



**HAL**  
open science

# Etude de la transition endothélio-mésenchymateuse des cellules endothéliales intra-insulaires de souris et modulation pharmacologique : intérêt dans la greffe d'îlots pancréatiques

Noura Sbat

► **To cite this version:**

Noura Sbat. Etude de la transition endothélio-mésenchymateuse des cellules endothéliales intra-insulaires de souris et modulation pharmacologique : intérêt dans la greffe d'îlots pancréatiques. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ059 . tel-03873595

**HAL Id: tel-03873595**

**<https://theses.hal.science/tel-03873595v1>**

Submitted on 27 Nov 2022

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

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

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



## ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Unité de recherche : Nano médecine Régénérative INSERM-UNISTRA UMR1260

# THÈSE

Présentée par :

**Noura Sbat**

Soutenue le : **26 Novembre 2021**

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

Discipline/ Spécialité : Biologie Médicale

**Etude de la transition endothélio-mésenchymateuse  
des cellules endothéliales Intra-insulaires de souris et  
modulation pharmacologique :**

**Intérêt dans la greffe d'îlots pancréatiques**

### THÈSE dirigée par :

Laurence Kessler                      Professeur, Université de Strasbourg

Florence Toti                            Professeur, Université de Strasbourg

### RAPPORTEURS :

Eduardo Angles-Cano                Directeur de recherche, Université de Paris

Angela Tesse                            Maître de conférences, Université de Nantes

### Examineur :

Anne Wojtuszczyńska                Professeur, Université de Lausanne

Karim Bouzakri                        Docteur, Université de Strasbourg

## Table des matières

### Table des matières

#### Liste des figures

#### Liste des abréviations

### 1- La greffe d'îlots pancréatiques : Un traitement du diabète de type 1

1-1- Diabète de type 1 : une maladie auto-immune.....	12
1-2- Les différents traitements du diabète de type 1 .....	13
1-3- Structure des îlots de Langerhans : L'unité fonctionnelle de sécrétion insulinaire.....	14
1-3-a Anatomie vasculaire des îlots de Langerhans.....	18
1-4- Fonctionnement cellulaire des cellules $\beta$ et régulation de la sécrétion d'insuline.....	19
1-5- La transplantation d'îlots pancréatiques : Un traitement pour les patients atteints du diabète de type 1 avec grande variabilité glycémique.....	20
1-5-a- Procédure et technique de transplantation d'îlots pancréatiques.....	21
1-5-b- Complications liées à la transplantation d'îlots.....	24

### 2- L'endothélium intra-insulaire : Un acteur fondamental du bon fonctionnement de la revascularisation des îlots après transplantation

2-1- Anatomie vasculaire du pancréas .....	35
2-2- Structure et définition de l'endothélium .....	36
2-3- Interactions cellulaires entre l'endothélium et les îlots pancréatiques .....	38
2-4- Mécanisme de revascularisation des îlots pancréatiques après transplantation.....	40
2-5- Rôle des cellules endothéliales dans le processus de revascularisation des îlots après transplantation.....	44
2-6- Rôle des cellules endothéliales sinusoidales dans le processus de revascularisation des îlots après transplantation.....	45

### **3- La Transition endothélio-mésenchymateuse (EndTM)**

3-1- Définition de l'EndTM.....	47
3-2- La transition des cellules endothéliales en cellules mésenchymateuses dans les conditions Inflammatoires.....	49
3-3- Les médiateurs et les voies de signalisation impliquées dans l'EndTM.....	52
3-4- L'EndTM dans les maladies vasculaires pulmonaires.....	60
3-5- L'EndTM dans le contexte de la greffe d'organe.....	62
3-6- L'EndTM dans les conditions de l'hyperglycémie .....	63
3-7- Fibrose des organes induite par l'EndTM.....	64
3-8- Traitements possibles pour la prévention de l'apparition de l'EndTM.....	65

### **4- Le Glucagon Like Peptide**

4-1- Généralité .....	68
4-2- Le récepteur au GLP-1 et sa distribution physiologique.....	69
4-3- Les analogues du GLP-1.....	71
4-4- Les essais cliniques.....	74
4-5- Effet des analogues du GLP-1 sur les cellules pancréatiques.....	75

### **5- Les Microparticules : vésicules extracellulaires avec effets pro-inflammatoires et pro-coagulants**

5-1- Les vésicules extracellulaires.....	77
5-2- Les microparticules (MPs).....	78
5-2-1 Mécanismes généraux de la biogénèse des microparticules .....	79
5-3- Techniques de mesure des microparticules.....	80
5-4- Les méthodologie de caractérisation de dosages des microparticules.....	81

5-5- Les microparticules endothéliales : Des vésicules sophistiquées modulant la fonction vasculaire et tissulaire.....	83
5-6- Biogénèse des microparticules endothéliales.....	84
5-7- Actions des microparticules sur les cellules endothéliales.....	86
5-8- Les microparticules : rôle en tant que marqueur de dysfonctionnement endothélial.....	87
5-9- Les microparticules endothéliales : biomarqueurs du diabète et maladies cardiovasculaires.....	88
5-10- Les microparticules endothéliales et l'EndTM .....	89
5-11- Les microparticules et la régénération hépatique .....	90
5-12- Intérêt des microparticules dans le suivi thérapeutique.....	90
<b>6-Hypothèses et objectifs .....</b>	<b>97</b>
<b>7-Article.....</b>	<b>98</b>
<b>8-Discussion générale .....</b>	<b>103</b>
<b>9-Conclusion et perspectives.....</b>	<b>110</b>
<b>10-Production scientifique et communication orales.....</b>	<b>134</b>

## Remerciements

A l'issue de la rédaction de cette thèse, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de \*l'apprenti chercheur\*.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres qui composent mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier mes chères directrices de thèse, madame **Florence TOTI** et madame **Laurence KESSLER**, pour la confiance qu'elles m'ont accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour leurs multiples conseils et pour toutes les heures qu'elles ont consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également leur dire à quel point j'ai apprécié leurs grandes disponibilités et j'ai extrêmement été sensible à leurs qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral, MERCI !!!

Je remercie mes très chers parents, **Houssam** et **Bassima**, qui ont toujours été là pour moi, vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fière.

Je remercie mes frères **Mohamad, Ahmad, Saad** et ma sœur **Bouchra** ainsi que ma tante **Majd** qui n'ont jamais quitté mes pensées, pour l'affection dont ils me comblent, pour la confiance qu'ils m'ont témoignée et pour leur soutien indéfectible dans les moments difficiles.

Je remercie également mes collègues de l'équipe Dysfonction d'organe et Transplantation de l'UMR 1260, **Margaux, Hanine, Louise, Foteini** et **Ali Habhab** pour votre aide et votre joie de vivre, ainsi qu'un grand merci à **Fatiha Zobairi**, pour sa gentillesse et son aide qui a contribué à l'avancement de ce travail.

Un grand merci à **Mohamad Kassem**, qui depuis mon premier jour d'arrivée dans l'équipe a été un grand frère pour moi et a été présent *dans les bons moments comme dans les mauvais*.

Un grand merci à mon amie **Lamia Remila**, avec qui durant ces trois années nous avons partagé nos joies, nos rires et nos moments d'angoisse. Merci ma copine !!!

Liste des tableaux

**Tableau 1 : Etudes d'induction de EndTM dans différents types cellulaires.**

**Tableau 2 : Médicaments utilisés en clinique pour inhiber la EndMT.**

**Table 3 : Récapitulatif des différentes techniques de dosage des microparticules.**

## Liste des figures

**Figure 1 : Anatomie du pancréas (A) et de l'îlot humain (B)**

**Figure 2 : Flux sanguin endocrinien et exocrine dans le pancréas**

**Figure 3 : Mécanisme de sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  stimulée par du glucose**

**Figure 4 : Illustration schématique de l'ensemble depuis l'isolement des îlots jusqu'à la transplantation intra-portale**

**Figure 5 : Chronologie des complications qui peuvent contribuer aux dommages et à la perte de fonction des îlots après transplantation**

**Figure 6 : Les étapes de la réaction IBMIR**

**Figure 7 : Schéma des 3 systèmes de signalisation impliqués lors de l'activation des lymphocytes T après une allo-transplantation d'îlots**

**Figure 8 : Anatomie vasculaire du Pancreas (D'après l'EMC: "Radioanatomie du pancréas")**

**Figure 9 : Les 3 types endothéliums**

**Figure 10 : Description des interactions entre les cellules endothéliales et les cellules des îlots de Langerhans**

**Figure 11 : Revascularisation des îlots après une transplantation**

**Figure 12 : Transition Endothélio mésenchymateuse des cellules endothéliales**

**Figure 13 : Schémas des voies de signalisation activées durant l'EndTM**

**Figure 14 : Représentation schématique de la transition endothélio-mésenchymateuse (EndTM) en réponse à des stimuli inflammatoires et à un dysfonctionnement métabolique**

**Figure 15 : L'EndMT peut contribuer au développement de multiples maladies, notamment les maladies fibrotiques et le cancer**

**Figure 16 : Représentation schématique de la transition endothéliale-mésenchymateuse (EndTM) impliquée dans les maladies pulmonaires**

**Figure 17 : Effet du GLP-1 et de ses analogues sur les différents organes**

**Figure 18 : Essai REWIND : Critère de jugement principal des événements cardiovasculaires majeurs**

**Figure 19 : Ils existent trois types de vésicules extracellulaires : les exosomes d'origine endosomale (émises par exocytose), les microvésicules (émises par bourgeonnement de la membrane plasmique) et les corps apoptotiques (émises suite à un stimulus apoptotique)**

**Figure 20 : Représentation schématique de la formation de microparticules.**

**Figure 21 : Libération des MPs circulantes pendant la transplantation d'îlots, en fonction de leur origine cellulaire**



**Figure 22 : Variation du taux d'expression de PSA-NCAM+-MP circulants chez les patients transplantés avec succès, succès partiel ou échec de la greffe**

## Liste des abréviations

<b>AGO2</b>	Argonaute RISC Catalytic Component 2
<b>ALK-5</b>	Activin receptor-like kinase 5
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Alpha-smooth muscle actin
<b>BMPR2</b>	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2
<b>C3b</b>	Complément C3b
<b>CAF</b>	Fibroblastes associés au cancer
<b>cAMP</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>CCL2 :</b>	Chemokine C-C motif ligand 2
<b>CEs :</b>	Cellules endothéliales
<b>CITR</b>	Collaborative Islet Transplant Registry
<b>CMH de classe I :</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
<b>CMH de classe II :</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
<b>COX-2</b>	Cyclooxygenase-2
<b>CSM</b>	Cellules souches mésenchymateuses.
<b>CXCL8</b>	Chemokine C-X-C motif ligand 8
<b>DPP4</b>	Dipeptidyl-peptidase 4
<b>DSA</b>	Anticorps spécifiques du donneur
<b>DT1</b>	Diabète de type 1
<b>EROs</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>FGF-2</b>	Fibroblast growth factor 2
<b>FID</b>	Fédération Internationale du Diabète
<b>FPR</b>	Fibrose pulmonaire radio-induite
<b>FT</b>	Facteur tissulaire
<b>GLP-1R</b>	Récepteur du glucagon-like peptide-1

<b>GLUT 2</b>	Transporteur de glucose 2
<b>HGF</b>	Facteur de croissance hépatocytaire
<b>HLA</b>	Antigène leucocytaire humain
<b>HMGB1</b>	High-mobility group box 1
<b>HPI</b>	Hypertension portale idiopathique
<b>HTAP</b>	Hypertension artérielle pulmonaire
<b>IBMIR</b>	Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule 1
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Interleukine 1 bêta
<b>IgG4-RD</b>	Immunoglobulin G4-related disease
<b>MACE</b>	Major adverse cardiovascular events
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein-1
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MPs</b>	Microparticles
<b>mTOR</b>	Mammalian Target of Rapamycin
<b>MYH11</b>	Myosin Heavy Chain 11
<b>NETs</b>	Neutrophil extracellular traps
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NO</b>	Nitric oxide / Monoxide d'azote
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PGI2</b>	Prostacycline
<b>PNN</b>	Polynucléaires neutrophiles
<b>PP</b>	Pancreatic polypeptide
<b>PRA</b>	Réactifs du panel

<b>PSer</b>	Phosphatidylsérine
<b>SCID</b>	Severe combined immunodeficiency
<b>SMC</b>	Cellules musculaires lisses
<b>STAT1</b>	Signal transducer and activator of transcription 1
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor beta
<b>TIL</b>	Transplantés d'îlots de Langerhans
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Facteur de nécrose tumorale- $\alpha$
<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion protein 1
<b>VEGF-A</b>	Facteur de croissance endothélial vasculaire-A
<b>Vwf</b>	Facteur de von Willebrand

# 1- La greffe d'îlots pancréatiques : Un traitement du diabète de type 1

## 1-1- Le Diabète de type 1 : une maladie auto-immune

Le diabète est une maladie caractérisée par une hyperglycémie chronique, qui affecte 9,3% de la population mondiale d'après la Fédération Internationale du Diabète (Atlas du diabète, 2019) (Ahlqvist, Storm et al. 2018). Il existe plusieurs classes de diabète dont le diabète de type 1 (DT1). Il représente 10 % des cas (FID, Atlas du Diabète, 2019). Le DT1 est une maladie auto-immune déclenchée par des facteurs environnementaux (infections virales, toxines, nutriments alimentaires ou allergies) chez des individus génétiquement prédisposés. Ce processus chronique conduit à la destruction sélective des cellules bêta ( $\beta$ ) sécrétrices d'insuline dans les îlots pancréatiques. Plusieurs gènes responsables ont été identifiés avec des loci dispersés situés sur 40 sites distincts. Le premier ensemble de gènes associés au DT1 a été identifié sur le chromosome 6. Il s'agit du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 2 (HLA-DQ2), qui est impliqué dans la tolérance immunitaire (Barrett, Clayton et al. 2009). En plus de la prédisposition génétique, le DT1 peut également être déclenché par des conditions environnementales prédisposant l'attaque auto-immune médiée par les lymphocytes T contre les cellules  $\beta$  (Zaccane, Fehervari et al. 2006). Les lymphocytes T (LT), acteurs clés de l'immunité cellulaire, jouent également un rôle central dans la destruction auto-immune des cellules  $\beta$  (Diana, Gahzarian et al. 2011). L'apparition de DT1 nécessite deux types de lymphocytes T : les LT CD4+ et les LT CD8+. L'activation des LT est déclenchée par le recrutement des cellules dendritiques par les antigènes de cellules  $\beta$ . Deux voies de destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques médiées par ces cellules présentatrices d'antigènes (APC) sont possibles : i) par contact direct via un processus cytotoxique, ou ii) indirectement par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de perforine ou de granzyme B (Li, Song et

al. 2014). Parmi les antigènes exprimés par la cellule  $\beta$ , l'insuline est reconnue par les LT auto-immuns (Mannering, Pang et al. 2009). Les LT CD4+ de type T helper (Th1, Th2 et Th17) et les cellules T régulatrices (Tregs) sont impliqués différemment dans la pathogenèse de DT1 et répondent à des interleukines différentes afin d'assurer le maintien de la tolérance immunitaire et de limiter la réponse excessive du système immunitaire. Les lymphocytes B (LB) ne sont pas directement liés à la destruction des cellules  $\beta$  mais plutôt à la progression de la maladie en favorisant l'auto-immunité. Les LB favorisent la différenciation des LT CD8+ en LT cytotoxiques (CTL) et fournissent des signaux de survie aux LT CD8+ pour maintenir des niveaux élevés de CTL agressifs (Brodie, Wallberg et al. 2008). En effet, ils stimulent la production d'auto-anticorps dont la présentation génère une auto-réaction de LT et la maintenance des LT CD4+ mémoires. Les premiers signes cliniques du DT1 apparaissent lorsque 80 à 90 % des cellules  $\beta$  ont été détruite induisant par la suite une glycémie à jeun  $\geq 126$  mg/dL, ou une glycémie  $\geq 200$  mg/dL au cours de la journée (Association 2015, Yamaji, Harada et al. 2020) .

## 1-2- Les différents traitements du DT1

Plusieurs traitements pour le DT1 ont été développés. Ils ont pour but de remplacer dès le début de l'apparition des signes clinique de la maladie, le manque d'insuline causée par le défaut de sa sécrétion. Ces traitements sont mis en place dans le but d'atteindre la normoglycémie qui est proche de 100 mg/dL avant les repas et  $\leq 140$  mg/dL en condition post-prandiale (Santiago 2019). La normalisation de la glycémie permet ainsi d'éviter les complications aiguës et chroniques du DT1 et assurer au malade une qualité de vie optimale. L'insulinothérapie a fait l'objet de nombreuses avancées technologiques : des injections multiples d'insuline ultra-rapide jusqu'à la pompe à insuline portable couplée à des capteurs

de mesure continue de glucose. Cependant, ces traitements ne permettent pas d'éviter les complications liées au DT1 comme les maladies cardiovasculaires, les rétinopathies, les neuropathies et l'insuffisance rénale (Hirsch 2009, Atkinson, Eisenbarth et al. 2014). A côté des complications chroniques du diabète, le contrôle des complications aiguës du diabète, l'acidocétose et l'hypoglycémie sévère représentent un enjeu majeur dans le traitement du DT1. Pour cela plusieurs thérapies substitutives ont été développées comme par exemple le pancréas artificiel hybride (dispositif 780G, Diabeloop..) associant des systèmes d'analyses continue du glucose couplés à des systèmes d'administration automatique d'insuline (Saunders, Messer et al. 2019). D'autres traitements curatifs du DT1 ont été développés. La transplantation de pancréas, est considérée comme l'une des techniques de référence dans la greffe de tissus insulino-sécréteur, mais le taux de morbi-mortalité qui survient après l'intervention et la difficulté de trouver des greffons sont les principaux obstacles de ce traitement (Mittal, Johnson et al. 2014). Par ailleurs, la transplantation d'îlots de Langerhans, est une autre option de traitement du DT1 avec pour objectif le maintien chronique et continue de la capacité à contrôler la glycémie (Bottino, Knoll et al. 2018) en remplaçant les cellules bêta sécrétrices d'insuline non fonctionnelles (Corrêa-Giannella and Raposo do Amaral 2009).

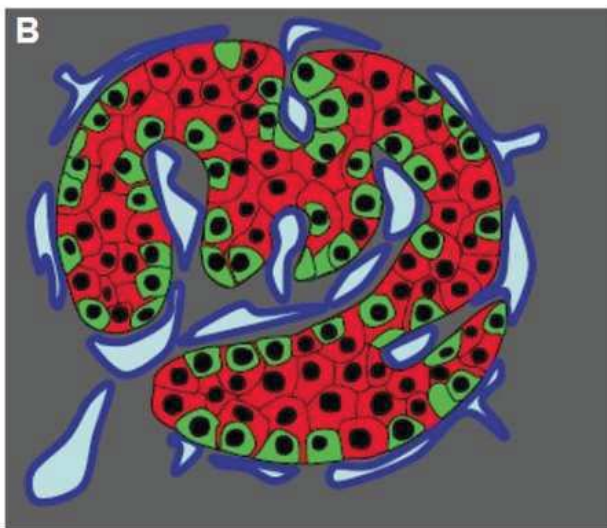
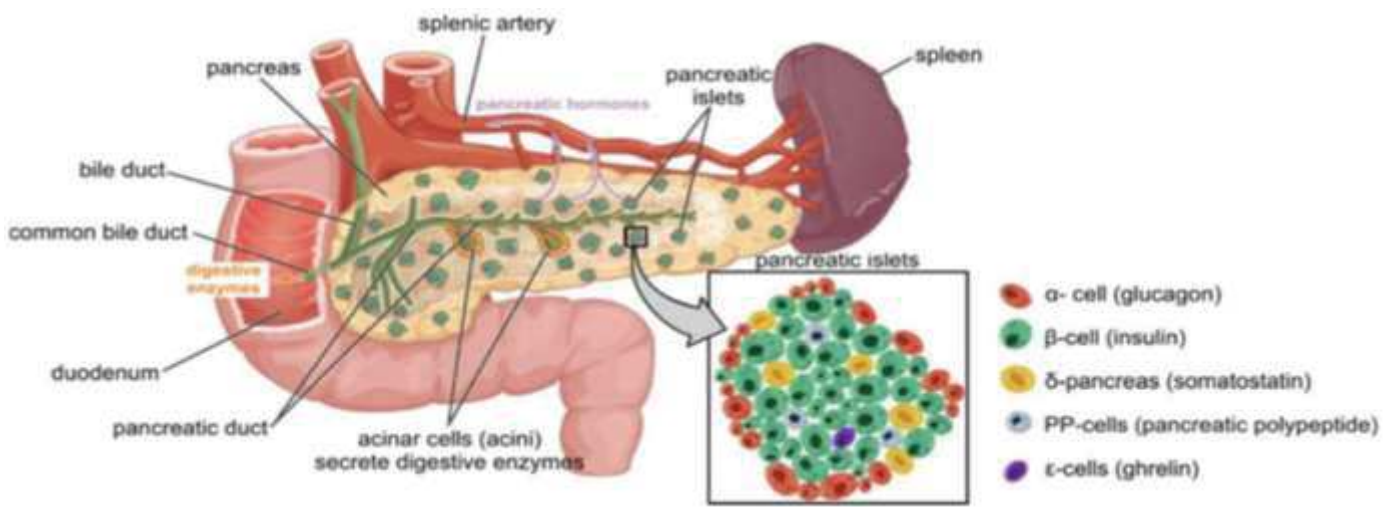
### 1-3- Structure des îlots de Langerhans : L'unité fonctionnelle de sécrétion insulinique

Le pancréas est une glande composée de deux parties aux fonctions diverses, le pancréas exocrine et le pancréas endocrine (Tando, Yanagimachi et al. 2010). La partie exocrine du pancréas représente 97% à 99% du volume pancréatique et est dotée de canaux et de cellules acineuses qui sécrètent du suc pancréatique contenant des enzymes protéolytiques telles que

la trypsine, la chymotrypsine, de l' $\alpha$ -amylase et de la lipase (Yuan, Pan et al. 2021) ( Figure 1 A). Ces enzymes sont transportées par le système de canaux pancréatiques jusqu'à l'intestin grêle, où elles ont un rôle prépondérant dans la digestion des aliments (Yuan, Pan et al. 2021). La partie endocrine du pancréas quant à elle, est constituée de 1 à 3 millions d'îlots de Langerhans qui sont encastrés (Ramírez-Domínguez 2016) et dispersés entre les composantes acinaires et canalaire dans le tissu exocrine (Henderson and Moss 1985, Goodman 2010). Les îlots représentent 1 à 3 % du volume pancréatique global (Ionescu-Tirgoviste, Gagniuc et al. 2015) et ont un diamètre d'environ 150-200  $\mu\text{m}$  et représentent moins de 2% du pancréas humain adulte. Ils sont composés de 5 types cellulaires, les cellules  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et PP (Collombat and Mansouri 2009). Les îlots sont des structures hautement vascularisées, qui reçoivent 15% des réserves de sang du pancréas (Henderson and Moss 1985, Goodman 2010). Leur endothélium est fenêtré, donc perméable ce qui favorise la libération de l'insuline dans la circulation sanguine (Zanone, Favaro et al. 2008). Les îlots régulent l'homéostasie nutritionnelle du corps en libérant des substances chimiques comme l'insuline qui est une hormone peptidique et qui a pour rôle principal la régulation du taux de glucose sanguin en agissant sur l'absorption de ce dernier par les cellules (Göke 2008). L'insuline sécrétée par les cellules  $\beta$ , agit sur l'incorporation des acides aminés dans les protéines et sur l'activation de la lipogénèse et de la glycogénèse (Biolo, Declan Fleming et al. 1995)-(Röder, Wu et al. 2016). Une autre substance sécrétée par les îlots est le glucagon, aux effets antagoniste vis-à-vis de l'insuline, et est sécrété par les cellules  $\alpha$ . Le glucagon a pour rôle d'éviter l'hypoglycémie en période de jeûne, en activant la néoglucogénèse dans le foie (Hædersdal, Lund et al. 2018). La somatostatine est aussi une hormone sécrétée par les cellules de l'îlot, les cellules  $\delta$ , et inhibe la libération du glucagon et de l'insuline et augmente la motilité de l'intestin (Da Silva Xavier 2018). Enfin, la Ghréline, qui est sécrétée par les cellules  $\epsilon$  et qui joue un rôle dans la régulation



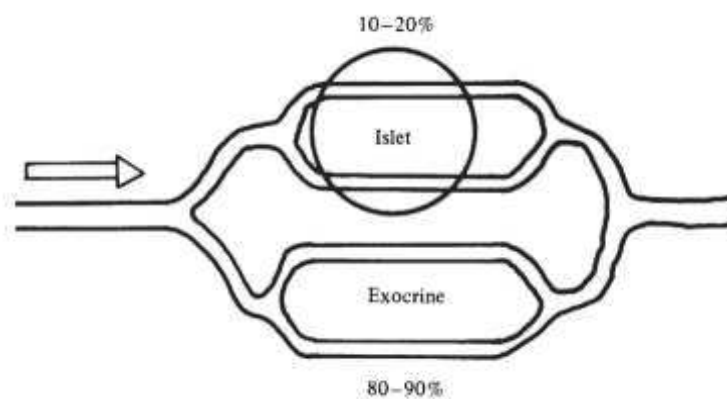
de l'appétit peut également avoir un effet inhibiteur de la libération d'insuline, de glucagon, de somatostatine (Müller, Nogueiras et al. 2015). Le polypeptide pancréatique, qui lui est sécrétée par les cellules PP régule la sécrétion endocrine et exocrine et joue un rôle dans la régulation de l'absorption et de la digestion (Roy, Sahoo et al. 2020). Morphologiquement, les cellules  $\alpha$  et les cellules  $\beta$ , qui forment la majorité des îlots pancréatiques, sont organisées en une plaque épaisse avec des vaisseaux sur chacune des faces. Le repliement de la plaque permet la formation d'une structure tridimensionnelle vascularisée en son centre et à sa périphérie. Les cellules  $\alpha$  se trouvent regroupées à la surface de la plaque, en contact direct avec les vaisseaux. Les cellules  $\beta$ , constituent la partie centrale de la plaque. Les cellules  $\beta$  assurent la sécrétion endocrine en développant des extensions cytoplasmiques qui se déroulent entre les cellules  $\alpha$  pour atteindre les vaisseaux en surface externe et interne de l'îlot ( figure 1 B) (Mühlemann 2018)



**Figure 1 : Anatomie du pancréas (A) et de l'îlot humain (B): Les cellules  $\alpha$  (vert) et les cellules  $\beta$  (rouge) et les vaisseaux (Bleu) (Mühlemann 2018)**

### 1-3-a- Anatomie vasculaire des îlots de Langerhans

Les îlots sont dotés d'un réseau capillaire cinq fois plus dense que celui du tissu exocrine. Les capillaires présents dans les îlots sont plus longs et ont une paroi plus fine (comprenant plus de fenestrations) que celle des capillaires du tissu exocrine (Henderson and Moss 1985). Les artérioles des îlots comprennent des cellules musculaires lisses et sont majoritairement composées de cellules endothéliales (Rodriguez-Diaz, Abdulreda et al. 2011). Cette vascularisation est essentielle pour l'homéostasie du glucose, non seulement car elle assure un approvisionnement en oxygène suffisant pour répondre aux besoins élevés des cellules  $\beta$ , ainsi qu'un relargage efficace des hormones sécrétées dans la circulation. Elle permet également de réguler par voie hormonale (incrétines, hormones de stress...) le fonctionnement des îlots et donc la libération des différentes hormones pancréatiques impliquées dans le contrôle de la glycémie (In't Veld and Marichal 2010).



**Figure 2 : Flux sanguin endocrinien et exocrine dans le pancréas (Henderson and Moss 1985).**

## 1-4- Fonctionnement cellulaire des cellules $\beta$ et régulation de la sécrétion d'insuline

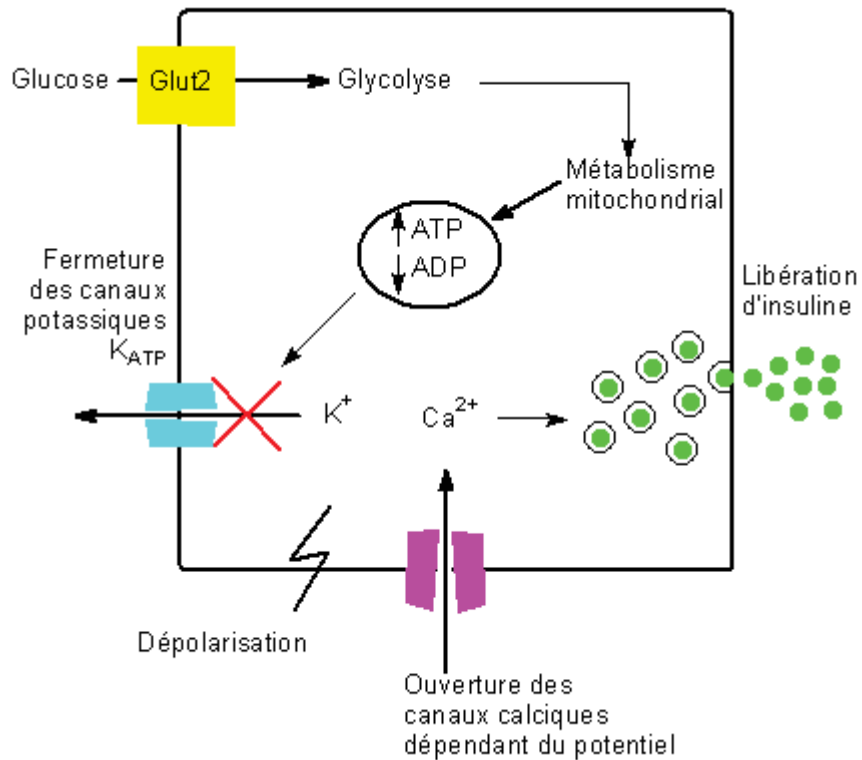
La production de l'insuline à la suite d'une stimulation par le glucose est réalisée par les cellules  $\beta$  des îlots, induisant une libération biphasique de l'insuline: un effet immédiat de courte durée et un effet prolongé (Nesher and Cerasi 2002). Les canaux jonctionnels sont des acteurs importants dans la synchronisation de sa sécrétion en permettant le passage d'ions, de métabolites, de messagers secondaires d'une cellule à l'autre (Jitrapakdee, Wutthisathapornchai et al. 2010). La stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose nécessite plusieurs étapes :

La stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose nécessite plusieurs étapes :

- sa pénétration dans la cellule  $\beta$ , pénétration par les transporteurs Glut2, indépendante de la présence d'insuline.

- sa phosphorylation par une glucokinase présente dans les cellules  $\beta$  puis sa métabolisation avec synthèse d'ATP dont la concentration intracellulaire augmente. Cette augmentation d'ATP entraîne la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants et donc l'arrêt de la sortie de potassium, ce qui entraîne une dépolarisation à l'origine de l'ouverture des canaux calcium voltage-dépendants. L'entrée du calcium provoque l'activation de phospholipases A2 et C et la sécrétion d'insuline. (Remedi, Koster et al. 2005)

### Cellule pancréatique bêta et sécrétion d'insuline



**Figure 3 : Mécanisme de sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  stimulée par du glucose (Nepton 2013)**

#### 1-5- La transplantation d'îlots pancréatiques : un traitement pour les patients atteints de DT1 avec grande variabilité glycémique

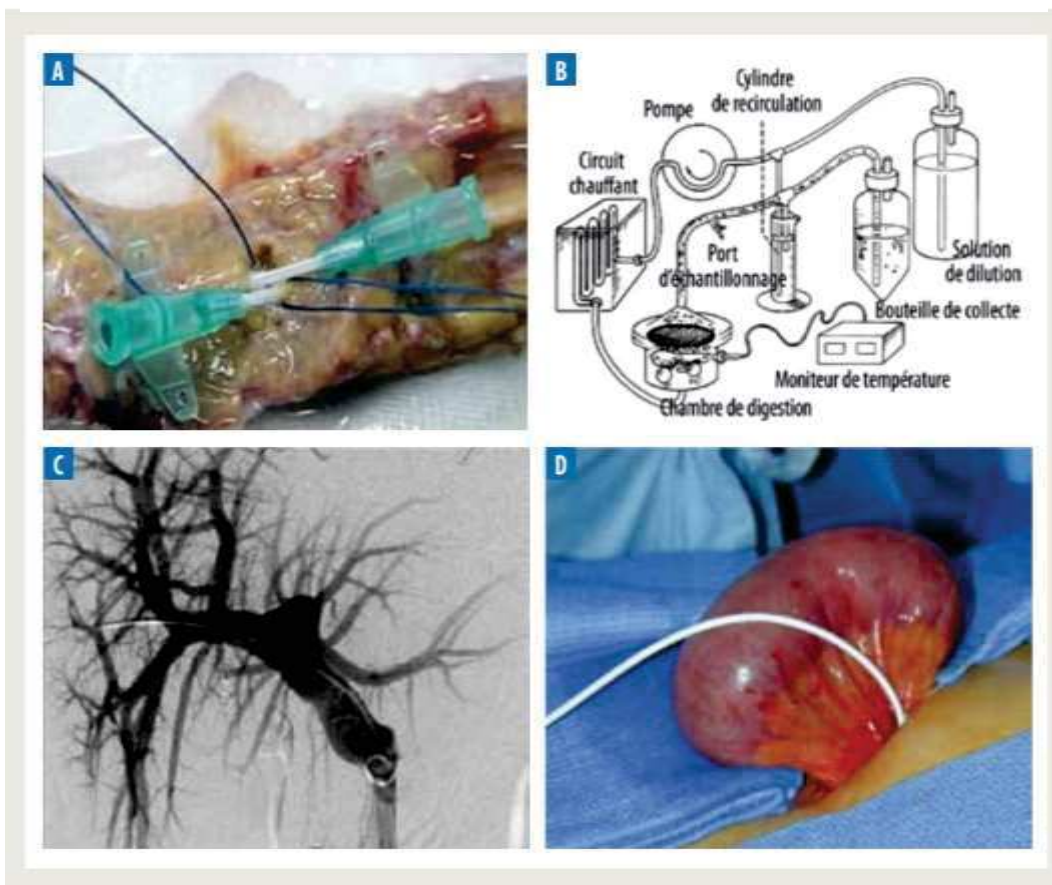
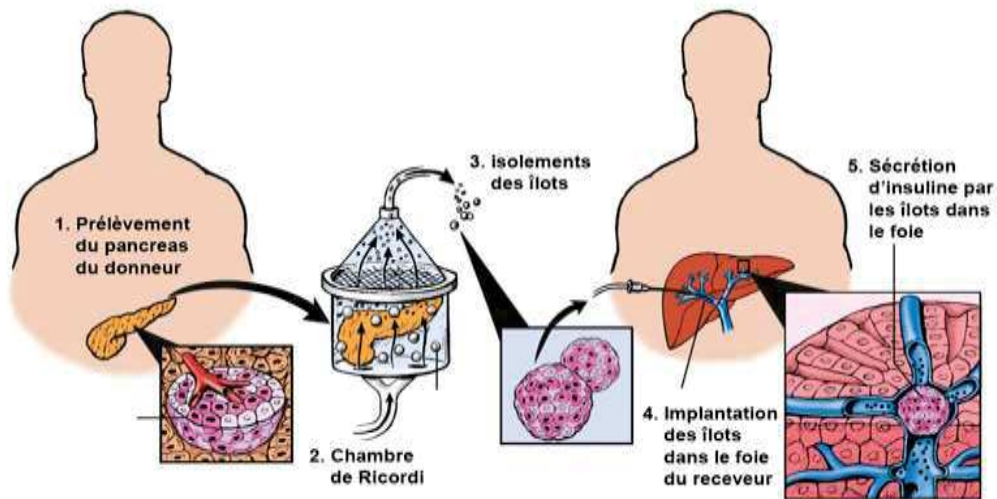
La transplantation d'îlots pancréatiques est une thérapie efficace de remplacement des cellules  $\beta$ . Cette technique a la capacité de normaliser le contrôle glycémique chez les patients atteints de DT1 (Shapiro, Pokrywczynska et al. 2017). À ce jour, plus de 5 000 patients ont subi une transplantation d'îlots dans environ 40 centres internationaux (CITR, Annual Report, 2017). La transplantation d'îlots est considérée comme une procédure à faible morbidité comparée à la greffe du pancréas (Shapiro 2011). La transplantation d'îlots est considérée comme une procédure non invasive et comme une alternative plus simple à la transplantation

du pancréas, c'est pourquoi, elle a été apparue comme un traitement prometteur pour les patients atteints de DT1 (Qi, Kinzer et al. 2014). De nos jours, le taux d'insulino-indépendance un an après une transplantation d'îlots est significativement amélioré et approche 50 à 70%, et atteint 30 à 50% cinq ans après transplantation (CITR, data 2017). Cette restauration de la sécrétion d'insuline induit une amélioration de la qualité de vie du patient ainsi qu'à une réduction des épisodes d'hypoglycémies sévères.

#### **1-5-a - Procédure et technique de transplantation d'îlots pancréatiques :**

Le prélèvement de pancréas se fait chez des donneurs en état de mort cérébrale. La qualité du greffon et la bonne préservation de la capsule pancréatique sont les principaux critères de succès du prélèvement (Iwanaga, Sutherland et al. 2008). Tout d'abord, un cathéter est introduit au niveau de l'isthme pancréatique dans le canal pancréatique, ce qui permettra d'injecter la libérase lors de l'isolement des îlots (Figure 4A). L'isolement des îlots doit être réalisé dans les 8-12 heures suite au clampage vasculaire du pancréas. Lors de l'injection de la libérase directement dans le canal pancréatique, une dissociation enzymatique est activée. La dilatation de la glande pancréatique est l'élément fondamental de cette étape. Par la suite, un circuit est relié à une chambre de Ricordi, où le pancréas sectionné sera introduit. Cette chambre sera alimentée par une pompe qui aura pour rôle de perfuser la solution contenant la libérase (figure 4B). Les îlots isolés sont ensuite purifiés du contenu exocrine par un gradient discontinu de Ficoll®. Lors de la greffe, les îlots sont injectés dans la veine porte du patient déjà cathétérisée par voie percutanée trans-hépatique sous anesthésie locale et sous contrôle radiologique (figure 4C). La technique chirurgicale de greffe d'îlots consiste à injecter les îlots après cathétérisme d'une veine mésentérique terminale, après exposition de la dernière anse grêle par incision en fosse iliaque droite (figure 4D). Les îlots sont injectés en présence d'une

solution de Ringer contenant de l'héparine pendant 30 à 45 minutes avec suivie de la pression portale afin d'éviter la thrombose portale (Shapiro, Pokrywczynska et al. 2017).



**Figure 4 : Illustration schématique de l'ensemble depuis l'isolement des îlots jusqu'à la transplantation intra-portale (d'après Kanza Benomar, 2017) (Lablanche, Vantyghe et al. 2018)**

*(A) Deux cathéters sont introduits dans le canal pancréatique principal au niveau de l'isthme pancréatique et permettent d'injecter la libérase pendant le processus d'isolement.*

*(B) Chambre de Ricordi et circuit contenant la libérase.*

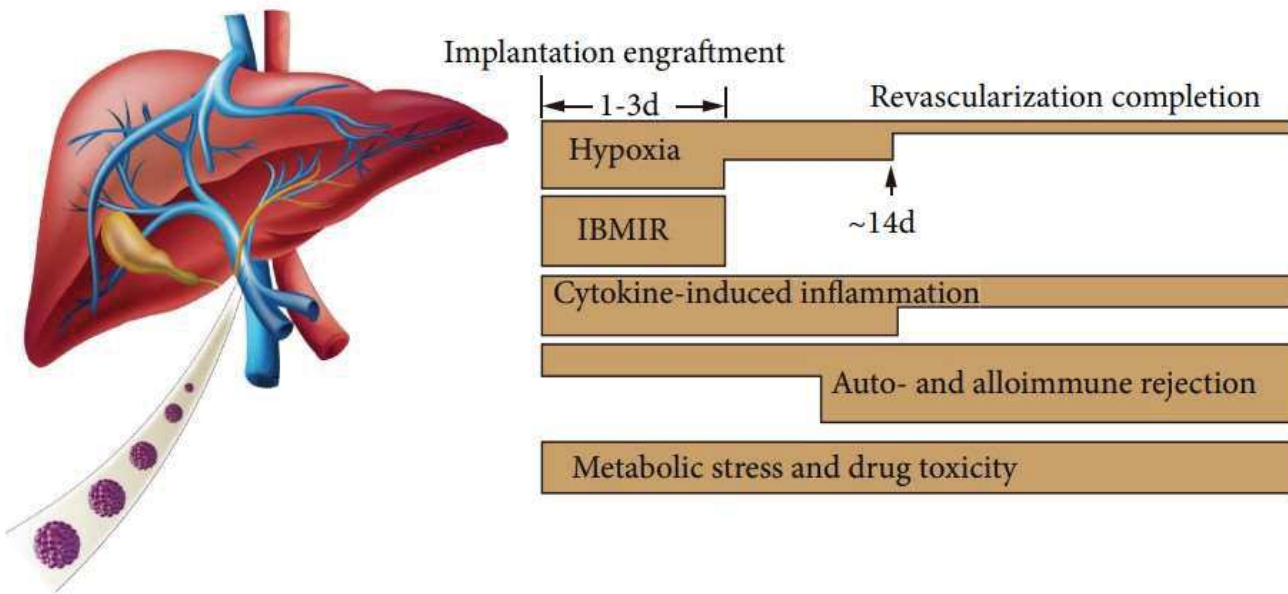
*(C) Injection intra portale des îlots par voie radiologique trans hépatique.*

*(D) Injection des îlots par voie chirurgicale*



### **1-5-b- Complications liées à la transplantation d'îlots**

Bien que la transplantation d'îlots pancréatiques ait été reconnue comme un des traitements les plus efficace pour les patients atteint de DT1, elle se heurte à des complications à court moyen et long termes (Fiorina, Shapiro et al. 2008, Shapiro, Pokrywczynska et al. 2017). Lors d'une transplantation d'îlots, il faut distinguer deux types de complications. Des complications liées à l'injection elle-même et des complications post-opératoires qui survienne après injection des îlots chez le patient. Les complications potentielles liées à l'injection sont de type hémorragiques ou thrombotiques, comme une augmentation de la thrombose portale, une apparition d'hématome et des hémorragies (Caiazzo, Vantyghem et al. 2015). En péri-greffe, l'hypoxie des cellules bêta et l'apparition d'une intense réaction inflammatoire (IBMIR, instant blood-mediated inflammatory reaction) représentent des conditions de stress cellulaire (Olsson, Olerud et al. 2011), (Kanak, Takita et al. 2014). En effet, après l'injection des îlots dans la veine porte, 60% des îlots transplantés sont détruits (non fonctionnels seulement après 1 heure après la transplantation) (Alwahsh, Qutachi et al. 2021). Plusieurs réactions survenant dès l'injection comme les lésions d'anoxie, d'ischémie-reperfusion et la réaction IBMIR. A plus long terme, peuvent apparaître les rejets auto-immuns et allo-immuns, la dysfonction chronique du greffon et la toxicité liée aux immunosuppresseurs (Li, Meng et al. 2018) (figure 5).



**Figure 5 : Chronologie des complications qui peuvent contribuer aux dommages et à la perte de fonction des îlots après transplantation (Li, Meng et al. 2018) .**

*La perte importante des îlots transplantés causée par la réaction IBMIR directement après injection et l'hypoxie qui survient dans les 24 heures après la transplantation réduisent les chances de survie des îlots et par conséquent la réussite de la transplantation.*

*En effet, cette réaction inflammatoire limite les résultats de l'injection intraportale des îlots en cas de xéno greffe, autogreffe et 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.*

### **1-5-b- I- L'hypoxie cellulaire :**

Après injection dans le foie, les îlots sont susceptibles de subir une hypoxie en raison de leur fort besoin en oxygène et de leur incapacité à neutraliser les radicaux libres (Simmons 2012). Ainsi, la survie à long terme des îlots injectés dans la veine porte nécessite une revascularisation, qui prend 10 à 24 jours en moyenne après l'injection des îlots (Bowers, Song et al. 2019) et jusqu'à trois mois pour effectuer le remodelage vasculaire (Li, Meng et al. 2018). A la phase initiale de la greffe, la survie des îlots dépend en grande majorité de la diffusion passive des nutriments et de l'oxygène en attendant que la vascularisation se développe dans les îlots. Plus le diamètre des îlots est grand, plus les cellules centrales sont vulnérables à l'hypoxie. En effet, lorsqu'on observe les îlots sous microscope inversé, les îlots semblent souvent plus sombres dans la zone centrale, en relation avec la nécrose des cellules centrales (Komatsu, Kandeel et al. 2018). Les îlots de petite taille sont le siège d'une nécrose centrale réduite pouvant améliorer la survie des greffons (Yu, Agarwal et al. 2020). L'hypoxie chronique observée durant la transplantation d'îlots de Langerhans déclenche une cascade de réactions biochimiques provoquant la production d' ROS (espèces réactives de l'oxygène) et l'induction de l'apoptose et de la nécrose intracellulaires (Li, Meng et al. 2018). De plus, l'hypoxie et la reperfusion induisent la libération de multiples médiateurs pro-inflammatoires par les îlots de Langerhans, tels que l'HMGB1 (high-mobility group box 1) qui est régulé par les lymphocytes T activés, le TNF- $\alpha$  (le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$ ), l'IL-1 $\beta$  (interleukine-1 $\beta$ ), l'IFN $\gamma$  (l'interféron gamma) et le facteur tissulaire (TF) (Itoh, Takita et al. 2012, Delaune, Lacotte et al. 2018), induisant une amplification de l'inflammation qui affecte la survie des îlots de Langerhans.

