Sapet C, Simoncini S, Loriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, Dignat-George F, Anfosso F.** Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood*. 2006; 108: 1868-76.
226. **Meshki J, Douglas SD, Hu M, Leeman SE, Tuluc F.** Substance P induces rapid and transient membrane blebbing in U373MG cells in a p21-activated kinase-dependent manner. *PloS one*. 2011; 6: e25332.

227. **Abid Hussein MN, Boing AN, Sturk A, Hau CM, Nieuwland R.** Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thrombosis and haemostasis*. 2007; 98: 1096-107.
228. **Sonnino S, Prinetti A.** Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Current medicinal chemistry*. 2013; 20: 4-21.
229. **Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA.** Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005; 106: 1604-11.
230. **Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borken C, Prohaska R.** Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood*. 2002; 99: 2569-77.
231. **Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, Nagata S, Rumbaut RE, Thiagarajan P.** Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood*. 2009; 113: 1332-9.
232. **Dasgupta SK, Le A, Chavakis T, Rumbaut RE, Thiagarajan P.** Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation*. 2012; 125: 1664-72.
233. **Willekens FL, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Dopp YA, van den Bos AG, Bosman GJ, van Berkel TJ.** Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*. 2005; 105: 2141-5.
234. **Rank A, Nieuwland R, Crispin A, Grutzner S, Iberer M, Toth B, Pihusch R.** Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets*. 2011; 22: 111-6.
235. **Flaumenhaft R.** Formation and fate of platelet microparticles. *Blood cells, molecules & diseases*. 2006; 36: 182-7.
236. **Rand ML, Wang H, Bang KW, Packham MA, Freedman J.** Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006; 4: 1621-3.
237. **Wang Y, Chen LM, Liu ML.** Microvesicles and diabetic complications--novel mediators, potential biomarkers and therapeutic targets. *Acta pharmacologica Sinica*. 2014; 35: 433-43.
238. **Kurtzman N, Zhang L, French B, Jonas R, Bantly A, Rogers WT, Moore JS, Rickels MR, Mohler ER, 3rd.** Personalized cytomic assessment of vascular health: Evaluation of the vascular health profile in diabetes mellitus. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2013; 84: 255-66.
239. **Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F.** Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes*. 2002; 51: 2840-5.
240. **Alkhatatbeh MJ, Enjeti AK, Acharya S, Thorne RF, Lincz LF.** The origin of circulating CD36 in type 2 diabetes. *Nutrition & diabetes*. 2013; 3: e59.
241. **Owens AP, 3rd, Passam FH, Antoniak S, Marshall SM, McDaniel AL, Rudel L, Williams JC, Hubbard BK, Dutton JA, Wang J, Tobias PS, Curtiss LK, Daugherty A, Kirchhofer D, Luyendyk JP, Moriarty PM, Nagarajan S, Furie BC, Furie B, Johns DG, Temel RE, Mackman N.** Monocyte tissue factor-dependent activation of coagulation in hypercholesterolemic mice and monkeys is inhibited by simvastatin. *The Journal of clinical investigation*. 2012; 122: 558-68.
242. **Sim D, Flaumenhaft R, Furie B, Furie B.** Interactions of platelets, blood-borne tissue factor, and fibrin during arteriolar thrombus formation in vivo. *Microcirculation*. 2005; 12: 301-11.
243. **Cimmino G, D'Amico C, Vaccaro V, D'Anna M, Golino P.** The missing link between atherosclerosis, inflammation and thrombosis: is it tissue factor? *Expert review of cardiovascular therapy*. 2011; 9: 517-23.
244. **Feng B, Chen Y, Luo Y, Chen M, Li X, Ni Y.** Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2010; 208: 264-9.

245. **Shouzu A, Nomura S, Omoto S, Hayakawa T, Nishikawa M, Iwasaka T.** Effect of ticlopidine on monocyte-derived microparticles and activated platelet markers in diabetes mellitus. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2004; 10: 167-73.
246. **Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM.** Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Current opinion in hematology*. 2004; 11: 156-64.
247. **Terrisse AD, Puech N, Allart S, Gourdy P, Xuereb JM, Payrastre B, Sie P.** Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010; 8: 2810-9.
248. **Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS.** Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004; 286: H1910-5.
249. **Martin S, Tesse A, Hugel B, Martinez MC, Morel O, Freyssinet JM, Andriantsitohaina R.** Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation*. 2004; 109: 1653-9.
250. **Jansen F, Yang X, Franklin BS, Hoelscher M, Schmitz T, Bedorf J, Nickenig G, Werner N.** High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovascular research*. 2013; 98: 94-106.
251. **Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V.** Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *The American journal of pathology*. 2002; 160: 673-80.
252. **Li J, Zhang Y, Liu Y, Dai X, Li W, Cai X, Yin Y, Wang Q, Xue Y, Wang C, Li D, Hou D, Jiang X, Zhang J, Zen K, Chen X, Zhang CY.** Microvesicle-mediated transfer of microRNA-150 from monocytes to endothelial cells promotes angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288: 23586-96.
253. **Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, Wenzel D, Vosen S, Franklin BS, Fleischmann BK, Nickenig G, Werner N.** Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation*. 2013; 128: 2026-38.
254. **Ogata N, Nomura S, Shouzu A, Imaizumi M, Arichi M, Matsumura M.** Elevation of monocyte-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. *Diabetes research and clinical practice*. 2006; 73: 241-8.
255. **Chahed S, Leroyer AS, Benzerroug M, Gaucher D, Georgescu A, Picaud S, Silvestre JS, Gaudric A, Tedgui A, Massin P, Boulanger CM.** Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes*. 2010; 59: 694-701.
256. **Sun AL, Deng JT, Guan GJ, Chen SH, Liu YT, Cheng J, Li ZW, Zhuang XH, Sun FD, Deng HP.** Dipeptidyl peptidase-IV is a potential molecular biomarker in diabetic kidney disease. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*. 2012; 9: 301-8.
257. **Schuerholz T, Weissig A, Juettner B, Becker T, Scheinichen D.** Ex vivo microvesicle formation after prolonged ischemia in renal transplantation. *Thrombosis research*. 2007; 120: 231-6.
258. **Garcia S, Chirinos J, Jimenez J, Del Carpio Munoz F, Canoniero M, Jy W, Jimenez J, Horstman L, Ahn Y.** Phenotypic assessment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: switch from cell activation to apoptosis. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2005; 24: 2184-9.
259. **Qamri Z, Pelletier R, Foster J, Kumar S, Momani H, Ware K, Von Visger J, Satoskar A, Nadasdy T, Brodsky SV.** Early posttransplant changes in circulating endothelial microparticles in patients with kidney transplantation. *Transplant immunology*. 2014; 31: 60-4.
260. **Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, Arnaud L, Loundou A, Robert S, Moal V, Berland Y, Dignat-George F, Camoin-Jau L.** Kidney transplantation decreases the level and

- procoagulant activity of circulating microparticles. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009; 9: 550-7.
261. **Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, Widemann A, Arnaud L, Loundou A, Robert S, Berland Y, Dignat-George F, Camoin-Jau L.** Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008; 8: 2360-7.
262. **Renner B, Klawitter J, Goldberg R, McCullough JW, Ferreira VP, Cooper JE, Christians U, Thurman JM.** Cyclosporine induces endothelial cell release of complement-activating microparticles. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013; 24: 1849-62.
263. **Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, Tetta C, Camussi G.** Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PloS one*. 2010; 5: e11803.
264. **Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, Salto-Tellez M, Timmers L, Lee CN, El Oakley RM, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Lim SK.** Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*. 2010; 4: 214-22.
265. **Choi HY, Moon SJ, Ratliff BB, Ahn SH, Jung A, Lee M, Lee S, Lim BJ, Kim BS, Plotkin MD, Ha SK, Park HC.** Microparticles from kidney-derived mesenchymal stem cells act as carriers of proangiogenic signals and contribute to recovery from acute kidney injury. *PloS one*. 2014; 9: e87853.
266. **Cantaluppi V, Biancone L, Figliolini F, Beltramo S, Medica D, Deregibus MC, Galimi F, Romagnoli R, Salizzoni M, Tetta C, Segoloni GP, Camussi G.** Microvesicles derived from endothelial progenitor cells enhance neoangiogenesis of human pancreatic islets. *Cell transplantation*. 2012; 21: 1305-20.
267. **Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D.** Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovascular research*. 2005; 67: 30-8.
268. **Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Biancone L, Tetta C, Camussi G.** Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney international*. 2012; 82: 412-27.
269. **Dejouvencel T, Doeuve L, Lacroix R, Plawinski L, Dignat-George F, Lijnen HR, Angles-Cano E.** Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood*. 2010; 115: 2048-56.
270. **Plawinski L, Angles-Cano E.** Membrane microvesicles: a circulating source for fibrinolysis, new antithrombotic messengers. *Haematologica*. 2013; 98: e75-6.
271. **Warshofsky MK, Dominguez M, Eisenberg MS, Wasserman HS, Sciacca R, Wang W, Simon AD, Morse JH, Schwartz A, Angles-Cano E, Rabbani LE.** Elevated plasma tissue plasminogen activator and anti-THP-1 antibodies are independently associated with decreased graft survival in cardiac transplant recipients. *The American journal of cardiology*. 2001; 88: 30-4.
272. **Shimoda M, Kanda Y, Hamamoto S, Tawaramoto K, Hashiramoto M, Matsuki M, Kaku K.** The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide preserves pancreatic beta cells via regulation of cell kinetics and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 2011; 54: 1098-108.
273. **Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR.** A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*. 1996; 379: 69-72.
274. **Ashcroft FM, Rorsman P, Trube G.** Single calcium channel activity in mouse pancreatic beta-cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1989; 560: 410-2.
275. **Jing X, Li DQ, Olofsson CS, Salehi A, Surve VV, Caballero J, Ivarsson R, Lundquist I, Pereverzev A, Schneider T, Rorsman P, Renstrom E.** CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *The Journal of clinical investigation*. 2005; 115: 146-54.