### **1-5-b-II- Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction: IBMIR**

La réaction IBMIR est un mécanisme complexe de défense et d'adaptation physiologique faisant intervenir le système immunitaire inné et adaptatif et des médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines et les ROS. La réponse inflammatoire est une des causes de l'altération précoce des îlots au cours de la transplantation. Durant l'ensemble des étapes de prélèvement jusqu'à l'implantation chez le receveur, les îlots sont soumis à de nombreuses séquences inflammatoires délétères pour leur viabilité et leur fonction. Les premiers dommages liés à une inflammation ont lieu avant le prélèvement chez le donneur au cours de l'inflammation induite par l'état de mort cérébrale (Kayton, Poffenberger et al. 2015). Celle-ci induit une « tempête cytokinique » avec une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes. La procédure d'isolement est elle-même génératrice d'un stress inflammatoire chronique sur le pancréas (Negi, Jetha et al. 2012). L'IBMIR est une réaction inflammatoire précoce non spécifique qui survient dans les 24 heures post-injection. Cette réaction est déclenchée lors du contact des îlots transplantés avec le sang de la veine porte via la sécrétion de facteur tissulaire (FT) (Johansson, Goto et al. 2006) et des cytokines par les îlots qui vont activer plusieurs réactions telles que :

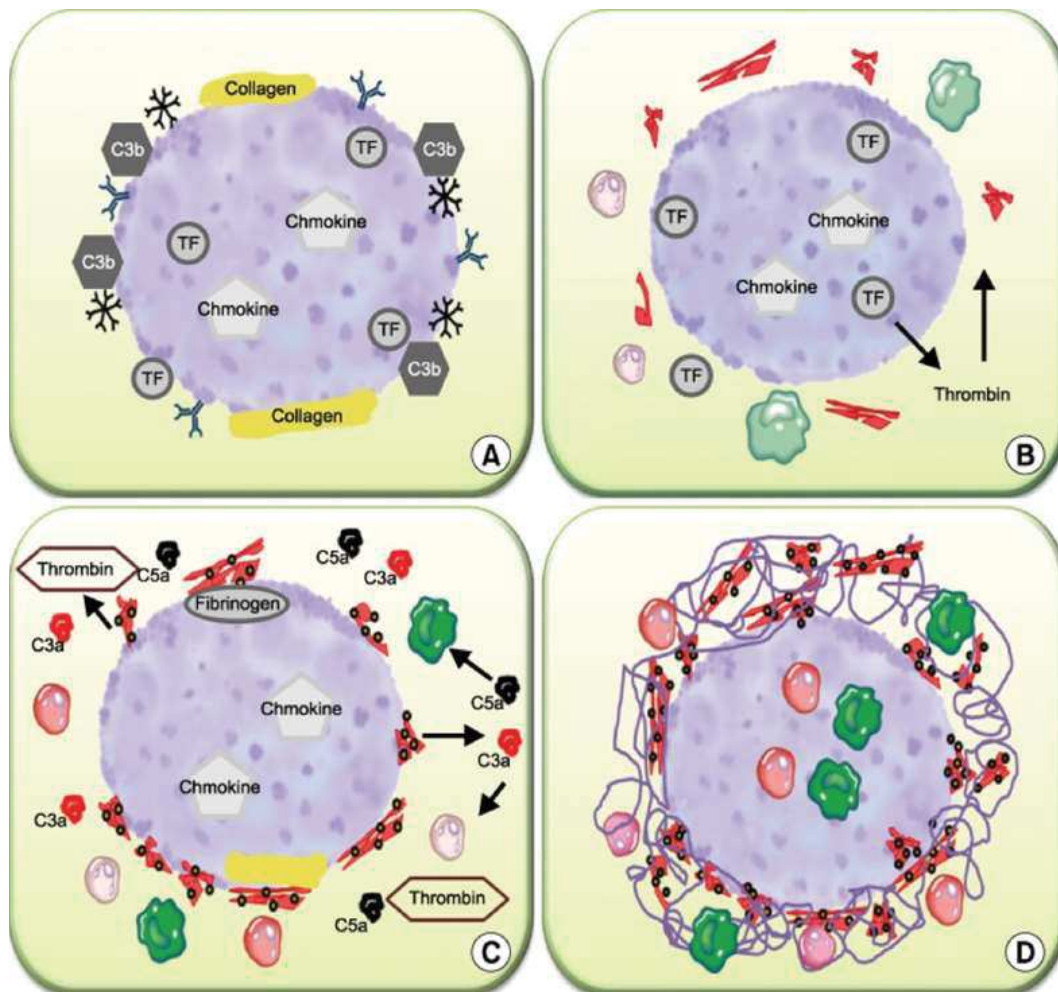
- l'activation de la cascade de la coagulation par la formation des complexes thrombine/anti-thrombine et la génération de caillots de fibrine (Naziruddin, Iwahashi et al. 2014)- (Ali and Hatipoglu 2020).

- l'activation du système du complément contribuant au recrutement des granulocytes, neutrophiles (PNN), l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion de l'endothélium et des plaquettes, la génération de ROs et de cytokines pro-inflammatoires.

- la sécrétion de chimiokines par les îlots telles que : le monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), la chemokine C-X-C motif ligand 8 (CXCL8), et la chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2) (Tan and Zhou 2005).

- l'infiltration des leucocytes et des macrophages qui libèrent des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ ) initiant l'apoptose des cellules des îlots.

Dès l'implantation des îlots, la réaction inflammatoire se poursuit. Les macrophages, les cellules de Küppfer et les neutrophiles résidents des îlots sécrètent de l'IL-1 $\beta$ , altérant ainsi la sécrétion d'insuline et induisant l'apoptose des cellules d'îlots par plusieurs mécanismes moléculaires tels que : l'activation des voies majeures de régulation des mécanismes pro-apoptotiques : nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) et Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) (Burke, Stadler et al. 2015) - (Moore, Naamane et al. 2011, Burke and Collier 2021).



**Figure 6 : Les étapes de la réaction IBMIR (Nilsson, Ekdahl et al. 2011).**

(A) Lorsque les îlots entre en contact avec le sang portal, le TF s'expose à la surface des îlots et induit l'activation du système de complément. Cela conduit alors au dépôt de C3b / iC3b sur la surface des îlots.

(B) Ces derniers processus activent le système de coagulation, qui est suivi du clivage de la prothrombine en thrombine. La thrombine génère ensuite de la fibrine et active les plaquettes.

(C) L'activation des plaquettes augmente l'affinité des intégrines GPIIb-IIIa et  $\alpha 2b1$  pour la fibrine et le collagène et par la suite les plaquettes activées se lient à la fibrine et au collagène sur la surface des îlots.

(D) Amplifiées par les plaquettes, la thrombine génère plus de fibrine en créant une capsule contenant des plaquettes, des neutrophiles et des monocytes entourant les îlots. Les facteurs chimiotactiques (p. Ex., C5a et IL-8) qui ont été libérés à la suite d'IBMIR ou libérés directement par les îlots (p. Ex. MCP-1, IL- 8, etc.) exercent leur action sur les neutrophiles et les monocytes qui infiltrent les îlots en grand nombre après 30 minutes.

### **1-5-b-III- Les réponses auto-immunes des lymphocytes T**

Les îlots transplantés sont également affectés par la pathogénèse du DT1. Après leur injection, une réexposition à un antigène identique « réveille » les cellules T auto-réactives initiales silencieuses et dotées d'une mémoire immunologique, déclenchant une attaque contre le greffon (Sutherland, Sibley et al. 1984). La fonction exacte des auto-anticorps contre les antigènes cellulaires, tels que les auto-anticorps spécifiques de la cellule à insuline (Anticorps antiGA-65, Anti IA2, Anti ZNT8) dans le développement du diabète de type 1 est inconnue, bien qu'ils soient importants dans le diagnostic et la prédiction du DT1 (Yoon and Jun 2005). Les premières études sur la réponse immunitaire après une transplantation d'îlots de Langerhans n'ont révélé aucun lien entre les anticorps autoréactifs pré-existants et le mauvais fonctionnement du greffon (Piemonti, Everly et al. 2013), mais d'autres données ont montré que les patients présentant des auto-anticorps préformés perdent leurs greffons plus tôt que les autres (Monti, Vignali et al. 2015). Les lymphocytes T autoréactifs (y compris les cellules T CD4 et CD8) jouent un rôle essentiel dans la mort cellulaire et constituent des cibles d'intervention de la thérapie (Rolandsson, Hampe et al. 2020)

### **1-5-b-IV- L'allo-immunité**

Les réponses allo-immunes après une greffe d'îlots, sont une autre cause majeure de destruction des îlots transplantés. La diversité génétique entre le donneur et le receveur détermine l'apparition de la réponse immunitaire. Le rejet causé par les lymphocytes T constitue l'élément le plus important dans l'allogreffe d'îlots. L'extrême diversité de l'antigène leucocytaire humain (HLA) est la cible des lymphocytes T CD8 du receveur (Reffet and Thivolet 2006). Que l'antigène soit présenté directement ou indirectement, l'activation des lymphocytes T est une étape critique du rejet et nécessite la coordination de trois

systèmes de signalisation (figure 7). Le premier signal (complexe peptide-CMH sur les cellules présentatrices d'antigènes), le deuxième signal (molécules co-stimulatrices telles que (B7-CD28) et (CD40-CD154)) et le troisième signal (cytokines) amplifient encore la prolifération des lymphocytes T (Enderby and Keller 2015). L'effet biologique résultant, est le recrutement de cellules immunitaires sur les greffons avec la perte de la fonction du greffon. Les patients subissant des greffes allogéniques peuvent avoir une immunité humorale, (une réponse immunitaire induite par les anticorps), pouvant également être impliquée dans le processus de rejet. Les anticorps alloréactifs sont principalement dirigés vers les molécules du CMH de classe I et du CMH de classe II. Ils comprennent des anticorps non spécifiques pré-existants à la greffe et des anticorps spécifiques du donneur (DSA). Tous deux sont reconnus comme des marqueurs pronostiques de la transplantation d'îlots. Les premières études ont montré que les auto-anticorps présents avant la transplantation, constituent un facteur prédictif négatif des résultats de la transplantation d'îlots (Olack, Swanson et al. 1997). Un taux > 15 %, avant transplantation est associé à un plus grand risque de perte de fonction du greffon (Piemonti, Everly et al. 2013)- (Campbell, Salam et al. 2007). En revanche, la corrélation entre les anticorps survenant au cours de la greffe et la fonction des îlots de Langerhans après la transplantation n'a pas été confirmée (Cardani, Pileggi et al. 2007).



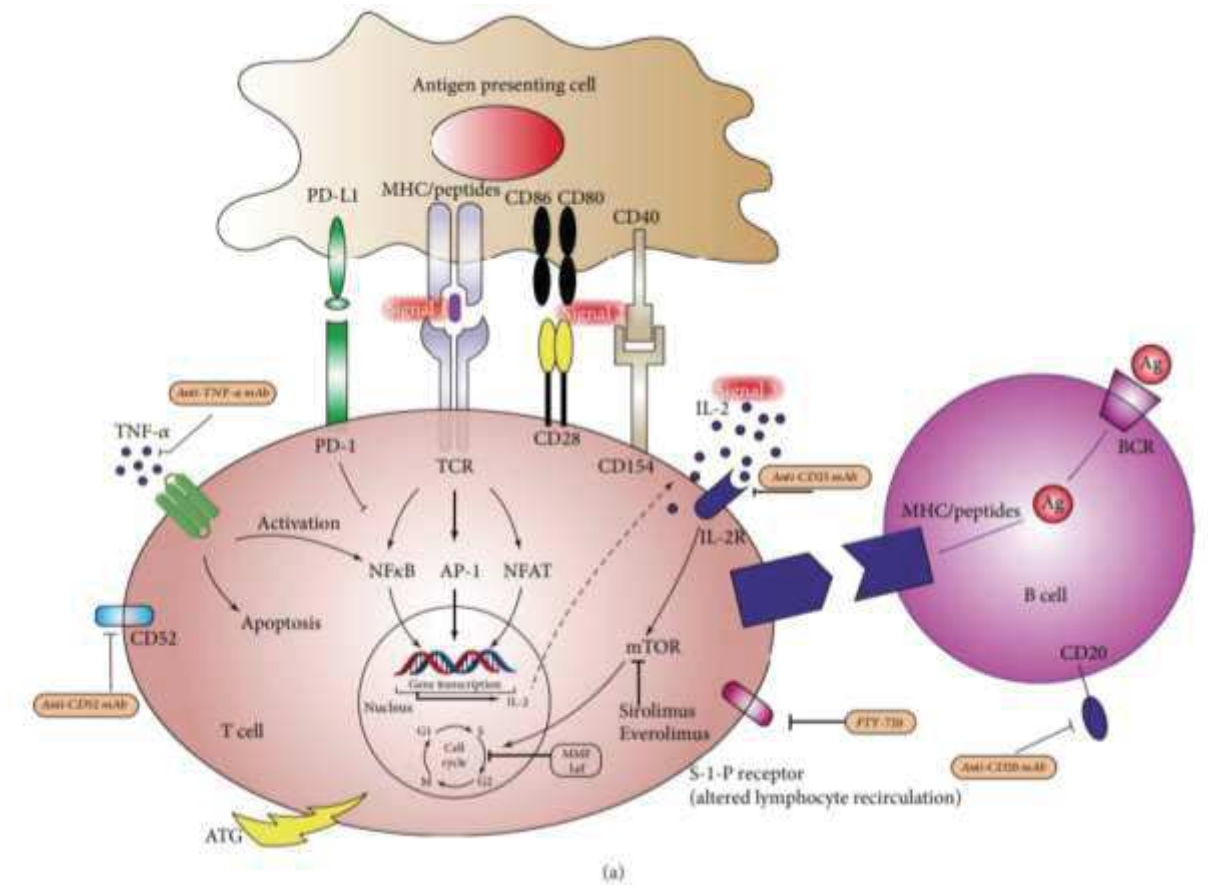


Figure 7 : Schéma des 3 systèmes de signalisation impliqués lors de l'activation des lymphocytes T après une allo-transplantation d'îlots (Li, Meng et al. 2018).

### **1-5-b-V - La toxicité liée aux immunosuppresseurs**

L'immunosuppression est un traitement indispensable pour prévenir les rejets immunologiques d'allogreffes chez les patients DT1 transplantés d'îlots de Langerhans (TIL). Les protocoles d'immunosuppression utilisés pour réaliser la TIL reposent sur une phase d'induction avant chaque injection d'îlots, suivie d'une phase d'entretien pendant toute la vie du greffon. La fréquence des effets indésirables liés à l'immunosuppression est variable. Les effets indésirables graves (néphrotoxicité, cancer) peuvent mener à l'arrêt de l'immunosuppression et à la perte du greffon. Les premiers protocoles d'immunosuppression incluaient de l'Azathioprine, de la Ciclosporine et des corticoïdes, reconnus diabétogènes et toxiques pour les îlots (Drachenberg, Klassen et al. 1999). En 2000, l'équipe d'Edmonton a été la première à décrire un taux de succès remarquable à 1 an en utilisant un cocktail d'immunosuppresseurs excluant les corticoïdes. Le traitement d'induction avec le Daclizumab ou le Basiliximab (anticorps anti- récepteur d'IL-2) a permis, par modulation de l'IL-2, la déplétion des lymphocytes T. L'immunosuppression d'entretien a été obtenue en combinant de fortes doses de Sirolimus (cible la protéine mTOR qui inhibe la réponse à l'IL-2) et de faible dose de Tacrolimus (inhibiteur de la calcineurine bloquant la production de l'IL-2) (Shapiro, Lakey et al. 2000). Ce protocole a largement contribué à développer cette thérapeutique en raison d'une bonne tolérance et des faibles effets indésirables. Cependant, la nécessité de mettre en route une immunosuppression plus puissante pour augmenter l'efficacité de la greffe a été proposée par différentes équipes. La Thymoglobuline (également connue sous le nom de globuline antithymocyte de lapin ou ATG) a été promue par Hering et ses collègues en association avec l'étanercept (inhibiteur de TNF $\alpha$ ) (Bellin, Kandaswamy et al. 2008). Depuis lors, le même groupe a montré que le traitement initial de déplétion des lymphocytes T avait un effet positif considérable sur l'insulino-indépendance à long terme, quel que soit le choix

de l'immunosuppression d'entretien (Bellin, Barton et al. 2012). L'induction par l'alemtuzumab (anticorp anti-CD52) et l'éta nercept associée au tacrolimus et au mycophénolate mofétil (Inhibiteur de l'Inosine monophosphate déshydrogénase : une enzyme qui intervient dans la fabrication d'un des constituants de l'ADN : la guanine dans les lymphocytes T était bien tolérée et associée à un taux d'indépendance à l'insuline beaucoup plus élevé après transplantation d'îlots à cinq ans (Pepper, Gala-Lopez et al. 2013). Cependant, ces traitements immunosuppresseurs sont pourvoyeurs d'effets indésirables tels que la toxicité rénale pour le tacrolimus, les infections et le risque de cancer (Bechstein 2000). De plus, le tacrolimus inhibe la sécrétion d'insuline par les îlots humains et est diabétogène (Rangel 2014). La nécessité de recourir au traitement anti-rejet constitue un obstacle majeur à l'extension de la transplantation d'îlots à l'ensemble des patients DT1. Une autre approche est l'encapsulation d'îlots à l'aide de membranes artificielles semi-pérmeables. Cette approche réduirait le besoin d'un traitement immunosuppresseur en protégeant les îlots des attaques immunitaires et en maintenant la fonction du greffon en avec le passage des nutriments nécessaires et de l'oxygène (Skrzypek, Nibbelink et al. 2018). Très peu de données existent en clinique humaine du fait de la difficulté de maintenir une vascularisation adéquate des îlots.

## 2- L'endothélium intra-insulaire : un acteur fondamental du bon fonctionnement de la revascularisation des îlots après transplantation

### 2-1- Anatomie vasculaire du Pancréas

Le pancréas possède une vaste vascularisation artérielle, qui est alimentée par des branches directes de l'aorte abdominale (tronc coélique et artère mésentérique supérieure) et représente environ 1 % du débit cardiaque. Le tronc coélique offre une vascularisation sur le bord supérieur du pancréas, puis donne naissance, caudalement à l'artère hépatique commune et à l'artère splénique. Par ses branches qui s'étendent vers la tête du pancréas, l'artère hépatique commune alimente les tissus du côté droit. L'artère splénique, quant à elle, se ramifie sur le côté gauche pour envoyer le sang artériel de l'organisme vers la queue du pancréas. Le pancréas est irrigué par l'artère mésentérique supérieure et ses branches, qui forment des arcades et une circulation collatérale des deux côtés.

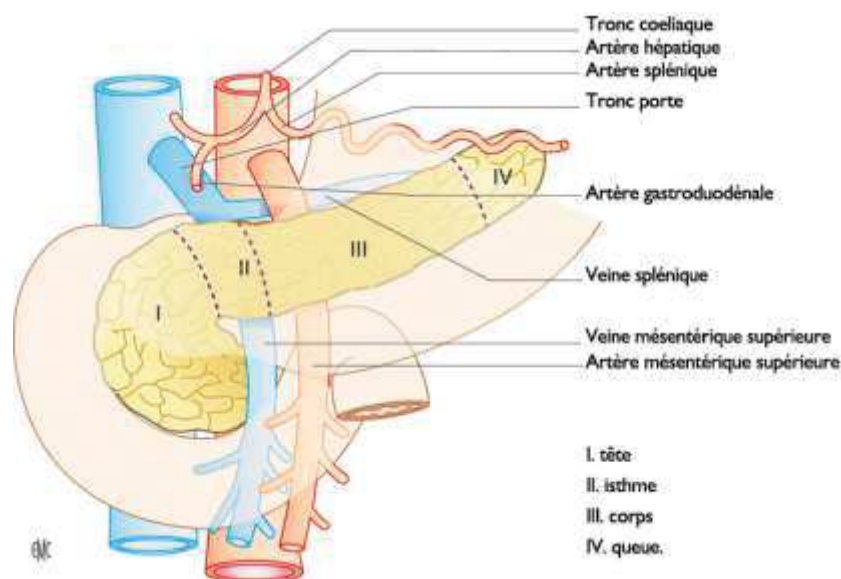
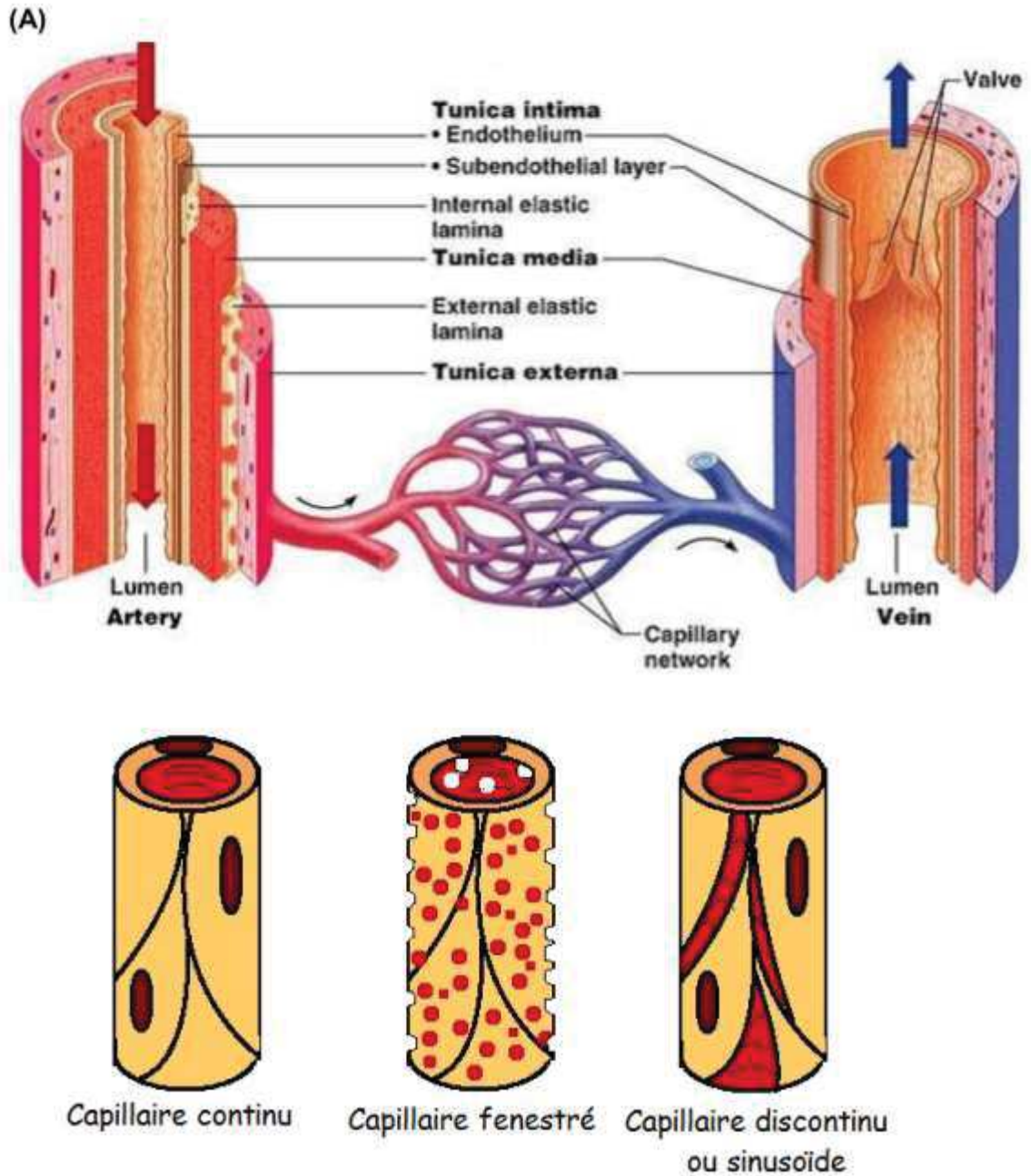


Figure 8 : Anatomie vasculaire du Pancréas (D'après l'EMC: "Radioanatomie du pancréas")

## 2-2- Structure et définition de l'endothélium

L'embryologiste Wilhelm Hirsch a utilisé le mot endothélium pour désigner la couche cellulaire recouvrant la lumière du système vasculaire et les cavités internes du corps. Par la suite, l'endothélium a été défini uniquement comme le revêtement des vaisseaux sanguins et lymphatiques (Laubichler, Aird et al. 2007), et constitue un système dispersé qui s'étend dans l'ensemble du corps humain. L'endothélium forme une paroi semi-perméable constituée d'une couche de cellules endothéliales qui sont en contact direct avec le sang et forment une barrière sélective entre la lumière du vaisseau et les tissus environnants (Yuan and Rigor 2011). Les cellules endothéliales contiennent de multiples systèmes de transport par diffusion facilitée pour les acides aminés et le glucose (Galley and Webster 2004). Les analyses en microscopie électronique ont mis en évidence l'hétérogénéité des cellules endothéliales en identifiant des différences dans les jonctions intercellulaires. Ceci a conduit à la classification de l'endothélium en trois types : i) l'endothélium continu : présent dans la plupart des artères, veines et capillaires du cerveau, de la peau, des poumons, du cœur et des muscles. Dans ce type d'endothélium, les cellules endothéliales sont structurées par des jonctions serrées et sont entourées d'une membrane basale continue. ii) L'endothélium fenestré : de façon similaire à l'endothélium continu, il est relié à une membrane basale continue mais se caractérise par l'existence de pores transcellulaires de 50-60 nm de large. Cette structure est très importante dans les tissus avec un transport trans-endothélial élevé, comme les glandes endocrines et exocrines. iii) l'endothélium discontinu : est associé à une membrane basale mal structurée où se trouvent de grandes fenestrations de 100-200 nm de large. Ce type d'endothélium est en grande majorité présent dans le foie, la rate et la moelle osseuse (Aird 2007).

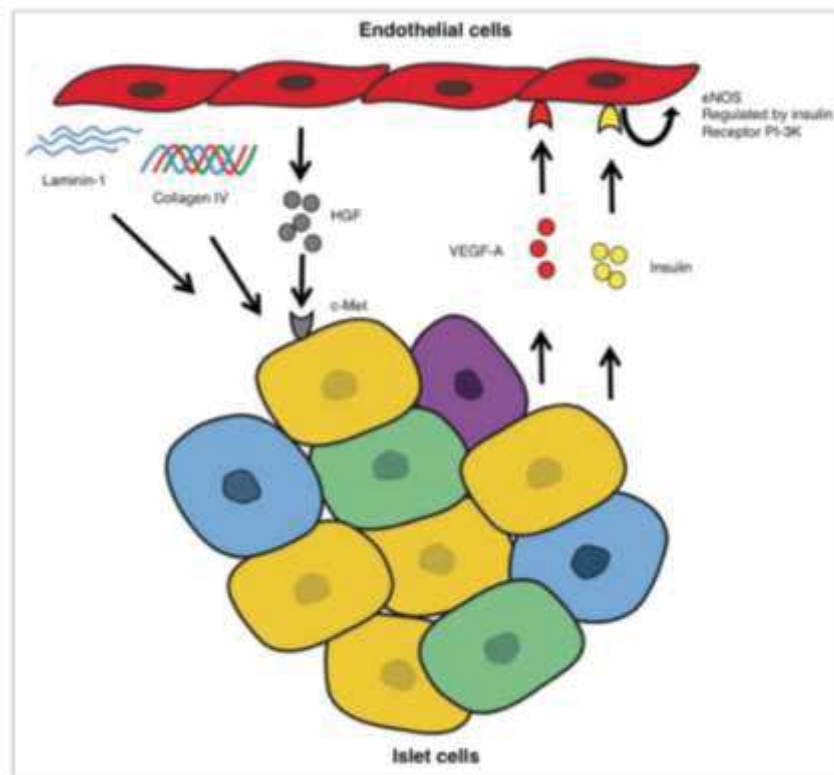


**Figure 9: Les 3 types endotheliums** (Adopted from Wayne W. La Morte, MD, PhD, MPH, Boston University School of Public Health)

## 2-3- Interactions cellulaires entre l'endothélium et les îlots pancréatiques

L'endothélium des vaisseaux sanguins et les îlots ont un lien très fort dès l'organogenèse du pancréas grâce aux signaux émis par l'endothélium. L'endothélium régule le flux sanguin, l'angiogenèse, la formation et la sélectivité des barrières immunologiques entre le sang et les tissus pancréatiques (Cano, Hebrok et al. 2007). Chaque îlot bénéficie d'un vaste approvisionnement vasculaire, avec au moins deux ou trois artérioles afférentes formant de nombreux capillaires à l'intérieur du cœur de l'îlot pour fournir tous les nutriments essentiels et l'oxygène. De même, les hormones libérées sont drainées de l'îlot par les capillaires et les petites veinules vers la circulation générale (Dolenšek, Rupnik et al. 2015). L'endothélium des vaisseaux des îlots est formé de cellules endothéliales fenestrées. Ces fenestrations se forment en réponse au stimulus du facteur de croissance endothélial vasculaire-A (VEGF-A) et de l'angiopoïétine-1 qui sont directement sécrétés par les différentes cellules de l'îlots (Jabs, Franklin et al. 2008). De plus, les cellules endothéliales sécrètent le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF-2) et le facteur de croissance hépatocytaire (HGF), qui ont un effet sur les cellules  $\beta$  en améliorant leur capacité à produire et à sécréter de l'insuline (Alvarez-Perez, Ernst et al. 2014)- (Rivas-Carrillo, Soto-Gutierrez et al. 2007). En outre, l'induction d'une mutation pour le VEGF-A ou le HGF chez des animaux, entraîne l'apparition d'anomalies des vaisseaux des îlots à sécréter de l'insuline (Jabs, Franklin et al. 2008) - (Demirci, Ernst et al. 2012). Il existe aussi une interaction des îlots et l'endothélium avec les composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, le collagène IV, la laminine-1 et la fibronectine. Les composants de la matrice extracellulaire induisent d'importants changements épigénétiques, qui incluent l'induction de l'expression du gène de l'insuline, la stimulation de la réplication des cellules et la régulation de la sécrétion de plusieurs facteurs paracrines

(Stendahl, Kaufman et al. 2009) (Figure 10). Enfin, l'endothélium joue un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires contre les îlots, qui conduit soit à une destruction auto-immune ou allo-immune, soit à une tolérance des cellules  $\beta$  (Stendahl, Kaufman et al. 2009).



**Figure 10 : Description des interactions entre les cellules endothéliales et les cellules des îlots de Langerhans (Del Toro-Arreola, Robles-Murillo et al. 2016).**

*L'insuline régule le monoxyde d'azote synthétase endothéliale (eNOS), qui facilite la génération de monoxyde d'azote (NO). À la surface des cellules endothéliales, le VEGF-A induit la formation de capillaire et de leurs fenestrations. En stimulant la prolifération des cellules  $\beta$ , le HGF produit par l'endothélium maintient à la fois la libération d'insuline stimulée par le glucose, et la masse des cellules  $\beta$ . Les cellules endothéliales génèrent des composants de la MEC telles que les laminines, les collagènes et la fibronectine, qui favorisent la prolifération*



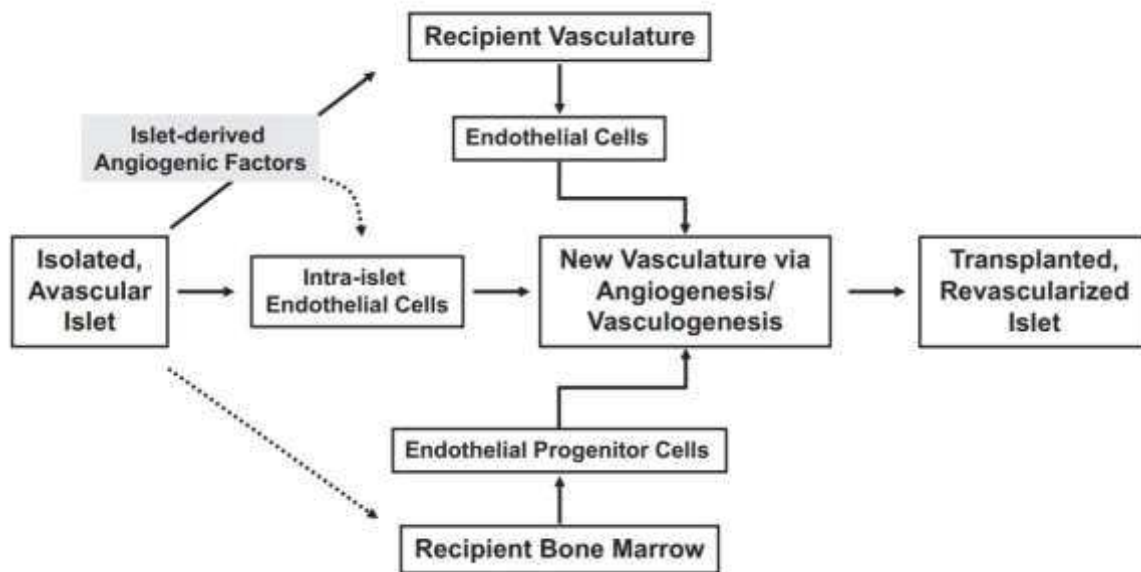
*des cellules  $\beta$ , le maintien du phénotype de différenciation et, finalement, une plus grande synthèse d'insuline.*

## **2-4- Mécanisme de revascularisation des îlots pancréatiques après transplantation**

Les cellules endothéliales impliquées dans la revascularisation et la génération de nouveaux capillaires dans les îlots transplantés proviennent de trois sources (figure 11). La première source est les cellules endothéliales du receveur de la greffe, qui sont recrutées dans le greffon d'îlots. La deuxième source est les cellules endothéliales intra-insulaires du donneur, qui existent en grand nombre dans les îlots isolés et peuvent représenter jusqu'à 40 % des cellules endothéliales qui tapissent les capillaires d'un greffon revascularisé (Aird 2007), (Nyqvist, Köhler et al. 2005). Les cellules dérivées de la moelle osseuse du receveur, constituent une troisième source, probablement mineure, de cellules endothéliales (Contreras, Smyth et al. 2003), (Miller, Cirulli et al. 2008). Les vaisseaux fonctionnels d'un greffon revascularisé sont chimériques, constitués à la fois de cellules endothéliales du receveur de la greffe et de cellules endothéliales intra-insulaire du donneur. Les facteurs produits par les îlots transplantés stimulent ou recrutent les cellules endothéliales des trois sources potentielles dans le greffon incluent le VEGF-A (2) mais d'autres molécules pro- ou anti-angiogéniques peuvent également jouer un rôle. La formation de nouveaux vaisseaux nécessite également un remodelage vasculaire impliquant la membrane basale, les cellules de soutien vasculaire telles que les péricytes, et la matrice extracellulaire. La revascularisation des îlots transplantés pourrait être améliorée ou accélérée par plusieurs types d'interventions. Une approche consisterait à augmenter l'action des facteurs pro-angiogéniques ou à inhiber les facteurs anti-angiogéniques et ainsi stimuler la prolifération, la migration et la maturation des cellules

endothéliales en vaisseaux fonctionnels. Cette approche a connu un certain succès (Lai, Schneider et al. 2005)- (Zhang, Richter et al. 2004), mais il est probable que la formation optimale d'une vascularisation mature et pleinement fonctionnelle des îlots nécessitera un contrôle précis de la cinétique, de la dose et de la durée de l'action des facteurs angiogéniques dans la période post-transplantation. Une deuxième approche pourrait cibler directement les cellules endothéliales ou améliorer leur capacité à former des vaisseaux matures et fonctionnels et pourrait impliquer l'ajout de cellules endothéliales pré-activées ou d'un certain type de population de cellules progénitrices endothéliales. Ces deux approches pourraient être applicables aux îlots isolés avant la transplantation ou, pourraient être utilisées pour préparer le site de transplantation avant la transplantation d'îlots isolés. Johansson et al. (Johansson, Rasmusson et al. 2008) proposent une nouvelle approche utilisant l'ingénierie tissulaire pour améliorer la revascularisation des îlots. Ces chercheurs apportent la preuve que la coculture de cellules souches mésenchymateuses (CSM) et de cellules endothéliales avec des îlots humains *in vitro* avant la transplantation, initie la formation de structures vasculaires qui peuvent favoriser la prise de greffe d'îlots après la transplantation. Johansson et al. ont purifié des CSM à partir de moelle osseuse humaine saine en utilisant des marqueurs de surface cellulaire, et ont découvert que les CSM ou les facteurs produits par ces cellules favorisaient la prolifération et la migration des cellules endothéliales et le "revêtement" des îlots de culture par des cellules endothéliales (Johansson, Rasmusson et al. 2008). En utilisant un système *in vitro* pour étudier l'angiogenèse, ces chercheurs ont démontré que la co-culture de CSM, de cellules endothéliales et d'îlots de Langerhans favorisait la migration de cellules endothéliales exogènes dans les îlots de Langerhans en culture, la formation de structures chimériques ressemblant à des vaisseaux entre les cellules endothéliales endogènes intra-îlots de Langerhans et les cellules endothéliales ajoutées à la culture d'îlots de Langerhans, et la

formation de nouveaux vaisseaux qui « poussent » à partir des îlots de Langerhans. Les cellules endothéliales d'origine microvasculaire prélevées dans le derme humain, qui sont probablement plus réceptives aux signaux de remodelage émis par les CSM, constituent un élément majeur et peut-être essentiel de ces études. Ces CSM et ces cellules endothéliales microvasculaires pourraient probablement être prélevées et développées à partir de la moelle osseuse ou du tissu adipeux de patients sélectionnés pour recevoir une greffe d'îlots. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour définir les ligands, les récepteurs et les mécanismes responsables de ces effets, mais Johansson et al. supposent que les protéases des CSM peuvent dégrader la matrice extracellulaire des îlots et permettre ainsi la migration des cellules endothéliales qui ont été stimulées par des facteurs de croissance tels que le VEGF-A produit par les CSM (Brissova and Powers 2008).



**Figure 11 : Revascularisation des îlots après une transplantation** (Brissova and Powers 2008) :

*Les cellules endothéliales de trois sources (cellules endothéliales du receveur au site de la transplantation, cellules endothéliales intra-îlot et cellules progénitrices endothéliales de la moelle osseuse) contribuent à la revascularisation. La ligne pointillée fait référence à des processus ou des facteurs non encore définis.*

## 2-5- Rôle des cellules endothéliales dans le processus de revascularisation des îlots après transplantation

Comme décrit précédemment, au moins quatorze jours sont nécessaires pour achever le processus de revascularisation des îlots après leur injection dans la veine porte du patient (Pepper, Gala-Lopez et al. 2015)- (Brissova, Fowler et al. 2004). La survie, la prise de greffe et la fonction des îlots transplantés dépendent en grande majorité de la rapidité avec laquelle la revascularisation va être effectuée (Pepper, Gala-Lopez et al. 2013). A l'état normal, lorsque les îlots sont injectés dans un vaisseau sanguin sinusoidal, la perfusion et l'apport d'oxygène à l'intérieur des îlots sont considérablement réduits en comparaison avec les îlots d'origine. La revascularisation de ces îlots transplantés dans le foie peut également modifier la structure cellulaire des cellules endothéliales et des composants de la matrice extracellulaire. Les vaisseaux nouvellement formés après la transplantation proviennent principalement des cellules endothéliales résidant dans les îlots et se connectent à l'endothélium du receveur en devenant des vaisseaux chimériques. Les interactions avec des facteurs angiogéniques, tels que le FGF-2 et le VEGF, accélèrent le processus d'attraction des cellules endothéliales induisant par la suite une prolifération et une différenciation qui conduit à la constitution d'un réseau néo-vasculaire sur le site de la transplantation (Pepper, Gala-Lopez et al. 2015). Les cellules endothéliales intra-insulaires jouent un rôle majeur dans le processus de revascularisation après transplantation. Le stress qui survient lors du processus de l'isolement des îlots du pancréas induit la perte et le dysfonctionnement de la plupart des cellules endothéliales intra-insulaires de l'îlot. Le processus d'isolement des îlots est extrêmement délétère pour les cellules endothéliales intra-insulaires (Del Toro-Arreola, Robles-Murillo et al. 2016). Afin de palier au dysfonctionnement intra-insulaire, la co-transplantation d'îlots et de

précurseurs endothéliaux a été proposée. L'utilisation de précurseurs angiogéniques issus de la moelle osseuse ou de précurseurs endothéliaux qui subiront une différenciation, contribueraient ainsi au rétablissement du réseau vasculaire des îlots transplantés (Quaranta, Antonini et al. 2014).

En conclusion, la revascularisation des îlots est une étape critique dans leur survie conditionnant ainsi la réussite ou l'échec de la transplantation. Une transplantation d'îlots est considérée comme optimale lorsqu'elle fournit un apport adéquat en oxygène et en nutriments au îlots transplantés. Ceci nécessite la préservation de l'endothélium intra-insulaire et de la matrice extracellulaire.

## 2-6- Rôle des cellules sinusoidales hépatiques dans le processus de revascularisation des îlots après transplantation

Le remodelage du tissu hépatique au cours de la greffe d'îlots incluant l'implantation du greffon et sa reconnexion à la circulation systémique est un événement complexe faisant intervenir la vascularisation du tissu et la structure même de l'arrangement cellulaire hépatique. Le recrutement leucocytaire est certainement modulé par les taux sanguins dans la veine porte d'immunosuppresseurs considérablement plus élevés que dans la circulation systémique (Marzorati, Melzi et al. 2014). L'insulino-indépendance chez les receveurs par la restauration d'une sécrétion physiologique portale endogène de l'insuline, témoigne d'une revascularisation efficace de l'îlot. La tension en oxygène est plus faible dans le foie que celle des vaisseaux intra-insulaires pancréatiques. Les cellules du foie sont fortement impliquées dans la réaction pro-coagulante et proinflammatoire intravasculaire qui caractérisent l'IBMIR. L'IBMIR provoque le stress oxydant des CE sinusoidales (SCE), conduisant au recrutement et à l'activation des cellules de Kupffer, les cellules macrophagiques du foie, des plaquettes et des

troubles de la microcirculation. Dans la phase précoce dès les 2 premières heures, les dommages hépatiques sont causés par ce stress oxydant. La phase tardive (6-24 h) est caractérisée par le recrutement hépatique des leucocytes et des macrophages. Ils adhèrent à des SEC exprimant des molécules d'adhésion (E- sélectine, P-sélectine, ICAM-1, VCAM-1) et sécrètent des chimiokines (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ ) en réponse à l'hypoxie et au stress oxydant. Des agrégats plaquettaires adhèrent aux SCE lésées dès les 20 premières minutes de reperfusion post-ischémique, favorisé par le recrutement des cellulaires inflammatoires ce qui conduit à une altération microcirculatoire et un remodelage hépatique (Teoh, Ajamieh et al. 2014). L'augmentation transitoire de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) est observée pour la moitié des receveurs transplantés d'îlots avec un pic à 7 jours post-transplantation (Rafael, Ryan et al. 2003), témoignant d'une agression des cellules du tissu hépatocytaire. A distance, la stéatose hépatique, c'est à dire accumulation des triglycérides dans les hépatocytes, est fréquemment décelée chez 20% des patients greffés d'îlots probablement secondaire aux concentrations élevées d'insuline au niveau du foie. Histologiquement, contrairement à l'IBMIR, la stéatose est majoritairement macrovasculaires et un infiltrat lymphocytaire peut s'y associer (Eckhard, Lommel et al. 2004). Cette lipotoxicité est en relation avec un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  et est prévenue par la leptine, qui limite la lipogenèse hépatique et améliore significativement la fonction des îlots greffés (Lee, Ravazzola et al. 2007). Chez l'homme, la caractérisation histologique du remodelage tissulaire induit par une potentielle ischémie post-greffe est limitée par le manque d'information des biopsies hépatiques, les îlots étant embolisés dans l'ensemble du foie. En conclusion, les données histologiques sur le retentissement hépatocytaire de la greffe d'îlots sont parcellaires chez l'homme et peu d'études existent dans les modèles de greffe chez le grand animal. Dans ce contexte, le remodelage du tissu hépatique et ses conséquences

systemiques doivent donc être envisagés comme alternative aux biopsies afin d'identifier par un marqueur circulant les dommages tissulaires et vasculaires.

### 3- La Transition endothélio-mésenchymateuse (EndTM) :

#### 3-1-Définition

La transition endothéliale-mésenchymateuse (EndTM) est un processus durant lequel les cellules endothéliales perdent progressivement leur phénotype endothélial pour acquérir des caractéristiques mésenchymateuses semblables à celles des fibroblastes (Medici and Kalluri 2012). L'EndTM se caractérise par une augmentation de la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) comme la fibronectine et les collagènes de type I et III, accompagnée d'une diminution des marqueurs endothéliaux (VE-cadhérine, facteur de von Willebrand (vWF), CD31) et d'une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux tels que l' $\alpha$ -SMA, la vimentine et la N-cadhérine. Les changements phénotypiques observés durant la EndMT s'accompagnent d'une restructuration du cytosquelette induisant une modification de la polarité des CEs, et donnant lieu à une morphologie " fusiforme " de type fibroblastique. Les CEs, au cours de la transition, perdent leurs connexions intercellulaires et développent des capacités de migration et d'invasion (Li and Bertram 2010). La diminution de l'expression des marqueurs endothéliaux et l'augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux sont principalement contrôlés par plusieurs facteurs de transcription (Arciniegas, Frid et al. 2007). Plusieurs études ont été réalisées entre la fin des années 1970 et le début des années 1990, dans le but d'étudier le rôle physiologique de l'EndTM aux stades embryonnaires. Il a été démontré que l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les CEs induit une altération de la structure de plusieurs organes impliqués dans le développement cardiaque, tels que l'épaississement de la paroi aortique et une altération du développement des artères



pulmonaires (Arciniegas, Neves et al. 2005) (Arciniegas, Sutton et al. 1992)-(Krug, Runyan et al. 1985) (Arciniegas, Ponce et al. 2000). De plus, Frid et al. ont démontré que l'EndTM pouvait également se produire chez les adultes (Frid, Kale et al. 2002). Ils ont montré *in vitro* que les cellules endothéliales (CEs) de bovins adultes, exprimant des marqueurs endothéliaux comme la VE- Cadhérine, le CD31 et le vWF, subissaient une EndTM après stimulation avec du TGF- $\beta$  et se différencient en cellules musculaires lisses (SMC) qui sont des cellules d'origine mésenchymateuse. Par conséquent, la EndTM chez les adultes a été étudiée au cours de la dernière décennie dans le contexte de l'apparition de situations pathologiques. En effet, il a été démontré que la EndTM est impliquée dans plusieurs conditions pathologiques tels que la progression du cancer et le développement de la fibrose d'organes (foie, poumons, cœur, rein) (Zeisberg, Tarnavski et al. 2007), (Choi, Hong et al. 2015, Ribera, Pauta et al. 2017). De plus, Zeisberg et al. ont rapporté la première preuve que l'EndTM favorise la croissance et la progression des tumeurs (Zeisberg, Potenta et al. 2007), de plus dans une étude *in vivo* sur des souris, le même groupe a démontré que la fibrose cardiaque survient suite une réaction d'EndTM (Zeisberg, Tarnavski et al. 2007).

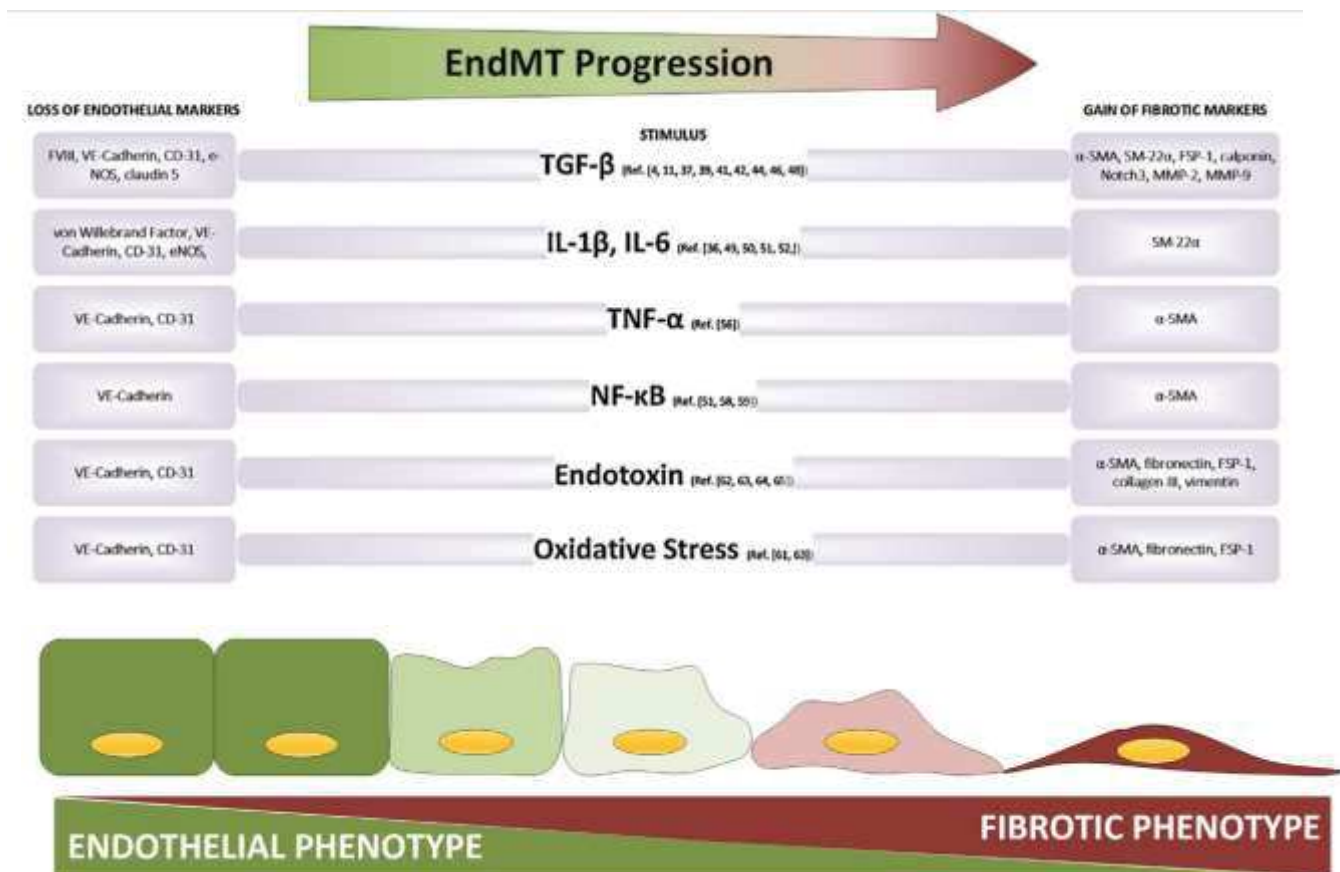
Stimuli	Endothelial markers	Mesenchymal markers	Endothelial cell types	Positive regulator of EndMT
TNF- $\alpha$	VE-cadherin	N-cadherin	LEC	ZEB1 and $\beta$ -catenin
TNF- $\alpha$	VE-cadherin, CD31, eNOS	$\alpha$ -SMA and MMP-9	PAVEC and eQEE	Akt/NF- $\kappa$ B, Snail, Slug, TGF $\beta$ , Notch1, and BMP-4
IL-1 $\beta$	vWF	$\alpha$ -SMA, collagen I, and calponin	HDMEC	Non determined
IL-1 $\beta$	Non determined	SM22 $\alpha$	HUVEC	pSmad2 and TGF $\beta$ 2
IL-1 $\beta$	Non determined	Cell shape change and actin cytoskeleton	CECs	PI3K
TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and TGF $\beta$ 1	VE-cadherin, CD31, and vWF	$\alpha$ -SMA, FSP-1, vimentin, N-cadherin, and fibronectin	HIMEC	Sp1
TGF $\beta$ 2 and IL-1 $\beta$	CD31, vWF, and VE-cadherin	SM22 $\alpha$ , FSP-1, collagen 1 A2, vimentin, and $\alpha$ -SMA	HEMEC	Snail
TGF $\beta$ 2 and IL-1 $\beta$	eNOS and vWF	SM22 $\alpha$ , calponin	HUVEC	NF- $\kappa$ B
TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and TGF $\beta$ 1	vWF, CD31, VE-cadherin, and Occludin	Calponin, $\alpha$ -SMA, and collagen I	PAECs	Non determined
High glucose	CD31 and VE-cadherin	$\alpha$ -SMA, $\alpha$ -SMA, FSP-1, and fibronectin	GEnC	TGF $\beta$ , pSmad2/3, Snail, ROCK1, NOD1, MEK/ERK, SRF, and Snail
High glucose	CD31 and VE-cadherin	$\alpha$ -SMA, FSP-1, collagen I, collagen III, and MMP-2/9	HAEC	Angiotensin II, Snail, and PARP-1
High glucose	VE-cadherin and CD31	$\alpha$ -SMA, collagen I, FSP-1, vimentin, and MMP-2/9	HUVEC	TGF $\beta$ 1, ERK, pSmad2/3, and MAPK (p38 and ERK)
High glucose	VE-cadherin	FSP-1 and collagen I	HUVEC and HAEC	ET-1, TGF $\beta$ 1, pSmad3, pAKT, and Snail
ox-LDL + Radiation	VE-cadherin and CD31	$\alpha$ -SMA, FSP-1, and vimentin	HAEC	Non determined

**Table 1: Etudes d'induction de EndTM dans différents types cellulaires (Cho, Lee et al. 2018).**

### 3-2- La transition des cellules endothéliales en cellules mésenchymateuses dans les conditions inflammatoires

La fibrose est une lésion non spécifique d'un organe, caractérisée par le développement de la MEC associée à la multiplication des fibroblastes déjà présente et de ceux générés après la transition des cellules endothéliales en cellules mésenchymateuses, c'est-à-dire, l'acquisition par les cellules endothéliales de propriétés et de marqueurs des fibroblastes (Piera-Velazquez, Li et al. 2011). En général, la fibrose se développe le plus souvent suite à un processus inflammatoire marqué par l'afflux dans le tissu de leucocytes circulants et tissulaire. Ces cellules vont libérer des cytokines et des facteurs de croissance dont le principal est le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) qui entament le processus de fibrose. La fibrose est également induite par l'augmentation locale de peptides vasoactifs comme l'angiotensine II et

l'endothéline-1 (ET-1) (Schuppan, Ruehl et al. 2001, Lee and Kalluri 2010). Compte tenu de l'interaction inévitable entre les CEs et les médiateurs de l'inflammation circulant dans le sang, les CEs deviennent une cible de l'EndTM. Les conditions inflammatoires sont initiées par des molécules plasmatiques, appelées médiateurs de l'inflammation, qui déclenchent la réponse inflammatoire en agissant localement ou de manière systémique. Les médiateurs de l'inflammation sont principalement composés de cytokines pro-inflammatoires, de facteurs de croissance, de ROS et d'endotoxines bactériennes. En effet, il a été démontré que certains de ces composants sont capables d'induire une EndTM et de transformer les CEs en cellules mésenchymateuses (figure 12). Ainsi, un lien entre les conditions de l'inflammation et l'apparition de l'EndTM a été établi (Pérez, Muñoz-Durango et al. 2017). Des observations réalisées au milieu des années 1980 ont montré que les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) exposées à des surnageants de leucocytes mononucléaires activés du sang périphérique, présentaient des altérations morphologiques, décrites comme présentant un aspect fibroblastique tranchant avec l'aspect typiquement retrouvé des pavés endothéliaux. De plus, ce changement s'est accompagné d'une augmentation de la production de protéines de la MEC, démontrant pour la première fois une interconnexion entre les stimuli inflammatoires et l'apparition de caractéristiques associées à l'EndTM (Montesano, Mossaz et al. 1984).

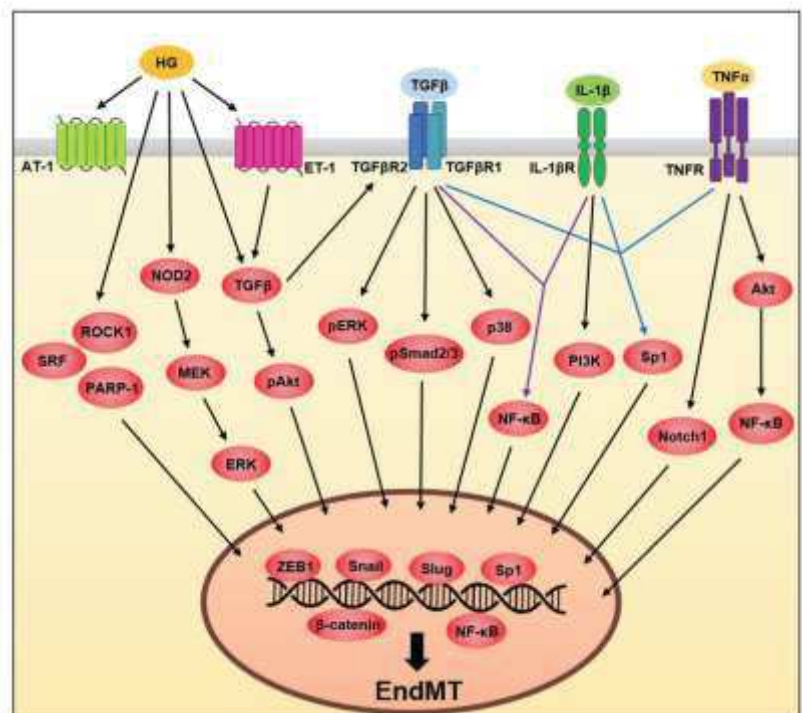


**Figure 12 : Transition Endothélio mésenchymateuse des cellules endothéliales (Pérez, Muñoz-Durango et al. 2017)**

*Les cellules endothéliales subissent une transition endothélio-mésenchymateuse en perdant progressivement l'expression de marqueurs endothéliaux et en expriment des marqueurs mésenchymateux. Ces changements dans l'expression des protéines s'accompagnent d'altérations de la morphologie endothéliale typique. Les cellules endothéliales deviennent fusiformes.*

### 3-3 Les médiateurs et les voies de signalisation impliquées dans l'EndMT

Les CE sont des acteurs déterminants dans le maintien de l'homéostasie du système circulatoire et dans le contrôle des réponses immunologiques suite à différents stimuli (Rajendran, Rengarajan et al. 2013), (Gori, Dragoni et al. 2007). Le système de signalisation induit par l'inflammation dans les CE a été étudié et plusieurs facteurs ont été identifiés comme inducteurs de l'EndMT en agissant individuellement, en synergie ou en formant une voie de signalisation intercellulaire (figure 13) (Pérez, Muñoz-Durango et al. 2017), (Zhang 2008). Les inducteurs de l'EndTM les plus décrits sont le TGF- $\beta$ , les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 bêta et le facteur de nécrose tumorale alpha, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, les endotoxines bactériennes et les facteurs pro-oxydants (Dejana, Hirschi et al. 2017).



**Figure 13 : Schémas des voies de signalisation activées durant l'EndTM (Cho, Lee et al. 2018).**

*Le TGF $\beta$ , l'IL-1 $\beta$  et l'hyperglycémie influencent l'EndTM en régulant les voies de signalisation. Ces voies induisent l'expression de facteurs de transcription impliquant Slug, Snail et zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1).*

### **3-3-a- Le TGF- $\beta$ : inducteur principal de l'EndTM**

Le TGF- $\beta$  est considéré comme l'inducteur principal de l'EndTM (Goumans, van Zonneveld et al. 2008)-(Chen, Qin et al. 2015). Il existe trois isoformes de TGF- $\beta$ , le TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3, qui se lient à un récepteur transmembranaire spécifique du TGF- $\beta$  de type II, activant ensuite le récepteur du TGF- $\beta$  de type I (ALK5) et induisant la transduction des signaux dans la cellule. Ces trois isoformes de TGF- $\beta$  sont impliqués dans l'induction de l'EndTM des CEs (Pérez, Muñoz-Durango et al. 2017). La première preuve démontrant que le TGF- $\beta$ 1 est impliqué dans l'EndTM a été rapportée par Zeisberg et al. qui ont montré que le TGF- $\beta$ 1 diminue l'expression des marqueurs endothéliaux et augmente l'expression des marqueurs mésenchymateux dans le contexte du cancer (Zeisberg, Potenta et al. 2007). L'hypothèse que les CEs interviennent dans le processus de l'EndTM a été suggérée par Arciniegas et al., qui ont montré la transition de cellules endothéliales bovine de l'aorte (BAEC) en cellules mésenchymateuse *in vitro* (Arciniegas, Sutton et al. 1992). Les chercheurs ont également détecté l'expression de l' $\alpha$ -SMA en réponse à la stimulation du TGF- $\beta$ 1. Les BAEC traitées avec du TGF- $\beta$ 1 ont perdu l'expression du facteur de coagulation VIII (FVIII) et ont augmenté progressivement l'expression de l' $\alpha$ -SMA, qui sont considérés comme des marqueurs fiables de la formation de cellules mésenchymateuses. Le deuxième isoforme du TGF- $\beta$ , le TGF- $\beta$ 2 est également un inducteur reconnu de l'EndTM. L'EndTM induite par le TGF- $\beta$ 2 est régulée par le facteur de transcription Snail. En effet, des études ont démontré que la stimulation du TGF- $\beta$ 2 induit la surexpression de Snail et que la répression de Snail par un siRNA inhibe la régulation négative de l'expression du marqueur de lésions endothéliales claudine-5 et active la régulation positive des marqueurs mésenchymateux  $\alpha$ -SMA, SM22- $\alpha$  et calponine (Kokudo, Suzuki et al. 2008). Le TGF- $\beta$ 2 provoque la transition non réversible des cellules endothéliales de la rétine en cellules mésenchymateuses, l'impliquant dans le développement pathologique

de la rétinopathie (Deissler, Deissler et al. 2006). De plus, peu de données existent sur la participation du TGF- $\beta$ 3 dans l'EndTM car cet isoforme a été peu décrit dans le contexte de l'EndTM. Le TGF- $\beta$ 3 est plus étroitement associé à l'EndTM au cours des stades embryonnaires du développement, comme l'ont démontré des expériences sur des explants aortiques d'embryons de poulet (Arciniegas, Ponce et al. 2000).

### **3-3-b- TNF- $\alpha$ et IL1- $\beta$ : cytokines pro-inflammatoires inductrices de l'EndTM**

#### - Le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) :

TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans le contrôle de plusieurs fonctions cellulaires (MacEwan 2002). Les réponses au TNF- $\alpha$  dans les CE sont déclenchées par la liaison à l'un des deux récepteurs du TNF- $\alpha$ , le récepteur TNF- $\alpha$  de type 1 ou le récepteur TNF- $\alpha$  de type 2, ce qui permet à ces récepteurs d'activer des facteurs de transcription comme le NF- $\kappa$ B ce qui induit l'expression de multiples protéines comme la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1 (VCAM-1) et la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) (Rieder, Kessler et al. 2011), (Farrar and Butcher 2014) - (Modur, Zimmerman et al. 1996). Dans divers types de CE, le TNF- $\alpha$  a été décrit comme inducteur de l'EndTM par l'intermédiaire de plusieurs voies de signalisation (Farrar and Butcher 2014), (Wu, Muratore et al. 2017). L'EndTM induite par le TNF- $\alpha$ , dans l'endothélium lymphatique, inhibe l'expression de la VE-cadhérine tout en augmentant l'expression de la  $\beta$ -caténine, de la N-cadhérine et de ZEB1 (Chakraborty, Zawieja et al. 2015). Dans une autre étude sur des cellules endothéliales humaine de valve embryonnaire, le TNF- $\alpha$  a induit une transition l'EndTM par l'intermédiaire de l'activation de la voie de signalisation Akt/NF- $\kappa$ B (Mahler, Farrar et al. 2013). Dans les cellules endothéliales de valve aortique porcine, le TNF- $\alpha$ , induit une augmentation de l'expression de marqueurs

mésenchymateux  $\alpha$ -SMA et Snail avec une diminution de l'expression de la VE-cadhérine (Mahler, Farrar et al. 2013).

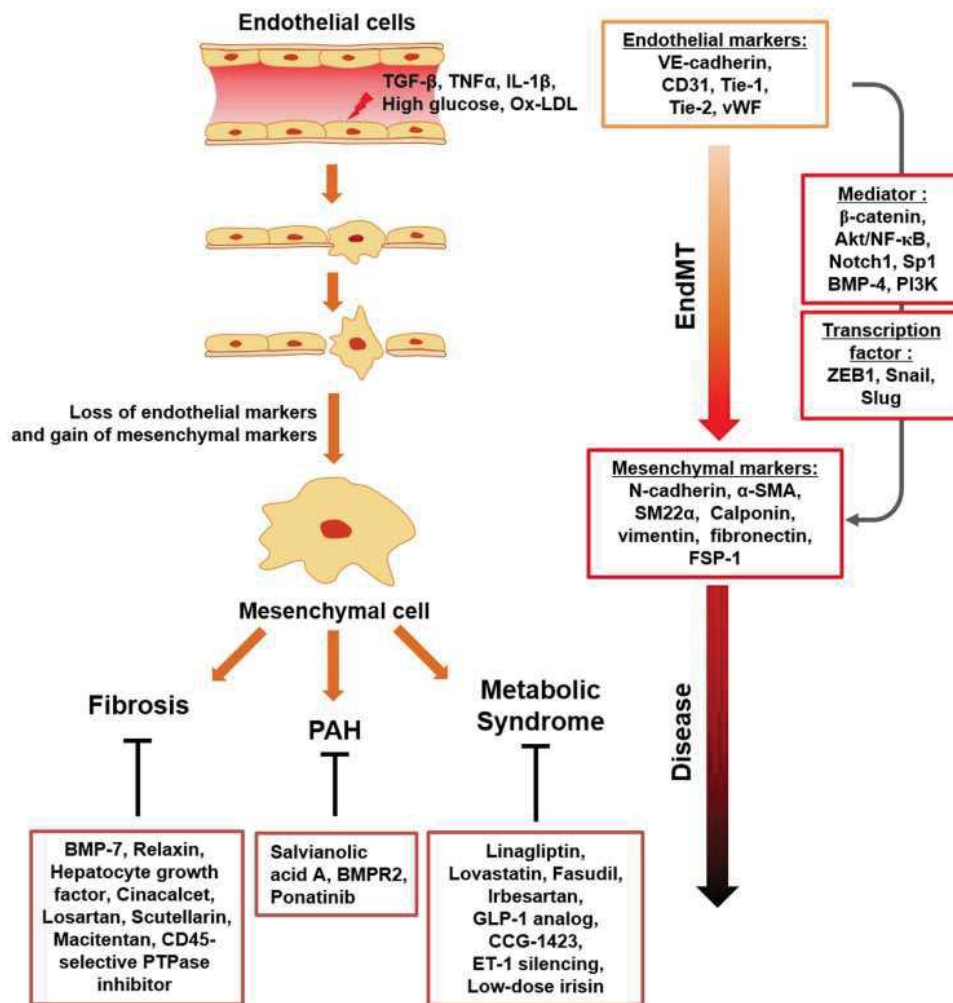
- L'interleukine-1 bêta (IL1- $\beta$ ) :

IL1- $\beta$  est une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle dans le dysfonctionnement de l'endothélium, tout en étant un inducteur majeur de l'EndTM (Dinarello 2000) (Bhagat and Vallance 1997). Les altérations phénotypiques induites par l'IL-1 $\beta$  dans les CEs ont été initialement observées dans les cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines, qui présentaient des anomalies morphologiques et un réarrangement du cytosquelette, ainsi qu'une diminution de l'expression des marqueurs endothéliaux vWF et CD31 (Romero, Zhang et al. 1997). En outre, l'exposition à long terme à l'IL-1 $\beta$  augmente l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que l' $\alpha$ -SMA, le collagène de type I et la calponine, tout en inhibant la production de vWF dans les cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines (Chaudhuri, Zhou et al. 2007). Selon Maleszewska et al., le mécanisme moléculaire qui soutient l'EndTM induite par l'IL-1 $\beta$  induit une augmentation de l'expression de SM22- $\alpha$ , qui est codée par TAGLN. Leurs études ont révélé que TAGLN est régulé épigénétiquement par EZH2, un régulateur négatif majeur dans l'EndTM induite par l'IL-1  $\beta$  (Maleszewska, Gjaltema et al. 2015). De plus, l'IL-1 $\beta$  a généré un phénotype d'EndTM dans les cellules endothéliales de la cornée en augmentant la synthèse de facteur de croissance des fibroblastes (FGF) *via* la cascade de signalisation PI3K en réponse aux changements du cytosquelette d'actine et de la structure cellulaire (Lee, Ko et al. 2012), (Lee, Lee et al. 2004).

Des études ont démontré que le mélange de plusieurs cytokines comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le TGF- $\beta$  induit une EndTM plus facilement qu'une cytokine seule. Dans les cellules endothéliales microvasculaires intestinales humaines (HIMEC), la combinaison du TGF- $\beta$ , de l'IL-1  $\beta$  et du



TNF- $\alpha$  favorise l'EndTM *via* le facteur de transcription Sp1, qui est un régulateur transcriptionnel majeur des gènes liés à l'EndTM (Rieder, Kessler et al. 2011). De plus, dans les cellules endothéliales microvasculaires de l'œsophage humain et les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine , le TGF- $\beta$ 2 et l'IL-1 $\beta$  favorisent l'EndTM en augmentant l'expression des marqueurs mésenchymateux et en réduisant l'expression des marqueurs endothéliaux (Nie, Lyros et al. 2014), (Maleszewska, Moonen et al. 2013). De plus, l'effet de la co-incubation des cellules endothéliales des artères pulmonaires avec la combinaison de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et TGF- $\beta$ 1 induit une EndTM, qui se présente par des altérations morphologiques accompagnées de modifications des marqueurs endothéliaux et mésenchymateux (Good, Gilbane et al. 2015).



**Figure 14: Représentation schématique de la transition endothélio-mésenchymateuse (EndTM) en réponse à des stimuli inflammatoires et à un dysfonctionnement métabolique (Cho, Lee et al. 2018).**

*Dans des conditions d'inflammation chronique impliquant le TNF- $\alpha$ , le TGF $\beta$ , l'IL-1 $\beta$  et l'endotoxine, et en cas de dysfonctionnement métabolique, tel qu'une augmentation du niveau sérique de LDL et de glucose, les CE subissent une activation, ce qui entraîne la perte de marqueurs des cellules endothéliales et l'acquisition des marqueurs des cellules mésenchymateuses.*

*L'EndTM contribue au dysfonctionnement endothélial dans des conditions inflammatoires et de dysfonctionnement métabolique, avec des médiateurs EndTM identifiés. Ce processus peut être à l'origine de diverses maladies postnatales, telles que la fibrose, l'HTAP et le syndrome métabolique.*

## **Pathologies liées à la transition endothélio-mésenchymateuse**

La plasticité des CEs et l'EndTM sont des phénomènes importants pour le développement embryonnaire. La préservation de la fonction des CEs pendant la vie adulte est un processus actif et crucial pour l'homéostasie tissulaire. Le dysfonctionnement endothélial peut être une des conséquences de l'EndTM et peut conduire à un remodelage pathologique des tissus, contribuant ainsi à la progression d'une variété de maladies, telles que la fibrose et le développement tumoral (Figure 15).

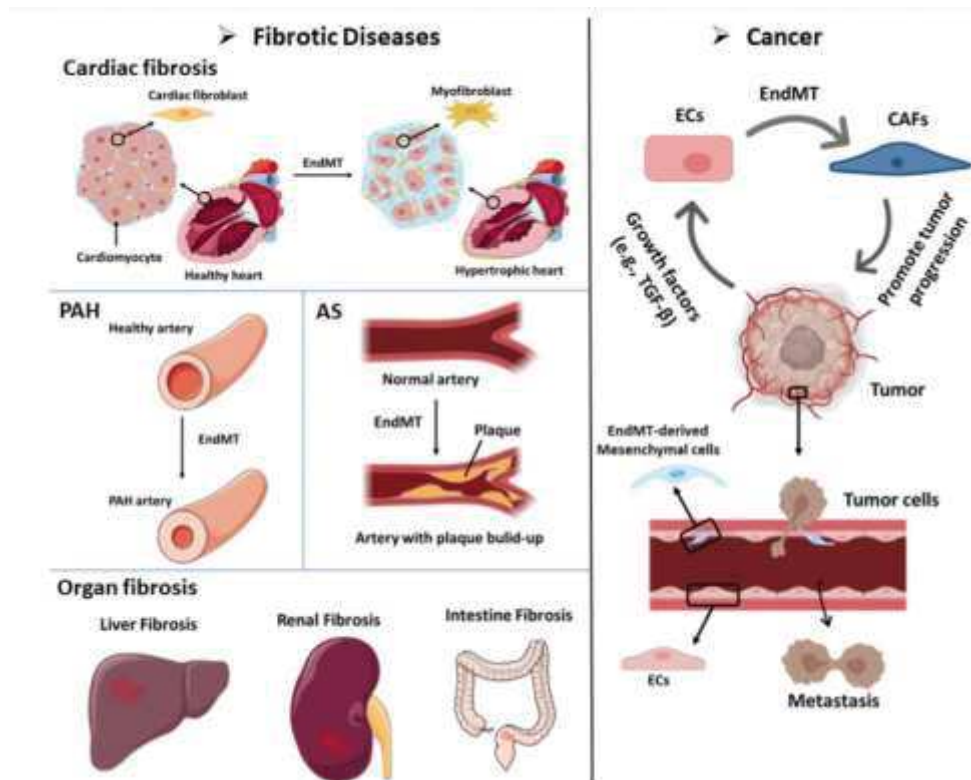


Figure 15: L'EndMT peut contribuer au développement de multiples maladies, notamment les maladies fibrotiques et le cancer (Ma, Sanchez-Duffhues et al. 2020).

**Fibrose cardiaque** : Les CEs qui subissent une EndMT peuvent se différencier en cellules mésenchymateuses cardiaques induisant ainsi une fibrose cardiaque.

**Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)** : l'accumulation de cellules fibrotiques dérivées de l'EndMT et surexprimant la  $\alpha$ -SMA, peut épaissir et rétrécir les parois artérielles et favoriser le développement de l'HTAP.

**Athérosclérose (AS)** : l'accumulation de fibroblastes dérivés de l'EndMT peut entraîner la croissance des plaques et faciliter leur épaississement.

**Fibrose des organes** : les fibroblastes induits par l'EndMT sont une source de cellules de type fibroblastique dans la fibrose hépatique, la fibrose rénale et la fibrose intestinale.

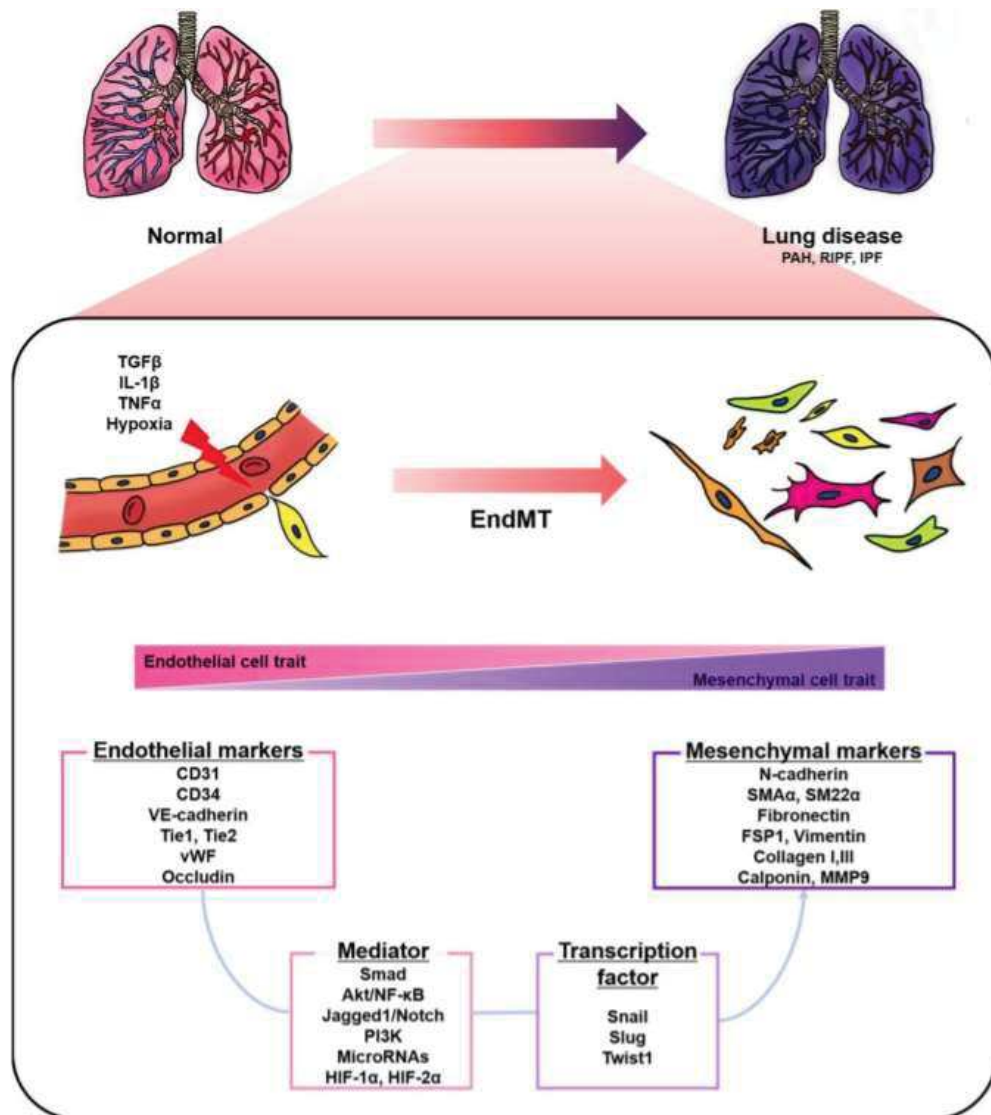
**Le cancer** : il a été démontré que jusqu'à 40 % des fibroblastes associés au cancer (CAF) dans les modèles animaux de cancer du pancréas ou de mélanome, étaient dérivés de l'EndMT.

Les cellules tumorales sécrètent d'abondants facteurs de croissance, dont le TGF- $\beta$ , qui stimule les CEs à se différencier en CAFs. Les CAFs peuvent favoriser l'invasion tumorale, les métastases et l'évasion immunitaire. De plus, les facteurs de croissance sécrétés par les cellules cancéreuses (TGF- $\beta$ ) induisent l'EndMT des CEs qui tapissent les vaisseaux sanguins tumoraux. Les cellules mésenchymateuses dérivées de l'EndMT affaiblissent la perméabilité de la barrière endothéliale en raison de l'allongement de la forme des cellules et de la perte de molécules d'adhésion telles que les claudines et la VE-cadhérine. Ces effets facilitent l'intravasation et l'extravasation des cellules cancéreuses.

### 3-4- La transition endothélio-mésenchymateuse dans les maladies vasculaires pulmonaires

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une pathologie qui résulte de l'augmentation de pression artérielle dans l'artère pulmonaire. Cette hypertension est due à un rétrécissement du diamètre des artères des poumons et a un impact délétère sur le ventricule gauche du cœur qui devient hypertrophique (Farber and Loscalzo 2004). Des mutations génétiques affectant la BMPR2 (Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2) ont été trouvées dans 70 % des cas d'HTAP familiale et dans 10 à 40 % des cas d'HTAP idiopathique (Ranchoux, Antigny et al. 2015). De plus, les cas non génétiques d'HTAP, présentent une diminution de l'expression de BMPR2, en raison d'un environnement inflammatoire qui affecte négativement l'expression de BMPR2 (Hurst, Dunmore et al. 2017, Orriols, Gomez-Puerto et al. 2017) (Sánchez-Duffhues, García de Vinuesa et al. 2019). L'utilisation de deux groupes de souris qui exprime deux différents marqueurs endothéliaux, le Tie2 et VE-cadhérine, en combinaison avec des immunomarquages pour les marqueurs,  $\alpha$ -SMA et MYH11, Qiao et al. (2014) ont démontré l'induction de l'EndTM dans les vaisseaux pulmonaires dans un modèle animal expérimental d'HTAP induit par la monocrotaline et la pneumonectomie (Qiao, Nishimura et al. 2014). D'autre part, d'autres études ont confirmé la présence d'une EndTM dans des coupes pulmonaires de patients atteints d'HTAP (Ranchoux, Antigny et al. 2015). De plus, Good et al. (2015) ont démontré la présence de cellules ayant acquis un phénotype mésenchymateux par la colocalisation de l'expression de vWF et l' $\alpha$ -SMA. Cette étude a été réalisée sur un modèle de poumons de souris hypoxie/SU5416 et sur des échantillons de patients atteints d'HTAP, et il a été démontrée une surexpression de l' $\alpha$ -SMA sur des sections de poumons de souris en hypoxie/SU5416 et les échantillons de patients atteint d'HTAP (Good, Gilbane et al. 2015). De plus, les cellules endothéliales des artères

pulmonaires (PAEC) subissent une EndTM à la suite d'une stimulation par les cytokines inflammatoires IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et TGF- $\beta$ , et sécrètent à leur tour davantage de cytokines pro-inflammatoires qui peuvent favoriser davantage la progression de l'HTAP (Good, Gilbane et al. 2015).



**Figure 16: Représentation schématique de la transition endothéliale-mésenchymateuse (EndTM) impliquée dans les maladies pulmonaires (Yun, Kook et al. 2020).**

*Les cellules endothéliales stimulées par le TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et l'hypoxie subissent une EndTM. L'EndTM contribue à la pathogenèse des maladies pulmonaires, notamment l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), la fibrose pulmonaire radio-induite (FPR) et la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI).*

### 3-5- La transition endothélio-mésenchymateuse dans le contexte de la greffe d'organe

Très peu d'études ont décrit l'implication de l'EndTM dans le contexte de la greffe d'organe. En 2017, Wang et al (Wang, Han et al. 2017)) , ont émis l'hypothèse que la fibrose rénale est la principale cause du dysfonctionnement chronique et de l'échec de l'allogreffe rénale et que la transition endothéliale-mésenchymateuse (EndTM) induite par le TGF- $\beta$  est une cause de cette fibrose. L'étude a été réalisée sur des cellules endothéliales (HUVECs) et des coupes de tissus rénaux provenant de patients transplantés du rein. L'induction de l'EndTM a été réalisée par le TGF- $\beta$ . L'apparition de l'EndTM a été étudiée par western blot, qRT-PCR et ELISA. Les données ont démontré une diminution de l'expression de la VE-cadherin et du CD31 accompagnée d'une augmentation de l'expression du  $\alpha$ -SMA et du collagène I de façon temps-dépendant après stimulation par 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 pendant 72 heures. Les chercheurs ont étudié l'expression du TGF- $\beta$ 1, de l' $\alpha$ -SMA, du CD31 et du collagène I/III par marquage fluorescent de coupes de tissus rénaux provenant de patients transplantés du rein. Le marquage a démontré une augmentation de l'expression du TGF- $\beta$ 1, du  $\alpha$ -SMA et du collagène I et III avec une diminution de l'expression du CD31. Les chercheurs ont validé ainsi l'hypothèse que le TGF- $\beta$ -1 est un inducteur de l'EndTM, et que cette EndTM peut être une cause du développement de la fibrose interstitielle rénale chez les patients greffés du rein par le biais des voies de signalisation TGF- $\beta$ /Smad et Akt/mTOR/p70S6K (Wang, Han et al. 2017).

### 3-6- La transition endothélio-mésenchymateuse dans les conditions de l'hyperglycémie

L'hyperglycémie chronique est le principal facteur d'apparition et de progression des complications connues du diabète (complications qui touchent le rein, le système nerveux et le système cardiovasculaire) (Deshpande, Harris-Hayes et al. 2008). Ces complications sont secondaires aux altérations structurelles et fonctionnelles des organes et des tissus causées par une augmentation de l'absorption cellulaire de glucose (Wellen and Hotamisligil 2005). Cela active les voies inflammatoires qui conduisent à un dépôt excessif de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et à un épaissement de la paroi des vaisseaux (Wellen and Hotamisligil 2005), (Wynn 2008). La fibrose tissulaire est la cause commune de la plupart des complications diabétiques, notamment l'athérosclérose, la cardiomyopathie, la néphropathie et la rétinopathie (Ban et Twigg, 2008). Les myofibroblastes sont les médiateurs de l'accumulation pathologique de la MEC (Kendall and Feghali-Bostwick 2014). Ces cellules sont normalement impliquées dans la réparation des tissus et sont éliminées par apoptose à la fin du processus de réparation. Cependant, dans des situations pathologiques, leurs activations immodérées conduisent à un dépôt excessif (Micallef, Li et al. 2012). Les fibroblastes représentent la source principale des myofibroblastes, mais ces derniers peuvent provenir également des cellules mésenchymateuses résidentes ou dérivées de la moelle osseuse, ainsi que des cellules endothéliales, par le biais de l'EndTM (Micallef, Li et al. 2012) (Kendall and Feghali-Bostwick 2014). L'EndTM apparaît comme un acteur important dans la pathogenèse de la fibrose diabétique (Souilhol, Harmsen et al. 2018). Plusieurs études ont mis en évidence que l'hyperglycémie induit des altérations de CE entraînant un déséquilibre entre la vasodilatation et la vasoconstriction ainsi que le développement de complications



inflammatoires et vasculaires (Meza, La Favor et al. 2019). En outre, il a été démontré que des concentrations élevées de glucose déclenchent la transition de l'endothélium vers un phénotype mésoenchymateux (Giordo, Ahmed et al. 2021). Dans l'ensemble, l'EndTM semble représenter le lien dans l'interaction entre l'inflammation et la dysfonction endothéliale dans les complications diabétiques (Man, Sanchez Duffhues et al. 2019). Dans le diabète, le stress oxydatif apparaît comme un déclencheur important de la transformation des CEs en myofibroblastes et du remodelage vasculaire (Montorfano, Becerra et al. 2014). En effet, l'hyperglycémie peut augmenter la production de ROS, qui à leur tour activent des voies de signalisation conduisant à la perturbation de l'hémostase des CEs (Zou, Liu et al. 2017). De plus, plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de l'EndMT, par exemple, la voie de signalisation du TGF- $\beta$ , la signalisation Notch, la voie de signalisation du FGF/FGFR1, les voies médiées par Smad2/3 (Piera-Velazquez and Jimenez 2019) et les cascades de signalisation pro-inflammatoires (Lin, Zhao et al. 2018),(Ursoli Ferreira, Eduardo Botelho Souza et al. 2019).

### 3-7- Fibrose des organes induite par l'EndTM

L'EndTM est impliquée dans le développement de la fibrose de plusieurs organes, tels que le poumon, le rein et le foie (Piera-Velazquez, Mendoza et al. 2016). L'origine des fibroblastes dans la fibrose rénale a été étudiée par Zeisberg et al. en utilisant trois modèles différents de maladie rénale chronique chez la souris (Zeisberg, Potenta et al. 2008). Dans les sections de rein, jusqu'à 50 % des fibroblastes présentaient l'expression d'un marqueur endothélial (CD31) et de marqueurs mésoenchymateux (FSP-1 et  $\alpha$ -SMA, respectivement). Les résultats ont démontré la contribution de l'EndTM dans l'accumulation de fibroblastes dans le rein et dans l'induction de fibrose rénale (Zeisberg, Potenta et al. 2008). Li et al. ont également fourni des

preuves de l'existence de l'EndTM et de son rôle dans le développement précoce de la fibrose interstitielle rénale diabétique (Li, Qu et al. 2009). Ils ont utilisé le traçage de la lignée endothéliale avec un modèle de souris transgénique Tie2-Cre (qui possède le récepteur tyrosine kinase spécifique de l'endothélium de souris) et marqué avec du EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) dans le but de distinguer les cellules dérivées de l'endothélium. Ils ont constaté une surexpression de l' $\alpha$ -SMA dans CEs en transition dans le modèle de souris atteintes de néphropathie diabétique (Li, Qu et al. 2009). Une surexpression de la  $\alpha$ -SMA a également été observée dans les cellules endothéliales des artérioles afférentes/efférentes des glomérules, indiquant que les cellules mésenchymateuses de type 'myofibroblastique' dérivées de l'EndTM favorise la sclérose glomérulaire (Li, Qu et al. 2009). L'EndTM a également été associée à la fibrose du foie. Les coupes de tissus hépatiques provenant d'une hypertension portale idiopathique (HPI) ont montré une double coloration positive pour le CD34 et le S100A4, qui sont respectivement des marqueurs de CEs et de myofibroblastes. Sur la base d'une augmentation des niveaux de Smad2 phosphorylé, la signalisation TGF- $\beta$  peut être liée à l'EndTM dans l'endothélium de la veine porte et conduire à une éventuelle sténose et oblitération de la veine porte dans l'HPI (Kitao, Sato et al. 2009).

### 3-8- Traitement possible pour la prévention de l'apparition de l'EndTM

Récemment, plusieurs médicaments en cours d'essai clinique ont été signalés comme inhibiteur de l'EndMT dans divers modèles de pathologie animales (Tableau 3). Ces médicaments inhibent l'EndMT en ciblant diverses voies de signalisation, telles que DPP-4 (Kanasaki, Shi et al. 2014, Suzuki, Tada et al. 2017), Smad (Yao, Li et al. 2018), TGF- $\beta$  (Yao, Li et al. 2018) et l'AMPK (Tsai, Lee et al. 2019). Le Nintedanib, un traitement contre la fibrose pulmonaire, a montré des effets anti-modélagé vasculaire dans l'hypertension pulmonaire

(Tsutsumi, Nagaoka et al. 2019). Le Macitentan, également approuvé pour le traitement de la fibrose pulmonaire, a inhibé l'EndMT médiée par le TGF- $\beta$  et l'ET-1 dans les CEs isolées de patients atteints de sclérose systémique (Cipriani, Di Benedetto et al. 2015).

Des données récentes ont démontré qu'il existe un lien entre l'apparition des complications diabétiques et l'EndMT. Une hyperglycémie peut entraîner une EndMT, qui est régulée par des miARN (miR-200b et miR-18a-5p) (Cao, Feng et al. 2014, Geng and Guan 2017). La Vildagliptine, un inhibiteur de l'enzyme DDP-IV utilisé dans le traitement du DT2, régule l'EndMT et présente des effets anti-fibrotiques dans un modèle murin (Suzuki, Tada et al. 2017). De plus, le Liraglutide, utilisé dans le traitement du DT2 et le Losartan un anti-hypertenseur, inhibent l'EndMT et l'apparition des complications liées au diabète chez des souris diabétiques (Kanasaki, Shi et al. 2014, Yao, Li et al. 2018, Tsai, Lee et al. 2019).

Drug	Target(s) <sup>a</sup>	Mechanism(s) <sup>b</sup>	Biological effects in EndMT <sup>c</sup>	Research animal model/cells <sup>d</sup>	Biological effect(s) (clinical phase) <sup>e</sup>	Clinical trial status (disease)
Nintedanib	PDGFR, FGFR, and VEGFR	Inhibits kinase signaling pathways and EndMT	Anti-vascular remodeling effects	Pulmonary arterial hypertension	Inhibits kinases and cell proliferation	Phase 3 completed (fibrosis)
Vildagliptin	Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)	Inhibits DPP-4 signaling and EndMT	Anti-fibrotic effect	Sepsis models	Blood glucose regulation	Phase 4 completed (diabetes)
Liraglutide	Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor	Inhibits high glucose-induced EndMT via the AMPK pathway	Inhibits neointima formation to increase reendothelialization	Endovascular injury in diabetic mice	Blood glucose regulation	Phase 2 completed (type-1 and -2 diabetes mellitus)
Cinacalcet	Extracellular calcium-sensing receptor	Inhibits the expression of extracellular matrix elements (type I collagen and fibronectin) and EndMT	Ameliorates cardiac fibrosis	Uremic hearts	Acts as a calcium mimetic	Phase 4 completed (chronic kidney disease)
Linagliptin	DPP-4	Suppresses DPP-4 and inhibits EndMT via microRNA29 induction	Ameliorates kidney fibrosis	Streptozotocin-induced diabetic mice	Blood glucose regulation	Phase 2 completed (type-2 diabetes mellitus)
Macitentan	Endothelin-1 receptor, and endothelin B receptor	Inhibits the TGF- $\beta$ - and ET-1-mediated EndMT	Inhibits fibroblast accumulation	ECs isolated from patients with systemic sclerosis (in vitro)	Antagonist of endothelin receptors on blood vessels and smooth muscle	Phase 2 completed (pulmonary hypertension)
Rapamycin (sirolimus)	Inhibits cell migration and extracellular matrix degradation	Inhibits EndMT and MMP-2/9 secretion	Inhibits EC angiogenesis in vitro	EA.hy926 cell line, a permanent endothelial cell line derived from HUVECs (in vitro)	Immunosuppressive macrolide	Phase 4 completed (transplantation, kidney)
Rapamycin	Inhibits VEGF, TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$ levels	Decreases PD-induced angiogenesis and EndMT	Protective effects, i.e., preservation of the peritoneal membrane	In vivo mouse model of peritoneal dialysis	Immunosuppressive macrolide	Phase 4 completed (transplantation, kidney)
Spirolactone	Abrogates TGF- $\beta$ -induced fibrosis in EndMT	Inhibits EndMT by blocking Notch signaling and TGF- $\beta$	-	HUVECs (in vitro)	Aldosterone receptor blocker	Phase 2 completed (congenital heart disease, endomyocardial fibrosis, and heart failure)
CHR-99021	Reduces FSP1 and $\alpha$ -SMA expression	Inhibits radiation-induced EndMT	-	HUVECs (in vitro)	GSK-3 inhibitor	N/A
Losartan	Inhibits ERK phosphorylation	Inhibits EndMT	-	-	Type-1 angiotensin-II receptor antagonist	Phase 2 completed (fibrosis, inflammatory reaction)

**Tableau 2 : Médicaments utilisés en clinique pour inhiber l'EndMT (Choi, Nam et al. 2020)**

## 4- Le Glucagon-Like-Peptide

### 4-1- Le Glucagon Like Peptide (GLP-1) : généralité

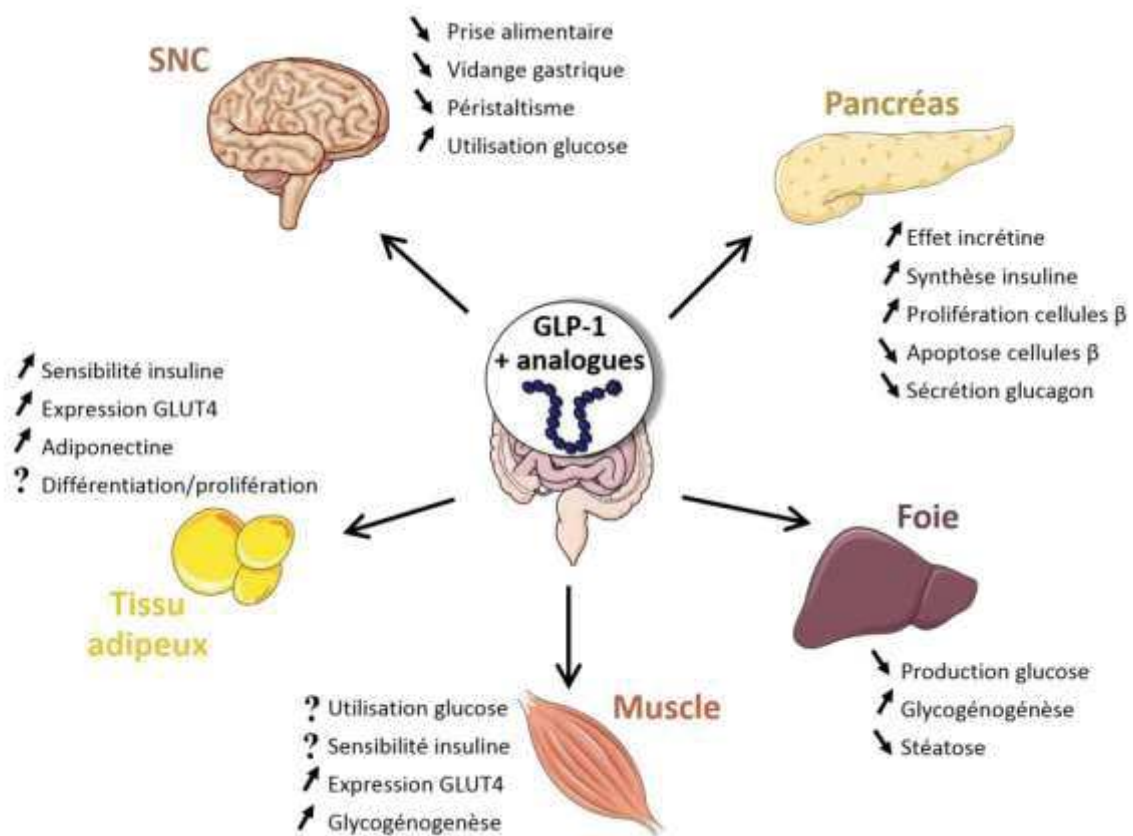
Le Glucagon Like Peptide (GLP-1), et le glucagon sont codés par le même gène Gcg dans les cellules L intestinales et les cellules  $\alpha$  pancréatiques respectivement. Il résulte d'un clivage post-traductionnel du produit du gène du glucagon par la convertase PC1/3 de la prohormone (Papaetis 2014). Il est l'une des principales hormones incrétines de l'organisme (Pegah, Abbasi-Oshaghi et al. 2021), (Meier, Nauck et al. 2002). Il est synthétisé dans les cellules L entéro-endocrines de l'intestin puis libéré dans la circulation sanguine à la suite de l'introduction du bol alimentaire contenant des protéines hydrolysées, des graisses ou bien des glucides (Doyle and Egan 2007). Le GLP-1 se fixe à un récepteur spécifique couplé à une protéine G présent dans divers tissus tels que le pancréas, le cerveau, les reins, les poumons, le cœur et dans les principaux vaisseaux sanguins (Doyle and Egan 2007). Dès l'activation du récepteur du GLP-1, l'adénylyl-cyclase est activée ce qui génère de l'adénosine monophosphate cyclique (AMP) conduisant à une activation AMPc-dépendante des voies de signalisation secondaire PKA et Epac (Doyle and Egan 2007). Les effets du GLP-1 ont été amplement étudiés au cours de ses dernières années. Dans les cellules pancréatiques, le GLP-1 stimule l'expression du transporteur de glucose de type 2 (GLUT2) qui est une protéine impliquée dans le transport passif du glucose à travers la membrane cellulaire (Villanueva-Peñacarrillo, Puente et al. 2001). De plus, le GLP-1 stimule la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas en réponse à une hyperglycémie tout en inhibant la production de glucagon par les cellules  $\alpha$  (Holst, Orskov et al. 1987) - (Lafferty, O'Harte et al. 2021). Le GLP-1 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et l'interféron (Lee and Jun 2016). L'amide du GLP-1 (7-36) est la forme active circulante dominante chez

l'homme avec une concentration moins élevée pour la forme bioactive du GLP-1(7-37) (Müller, Finan et al. 2019). Le GLP-1 est rapidement dégradé par l'enzyme dipeptidyl peptidase-IV (DPP-4) dans le sérum suite à la présence d'un site de reconnaissance de la DPP-4 dans l'extrémité N-terminale (Lee and Lee 2017). La DPP-4 est une enzyme circulante dans le sang, qui a la capacité de cliver le peptide GLP-1 (7-36) pour le transformer en une forme inactive : le GLP-1 (9-36). Par conséquent, comme le GLP-1 est rapidement dégradé, il est nécessaire de développer des analogues résistant à l'enzyme DPP-4 pour augmenter sa demi-vie biologique et être utilisable en clinique.