276. **Thorens B.** Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1992; 89: 8641-5.
277. **Kang G, Joseph JW, Chepurny OG, Monaco M, Wheeler MB, Bos JL, Schwede F, Genieser HG, Holz GG.** Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry.* 2003; 278: 8279-85.
278. **MacDonald PE, Wang X, Xia F, El-kholy W, Targonsky ED, Tsushima RG, Wheeler MB.** Antagonism of rat beta-cell voltage-dependent K⁺ currents by exendin 4 requires dual activation of the cAMP/protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *The Journal of biological chemistry.* 2003; 278: 52446-53.
279. **Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D.** Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Molecular cell.* 2001; 7: 1153-63.
280. **Zhao L, Guo H, Chen H, Petersen RB, Zheng L, Peng A, Huang K.** Effect of Liraglutide on endoplasmic reticulum stress in diabetes. *Biochemical and biophysical research communications.* 2013; 441: 133-8.
281. **Younce CW, Burmeister MA, Ayala JE.** Exendin-4 attenuates high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress and activation of SERCA2a. *American journal of physiology Cell physiology.* 2013; 304: C508-18.
282. **Wang MD, Huang Y, Zhang GP, Mao L, Xia YP, Mei YW, Hu B.** Exendin-4 improved rat cortical neuron survival under oxygen/glucose deprivation through PKA pathway. *Neuroscience.* 2012; 226: 388-96.
283. **Sharma S, Mells JE, Fu PP, Saxena NK, Anania FA.** GLP-1 analogs reduce hepatocyte steatosis and improve survival by enhancing the unfolded protein response and promoting macroautophagy. *PLoS one.* 2011; 6: e25269.
284. **Liang CP, Han S, Li G, Tabas I, Tall AR.** Impaired MEK signaling and SERCA expression promote ER stress and apoptosis in insulin-resistant macrophages and are reversed by exenatide treatment. *Diabetes.* 2012; 61: 2609-20.
285. **Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S.** Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes.* 1999; 48: 2270-6.
286. **Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B.** Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes.* 2002; 51: 1443-52.
287. **Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM.** Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes.* 2000; 49: 741-8.
288. **Gomez E, Pritchard C, Herbert TP.** cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated calcium channels mediate Raf-independent activation of extracellular regulated kinase in response to glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry.* 2002; 277: 48146-51.
289. **Garber AJ.** Long-acting glucagon-like peptide 1 receptor agonists: a review of their efficacy and tolerability. *Diabetes care.* 2011; 34 Suppl 2: S279-84.
290. **Barnett AH.** Lixisenatide: evidence for its potential use in the treatment of type 2 diabetes. *Core evidence.* 2011; 6: 67-79.
291. **Dharmalingam M, Sriram U, Baruah MP.** Liraglutide: A review of its therapeutic use as a once daily GLP-1 analog for the management of type 2 diabetes mellitus. *Indian journal of endocrinology and metabolism.* 2011; 15: 9-17.
292. **Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, Schmidt WE, Montanya E, Brett JH, Zychma M, Blonde L, Group L-S.** Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week

- randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet*. 2009; 374: 39-47.
293. **Varanasi A, Bellini N, Rawal D, Vora M, Makdissi A, Dhindsa S, Chaudhuri A, Dandona P.** Liraglutide as additional treatment for type 1 diabetes. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2011; 165: 77-84.
294. **Kielgast U, Krarup T, Holst JJ, Madsbad S.** Four weeks of treatment with liraglutide reduces insulin dose without loss of glycemic control in type 1 diabetic patients with and without residual beta-cell function. *Diabetes care*. 2011; 34: 1463-8.
295. **Deiss D, Diederich S, Kordonouri O.** [Successful treatment with liraglutide in type 1 diabetes and MODY]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 2011; 136: 1116-20.
296. **Kuhadiya ND, Malik R, Bellini NJ, Patterson JL, Traina A, Makdissi A, Dandona P.** Liraglutide as additional treatment to insulin in obese patients with type 1 diabetes mellitus. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2013; 19: 963-7.
297. **Park YJ, Ao Z, Kieffer TJ, Chen H, Safikhani N, Thompson DM, Meloche M, Warnock GL, Marzban L.** The glucagon-like peptide-1 receptor agonist exenatide restores impaired pro-islet amyloid polypeptide processing in cultured human islets: implications in type 2 diabetes and islet transplantation. *Diabetologia*. 2013; 56: 508-19.
298. **Cechin SR, Perez-Alvarez I, Fenjves E, Molano RD, Pileggi A, Berggren PO, Ricordi C, Pastori RL.** Anti-inflammatory properties of exenatide in human pancreatic islets. *Cell transplantation*. 2012; 21: 633-48.
299. **Krasner NM, Ido Y, Ruderman NB, Cacicedo JM.** Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide inhibits endothelial cell inflammation through a calcium and AMPK dependent mechanism. *PLoS one*. 2014; 9: e97554.
300. **Padmasekar M, Lingwal N, Samikannu B, Chen C, Sauer H, Linn T.** Exendin-4 protects hypoxic islets from oxidative stress and improves islet transplantation outcome. *Endocrinology*. 2013; 154: 1424-33.
301. **Wang L, Liu Y, Yang J, Zhao H, Ke J, Tian Q, Zhang L, Wen J, Wei R, Hong T.** GLP-1 analogue liraglutide enhances proinsulin processing in pancreatic beta-cells via a PKA-dependent pathway. *Endocrinology*. 2014: en20141218.
302. **Toso C, McCall M, Emamaullee J, Merani S, Davis J, Edgar R, Pawlick R, Kin T, Knudsen LB, Shapiro AM.** Liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide 1 analogue, improves human islet survival in culture. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2010; 23: 259-65.
303. **Zhao X, Tang YG, Wu SV, Wang C, Perfetti R, Khoury N, Cai D, He F, Su X, Go VL, Hui H.** The global transcriptional response of isolated human islets of langerhans to glucagon-like Peptide-1 receptor agonist liraglutide. *ISRN endocrinology*. 2012; 2012: 608672.
304. **Emamaullee JA, Merani S, Toso C, Kin T, Al-Saif F, Truong W, Pawlick R, Davis J, Edgar R, Lock J, Bonner-Weir S, Knudsen LB, Shapiro AM.** Porcine marginal mass islet autografts resist metabolic failure over time and are enhanced by early treatment with liraglutide. *Endocrinology*. 2009; 150: 2145-52.
305. **Merani S, Truong W, Emamaullee JA, Toso C, Knudsen LB, Shapiro AM.** Liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide 1 analog, improves glucose homeostasis in marginal mass islet transplantation in mice. *Endocrinology*. 2008; 149: 4322-8.
306. **Nishimura R, Ushiyama A, Sekiguchi S, Fujimori K, Ohuchi N, Satomi S, Goto M.** Effects of glucagon-like peptide 1 analogue on the early phase of revascularization of transplanted pancreatic islets in a subcutaneous site. *Transplantation proceedings*. 2013; 45: 1892-4.
307. **Toyoda K, Okitsu T, Yamane S, Uonaga T, Liu X, Harada N, Uemoto S, Seino Y, Inagaki N.** GLP-1 receptor signaling protects pancreatic beta cells in intraportal islet transplant by inhibiting apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008; 367: 793-8.

308. **Gaspari T, Welungoda I, Widdop RE, Simpson RW, Dear AE.** The GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits progression of vascular disease via effects on atherogenesis, plaque stability and endothelial function in an ApoE(-/-) mouse model. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*. 2013; 10: 353-60.
309. **Ban K, Kim KH, Cho CK, Sauve M, Diamandis EP, Backx PH, Drucker DJ, Husain M.** Glucagon-like peptide (GLP)-1(9-36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin(9-39) yet does not require the known GLP-1 receptor. *Endocrinology*. 2010; 151: 1520-31.
310. **Matsuda T, Omori K, Vuong T, Pascual M, Valiente L, Ferreri K, Todorov I, Kuroda Y, Smith CV, Kandeel F, Mullen Y.** Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005; 5: 484-93.
311. **Cardozo AK, Proost P, Gysemans C, Chen MC, Mathieu C, Eizirik DL.** IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. *Diabetologia*. 2003; 46: 255-66.
312. **Hindlycke H, Lu T, Welsh N.** Cytokine-induced human islet cell death in vitro correlates with a persistently high phosphorylation of STAT-1, but not with NF-kappaB activation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012; 418: 845-50.
313. **Cardozo AK, Kruhoffer M, Leeman R, Orntoft T, Eizirik DL.** Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. *Diabetes*. 2001; 50: 909-20.
314. **Zhao L, Guo H, Chen H, Petersen RB, Zheng L, Peng A, Huang K.** Effect of Liraglutide on endoplasmic reticulum stress in diabetes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013.
315. **Curtis AM, Wilkinson PF, Gui M, Gales TL, Hu E, Edelberg JM.** p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009; 7: 701-9.
316. **Ahlkvist L, Brown K, Ahren B.** Upregulated insulin secretion in insulin-resistant mice: evidence of increased islet GLP1 receptor levels and GPR119-activated GLP1 secretion. *Endocrine connections*. 2013; 2: 69-78.
317. **Shao S, Nie M, Chen C, Chen X, Zhang M, Yuan G, Yu X, Yang Y.** Protective action of liraglutide in beta cells under lipotoxic stress via PI3K/Akt/FoxO1 pathway. *Journal of cellular biochemistry*. 2014; 115: 1166-75.
318. **Schwasinger-Schmidt T, Robbins DC, Williams SJ, Novikova L, Stehno-Bittel L.** Long-term liraglutide treatment is associated with increased insulin content and secretion in beta-cells, and a loss of alpha-cells in ZDF rats. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2013; 76: 58-66.
319. **Xia F, Leung YM, Gaisano G, Gao X, Chen Y, Fox JE, Bhattacharjee A, Wheeler MB, Gaisano HY, Tsushima RG.** Targeting of voltage-gated K⁺ and Ca²⁺ channels and soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins to cholesterol-rich lipid rafts in pancreatic alpha-cells: effects on glucagon stimulus-secretion coupling. *Endocrinology*. 2007; 148: 2157-67.
320. **Yoshida M, Dezaki K, Uchida K, Kodera S, Lam NV, Ito K, Rita RS, Yamada H, Shimomura K, Ishikawa SE, Sugawara H, Kawakami M, Tominaga M, Yada T, Kakei M.** Involvement of cAMP-EPAC-TRPM2 activation in glucose- and incretin-induced insulin secretion. *Diabetes*. 2014.
321. **Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefler J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M.** Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*. 2008; 117: 2340-50.

322. **Sampson SR, Bucris E, Horovitz-Fried M, Parnas A, Kahana S, Abitbol G, Chetboun M, Rosenzweig T, Brodie C, Frankel S.** Insulin increases H₂O₂-induced pancreatic beta cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2010; 15: 1165-76.
323. **Ding Y, Zhang ZF, Dai XQ, Li Y.** Myricetin protects against cytokine-induced cell death in RIN-m5f beta cells. *Journal of medicinal food*. 2012; 15: 733-40.
324. **Constantinescu AA, Gleizes C, Alhosen M, Yala E, Zobairi F, Leclercq A, Stoian G, Mitrea IL, Prevost G, Toti F, Kessler L.** Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2014; 13: 219-26.
325. **Rao AK, Freishtat RJ, Jalagadugula G, Singh A, Mao G, Wiles A, Cheung P, Boden G.** Alterations in insulin-signaling and coagulation pathways in platelets during hyperglycemia-hyperinsulinemia in healthy non-diabetic subject. *Thrombosis research*. 2014; 134: 704-10.
326. **Uchida Y, Takeshita K, Yamamoto K, Kikuchi R, Nakayama T, Nomura M, Cheng XW, Egashira K, Matsushita T, Nakamura H, Murohara T.** Stress augments insulin resistance and prothrombotic state: role of visceral adipose-derived monocyte chemoattractant protein-1. *Diabetes*. 2012; 61: 1552-61.
327. **Abid Hussein MN, Nieuwland R, Hau CM, Evers LM, Meesters EW, Sturk A.** Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005; 3: 888-96.
328. **Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Koppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C.** Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Science signaling*. 2009; 2: ra81.
329. **Qi P, Du X.** The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2013; 26: 155-65.
330. **Xia F, Gao X, Kwan E, Lam PP, Chan L, Sy K, Sheu L, Wheeler MB, Gaisano HY, Tsushima RG.** Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279: 24685-91.
331. **Siljander P, Farndale RW, Feijge MA, Comfurius P, Kos S, Bevers EM, Heemskerk JW.** Platelet adhesion enhances the glycoprotein VI-dependent procoagulant response: Involvement of p38 MAP kinase and calpain. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001; 21: 618-27.
332. **Kang KH, Lee KH, Kim MY, Choi KH.** Caspase-3-mediated cleavage of the NF-kappa B subunit p65 at the NH₂ terminus potentiates naphthoquinone analog-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276: 24638-44.
333. **Huang Y, Li X, Wang Y, Wang H, Huang C, Li J.** Endoplasmic reticulum stress-induced hepatic stellate cell apoptosis through calcium-mediated JNK/P38 MAPK and Calpain/Caspase-12 pathways. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014; 394: 1-12.
334. **Samad F, Ruf W.** Inflammation, obesity, and thrombosis. *Blood*. 2013; 122: 3415-22.
335. **Kunzelmann-Marche C, Satta N, Toti F, Zhang Y, Nawroth PP, Morrissey JH, Freyssinet JM.** The influence exerted by a restricted phospholipid microenvironment on the expression of tissue factor activity at the cell plasma membrane surface. *Thrombosis and haemostasis*. 2000; 83: 282-9.
336. **Zhang M, Robitaille M, Showalter AD, Huang X, Liu Y, Bhattacharjee A, Willard FS, Han J, Froese S, Wei L, Gaisano HY, Angers S, Sloop KW, Dai FF, Wheeler MB.** Progesterone receptor membrane component 1 is a functional part of the GLP-1 receptor complex in pancreatic beta cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2014.
337. **Schelshorn D, Joly F, Mutel S, Hampe C, Breton B, Mutel V, Lutjens R.** Lateral allosterism in the glucagon receptor family: glucagon-like peptide 1 induces G-protein-coupled receptor heteromer formation. *Molecular pharmacology*. 2012; 81: 309-18.

338. **Harikumar KG, Wootten D, Pinon DI, Koole C, Ball AM, Furness SG, Graham B, Dong M, Christopoulos A, Miller LJ, Sexton PM.** Glucagon-like peptide-1 receptor dimerization differentially regulates agonist signaling but does not affect small molecule allostery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109: 18607-12.
339. **Finn NA, Eapen D, Manocha P, Al Kassem H, Lassegue B, Ghasemzadeh N, Quyyumi A, Searles CD.** Coronary heart disease alters intercellular communication by modifying microparticle-mediated microRNA transport. *FEBS letters*. 2013; 587: 3456-63.
340. **Orozco AF, Lewis DE.** Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2010; 77: 502-14.
341. **Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH.** The cytoprotective protein C pathway. *Blood*. 2007; 109: 3161-72.

ANNEXES

Original Article

Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis

Andrei Alexandru Constantinescu^{a,b}, Céline Gleizes^a, Mahmoud Alhosin^c, Elhassan Yala^a,
Fatiha Zobairi^a, Alexandre Leclercq^d, Gheorghe Stoian^e, Ioan Liviu Mitrea^b, Gilles Prévost^f,
Florence Toti^{c,g,1}, Laurence Kessler^{a,h,*},¹

^a EA7293, Vascular and Tissular Stress in Transplantation, Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, 74 route du Rhin, F-67401 Illkirch, Strasbourg, France

^b Department of Parasitology and Parasitic Diseases and Animal Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Agronomical Sciences and Veterinary Medicine, 105 spl. Independentei, sector 5, 050097 Bucharest, Romania

^c UMR7213 CNRS, Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, 74 route du Rhin, F-67401 Illkirch, France

^d Department of Pneumology, University Hospital, 1 place de L'hôpital, CHU de Strasbourg, BP426, 67091 Strasbourg Cedex, France

^e Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Bucharest, 91-95 spl. Independentei, sector 5, 050095 Bucharest, Romania

^f EA7290 Early Bacterial Virulence, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France

^g Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, 74 route du Rhin, F-67401 Illkirch, France

^h Department of Diabetology, University Hospital, 1 place de l'Hôpital, CHU de Strasbourg, BP421, 67091 Strasbourg Cedex, France

Received 15 July 2013; received in revised form 26 August 2013; accepted 30 August 2013

Available online 2 October 2013

Abstract

Background: Diabetes in cystic fibrosis (CF) is a result of exocrine pancreas alteration followed by endocrine dysfunction at a later stage. Microparticles (MPs) are plasma membrane fragments shed from stimulated or damaged cells that act as cellular effectors. Our aim was to identify a new form of interaction between exocrine and endocrine pancreatic cells mediated by exocrine MPs, in the context of recurrent infection in CF. **Methods:** MPs from either human exocrine CFTR Δ F508-mutated (CFPAC-1) cells or exocrine normal pancreatic (PANC-1) cells were collected after treatment by LPS from *Pseudomonas aeruginosa* and applied to rat endocrine normal insulin-secreting RIN-m5F cells. MP membrane integration in target cells was established by confocal microscopy and flow cytometry using PKH26 lipid probe. Apoptosis, lysosomal activity, insulin secretion were measured after 18 h. MP-mediated NF- κ B activation was measured in HEK-Blue reporter cells by SEAP reporter gene system and in RIN-m5F cells by Western blot. In endocrine normal cells, CFTR inhibition was achieved using Inhibitor-172.

Results: Compared to PANC-1, MPs from CFPAC-1 significantly reduced insulin secretion and lysosomal activity in RIN-m5F. MPs induced NF- κ B activation by increasing the level of I κ B phosphorylation. Moreover, the inhibition of NF- κ B activation using specific inhibitors was associated with a restored insulin secretion. Interestingly, CFTR inhibition in normal RIN-m5F cells promoted apoptosis and decreased insulin secretion. **Conclusions:** During recurrent infections associated with CF, exocrine MPs may contribute to endocrine cell dysfunction via NF- κ B pathways. Membrane CFTR dysfunction is associated with decreased insulin secretion.

© 2013 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Insulin secretion; Cystic fibrosis-related diabetes; Membrane microparticles; NF- κ B

* Corresponding author at: Department of Diabetology, 1 place de l'Hôpital, Clinique Médicale B, CHU de Strasbourg, BP421, 67091 Strasbourg Cedex, France. Tel.: +33 03 88 11 62 67; fax: +33 03 88 11 67 51.

E-mail addresses: kessler@unistra.fr, Laurence.Kessler@chru-strasbourg.fr (L. Kessler).

¹ Contributed equally to this work.

1. Introduction

One of the most important complication in cystic fibrosis (CF) patients is the bacterial colonization of airways favored by the over-consistent mucosa. Infection by *Staphylococcus aureus* occurs at early age and approximately 70% of CF patients are

infected by *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) after the age of 20. In most of cases, infection becomes recurrent, leading to progressive lung destruction and respiratory failure [1].

Due to constant improvement in therapy, life expectancy in CF sufferers has increased dramatically. However, patients now live long enough to develop one morbid consequence of CF: CF-related diabetes (CFRD) that has been associated with a nearly 6-fold greater mortality rate [2]. This specific form of diabetes is characterized by impaired first-phase insulin and C-peptide secretion, in association with pancreatic insufficiency as a consequence of the exocrine fibrosis. Exocrine pancreatic insufficiency affects about 85% to 90% of CF patients [3]. CFRD prevalence reaches almost 50% of adults over 40 years [4]. Multiple pancreatic dysfunctions like islet destruction linked to exocrine condition, insulin resistance, decreased secretion of glucagon-like peptide (GLP-1) and inefficient gastric inhibitory peptide (GIP) have been reported in CF [2].

CFTR Δ F508 is the most common mutation in CF patients with typical retention of CFTR protein in the Endoplasmic Reticulum [5]. CFTR is a cyclic AMP-regulated ion channel responsible for the chloride ion transport across epithelial cell surface. Other functions of CFTR in the metabolism balance [6] or in the defense against *P. aeruginosa* endotoxin [7] have also been described. CFTR dysfunction mainly leads to excessive viscosity of epithelial secretions, causing the obstruction and damage in many organs, including the exocrine pancreas [3]. In a previous work from the laboratory, CFTR Δ F508 mutation was associated with exaggerated apoptosis [8].

Microparticles (MPs) are submicronic plasma membrane fragments released from stressed cells that carry membrane and bioactive proteins from the parental cell. MPs behave as true intercellular shuttles disseminating signals to neighboring or distant target cells. Mechanisms of such interactions are not fully deciphered. In clinical issues, elevated plasma concentration of MPs is associated with thrombotic disorders, inflammation, or degenerative diseases [9,10]. Recently, MPs from the sputum of CF patients were found deleterious when injected in mice [11].