#### 4-2- Le récepteur au GLP-1 et sa distribution physiologique

A ce jour un seul récepteur du GLP-1 a été identifié, le GLP-1R (Thorens 1992). C'est par l'intermédiaire de ce récepteur transmembranaire que le GLP-1 actif exerce ses fonctions biologiques. Cette protéine de 463 acides aminés est capable de reconnaître des peptides dérivés du proglucagon endogène, tels que le GLP-1, l'Oxyntomoduline ainsi que des molécules pharmacologiques exogènes analogues du GLP-1 comme l'exendine 4. Comme tous les membres de sa famille, le GLP-1R possède un long domaine N-terminal extracellulaire capable de reconnaître ses peptides cibles ainsi qu'un domaine C-terminal intracellulaire. Entre les deux, la partie centrale est composée de sept domaines transmembranaires. C'est donc au niveau de la partie N-terminale que se fait la reconnaissance du GLP-1 (Scrocchi, Brown et al. 1996). En plus du pancréas, l'ARNm codant pour le GLP-1R a également été retrouvé dans d'autres tissus tels que les poumons, le cœur, le cerveau, les reins et le tube digestif (Wei and Mojsov 1995). Ses fonctions dans ces différents organes ne sont pas encore toutes élucidées. Outre l'augmentation de la sécrétion d'insuline, le GLP-1 présente une variété d'effets supplémentaires, notamment en favorisant la satiété et en réduisant la prise

alimentaire (Flint, Raben et al. 1998), en retardant le temps de vidange gastrique (Nauck, Quast et al. 2021), en inhibant la libération de glucagon (Orskov, Holst et al. 1988) et en protégeant les cellules bêta de l'apoptose (Farilla, Bulotta et al. 2003).



**Figure 17 : Effet du GLP-1 et de ses analogues sur les différents organes (Ceccarelli, Guarino et al. 2013).**

### 4-3- Les agonistes du récepteur au GLP-1 (GLP-1R)

Les effets physiologiques du GLP-1 en font un bon candidat dans le traitement du DT2, car il existe chez les DT2 une diminution de la production d'insuline et une résistance à l'action du GP1 endogène

Toutefois, sa faible demi-vie limite son utilisation en clinique. Ainsi, deux approches ont été développées :

- La première consiste à inhiber l'action de la DPP-4, permettant ainsi de rallonger la durée de vie du GLP-1 endogène. Ils constituent la famille thérapeutique des Gliptines (Inhibiteurs de DDP-4).
- La deuxième consiste à utiliser un GLP-1 modifié de manière à assurer sa résistance vis-à-vis de la DPP-4. Ces analogues du GLP-1 sont des incréтино-mimétiques.

Actuellement en France, quatre analogues du GLP-1 sont commercialisés : l'Exénatide, le Liraglutide, le Dulaglutide et le Sémaglutide.

#### 4-3-a- L'Exénatide (Exendine-4)

L'Exénatide (Byetta®) est le premier agoniste du GLP-1R à avoir été autorisé par la FDA en 2005. L'Exénatide est une version synthétique de l'exendin-4, une hormone découverte dans la salive du monstre de Gila ( un lézard d'Amérique du Nord), composée de 39 acides aminés et présentant une similarité de séquence de 53 % avec le GLP-1 (Eng, Kleinman et al. 1992). L'Exénatide est également résistant à la dégradation par la DPP-4 car il contient un résidu glycine en position 8 au lieu d'un résidu alanine (le résidu ciblé par la DPP-4), induisant une demi-vie plus longue que celle du GLP-1 natif d'environ 2-4 heures chez l'homme (Kolterman, Kim et al. 2005) (Doyle and Egan 2007) . L'Exénatide se lie au GLP-1R d'une façon similaire au



GLP-1 et a de nombreux effets anti-hyperglycémiques, en stimulant la libération d'insuline après une hausse du niveau de glucose et en diminuant le niveau de glucagon (Egan, Clocquet et al. 2002) - (Kolterman, Buse et al. 2003). L'Exénatide doit être injecté par voie sous-cutanée deux fois par jour, une autre formulation d'Exénatide à action prolongée, est administré une fois par semaine (Prasad-Reddy and Isaacs 2015).

#### **4-3-b Liraglutide (Victoza)**

Le liraglutide (Victoza®) est une protéine qui partage 97 % de sa séquence avec le GLP-1 naturel et a une demi-vie de 13 heures (Prasad-Reddy and Isaacs 2015) . Après administration sous-cutanée, le profil d'action prolongée fait intervenir trois mécanismes : une auto-agrégation qui permet une absorption lente, une liaison à l'albumine et une stabilité accrue vis-à-vis de l'enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) et de l'enzyme endopeptidase neutre (EPN), ce qui se traduit par une longue demi-vie plasmatique. L'action du Liraglutide résulte d'une interaction spécifique avec les récepteurs du GLP-1, entraînant une augmentation de la formation d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). En comparaison avec le GLP-1, le Liraglutide induit une libération plus lente de l'albumine, une dégradation retardée et une clairance rénale plus faible du Liraglutide (Chang, Jakobsen et al. 2003). Le Liraglutide a une variété d'effets qui sont comparables à ceux du GLP-1. Il inhibe la mort cellulaire tout en stimulant la sécrétion d'insuline de façon glucose-dépendante (Buse, Rosenstock et al. 2009). Le Liraglutide doit être administré en S/C aux patients à la dose de 0,6 mg à 1,8 mg /jour (Dharmalingam, Sriram et al. 2011).

#### **4-3-c- Dulaglutide (Trulicity)**

Le Dulaglutide (Trulicity®) a été approuvé par la FDA en 2014 en tant qu'agoniste humain du GLP-1R à action prolongée. La molécule comprend deux chaînes identiques liées par des ponts disulfures, chacune contenant une séquence analogue du GLP-1 humain modifié liée de manière covalente par un petit peptide de liaison à un fragment (Fc) de chaîne lourde d'immunoglobuline humaine modifiée G4 (IgG4). La partie du Dulaglutide analogue du GLP-1 présente une homologie d'environ 90 % avec le GLP-1 natif humain (7-37) (Barrington, Chien et al. 2011). Cette structure protège le Dulaglutide de la dégradation réalisée par la DPP-4, ce qui améliore ses effets cliniques (Barrington, Chien et al. 2011). La demi-vie du Dulaglutide est de 5 jours, ce qui le rend approprié pour une administration hebdomadaire.

#### **4-3-d-Le Sémaglutide (Ozempic®) :**

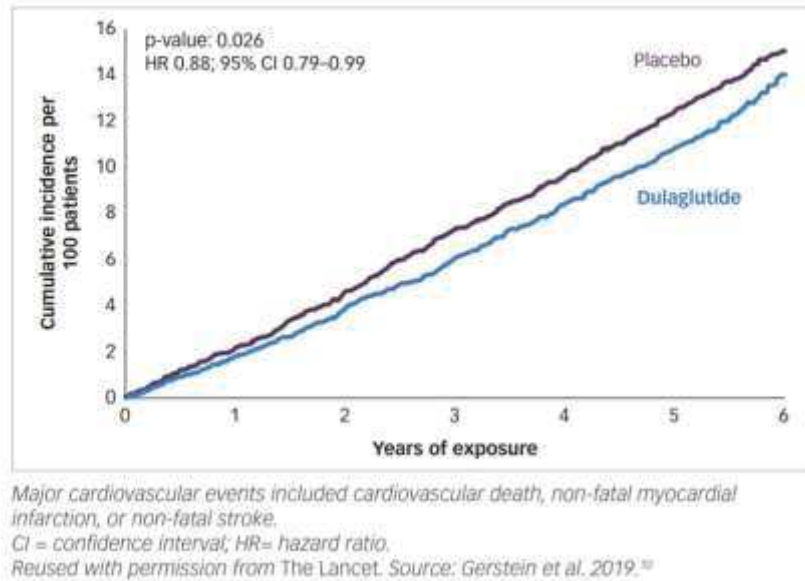
La fréquence d'administration du Sémaglutide est similaire à celle indiquée pour le Dulaglutide (Knudsen and Lau 2019). La séquence peptidique du Sémaglutide présente 94 % d'identité avec celle du GLP--1, et comporte notamment deux modifications d'acides aminés : la première abolit le site de liaison à la DPP4 et la seconde permet la liaison d'un acide stéarique en position C26 (Knudsen and Lau 2019). Ces deux modifications contribuent à prolonger la durée d'action du peptide, qui est de 8 jours pour le Sémaglutide injectable, alors qu'elle n'est que de quelques minutes pour le GLP-1 natif (O'Neil, Birkenfeld et al. 2018). Il existe aussi la formulation *per os* de Sémaglutide en cours d'évaluation (Husain, Birkenfeld et al. 2019).

#### 4-4- Essais cliniques réalisés avec le Dulaglutide

La sécurité cardio vasculaire des agonistes du GLP-1R a été démontrée chez des patients DT2 (Nissen and Wolski 2007). En effet, certaines de ces molécules ont permis de réduire de manière significative la survenue d'événements cardiovasculaires majeurs (McGuire, Marx et al. 2019)- (Marso, Bain et al. 2016). Les mécanismes par lesquels les agonistes du GLP-1R exercent ces effets bénéfiques ne sont pas complètement compris. Les effets reconnus de ces molécules qui pourraient contribuer au bénéfice cardiovasculaire comprennent l'amélioration du contrôle glycémique, la réduction du poids et la réduction de l'hypertension artérielle, l'amélioration du bilan lipidique et la réduction des complications associées au diabète, y compris les maladies rénales (Holman, Bethel et al. 2017)- (Gustavo 2019).

- *Etude REWIND* (Researching cardiovascular Events with a Weekly INcretin in Diabetes):

L'étude REWIND a pour but d'examiner l'effet de l'agoniste du GLP-1R, le Dulaglutide, sur la survenue des principaux événements cardiovasculaires chez des personnes atteintes de DT2 avec antécédents d'événement cardiovasculaires ou en prévention primaire chez 75% des patients de la cohorte. Les patients avaient un suivi médian de 5,4 ans, le plus long à ce jour pour un essai thérapeutique portant sur un agoniste des récepteurs du GLP-1 (Wiviott, Raz et al. 2019). Le critère composite MACE (comportant infarctus du myocarde non fatal ou Accident vasculaire cérébral non fatal ou un décès de cause CV) était atteint chez 12,0 % des patients traités par le Dulaglutide, soit un taux d'incidence de 2,4 pour 100 (personnes-années) contre 13,4 % dans le groupe placebo, soit un taux d'incidence de 2,7 pour 100 (années-personnes) (hazard ratio [HR] 0.88; 95% confidence interval [CI] 0.79–0.99; p=0.026) (Doupis 2019) (figure 18).



**Figure 18 : Essai REWIND : Critère de jugement principal des événements cardiovasculaires majeurs (Doupis 2019).**

D’après les résultats de cette étude le Dulaglutide peut être considéré comme une option utile dans la gestion du contrôle de la glycémie chez les personnes atteintes de DT2 et présentant soit des antécédents de maladies cardiovasculaires, soit des facteurs de risque cardiovasculaires.

#### 4-5- Effet des agonistes du GLP-1R sur les cellules pancréatiques

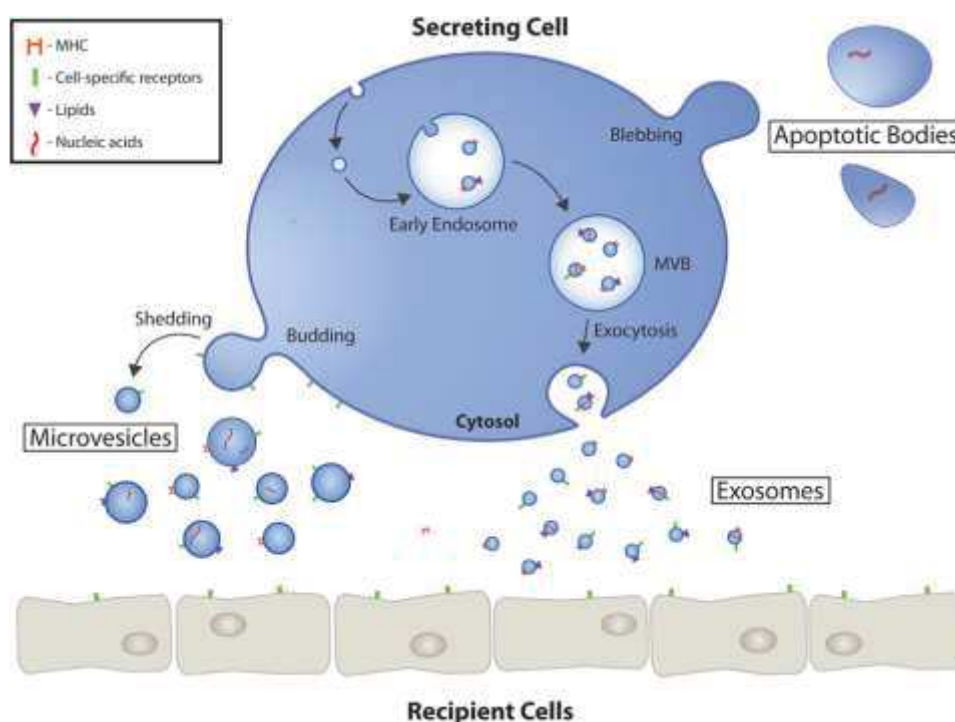
De nombreuses études démontrent l’effet bénéfique des analogues du GLP-1 sur la cytoprotection des îlots pancréatiques, plus particulièrement de la cellule  $\beta$ . En effet, l’Exénatide, présente des propriétés anti-inflammatoires en diminuant le contenu des îlots en FT, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  et IL-2 (Cechin, Pérez-Álvarez et al. 2012). En ce qui concerne la greffe d’îlots pancréatiques, l’équipe de Shapiro a mis en évidence que l’application d’1 $\mu$ M de Liraglutide à des îlots humains pendant 24 et 48 heures réduit significativement le taux d’apoptose et augmente le nombre et la taille des îlots (Toso, Pawlick et al. 2011), suggérant l’utilisation d’un analogue du GLP-1 en pré et post greffe. Les analogues du GLP-1 ont démontré leurs effets cytoprotecteurs sur les cellules endothéliales en étant anti-inflammatoires. L’application de

100 nM de Liraglutide sur des cellules endothéliales induit la diminution de l'expression de VCAM-1 et de l'E-sélectine et l'adhérence des monocytes, par des mécanismes impliquant l'AMP Kinase (Krasner, Ido et al. 2014) .

## 5- Les Microparticules : Vésicules extracellulaires avec effets pro-inflammatoires et pro-coagulants

### 5-1 Les vésicules extracellulaires (EVs) :

Les vésicules extracellulaires constituent une famille hétérogène de vésicules, générées à partir de différents compartiments subcellulaires et libérées dans l'espace extracellulaire. Il s'agit des exosomes d'origine endosomale largement étudiés dans les réponses immunitaires, des microparticules, issus de la membrane plasmique et le plus souvent investiguées dans le sang, et les corps apoptotiques également en réponse à un stress apoptotique. Leurs compositions diversifiées et de leurs contenus biologiques, ont fait des EV des marqueurs spécifiques de l'activation cellulaire et des processus pathologiques. Leur potentiel en tant que biomarqueurs diagnostiques et pronostiques ont suscité un intérêt significatif dans différentes pathologies (Jansen, Nickenig et al. 2017). En particulier, les propriétés immunomodulatrices des exosomes sont connues et pourraient être impliquées dans la régénération tissulaire et vasculaire. (Mohan, Agarwal et al. 2020).



**Figure 19 : Ils existent trois types de vésicules extracellulaires : les exosomes d'origine endosomale (émises par exocytose), les microvésicules (émises par bourgeonnement de la membrane plasmique) et les corps apoptotiques (émises suite à un stimulus apoptotique) (Gustafson, Veitch et al. 2017).**

## 5-2- Les Microparticules (MPs) :

Les microparticules sont émises par la membrane plasmique. Leur taille varie de 0,1 à 1  $\mu\text{m}$  (VanWijk, VanBavel et al. 2003). Elles transportent plusieurs types de molécules (ARNm, ADN, lipides et protéines activés) qui caractérisent la cellule émettrices et/ou le stress ayant induit leur émission. Les MPs se comportent comme des effecteurs cellulaires et transfèrent leur contenu (Morel, Ohlmann et al. 2005). La libération des MPs ce fait en réponse à l'activation cellulaire. Dans le sang, elles sont principalement issues des plaquettes, de cellules endothéliales, des leucocytes et d'érythrocytes (França, Izar et al. 2015). Dans le passé, les

MPs étaient considérées comme des "débris/poussière cellulaires" (Patz, Trattng et al. 2013). En 1999, des taux élevés de microparticules endothéliales (MPE) circulantes ont été observés dans différentes pathologies (Combes, Simon et al. 1999) suggérant qu'elles seraient des biomarqueurs de risque thrombotique à possible valeur diagnostiques et pronostiques (Curtis, Edelberg et al. 2013).

### 5-2-1 Mécanismes généraux de la biogénèse des microparticules

La génération de MPs implique une réorganisation du cytosquelette avec l'inhibition des activités translocase et l'activation des activités scramblase et floppases. Ces changements sont induits par l'influx calcique ( $Ca^{2+}$ ) conduisant à l'activation de la calpaïne et à la protéolyse subséquente des protéines du cytosquelette de façon calcium-dépendante (Miyoshi, Umeshita et al. 1996). Les voies de signalisation spécifiques à chaque stimulus et conduisant à ces changements membranaires ne sont pas encore bien caractérisées. Deux observations clés ont conduit à la découverte de MP procoagulantes dans le plasma frais dépourvu de plaquettes. Premièrement, l'identification par Chargaff (1946) d'une activité procoagulante dans le précipité obtenu par centrifugation de ce plasma à haute vitesse (30 000 g, 120 min) (Chargaff and West 1946). Puis, la confirmation par Wolf (1967) de ce phénomène et l'identification dans ces précipités, par microscopie électronique, de très petites particules d'origine plaquettaire (Chargaff and West 1946). Cette activité procoagulante des MP est associée à la présence de la PS dans le feuillet externe de la membrane et de facteur tissulaire (FT), une protéine transmembranaire synthétisée par les fibroblastes, les leucocytes et les cellules endothéliales. La PS joue un rôle pivot dans l'assemblage membranaire de facteurs de la coagulation et le FT est le principal initiateur de la séquence d'activation aboutissant à la formation de thrombine et, *in fine*, au caillot fibrino-plaquettaire. La description d'un défaut



dans la translocation de phospholipides membranaires et dans la libération de MP plaquettaires, érythrocytaires et lymphocytaires chez des patients ayant un syndrome hémorragique (syndrome de Scott) a confirmé le rôle physiologique de ces MPs dans la réponse hémostatique (Sims, Wiedmer et al. 1989). Ces caractéristiques, présence de PS et/ou de FT, ont orienté les travaux sur les MP dérivées de plaquettes ou de leucocytes vers l'étude de leur rôle dans la coagulation (Diamant, Tushuizen et al. 2004) . Ainsi, leur activité procoagulante est actuellement considérée comme un déterminant du risque de thrombose au cours de plusieurs situations pathologiques (Combes, Simon et al. 1999, Morel, Toti et al. 2006).

## Techniques de mesure des microparticules

### 5-3- Techniques de mesure des microparticules

La première mise en évidence des microparticules remonte à 1967 où Wolf isola du plasma des éléments infra-micrométriques présentant une activité pro-coagulante intrinsèque. Il réussit à les visualiser par microscopie électronique (Wolf 1967).

#### 5-3-1- Phase pré-analytique

L'analyse des microparticules requiert des conditions pré-analytiques précises. Le prélèvement doit être réalisé dans des conditions standards. La ponction veineuse périphérique (19 à 22 Gauge) est réalisée sur citrate de sodium pour éviter la stimulation cellulaire et des facteurs de la coagulation dans le tube de prélèvement. Des études ont évalué l'utilisation de tubes contenant de l'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique), de l'ACD (Acide citrique, Citrate de sodium, Dextrose) ou de l'héparine. Elles ont montré que le nombre de microparticules était plus élevé avec des tubes contenant de l'héparine et de l'EDTA

comparé aux tubes contenant du citrate, qui lie le calcium circulant (Yuana, Bertina et al. 2010, Lacroix, Judicone et al. 2012). Cependant l'EDTA, altère les propriétés de certaines protéines dont la conformation dépend du calcium lié à certains de leurs domaines (Piccin, Murphy et al. 2007).

Après le prélèvement, les tubes doivent être centrifugés dans l'heure suivant le recueil pour éviter la stimulation artéfactuelle des cellules et des facteurs de coagulation. Les sociétés savante ESC et ISEV et ISTH fournissent régulièrement des recommandations sur les méthodes de purification et de mesure des MPs pour s'adapter à l'avancement des techniques et connaissances et améliorer la détection des MVs dans les fluides biologiques.

#### 5-4 Les méthodologie de caractérisation de dosages des microparticules

Depuis 1967, d'autre techniques d'identification par microscopie de fluorescence ont été développées. Récemment, Yuana et al. (Yuana, Oosterkamp et al. 2010) ont utilisé la microscopie à force atomique pour détecter et quantifier les microparticules d'origine plaquettaire ainsi que pour étudier la distribution de leur taille. Les microparticules sont également identifiables par leurs propriétés procoagulantes à l'aide de tests enzymatiques. Ces tests peuvent être adaptés pour la détermination de l'origine cellulaire. Les principales techniques et leurs limites sont décrites dans le tableau 3.

	<b>Méthode de quantification</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Cytométrie de flux</b> (Ibrahim and van den Engh 2007, Robert, Poncelet et al. 2009)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sondes de fluorescence</li> <li>- Propriétés de diffusion de la lumière</li> <li>- MPs en suspension</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rapide</li> <li>- Plusieurs antigènes analysables dans un seul échantillon</li> <li>- MPs analysées individuellement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Impossibilité de détecter des MPs inférieur à 100- 400 nm</li> <li>- L'identification de l'origine cellulaire dépend des anticorps</li> </ul>
<b>Elisa</b> (Hugel et al. 2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Immunocapture</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Répandu</li> <li>- Pas de restriction de taille</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse effectuée par lots</li> <li>- Aucune détermination de taille possible</li> <li>- Quantification sur la base d'un seul antigène</li> </ul>
<b>Essais fonctionnels</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité procoagulante</li> <li>- Activité enzymatique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indépendant de la taille</li> <li>- Fournit une indication de l'activité biologique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse effectuée par série - Pas de détermination de la taille possible</li> </ul>
<b>Microscopie à force atomique</b> (Leong, Podor et al. 2011, Calo, Reguera et al. 2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comptage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Détection précise de la structure 3D</li> <li>- Quantification et analyse fonctionnelle de leur teneur en protéine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Technologie délicate</li> <li>- Développement de surfaces recouvertes d'anticorps spécialisés</li> </ul>
<b>Nanoparticle tracking</b> (Dragovic, Gardiner et al. 2011, van der Pol, Coumans et al. 2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diffusions de la lumière</li> <li>- Mouvements browniens des MPs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Visualisation des MPs de taille comprise entre 25 et 1500 nm</li> <li>- Enumération</li> <li>- Marquage individuel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Technologie pas facilement disponible</li> <li>- Temps d'analyse long</li> <li>- Coûteux</li> </ul>

**Tableau 3 : Récapitulatif des différentes techniques de dosage des microparticules (d'après Carole Pellegrini)**

## 5-5- Les microparticules endothéliales : Des vésicules sophistiquées modulant la fonction vasculaire et tissulaire

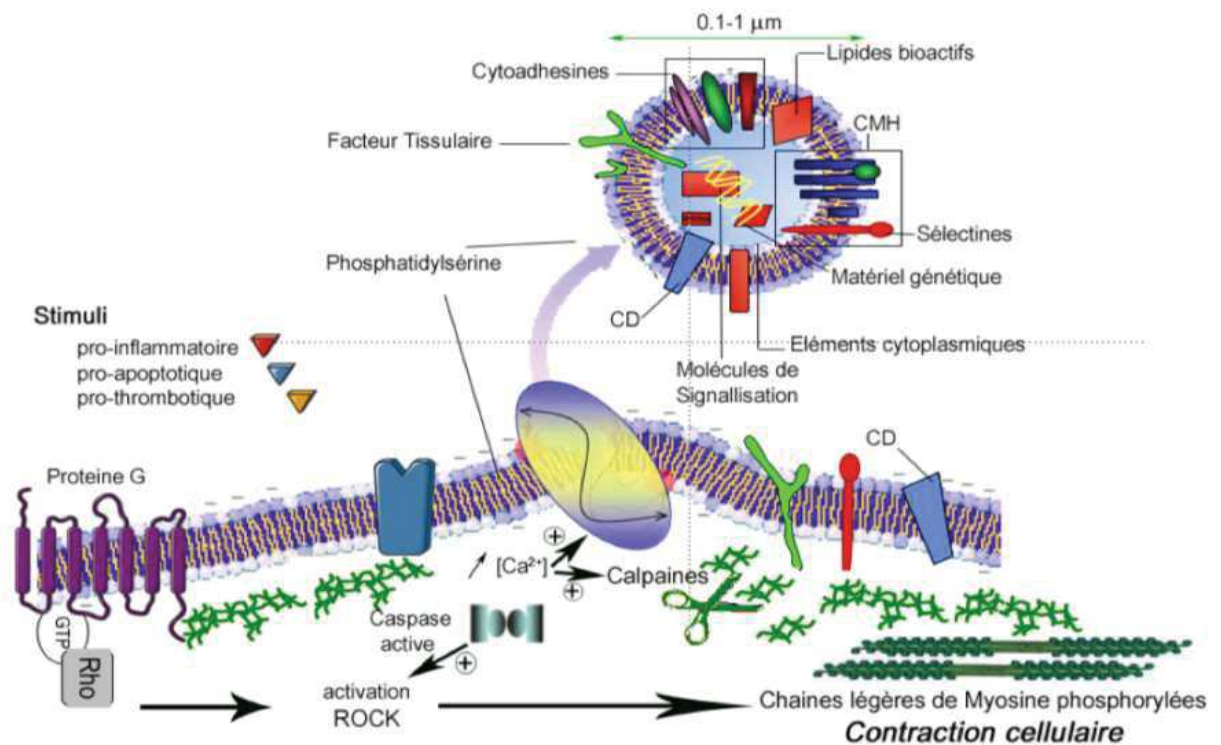
Plusieurs types de médiateurs physiopathologiques, tels que le TNF $\alpha$ , la thrombine, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1), l'angiotensine II et les lipopolysaccharides bactériens (LPS), peuvent induire la formation concentration-dépendante de MPs endothéliales, ce qui a été démontré *in vitro* pour différents types cellulaires (Combes, Simon et al. 1999) (Peterson, Sander et al. 2008) (Burger, Montezano et al. 2011) (Sapet, Simoncini et al. 2006). La compréhension fine des mécanismes associés à la formation de MPs endothéliales *in vivo* et l'identification des stress physiopathologiques initiateurs fait encore défaut. Barry et al. ont observé que les microparticules plaquettaires induisent l'expression endothéliale de COX-2 et la production de prostacycline (PGI<sub>2</sub>), et favorisent l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Barry, Pratico et al. 1997), (Barry, Praticò et al. 1998). Les effets des microparticules s'étendent à la coagulation, au tonus vasculaire, à l'inflammation, à l'angiogenèse, aux métastases, à la régénération et peut-être même au façonnement de la réponse immunitaire innée et adaptative (Markiewicz, Richard et al. 2013). Les microparticules détournent les récepteurs fonctionnels, les protéines, les lipides bioactifs et le matériel génétique de la cellule parentale et se comportent comme des navettes convoyant des molécules actives, et des effecteurs de l'environnement intercellulaire (Silambanan, Hermes et al. 2020). Le fait que les microparticules se forment toujours dans des circonstances délétères est peut-être une simplification de leur rôle (Curtis, Edelberg et al. 2013) - (Silambanan, Hermes et al. 2020). De fait, elles font probablement partie de l'ensemble de l'homéostasie cellulaire et l'étude de leurs cinétiques d'apparition et des variations de leurs capacités effectrices est souvent négligée.

## 5-6-Biogénèse des MPs endothéliales (MPE)

Il a été montré *in vitro* que les facteurs pro-inflammatoires, pro-apoptotiques et pro-coagulants provoquent la formation et la libération de MPs endothéliales (MPE). De plus, les facteurs rhéologiques favorisent l'émission de MPs. Ainsi, les patients en insuffisance rénale terminale hémodialysés et à haut risque cardio-vasculaire, ont un taux de MPs endothéliales circulant inversement corrélé aux forces de cisaillement de l'artère brachiale (Boulangier, Amabile et al. 2007). La génération accrue de MPs endothéliales peut être considérée comme un événement marquant le début d'un dysfonctionnement endothélial, ce qui est observé dans le cadre du tabagisme passif qui s'accompagne chez le sujet sain d'une altération du tonus vasculaire et d'une élévation de la libération des MPs endothéliales (Heiss, Amabile et al. 2008). L'analyse par cDNA arrays du profil d'expression des cellules endothéliales microvasculaires (HMEC) stimulées par la thrombine a montré une augmentation rapide dans les deux heures de l'expressions des gènes liés à l'organisation du cytosquelette (Sapet, Simoncini et al. 2006). L'activation du cytosquelette comme pré-requis à l'émission de MPs a également été retrouvée dans des cellules souches mésenchymateuses, en inhibant la formation de microfilaments par la cytochalasine B (Collino, Deregibus et al. 2010). Plusieurs kinases ont été identifiées dans la signalisation de l'émission des MPE. L'apoptose des cellules endothéliales microvasculaires (HMEC) induite par la thrombine conduit à la surexpression de ROCK II (Rho kinase) après 18 heures et détectable dès 4 heures (Sapet, Simoncini et al. 2006). Par ailleurs, l'activation de ROCK II est dépendante de la caspase 2 et ce mécanisme de lyse du cytosquelette est indépendant de ROCK I, une autre kinase impliquée dans la libération des MPs plaquettaires (Nomura and Shimizu 2015). La formation de MPs endothéliales en réponse à l'angiotensine II (Ang II) est-elle dépendante et de NADPH et de ROCK. Enfin, la thrombine

clive TRAIL membranaire et libère sa forme soluble qui se comporte comme une cytokine pro-apoptotique en se liant au récepteur TRAIL/R2 induisant une libération de MPs endothéliales dépendante de NF- $\kappa$ B. En effet, le TRAIL soluble et la thrombine induisent la libération de MPs endothéliales, alors que les milieux conditionnés de cellules endothéliales dépourvues de TRAIL et stimulées par la thrombine ne le font pas (Simoncini, Njock et al. 2009). Ces données indiquent une réponse inflammatoire endothéliale en réponse à la thrombine qui l'amplifie via TRAIL.

Dans un autre contexte inflammatoire, les MPs endothéliales émises en réponse au TNF- $\alpha$  de manière P38 dépendante sont capables de favoriser l'action autocrine proinflammatoire qui se traduit par l'expression de l'ICAM-1 mais n'est plus P38 dépendante (Nomura and Shimizu 2015). De plus, il a été démontré que le Clopidogrel (antiplaquettaire oral), inhibe la génération de MPs des HUVEC suite à son action sur la voie de signalisation MAPK p38. (Ryu and Kim 2011). Par ailleurs, la perturbation des rafts lipidiques par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (MBC) et la nystatine abolit la formation des MPs, démontrant que le rôle des rafts lipidiques dans le processus d'émission des MPs, au site membranaire de leur formation.



**Figure 20 : Représentation schématique de la formation de microparticules. (d'après B. Bakouboula et al. *Frontiers in Transplantation*)**

### 5-7- Action des microparticules sur les cellules endothéliales

Les MPs sont impliquées dans la communication intercellulaire, dans les états physiologiques comme dans les états pathologiques. Elles jouent un rôle essentiel dans l'angiogenèse, l'inflammation, l'activation endothéliale ou la coagulation (Alexandru, Badila et al. 2016). Les effets spécifiques des MPs dépendent de leur origine, de leur concentration, du stimulus de leur libération et ou de la maladie sous-jacente. Chez les patients DT2, les MPs circulantes ont des caractéristiques et effets différents sur l'angiogenèse selon des complications micro- et macrovasculaires (Tsimmerman, Roguin et al. 2011). Les MPs contribueraient à la pathogenèse de maladies cardiovasculaires, en participant à la progression du dysfonctionnement endothélial conduisant éventuellement à l'athéromatose ou l'hypertension (Silambanan,

Hermes et al. 2020)-(Versari, Daghini et al. 2009). Ainsi les taux de MPE circulantes semblent inversement corrélés aux performances endothéliales-dépendantes des vaisseaux. L'émission de MPE est supérieure lorsque la disponibilité endothéliale du NO est faible et lorsque la barrière endothéliale est endommagée. D'une manière générale, le stress oxydant et la réponse aux cytokines inflammatoires sont connus depuis longtemps pour favoriser l'émission des MPE (Brodsky, Zhang et al. 2004) (Amabile, Guérin et al. 2005). De même, les MPs augmentent l'apoptose des cellules endothéliales et altèrent l'angiogenèse (Mezentsev, Merks et al. 2005). Les MPE exposent le facteur tissulaire et la Phosphatidylsérine. Elles sont capables de lier les facteurs de la coagulation et d'activer la cascade en favorisant la formation de thrombus aux sites des lésions endothéliales (Yong, Koh et al. 2013). De plus, des MPE circulantes ont été identifiées dans le diabète de type 2 et la coronaropathie (Zarà, Guidetti et al. 2019). Cependant, les propriétés des MPE sont complexes et dépendent de plusieurs facteurs tels que, leur composition, leur concentration, le stimulus de libération et le contexte pathologique. Elles ont également une fonction protectrice liée à la régénération et à la réparation vasculaire (Yáñez-Mó, Siljander et al. 2015). Leur potentiel thérapeutique a été démontré sur la néovascularisation post-ischémique par plusieurs études *in vitro* et *in vivo* (Tsimmerman, Roguin et al. 2011) - (Letsiou and Bauer 2018).

## 5-8- Les microparticules : Rôle en tant que marqueur de dysfonctionnement endothélial

Les MPs endothéliales sont étroitement associées à la dysfonction endothéliale (Park and Park 2015)- (Shantsila, Wrigley et al. 2012). Des études ont démontré des augmentations significatives des niveaux plasmatiques de MPEs en présence de facteurs de risque cardiovasculaire, tels que le tabagisme (Mobarrez, Antoniewicz et al. 2014) et l'obésité



((Esposito, Ciotola et al. 2006)) et dans plusieurs maladies cardiovasculaires et métaboliques, telles que la coronaropathie, le diabète, le syndrome métabolique, l'hypertension pulmonaire, l'insuffisance rénale et l'insuffisance cardiaque (Yong, Koh et al. 2013),(Pisetsky, Ullal et al. 2012), (Parker, Al-Husain et al. 2014), (Bartoloni, Alunno et al. 2015). Plusieurs études ont caractérisé, quantifié et analysé la pertinence des MPs en tant que marqueurs pro coagulants dans l'hypertension artérielle et pulmonaire, l'obésité, le DT1 et le DT2 (Jung, Chu et al. 2011), (Boulanger, Amabile et al. 2007, Song, Chou et al. 2015), (Amabile, Heiss et al. 2008) (Sabatier, Darmon et al. 2002) (Boulanger, Amabile et al. 2007). Les MPE mais pas les MPs d'autres origines cellulaires seraient utiles pour le suivi de la progression des maladies cardiovasculaire, et de l'efficacité des traitements athéro-protecteurs (Alexandru, Badila et al. 2016), (Nozaki, Sugiyama et al. 2010) -(Brogan, Shah et al. 2004)- (Jung, Chu et al. 2011). Les MPE peuvent également constituer un biomarqueur plus stable que d'autres marqueurs de la fonction endothéliale vasoprotectrice tels que le NO, eNOS et l'ET-1 solubles. Elles seraient plus fiables dans certains cas car elles ne sont pas affectées par les substances pharmacologiques, telles que les nitrates (Song, Chou et al. 2015).

## 5-9- Les microparticules endothéliales : biomarqueurs du diabète et maladie cardiovasculaires

Dans le diabète, de nombreuses études suggèrent que les MPs endothéliales sont nocives et favorisent la progression pathologique et les désordres cardiovasculaires liés la diminution de la fonction endothéliale (Deng, Wang et al. 2016). Chez les patients atteints de DT2, les concentrations des MPE circulantes sont élevées lors de l'apparition de complications thrombotiques et elles portent du facteur tissulaire (Tsimerman, Roguin et al. 2011). D'après une étude *in vitro* (Ettelaie, Su et al. 2008), les MPs porteuses de TF générées par des cellules

mésenchymateuses rénales en réponse au glucose favorisent le développement des capillaires dans les cellules endothéliales de la peau humaine. Ainsi, les MPs endothéliales sont des indicateurs pour l'établissement d'un profil de risque cardiovasculaire dans le diabète (Sinning, Losch et al. 2011). Des taux élevés de MPs circulantes provenant des plaquettes, des monocytes, des lymphocytes, des granulocytes et des cellules endothéliales ont aussi été signalées chez des patients atteints de DT1, DT2, de rétinopathie diabétique, de néphropathie diabétique, de maladie cardiovasculaire et d'ischémie vasculaire cérébrale (Serebruany, Malinin et al. 2008) (Nomura, Inami et al. 2009) (Zhang, Ou et al. 2019) (Ogata, Imaizumi et al. 2005, Zhang, Chen et al. 2018). Enfin, Les lésions vasculaires chez les patients atteint de DT1 provoquent un stress tissulaire qui déclenche la production de MPs pro-coagulantes circulantes favorisant le développement des complications thrombotiques (Nomura and Shimizu 2015). Dans le cadre de la transplantation d'îlots pancréatiques intra-portale les MP circulantes, dont les MPEs, ont été associées à la progression de la dysfonction du greffon et au rejet.

### 5-10- Les microparticules endothéliales et l'EndTM

Quelques études ont indiqué qu'il existe une implication directe des MPs dans la fibrose et peut-être dans l'apparition de la transition endothélio-mésenchymateuse (TEM). D'une manière générale, le contenu des MPs peut comprendre des médiateurs vasoactifs favorisant la vasoconstriction (comme le thromboxane), des facteurs de croissance (TGF- $\beta$  et PDGF) et la protéine HMGB1 impliquée dans la fibrose (McCarthy, Wilkinson et al. 2016),(Dignat-George and Boulanger 2011). Dans le contexte de la sclérose systémique, les MPs plaquettaires isolées de patients ont été identifiées comme capables d'interagir avec les neutrophiles, de provoquer leur autophagie et favorisant la génération de (NETs) (Maugeri, Capobianco et al. 2018). Il faut noter que, les MPs plaquettaires interagissent avec les NETs, eux-mêmes

susceptibles de se lier à l'endothélium inflammatoire. L'ensemble de ces données soutient l'hypothèse que les MPs sont des médiateurs de l'EndTM, déjà associée à la NETose (Pieterse, Rother et al. 2017). En outre, les MPs pro-oxydantes favorisent la production des ROS de manière Nox-dépendante, maintenant ainsi un stress oxydant connu comme déclencheur important de la fibrose (Dignat-George and Boulanger 2011).

### **5-11- Les microparticules et la régénération hépatique**

La néovascularisation rapide de la greffe d'îlots dans le foie reste un enjeu dans la transplantation d'îlots pancréatiques. Witek et ses collaborateurs ont montré que les concentrations de MP hépatiques stellaires portant le morphogène Sonin Hedgehog (Shh) sont élevées dans la bile de rats après une ligature du canal biliaire, un type de lésion hépatique qui s'accompagne d'un remodelage vasculaire hépatique rapide. Ces MPs-Shh+ s'accumulent dans le foie fibrotique et régulent la vasculogenèse et l'angiogenèse en modifiant l'expression de gènes dans les cellules endothéliales sinusoidales. Les MPs dérivées de culture de cellules souches hépatiques humaines contribueraient à la régénération hépatique dans un modèle d'hépatectomie chez le rat, et apparaissent comme un outil thérapeutique potentiel (Herrera, Fonsato et al. 2010). Cependant, les propriétés fibrinolytiques des MP et leurs rôles dans le remodelage hépatique restent à démontrer (299).

### **5-12- Intérêt des microparticules dans le suivi thérapeutique**

Puisque les concentrations de MPs circulantes sont souvent corrélées avec la gravité de la pathologie, l'analyse de leurs variations à la suite d'un traitement pharmacologique ou à la suite d'une transplantation d'organe est primordiale pour établir un bon suivi clinique.

### **5-12-a- Microparticules en transplantation d'organes**

Dans les organes fortement vascularisés, il est probable que l'atteinte tissulaire se traduise par un déversement de MPs tissulaires dans la circulation systémique. Actuellement, des preuves de l'intérêt d'un suivi post-greffe par des MPs circulantes en tant que biomarqueur de l'état fonctionnel des organes transplantés s'accumulent dans la littérature. L'origine cellulaire de la MP étudiée varie selon l'organe. Néanmoins des taux élevés de MPs porteuses de FT sont souvent décrits, ce qui ne préjuge pas de leur origine (monocyte, macrophage, neutrophile, endothélium) mais indique une élévation de l'état pro-coagulant. Malgré l'amélioration des procédures de prélèvement et de greffe, et l'efficacité des médicaments immunosuppresseurs, ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires sous-jacents des lésions d'ischémie- reperfusion, il existe toujours un manque de marqueur précoce universel des lésions de greffe. L'enjeu en transplantation est le suivi du rejet proche de la greffe mais aussi de la dysfonction chronique du greffon, s'établissant progressivement.

### **5-12-b- Microparticules : Marqueurs circulants en transplantation des cellules souches**

Chez des patients ayant reçu une allogreffe de cellules souches, le taux de MPE serait un élément diagnostique pour différencier le rejet du greffon contre l'hôte (GVHD) des autres complications post-greffe (Pihusch, Rank et al. 2006). L'équipe de Nomura a confirmé l'augmentation des taux de MPE dans les trois premières semaines post-greffe commemarqueurs discriminants du GVHD (Nomura, Ozaki et al. 2008). De plus, De Rop et ses collaborateurs ont montré la pertinence diagnostique des MP porteuses de FT pour une meilleure stratification du risque de rejet de greffe (302).

### **5-12-c- Microparticules Endothéliales : Marqueurs circulants en transplantation rénale**

Les MPs circulent en concentration élevée dans des pathologies rénales (Faure, Dou et al. 2006)-(Amabile, Guérin et al. 2005). En transplantation rénale, les biopsies sont informatives du dysfonctionnement de l'allogreffe repéré par coloration de la molécule du complément C4d. Chez les patients ayant un rejet cellulaire aigu prouvé par biopsie, la concentration de MPE circulantes associées au rejet était élevée, alors qu'elle est inchangée dans les autres cas de dysfonctionnement (Qamri, Pelletier et al. 2014). Chez 52 patients insuffisants rénaux hémodialysés, le taux élevé de MPs circulantes totales (An V+), de MPs endothéliales, plaquettaires (CD41+), leucocytaires (CD45+), granulocytaires (CD66+) et érythrocytaires (CD235a+) ainsi que leur activité pro-coagulantes (MP FT+) témoigne de l'amplitude du dommage vasculaire. Le taux se normalise après transplantation rénale avec des cinétiques différentes selon l'origine cellulaire (305). Cependant, les valeurs de cellules endothéliales circulantes et de VCAM-1 soluble restent plus élevées que celles des témoins sains, contrairement aux MPs endothéliales devenues comparables (Al-Massarani, Vacher-Coponat et al. 2009). Une explication possible serait la forte réduction des agents systémiques nocifs pour l'endothélium tels que les toxines urémiques, la surcharge hémodynamique, le déséquilibre électrolytique et les niveaux d'oxydation, alors que les effets mécaniques de la dialyse favorisent la génération de MPs circulantes (Daniel, Fakhouri et al. 2006). En outre, Qamri et ses collaborateurs ont confirmé par cytométrie en flux l'atteinte endothéliale dans une cohorte plus élargie de 231 transplantés rénaux dont 14 en transplantation combinés rein / pancréas et 60 donneurs sains, une réduction significative des taux circulants de MP endothéliales, 2 mois post-transplantation.

#### **5-12-d- Microparticules endothéliales : Marqueurs circulants en transplantation hépatique**

Brodsky et ses collaborateurs ont constaté que les taux de MPs circulantes endothéliales CD144+ et hépatiques HepPar+ étaient significativement élevés chez les patients le 1er jour après la transplantation hépatique jusqu'au 7ème jour. Chez les patients transplantés, les taux de MPs circulantes changent de façon dynamique et sont en corrélation avec l'état physiopathologique (Brodsky, Facciuto et al. 2008). Dans des récents travaux, les MPs endothéliales CD31+ et dérivées des cellules T (cytotoxiques) CD8+ et CD4+ (auxiliaires) étaient en effet associées aux épisodes de rejet aigu. Cependant, ces données nécessitent une confirmation car les MPs étaient isolées à partir de sérum, c'est à dire après activation in-vitro des cellules sanguines prélevées et aussi des enzymes de la coagulation et protéases circulantes (Morgul, Splith et al. 2018).

#### **5-12-e- Marqueurs circulants en transplantation cardiaque**

Chez les patients transplantés cardiaques, les taux de MPs endothéliales (CD31+, PECAM+) post-transplantation sont significativement plus élevés que chez les témoins sains, et les MPs endothéliales (CD62E+, E-selectine+) semblent être un facteur prédictif indépendant du rejet aigu de l'allogreffe. En effet, le ratio des MPs endothéliales (E-sélectine+/ PECAM+) serait indicateur pertinent du degré d'activation (rapport élevé) ou d'apoptose cellulaire (rapport faible). Des ratios significativement plus faibles sont observés chez les patients transplantés comparativement aux insuffisants cardiaques et témoins sains (Boulanger, Amabile et al. 2006). Ainsi, l'évaluation phénotypique des MPE fournirait des informations pertinentes sur la nature de la lésion endothéliale (Morel, Ohlmann et al. 2008). La vasculopathie d'allogreffe cardiaque (CAV) est le déterminant le plus important de la survie de l'allogreffe cardiaque et une cause majeure de décès après la transplantation cardiaque. Singh et ses collaborateurs

ont trouvé des niveaux de MPE CD144 +/CD42- significativement élevés chez les patients transplantés cardiaques avec CAV indiquant que les MPs endothéliales CD144+/CD42a- sont discriminantes de la sévérité de l'atteinte chez les patients transplantés cardiaques (Singh, Van Craeyveld et al. 2012).