Because apoptosis is associated with plasma membrane remodeling and shedding of MPs [8], we questioned their role in the cross-talk between exocrine and endocrine cells. The aim of the present work was to decipher the incidence of CFTR deficiency on insulin secreted by endocrine cells and, if so, to determine how MPs mediate interactions between exocrine and endocrine pancreas in the context of CF recurrent infections with *P. aeruginosa*.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

Human pancreatic exocrine cell lines PANC-1 (CRL-1469TM) and CFPAC-1 (CRL-1918TM) presenting the CFTR Δ F508 mutation were purchased from ATCC (Manassas, USA) and grown as recommended by manufacturer in DMEM and IMDM respectively, with 4.5% glucose, 1% penicillin and 1% streptomycin. Rat insulin-secreting β -cell line RIN-m5F (CRL-11605TM)

was grown in RPMI 1640 containing 4.5% glucose, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 0.2% gentamicin. Cell media were purchased from PANTM Biotech GmbH (Aidenbach, Germany).

Secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) reporter cell lines HEK-BlueTM were grown as recommended by manufacturer (InvivoGen, San Diego, USA) in DMEM, 0.5% penicillin, 0.2% NormocinTM. HEK-hTLR4 initiate Nuclear Factor-kappaB (NF- κ B) pathway in response to LPS binding to TLR4, while HEK-Null2 lack TLR4 receptor. After at least three passages, selection antibiotics were applied: 100 μ g/mL ZeocinTM for HEK-Null2 cells and 4 μ L/mL of 250-fold concentrated HEK-BlueTM Selection stock solution for control HEK-hTLR4. All cells were grown in 10% FBS-supplemented media and incubated in 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.

2.2. Inhibitors and pharmacological agents

In non-mutated cells, the inhibition of CFTR activity at membrane surface was achieved after 18 h (RIN-m5F) or 24 h (PANC-1) treatment by 5–25 μ M Inhibitor-172 (Inh-172). Inhibition of NF- κ B pathways was achieved using 10 μ M Interleukin-1 Receptor-Associated-Kinase-1/4 Inhibitor (IRAKi) or 10 μ M (5Z)-7-Oxozeanol, *Curvularia* sp. (TAK-1i), a potent ATP-competitive irreversible inhibitor of ERK2, TAK-1 (MKK7) and MEK1. All inhibitors were purchased from Calbiochem® (Billerica, USA). Lipopolysaccharide (LPS) from *P. aeruginosa* (serotype 10²², ATCC 27316 strain) was purchased from Sigma (St. Louis, USA).

2.3. Microparticle production

MPs were produced in vitro and collected from 1 μ g/mL LPS-treated exocrine cells after 24 h. In some experiments, MPs from PANC-1 cells treated by additional 5 μ M CFTRi were collected. MPs were isolated from cell conditioned medium by sequential centrifugation steps under sterile conditions. Cells and debris were first discarded by a 2-step 800 g centrifugation, and supernatant further submitted to 13,000 g, at 4 °C for 60 min. The final suspension was kept less than 30 days at 4 °C. MF measurement was performed by prothrombinase assay after capture onto annexin-5 as previously described [12]. The assay allows extensive washing of insolubilized MPs, taking advantage of the high affinity of annexin-5 for phosphatidylserine (PhtdSer) exposed by MP surface. MP concentration is determined as PhtdSer equivalent, using the MP ability to catalyze the assembly of the prothrombinase complex.

2.4. Cellular stress and MP-mediated cross-talk

Endocrine RIN-m5F cells were treated by 10 nM exocrine MPs alone or in combination with 1 μ g/mL LPS during 18 h.

2.5. Probing of exocrine MP transfer to target endocrine cells

Microparticle fluorescent staining was achieved by addition of 2 μ M of PKH26 lipid probe (Sigma) per 30–60 picomoles

of MPs in TBS buffer. MPs were washed twice by centrifugation (13,000 g, 60 min.). Interaction of PKH26-labeled MPs and target endocrine cells was probed by flow cytometry using a FACS-scan cytometer (Becton Dickinson) and by confocal microscopy (Leica FW4000 platform, Leica Microsystems GmbH) after 18 h treatment.

2.6. Cellular measurements

Apoptosis was measured in ethanol-permeabilized cells by hypodiploid DNA probing using 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide and flow cytometry. Lysosomal activity was measured in 96-well plates by Neutral Red (Generi Biotech; Hradec Kralove, Czech Republic) assay which is based on the absorption and storage of the vital dye neutral red in lysosomes. NF- κB activation was assessed by the measurement of SEAP release in the supernatant of HEK-BlueTM cells. Insulin secretion accumulated in the supernatant of RIN-m5F cells after 18 h was measured at the end of the stimulation period by ELISA (EZRMI-13 K, EMD Millipore Billerica, USA). Insulin concentration was expressed as ng/mL per 10^6 living cells.

2.7. Immunological staining

Cells were fixed using Fix&Perm[®] kit (Caltag Laboratories, Carlsbad, USA) and labeled with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TLR4-Phycoerythrin (PE) monoclonal antibody (Abcam[®], Cambridge, USA), or with 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MATG-1031 anti-CFTR monoclonal antibody (RD Biotech, Besançon, France) and revealed by 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ goat anti-mouse PE secondary antibody (Beckman Coulter, Brea USA). Labeling was proven by flow cytometry using a FACS-scan cytometer set at logarithmic gain and 10,000 events per sample were recorded.

2.8. Evaluation of NF- κB activation and pathways targeted by MPs

NF- κB activity was measured by SEAP Reporter Assay Kit (InvivoGen) in HEK cells treated by 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS and 100 nM MPs from CFPAC-1 or PANC-1 for 22 h. The concentration of the yellow end-product was measured at 405 nm (VersaMax, Molecular Devices). For detection of phosphorylated I $\kappa\text{B}\alpha$ (p-I $\kappa\text{B}\alpha$) in RIN-m5F, cells were incubated with IRAK or TAK-1 inhibitors 30 min. before a 6 h-stimulation by MPs.

2.9. Western blot analysis

After treatment, cells were washed twice with PBS and then lysed in TRIS buffer containing protease inhibitors (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin, 5 mM Benzamide) and 2% Triton[®] X-100 on ice. Total proteins (10 μg) were separated on 10% SDS-polyacrylamide (Sigma) gels as previously described [13]. Membranes were incubated with the primary mouse antibody for p-I $\kappa\text{B}\alpha$ (US Biological, Swampscott, USA; 1:1000 dilution) overnight at 4 °C. Detection of β -tubulin protein was used for normalization and quantification. After washing, membranes were incubated with the anti-mouse antibody (Cell Signaling

Technology, Danvers, USA) at 1:10,000 dilution at room temperature for 60 min. Prestained markers (InvitrogenTM, Carlsbad, USA) were used for molecular mass determinations. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham, GE Healthcare). Density analysis was realized using ImageQuant LAS 4000 imager (GE Healthcare).

2.10. Statistics

All experiments were performed at least three times and results expressed as means \pm S.E.M. One-way ANOVA with Tukey's post hoc tests and student's t test were performed for the comparisons of groups using GraphPad Prism version 6.01 for WindowsTM (GraphPad Software, San Diego, USA). Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

3. Results

3.1. LPS effect on CFTR deficient cells

Firstly, we wanted to study the effect of LPS on apoptosis in exocrine PANC-1, exocrine CFTR-deficient CFPAC-1, endocrine RIN-m5F and endocrine CFTR-inhibited RIN-m5F cells. Our results showed that treatment with LPS significantly induced apoptosis in both exocrine CFTR-deficient CFPAC-1 (Fig. 1A) and endocrine CFTR-inhibited RIN-m5F cells (Fig. 1B). Contrary to PANC-1, LPS-challenged CFPAC-1 presented a 4-fold increase in apoptosis. Furthermore, a decrease in lysosomal activity from 100% to 82% was observed only in exocrine mutated cells (data not shown). CFTR protein-receptor activity inhibition in RIN-m5F using Inh-172 resulted in a 7-fold increase of apoptosis, reaching $27.06 \pm 2.6\%$ (Fig. 1B). Addition of LPS to those cells augmented apoptosis up to $41.5 \pm 2.15\%$. LPS alone did not induce apoptosis in normal RIN-m5F.

Because TLR4 and CFTR are two receptors for *P. aeruginosa* LPS [7], their expression was studied in RIN-m5F cells. A shift of red fluorescence intensity was observed after LPS challenge indicating the enhanced expression of both receptors (Fig. 1C–D).

3.2. Contribution of MPs to endocrine dysfunction

Fluorescence microscopy evidenced that exocrine MPs adhere and fuse with the target endocrine cell membrane (Fig. 2A–C). Flow cytometry confirmed that approximately 82% of cells presented specific fluorescence brought by MPs (Fig. 2D–F).

After 18 h, exocrine MPs isolated from both, mutated and normal cells, induced apoptosis in target endocrine cells up to $7 \pm 0.79\%$ and $8.8 \pm 1.15\%$, respectively (Fig. 3A). LPS alone decreased lysosomal activity in endocrine RIN-m5F from 100% to $82.3 \pm 2\%$. This decrease was more pronounced when cells were challenged by MPs from CFPAC-1. Conversely, MPs from PANC-1 had no effect on the lysosomal activity (Fig. 3B). Under conditions of LPS treatment and pharmacological inhibition by Inh-172, MPs from exocrine mutated CFPAC-1 decreased the lysosomal activity in RIN-m5F from 100% to $76.3 \pm 4.5\%$ (Fig. 3C).

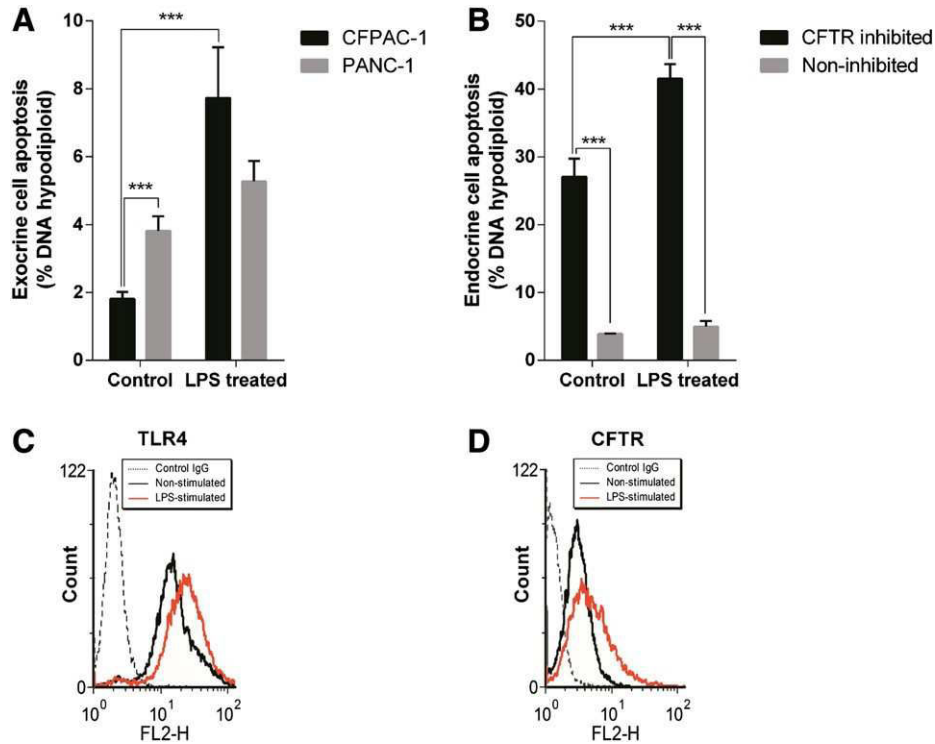


Fig. 1. Effect of CFTR deficiency in LPS-challenged exocrine and endocrine cells. CFPAC-1 and PANC-1 were incubated with 1 μ g/mL LPS during 24 h (A), and RIN-m5F during 18 h (B). Inh-172 (25 μ M) was added to normal RIN-m5F (B). N = 5, ***p < 0.0001, ns: statistically not significant. Red fluorescent (FL2-H) labeling of TLR4 and CFTR at membrane surface in LPS-stimulated RIN-m5F cells (C, D).

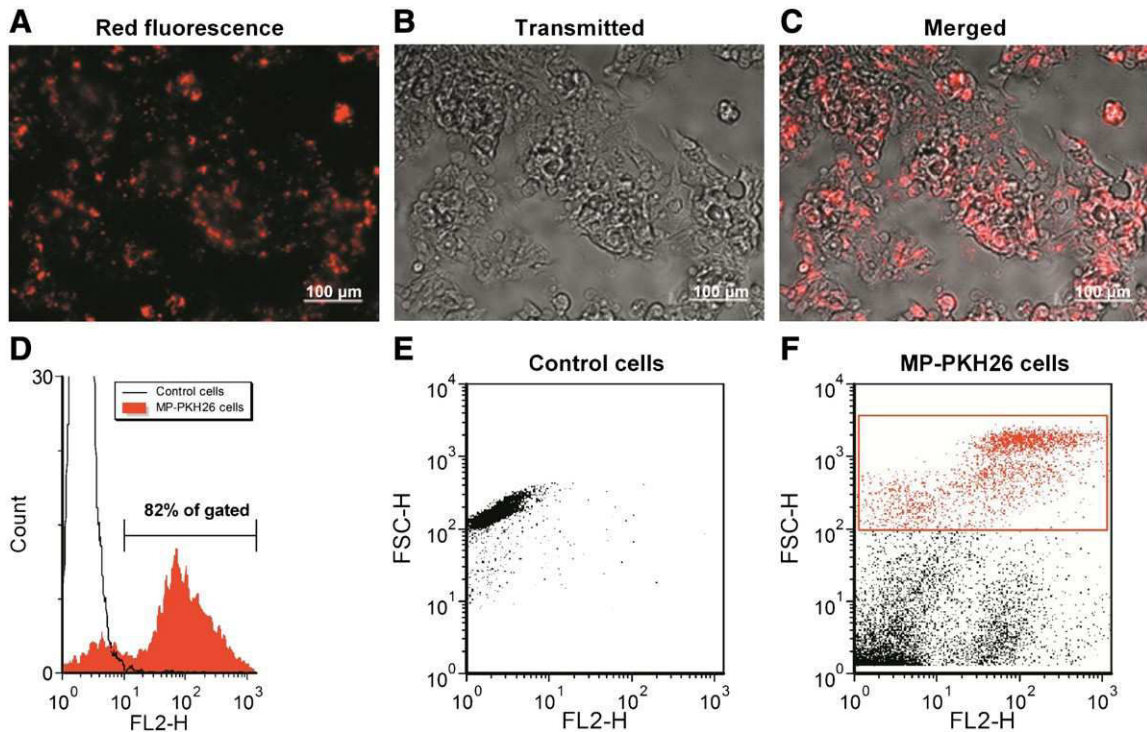


Fig. 2. Transfer of PKH26-labeled MPs from exocrine CFPAC-1 cells to endocrine target RIN-m5F cells. Cells were incubated with 10 nM MPs during 18 h and analyzed by confocal microscopy (A–C). Flow cytometry evidenced a shift of red fluorescence (FL2-H) intensity brought by PKH26-labeled MPs in endocrine RIN-m5F cells (D–F).

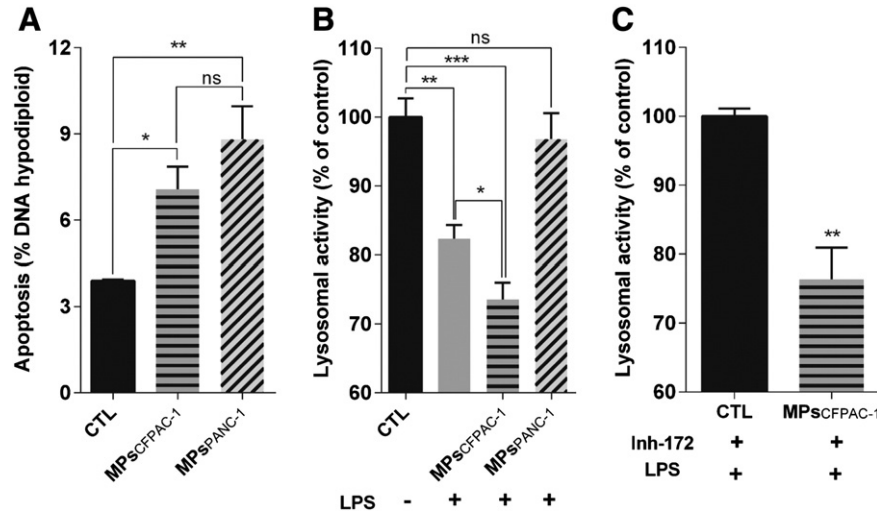


Fig. 3. Effect of exocrine MPs and LPS on the apoptosis (A) and lysosomal activity (B–C) of endocrine RIN-m5F cells. Cells were incubated with 10 nM MPs and 1 µg/mL LPS during 18 h. CFTR inhibition was achieved using 25 µM Inh-172 (C). MPs from CFPAC-1 exocrine cells (MPSCFPAC-1), MPs from PANC-1 exocrine cells (MPSPANC-1), n = 5, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.0001, ns: statistically not significant.

3.3. CFTR inhibition and exocrine MPs modulate insulin secretion

As insulin secretion decrease is a specific marker for endocrine dysfunction, we wanted then to evaluate the effect of CFTR inhibition and exocrine MPs on insulin secretion level in RIN-m5F cells. Treatment by 25 µM Inh-172 for 18 h induced a sharp decrease in insulin secretion from 60.72 ± 1.57 ng/mL to 22.39 ± 2.38 ng/mL per 10⁶ cells (Fig. 4A). Addition of LPS and LPS alone had no effect.

In contrast to PANC-1-derived MPs, MPs from CFPAC-1 decreased insulin secretion from 58 ± 1.27 ng/mL to 37.4 ± 0.96 ng/mL per 10⁶ cells. Interestingly, MPs released from Inh-172-treated PANC-1 cells decreased insulin secretion to a similar extent induced by CFPAC-1-derived MPs (Fig. 4B).

3.4. MPs from CFPAC-1 cells activate NF-κB

After treatment by 100 nM CFPAC-1-derived MPs, SEAP concentration in the supernatant of HEK-Null2 reporter cells increased by approximately 163%, while additional LPS remained ineffective, indicating that MPs delivered saturated amounts of TLR4-LPS complex to target cells. In contrast, PANC-1-derived MPs did not stimulate SEAP secretion, confirming the specificity of CFTR deficiency in MP-mediated cell response (Figs. 5A and 6). TLR4 delivery by MPs was also observed in HEK-hTLR4 control cells, where NF-κB activity could be enhanced by LPS challenge most probably through its binding to free initial cell receptors (Fig. 6).

Treating RIN-m5F cells by CFPAC-1-derived MPs significantly decreased insulin secretion from 13.9 ± 0.6 ng/mL to 10.8 ± 0.6 ng/mL per 3 × 10⁵ cells (Fig. 5B). Interestingly, an inhibitor of either IRAK-1/4 or TAK-1 was able to abrogate the effect of MPs (Fig. 5B).

A strong MP-mediated NF-κB activation was further demonstrated by highly phosphorylated IκB, an indicator of NF-κB

activation. Their effect was inhibited by IRAKi and TAK-1i (Fig. 5C).