#### **5-12-f- Microparticules endothéliales : Marqueurs circulants en transplantation d'îlots de Langerhans**

La perte de fonction du greffon d'îlots pancréatiques après une transplantation intraportale est multifactorielle. L'absence de marqueurs précoces du rejet ou de la perte de la fonction des îlots transplantés est un obstacle majeur d'un bon suivi de la fonction du greffon. Lorsque le taux de C peptide sanguin diminue, 95% des îlots transplantés sont déjà détruits, ce qui en fait un marqueur tardif de la dysfonction insulaire (Chhabra and Brayman 2014). De plus, les biopsies ne sont pas informatives car les îlots sont disséminés dans l'arbre vasculaire hépatique. Des études préliminaires dans notre équipe, ont montré la faisabilité du suivi chez des patients avec rejet (Toti, Bayle et al. 2011). Les résultats suggèrent que le pic de MPs procoagulantes mesurées par dosage prothrombinase pourraient avoir une valeur pronostique du rejet et constituer une preuve de la perte du greffon (Toti, Bayle et al. 2011).

Dans ce contexte, une cohorte de patients diabétiques a été explorée sur trois ans.

### **- La cohorte MIPIL (Microparticules et transplantations d'îlots)**

Une autre étude a été réalisée par notre équipe dont l'objectif était double : i) d'identifier des MPs circulantes de cellules  $\beta$  et leurs variations chez des patients transplantés d'îlots, ii) d'évaluer la valeur pronostique des MPs circulantes pour le suivi du rejet en comparant trois catégories de greffés : succès partiel de la greffe (PS) ou succès complet de la greffe(S), ou échec de la greffe (F) stratifiées en utilisant le  $\beta$ -score comme indicateur clinique de la fonction du greffon. Des valeurs faibles similaires de PSA-NCAM+-MPs ont été trouvées chez les volontaires sains et les patients en succès de greffe, indiquant l'absence de dommages cellulaires. PSA-NCAM+ est un marqueur spécifique de la cellule bêta et de la cellule neuronale de l'embryon. Chez les patients en succès partiel ou en échec de greffe, une élévation de 2 à 3 fois des taux circulants de PSA-NCAM+-MPs a précédé chaque baisse du  $\beta$ -score, ainsi qu'une augmentation concomitante des besoins en insuline, suggérant une atteinte des cellules  $\beta$  ou une altération de leur fonction (figure 22). L'ensemble du suivi longitudinal a montré une séquence d'activations cellulaires identifiées par les pics successifs de MPs caractérisant la progression du processus de perte de fonction du greffon. Les PSA-NCAM+-MPs mesurées à l'aide d'un test prothrombinase sont des marqueurs précoces non invasifs du dysfonctionnement des îlots survenant dans les deux mois précédant la chute du  $\beta$ -score, tandis que les ASGPR+-MPs et les MPE CD105+ signalent le remodelage du tissu hôte. Bien que plus précoces, ces dernières MPs ne sont pas spécifiques du dommage de la cellule  $\beta$ , et donc moins pertinentes pour le suivi du rejet d'îlots (Figure 21). Cependant la cause d'une altération endothéliale intra-insulaire au cours de la perte de fonction des îlots est suggéré par ces résultats.



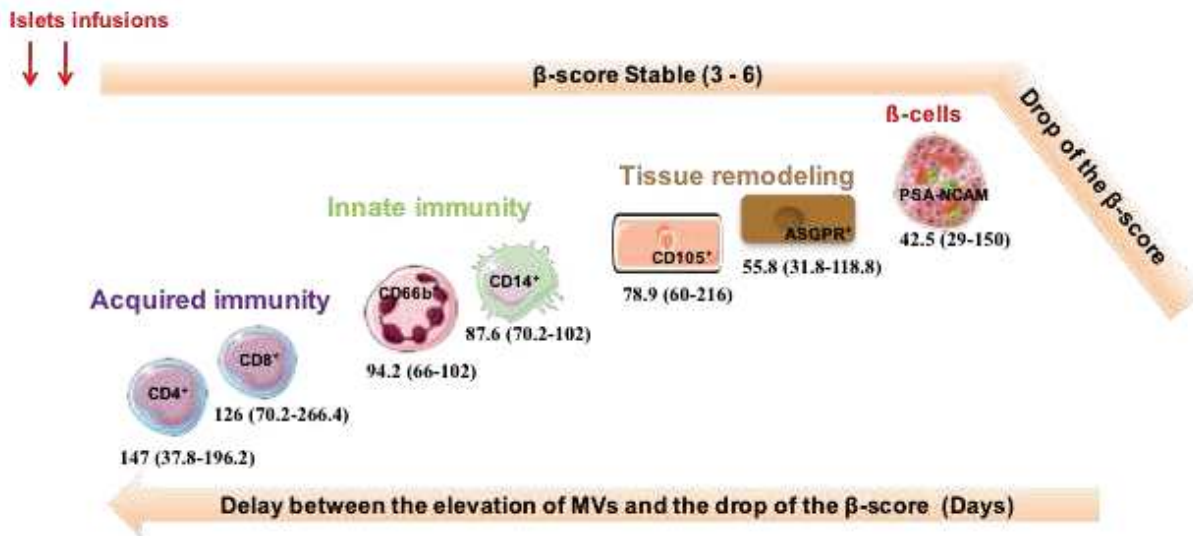


Figure 21 : Libération des MPs circulantes pendant la transplantation d'îlots, en fonction de leur origine cellulaire (Amoura, El-Ghazouani et al. 2020)

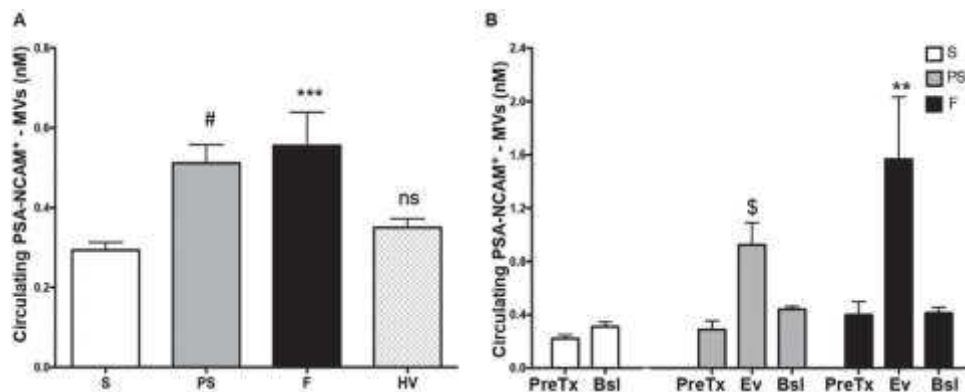


Figure 22: Variation du taux d'expression de PSA-NCAM+MP circulants chez les patients transplantés avec succès, succès partiel ou échec de la greffe (Amoura, El-Ghazouani et al. 2020).

## 6- Hypothèses et objectifs du travail

Aux vues des données de la littérature et des résultats de notre équipe nous faisons les hypothèses que :

- Les cytokines pro-inflammatoires libérées durant la réaction IBMIR, induisent une transition endothélio-mésenchymateuse des cellules endothéliales intra-insulaires
- Un agoniste du GLP-1 récepteur, le Dulaglutide, utilisé dans le traitement du DT2 et ayant démontré son bénéfice cardio vasculaire protège l'endothélium intra-insulaire de l'EndMT induite par le stress cytokinique de l'IBMIR.
- l'effet protecteur du Dulaglutide est en partie médié par les MPs libérées par les cellules endothéliales

Les objectifs du présent travail sont :

1. Etudier l'effet de cytokines pro-inflammatoires mimant l'IBMIR sur la transition endothélio-mésenchymateuse des cellules endothéliales insulaires pancréatiques de souris
2. Etudier l'effet protecteur du Dulaglutide sur la transition endothélio-mésenchymateuse des cellules endothéliales induite par le stress cytokinique
3. Etudier le rôle des MPs endothéliales dans l'effet protecteur du Dulaglutide sur la transition endothélio-mésenchymateuse des cellules endothéliales

**Dulaglutide prevents the mesenchymal transition of intra-islet  
endothelial cells induced by IBMIR cytokines and derived-  
microvesicles**

*Soumis à*

*Journal of Cellular and Molecular Medicine*

## **Contexte de l'étude**

Le taux d'insulino-indépendance un an après une transplantation d'îlots approche 50 à 70%, et atteint 30% à 50% cinq ans après transplantation (CITR, data 2017). La perte progressive de la capacité fonctionnelle des îlots transplantés est probablement multifactorielle.

### **Vascularisation et greffe d'îlots : impact endothélial de l'ischémie-reperfusion**

Parmi les causes possibles de dysfonction de l'îlot, la vascularisation défectueuse intra-insulaire par suite du dommage endothélial est parfois évoquée. En effet, lors de la transplantation les vaisseaux intra-insulaires et leurs connexions avec la circulation systémique du receveur sont nécessaires pour la restauration du taux d'insuline chez le patient DT1 insulino-déficient (Takaki and Shimoda 2020). Ainsi, la préservation de l'endothélium des îlots transplantés ainsi que celle de l'endothélium hépatique du receveur est cruciale. En effet, toute altération endothéliale, de la veine portale ou dans un pré-capillaire hépatique conduit à un stress oxydant un phénotype endothélial généralement procoagulant et proinflammatoire, l'ensemble pouvant favoriser un remodelage inapproprié de la structure du vaisseau.

Au cours du prélèvement des îlots, l'hypoxie endothéliale est majeure avant même leur implantation dans le foie. De plus, le contact des îlots injectés avec le sang de la veine portale conduit à la réaction inflammatoires IBMIR dans les 24 premières heures post-transplantation (Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction) caractérisée par la production de cytokines dans l'environnement insulaire. Notre hypothèse dans ce travail était centrée sur l'endothélium intra-insulaire : L'ischémie des îlots isolés associés à l'IBMIR favoriserait non seulement l'inflammation vasculaire aiguë dans l'environnement de l'îlot greffé mais aussi une

atteinte endothéliale des vaisseaux intra-insulaire impactant la fonction des îlots et pouvant induire un rejet de greffe. Nous avons examiné la possibilité que la perte de l'endothélium fonctionnel intra-insulaire pouvait s'établir par une transformation endothélio-mésenchymateuse induite par les cytokines de l'IBMIR. Cette éventualité a été envisagée dans le contexte de la greffe rénale (cf paragraphe ci-dessous) (Wang, Han et al. 2017).

### **Protection des cellules de l'îlot au cours de la greffe : données précédentes du laboratoire**

La protection des îlots pré-injection et une fois greffés apparaît une piste importante pour limiter la dysfonction du greffon et sa perte. Des données du laboratoire dans un modèle cellulaire de cellules  $\beta$  soumises au stress oxydant, ou inflammatoire par les cytokines de l'IBMIR, indiquaient clairement une protection par les analogues du GLP-1 (Liraglutide) contre l'activité du facteur tissulaire (FT), initiateur cellulaire de la coagulation (Gleizes, Kreutter et al. 2016), l'émission de microparticules (MPs) à action autocrine procoagulantes et pro-apoptotiques (Constantinescu, Gleizes et al. 2014), (Gleizes, Kreutter et al. 2016).

### **Protection contre les mécanismes endothéliaux induits par l'IBMIR : l'hypothèse de l'EndTM**

A côté de la mort cellulaire, l'une des réponses endothéliales au stress de l'ischémie et de l'IBMIR est la transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT). Initialement décrite au cours de l'embryogenèse du système cardiovasculaire, l'EndMT induite par les cytokines conduit à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux caractérisé par une perte de l'adhésion intercellulaire, un aspect en fuseau et une dysfonction endothéliale majeure, la cellule devant pro-inflammatoire et procoagulante.

L'EndTM dans le contexte de la greffe d'îlots pancréatique n'est que peu étudiée. Le Liraglutide, un analogue du GLP-1, limiterait l'apparition de l'EndTM (Tsai, Lee et al. 2019).

Dans ce travail nous nous sommes intéressés au Dulaglutide, dont la demi-vie chez le diabétique DT2 est de 5 jours, et à ses effets protecteurs sur l'EndTM intra-insulaire en réponse au stress cytokinique de l'IBMIR. Récemment, le Dulaglutide, a été démontré avoir un effet de prévention primaire du risque cardiovasculaire chez les patients DT2 traités par le Dulaglutide (étude REWIND) suggérant une protection via le récepteur du GLP-1 endothélial. De plus, des données de la littérature ont établi que les MPs endothéliales sont des acteurs de la réponses vasculaire et que les MPs qu'elles émettent en réponse au stress favorisent la thrombogénicité et le dysfonctionnement endothélial dans les cellules endothéliales coronaires notamment (Gleizes, Kreutter et al. 2016)-(Abbas, Jesel et al. 2017).

### **Modèle d'EndTM induite par les cytokines de l'IBMIR**

Pour établir un modèle d'EndTM spécifique aux cellules intra-insulaires, nous avons étudié le lien entre les cytokines libérées lors de la réaction IBMIR et l'induction de l'EndTM des cellules endothéliales intra-insulaire MS-1 ainsi que l'émission des MPs et leurs propriétés autocrines pro inflammatoires. Puis nous avons examiné l'impact du Dulaglutide en tant qu'analogue du GLP-1 dont le récepteur est présent sur les cellules endothéliales MS-1.

# **Dulaglutide prevents the mesenchymal transition of intra-islet endothelial cells induced by both IBMIR cytokines and derived-microvesicles.**

Authors:

**Noura Sbat<sup>1</sup>, Mohamad Kassem<sup>1,2</sup>, Foteini Moschovaki Filippidou<sup>1,2</sup>, Margaux Gracyasz<sup>1</sup>,  
Fatiha Zobairi<sup>2,4</sup>, Laurence Kessler<sup>2,3,4\*</sup>, Florence Toti<sup>2,5\*</sup>**

- 1- University of Strasbourg, Strasbourg, France
- 2- INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), Centre de recherche en biomedicine (CRBS).
- 3- Department of Diabetes and Nutrition Endocrinology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.
- 4- Faculty of Medicine, Université de Strasbourg, France
- 5- Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

\* Joint-last co-authors

## **Corresponding author:**

### **TOTI Florence**

INSERM (French National Institute of Health and Medical Research),  
UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), Strasbourg, France.

CRBS, 1 Rue Eugène Boeckel, Strasbourg, 67000, France

E-mail : [toti@unistra.fr](mailto:toti@unistra.fr)

## Abstract

In pancreatic islet transplantation, islets injected in portal blood undergo an acute immediate inflammatory response termed IBMIR owing to elevated cytokines such as IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ . Islet vascularization is crucial to the efficient glycemic control by the graft. We investigated the effect of IBMIR cytokines on the endothelial to mesenchymal transition (EndMT) of intra-islet endothelial cells (MS-1), and the cytoprotection by Dulaglutide, a GLP1-R agonist. Kinetics of EndMT induced by IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  were determined by western blot, confocal microscopy and wound-healing assays and compared to TGF- $\beta_2$ . Data indicate distinct variations for each cytokine, the overall progressive disappearance of endothelial CD31 and VE-cadherin and the opposite acquisition of the mesenchymal  $\alpha$ -SMA and Vimentin, culminating at 72h. At 72h, cells up-regulated ICAM-1 (+64,39% - +58,77% vs. untreated) by confocal microscopy and shed pro-inflammatory microvesicles (+40,39% - 38,07% vs. untreated) as detected on naïve target MS-1. Dulaglutide exerted full cytoprotection against all cytokine-driven responses at 72h, that was completely reversed by 200 nM exendine (9-39), a GLP-1R antagonist. Dulaglutide also shifted the pro-inflammatory into cytoprotective effect of MVs. In conclusion, data demonstrate that Dulaglutide protects intra-insular endothelial cells from EndMT, and limits its propagation mediated by MVs.

**Keywords:** EndMT, GLP1-R agonist, Extracellular vesicles, endothelial protection.

**Abbreviations:** EndMT: Endothelial-to-mesenchymal transition; GLP-1R: Glucagon-Like Peptide1 Receptor, TF: Tissue Factor, ALK5: Activin receptor Like Kinase 5, MVs: Microvesicles, Dula: Dulaglutide; EX: Exendine (9-39).



## 1- INTRODUCTION

Pancreatic islet transplantation is a cellular therapy proposed to unstable type 1 diabetic patients (T1D) <sup>1</sup>. Type 1 diabetes is an autoimmune disease characterised by the destruction of the pancreatic islets which are the endocrine structures responsible for insulin synthesis <sup>2</sup>. After isolation, the islets are injected intraportally and will embolize in the hepatic vessels and engraft in the hepatic tissue <sup>3</sup>. Revascularization of the transplanted islets is crucial for their function. Indeed, the intra-islet vessels and their connection to the systemic circulation are crucial for the efficient discharge of insulin into the bloodstream <sup>4</sup>.

The recovery of a fully functional endothelium within islets will determine its fate <sup>5</sup>. Indeed, endothelial damage leads to vascular dysfunction eventually leading to inappropriate remodelling of the vessel wall <sup>4</sup>. Isolation of pancreatic islets induces endothelial hypoxia, even before their implantation in the liver <sup>6</sup>. Moreover, the contact of the injected islets with portal vein blood leads to inflammatory reactions in the first 24 hours post-transplantation called IBMIR (Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction), and characterized by the production of cytokines in the islet environment <sup>7</sup>. Both, ischemia of the islets during their isolation and reperfusion leading to IBMIR would promote acute vascular inflammation in the environment of the transplanted islet but also endothelial damage of the intra-islet vessels, impacting islet function <sup>8</sup>.

Besides cell death already explored in our laboratory and in the literature, one of the endothelial responses to the stress of ischemia and IBMIR is the endothelial-mesenchymal transition (EndMT). Originally described during embryogenesis of the cardiovascular system, EndMT is a complex cytokine-induced process by which endothelial cells lose function and acquire a mesenchymal phenotype characterized by loss of intercellular adhesion and a

spindle-like appearance<sup>9</sup>. The originality of our study lies in the characterization of EndMT in pancreatic islets endothelial cells, previously unexplored in the context of islet transplantation, and in our hypothesis that a GLP-1 analogue, Dulaglutide, would protect the intra-insular endothelium from EndMT induced by the cytokine stress of IBMIR. This hypothesis is based on the observation of a primary prevention of cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus patients treated with Dulaglutide (REWIND study) suggesting protection via the endothelial GLP-1 receptor. Furthermore, data from the laboratory show a cytoprotective effect of GLP1 analogues, Liraglutide, against oxidative stress, inflammation and apoptosis of  $\beta$ -cells and the release of pro-apoptotic microvesicles<sup>10</sup>. In this present work we will investigate the cytoprotective effect of Dulaglutide against EndMT induced by both, IBMIR cytokines and derived-microvesicles.

## **2- MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Cell culture**

MS-1 cells (MILE SVEN 1, ATCC®, Manassas, Virginia, USA, Number: CRL-2279TM) were cultured in DMEM Glutamax Medium, (thermo scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 11594446) containing 4,5 g/l glucose, with 5% fetal bovine serum (Biowest, Missouri, USA, S1810-500 ) in a humid atmosphere at 37°C. Passages were performed at confluency after detachment by Trypsin EDTA 1x (Pan biotech, Am Gewerbepark , Aidenbach, Germany) and 3 washings in Hanks Balanced solution (HBSS, bioWhittaker, 10-547F). Depending on the experiment, cells were cultured in T75 flask, 6-well plates, or lab-Teck (Milicell ez slide, 8 wells glass, Merck Millipore).

## **2.2 In vitro induction of EndMT in pancreatic endothelial cells**

After 4 to 5 passages, MS-1 cells were treated with TGF- $\beta_2$  (1ng/mL, Abcam, Cambridge MA, USA, ab 84070), IL1- $\beta$  (5, 10, 20, 25ng/mL, sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany, SRP3083) and TNF- $\alpha$  (20, 50, 100, 130 ng/mL, Sigma, Darmstadt, Germany, T0157) up to 72 hours. In some experiments, 10 $\mu$ M of SB-431542, a specific inhibitor of ALK5 the main endothelial TGF- $\beta$  Type 1R, was simultaneously added. Dulaglutide (1  $\mu$ M, Eli Lilly, Trulicity 1,5 mg, Indianapolis, Indiana, USA), an analogue of GLP1, was added to the medium two hours before cytokine induction. In some experiments, 200nM of Exendine (9-39) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany, E7269), a peptide antagonist to GLP1-R was incubated 1h before the addition of Dulaglutide.

## **2.3 Assessment of mesenchymal markers by Western blot**

Following cell centrifugation, cellular proteins were extracted after 15 min incubation at 4°C with RIPA buffer (Tris/HCl 20 mM, pH 7.5; Q-Biogene, California, USA), NaCl 150 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, sodium pyrophosphate 10 mM, NaF 20 mM, okadaic acid 0.01 mM (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) containing a tablet of protease inhibitor (Complete Roche, Basel, Switzerland) and 1% Triton X-100 (Euromedex, 2000-B, Souffelweyersheim, France). Protein lysates (15 $\mu$ g) were loaded on 10% SDS-polyacrylamide gels at 100 V for two hours and transferred electrophoretically onto polyvinylidene difluoride membranes (Amersham, Life Sciences, Germany) at 100 V for 2 hours. Specific binding sites were blocked by 1h incubation in TBS-T buffer (Bio-Rad, California, USA) containing 5% bovine serum albumin (BSA) (Euromedex, 04-100-812-E, Souffelweyersheim, France), and 0.1% Tween 20 (sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) (TBS-T). Membranes were then incubated overnight at 4°C with the blocking solution of TBS-T with antibodies raised against CD31 (abcam, ab24590, Cambridge MA, USA)

1/1000, VE-Cadherin (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, TJ277399) 1/250,  $\alpha$ -SMA (abcam, Cambridge MA, USA, ab7817) 1/500 and Vimentin (abcam, Cambridge MA, USA, ab92547) 1/1000. After 3 washings in TBS-T, membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and density signals of each band detected using the ECL Substrate (170-0561, BIO-RAD, United States). Membranes were incubated with monoclonal anti- $\beta$ -tubulin I mouse antibody (Sigma-Aldrich, T7816, Missouri, USA) for normalization purposes. All data were expressed as the ratio of the untreated cells values (100%).

#### **2.4 Immunofluorescence staining**

MS-1 cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min and then blocked with 5% BSA for 30 min at room temperature. Cells were then incubated for 1 hour at 4°C with antibodies against 1/200 CD31 (Abcam, ab24590), 1/400 Vimentin (Abcam, ab92547), 1/400 ALK5 (LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA), 1/250 GLP1-R (Santa Cruz biotechnology, sc-390774), ICAM-1 (Abcam, Cambridge MA, USA, ab171123). After 3 HBSS washings, cells were further incubated with fluorescent-conjugated appropriate secondary antibodies for 1 hour. Nuclei were stained with 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI, Thermofisher, D1306). Cell staining was assessed by confocal immunofluorescence microscopy (ZEISS Apotome, Carl Zeiss Microscopy, 20X objective). Images were captured by the ZEN 2 software and analysed using Fiji J software.

## **2.5 Wound healing assay**

Cells were seeded in 6-well plates at  $1,5 \times 10^5$  cells/well and incubated at 37°C until reaching 70% confluency. A gap was generated in the monolayer using of a 200- $\mu\text{m}$  pipette tips before addition. Photographs were taken immediately at (t0) and after 24h or 48h using a microscope equipped with camera (EVOS XL Digital inverted Microscope, Waltham, MA, USA). Gap filling was measured using the Fiji J software to calculate the remaining distance ( $\mu\text{m}$ ). Each experiment was repeated at least 3 times.

## **2.6 MVs isolation and measurement**

MVs were harvested after 72h induction when EndMT was fully established. The supernatant of cytokine-treated cells was submitted to centrifugation under sterile conditions <sup>11</sup>. Briefly, cells and debris were discarded at 500 g for 5 min, and the supernatant further centrifuged at 500 g for 12 min. The final suspension was kept for less than 30 days at 4°C under sterile conditions. The MVs measurements were performed by prothrombinase assay after capture onto biotinylated Annexin-5 <sup>12</sup>. This procedure relies on the high affinity of annexin-5 for phosphatidylserine (PhtdSer) on the MVs surface. Samples (100  $\mu\text{l}$ ) were added to each well and incubated at 37°C for 1h. After 3 washings, the insolubilized MVs were measured by prothrombinase assay. In this assay, the degree of exposure of anionic phospholipids (PS) on the surface of MVs was the limiting factor of the conversion of prothrombin into thrombin in the presence of purified human coagulation factors (FII 4.2 mM, FVa 250 pM, FXa 53 pM, and CaCl<sub>2</sub> 2 mM). After 10 min at 37°C, the generated thrombin was measured using a chromogenic substrate, pNAPEP 0216 (1.52 mM). The absorbance at 405 nm was converted into phosphatidylserine equivalent (PhtdSer eq) by reference to a standard curve obtained

using a suspension of synthetic vesicles presenting known amounts of PhtdSer (33% mol:mol) and phosphatidylcholine (67% mol:mol) <sup>13</sup>.

## **2.7 Endothelial MVs-driven response**

MVs (10  $\mu$ M) shed from MS-1 cells treated either by 100ng/mL TNF- $\alpha$ , 20 ng/ml IL1- $\beta$  or 1 ng/mL TGF- $\beta_2$  were collected after 72 hours. After washing, MVs were incubated with target naïve cells for 72 hours. MVs were also eventually isolated from MS-1 treated by these three cytokines and 1 $\mu$ M Dulaglutide. Target cells were examined for MVs capture and ICAM-1 expression.

## **2.8 Assessment of MVs integration into naïve cells**

MS-1 derived MVs were stained using 2  $\mu$ M of the red fluorescent staining PKH26 lipid probe per 10 nM of MVs (Sigma, L'isle d'Abeau Chesnes, France). MVs were washed twice by centrifugation (14 000 g, 60 min) in HBSS at 4°C. Capture of MVs the endothelial monolayer and ICAM-1 expression by target cells were simultaneously assessed using an anti-ICAM-1 murine antibody IgG 1/250 (Alexa 488, Invitrogen), by fluorescence microscopy (ZEISS Apotome, Carl Zeiss Microscopy, 20X objective).

## **2.9 Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error mean (S.E.M) for n different experiments and analyzed by Graphpad Prism (Version 7.01 for Windows™). Statistical variance between different conditions was determined by applying Unpaired t-test for Western Blot assay and quantitative confocal microscopy results and Two-way Anova test for Scratch test followed by Bonferroni's Multiple Comparison *post hoc* test. Group differences were considered statistically significant at P<0.05.

### 3- RESULTS

#### 3.1 The characteristic cytokines of IBMIR induce EndMT in intra-islet endothelial cells

The EndMT of MS-1 intra-islet endothelial cells was assessed by morphological, functional, and molecular approaches to establish kinetics and concentration curves of the cytokine-induced response. After 48h, TNF- $\alpha$  treatment, a proportion of MS-1 showed the typical mesenchymal fusiform spindle-shape. In accordance, the expression of the endothelial marker VE-cadherin was significantly decreased by respectively 17.7%, 35.27%, 29.52% in response to 5, 10 and 20 ng/mL IL1- $\beta$  ( $P < 0.001$  vs. untreated cells). By comparison, TGF- $\beta_2$  1ng/mL, the gold standard inducer of EndMT, led to a 29.24% decrease in VE-cadherin expression ( $0.70 \pm 0.08$ ,  $P = 0.0018$ ). CD31 however appeared a less sensitive marker of EndMT, with approximately 38,06% down-regulation that was only detectable after 72h treatment and remaining lower than values observed in response to TGF- $\beta_2$  (75.67%,  $P < 0.0001$ ). Symmetrical to the loss of endothelial markers, the acquisition of Vimentin and  $\alpha$ -SMA, two mesenchymal features of EndMT, was also detectable as early as 48 hours post-cytokine treatment. IL1- $\beta$ -induced the over-expression of Vimentin induced by the IL1- $\beta$  was concentration-dependent (10 ng/mL: 49.6%,  $0.647 \pm 0.069$ ,  $P = 0.0001$ ; 20ng/mL: 63.7%,  $0.704 \pm 0.081$ ,  $P = 0.0008$ ) without reaching the 2-fold enhancement observed in response to TGF- $\beta_2$ . By comparison,  $\alpha$ -SMA over-expression was detectable at low concentration of IL1- $\beta$ , 5ng/mL induced a 19.5% up-regulation and maximal values being measured in response to 20ng/ml IL1- $\beta$  (96.3%). However, maximal EndMT response was not fully achieved, since TGF- $\beta_2$  up-regulated  $\alpha$ -SMA by 150%. After 72 hours, the induction of mesenchymal markers by IL1- $\beta$  treatment was optimal: Vimentin overexpression reached a plateau with 108% raise in response to 25ng/mL IL1- $\beta$  and  $\alpha$ -SMA was significantly up-regulated by 50%. Nevertheless,

IL1- $\beta$  remained less potent than TGF- $\beta_2$  that enhanced Vimentin and  $\alpha$ -SMA expression by respectively 139.1% and 117.7%. Similarly to IL1- $\beta$ , an early and concentration-dependent loss of the endothelial marker VE-cadherin was prompted by TNF- $\alpha$  and detectable after 48hours (TNF- $\alpha$  100 ng/mL: 24.91%, P=0.0486) peaking after 72h with a significant half-reduction of VE-Cadherin expression, mean values being close to those induced by TGF- $\beta_2$  (VE-Cadherin: 52%; TGF- $\beta_2$ : 66%). After 48h, TNF- $\alpha$  was also a potent inducer of a CD31 down-regulation as compared to TGF- $\beta_2$  (30%), with a 30% overall decrease whatever the concentration. After 72hours, the CD31 down-regulation reached a 55.41% plateau with values close to those measured in response to TGF- $\beta_2$  (53.5%, P=<0.0001). Conversely to the drop of endothelial markers, mesenchymal ones were progressively over-expressed in response to TNF- $\alpha$ . The up-regulation of Vimentin occurred as early as 48h after treatment in a concentration-dependent manner (TNF- $\alpha$  20 ng/mL: 10.0%, 50ng/mL: 66.2%), values peaking after 72h (TNF- $\alpha$  20 ng/mL: -70.1%, 50ng/mL: -93.1%). Nevertheless, values remained below those induced by the gold standard (156% raise). Interestingly, TNF- $\alpha$  was less efficient to induce  $\alpha$ -SMA expression and significant raises were only detected at high concentrations and/or longer treatment duration TGF- $\beta_2$ : 135.2% vs Untreated (p= 0.002) and TNF- $\alpha$  50ng/mL: 77.6%, TNF- $\alpha$  130ng/mL: 115% (p=0.0438; P=0.003). Altogether, kinetics of EndMT established by western blot indicate that 100 ng/mL TNF- $\alpha$  is sufficient to induce the loss of both CD31 and VE-Cadherin and the overexpression of Vimentin after 48h, while 130ng/mL were necessary to prompt  $\alpha$ -SMA up-regulation. In our hands, 20ng/mL IL1- $\beta$  were sufficient to prompt the loss of VE-Cadherin, together with the overexpression of vimentin and  $\alpha$ -SMA after 48h, while the loss of CD31 was only observed after 72h in response to 5-25 ng/mL IL1- $\beta$  (Figure 1 A, 1B).



### **3.2 Effect of IBMIR cytokines on MS-1 cell migration**

To confirm the mesenchymal switch we further assessed the migration potency of MS-1 by scratch test. TGF- $\beta_2$ -induced EndMT was detectable only after 48h with a significant 19.34 % difference in gap filling by comparison to untreated cells (TGF- $\beta$ : 63.03% vs. untreated:43.68%, P= 0.012). No variation could be observed after 24h treatment by TNF- $\alpha$  nor IL-1 $\beta$  applied at low concentrations. However, a significant 9.28 % gap filling was achieved at 24h in response to 100 ng/mL TNF- $\alpha$ , becoming 30.42% after 48h (p <0.001 vs. untreated). In addition, TNF- $\alpha$  was able to prompt gap filling even at moderate concentration (11.18% TNF- $\alpha$  50 ng/mL vs. untreated, p= 0.08). Similarly, enhanced gap filling was achieved 48h after treatment by 10-20ng/mL IL-1 $\beta$ . Altogether, data indicate a time and concentration-dependent induction of EndMT, its extent being specific of each cytokine (figure 2).

### **3.3 Dulaglutide prevents the loss of endothelial markers and the up-regulation of mesenchymal markers in the pancreatic endothelium**

After 48h co-incubation with cytokines, 1  $\mu$ M Dulaglutide reduced the up-regulation of both mesenchymal markers  $\alpha$ -SMA and vimentin. The effect persisted after 72h and was associated with the symmetrical preservation of endothelial CD31 and VE-Cadherin (figure 3A, 3B). Western blot analysis indicated that Dulaglutide significantly reduced by 31.26% the CD31 loss induced by 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , and by 16.91% in response to 20ng/ml IL1- $\beta$ . VE-Cadherin disappearance was also limited in response to 10 ng/mL and 20ng/mL IL1- $\beta$ , by respectively 63.75% and 105.93%. Symmetrically to the preservation of the endothelial markers, Dulaglutide had a strong limitative effect on the expression of both mesenchymal markers. After 48h, Dulaglutide reduced cytokine-induced EndMT in response to 10-20 ng/mL IL1- $\beta$ , by a 63.75 % and 105.93%-fold respectively, and restored VE-cadherin expression. Similarly, a

31.2 % restoration of CD31 was observed in cells treated by 10 ng/mL IL1- $\beta$ . After 72h co-incubation with TNF- $\alpha$  preservation of endothelial markers was maximal with a partial restoration for CD31 (TNF- $\alpha$  100 ng/mL: +122.40%) and a complete recovery of VE-Cadherin (TNF- $\alpha$  100 ng/mL: +103.21%). In accordance, maximal protection was achieved by Dulaglutide that limited the  $\alpha$ -SMA and vimentin overexpression by approximately 50%, whatever the TNF- $\alpha$  concentration. Of note, no effect of Dulaglutide alone was observed on the expression of endothelial or mesenchymal markers expressed by control MS-1.

### **3.4 The protection against EndMT exerted by Dulaglutide is dependent on GLP-1R**

Because the potency of Dulaglutide could be limited by the degree of GLP1R expression, MS-1 were labelled with a fluorescent GLP1-R antibody. After 48h or 72h cytokine treatment, no variation in GLP1-R staining could be evidenced between cytokine-treated or untreated cells, thereby suggesting that Dulaglutide effects were truly GLP1-R dependent. Pre-treatment of cells by a saturating 200 nM concentration of Exendin (9-39)<sup>11</sup>, a GLP-1R antagonist, was performed. Under conditions enabling the measurement of a significant protection against cytokine induced EndMT (see above). Exendine (9-39) indeed partially decreased the CD31 restauration induced by either TGF- $\beta_2$  (- 24.06 %), IL-1- $\beta$  20 ng/mL (-39.01%) and TNF- $\alpha$  (-27.97 %) after 48h. The counter effect persisted over 72 hours (+33.85% for TGF- $\beta_2$ , + 41.44% for IL1- $\beta$  20 ng/mL and +38.55% for TNF- $\alpha$  100 ng/mL). At the opposite, Vimentin expression induced by TGF- $\beta_2$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were up-regulated in the presence of Exendine by 22.01%, 38.014% and 52.97% respectively after 48h. the up-regulation persisted for 72h (+53.42% TGF- $\beta_2$ , +33.85% IL1- $\beta$  and + 33.85% TNF- $\alpha$ ). Altogether data confirm a GLP-1R dependant cytoprotection by Dulaglutide (figure 4).

### **3.5 ALK5 inhibition impairs TGF- $\beta_2$ - induced MS-1 migration**

TGF- $\beta_2$  treatment was associated with an increased gap filling potency that was completely abolished by co-incubation with SB-431542, a specific antagonist of the ALK5 receptor. After 24h co-incubation with SB-431542, the gap filling capacity decreased by 16.39%,  $p=0.036$  (TGF- $\beta_2$  + SB-431542 vs. TGF- $\beta_2$  alone). The counteracting effect persisted after 48h with a return to baseline values (SB-431542 vs. untreated: 14.88 to 44.25,  $p<0.001$ ). Altogether, data indicate an early ALK5-dependant response to TGF- $\beta_2$ , already detectable after 24h. To determine whether Dulaglutide alters ALK5 expression, MS-1 were pre-treated with 1 $\mu$ M Dulaglutide 24h before cytokine induction. After additional 48h, a significant increase of ALK5 expression was detected by confocal microscopy in response to Dulaglutide alone (34.64%) or associated with the IBMIR cytokines (IL-1 $\beta$  20ng/mL: + 17.81%; TNF- $\alpha$  100 ng/mL: + 25.47%). ALK5 up-regulation persisted after 72h, (untreated+ Dula: + 44.02%, IL-1 $\beta$  20ng/mL + Dula: +34.40%, TNF- $\alpha$  100 ng/mL+ Dula: + 32.53%,  $p=0.0451$ ,  $p=0.0090$ ,  $p=0.0032$ , respectively). Of note TGF- $\beta_2$  alone had no effect on ALK5 expression over 72h, nor did Dulaglutide alone (figure 5).

### **3.6 Anti-inflammatory effects of Dulaglutide during cytokine-induced EndMT**

ICAM-1 fluorescent labelling of Dulaglutide-treated cells was performed after 72h of cytokine-induction, when EndMT was fully established (20 ng/ml IL-1 $\beta$  or 100 ng/mL TNF- $\alpha$ ) and analysed by confocal microscopy. The 4-fold over-expression of ICAM-1 induced by either TGF- $\beta_2$ , or IL-1 $\beta$ , was decreased to baseline by Dulaglutide (TGF- $\beta_2$ : -100.68%, IL-1 $\beta$  20 ng/ml: -55.66%, vs. respective cytokine,  $p=0.0061$ ,  $p=0.0352$ ) (figure 6 a, b)

## **6.7 Dulaglutide abolishes the pro-inflammatory effect of MVs from cytokine-induced EndMT cells**

Naïve MS-1 were treated by PKH26-stained MVs isolated from cytokine-treated cells after a 72h optimal EndMT induction. The PKH26 red fluorescence was used to identify the cell having incorporated MVs. ICAM-1 expression was enhanced in all MV-treated cells by roughly 30%, whatever the cytokine applied to the parental cells. Dulaglutide induced a down-regulation of MV-induced ICAM-1 expression by 35.64 % ( $p= 0.0235$ ), 54.09% ( $p= 0.0101$ ) and 31.65% ( $p= 0.0421$ ) respectively, thereby restoring the baseline values observed in naïve MS-1 (figure 6c, d).

## 4- DISCUSSION

We demonstrate herein a GLP1-dependent protection against the mesenchymal transition of intra-islet endothelial cells induced by cytokines characterizing the IBMIR. Using an in-vitro assay we confirmed the typical endothelial to mesenchymal (EndMT) shift by multiple approaches including morphological analysis, a gap-filling functional assay as well as protein and RNA patterns. The mesenchymal transition kinetics and the cytokine concentration curves were established to determine the best time-point to study each specific feature.

### 4.1 Monitoring of the induction of EndMT induced by the IBMIR cytokines in MS-1:

Because it was previously reported as an inducer of the EndMT in MS-1, we performed all experiments using 1 ng/mL TGF- $\beta_2$  as a gold-standard reference inducer <sup>14</sup>. We identified a TGF- $\beta_2$ -induced EndMT with a 72h time-course. We measured a progressive and characteristic disappearance of CD31 and VE-Cadherin endothelial markers and a symmetrical raise in  $\alpha$ -SMA and vimentin mesenchymal markers, by western blot and confocal analysis. In addition, our morphological analysis established the progressive acquisition of an elongated cell phenotype, previously reported by Ma et al. after 72h TGF $\beta_2$  treatment <sup>15</sup>. In the present study, IBMIR cytokines, namely IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , were strong inducers of the EndMT, although with distinct kinetics. Indeed, the CD31 drop could not be detected 48h after IL-1 $\beta$  treatment whereas it was already detectable in response to TNF- $\alpha$ . By comparison, VE-cadherin was an earlier sensor (see figure 1) while both markers showed maximal loss after 72h. Such an inflammatory cytokine-induced EndMT was also reported in porcine aortic valve endothelium (PAVEC) and associated with an early drop of both endothelial markers CD31 and VE cadherin, 48h after incubation with IL-6 or TNF- $\alpha$ . The symmetrical concentration-dependent acquisition of  $\alpha$ -SMA was also observed by in 3D collagen matrix invasion <sup>16</sup>. In our hands,

kinetics of the mesenchymal transition markers  $\alpha$ -SMA and Vimentin in cytokine-induced MS-1 EndMT were also different, the latter being an early sensor at 48h as previously reported in PAVEC <sup>16</sup>. Altogether, the functional assay detected EndMT as early as 24h after induction and western blots also revealed several endothelial or mesenchymal alterations at such an early stage. Our data confirm that a 48 h-treatment by IL1- $\beta$  (10-20ng/mL) or TNF- $\alpha$  (50-100ng/mL) is the reliable time-point to investigate the EndMT switch measured by either of the above assays. By contrast to the monitoring of characteristic markers, the functional assessment of EndMT enabled the detection of pharmacological modulation by Dulaglutide 48h after cytokine induction (see below).

#### **4.2 Dulaglutide induces the up-regulation of ALK5**

While discrepancies in the kinetics of the endothelial marker loss might pertain to cell lineage or model, the respective contribution of TNF- $\alpha$  receptors TNF-RI and TNFRII both typically expressed by the endothelium remains to be deciphered <sup>17</sup>.

We observed that Dulaglutide prompts a 30% enhancement of the expression of ALK5, the type-I TGF- $\beta_2$  receptor by MS-1, after 48h and 72h, even in the absence of cytokine treatment. Furthermore, this up-regulation was already reaching its highest values after 48h and did not vary with the addition of cytokines, pointing at an independent effect of Dulaglutide. Pharmacological inhibition using 10  $\mu$ M SB-431542, confirmed that ALK5 mediated the EndMT response in TGF- $\beta_2$ -treated cells by functional gap filling assay. On line with our data, ALK5 mediated EndMT of human dermal lymphatic endothelial cells in response to TGF- $\beta_2$  was also described in flow chambers <sup>18</sup>. In TGF- $\beta_1$  treated bovine aortic endothelial cells transfected with ALK5 and ALK1 expression vectors, a preferential ALK5/smad 3 signalling was associated with slowed-down gap filling, at the opposite of our data. One possible explanation would be

an altered balance between the ALK1/Smad 2 pathway cell proliferation and the ALK5/Smad 1. Signalling limiting it, as reported in bovine aortic cells treated with TGF- $\beta_1$ <sup>19 20</sup>. In addition, discrepancies may also be related to the rough evaluation of the endothelial properties in responses to TGF- $\beta_1$  using gap filling assays. Indeed, Guo et al showed a specific ALK5/smad2 mediated effect on HUVEC migration, and an unchanged proliferation 24h after treatment<sup>21</sup>.

#### **4.3 Inhibition of EndMT by Dulaglutide is fully GLP-1R dependent**

The impact of GLP-1 analogues on the TGF- $\beta_1$ -induced mesenchymal phenotype and its receptor has been reported in a 7-days unilateral ureteral obstruction murine model<sup>22</sup>. Contrary to our findings, histological and RT-PCR kidney analysis revealed that 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Liraglutide induced a GLP1-mediated drastic reduction of the expression of both TGF- $\beta_1$  and its receptor *in vivo* and in NRK-52 tubular epithelial cells, that was associated with a partial suppression of the epithelial to mesenchymal conversion with no effect at baseline. To the best of our knowledge, there is no data concerning the impact of GLP-1 analogues on the expression of the TGF- $\beta_2$  receptor during EndMT and discrepancies could pertain to numerous causes like the different cell lineages and mesenchymal transitions inducers or the biochemical properties of the analogue. Nevertheless, we identified herein a GLP1R-dependent inhibition of the EndMT by Dulaglutide: pharmacological abolishment by 200nM Exendine 9-39 confirmed the GLP1-R-dependent pathway by confocal microscopy. Conversely, li et al. described a partial reversion of the Liraglutide-mediated protection by 100nM exendine 9-39 in NRK-2 after 12h-incubation by Liraglutide, possibly indicating an alternate non GLP-1-dependent action in epithelial cells (see above). Of note, we previously identified both GLP-1R-dependent and independent responses in the protection of insulin secreting  $\beta$  cells submitted to similar cytokine stress using 200 nM exendine 9-39<sup>10</sup>.

#### **4.4 Dulaglutide shifts the pro-inflammatory properties of MVs from EndMT-induced cells and reduces MS-1 endothelial inflammatory response**

In our crosstalk model, MVs generated during the IL-1 $\beta$ -induced EndTM have a noticeable pro-inflammatory action on MS-1 cells as measured by the expression of ICAM-1 after 72h. Indeed, 10 nM MVs were able to up-regulate ICAM-1 by 1.63-folds. By comparison, the effect of a moderate concentration of IL-1 $\beta$  alone (20 ng/mL) led to a 2.42-folds raise as also reported in HUVEC stimulated by a combination of shear stress and TGF- $\beta$ <sub>1</sub>.<sup>23</sup> In our model, Dulaglutide clearly reduced both the MV capture by target cells and the overexpression of ICAM-1 induced by either IL-1 $\beta$  alone or by MVs from IL-1 $\beta$ -treated cells indicating a direct cytokine effect and the prevention of the MV-mediated autocrine amplification of the inflammatory response. These data are on-line with previous evidence of the beneficial action of Dulaglutide in an *in vitro* model of atherothrombosis where Human Aortic Endothelial cells were submitted to a drastic endogenous IL-1 $\beta$ , and IL-6 over-secretion prompted by Ox-LDL. Within the first 24h, Dulaglutide (0.1  $\mu$ g/mL) restored VCAM-1 and HMGB-1 mRNAs levels close to baseline as well as VCAM-1 expression by western blot, suggesting a potential benefit in patients at cardiovascular risk, even at moderate concentration<sup>24</sup>. A class effect of GLP-1 analogues on the prevention of endothelial inflammatory responses is supported by other data reported in glucose or TNF- $\alpha$  stimulated HUVEC showing an attenuation of VCAM-1, ICAM-1 expression to control levels by Liraglutide as early as 16h post-treatment and after 48h<sup>25,26</sup>.



## **5- CONCLUSION**

While GLP-1 analogues are emerging as anti-inflammatory effectors counteracting the endothelial response to cytokines, our data demonstrate that Dulaglutide protects the pancreatic endothelial cells from EndTM, a process noxious to the islet graft, in a GLP-1R dependent manner. Furthermore, such protection is also exerted on the pro-inflammatory properties of MVs released upon cytokine stress. Other in-vivo investigations are needed to confirm the protection in Dulaglutide-treated animals submitted to IBMIR and in isolated islets, to propose a GLP-1-mediated protective treatment limiting pancreatic endothelial cell damages during ischemia-reperfusion and delay graft rejection.