4. Discussion

Our MP-mediated cross-talk model was based on the previous clinical observations of an increased risk of diabetes under the conditions of recurrent endotoxemia and low-grade inflammation [14,15]. LPS from *P. aeruginosa* was chosen as an inducer of pancreatic cell stress because it is more relevant to the clinical infection background in CF. However, since only exocrine pancreatic cell lineage is available and no human

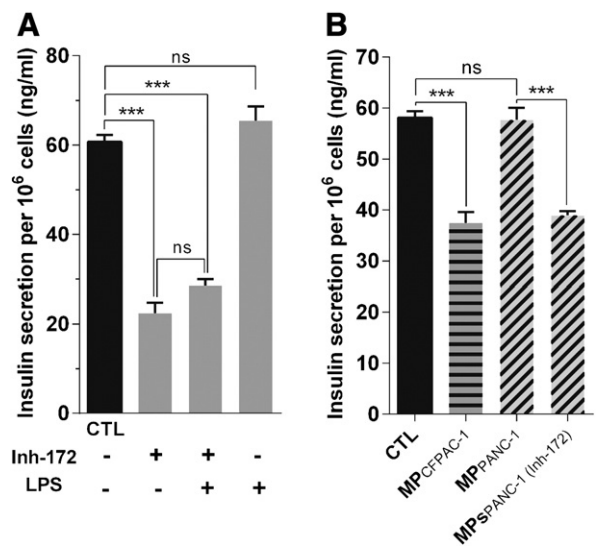


Fig. 4. Effect of MPs from CFPAC-1 and CFTR-inhibited PANC-1 on the insulin secreted by RIN-m5F. Insulin secretion was assessed after 18 h treatment with 25 µM Inh-172 and 1 µg/mL LPS, n = 7 (A). Effect of 10 nM MPs from CFPAC-1 on RIN-m5F, after 18 h treatment, n = 5 (B). ***p < 0.0001, ns: statistically not significant.

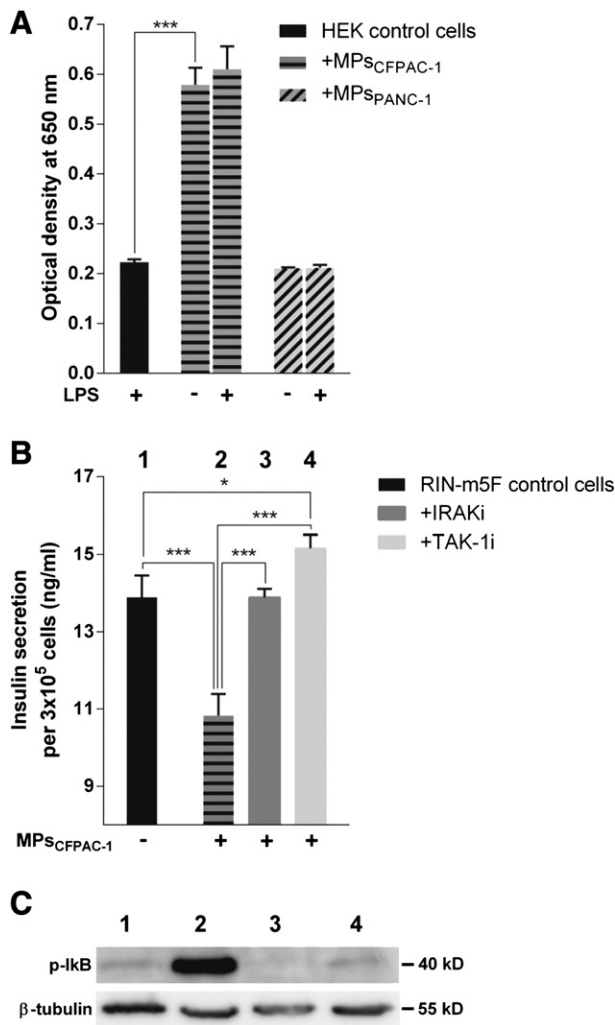


Fig. 5. NF- κ B activation in HEK-Null2 reporter cells and RIN-m5F. Null2 engineered HEK cells that are devoid of TLR4 and cannot initiate TLR4-mediated NF- κ B activation, were submitted to 100 nM MPs from exocrine CFPAC-1 and PANC-1, and challenged by LPS. NF- κ B activation was revealed by SEAP Reporter Gene System after 22 h of incubation, $n = 6$, *** $p < 0.0001$ (A). Insulin secretion was measured in the supernatant of RIN-m5F treated by 10 nM MPs from CFPAC-1 during 6 h and pretreated by IRAK or TAK-1 MAP kinase inhibitors during 30 min., $n = 5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, ns: statistically not significant (B). I κ B phosphorylation in RIN-m5F treated by MPs from CFPAC-1 and inhibitors as in B (C). One representative immunoblot of three different performed showing control cells (1), MP-treated (2), IRAKi-pretreated followed by MP treatment (3), and TAK-1i-pretreated followed by MP treatment (4). Results were reproducible for three distinct manipulations.

endocrine cell line has yet been fully established [16] rat insulin-secreting β -cells were used as MP targets [17]. CFTR activity at endocrine cell surface was further inhibited using the potent rapid-acting Inh-172 that binds to CFTR channel, to mimic CFTR dysfunction.

4.1. CFTR, cell response to LPS and insulin secretion

Our findings are indicative of cell specific consequences of CFTR deficiency, especially in the initiation of apoptosis [8].

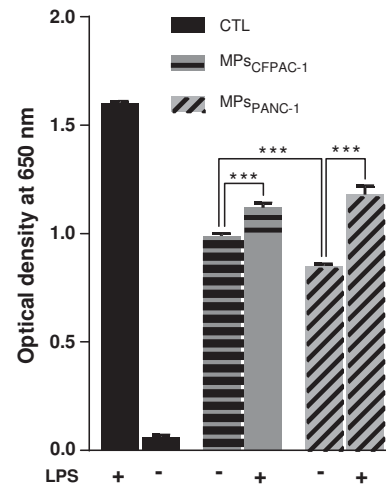


Fig. 6. NF- κ B activation in HEK-hTLR4 reporter cells challenged by LPS. hTLR4 engineered HEK cells express human TLR4 and are able to initiate TLR4-mediated NF- κ B activation. They were submitted to 100 nM MPs from exocrine CFPAC-1 and PANC-1, and challenged by LPS. NF- κ B activation was revealed by SEAP Reporter Gene System after 22 h of incubation, $n = 6$, *** $p < 0.0001$.

To the best of our knowledge, this is the first report of LPS effects on pancreatic ductal cell lines bearing CFTR Δ F508 mutation [18]. Ductal cells are key components of the exocrine pancreas and contribute to CF-induced inflammation [19,20]. Our data demonstrate that, contrary to their normal counterparts, exocrine CFTR Δ F508-mutated cells are highly sensitive to apoptotic stress in response to *P. aeruginosa* LPS. They presented a decreased metabolic activity, along with enhanced TLR4 expression. Moreover, in LPS-treated endocrine cells, an increased CFTR expression suggests its contribution to NF- κ B mediated cell response. Indeed, CFTR was reported as a specific receptor for *P. aeruginosa* endotoxin [21,22].

Although, deleterious effects of all-origin LPS have been reported in endocrine pancreas [23,24], we could not evidence LPS-induced apoptosis in our endocrine cell model. Nevertheless, LPS-challenged endocrine cells showed an important decrease in viability, detected by reduced lysosomal activity, in accordance with previous data [23,24]. LPS from *P. aeruginosa* alone did not induce the decrease of insulin secretion in our model, contrary to previous reports in human primary β -cells, murine MIN-6 cell line, or even mouse and rat islets [23,25]. This apparent discrepancy could be due to differences in cell lineages, LPS type or time duration of stimulation, although, the lack of LPS effect on insulin secretion has also been mentioned in acute stimulation, showing the importance of the experimental model [26]. However, we could evidence a direct link between CFTR inhibition and insulin secretion. CFTR inhibition led to decreased insulin secretion along with exaggerated apoptosis that was even enhanced by LPS. These data are strongly suggestive of an insulin deficiency occurring in CF as a result of CFTR dysfunction in β -cells, independently of duct obstruction. Further molecular exploration of CFTR-related insulin secretion impairment is needed for a better understanding of the underlying mechanism.

4.2. CF exocrine MPs impair cellular metabolism and insulin secretion

MPs represent a fairly recent field of research and there is a growing literature describing their properties as biomarkers of cell damage or dysfunction in many physiological settings such as coagulation or inflammation [9]. MPs can act as bioactive effectors, modulating intercellular signaling [10,27]. MPs of vascular origin have been extensively studied but data concerning MPs from pancreas are lacking. We could evidence the generation of MPs from exocrine CFTR Δ F508-mutated cells and probe their interaction with endocrine cells, leading to major apoptotic effect correlated with the decrease in lysosomal activity. In contrast, exocrine control MPs not only remained ineffective on RIN-m5F lysosomal activity but also protected target cells against LPS action, showing the importance of CFTR protein in the cell metabolism. The most surprising action of exocrine MPs was the strong decrease in insulin secretion prompted by those from CFPAC-1 or from normal cells treated by CFTR Inh-172. Interestingly, endocrine cells treated by CFPAC-1-derived MPs showed apoptosis and insulin impairment, while control MP-treated cells showed an almost similar degree of apoptosis without modification of insulin secretion. Altogether, data indicate that apoptosis was not directly involved in insulin impairment. Furthermore, CFTR protein activity at cell membrane appears pivotal in the delivery of MP signals.

Although it is tempting to draw a similar picture of MPs and cell deficiency in CFTR, our cross-talk model rather supports the idea that MPs deliver a low amount of deleterious molecules that is enhanced when CFTR mutation is present. Conversely, CFTR expressed at cell and MP membranes could be protective and its absence reveals a defective counter balance of deleterious messages borne by MPs. Data from Inh-172-challenged cell-derived MPs fit with this hypothesis (Fig. 4B).

4.3. Inhibition of NF- κ B restores insulin secretion

The influence of inflammation on insulin secretion via NF- κ B activation remains a matter of debate [25]. The ability of exocrine MPs alone to target and strongly activate NF- κ B raised the question of a possible delivery of LPS through TLR4-CD14-LPS complex. Challenge by LPS was ineffective, probably due to the saturation of TLR4 receptors delivered by MPs. Surprisingly, MPs from PANC-1 were not able to mobilize NF- κ B, in accordance with the hypothesis of CFTR-related cytoprotective effect [28,29].

Although we could verify that TLR4 as well as CFTR are expressed by RIN-m5F cells (Fig. 1C,D), free LPS had no effect neither on insulin secretion nor on apoptosis of β -cells.