### **Conflict of interest statement**

The authors confirmed that there are no conflicts of interest

## REFERENCES

1. Health Quality O. Pancreas Islet Transplantation for Patients With Type 1 Diabetes Mellitus: A Clinical Evidence Review. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2015;15(16):1-84.
2. Roep BO, Thomaidou S, van Tienhoven R, Zaldumbide A. Type 1 diabetes mellitus as a disease of the  $\beta$ -cell (do not blame the immune system?). *Nature Reviews Endocrinology.* 2021/03/01 2021;17(3):150-161. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00443-4>.
3. Shapiro AMJ, Pokrywczynska M, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nature Reviews Endocrinology.* 2017/05/01 2017;13(5):268-277. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.178>.
4. Brissova M, Powers AC. Revascularization of transplanted islets: can it be improved? *Diabetes.* 2008;57(9):2269-2271. <https://doi.org/10.2337/db08-0814>.
5. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057-1069. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7502>.
6. Komatsu H, Kandeel F, Mullen Y. Impact of Oxygen on Pancreatic Islet Survival. *Pancreas.* May/June 2018;47(5):533-543. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001050>.
7. Yao M, Domogatskaya A, Ågren N, et al. Cibinetide Protects Isolated Human Islets in a Stressful Environment and Improves Engraftment in the Perspective of Intra Portal Islet Transplantation. *Cell Transplant.* Jan-Dec 2021;30:9636897211039739. <https://doi.org/10.1177/09636897211039739>.
8. Addison P, Fatakhova K, Rodriguez Rilo HL. Considerations for an Alternative Site of Islet Cell Transplantation. *J Diabetes Sci Technol.* 2020;14(2):338-344. <https://doi.org/10.1177/1932296819868495>.
9. Ma J, Sanchez-Duffhues G, Goumans M-J, Ten Dijke P. TGF- $\beta$ -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:260-260. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00260>.
10. Gleizes C, Kreutter G, Ab AM, et al. Beta cell membrane remodeling and procoagulant events occur in inflammation-driven insulin impairment: A GLP-1 receptor dependent and independent control. *Journal of cellular and molecular medicine.* 11/26 2015;20. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12683>.
11. 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.* Jul 2014;27(7):733-40. <https://doi.org/10.1111/tri.12286>.
12. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost.* Oct 2004;2(10):1842-51. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00936.x>.
13. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Lesèche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation.* Jan 26 1999;99(3):348-53. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.3.348>.
14. Suzuki HI, Horie M, Mihira H, Saito A. Molecular Analysis of Endothelial-mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling. *J Vis Exp.* Aug 3 2018;(138). <https://doi.org/10.3791/57577>.
15. Ma J, van der Zon G, Gonçalves MAFV, et al. TGF- $\beta$ -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition Is Determined by a Balance Between SNAIL and ID Factors [Original Research]. *Front Cell Dev Biol.* 2021-February-12 2021;9(182). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.616610>.
16. Mahler GJ, Farrar EJ, Butcher JT. Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jan 2013;33(1):121-30. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.112.300504>.

17. Adjuto-Saccone M, Soubeyran P, Garcia J, et al. TNF- $\alpha$  induces endothelial–mesenchymal transition promoting stromal development of pancreatic adenocarcinoma. *Cell Death & Disease*. 2021/06/25 2021;12(7):649. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03920-4>.
18. Yoshimatsu Y, Kimuro S, Pauty J, et al. TGF-beta and TNF-alpha cooperatively induce mesenchymal transition of lymphatic endothelial cells via activation of Activin signals. *PLoS One*. 2020;15(5):e0232356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232356>.
19. Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-b receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med*. Oct 2003;13(7):301-7. [https://doi.org/10.1016/s1050-1738\(03\)00142-7](https://doi.org/10.1016/s1050-1738(03)00142-7).
20. Liu Z, Kobayashi K, van Dinther M, et al. VEGF and inhibitors of TGFbeta type-I receptor kinase synergistically promote blood-vessel formation by inducing alpha5-integrin expression. *J Cell Sci*. Sep 15 2009;122(Pt 18):3294-302. <https://doi.org/10.1242/jcs.048942>.
21. Guo L, Wen X, Hou Y, et al. Dihydroartemisinin inhibits endothelial cell migration via the TGF- $\beta$ 1/ALK5/SMAD2 signaling pathway. *Exp Ther Med*. Jul 2021;22(1):709. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10141>.
22. Li YK, Ma DX, Wang ZM, et al. The glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide attenuates renal fibrosis. *Pharmacol Res*. May 2018;131:102-111. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.03.004>.
23. Mina SG, Wang W, Cao Q, Huang P, Murray BT, Mahler GJ. Shear stress magnitude and transforming growth factor- $\beta$ 1 regulate endothelial to mesenchymal transformation in a three-dimensional culture microfluidic device. *RSC Advances*. 2016;6(88):85457-85467. <https://doi.org/10.1039/c6ra16607e>.
24. Chang W, Zhu F, Zheng H, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist dulaglutide prevents ox-LDL-induced adhesion of monocytes to human endothelial cells: An implication in the treatment of atherosclerosis. *Molecular Immunology*. 2019/12/01/ 2019;116:73-79. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.09.021>.
25. 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. *Diab Vasc Dis Res*. Jul 2013;10(4):353-60. <https://doi.org/10.1177/1479164113481817>.
26. Liu FQ, Zhang XL, Gong L, et al. Glucagon-like peptide 1 protects microvascular endothelial cells by inactivating the PARP-1/iNOS/NO pathway. *Mol Cell Endocrinol*. Jun 6 2011;339(1-2):25-33. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.03.007>.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are indebted to Romain Vauchelles from the PIQ (Plateforme d'Imagerie Quantitative) UMR 7021, Faculté de pharmacie, Université de Strasbourg and to Pascal Kessler from the PICsTRa facility, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg for expert assistance in confocal microscopy. This work was partly supported by the ANR grant COCERP (N°A17R417B) and by the ADIRAL (Association d'Aide aux Insuffisants Respiratoire d'Alsace et Lorraine)

## **AUTHORS' CONTRIBUTION**

Study design: NS, FT, LK

Statistical design, analysis, and interpretation of data: NS

Writing up the first draft of the paper: NS, FT, LK

Editing of the manuscript: NS, FT, LK

Review of the manuscript: NS, FT, LK, MK

Approval of the manuscript: NS, FT, LK

Contributions: FZ, FM, MG

## LEGENDS TO FIGURES

### Figure 1: Loss of endothelial markers and acquisition of mesenchymal markers is time and concentration dependent.

**1A:** MS-1 cells were submitted to IL-1 $\beta$ , or TGF- $\beta_2$  for 48h (**a, c, e, g**) and 72h (**b, d, f, h**).

**1B:** MS-1 cells were submitted to TNF- $\alpha$ , or TGF- $\beta_2$  for 48h (**a, c, e, g**) and 72h (**b, d, f, h**). The expression of endothelial (CD31, VE-cadherin) and mesenchymal ( $\alpha$ -SMA, Vimentin) markers was assessed by western blot. Upper panel representative experiment, lower panel cumulative data of minimum 3 separate experiments performed likewise using different cell batches. Values expressed as a ratio of b-tubulin expression. TGF- $\beta_2$  was used as a gold standard inducer of the EndTM. \* P $\leq$ 0.05, \*\* P $\leq$ 0.01, \*\*\* P $\leq$ 0.001

### Figure 2: Kinetics of cytokine-induced EndTM in MS-1 assessed by gap filling of the MS-1 monolayer

MS-1 were cultured for 24h-48h in the presence of 10-20 ng/mL IL-1 $\beta$  (**a**) or 50-100 ng/mL TNF- $\alpha$  (**b**) or 1 ng/mL TGF- $\beta_2$  as a gold standard inducer (**c,d**). SB-431542: antagonist of TGF- $\beta_2$ . Data are expressed as the mean  $\pm$ SEM of 4-6 experiments performed on different cell batches. E: gap filling observed by light microscopy (magnitude X 10)

\* P $\leq$ 0.05, \*\* P $\leq$ 0.01, \*\*\* P $\leq$ 0.001

### Figure 3: Dulaglutide prevents the expression of mesenchymal markers and restores the expression of endothelial ones in cytokine-induced EndMT.

**3A:** MS-1 cells were submitted to IL-1  $\beta$  with or without Dulaglutide (1  $\mu$ M) for 48h (**a-d**) and 72h (**e-h**).

**3B:** MS-1 cells were treated by TNF- $\alpha$  with or without Dulaglutide (1  $\mu$ M) for 48h (**a-d**) and 72h (**e-h**). The expression of endothelial (CD31, VE-cadherin) and mesenchymal ( $\alpha$ -SMA, Vimentin) markers was assessed by western blot. Cumulative data of 3-6 separate experiments performed likewise using different cell batches are represented. Values expressed as a ratio of b-tubulin expression. TGF- $\beta_2$  was used as a gold standard inducer of the EndMT. **i:** Morphological aspect TNF- $\alpha$ -treated MS-1 with and without Dulaglutide by light microscopy. Dula: Dulaglutide, Untreated: resting cells without cytokine nor Dulaglutide. \* P $\leq$ 0.05, \*\* P $\leq$ 0.01, \*\*\* P $\leq$ 0.001

#### Figure 4: The protection exerted by Dulaglutide is GLP-1R dependent

MS-1 cells were submitted to IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  or TGF- $\beta_2$  for 48h (**a,c**) and 72h (**b,d**) in the presence of 1  $\mu$ M Dulaglutide with or without 200 nM exendine (9-39). The expression of endothelial (CD31, VE-cadherin) and mesenchymal ( $\alpha$ -SMA, Vimentin) markers was assessed by fluorescence confocal microscopy. Cumulative data of 4 separate experiments performed likewise using different cell batches are represented. Values are expressed as a ratio of the fluorescent area/number of cells, measured in cytokine-treated versus untreated cells. TGF- $\beta_2$  was used as a gold standard inducer of the EndTM.

**(e-h)**: CD31 endothelial and Vimentin mesenchymal markers expression by MS-1 in response to 20 ng/mL IL-1 $\beta$  and 1  $\mu$ M Dulaglutide with (**f,h**) or without exendine (9-39) (**e,g**) and assessed by fluorescence confocal microscopy after 48h (**e,f**) or 72 h (**g,h**). Red fluorescence: Vimentin, green fluorescence CD31. Dula: Dulaglutide, untreated: resting cells without cytokine nor Dulaglutide. \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$

#### Figure 5: Dulaglutide enhances ALK5 expression during EndTM

MS-1 cells were submitted to 20 ng/mL IL-1 $\beta$ , 100ng/mL TNF- $\alpha$  or TGF- $\beta_2$  for 48h (**a**) and 72h (**b**) with (hatched bars) or without (plain bars) 1  $\mu$ M Dulaglutide. The expression of ALK5 was assessed by fluorescence confocal microscopy. Cumulative data of 5 separate experiments performed likewise using different cell batches. TGF- $\beta_2$  was used as a gold standard inducer of the EndTM.

**(c)**: ALK5 expression by MS-1 in response to 20 ng/mL IL-1 $\beta$  with or without 1  $\mu$ M Dulaglutide assessed by fluorescence confocal microscopy after 72 h. Red fluorescence: ALK5, blue fluorescence: DAPI. Dula: Dulaglutide, untreated cells without cytokine. \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$

#### Figure 6: Dulaglutide prevents ICAM-1 expression during EndTM and shifts the pro-inflammatory properties of microvesicles

MS-1 cells were submitted to 20 ng/mL IL-1 $\beta$ , 100ng/mL TNF- $\alpha$  or TGF- $\beta_2$  for 72h with (hatched bars) or without (plain bars) 1  $\mu$ M Dulaglutide. Microvesicles were isolated from each conditioned medium, washed, labelled with the fluorescent red probe PKH26 and 10nM stained microvesicles of each subset were further incubated with naïve proliferating MS-1 for 72h before fixation and assessment of ICAM-1 expression in target cells. The expression of ICAM-1 was assessed by fluorescence confocal microscopy. Cumulative data of 4 separate experiments performed likewise using different cell and microvesicles batches. TGF- $\beta_2$  was used as a gold standard inducer of the EndTM.

**(a,b)**: ICAM-1 expression by MS-1 on response to cytokines with or without 1  $\mu$ M Dulaglutide assessed by fluorescence confocal microscopy. Green fluorescence: ICAM-1, blue fluorescence: DAPI. Untreated: cells without cytokine nor Dulaglutide. **(c,d)**: ICAM-1 expression by microvesicles-treated naïve target MS-1. MV<sub>Untreated</sub> microvesicles isolated from cytokine-free cells, MV<sub>IL-1 $\beta$</sub> : microvesicles isolated from IL-1 $\beta$  treated cells, MV<sub>TNF- $\alpha$</sub> : microvesicles isolated from TNF- $\alpha$  treated cells, MV<sub>TGF- $\beta_2$</sub> : microvesicles isolated from TGF- $\beta_2$  treated cells. Red fluorescence: PKH26 lipid probe. Dula: Dulaglutide, untreated: microvesicles from untreated resting cells. \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

Figure 1 A

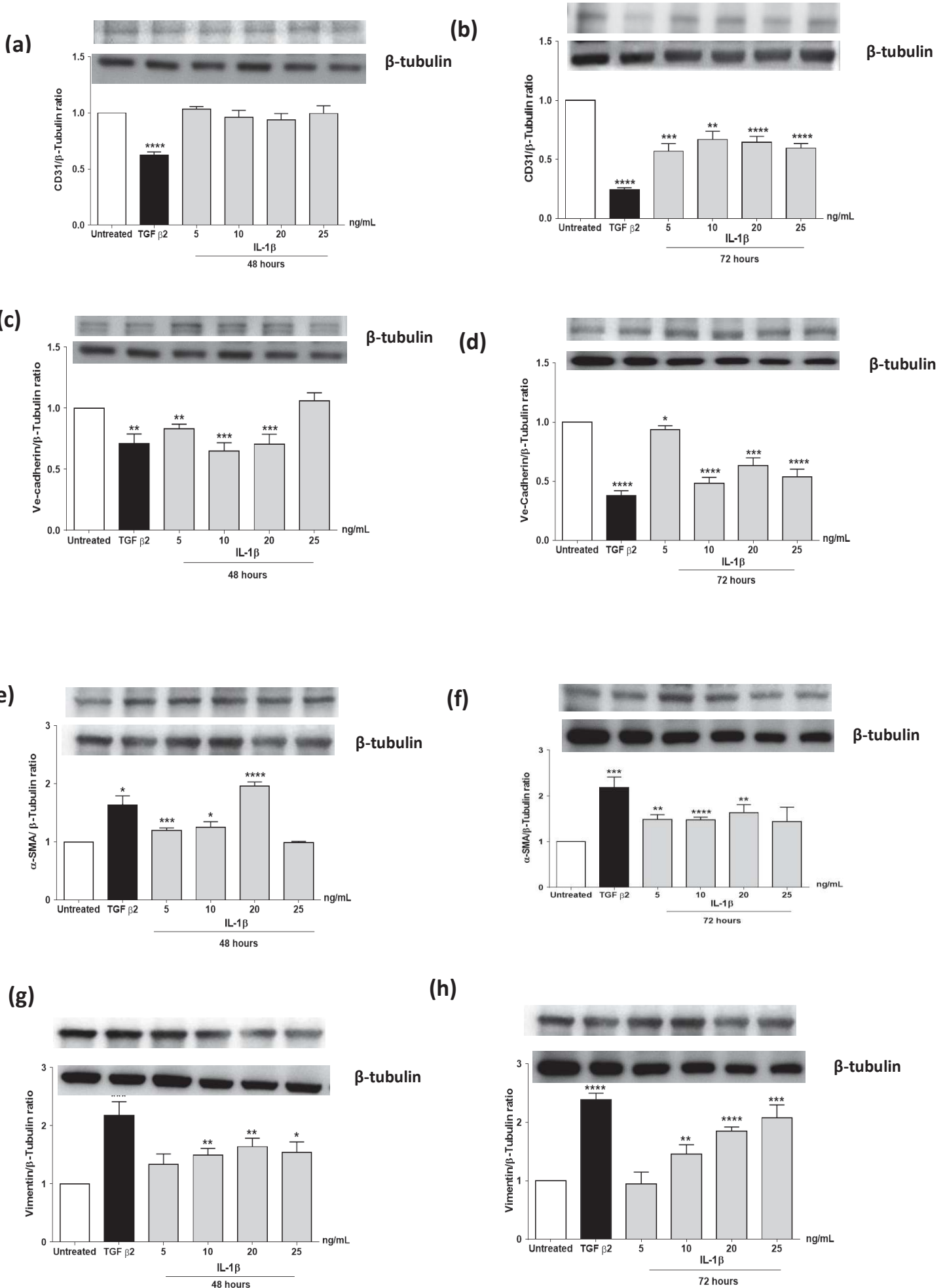


Figure 1 B

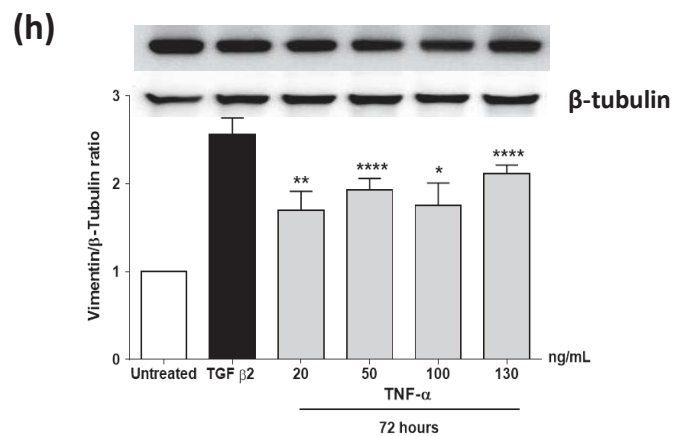
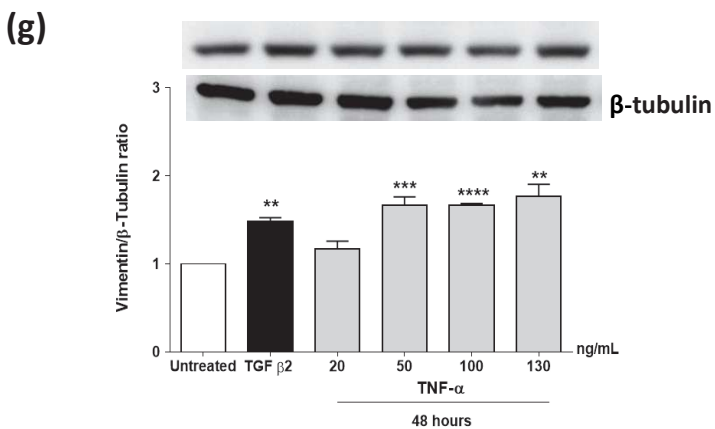
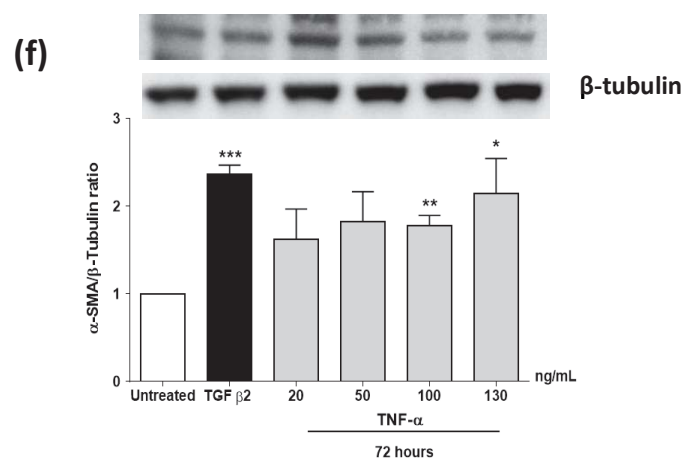
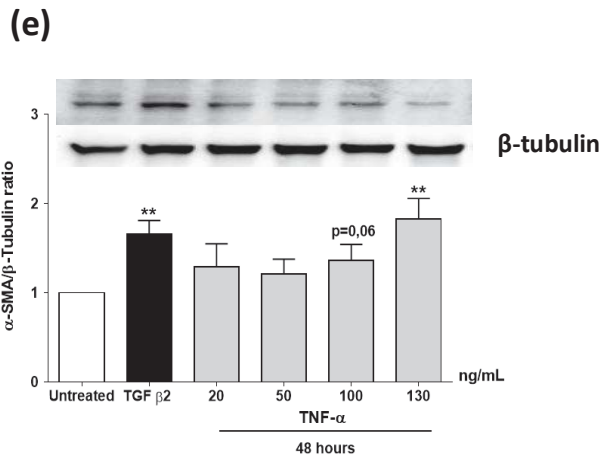
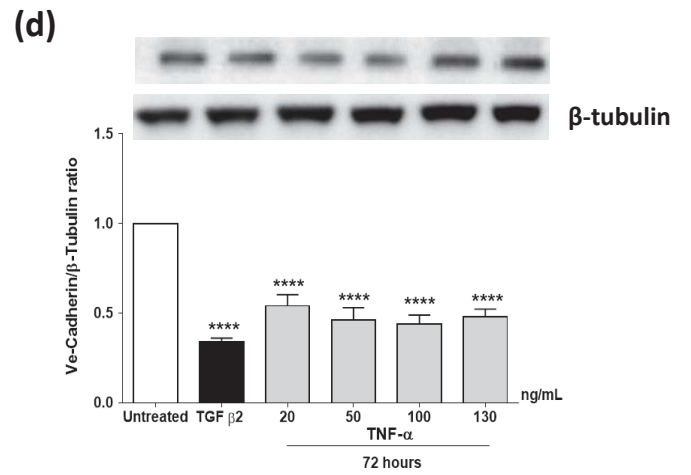
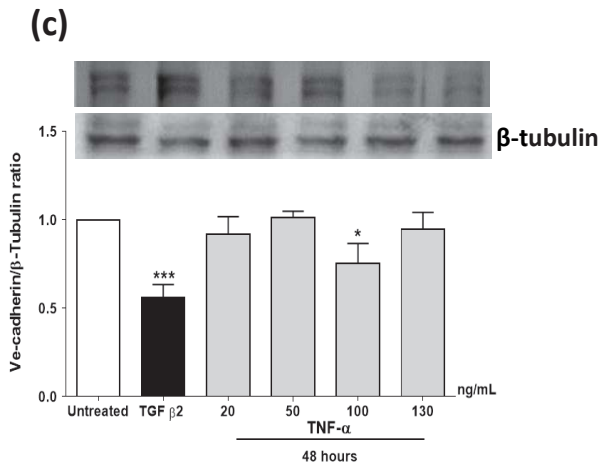
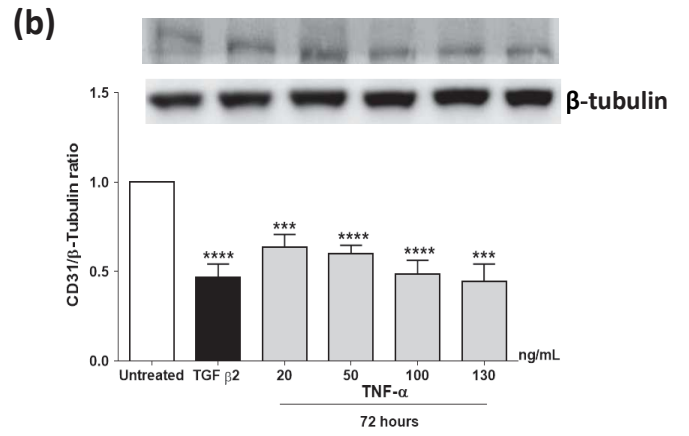
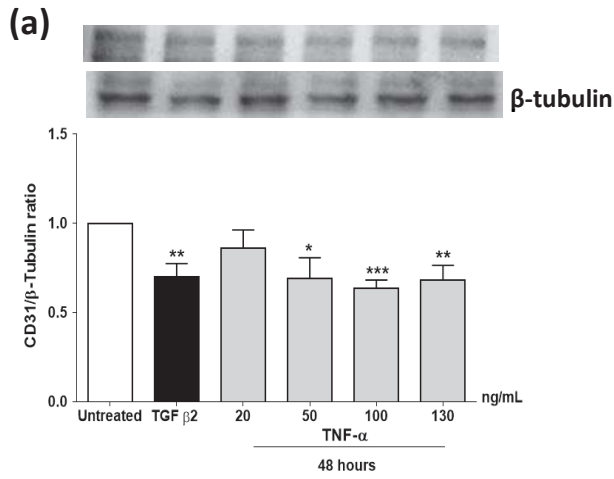




Figure 2

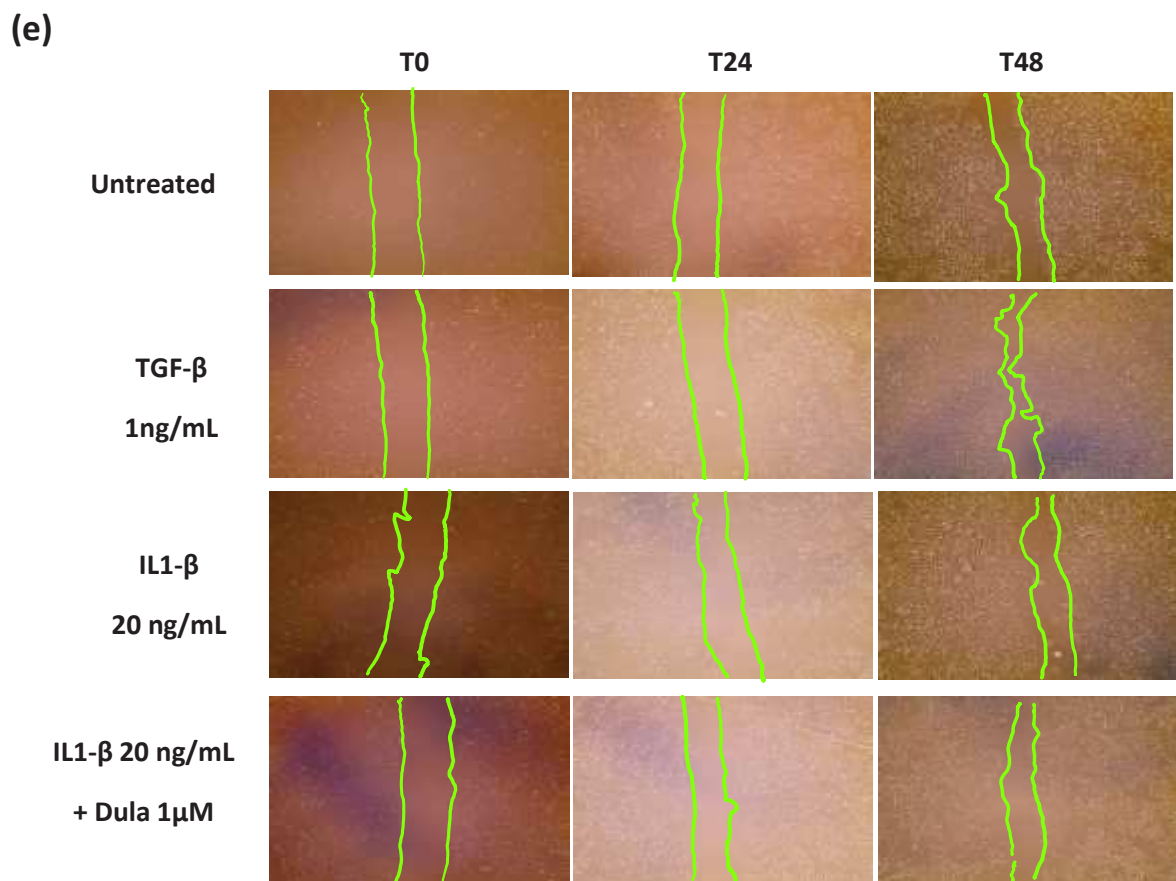
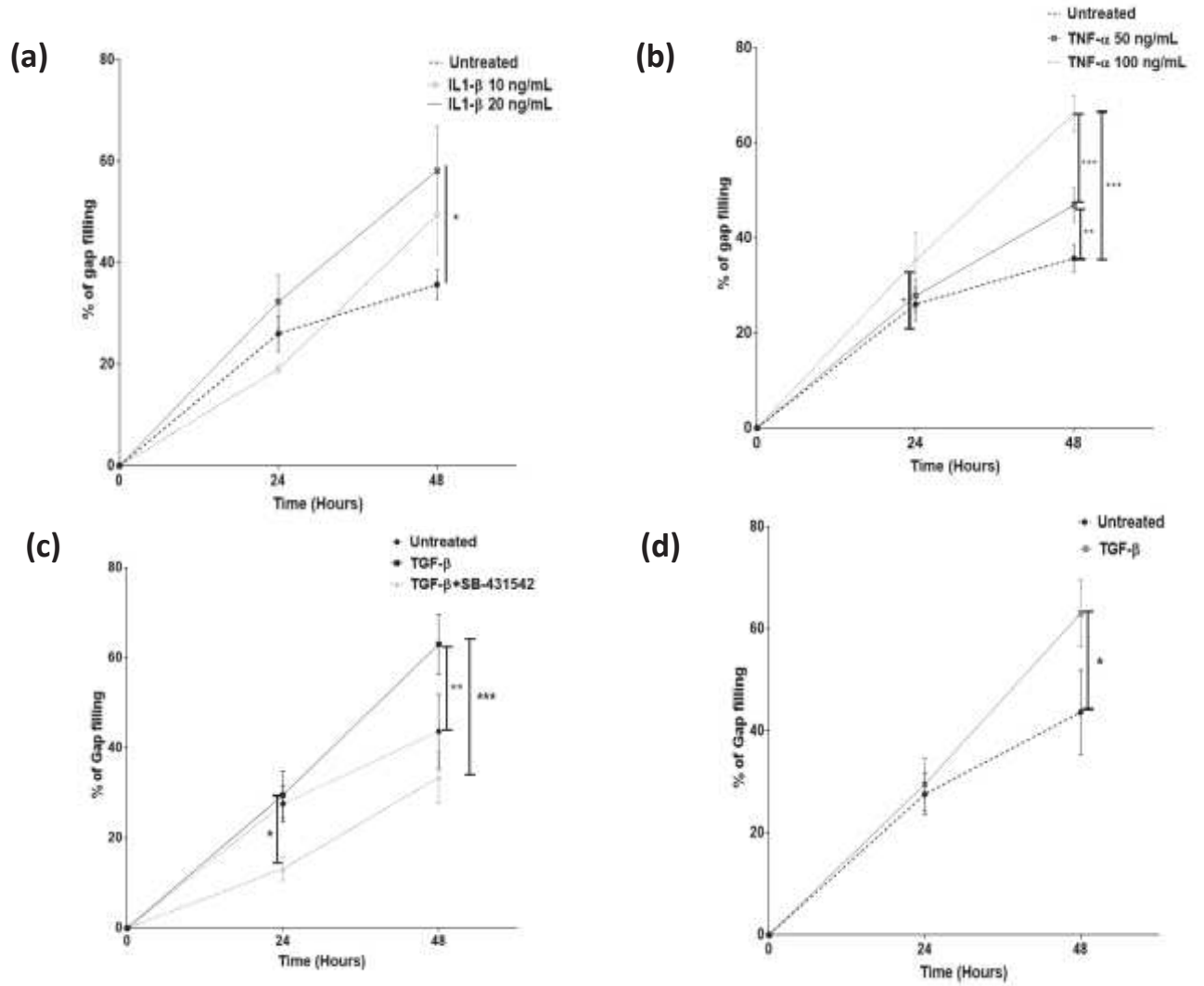
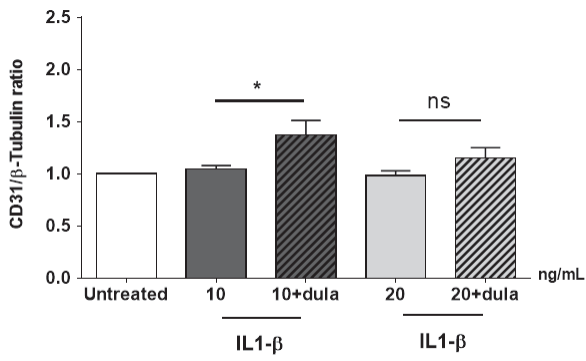
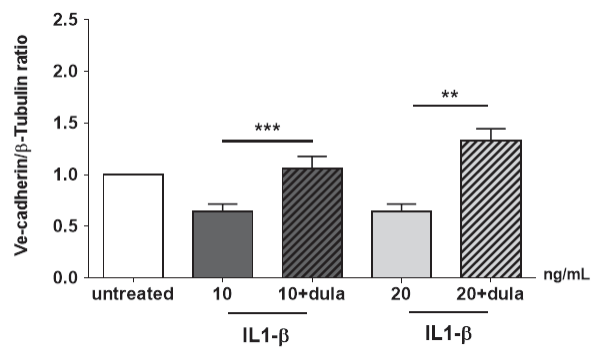


Figure 3 A

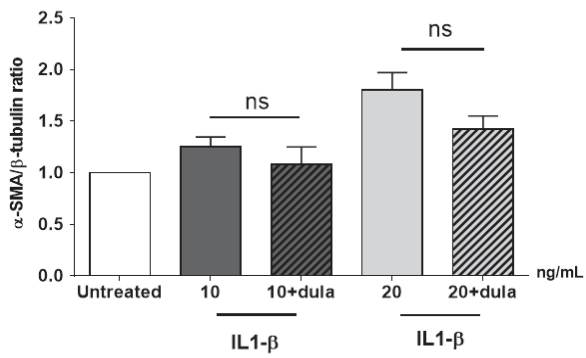
(a)



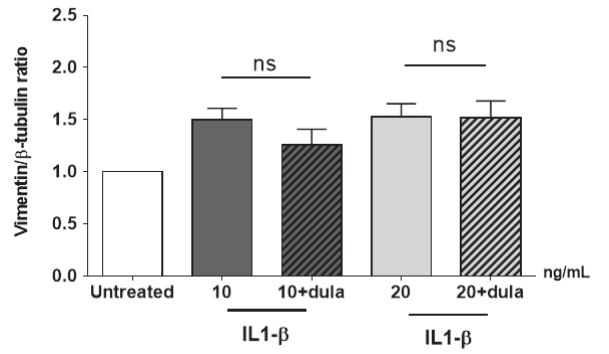
(b)



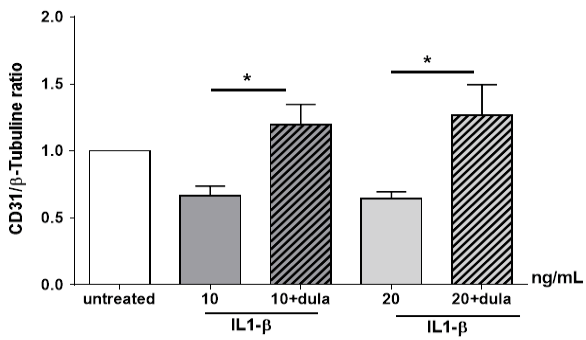
(c)



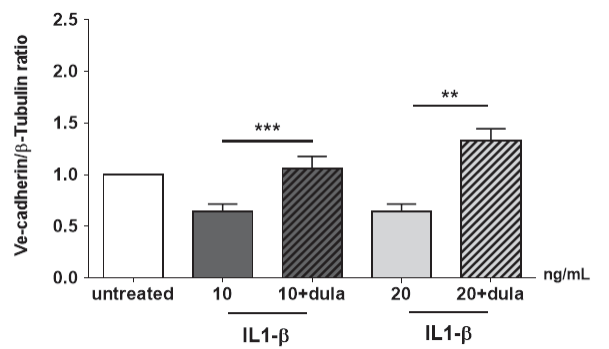
(d)



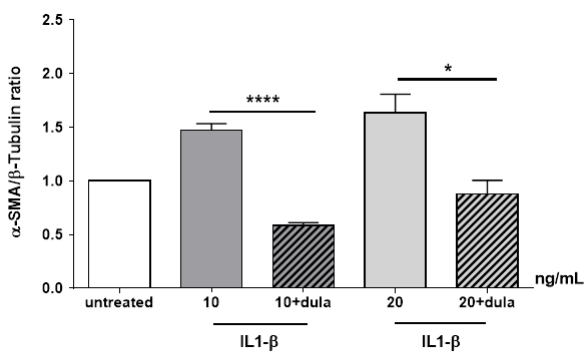
(e)



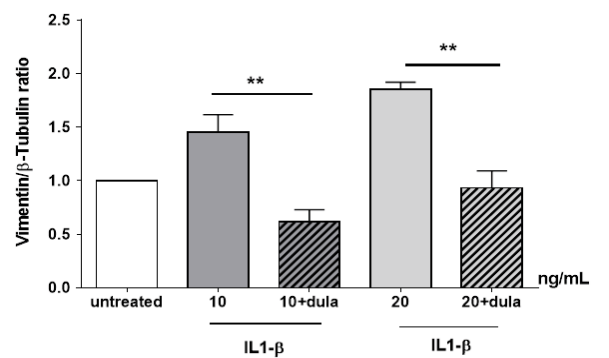
(f)



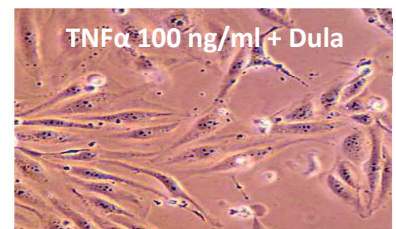
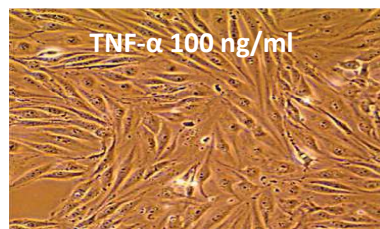
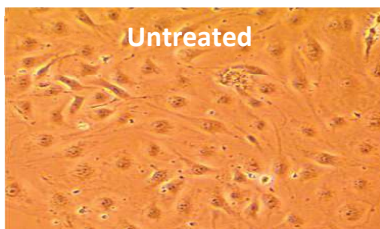
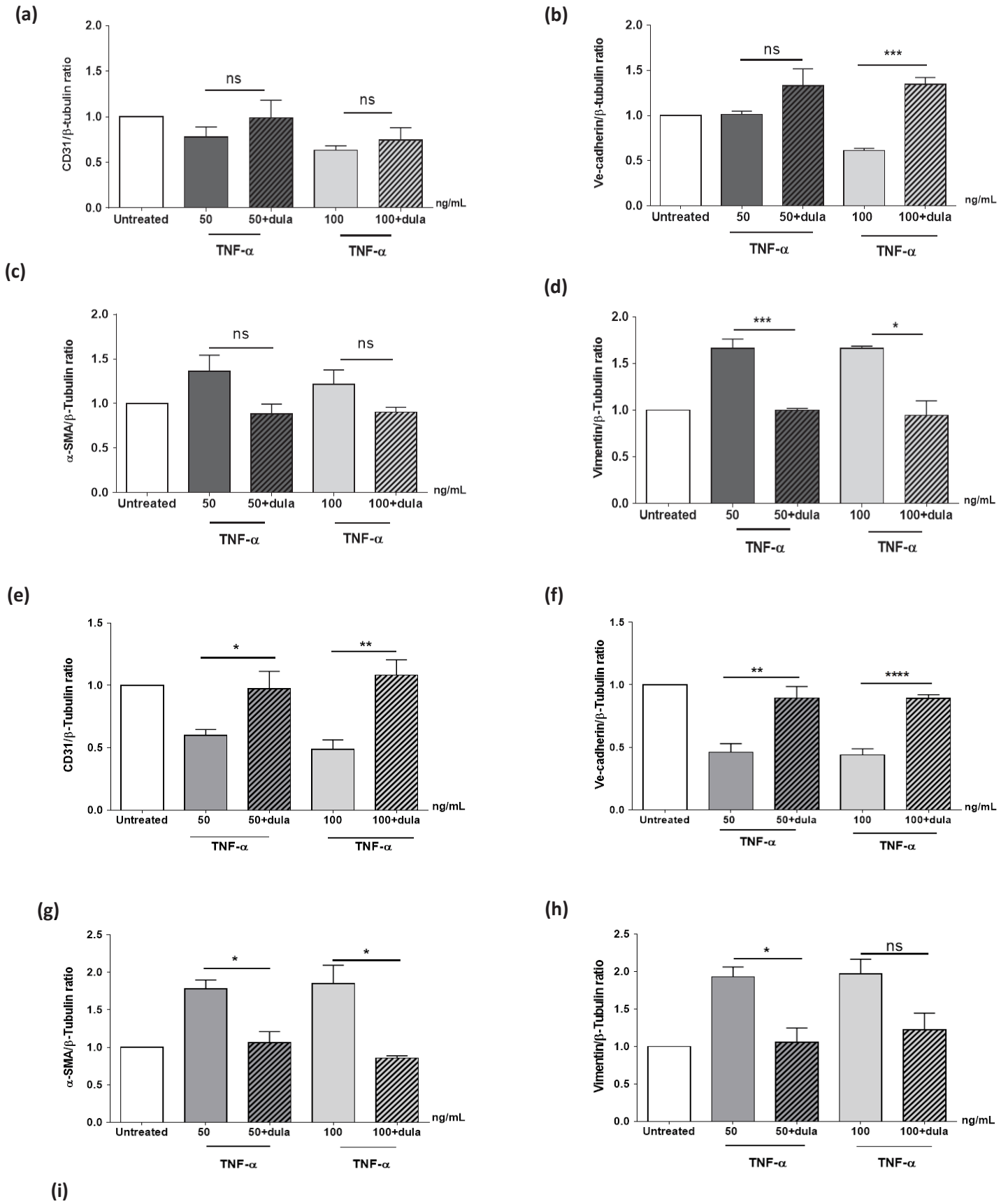
(g)



(h)



**Figure 3 B**



**Figure 4**

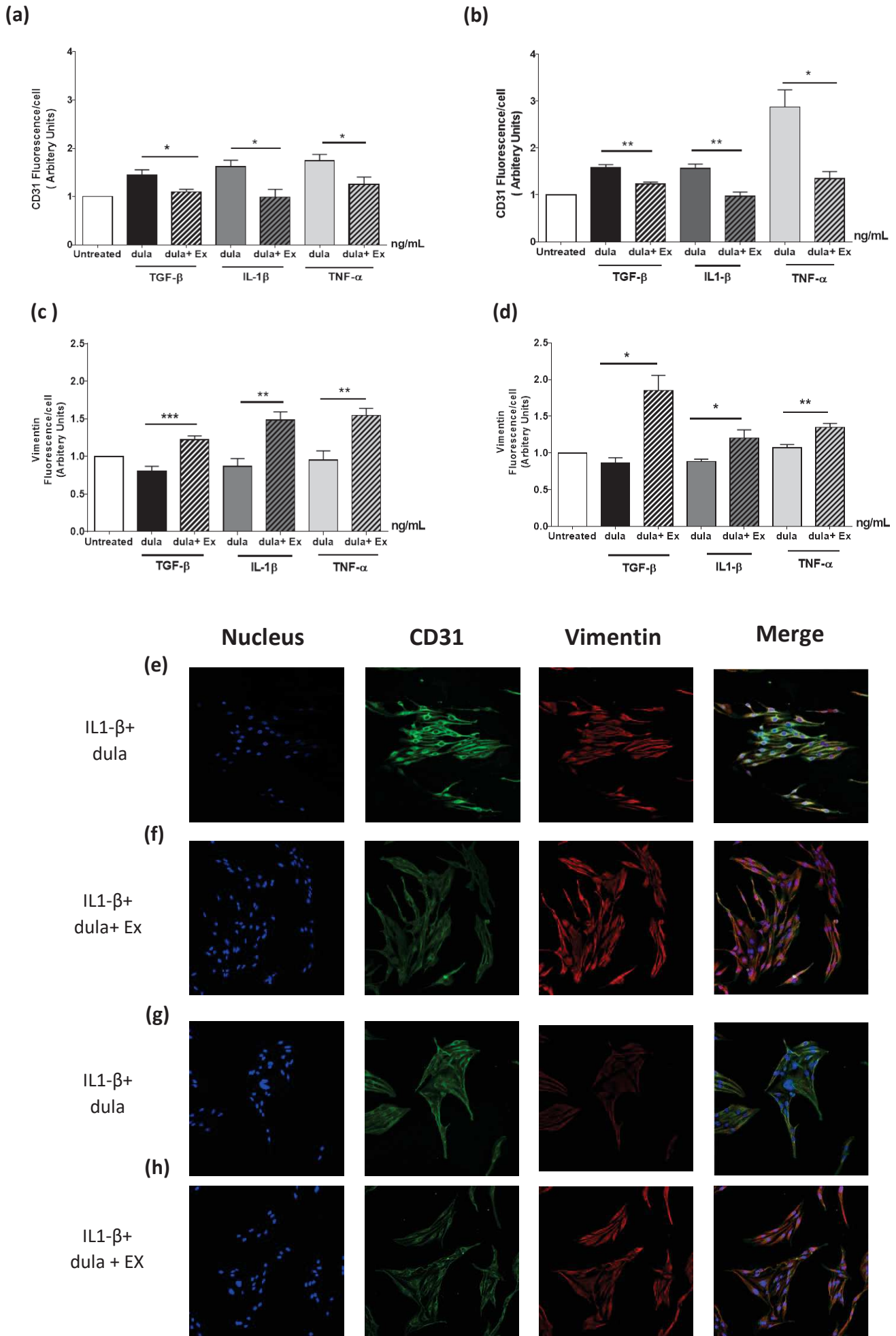
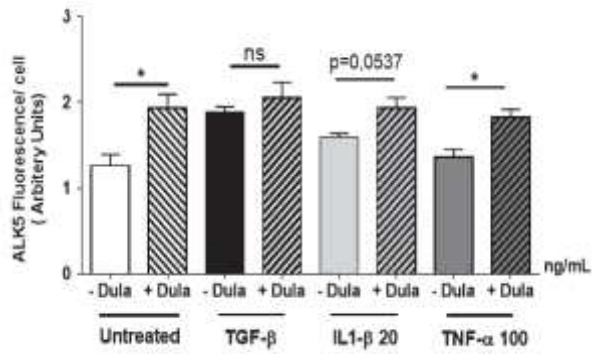
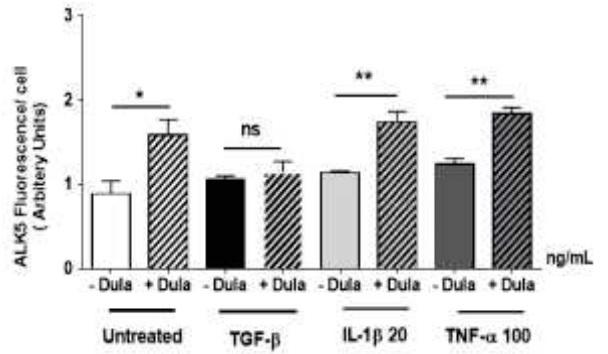


Figure 5

(a)



(b)



(c)