Our data question the role of free LPS in the complex environment of the islet and suggest that exocrine MPs are able to capture and concentrate an active form of LPS at the vicinity of endocrine cells. Mechanisms of an MP-driven TLR4-targeted NF- κ B pathway and of its tuning in the restoration of insulin secretion remain elusive. Together with TLR4 and co-adaptor MD2 membrane delivery, MP could also bring a more favorable hindrance to the LPS-TLR4 complex or have transfer kinases and

farnesylated proteins already recruited at plasma membrane in their active form. IRAK and TAK kinases are two TLR4 downstream actors in the LPS-induced NF- κ B activation cascade. In our hands, their inhibition succeeded to restore insulin secretion in RIN-m5F cells challenged by exocrine CFPAC-1-derived MPs. Moreover, low levels of phosphorylated I κ B, the activated form of the I κ B protein responsible for keeping NF- κ B inactive, were linked to normal insulin secretion. Altogether, these data emphasize the tight connection between insulin secretion and NF- κ B in the MF cross-talk between exocrine and endocrine pancreas.

In conclusion, our data are in favor of a specific role of CFTR in the pancreatic cell homeostasis directly linked to NF- κ B. Indeed, exocrine cells with CFTR Δ F508 mutation or endocrine CFTR-inhibited cells present an exaggerated susceptibility to LPS from *P. aeruginosa*. Enhanced exocrine apoptosis and consecutive MP shedding appear as keys to the delivery of a deleterious message from mutated cells to target endocrine ones. Our data point at MP-mediated pancreatic function degeneration in CF. Hence, in the context of CF recurrent infections, MPs released from LPS-damaged exocrine cells could be viewed as direct effectors of endocrine pancreatic progressive dysfunction.

Funding

This research was supported by the Sectorial Operational Programme Development of Human Resources 2007–2013 (POS DRU) through the Financial Agreement POS DRU/107/1.5/S/76888 of the Government of Romania, recurrent funding, by the Association Vaincre la Mucoviscidose (VLM) and by the Aide à Domicile aux Insuffisants Respiratoires d'Alsace Lorraine (ADIRAL).

References

- [1] Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2012;10(12):841–51.
- [2] Kelly A, Moran A. Update on cystic fibrosis-related diabetes. *J Cyst Fibros* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2013.02.008>.
- [3] Valour F, Brault C, Abbas-Chorfa F, Martin C, Kessler L, Kanaan R, et al. Outcome of cystic fibrosis-related diabetes two years after lung transplantation. *Respiration* 2012. <http://dx.doi.org/10.1159/000339928>.
- [4] Bridges N. Diabetes in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2013.02.002>.
- [5] Hoelen H, Kleizen B, Schmidt A, Richardson J, Charitov P, Thomas PJ, et al. The primary folding defect and rescue of Δ 508 CFTR emerge during translation of the mutant domain. *PLoS One* 2010;5(11):e15458.
- [6] Bertrand CA, Frizzell RA. The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285(1):C1–C18.
- [7] Kowalski MP, Pier GB. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *J Immunol* 2004;172(1):418–25.
- [8] Rottner M, Kunzelmann C, Mergely M, Freyssonnet J-M, Martínez MC. Exaggerated apoptosis and NF- κ B activation in pancreatic and tracheal cystic fibrosis cells. *FASEB J* 2007;21(11):2939–48.
- [9] Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci* 2013;124(7):423–41.
- [10] Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssonnet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004;11(3):156–64.

- [11] Porro C, Di Gioia S, Trotta T, Lepore S, Panaro MA, Battaglino A, et al. Pro-inflammatory effect of cystic fibrosis sputum microparticles in the murine lung. *J Cyst Fibros* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2013.03.002>.
- [12] Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2(10):1842–51.
- [13] Alhosin M, Ibrahim A, Boukhari A, Sharif T, Gies JP, Auger C, et al. Anti-neoplastic agent thymoquinone induces degradation of alpha and beta tubulin proteins in human cancer cells without affecting their level in normal human fibroblasts. *Invest New Drugs* 2012;30(5):1813–9.
- [14] Pussinen PJ, Havulinna AS, Lehto M, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes Care* 2011;34(2):392–7.
- [15] Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, Korzeniewski K, Chaudhuri A, Fernandez-Real JM, et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal implications for insulin resistance. *Diabetes Care* 2009;32(12):2281–7.
- [16] Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, Bricout-Neveu E, Armanet M, Czernichow P, et al. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest* 2011;121(9):3589–97.
- [17] Kopeikin Z, Sohma Y, Li M, Hwang T-C. On the mechanism of CFTR inhibition by a thiazolidinone derivative. *J Gen Physiol* 2010;136(6):659–71.
- [18] Fortunato F, Deng X, Gates LK, McClain CJ, Bimmler D, Graf R, et al. Pancreatic response to endotoxin after chronic alcohol exposure: switch from apoptosis to necrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(2):G232–41.
- [19] Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Fujiki K, Hayakawa T. Cystic fibrosis and related diseases of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16(3):511–26.
- [20] Stecenko AA, Moran A. Update on cystic fibrosis-related diabetes. *Curr Opin Pulm Med* 2010;16(6):611–5.
- [21] Schroeder TH, Lee MM, Yacono PW, Cannon CL, Gerçeker AA, Golan DE, et al. CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF- κ B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(10):6907–12.
- [22] Goldberg JB, Pier GB. The role of the CFTR in susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Trends Microbiol* 2000;8(11):514–20.
- [23] Garay-Malpartida HM, Mourão RF, Mantovani M, Ia Santos, Sogayar MC, Goldberg AC. Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis. *BMC Immunol* 2011;12(1):18.
- [24] Ge QM, Du SC, Bian F, Lin N, Su Q. Effects of lipopolysaccharides on TLR4 expression in Ins-1 rat insulinoma cells. *Cell Mol Biol* 2011;57(Suppl.):OL1513–9.
- [25] Amyot J, Semache M, Ferdaoussi M, Fontés G, Poitout V. Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of langerhans via toll-like receptor-4 and NF- κ B signalling. *PLoS One* 2012;7(4):e36200-e.
- [26] Liu S-Y, Liang Q-J, Lin T-X, Fan X-L, Liang Y, Heemann U, et al. Lipopolysaccharide-enhanced early proliferation of insulin secreting Nit-1 cell is associated with Nuclear Factor-KappaB-mediated inhibition of caspase 3 cleavage. *Chin Med J (Peking)* 2011;124(22):3652–6.
- [27] Reid VL, Webster NR. Role of microparticles in sepsis. *Br J Anaesth* 2012;109(4):503–13.
- [28] Vij N, Mazur S, Zeitlin PL. CFTR is a negative regulator of NF- κ B mediated innate immune response. *PLoS One* 2009;4(2):e4664.
- [29] Fiorotto R, Scirpo R, Trauner M, Fabris L, Hoque R, Spirli C, et al. Loss of CFTR affects biliary epithelium innate immunity and causes TLR4-NF- κ B-mediated inflammatory response in mice. *Gastroenterology* 2011;141(4):1498–508 [508.e1-5].

RÉSUMÉ

I. INTRODUCTION

Le diabète de type 1 est une pathologie liée à la destruction des cellules β pancréatiques par le système immunitaire, entraînant une hyperglycémie consécutive à une carence en insuline. Cette forme de diabète survient essentiellement chez les enfants et les jeunes adultes et se traite par injections quotidiennes d'insuline exogène. Toutefois chez certains patients, la glycémie reste instable et difficile à contrôler, malgré une insulinothérapie intensive.

La transplantation d'îlots pancréatiques de Langerhans est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie chez ces patients à grande variabilité glycémique. Cette technique de thérapie cellulaire consiste à isoler et purifier les îlots d'un donneur en mort cérébrale et à les injecter chez le receveur au niveau de la veine porte du foie. 80% des patients atteignent l'insulino-indépendance un an après la greffe. Cependant ce taux chute à 40% de patients insulino-indépendants trois ans après transplantation et 10% après cinq ans (Collaborative Islet Transplant registry 2012).

Malgré une approche thérapeutique prometteuse et non invasive, cette perte progressive de la fonction du greffon, encore appelée dysfonction chronique, apparaît donc comme la limite principale de cette technique. Elle est la conséquence d'agressions répétées : Ischemie-reperfusion (déconnection du lit vasculaire), rejet, toxicité du traitement immunosuppresseur. Parmi ces mécanismes, la réaction inflammatoire précoce, appelée IBMIR (Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction) consécutive au contact des îlots avec le sang du receveur, semblerait jouer un rôle déterminant dans la survie des îlots. Cette réaction est caractérisée par une production importante de cytokines et par l'expression de facteur tissulaire (TF), initiateur de la cascade de coagulation. Au voisinage de l'îlot, ce facteur procoagulant est associé à des vésicules appelées microparticules (MPs). Ces MPs sont des fragments submicroniques de membrane plasmique émises par les cellules en réponse à un stress. Elles exposent des protéines membranaires et des marqueurs actifs, spécifiques de la cellule parentale et du stress qui leur a donné naissance. Elles se comportent comme des effecteurs cellulaires, suggérant leur rôle potentiel dans la propagation d'un message pro-inflammatoire spécifique de la réaction IBMIR.

Récemment des travaux ont montré qu'un analogue du GLP-1, le Liraglutide, utilisé dans le traitement du diabète de type 2 pour ses effets bénéfiques sur la sécrétion d'insuline présentait aussi des propriétés anti-apoptotiques, identifiées *in vitro et in vivo*.

II. HYPOTHESES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Dans ce travail, nous faisons l'hypothèse que l'utilisation du Liraglutide en transplantation d'îlots pancréatiques protégerait les cellules de la réaction IBMIR, de manière directe en assurant la survie et préservant la fonction sécrétrice de la cellule β mais aussi en ciblant les MPs en tant qu'amplificateur du message délétère inflammatoire.

Nous avons donc pour objectifs (i) d'étudier le rôle des MPs dans la propagation du message procoagulant et pro-inflammatoire de la réaction IBMIR, (ii) d'étudier l'effet du Liraglutide sur les mécanismes physiopathologiques transmis par les MPs aux cellules à insuline et (iii) d'évaluer les mécanismes membranaires et cellulaires du maintien des fonctions sécrétrices de la cellule β assurés par le Liraglutide et leurs dépendance ou non au récepteur du GLP-1.

III. MATERIELS ET METHODES

Modèle de stress et communication cellulaire

Des cellules β endocrines de rat productrices d'insuline, Rin-m5F, ont été stimulées selon deux protocoles de stress : un protocole séquentiel de stress oxydant par application de 100 μ M de H_2O_2 mimant le stress de l'ischémie-reperfusion subit par les îlots lors de leur isolement et un protocole de stress cytokinique par application d'un cocktail d'IL-1 β +TNF- α mimant la réaction inflammatoire de l'IBMIR. Une modulation pharmacologique a été appliquée par utilisation de Liraglutide à 1 μ M. Les MPs émises ont été collectées dans le surnageant puis appliquées à des Rin-m5f naïves à la concentration de 10nM. Ce modèle de communication cellulaire ou « cross-talk » a permis d'évaluer les propriétés d'effecteur cellulaire des MPs vis à vis des cellules β cibles.