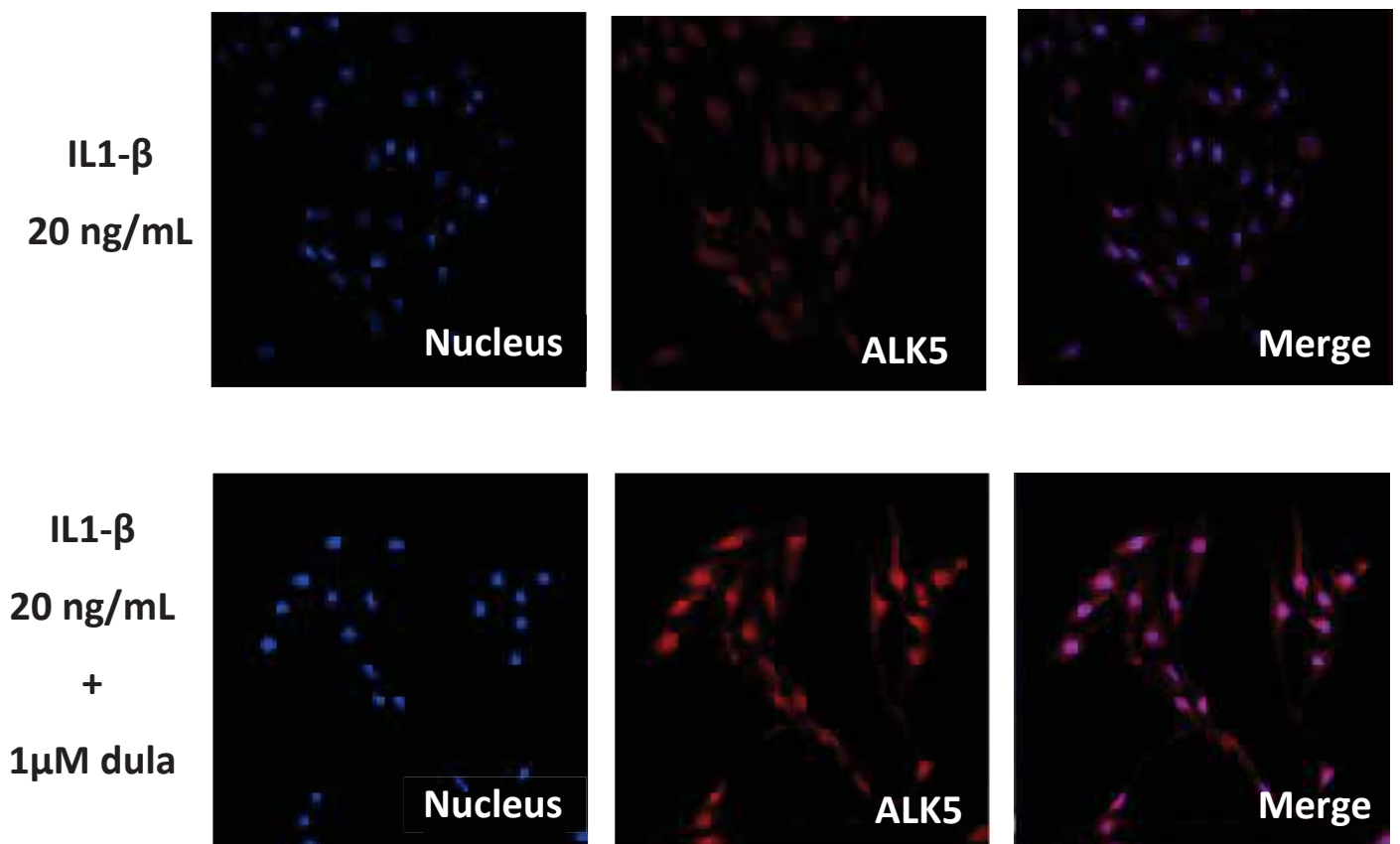
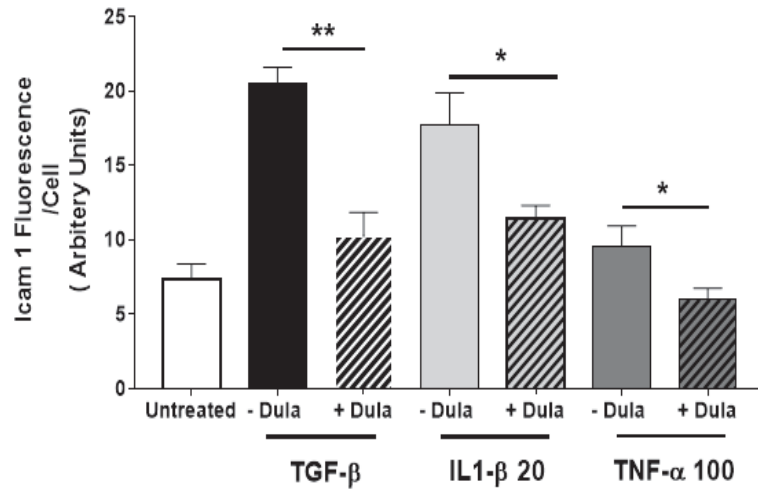
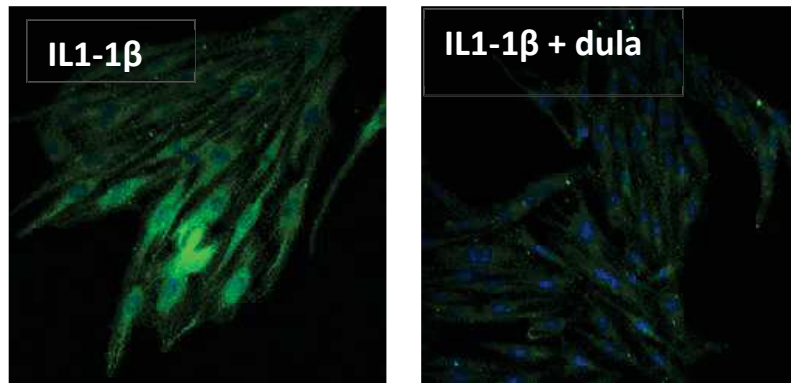


Figure 6

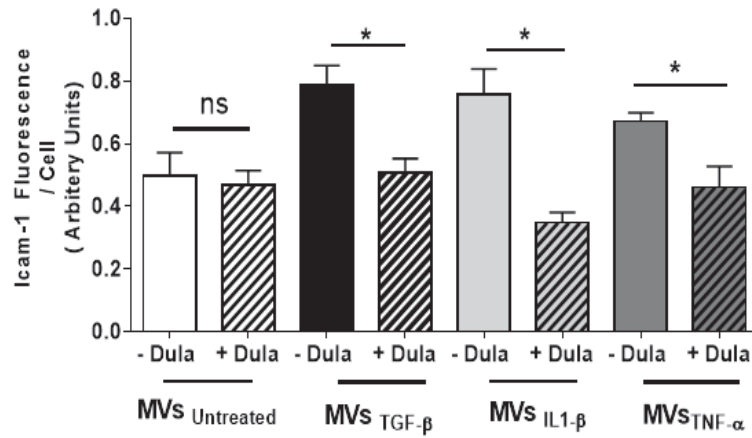
(a)



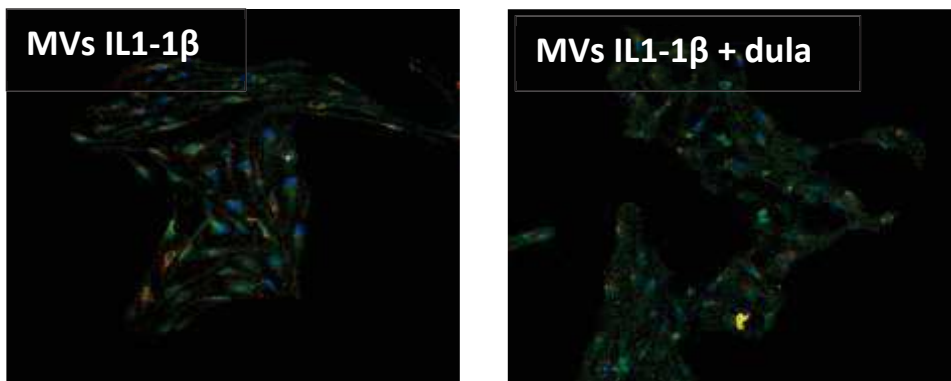
(b)



(c)



(d)



Discussion Générale

et

Perspectives

## 8- Discussion

Depuis les années 2000, l'efficacité et la sécurité de la greffe d'îlots ont été validées par plusieurs travaux de recherche. En France les avancées réglementaires récentes permettent désormais une prise en charge de la greffe d'îlots pancréatiques en soin courant dans des conditions bien précises chez les patients atteints de DT1 instable. Les mécanismes associés à la réaction l'IBMIR et ses conséquences sur la dysfonction chronique du greffon restent encore mal connus. En outre, les agonistes du récepteur au GLP-1, font partie des approches potentielles disponibles et sont validées pour le traitement du diabète du type 2 (Hinnen 2017). En effet, dans des modèles d'études d'animaux diabétiques insulinooprives, les données ont démontré un effet cytoprotecteur des analogues du GLP-1 (Wang, Qi et al. 2013). Dans notre laboratoire, nous avons démontré que le Liraglutide, a un effet anti-apoptotique sur les cellules- $\beta$  RINm-5F de rat soumises aux conditions de l'IBMIR (Gleizes, Kreutter et al. 2015). De plus les MPs de cellules endothéliales cultivées étaient capables de se comporter comme des navettes thérapeutiques et de protéger la cellule- $\beta$  de l'apoptose induite par les cytokines (Kreutter, El Habhab et al. 2017). Dans le modèle d'étude de notre travail de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la cellule endothéliale intra-insulaire. En effet, nous avons pu démontrer *in-vitro* que l'EndTM était induite par les cytokines de la réaction IBMIR et qu'elle favorisait une dysfonction endothéliale majeure avec la libération de MPs délétères. Dans ce modèle, l'utilisation d'un analogue de GLP-1, le Dulaglutide, inversait l'EndTM induite par les cytokines. De plus, le Dulaglutide offre une protection contre l'acquisition d'un phénotype endothélial inflammatoire et pro-inflammatoire.

Ces données suggèrent que l'endothélium est une possible cible thérapeutique des analogues du GLP-1 pour la prévention des dommages cellulaires susceptibles d'impacter le devenir du



greffon lors du prélèvement des îlots (ischémie). La demi-vie de 5 jours du Dulaglutide (Geiser, Heathman et al. 2016), en fait un traitement de choix en péri-opératoire. En effet, le prétraitement du patient transplanté avec du Dulaglutide peut-être une technique simple de préservation des îlots prélevés, mais aussi des îlots transplantés contre le stress oxydant, de l'hypoxie, des cytokines pro-inflammatoires de la réaction IBMIR.

### **La réaction IBMIR : Cause de l'EndTM des cellules endothéliales intra-insulaires**

Puisque la vascularisation des îlots est cruciale pour le succès de la greffe, nous avons émis l'hypothèse qu'une altération endothéliale intra-insulaire en réponse aux cytokines de l'IBMIR peut-être une cause du défaut de revascularisation des îlots transplantés après injection intra-portale. En effet, outre leurs actions pro-inflammatoires, ces cytokines ont également été rapportées comme inductrices de l'EndTM de cellules endothéliales aortiques bovine (BAEC) (Pérez, Muñoz-Durango et al. 2017). Dans notre modèle d'étude, la cinétique d'apparition de l'EndTM des cellules MS-1, soumises à IL1- $\beta$  et au TNF- $\alpha$  a été établie par des études morphologiques, par l'expression de marqueurs endothéliaux (CD31, Ve-cadhérine) et mésenchymateux (Vimentine,  $\alpha$ -SMA) et par un test fonctionnel de reconstitution de tapis cellulaire. La cytokine de référence choisie dans notre étude a été le TGF- $\beta$ 2, qui a déjà été décrite comme inducteur d'EndTM des cellules MS-1 à une concentration de 1 ng/mL pendant 48h (Suzuki, Horie et al. 2018). Dans notre modèle, le TGF- $\beta$ 2 (1 ng/mL) induit les effets caractéristiques rapportés précédemment sur les MS-1 : une diminution de l'expression des marqueurs endothéliaux (CD31 et VE-Cadhérine) avec une augmentation en parallèle des marqueurs mésenchymateux ( $\alpha$ -SMA et vimentine) évalués par western blot et par microscopie confocale. De plus, nos résultats d'analyse morphométrique des cellules MS1 après 72h d'induction par le TGF- $\beta$ 2 sont similaires à ceux décrits par Ma et al. (Ma, van der

Zon et al. 2021). A notre connaissance, ce travail rapporte pour la première fois l'effet de la transition mésenchymateuse induite par les cytokines de l'IBMIR sur les cellules endothéliales intra-insulaires. D'autres territoires endothéliaux ont été décrits comme capable d'EndTM. Dans les cellules endothéliales de valve aortique porcine (PAVEC), l'IL-6 (100 ng/mL) et le TNF- $\alpha$  (100ng/mL) induisent une diminution de l'expression du CD31 et de la VE-Cadhérine, parallèlement à l'augmentation de l'expression de l' $\alpha$ -SMA, dès 48 heures post-traitement (Mahler, Farrar et al. 2013). L'induction de l'EndTM a été aussi décrite dans les cellules endothéliales microvasculaires intestinale humaine (HIMEC) après 6 jours de traitement par l'IL-1 $\beta$  (100 U/mL), le TNF- $\alpha$  (100 U/mL) ou le TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL). Les changements morphologiques étaient corrélés à la perte du CD31, de la VE-cadhérine et du facteur de von Willebrand (vWF). Parallèlement, un réarrangement du cytosquelette a été identifié grâce à la F-actine et une augmentation de l'expression de  $\alpha$ -SMA et de FSP-1 (un marqueur mésenchymateux) a été décrite (Rieder, Kessler et al. 2011). Enfin sur un modèle d'EndMT des cellules HUVEC, un impact pro-mésenchymateux de l'IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) et du TGF- $\beta$ 2 (10ng/mL) a été rapporté après 4 jours (Maleszewska, Gjaltema et al. 2015). L'ensemble de ces données confirment des cinétiques d'induction d'EndTM qui diffèrent selon le territoire endothélial et probablement avec des concentrations efficaces différentes.

Dans notre étude, la cinétique d'apparition des marqueurs mésenchymateux,  $\alpha$ -SMA et Vimentine, varie selon les cytokines, certains marqueurs mésenchymateux apparaissent dès les premières 48 heures, comme observé dans les cellules PAVEC (Mahler, Farrar et al. 2013). En revanche, le test fonctionnel (scratch test) des MS-1 détecte l'EndMT dès 24h après induction cytokinique alors que la modification d'expression des marqueurs endothéliaux ou mésenchymateux apparaît dès 48 heures de traitement.

Au vu des cinétiques, nous avons choisi un traitement par l'IL1- $\beta$  (10-20ng/mL) ou le TNF- $\alpha$  (50-100ng/mL) de 48 heures et 72 heures comme les conditions optimales pour l'évaluation de l'apparition de l'EndMT et de sa modulation pharmacologique. La question d'une combinaison de cytokines inductrices d'EndTM reste à explorer pour les MS-1. Dans un modèle de cellules endothéliales microvasculaires intestinales (HIMEC) d'artères pulmonaires de souris, la synergie de l'IL-1 $\beta$ , du TGF- $\beta$ 1 et du TNF- $\alpha$  sur l'induction de l'EndMT a été démontrée par morphométrie et analyse des marqueurs endothéliaux et mésenchymateux et l'analyse de la barrière endothéliale suggérant une amplification possible dans le contexte de l'IBMIR (Good, Gilbane et al. 2015, Cho, Lee et al. 2018). Quoi qu'il en soit, l'ensemble des données sur les cellules endothéliales renforce notre hypothèse que la perte des îlots transplantés et le défaut de revascularisation des îlots pourraient être la conséquence non seulement d'une réaction inflammatoire liée à l'ischémie-reperfusion mais d'une EndMT de l'endothélium intra-insulaire impactant le fonctionnement de l'îlot. Ainsi, une inhibition pharmacologique de l'EndTM, est en accord avec la recherche d'un traitement protecteur de l'îlot du donneur, combiné à un effet anti-inflammatoire et cytoprotecteur chez le receveur.

### **Effets cytoprotecteurs des analogues du GLP-1**

Les études sur les effets protecteurs des analogues du GLP-1 dans le contexte de la greffe d'îlots pancréatiques sont principalement orientées vers la prévention de la fonction endocrine des cellules  $\beta$ . L'équipe de Gooszen, a démontré que les analogues du GLP-1 doublent la sécrétion d'insuline dans les îlots de chien, en réponse à des doses croissantes de glucose jusqu'à 7,5 mM (van der Burg, van Suylichem et al. 1997). D'autre part, l'effet protecteur de l'Exénatide a été démontré dans un modèle de diabète induit par pancréatectomie totale chez le singe, suivi d'une allogreffe d'îlots. Un pré-traitement *ex vivo*

des îlots du singe donneur avec 5 µg d'Exénatide améliorait leur fonctionnalité évaluée par la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. *In vivo*, une amélioration du contrôle glycémique et de la sécrétion d'insuline des singes receveurs également traités 2 jours en pré-opératoire par l'Exénatide (1 µg/kg) confirmait le bénéfice du traitement double à la fois des îlots du donneur, et du receveur (Buss, Rajab et al. 2012). L'intérêt d'une cytoprotection de l'îlot par les analogues du GLP-1 a déjà été évoqué dans le contexte de l'immunosuppression. Ainsi, les cellules d'insulinôme de souris (MIN6) sont résistantes aux effets toxiques induits par le cocktail d'immunosuppresseurs, Tacrolimus, Rapamycine et MMF lorsqu'elles sont transfectées et surexpriment le récepteur au GLP-1. 1 (D'Amico, Hui et al. 2005). Dans ce contexte, nos données sur l'effet amplificateur des MPs favorisant la transition-mésenchymateuse et sa réduction par le Dulaglutide soulignent une action locale probable dans les îlots transplantés. L'ensemble de ces données souligne le potentiel thérapeutique des analogues du GLP-1 dans la préservation du bon fonctionnement des îlots au cours de la greffe.

### **L'effet protecteur du Dulaglutide sur les cellules MS-1 est GLP-R dépendant**

Dans notre modèle, l'inhibition des récepteurs du GLP-1 par 200 nM d'Exendine (9-39) a restauré l'expression des marqueurs endothéliaux et s'est accompagnée d'une diminution de l'expression des marqueurs mésenchymateux dès les premières 48 heures post-traitement, mettant en évidence la réversibilité de l'EndTM et de plus un effet GLP-1R dépendant en réponse au Dulaglutide. Par ailleurs l'inhibition du GLP-1R des cellules-β RINm-5F par une concentration saturante de 200 nM d'Exendine avant induction cytokinique ou oxydative de 6 heures réduit partiellement (50% maximum) la sécrétion d'insuline initialement améliorée par le Liraglutide [ ]. Ces données suggèrent qu'une partie de l'effet protecteur du Liraglutide

est indépendante du GLP-1R, conformément aux observations faites dans l'endothélium murin et les myocytes cardiaques et vasculaires (Ban, Noyan-Ashraf et al. 2008). Li et al. ont également décrit une réversion partielle de l'effet protecteur du Liraglutide après 12 heures dans les cellules épithéliales (NRK-2), par inhibition pharmacologique avec 100nM d'Exendine (9-39) (Li, Ma et al. 2018). Quel que soit le modèle, les données convergent vers une protection partiellement dépendante du GLP-1R par le Liraglutide. Parce que, une concentration saturante maximale de l'exendine (9-39) ne modifie pas de manière significative l'expression du GLP-1R dans les RINm-5F par exemple (Gleizes, Kreutter et al. 2015), on pourrait envisager alors que le Liraglutide exerce une cytoprotection partielle passant par l'intermédiaire d'un membre encore inconnu de la famille des récepteurs, comme le suggèrent des données rapportées chez des souris knock-out GLP-1R (Ban, Noyan-Ashraf et al. 2008). Enfin, la possibilité que le remodelage de la membrane plasmique modulerait la capacité du GLP-1R à activer une signalisation en aval, a été évoquée par Chen et al. dans les cellules- $\beta$  RINm-5F. Cette équipe a identifié le pouvoir potentialisateur de la production d'AMPc dépendante du GLP-1R exercé par deux lipides de type endocannabinoïde (oleoyethanol-amide et 2-oleoyglycérol). Ils agiraient probablement par modification conformationnelle du GLP-1 lui-même en améliorant son affinité propre pour le GLP-1R (Cheng, Ho et al. 2015). En revanche, nos données sur les cellules endothéliales intra-insulaires, sont en faveur d'un effet du Dulaglutide GLP-1R-dépendant, mais, ne sont pas conclusives sur l'effet du Dulaglutide dans l'EndTM induite par le TNF- $\alpha$ .

## **Le Dulaglutide modifie les propriétés pro-inflammatoires des MPs émises par les cellules endothéliales intra- insulaires au cours de l'EndMT.**

L'association entre réponse inflammatoire et EndMT a été rapportée dans les cellules HUVEC stimulées par une combinaison de stress et d'une exposition de 48 heures au TGF- $\beta$ 1 (10ng/mL) évaluée à l'aide de RT-PCR et de microscopie de fluorescence (Mina, Wang et al. 2016). Dans notre modèle expérimental de cross-talk, les MPs (MP<sub>IL</sub>) émises par les cellules MS-1 en réponse à une concentration modérée d'IL-1- $\beta$  (20 ng/mL) sont pro-inflammatoires et favorisent l'expression de ICAM-1. La présence de Dulaglutide (1  $\mu$ M) pendant 72 heures modifie les propriétés de ces MPs (MP<sub>D</sub>) qui deviennent anti-inflammatoires. Une même concentration de MPs (10 nM) induit donc soit une augmentation de 1,63 fois de l'expression de l'ICAM-1 (MP<sub>IL</sub>), soit limite cette expression (MP<sub>D</sub>). L'effet pro-inflammatoire des MP<sub>IL</sub> atteint 67 % de celui de l'IL-1 $\beta$  seule (20 ng/mL), soulignant l'impact important probable de l'action autocrine des MPs au sein de l'îlot transplanté. Dans notre modèle, le Dulaglutide a réduit la capacité des cellules cibles à capturer les MPs (MP<sub>D</sub> & MP<sub>IL</sub>) marquées avec la sonde lipidique PKH26. Ces données suggèrent donc un effet direct du Dulaglutide sur la réponse inflammatoire de l'endothélium et indirect sur l'amplification autocrine de la réponse inflammatoire médiée par les MPs. Une action bénéfique endothéliale du Dulaglutide a été rapportée dans un modèle *in vitro* d'athérombose. Dans ce modèle, les cellules endothéliales aortiques humaines ont été soumises à une augmentation endogène drastique d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 provoquée par Ox-LDL et qui était limitée dès les premières 24h par de faibles concentrations de Dulaglutide (0,1  $\mu$ g/mL) ramenant les cytokines, l'ARNm de VCAM-1 et de HMBB-1 à des niveaux proches de la ligne de base (Chang, Zhu et al. 2019). Un effet classe des analogues du GLP-1 sur la prévention des réponses inflammatoires endothéliales est soutenu

par d'autres données rapportées sur des HUVEC stimulées par le glucose ou le TNF- $\alpha$  et traitées par le Liraglutide montrant un retour de l'expression de VCAM-1 et ICAM-1 à la ligne de base dès 16h de traitement et persistant après 48h (Gaspari, Liu et al. 2011).

## 9- Conclusion et perspectives

A l'heure actuelle, le contrôle des réactions pro coagulantes à la phase initiale de la greffe d'îlots est assuré par un traitement héparinique en péri-et post-greffe et anti-TNF- $\alpha$  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 pro-coagulante et assez peu vers un traitement ciblant spécifiquement le maintien de la fonction et de la masse  $\beta$  insulaire par la préservation de la vascularisation des îlots. Pourtant, cette dernière stratégie semble déterminante pour le devenir du greffon à long-terme. Dans notre laboratoire nous avons émis l'hypothèse d'un lien entre les cytokines de l'IBMIR et la stimulation de l'endothélium intra-insulaire (greffons) et de la veine porte (receveur). La perte des phénotypes endothéliaux et par suite un défaut de revascularisation serait donc une cause majeure de perte du greffon à court 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, les incrétinomimétiques présentent le double avantage de stimuler la fonction sécrétrice de la cellule  $\beta$  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 pro-coagulantes et de par les médiateurs inflammatoires et pro-apoptotiques qu'elles véhiculent. Ce travail de thèse s'est donc attaché à évaluer l'étude de l'EndMT induite

par des cytokines de l'IBMIR et en parallèle l'étude de l'émission des MPs et leurs effets autocrines sur la cellule endothéliale, 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.

L'étude a permis de montrer que les cytokines de la réaction IBMIR induisent une EndTM des cellules endothéliales intra-insulaire. L'EndMT a été démontrée réversible par le Dulaglutide qui limite la réponse inflammatoire. De plus, les MPs émises au cours de l'EndTM amplifient le stress inflammatoire. Si le modèle de l'EndTM que nous avons caractérisé apparaît solide pour l'exploration de la modulation pharmacologique des effets délétères des cytokines de l'IBMIR sur les cellules endothéliales intra-insulaires, des données complémentaires restent à explorer pour asseoir notre hypothèse de l'effet anti-inflammatoire et anti-EndTM du Dulaglutide. Des études complémentaires *in vitro* reste à réaliser pour valider les voies de signalisation impliquées dans l'EndTM et sensibles au Dulaglutide. Nous privilégierons l'étude de smad 2/3/7, effecteurs classiques de ALK5. De plus, une seule concentration de Dulaglutide a été utilisée dans notre modèle, correspondant à une valeur maximale des concentrations circulantes d'analogue du GLP-1 chez les patients traités actuellement. L'exploration des effets concentration-dépendante du Dulaglutide reste à réaliser. L'expression du TGF- $\beta$  type I récepteurs ALK5 sur les MS-1 a été significativement augmentée en présence du Dulaglutide. D'autres récepteurs du TGF- $\beta$  ont été décrits dans les cellules endothéliales tels que le ALK1. L'exploration des effets du Dulaglutide sur leur expression est inconnue. L'impact du Dulaglutide sur les remodelages membranaires devra être étudié dans les MS-1. En effet, des données du laboratoire sur les RINm-5F traitées par du Liraglutide et d'autres publications, rapportent un effet partiellement dépendant du GLP-1R avec un remodelage membranaire (flip-flop) altéré. Il serait aussi intéressant d'étudier les protéines partenaires des récepteurs ALK5 comme l'endogline et les transporteurs impliqués dans le flip-flop (scramblase, flippase).



L'exportation de protéines actives dans les MPs devra également être recherchée pour identifier d'éventuels acteurs moléculaires expliquant l'impact du Dulaglutide sur les propriétés des MPs notamment pro-inflammatoire et pro-mésenchymateuse. En effet, les microparticules des cellules endothéliales ont été décrites comme porteuse de eNOS, et de caspase-3 susceptibles de contribuer à la réponse aux cytokines de l'IBMIR.

### **Intérêt d'un modèle 3D**

Les données obtenues en culture 2D seront à confirmer dans un modèle cellulaire 3D dit organoïde mimant la structure et l'environnement des îlots. Cette structure constituée de cellules MS-1 et de cellules sécrétrices d'insuline INS-1 se rapproche des conditions d'interaction cellulaire dans les îlots greffés. La fonctionnalité des pseudo-îlots sera vérifiée par la mesure de la sécrétion d'insuline en réponse à une élévation de la concentration de glucose. En effet, les INS-1 sont répondeuses au challenge hyper-glucosé alors que les RINm-5F plus stables, développent préférentiellement une réponse apoptotique lente. Après dissociation des pseudo-îlots, le potentiel cytoprotecteur du Dulaglutide pourra être confirmé par cytométrie en flux en quantifiant la proportion de cellules endothéliales et de cellules à caractère mésenchymateux à différents temps de stimulation par les cytokines (0-72 heures). De plus, les MPs émises au cours de l'EndTM, seront produites en milieu 3D dans les conditions validées du modèle, puis, appliquées après marquage par PKH26 au pseudo-îlots naïfs, pour établir leur cinétique de progression au sein de la structure, tandis que l'altération des réponses insuliniques ou inflammatoires seront évaluées dans le milieu de culture.

Parceque, l'étude *in vivo* de la réaction IBMIR est difficile à mettre en œuvre l'utilisation de modèles plus complexes d'interactions entre sang et îlots est nécessaire. Pour cela, le modèle de blood-loop proposé par Akima et al., est complètement adaptable à l'étude des

interactions des pseudo-îlots avec le sang portal ou ses éléments constitutifs et à la modulation pharmacologique (Akima, Hawthorne et al. 2009, Liuwantara, Chew et al. 2016). Ainsi, les effets cytoprotecteurs des analogues du GLP-1 seront accessibles à la comparaison. De plus, d'autres molécules cytoprotectives récemment proposées pour la protection des îlots comme la protéine C mutante dépourvue de propriété anticoagulante sont efficaces dans ce modèle et pourraient servir de référence standard (Mosnier, Zlokovic et al. 2007).

### **Intérêt et étude *in vivo***

La mise en place d'un modèle *in vivo* de greffe d'îlots chez l'animal diabétique sera nécessaire pour l'évaluation du traitement pharmacologique par le Dulaglutide au cours de l'IBMIR et de l'EndTM. Le modèle de greffe intraportale d'îlots 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 conditionnée du récepteur au GLP-1 dans les vaisseaux et le pancréas est un atout indispensable pour confirmer les mécanismes de contrôle mis en jeu dans l'IBMIR et l'EndTM. Enfin, une étude histologique du greffon et un monitoring des MP de cellules  $\beta$  et endothéliales insulaires à l'image des travaux en recherche clinique (Amoura, El-Ghazouani et al. 2020) pourront être proposés. Parmi les biomarqueurs associés aux MPEs, plusieurs miRNAs modulent l'expression génique des cellules cibles (Orozco and Lewis 2010). L'angiomiRNA-126 impliqué dans la préservation de l'endothélium (Zerneck, Bidzhekov et al. 2009) et le miRNA-375 impliqué dans la préservation de la masse et de la fonction de la cellule  $\beta$  pourront être étudiés (Chen, Lan et al. 2014).

## References

"Unknown article."

Abbas, M., L. Jesel, C. Auger, L. Amoura, N. Messas, G. Manin, C. Rumig, A. J. León-González, T. P. Ribeiro, G. C. Silva, R. Abou-Merhi, E. Hamade, M. Hecker, Y. Georg, N. Chakfe, P. Ohlmann, V. B. Schini-Kerth, F. Toti and O. Morel (2017). "Endothelial Microparticles From Acute Coronary Syndrome Patients Induce Premature Coronary Artery Endothelial Cell Aging and Thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-Mediated Activation of MAPKs and PI3-Kinase Pathways." Circulation **135**(3): 280-296.

Ahlqvist, E., P. Storm, A. Käräjämäki, M. Martinell, M. Dorkhan, A. Carlsson, P. Vikman, R. B. Prasad, D. M. Aly, P. Almgren, Y. Wessman, N. Shaat, P. Spéigel, H. Mulder, E. Lindholm, O. Melander, O. Hansson, U. Malmqvist, Å. Lernmark, K. Lahti, T. Forsén, T. Tuomi, A. H. Rosengren and L. Groop (2018). "Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables." Lancet Diabetes Endocrinol **6**(5): 361-369.

Aird, W. C. (2007). "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms." Circ Res **100**(2): 158-173.

Akima, S., W. Hawthorne, E. Favaloro, A. Patel, K. Blyth, Y. Mudaliar, J. Chapman and P. O'Connell (2009). "Tirofiban and Activated Protein C Synergistically Inhibit the Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR) from Allogeneic Islet Cells Exposure to Human Blood." American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons **9**: 1533-1540.

Al-Massarani, G., H. Vacher-Coponat, P. Paul, L. Arnaud, A. Loundou, S. Robert, V. Moal, Y. Berland, F. Dignat-George and L. Camoin-Jau (2009). "Kidney Transplantation Decreases the Level and Procoagulant Activity of Circulating Microparticles." American Journal of Transplantation **9**(3): 550-557.

Alexandru, N., E. Badila, E. Weiss, D. Cochior, E. Stępień and A. Georgescu (2016). "Vascular complications in diabetes: Microparticles and microparticle associated microRNAs as active players." Biochem Biophys Res Commun **472**(1): 1-10.

Ali, K. F. and B. Hatipoglu (2020). "Pancreatic Islet Cell Transplantation: Graft Stability and Metabolic Outcomes." OBM Transplant **4**(3): 1-9.

Alvarez-Perez, J. C., S. Ernst, C. Demirci, G. P. Casinelli, J. M. Mellado-Gil, F. Rausell-Palamos, R. C. Vasavada and A. Garcia-Ocaña (2014). "Hepatocyte growth factor/c-Met signaling is required for  $\beta$ -cell regeneration." Diabetes **63**(1): 216-223.

Alwahsh, S. M., O. Qutachi, P. J. Starkey Lewis, A. Bond, J. Noble, P. Burgoyne, N. Morton, R. Carter, J. Mann, S. Ferreira-Gonzalez, M. Alvarez-Paino, S. J. Forbes, K. M. Shakesheff and S. Forbes (2021). "Fibroblast growth factor 7 releasing particles enhance islet engraftment and improve metabolic control following islet transplantation in mice with diabetes." Am J Transplant **21**(9): 2950-2963.

Amabile, N., A. P. Guérin, A. Leroyer, Z. Mallat, C. Nguyen, J. Boddaert, G. M. London, A. Tedgui and C. M. Boulanger (2005). "Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure." J Am Soc Nephrol **16**(11): 3381-3388.

Amabile, N., C. Heiss, W. M. Real, P. Minasi, D. McGlothlin, E. J. Rame, W. Grossman, T. De Marco and Y. Yeghiazarians (2008). "Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **177**(11): 1268-1275.

Amoura, L., F. Z. El-Ghazouani, M. Kassem, A. El Habhab, G. Kreutter, S. Sahraoui, D. Bosco, N. Jessel, T. Berney, P. Y. Benhamou, F. Toti and L. Kessler (2020). "Assessment of plasma microvesicles to monitor pancreatic islet graft dysfunction: Beta cell- and leukocyte-derived microvesicles as specific features in a pilot longitudinal study." Am J Transplant **20**(1): 40-51.

Amoura, L., F. Z. El-Ghazouani, M. Kassem, A. El Habhab, G. Kreutter, S. Sahraoui, D. Bosco, N. Jessel, T. Berney, P. Y. Benhamou, F. Toti and L. Kessler (2020). "Assessment of plasma microvesicles to monitor pancreatic islet graft dysfunction: Beta cell- and leukocyte-derived microvesicles as specific features in a pilot longitudinal study." American Journal of Transplantation **20**(1): 40-51.

- Arciniegas, E., M. G. Frid, I. S. Douglas and K. R. Stenmark (2007). "Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **293**(1): L1-L8.
- Arciniegas, E., C. Y. Neves, L. M. Carrillo, E. A. Zambrano and R. Ramírez (2005). "Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development." *Endothelium* **12**(4): 193-200.
- Arciniegas, E., L. Ponce, Y. Hartt, A. Graterol and R. G. Carlini (2000). "Intimal thickening involves transdifferentiation of embryonic endothelial cells." *The Anatomical Record* **258**(1): 47-57.
- Arciniegas, E., A. B. Sutton, T. D. Allen and A. M. Schor (1992). "Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro." *Journal of Cell Science* **103**(2): 521-529.
- Association, A. D. (2015). "2. Classification and Diagnosis of Diabetes." *Diabetes Care* **38**(Supplement 1): S8-S16.
- Atkinson, M. A., G. S. Eisenbarth and A. W. Michels (2014). "Type 1 diabetes." *Lancet* **383**(9911): 69-82.
- Ban, K., M. H. Noyan-Ashraf, J. Hoefler, S.-S. Bolz, D. J. Drucker and M. Husain (2008). "Cardioprotective and Vasodilatory Actions of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Are Mediated Through Both Glucagon-Like Peptide 1 Receptor–Dependent and –Independent Pathways." *Circulation* **117**(18): 2340-2350.
- Barrett, J. C., D. G. Clayton, P. Concannon, B. Akolkar, J. D. Cooper, H. A. Erlich, C. Julier, G. Morahan, J. Nerup, C. Nierras, V. Plagnol, F. Pociot, H. Schuilenburg, D. J. Smyth, H. Stevens, J. A. Todd, N. M. Walker and S. S. Rich (2009). "Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes." *Nature Genetics* **41**(6): 703-707.
- Barrington, P., J. Y. Chien, H. D. Showalter, K. Schneck, S. Cui, F. Tibaldi, B. Ellis and T. A. Hardy (2011). "A 5-week study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of LY2189265, a novel, long-acting glucagon-like peptide-1 analogue, in patients with type 2 diabetes." *Diabetes Obes Metab* **13**(5): 426-433.
- Barry, O. P., D. Pratico, J. A. Lawson and G. A. FitzGerald (1997). "Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles." *The Journal of clinical investigation* **99**(9): 2118-2127.
- Barry, O. P., D. Praticò, R. C. Savani and G. A. FitzGerald (1998). "Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles." *J Clin Invest* **102**(1): 136-144.
- Bartoloni, E., A. Alunno, O. Bistoni, S. Caterbi, F. Luccioli, G. Santoboni, G. Mirabelli, F. Cannarile and R. Gerli (2015). "Characterization of circulating endothelial microparticles and endothelial progenitor cells in primary Sjögren's syndrome: new markers of chronic endothelial damage?" *Rheumatology (Oxford)* **54**(3): 536-544.
- Bechstein, W. O. (2000). "Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management." *Transpl Int* **13**(5): 313-326.
- Bellin, M. D., F. B. Barton, A. Heitman, J. V. Harmon, R. Kandaswamy, A. N. Balamurugan, D. E. Sutherland, R. Alejandro and B. J. Hering (2012). "Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes." *Am J Transplant* **12**(6): 1576-1583.
- Bellin, M. D., R. Kandaswamy, J. Parkey, H. J. Zhang, B. Liu, S. H. Ihm, J. D. Ansite, J. Witson, P. Bansal-Pakala, A. N. Balamurugan, K. K. Papas, D. E. Sutherland, A. Moran and B. J. Hering (2008). "Prolonged insulin independence after islet allotransplants in recipients with type 1 diabetes." *Am J Transplant* **8**(11): 2463-2470.
- Bhagat, K. and P. Vallance (1997). "Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo." *Circulation* **96**(9): 3042-3047.
- Biolo, G., R. Y. Declan Fleming and R. R. Wolfe (1995). "Physiologic hyperinsulinemia stimulates protein synthesis and enhances transport of selected amino acids in human skeletal muscle." *J Clin Invest* **95**(2): 811-819.
- Bottino, R., M. F. Knoll, C. A. Knoll, S. Bertera and M. M. Trucco (2018). "The Future of Islet Transplantation Is Now." *Front Med (Lausanne)* **5**: 202.

- Boulanger, C. M., N. Amabile, A. P. Guérin, B. Pannier, A. S. Leroyer, C. N. Mallat, A. Tedgui and G. M. London (2007). "In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease." *Hypertension* **49**(4): 902-908.
- Boulanger, C. M., N. Amabile and A. Tedgui (2006). "Circulating Microparticles." *Hypertension* **48**(2): 180-186.
- Bowers, D. T., W. Song, L. H. Wang and M. Ma (2019). "Engineering the vasculature for islet transplantation." *Acta Biomater* **95**: 131-151.
- Brissova, M., M. Fowler, P. Wiebe, A. Shostak, M. Shiota, A. Radhika, P. C. Lin, M. Gannon and A. C. Powers (2004). "Intra-islet endothelial cells contribute to revascularization of transplanted pancreatic islets." *Diabetes* **53**(5): 1318-1325.
- Brissova, M. and A. C. Powers (2008). "Revascularization of Transplanted Islets: Can It Be Improved?" *Diabetes* **57**(9): 2269-2271.
- Brodie, G. M., M. Wallberg, P. Santamaria, F. S. Wong and E. A. Green (2008). "B-cells promote intra-islet CD8+ cytotoxic T-cell survival to enhance type 1 diabetes." *Diabetes* **57**(4): 909-917.
- Brodsky, S. V., M. E. Facciuto, D. Heydt, J. Chen, H. K. Islam, M. Kajstura, G. Ramaswamy and M. Agüero-Rosenfeld (2008). "Dynamics of circulating microparticles in liver transplant patients." *J Gastrointest Liver Dis* **17**(3): 261-268.
- Brodsky, S. V., F. Zhang, A. Nasjletti and M. S. Goligorsky (2004). "Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**(5): H1910-1915.
- Brogan, P. A., V. Shah, C. Brachet, A. Harnden, D. Mant, N. Klein and M. J. Dillon (2004). "Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young." *Arthritis Rheum* **50**(3): 927-936.
- Burger, D., A. C. Montezano, N. Nishigaki, Y. He, A. Carter and R. M. Touyz (2011). "Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(8): 1898-1907.
- Burke, S. J. and J. J. Collier (2021). "Special Issue: Islet Inflammation and Metabolic Homeostasis." *Metabolites* **11**(2): 77.
- Burke, S. J., K. Stadler, D. Lu, E. Gleason, A. Han, D. R. Donohoe, R. C. Rogers, G. E. Hermann, M. D. Karlstad and J. J. Collier (2015). "IL-1 $\beta$  reciprocally regulates chemokine and insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells via NF- $\kappa$ B." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **309**(8): E715-726.
- Buse, J. B., J. Rosenstock, G. Sesti, W. E. Schmidt, E. Montanya, J. H. Brett, M. Zychma and L. Blonde (2009). "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* **374**(9683): 39-47.
- Buss, J. L., A. Rajab, E. D. Essig, V. K. Bergdall, J. Wang and K. Osei (2012). "Exenatide pretreatment improved graft function in nonhuman primate islet recipients compared to treatment after transplant only." *Journal of transplantation* **2012**: 382518-382518.
- Caiazzo, R., M. C. Vantyghem, V. Raverdi, C. Bonner, V. Gmyr, F. Defrance, C. Leroy, G. Sergent, T. Hubert, O. Ernst, C. Noel, J. Kerr-Conte and F. Pattou (2015). "Impact of Procedure-Related Complications on Long-term Islet Transplantation Outcome." *Transplantation* **99**(5): 979-984.
- Campbell, P. M., A. Salam, E. A. Ryan, P. Senior, B. W. Paty, D. Bigam, T. McCready, A. Halpin, S. Imes, F. Al Saif, J. R. Lakey and A. M. Shapiro (2007). "Pretransplant HLA antibodies are associated with reduced graft survival after clinical islet transplantation." *Am J Transplant* **7**(5): 1242-1248.
- Cano, D. A., M. Hebrok and M. Zenker (2007). "Pancreatic development and disease." *Gastroenterology* **132**(2): 745-762.
- Cao, Y., B. Feng, S. Chen, Y. Chu and S. Chakrabarti (2014). "Mechanisms of endothelial to mesenchymal transition in the retina in diabetes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**(11): 7321-7331.
- Cardani, R., A. Pileggi, C. Ricordi, C. Gomez, D. A. Baidal, G. G. Ponte, D. Mineo, R. N. Faradji, T. Froud, G. Ciancio, V. Esquenazi, G. W. Burke, 3rd, G. Selvaggi, J. Miller, N. S. Kenyon and R. Alejandro (2007). "Allosensitization of islet allograft recipients." *Transplantation* **84**(11): 1413-1427.
- Ceccarelli, E., E. Guarino, D. Merlotti, A. Patti, G. Luigi, R. Nuti and F. Dotta (2013). "Beyond Glycemic Control in Diabetes Mellitus: Effects of Incretin-Based Therapies on Bone Metabolism." *Frontiers in endocrinology* **4**: 73.

- Cechin, S. R., I. Pérez-Álvarez, E. Fenjves, R. D. Molano, A. Pileggi, P. O. Berggren, C. Ricordi and R. L. Pastori (2012). "Anti-inflammatory properties of exenatide in human pancreatic islets." Cell Transplant **21**(4): 633-648.
- Chakraborty, S., D. C. Zawieja, M. J. Davis and M. Muthuchamy (2015). "MicroRNA signature of inflamed lymphatic endothelium and role of miR-9 in lymphangiogenesis and inflammation." Am J Physiol Cell Physiol **309**(10): C680-692.
- Chang, A. M., G. Jakobsen, J. Sturis, M. J. Smith, C. J. Bloem, B. An, A. Galecki and J. B. Halter (2003). "The GLP-1 derivative NN2211 restores beta-cell sensitivity to glucose in type 2 diabetic patients after a single dose." Diabetes **52**(7): 1786-1791.
- Chang, W., F. Zhu, H. Zheng, Z. Zhou, P. Miao, L. Zhao and Z. Mao (2019). "Glucagon-like peptide-1 receptor agonist dulaglutide prevents ox-LDL-induced adhesion of monocytes to human endothelial cells: An implication in the treatment of atherosclerosis." Molecular Immunology **116**: 73-79.
- Chargaff, E. and R. West (1946). "The biological significance of the thromboplastic protein of blood." J Biol Chem **166**(1): 189-197.
- Chaudhuri, V., L. Zhou and M. Karasek (2007). "Inflammatory cytokines induce the transformation of human dermal microvascular endothelial cells into myofibroblasts: a potential role in skin fibrogenesis." J Cutan Pathol **34**(2): 146-153.
- Chen, H., H. Y. Lan, D. H. Roukos and W. C. Cho (2014). "Application of microRNAs in diabetes mellitus." J Endocrinol **222**(1): R1-r10.
- Chen, P.-Y., L. Qin, N. Baeyens, G. Li, T. Afolabi, M. Budatha, G. Tellides, M. A. Schwartz and M. Simons (2015). "Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression." The Journal of clinical investigation **125**(12): 4514-4528.
- Cheng, Y. H., M. S. Ho, W. T. Huang, Y. T. Chou and K. King (2015). "Modulation of Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Potency by Endocannabinoid-like Lipids Represents a Novel Mode of Regulating GLP-1 Receptor Signaling." J Biol Chem **290**(23): 14302-14313.
- Chhabra, P. and K. Brayman (2014). "Overcoming barriers in clinical islet transplantation: Current limitations and future prospects." Current problems in surgery **51**: 49-86.
- Cho, J. G., A. Lee, W. Chang, M.-S. Lee and J. Kim (2018). "Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction." Frontiers in Immunology **9**(294).
- Cho, J. G., A. Lee, W. Chang, M.-S. Lee and J. Kim (2018). "Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction." Frontiers in immunology **9**: 294-294.
- Choi, K. J., J.-K. Nam, J.-H. Kim, S.-H. Choi and Y.-J. Lee (2020). "Endothelial-to-mesenchymal transition in anticancer therapy and normal tissue damage." Experimental & Molecular Medicine **52**(5): 781-792.
- Choi, S.-H., Z.-Y. Hong, J.-K. Nam, J. Jang, H.-J. Lee, R. Yoo, Y. Lee, S. Park, Y. Ji, Y.-S. Lee, J. Cho, Y.-J. Lee, C. Lee and K. H. Kim (2015). "A Hypoxia-Induced Vascular Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **21**.
- Cipriani, P., P. Di Benedetto, P. Ruscitti, D. Capece, F. Zazzeroni, V. Liakouli, I. Pantano, O. Berardicurti, F. Carubbi, G. Pecetti, S. Turrichia, E. Alesse, M. Iglarz and R. Giacomelli (2015). "The Endothelial-mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis Is Induced by Endothelin-1 and Transforming Growth Factor- $\beta$  and May Be Blocked by Macitentan, a Dual Endothelin-1 Receptor Antagonist." J Rheumatol **42**(10): 1808-1816.
- Collino, F., M. C. Deregibus, S. Bruno, L. Sterpone, G. Aghemo, L. Viltono, C. Tetta and G. Camussi (2010). "Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs." PLoS One **5**(7): e11803.
- Collombat, P. and A. Mansouri (2009). "[Pax4 transdifferentiates glucagon-secreting alpha cells to insulin-secreting beta endocrine pancreatic cells]." Med Sci (Paris) **25**(8-9): 763-765.
- Combes, V., A. C. Simon, G. E. Grau, D. Arnoux, L. Camoin, F. Sabatier, M. Mutin, M. Sanmarco, J. Sampol and F. Dignat-George (1999). "In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant." J Clin Invest **104**(1): 93-102.