Paramètres évalués

A l'échelle cellulaire, ont été évalués : L'apoptose par mesure de l'ADN hypodiploïde, l'émission des MPs par test enzymatique prothrombinase, l'intégration des MPs avec la sonde fluorescente lipidique PKH26, l'activité TF à la surface des cellules et des MPs par test enzymatique Tenase, l'activation de la voie NF κ B et UPR et la production de la MAP kinase p38 par Western Blot et la sécrétion d'insuline par test ELISA. Les voies de signalisation mises en jeu ont été explorées à l'aide d'inhibiteurs des kinases et protéines impliquées dans la sécrétion d'insuline (H89, Amlodipine, Diazoxide). Les mécanismes d'exocytose impliquées dans la sécrétion d'insuline ont été examinés par utilisation de la toxine tétanique et la formation de radeaux lipidiques par utilisation de la toxine du choléra et microscopie de fluorescence.

IV. RESULTATS

Les MPs : amplificateurs du stress de la réaction IBMIR

Nous avons démontré que l'application d'un stress oxydant ou cytokinique conduit à une émission importante de MPs par les cellules β . De plus, les MPs véhiculent une très importante activité du TF. En effet, l'activité TF mesurée à la surface des MPs émises en réponse au stress est plus élevée que celle des MPs émises en condition basale de culture.

En plus de leurs propriétés procoagulantes, nous avons pu étudier les propriétés effectrices des MPs et leurs interactions avec la cellule cible. Grâce au marquage des MPs par la sonde lipidique fluorescente PKH26 nous avons mis en évidence que 52% des cellules cibles présentaient une fluorescence membranaire après 24h d'incubation, témoignant de la fusion de la membrane plasmique et de celle des MPs. D'autre part, nous avons montré que les MPs émises lors des stress cytokinique et oxydant entraînent une diminution de la sécrétion d'insuline ainsi qu'une hausse de la production de la MAP kinase p38 dont le degré de phosphorylation a été associé à une altération de la sécrétion d'insuline. Les MPs provoquent aussi une augmentation significative de l'apoptose, une activation de la voie NFκB et de la voie UPR. Enfin, l'activité TF importante véhiculée par les MPs est transférée aux cellules cibles, accroissant ainsi l'activité procoagulante à leur surface.

Les MPs se comportent comme des messagers amplificateurs du stress de la cellule à insuline, initié par la réaction IBMIR.

Effet du Liraglutide sur la libération des MPs et sur leurs propriétés effectrices

Nous avons confirmé que le Liraglutide protège la cellule β de l'apoptose induite par un stress oxydant ou inflammatoire et restaure la sécrétion d'insuline dans notre modèle cellulaire. Nous avons pu approfondir ces résultats en montrant que le Liraglutide agissait sur les 3 étapes majeures impliquées dans la sécrétion d'insuline à savoir l'activation de la protéine kinase A (PKA), de la fermeture des canaux potassiques dépendant de l'ATP et de l'ouverture des canaux dépendant du calcium. De plus, nous avons montré que l'activation de la PKA par le Liraglutide est impliquée dans ses propriétés anti-apoptotiques .

De manière plus originale, nous avons montré que l'activité du TF qui est fortement augmentée en réponse aux stress inflammatoire et oxydant diminue significativement en présence de Liraglutide à partir de la concentration de 10 nM. La mise en place et la validation de ce modèle a permis la démonstration d'un effet anti-inflammatoire et anticoagulant du Liraglutide jusqu'alors inconnu. En relation avec son effet anti-apoptotique nous avons démontré que le Liraglutide limitait la génération de MPs mais aussi l'activité TF détectée à leur surface. Par contre, si le Liraglutide ne modifie pas l'interaction entre MPs et cellules cibles, il limite la transmission de leurs effets délétères, décrits précédemment, aux cellules cibles.

Le Liraglutide s'oppose ainsi à la propagation du message délétère porté par les MPs en limitant à la fois leur quantité et leurs effets sur les cellules cibles.

Effet du Liraglutide sur le remodelage membranaire : impact sur l'insulinosecrétion

Au vu de nos résultats précédents montrant un effet bénéfique du Liraglutide sur la génération de MPs et sur l'activité TF, nous avons recherché un éventuel impact du Liraglutide sur les remodelages

membranaires de la cellule β . En effet, la phosphatidylsérine (PhSer), un phospholipide de la bicouche lipidique de la membrane plasmique est connue pour potentialiser l'activité TF lorsqu'elle est présente dans le feuillet externe. Or la PhSer est recrutée aux abords des radeaux lipidiques, qui se constituent en réponse au stress. Ces micro-domaines protéolipidiques qui s'organisent dans le plan de la membrane plasmique sont riches en cholestérol et en glycosphingolipides. Nous avons pu observer par microscopie de fluorescence, la formation des radeaux lipidiques de grande taille en présence d'un stress cytokinique ou oxydant, dont la superficie était réduite par co-traitement avec le Liraglutide. Cette observation peut expliquer en partie l'effet inhibiteur du Liraglutide sur l'activité TF. De plus, nous avons montré que la méthyl- β -cyclodextrine, un accepteur de cholestérol qui disperse les composants des rafts, réduit la surface qu'ils occupent et limite partiellement la baisse de sécrétion d'insuline. Ces résultats suggèrent un lien entre la formation des rafts sous forme de larges domaines lipidiques et l'altération de la sécrétion d'insuline.

Enfin, à l'aide d'un modulateur pharmacologique de récepteur du GLP-1, l'exendine, nous avons montré que les mécanismes cytoprotecteurs du Liraglutide sur la cellule β reposent, au moins en partie, sur des mécanismes indépendants du récepteur du GLP-1, notamment en ce qui concerne la sécrétion d'insuline et l'activité TF.

Outre le remodelage de la membrane plasmique associé à l'émission des MPs, à l'activité du TF et dans la sécrétion d'insuline, nous avons montré que la membrane cellulaire était le siège d'autres types de remodelages nécessaires au bon fonctionnement de la cellule à insuline. En effet, après avoir inhibition pharmacologique du complexe protéique SNARE qui assure l'étape finale d'exocytose des granules intracellulaires d'insuline par fusion avec la membrane plasmique et libération vers le milieu extracellulaire, nous avons pu observer que les granules à insuline restaient acculés dans la zone péri-plasmique. L'ajout de Liraglutide permet de restaurer un la production continue de l'insuline jusqu'à son exocytose dans le milieu extracellulaire.

Ces résultats témoignent d'un nouveau mode d'action du Liraglutide reposant sur une modulation des remaniements de la membrane plasmique des cellules à insuline en condition de stress, qui ne semble pas uniquement dépendant de la fixation du Liraglutide à son récepteur et suggèrent une action directe vis à vis de la membrane.

V. CONCLUSION

Ce travail original a mis en évidence que les MPs constituent une boucle d'amplification de la réaction inflammatoire précoce IBMIR consécutive de la greffe d'ilots pancréatiques. Elles apparaissent comme des cibles thérapeutiques sur lesquelles le Liraglutide joue un rôle clef orientant la survie et la fonction de la cellule à insuline.

Ces données apportent une connaissance plus large sur les cibles et modes d'action du Liraglutide sur les mécanismes de production et de sécrétion d'insuline par les cellules β tant au niveau intracellulaire que membranaire.

Enfin, ces résultats mettent en évidence de nouveaux mécanismes cytoprotecteurs du Liraglutide, non dépendants de son récepteur et soulèvent l'importance du remodelage membranaire dans la fonction sécrétrice de la cellule β .

Ces données sont en faveur de l'utilisation du Liraglutide en prétraitement des îlots et en traitement post-greffe du patient pour le contrôle de la réaction IBMIR grâce à la diminution de la libération des MPs.

Céline GLEIZES

Mécanismes et contrôle de la réaction inflammatoire précoce au cours de la greffe d'îlots pancréatiques, dans un modèle de lignée de cellules β de rat : rôle et modulation de la libération des microparticules

Résumé

La greffe d'îlots pancréatiques est caractérisée par une réponse inflammatoire et procoagulante précoce, connue sous le nom d'IBMIR (*Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction*). Les microparticules (MPs) porteuses de facteur tissulaire (TF) sont le témoin d'un important remodelage membranaire et constituent des acteurs centraux dans la dissémination du stress de l'IBMIR. Nous avons exploré l'effet d'un stress inflammatoire sur la survie et la fonction de la cellule β dans un modèle de communication cellulaire médiée par les MPs. La modulation pharmacologique par les analogues du GLP-1 a été évaluée, la par la mesure de la sécrétion d'insuline, de l'activité TF et l'analyse du remodelage de la membrane plasmique. Nos résultats décrivent les MPs comme des effecteurs autocrines et indiquent que les MPs sont des cibles potentielles pour les analogues du GLP-1 au cours de l'IBMIR. Les données apportent de nouvelles pistes sur les mécanismes cellulaires mis en jeu lors des phénomènes d'ischémie reperfusion durant l'IBMIR.

Mots clés : greffe d'îlots, cellule β , insuline sécrétion, remodelage membranaire, microparticules, facteur tissulaire, analogues du GLP-1

Résumé en anglais

Pancreatic islets graft is characterized by early inflammatory and procoagulant events known as *Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction* (IBMIR). Tissue factor (TF) bearing microparticles (MPs) are surrogates of important membrane remodeling and key players in the systemic and local dissemination of such stress.

We investigated the effect of inflammatory stress on β cell survival and function in a MP-mediated cell crosstalk model. Pharmacological modulation by GLP-1 analogues was evaluated by measurement of insulin secretion, TF activity and assessment of plasma membrane remodeling. Our data evidenced MPs as autocrine effectors and possible new target for GLP-1 analogues. They bring new hints on the cellular mechanisms prompted by ischemia reperfusion during IBMIR.

Key words: islet graft, β cell, insulin secretion, plasma membrane remodeling, microparticles, tissue factor, GLP-1 analogues