- Combes, V., A. C. Simon, G. E. Grau, D. Arnoux, L. Camoin, F. Sabatier, M. Mutin, M. Sanmarco, J. Sampol and F. Dignat-George (1999). "In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant." The Journal of clinical investigation **104**(1): 93-102.
- Constantinescu, A. A., C. Gleizes, M. Alhosin, E. Yala, F. Zobairi, A. Leclercq, G. Stoian, I. L. Mitrea, G. Prévost, F. Toti and L. Kessler (2014). "Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis." Journal of Cystic Fibrosis **13**(2): 219-226.
- Contreras, J. L., C. A. Smyth, C. Eckstein, G. Bilbao, J. A. Thompson, C. J. Young and D. E. Eckhoff (2003). "Peripheral mobilization of recipient bone marrow-derived endothelial progenitor cells enhances pancreatic islet revascularization and engraftment after intraportal transplantation." Surgery **134**(2): 390-398.
- Corrêa-Giannella, M. L. and A. S. Raposo do Amaral (2009). "Pancreatic islet transplantation." Diabetology & Metabolic Syndrome **1**(1): 9.
- Curtis, A. M., J. Edelberg, R. Jonas, W. T. Rogers, J. S. Moore, W. Syed and E. R. Mohler (2013). "Endothelial microparticles: Sophisticated vesicles modulating vascular function." Vascular Medicine **18**(4): 204-214.
- Curtis, A. M., J. Edelberg, R. Jonas, W. T. Rogers, J. S. Moore, W. Syed and E. R. Mohler, 3rd (2013). "Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function." Vascular medicine (London, England) **18**(4): 204-214.
- D'Amico, E., H. Hui, N. Houry, U. Di Mario and R. Perfetti (2005). "Pancreatic  $\beta$ -cells expressing GLP-1 are resistant to the toxic effects of immunosuppressive drugs." Journal of Molecular Endocrinology **34**(2): 377-390.
- Daniel, L., F. Fakhouri, D. Joly, L. Mouthon, P. Nusbaum, J. P. Grunfeld, J. Schifferli, L. Guillevin, P. Lesavre and L. Halbwachs-Mecarelli (2006). "Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis." Kidney Int **69**(8): 1416-1423.
- Deissler, H., H. Deissler, G. K. Lang and G. E. Lang (2006). "TGFbeta induces transdifferentiation of iBREC to alphaSMA-expressing cells." Int J Mol Med **18**(4): 577-582.
- Dejana, E., K. K. Hirschi and M. Simons (2017). "The molecular basis of endothelial cell plasticity." Nature Communications **8**(1): 14361.
- Del Toro-Arreola, A., A. K. Robles-Murillo, A. Daneri-Navarro and J. D. Rivas-Carrillo (2016). "The role of endothelial cells on islet function and revascularization after islet transplantation." Organogenesis **12**(1): 28-32.
- Delaune, V., S. Lacotte, Q. Gex, F. Slits, A. Kahler-Quesada, V. Lavallard, A. Peloso, L. Orci, T. Berney and C. Toso (2018). "Effects of remote ischemic preconditioning on intraportal islet transplantation in a rat model." Transplant International **32**.
- Demirci, C., S. Ernst, J. C. Alvarez-Perez, T. Rosa, S. Valle, V. Shridhar, G. P. Casinelli, L. C. Alonso, R. C. Vasavada and A. García-Ocana (2012). "Loss of HGF/c-Met signaling in pancreatic  $\beta$ -cells leads to incomplete maternal  $\beta$ -cell adaptation and gestational diabetes mellitus." Diabetes **61**(5): 1143-1152.
- Deng, F., S. Wang and L. Zhang (2016). "Endothelial Microparticles Act as Novel Diagnostic and Therapeutic Biomarkers of Diabetes and Its Complications: A Literature Review." BioMed research international **2016**: 9802026-9802026.
- Deshpande, A. D., M. Harris-Hayes and M. Schootman (2008). "Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications." Phys Ther **88**(11): 1254-1264.
- Dharmalingam, M., U. Sriram and M. P. Baruah (2011). "Liraglutide: A review of its therapeutic use as a once daily GLP-1 analog for the management of type 2 diabetes mellitus." Indian J Endocrinol Metab **15**(1): 9-17.
- Diamant, M., M. E. Tushuizen, A. Sturk and R. Nieuwland (2004). "Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?" Eur J Clin Invest **34**(6): 392-401.
- Diana, J., L. Gahzarian, Y. Simoni and A. Lehuen (2011). "Innate immunity in type 1 diabetes." Discov Med **11**(61): 513-520.

- Dignat-George, F. and C. M. Boulanger (2011). "The many faces of endothelial microparticles." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(1): 27-33.
- Dinareello, C. A. (2000). "Proinflammatory cytokines." *Chest* **118**(2): 503-508.
- Dolenšek, J., M. S. Rupnik and A. Stožer (2015). "Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas." *Islets* **7**(1): e1024405.
- Doupis, J. (2019). "Once-weekly Dulaglutide and Major Cardiovascular Events—Results of the REWIND Trial." *US Endocrinology* **15**: 65.
- Doyle, M. E. and J. M. Egan (2007). "Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas." *Pharmacol Ther* **113**(3): 546-593.
- Drachenberg, C. B., D. K. Klassen, M. R. Weir, A. Wiland, J. C. Fink, S. T. Bartlett, C. B. Cangro, S. Blahut and J. C. Papadimitriou (1999). "Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation." *Transplantation* **68**(3): 396-402.
- Eckhard, M., D. Lommel, N. Hackstein, D. Winter, A. Ziegler, W. Rau, M. Choschzick, R. G. Bretzel and M. D. Brendel (2004). "Disseminated periportal fatty degeneration after allogeneic intraportal islet transplantation in a patient with type 1 diabetes mellitus: a case report." *Transplant Proc* **36**(4): 1111-1116.
- Egan, J. M., A. R. Clocquet and D. Elahi (2002). "The insulinotropic effect of acute exendin-4 administered to humans: comparison of nondiabetic state to type 2 diabetes." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(3): 1282-1290.
- Enderby, C. and C. A. Keller (2015). "An overview of immunosuppression in solid organ transplantation." *Am J Manag Care* **21**(1 Suppl): s12-23.
- Eng, J., W. A. Kleinman, L. Singh, G. Singh and J. P. Raufman (1992). "Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas." *J Biol Chem* **267**(11): 7402-7405.
- Esposito, K., M. Ciotola, B. Schisano, R. Gualdiero, L. Sardelli, L. Misso, G. Giannetti and D. Giugliano (2006). "Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women." *J Clin Endocrinol Metab* **91**(9): 3676-3679.
- Ettelaie, C., S. Su, C. Li and M. E. Collier (2008). "Tissue factor-containing microparticles released from mesangial cells in response to high glucose and AGE induce tube formation in microvascular cells." *Microvasc Res* **76**(3): 152-160.
- Farber, H. W. and J. Loscalzo (2004). "Pulmonary arterial hypertension." *N Engl J Med* **351**(16): 1655-1665.
- Farilla, L., A. Bulotta, B. Hirshberg, S. Li Calzi, N. Khoury, H. Noushmehr, C. Bertolotto, U. Di Mario, D. M. Harlan and R. Perfetti (2003). "Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets." *Endocrinology* **144**(12): 5149-5158.
- Farrar, E. J. and J. T. Butcher (2014). "Heterogeneous susceptibility of valve endothelial cells to mesenchymal transformation in response to TNF $\alpha$ ." *Ann Biomed Eng* **42**(1): 149-161.
- Faure, V., L. Dou, F. Sabatier, C. Cerini, J. Sampol, Y. Berland, P. Brunet and F. Dignat-George (2006). "Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure." *J Thromb Haemost* **4**(3): 566-573.
- Fiorina, P., A. M. J. Shapiro, C. Ricordi and A. Secchi (2008). "The Clinical Impact of Islet Transplantation." *American Journal of Transplantation* **8**(10): 1990-1997.
- Flint, A., A. Raben, A. Astrup and J. J. Holst (1998). "Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans." *The Journal of clinical investigation* **101**(3): 515-520.
- França, C. N., M. C. d. O. Izar, J. B. d. Amaral, D. M. Tegani and F. A. H. Fonseca (2015). "Microparticles as potential biomarkers of cardiovascular disease." *Arquivos brasileiros de cardiologia* **104**(2): 169-174.
- Frid, M. G., V. A. Kale and K. R. Stenmark (2002). "Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis." *Circ Res* **90**(11): 1189-1196.
- Galley, H. F. and N. R. Webster (2004). "Physiology of the endothelium." *Br J Anaesth* **93**(1): 105-113.



- Gaspari, T., H. Liu, I. Welungoda, Y. Hu, R. E. Widdop, L. B. Knudsen, R. W. Simpson and A. E. Dear (2011). "A GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelial cell dysfunction and vascular adhesion molecule expression in an ApoE<sup>-/-</sup> mouse model." *Diab Vasc Dis Res* **8**(2): 117-124.
- Geiser, J. S., M. A. Heathman, X. Cui, J. Martin, C. Loghin, J. Y. Chien and A. De La Peña (2016). "Clinical Pharmacokinetics of Dulaglutide in Patients with Type 2 Diabetes: Analyses of Data from Clinical Trials." *Clinical Pharmacokinetics* **55**(5): 625-634.
- Geng, H. and J. Guan (2017). "MiR-18a-5p inhibits endothelial-mesenchymal transition and cardiac fibrosis through the Notch2 pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **491**(2): 329-336.
- Giordo, R., Y. M. A. Ahmed, H. Allam, S. Abusnana, L. Pappalardo, G. K. Nasrallah, A. A. Mangoni and G. Pintus (2021). "EndMT Regulation by Small RNAs in Diabetes-Associated Fibrotic Conditions: Potential Link With Oxidative Stress." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**(1275).
- Gleizes, C., G. Kreutter, A. M. Ab, M. Kassem, A. Constantinescu, J. Helms, B. Yver, F. Toti and L. Kessler (2015). "Beta cell membrane remodeling and procoagulant events occur in inflammation-driven insulin impairment: A GLP-1 receptor dependent and independent control." *Journal of cellular and molecular medicine* **20**.
- Gleizes, C., G. Kreutter, M. Abbas, M. Kassem, A. A. Constantinescu, J. Boisramé-Helms, B. Yver, F. Toti and L. Kessler (2016). "β cell membrane remodelling and procoagulant events occur in inflammation-driven insulin impairment: a GLP -1 receptor dependent and independent control." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **20**(2): 231-242.
- Göke, B. (2008). "Islet cell function: α and β cells – partners towards normoglycaemia." *International Journal of Clinical Practice* **62**(s159): 2-7.
- Good, R. B., A. J. Gilbane, S. L. Trinder, C. P. Denton, G. Coghlan, D. J. Abraham and A. M. Holmes (2015). "Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension." *Am J Pathol* **185**(7): 1850-1858.
- Goodman, B. E. (2010). "Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans." *Adv Physiol Educ* **34**(2): 44-53.
- Gori, T., S. Dragoni, G. Di Stolfo and S. Forconi (2007). "Endothelium and haemorheology." *Ann Ist Super Sanita* **43**(2): 124-129.
- Goumans, M. J., A. J. van Zonneveld and P. ten Dijke (2008). "Transforming growth factor beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis?" *Trends Cardiovasc Med* **18**(8): 293-298.
- Gustafson, D., S. Veitch and J. E. Fish (2017). "Extracellular Vesicles as Protagonists of Diabetic Cardiovascular Pathology." *Frontiers in cardiovascular medicine* **4**: 71-71.
- Gustavo, A. M. (2019). "Dulaglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes (REWIND): a double-blind, randomised placebo-controlled trial." *The Lancet*.
- Hædersdal, S., A. Lund, F. K. Knop and T. Vilsbøll (2018). "The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes." *Mayo Clin Proc* **93**(2): 217-239.
- Heiss, C., N. Amabile, A. C. Lee, W. M. Real, S. F. Schick, D. Lao, M. L. Wong, S. Jahn, F. S. Angeli, P. Minasi, M. L. Springer, S. K. Hammond, S. A. Glantz, W. Grossman, J. R. Balmes and Y. Yeghiazarians (2008). "Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production." *J Am Coll Cardiol* **51**(18): 1760-1771.
- Henderson, J. R. and M. C. Moss (1985). "A morphometric study of the endocrine and exocrine capillaries of the pancreas." *Q J Exp Physiol* **70**(3): 347-356.
- Henderson, J. R. and M. C. Moss (1985). "A MORPHOMETRIC STUDY OF THE ENDOCRINE AND EXOCRINE CAPILLARIES OF THE PANCREAS." *Quarterly Journal of Experimental Physiology* **70**(3): 347-356.
- Herrera, M. B., V. Fonsato, S. Gatti, M. C. Deregibus, A. Sordi, D. Cantarella, R. Calogero, B. Bussolati, C. Tetta and G. Camussi (2010). "Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats." *Journal of cellular and molecular medicine* **14**(6B): 1605-1618.
- Hinnen, D. (2017). "Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonists for Type 2 Diabetes." *Diabetes Spectrum* **30**(3): 202-210.

- Hirsch, I. B. (2009). "Clinical review: Realistic expectations and practical use of continuous glucose monitoring for the endocrinologist." *J Clin Endocrinol Metab* **94**(7): 2232-2238.
- Holman, R. R., M. A. Bethel, R. J. Mentz, V. P. Thompson, Y. Lohknygina, J. B. Buse, J. C. Chan, J. Choi, S. M. Gustavson, N. Iqbal, A. P. Maggioni, S. P. Marso, P. Öhman, N. J. Pagidipati, N. Poulter, A. Ramachandran, B. Zinman and A. F. Hernandez (2017). "Effects of Once-Weekly Exenatide on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes." *N Engl J Med* **377**(13): 1228-1239.
- Holst, J. J., C. Orskov, O. V. Nielsen and T. W. Schwartz (1987). "Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut." *FEBS Lett* **211**(2): 169-174.
- Hurst, L. A., B. J. Dunmore, L. Long, A. Crosby, R. Al-Lamki, J. Deighton, M. Southwood, X. Yang, M. Z. Nikolic, B. Herrera, G. J. Inman, J. R. Bradley, A. A. Rana, P. D. Upton and N. W. Morrell (2017). "TNF $\alpha$  drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering NOTCH signalling." *Nature Communications* **8**(1): 14079.
- Husain, M., A. L. Birkenfeld, M. Donsmark, K. Dungan, F. G. Eliaschewitz, D. R. Franco, O. K. Jeppesen, I. Lingvay, O. Mosenzon, S. D. Pedersen, C. J. Tack, M. Thomsen, T. Vilsbøll, M. L. Warren and S. C. Bain (2019). "Oral Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes." *N Engl J Med* **381**(9): 841-851.
- In't Veld, P. and M. Marichal (2010). "Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans." *Adv Exp Med Biol* **654**: 1-19.
- Ionescu-Tirgoviste, C., P. A. Gagniuc, E. Gubceac, L. Mardare, I. Popescu, S. Dima and M. Militaru (2015). "A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas." *Scientific Reports* **5**(1): 14634.
- Itoh, T., M. Takita, J. Sorelle, M. Shimoda, K. Sugimoto, D. Chujo, H. Qin, B. Naziruddin, M. Levy and S. Matsumoto (2012). "Correlation of Released HMGB1 Levels With the Degree of Islet Damage in Mice and Humans and With the Outcomes of Islet Transplantation in Mice." *Cell transplantation* **21**.
- Iwanaga, Y., D. E. Sutherland, J. V. Harmon and K. K. Papas (2008). "Pancreas preservation for pancreas and islet transplantation." *Current opinion in organ transplantation* **13**(4): 445-451.
- Jabs, N., I. Franklin, M. B. Brenner, J. Gromada, N. Ferrara, C. B. Wollheim and E. Lammert (2008). "Reduced insulin secretion and content in VEGF-a deficient mouse pancreatic islets." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **116 Suppl 1**: S46-49.
- Jansen, F., G. Nickenig and N. Werner (2017). "Extracellular Vesicles in Cardiovascular Disease: Potential Applications in Diagnosis, Prognosis, and Epidemiology." *Circulation Research* **120**.
- Jitrapakdee, S., A. Wutthisathapornchai, J. C. Wallace and M. J. Macdonald (2010). "Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling." *Diabetologia* **53**(6): 1019-1032.
- Johansson, H., M. Goto, A. Siegbahn, G. Elgue, O. Korsgren and B. Nilsson (2006). "Low Molecular Weight Dextran Sulfate: A Strong Candidate Drug to Block IBMIR in Clinical Islet Transplantation." *American Journal of Transplantation* **6**(2): 305-312.
- Johansson, U., I. Rasmusson, S. P. Niclou, N. Forslund, L. Gustavsson, B. Nilsson, O. Korsgren and P. U. Magnusson (2008). "Formation of composite endothelial cell-mesenchymal stem cell islets: a novel approach to promote islet revascularization." *Diabetes* **57**(9): 2393-2401.
- Jung, K. H., K. Chu, S. T. Lee, J. J. Bahn, J. H. Kim, M. Kim, S. K. Lee and J. K. Roh (2011). "Risk of macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus: endothelial microparticle profiles." *Cerebrovasc Dis* **31**(5): 485-493.
- Kanak, M. A., M. Takita, F. Kunnathodi, M. C. Lawrence, M. F. Levy and B. Naziruddin (2014). "Inflammatory Response in Islet Transplantation." *International Journal of Endocrinology* **2014**: 451035.
- Kanasaki, K., S. Shi, M. Kanasaki, J. He, T. Nagai, Y. Nakamura, Y. Ishigaki, M. Kitada, S. P. Srivastava and D. Koya (2014). "Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen." *Diabetes* **63**(6): 2120-2131.
- Kanasaki, K., S. Shi, M. Kanasaki, J. He, T. Nagai, Y. Nakamura, Y. Ishigaki, M. Kitada, S. P. Srivastava and D. Koya (2014). "Linagliptin-Mediated DPP-4 Inhibition Ameliorates Kidney Fibrosis in Streptozotocin-

- Induced Diabetic Mice by Inhibiting Endothelial-to-Mesenchymal Transition in a Therapeutic Regimen." *Diabetes* **63**(6): 2120-2131.
- Kayton, N. S., G. Poffenberger, J. Henske, C. Dai, C. Thompson, R. Aramandla, A. Shostak, W. Nicholson, M. Brissova, W. S. Bush and A. C. Powers (2015). "Human islet preparations distributed for research exhibit a variety of insulin-secretory profiles." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **308**(7): E592-E602.
- Kendall, R. T. and C. A. Feghali-Bostwick (2014). "Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators." *Front Pharmacol* **5**: 123.
- Kitao, A., Y. Sato, S. Sawada-Kitamura, K. Harada, M. Sasaki, H. Morikawa, S. Shiomi, M. Honda, O. Matsui and Y. Nakanuma (2009). "Endothelial to mesenchymal transition via transforming growth factor-beta1/Smad activation is associated with portal venous stenosis in idiopathic portal hypertension." *Am J Pathol* **175**(2): 616-626.
- Knudsen, L. B. and J. Lau (2019). "The Discovery and Development of Liraglutide and Semaglutide." *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**: 155.
- Kokudo, T., Y. Suzuki, Y. Yoshimatsu, T. Yamazaki, T. Watabe and K. Miyazono (2008). "Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells." *J Cell Sci* **121**(Pt 20): 3317-3324.
- Kolterman, O. G., J. B. Buse, M. S. Fineman, E. Gaines, S. Heintz, T. A. Bicsak, K. Taylor, D. Kim, M. Aisporna, Y. Wang and A. D. Baron (2003). "Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(7): 3082-3089.
- Kolterman, O. G., D. D. Kim, L. Shen, J. A. Ruggles, L. L. Nielsen, M. S. Fineman and A. D. Baron (2005). "Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of exenatide in patients with type 2 diabetes mellitus." *Am J Health Syst Pharm* **62**(2): 173-181.
- Komatsu, H., F. Kandeel and Y. Mullen (2018). "Impact of Oxygen on Pancreatic Islet Survival." *Pancreas* **47**(5): 533-543.
- Krasner, N. M., Y. Ido, N. B. Ruderman and J. M. Cacicedo (2014). "Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Analog Liraglutide Inhibits Endothelial Cell Inflammation through a Calcium and AMPK Dependent Mechanism." *PLoS ONE* **9**(5): e97554.
- Kreutter, G., A. El Habhab, M. Kassem, S. Hassan, B. Yver, L. Amoura, G. ubeaud-sequier, F. Toti and L. Kessler (2017). "Étude de l'effet du dulaglutide, analogue du GLP1, sur la protection des cellules bêta dans un modèle de stress inflammatoire mimant la greffe d'îlots pancréatiques." *Diabetes & Metabolism* **43**: A43.
- Krug, E. L., R. B. Runyan and R. R. Markwald (1985). "Protein extracts from early embryonic hearts initiate cardiac endothelial cytodifferentiation." *Developmental Biology* **112**(2): 414-426.
- Lablanche, S., M. C. Vantuyghem, L. Kessler, A. Wojtuszczyz, S. Borot, C. Thivolet, S. Girerd, D. Bosco, J. L. Bosson, C. Colin, R. Tetaz, S. Logerot, J. Kerr-Conte, E. Renard, A. Penfornis, E. Morelon, F. Buron, K. Skaare, G. Grguric, C. Camillo-Brault, H. Egelhofer, K. Benomar, L. Badet, T. Berney, F. Pattou and P. Y. Benhamou (2018). "Islet transplantation versus insulin therapy in patients with type 1 diabetes with severe hypoglycaemia or poorly controlled glycaemia after kidney transplantation (TRIMECO): a multicentre, randomised controlled trial." *Lancet Diabetes Endocrinol* **6**(7): 527-537.
- Lacroix, R., C. Judicone, P. Poncelet, S. Robert, L. Arnaud, J. Sampol and F. Dignat-George (2012). "Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol." *J Thromb Haemost* **10**(3): 437-446.
- Lafferty, R. A., F. P. M. O'Harte, N. Irwin, V. A. Gault and P. R. Flatt (2021). "Proglucagon-Derived Peptides as Therapeutics." *Front Endocrinol (Lausanne)* **12**: 689678.
- Lai, Y., D. Schneider, A. Kidszun, I. Hauck-Schmalenberger, G. Breier, D. Brandhorst, H. Brandhorst, M. Iken, M. D. Brendel, R. G. Bretzel and T. Linn (2005). "Vascular endothelial growth factor increases functional beta-cell mass by improvement of angiogenesis of isolated human and murine pancreatic islets." *Transplantation* **79**(11): 1530-1536.
- Laubichler, M., W. Aird and J. Maienschein (2007). "The Endothelium in History." *Endothelial biomedicine*, 5-22 (2007).

- Lee, H. T., J. G. Lee, M. Na and E. P. Kay (2004). "FGF-2 induced by interleukin-1 beta through the action of phosphatidylinositol 3-kinase mediates endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells." *J Biol Chem* **279**(31): 32325-32332.
- Lee, J. G., M. K. Ko and E. P. Kay (2012). "Endothelial mesenchymal transformation mediated by IL-1 $\beta$ -induced FGF-2 in corneal endothelial cells." *Exp Eye Res* **95**(1): 35-39.
- Lee, S. and D. Y. Lee (2017). "Glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes." *Ann Pediatr Endocrinol Metab* **22**(1): 15-26.
- Lee, S. B. and R. Kalluri (2010). "Mechanistic connection between inflammation and fibrosis." *Kidney Int Suppl*(119): S22-26.
- Lee, Y.-S. and H.-S. Jun (2016). "Anti-Inflammatory Effects of GLP-1-Based Therapies beyond Glucose Control." *Mediators of inflammation* **2016**: 3094642-3094642.
- Lee, Y., M. Ravazzola, B. H. Park, Y. K. Bashmakov, L. Orci and R. H. Unger (2007). "Metabolic Mechanisms of Failure of Intraportally Transplanted Pancreatic  $\beta$ -Cells in Rats: Role of Lipotoxicity and Prevention by Leptin." *Diabetes* **56**(9): 2295-2301.
- Letsiou, E. and N. Bauer (2018). "Endothelial Extracellular Vesicles in Pulmonary Function and Disease." *Current topics in membranes* **82**: 197-256.
- Li, J. and J. F. Bertram (2010). "Review Article: Review: Endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis." *Nephrology* **15**(5): 507-512.
- Li, J., X. Qu and J. F. Bertram (2009). "Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice." *The American journal of pathology* **175**(4): 1380-1388.
- Li, M., L. J. Song and X. Y. Qin (2014). "Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes." *J Cell Mol Med* **18**(5): 749-758.
- Li, X., Q. Meng and L. Zhang (2018). "The Fate of Allogeneic Pancreatic Islets following Intraportal Transplantation: Challenges and Solutions." *Journal of Immunology Research* **2018**: 1-13.
- Li, X., Q. Meng and L. Zhang (2018). "The Fate of Allogeneic Pancreatic Islets following Intraportal Transplantation: Challenges and Solutions." *J Immunol Res* **2018**: 2424586.
- Li, X., Q. Meng and L. Zhang (2018). "The Fate of Allogeneic Pancreatic Islets following Intraportal Transplantation: Challenges and Solutions." *Journal of immunology research* **2018**: 2424586-2424586.
- Li, Y. K., D. X. Ma, Z. M. Wang, X. F. Hu, S. L. Li, H. Z. Tian, M. J. Wang, Y. W. Shu and J. Yang (2018). "The glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide attenuates renal fibrosis." *Pharmacol Res* **131**: 102-111.
- Lin, Q. Q., J. Zhao, C. G. Zheng and J. Chun (2018). "Roles of notch signaling pathway and endothelial-mesenchymal transition in vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **22**(19): 6485-6491.
- Liuwantara, D., Y. V. Chew, E. J. Favaloro, J. M. Hawkes, H. L. Burns, P. J. O'Connell and W. J. Hawthorne (2016). "Characterizing the Mechanistic Pathways of the Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction in Xenogeneic Neonatal Islet Cell Transplantation." *Transplant Direct* **2**(6): e77.
- Ma, J., G. Sanchez-Duffhues, M.-J. Goumans and P. ten Dijke (2020). "TGF- $\beta$ -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**(260).
- MacEwan, D. J. (2002). "TNF ligands and receptors – a matter of life and death." *British Journal of Pharmacology* **135**(4): 855-875.
- Mahler, G. J., E. J. Farrar and J. T. Butcher (2013). "Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**(1): 121-130.
- Maleszewska, M., R. A. Gjaltema, G. Krenning and M. C. Harmsen (2015). "Enhancer of zeste homolog-2 (EZH2) methyltransferase regulates transgelin/smooth muscle-22 $\alpha$  expression in endothelial cells in response to interleukin-1 $\beta$  and transforming growth factor- $\beta$ 2." *Cell Signal* **27**(8): 1589-1596.
- Maleszewska, M., J. R. Moonen, N. Huijckman, B. van de Sluis, G. Krenning and M. C. Harmsen (2013). "IL-1 $\beta$  and TGF $\beta$ 2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NF $\kappa$ B-dependent manner." *Immunobiology* **218**(4): 443-454.

- Man, S., G. Sanchez Duffhues, P. Ten Dijke and D. Baker (2019). "The therapeutic potential of targeting the endothelial-to-mesenchymal transition." *Angiogenesis* **22**(1): 3-13.
- Mannering, S. I., S. H. Pang, N. A. Williamson, G. Naselli, E. C. Reynolds, N. M. O'Brien-Simpson, A. W. Purcell and L. C. Harrison (2009). "The A-chain of insulin is a hot-spot for CD4+ T cell epitopes in human type 1 diabetes." *Clin Exp Immunol* **156**(2): 226-231.
- Markiewicz, M., E. Richard, N. Marks and A. Ludwicka-Bradley (2013). "Impact of endothelial microparticles on coagulation, inflammation, and angiogenesis in age-related vascular diseases." *J Aging Res* **2013**: 734509.
- Marso, S. P., S. C. Bain, A. Consoli, F. G. Eliaschewitz, E. Jódar, L. A. Leiter, I. Lingvay, J. Rosenstock, J. Seufert, M. L. Warren, V. Woo, O. Hansen, A. G. Holst, J. Pettersson and T. Vilsbøll (2016). "Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes." *New England Journal of Medicine* **375**(19): 1834-1844.
- Marzorati, S., R. Melzi, A. Citro, E. Cantarelli, A. Mercalli, M. Scavini and L. Piemonti (2014). "Engraftment versus immunosuppression: cost-benefit analysis of immunosuppression after intrahepatic murine islet transplantation." *Transplantation* **97**(10): 1019-1026.
- Maugeri, N., A. Capobianco, P. Rovere-Querini, G. A. Ramirez, E. Tombetti, P. D. Valle, A. Monno, V. D'Alberti, A. M. Gasparri, S. Franchini, A. D'Angelo, M. E. Bianchi and A. A. Manfredi (2018). "Platelet microparticles sustain autophagy-associated activation of neutrophils in systemic sclerosis." *Sci Transl Med* **10**(451).
- McCarthy, E. M., F. L. Wilkinson, B. Parker and M. Y. Alexander (2016). "Endothelial microparticles: Pathogenic or passive players in endothelial dysfunction in autoimmune rheumatic diseases?" *Vascul Pharmacol* **86**: 71-76.
- McGuire, D. K., N. Marx, O. E. Johansen, S. E. Inzucchi, J. Rosenstock and J. T. George (2019). "FDA guidance on antihyperglycemic therapies for type 2 diabetes: One decade later." *Diabetes Obes Metab* **21**(5): 1073-1078.
- Medici, D. and R. Kalluri (2012). "Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype." *Seminars in Cancer Biology* **22**(5-6): 379-384.
- Meier, J. J., M. A. Nauck, W. E. Schmidt and B. Gallwitz (2002). "Gastric inhibitory polypeptide: the neglected incretin revisited." *Regul Pept* **107**(1-3): 1-13.
- Meza, C. A., J. D. La Favor, D. H. Kim and R. C. Hickner (2019). "Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS?" *Int J Mol Sci* **20**(15).
- Mezentsev, A., R. M. Merks, E. O'Riordan, J. Chen, N. Mendeleev, M. S. Goligorsky and S. V. Brodsky (2005). "Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**(3): H1106-1114.
- Micallef, S. J., X. Li, J. V. Schiesser, C. E. Hirst, Q. C. Yu, S. M. Lim, M. C. Nostro, D. A. Elliott, F. Sarangi, L. C. Harrison, G. Keller, A. G. Elefanty and E. G. Stanley (2012). "INS(GFP/w) human embryonic stem cells facilitate isolation of in vitro derived insulin-producing cells." *Diabetologia* **55**(3): 694-706.
- Miller, R., V. Cirulli, G. R. Diaferia, S. Ninniri, G. Hardiman, B. E. Torbett, R. Benezra and L. Crisa (2008). "Switching-on survival and repair response programs in islet transplants by bone marrow-derived vasculogenic cells." *Diabetes* **57**(9): 2402-2412.
- Mina, S. G., W. Wang, Q. Cao, P. Huang, B. T. Murray and G. J. Mahler (2016). "Shear stress magnitude and transforming growth factor- $\beta$ 1 regulate endothelial to mesenchymal transformation in a three-dimensional culture microfluidic device." *RSC Advances* **6**(88): 85457-85467.
- Mittal, S., P. Johnson and P. Friend (2014). "Pancreas transplantation: solid organ and islet." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **4**(4): a015610-a015610.
- Miyoshi, H., K. Umeshita, M. Sakon, S. Imajoh-Ohmi, K. Fujitani, M. Gotoh, E. Oiki, J. Kambayashi and M. Monden (1996). "Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury." *Gastroenterology* **110**(6): 1897-1904.
- Mobarrez, F., L. Antoniewicz, J. A. Bosson, J. Kuhl, D. S. Pisetsky and M. Lundbäck (2014). "The effects of smoking on levels of endothelial progenitor cells and microparticles in the blood of healthy volunteers." *PloS one* **9**(2): e90314-e90314.

- Modur, V., G. A. Zimmerman, S. M. Prescott and T. M. McIntyre (1996). "Endothelial cell inflammatory responses to tumor necrosis factor alpha. Ceramide-dependent and -independent mitogen-activated protein kinase cascades." *J Biol Chem* **271**(22): 13094-13102.
- Mohan, A., S. Agarwal, M. Clauss, N. S. Britt and N. K. Dhillon (2020). "Extracellular vesicles: novel communicators in lung diseases." *Respiratory Research* **21**(1).
- Montesano, R., A. Mossaz, J. E. Ryser, L. Orci and P. Vassalli (1984). "Leukocyte interleukins induce cultured endothelial cells to produce a highly organized, glycosaminoglycan-rich pericellular matrix." *J Cell Biol* **99**(5): 1706-1715.
- Monti, P., D. Vignali and L. Piemonti (2015). "Monitoring Inflammation, Humoral and Cell-mediated Immunity in Pancreas and Islet Transplants." *Curr Diabetes Rev* **11**(3): 135-143.
- Montorfano, I., A. Becerra, R. Cerro, C. Echeverría, E. Sáez, M. G. Morales, R. Fernández, C. Cabello-Verrugio and F. Simon (2014). "Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2-dependent pathway." *Laboratory Investigation* **94**(10): 1068-1082.
- Moore, F., N. Naamane, M. L. Colli, T. Bouckenooghe, F. Ortis, E. N. Gurzov, M. Igoillo-Esteve, C. Mathieu, G. Bontempi, T. Thykjaer, T. F. Ørntoft and D. L. Eizirik (2011). "STAT1 is a master regulator of pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis and islet inflammation." *The Journal of biological chemistry* **286**(2): 929-941.
- Morel, O., P. Ohlmann, E. Epailly, B. Bakouboula, F. Zobairi, L. Jesel, N. Meyer, M. P. Chenard, J. M. Freyssinet, P. Bareiss, J. P. Mazzucotelli and F. Toti (2008). "Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection." *J Heart Lung Transplant* **27**(1): 38-45.
- Morel, O., P. Ohlmann, N. Morel, L. Jesel, P. Bareiss, J. M. Freyssinet and F. Toti (2005). "[Microparticles and cardiovascular disease]." *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* **98**(3): 226-235.
- Morel, O., F. Toti, B. Hugel, B. Bakouboula, L. Camoin-Jau, F. Dignat-George and J. M. Freyssinet (2006). "Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(12): 2594-2604.
- Morgul, M. H., K. Splith, C. Leonhardt, N. Raschzok, A. Reutzel-Selke, R. B. Schmuck, A. Andreou, G. Atanasov, C. Benzing, F. Krenzien, H. M. Hau, P. Felgendreff, S. Klunk, J. Pratschke, I. M. Sauer and M. Schmelzle (2018). "The value of microparticles in detecting acute rejection episodes after liver transplantation." *Biomarkers* **23**(1): 25-32.
- Mosnier, L. O., B. V. Zlokovic and J. H. Griffin (2007). "The cytoprotective protein C pathway." *Blood* **109**(8): 3161-3172.
- Mühlemann, M. (2018). Intestinal stem cells and the Na<sup>(+)</sup>-D-Glucose Transporter SGLT1: potential targets regarding future therapeutic strategies for diabetes.
- Müller, T. D., B. Finan, S. R. Bloom, D. D'Alessio, D. J. Drucker, P. R. Flatt, A. Fritsche, F. Gribble, H. J. Grill, J. F. Habener, J. J. Holst, W. Langhans, J. J. Meier, M. A. Nauck, D. Perez-Tilve, A. Pocai, F. Reimann, D. A. Sandoval, T. W. Schwartz, R. J. Seeley, K. Stemmer, M. Tang-Christensen, S. C. Woods, R. D. DiMarchi and M. H. Tschöp (2019). "Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)." *Mol Metab* **30**: 72-130.
- Müller, T. D., R. Nogueiras, M. L. Andermann, Z. B. Andrews, S. D. Anker, J. Argente, R. L. Batterham, S. C. Benoit, C. Y. Bowers, F. Broglio, F. F. Casanueva, D. D'Alessio, I. Depoortere, A. Geliebter, E. Ghigo, P. A. Cole, M. Cowley, D. E. Cummings, A. Dagher, S. Diano, S. L. Dickson, C. Diéguez, R. Granata, H. J. Grill, K. Grove, K. M. Habegger, K. Heppner, M. L. Heiman, L. Holsen, B. Holst, A. Inui, J. O. Jansson, H. Kirchner, M. Korbonits, B. Laferrère, C. W. LeRoux, M. Lopez, S. Morin, M. Nakazato, R. Nass, D. Perez-Tilve, P. T. Pfluger, T. W. Schwartz, R. J. Seeley, M. Sleeman, Y. Sun, L. Sussel, J. Tong, M. O. Thorner, A. J. van der Lely, L. H. van der Ploeg, J. M. Zigman, M. Kojima, K. Kangawa, R. G. Smith, T. Horvath and M. H. Tschöp (2015). "Ghrelin." *Mol Metab* **4**(6): 437-460.
- Nauck, M. A., D. R. Quast, J. Wefers and J. J. Meier (2021). "GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes - state-of-the-art." *Mol Metab* **46**: 101102.
- Naziruddin, B., S. Iwahashi, M. A. Kanak, M. Takita, T. Itoh and M. F. Levy (2014). "Evidence for instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical autologous islet transplantation." *Am J Transplant* **14**(2): 428-437.

- Negi, S., A. Jetha, R. Aikin, C. Hasilo, R. Sladek and S. Paraskevas (2012). "Analysis of beta-cell gene expression reveals inflammatory signaling and evidence of dedifferentiation following human islet isolation and culture." *PLoS One* **7**(1): e30415.
- Nepton, S. (2013). *Beta-Cell Function and Failure*, InTech.
- Nesher, R. and E. Cerasi (2002). "Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose." *Diabetes* **51 Suppl 1**: S53-59.
- Nie, L., O. Lyros, R. Medda, N. Jovanovic, J. L. Schmidt, M. F. Otterson, C. P. Johnson, B. Behmaram, R. Shaker and P. Rafiee (2014). "Endothelial-mesenchymal transition in normal human esophageal endothelial cells cocultured with esophageal adenocarcinoma cells: role of IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ 2." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **307**(9): C859-C877.
- Nilsson, B., K. N. Ekdahl and O. Korsgren (2011). "Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment." *Curr Opin Organ Transplant* **16**(6): 620-626.
- Nissen, S. E. and K. Wolski (2007). "Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes." *New England Journal of Medicine* **356**(24): 2457-2471.
- Nomura, S., N. Inami, A. Shouzu, F. Urase and Y. Maeda (2009). "Correlation and association between plasma platelet-, monocyte- and endothelial cell-derived microparticles in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus." *Platelets* **20**(6): 406-414.
- Nomura, S., Y. Ozaki and Y. Ikeda (2008). "Function and role of microparticles in various clinical settings." *Thrombosis research* **123**: 8-23.
- Nomura, S. and M. Shimizu (2015). "Clinical significance of procoagulant microparticles." *Journal of intensive care* **3**(1): 2-2.
- Nozaki, T., S. Sugiyama, K. Sugamura, K. Ohba, Y. Matsuzawa, M. Konishi, J. Matsubara, E. Akiyama, H. Sumida, K. Matsui, H. Jinnouchi and H. Ogawa (2010). "Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure." *Eur J Heart Fail* **12**(11): 1223-1228.
- Nyqvist, D., M. Köhler, H. Wahlstedt and P. O. Berggren (2005). "Donor islet endothelial cells participate in formation of functional vessels within pancreatic islet grafts." *Diabetes* **54**(8): 2287-2293.
- O'Neil, P. M., A. L. Birkenfeld, B. McGowan, O. Mosenson, S. D. Pedersen, S. Wharton, C. G. Carson, C. H. Jepsen, M. Kabisch and J. P. H. Wilding (2018). "Efficacy and safety of semaglutide compared with liraglutide and placebo for weight loss in patients with obesity: a randomised, double-blind, placebo and active controlled, dose-ranging, phase 2 trial." *Lancet* **392**(10148): 637-649.
- Ogata, N., M. Imaizumi, S. Nomura, A. Shozu, M. Arichi, M. Matsuoka and M. Matsumura (2005). "Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy." *Diabetes Res Clin Pract* **68**(3): 193-201.
- Olack, B. J., C. J. Swanson, K. S. Flavin, D. Phelan, D. C. Brennan, N. H. White, P. E. Lacy, D. W. Scharp, N. Poindexter and T. Mohanakumar (1997). "Sensitization to HLA antigens in islet recipients with failing transplants." *Transplant Proc* **29**(4): 2268-2269.
- Olsson, R., J. Olerud, U. Pettersson and P. O. Carlsson (2011). "Increased Numbers of Low-Oxygenated Pancreatic Islets After Intraportal Islet Transplantation." *Diabetes* **60**(9): 2350-2353.
- Orozco, A. F. and D. E. Lewis (2010). "Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma." *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **77**(6): 502-514.
- Orriols, M., M. C. Gomez-Puerto and P. Ten Dijke (2017). "BMP type II receptor as a therapeutic target in pulmonary arterial hypertension." *Cell Mol Life Sci* **74**(16): 2979-2995.
- Orskov, C., J. J. Holst and O. V. Nielsen (1988). "Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach." *Endocrinology* **123**(4): 2009-2013.
- Papaetis, G. S. (2014). "Incretin-based therapies in prediabetes: Current evidence and future perspectives." *World J Diabetes* **5**(6): 817-834.
- Park, K.-H. and W. J. Park (2015). "Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches." *Journal of Korean medical science* **30**(9): 1213-1225.
- Parker, B., A. Al-Husain, P. Pemberton, A. P. Yates, P. Ho, R. Gorodkin, L. S. Teh, M. Y. Alexander and I. N. Bruce (2014). "Suppression of inflammation reduces endothelial microparticles in active systemic lupus erythematosus." *Ann Rheum Dis* **73**(6): 1144-1150.

- Patz, S., C. Trattnig, G. Grünbacher, B. Ebner, C. Güllly, A. Novak, B. Rinner, G. Leitinger, M. Absenger, O. A. Tomescu, G. G. Thallinger, U. Fasching, S. Wissa, J. Archelos-Garcia and U. Schäfer (2013). "More than cell dust: microparticles isolated from cerebrospinal fluid of brain injured patients are messengers carrying mRNAs, miRNAs, and proteins." J Neurotrauma **30**(14): 1232-1242.
- Pegah, A., E. Abbasi-Oshaghi, I. Khodadadi, F. Mirzaei and H. Tayebinaei (2021). "Probiotic and resveratrol normalize GLP-1 levels and oxidative stress in the intestine of diabetic rats." Metabol Open **10**: 100093.
- Pepper, A. R., B. Gala-Lopez, R. Pawlick, S. Merani, T. Kin and A. M. Shapiro (2015). "A prevascularized subcutaneous device-less site for islet and cellular transplantation." Nat Biotechnol **33**(5): 518-523.
- Pepper, A. R., B. Gala-Lopez, O. Ziff and A. J. Shapiro (2013). "Current status of clinical islet transplantation." World Journal of Transplantation **3**(4): 48.
- Pepper, A. R., B. Gala-Lopez, O. Ziff and A. M. Shapiro (2013). "Revascularization of transplanted pancreatic islets and role of the transplantation site." Clin Dev Immunol **2013**: 352315.
- Pérez, L., N. Muñoz-Durango, C. A. Riedel, C. Echeverría, A. M. Kalergis, C. Cabello-Verrugio and F. Simon (2017). "Endothelial-to-mesenchymal transition: Cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions." Cytokine Growth Factor Rev **33**: 41-54.
- Peterson, D. B., T. Sander, S. Kaul, B. T. Wakim, B. Halligan, S. Twigger, K. A. Pritchard, Jr., K. T. Oldham and J. S. Ou (2008). "Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles." Proteomics **8**(12): 2430-2446.
- Piccin, A., W. G. Murphy and O. P. Smith (2007). "Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications." Blood Rev **21**(3): 157-171.
- Piemonti, L., M. J. Everly, P. Maffi, M. Scavini, F. Poli, R. Nano, M. Cardillo, R. Melzi, A. Mercalli, V. Sordi, V. Lampasona, A. Espadas de Arias, M. Scalamogna, E. Bosi, E. Bonifacio, A. Secchi and P. I. Terasaki (2013). "Alloantibody and autoantibody monitoring predicts islet transplantation outcome in human type 1 diabetes." Diabetes **62**(5): 1656-1664.
- Piemonti, L., M. J. Everly, P. Maffi, M. Scavini, F. Poli, R. Nano, M. Cardillo, R. Melzi, A. Mercalli, V. Sordi, V. Lampasona, A. Espadas de Arias, M. Scalamogna, E. Bosi, E. Bonifacio, A. Secchi and P. I. Terasaki (2013). "Alloantibody and autoantibody monitoring predicts islet transplantation outcome in human type 1 diabetes." Diabetes **62**(5): 1656-1664.
- Piera-Velazquez, S. and S. A. Jimenez (2019). "Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases." Physiol Rev **99**(2): 1281-1324.
- Piera-Velazquez, S., Z. Li and S. A. Jimenez (2011). "Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders." The American journal of pathology **179**(3): 1074-1080.
- Piera-Velazquez, S., F. A. Mendoza and S. A. Jimenez (2016). "Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases." J Clin Med **5**(4).
- Pieterse, E., N. Rother, M. Garsen, J. M. Hofstra, S. C. Satchell, M. Hoffmann, M. A. Loeven, H. K. Knaapen, O. W. H. van der Heijden, J. H. M. Berden, L. B. Hilbrands and J. van der Vlag (2017). "Neutrophil Extracellular Traps Drive Endothelial-to-Mesenchymal Transition." Arterioscler Thromb Vasc Biol **37**(7): 1371-1379.
- Pihusch, V., A. Rank, R. Steber, M. Pihusch, R. Pihusch, B. Toth, E. Hiller and H. J. Kolb (2006). "Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients." Transplantation **81**(10): 1405-1409.
- Pisetsky, D. S., A. J. Ullal, J. Gauley and T. C. Ning (2012). "Microparticles as mediators and biomarkers of rheumatic disease." Rheumatology (Oxford) **51**(10): 1737-1746.
- Prasad-Reddy, L. and D. Isaacs (2015). "A clinical review of GLP-1 receptor agonists: efficacy and safety in diabetes and beyond." Drugs Context **4**: 212283.
- Qamri, Z., R. Pelletier, J. Foster, S. Kumar, H. Momani, K. Ware, J. Von Visger, A. Satoskar, T. Nadasdy and S. V. Brodsky (2014). "Early posttransplant changes in circulating endothelial microparticles in patients with kidney transplantation." Transpl Immunol **31**(2): 60-64.
- Qi, M., K. Kinzer, K. K. Danielson, J. Martellotto, B. Barbaro, Y. Wang, J. T. Bui, R. C. Gaba, G. Knuttinen, R. Garcia-Roca, I. Tzvetanov, A. Heitman, M. Davis, J. J. McGarrigle, E. Benedetti and J. Oberholzer



- (2014). "Five-year follow-up of patients with type 1 diabetes transplanted with allogeneic islets: the UIC experience." *Acta Diabetol* **51**(5): 833-843.
- Qiao, L., T. Nishimura, L. Shi, D. Sessions, A. Thrasher, J. R. Trudell, G. J. Berry, R. G. Pearl and P. N. Kao (2014). "Endothelial fate mapping in mice with pulmonary hypertension." *Circulation* **129**(6): 692-703.
- Quaranta, P., S. Antonini, S. Spiga, B. Mazzanti, M. Curcio, G. Mulas, M. Diana, P. Marzola, F. Mosca and B. Longoni (2014). "Co-transplantation of endothelial progenitor cells and pancreatic islets to induce long-lasting normoglycemia in streptozotocin-treated diabetic rats." *PLoS One* **9**(4): e94783.
- Rajendran, P., T. Rengarajan, J. Thangavel, Y. Nishigaki, D. Sakthisekaran, G. Sethi and I. Nishigaki (2013). "The vascular endothelium and human diseases." *Int J Biol Sci* **9**(10): 1057-1069.
- Ramírez-Domínguez, M. (2016). "Historical Background of Pancreatic Islet Isolation." *Adv Exp Med Biol* **938**: 1-9.
- Ranchoux, B., F. Antigny, C. Rucker-Martin, A. Hautefort, C. Péchoux, H. J. Bogaard, P. Dorfmüller, S. Remy, F. Lecerf, S. Planté, S. Chat, E. Fadel, A. Houssaini, I. Anegon, S. Adnot, G. Simonneau, M. Humbert, S. Cohen-Kaminsky and F. Perros (2015). "Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension." *Circulation* **131**(11): 1006-1018.
- Rangel, E. B. (2014). "Tacrolimus in pancreas transplant: a focus on toxicity, diabetogenic effect and drug-drug interactions." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **10**(11): 1585-1605.
- Reffet, S. and C. Thivolet (2006). "Immunology of pancreatic islet transplantation." *Diabetes Metab* **32**(5 Pt 2): 523-526.
- Remedi, M. S., J. C. Koster, B. L. Patton and C. G. Nichols (2005). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel signaling in glucokinase-deficient diabetes." *Diabetes* **54**(10): 2925-2931.
- Ribera, J., M. Pauta, P. Melgar-Lesmes, B. Córdoba, A. Bosch, M. Calvo, D. Rodrigo-Torres, P. Sancho-Bru, A. Mira, W. Jiménez and M. Morales-Ruiz (2017). "A small population of liver endothelial cells undergoes endothelial-to-mesenchymal transition in response to chronic liver injury." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **313**(5): G492-g504.
- Rieder, F., S. P. Kessler, G. A. West, S. Bhilocha, C. De La Motte, T. M. Sadler, B. Gopalan, E. Stylianou and C. Fiocchi (2011). "Inflammation-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition." *The American Journal of Pathology* **179**(5): 2660-2673.
- Rieder, F., S. P. Kessler, G. A. West, S. Bhilocha, C. de la Motte, T. M. Sadler, B. Gopalan, E. Stylianou and C. Fiocchi (2011). "Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis." *Am J Pathol* **179**(5): 2660-2673.
- Rivas-Carrillo, J. D., A. Soto-Gutierrez, N. Navarro-Alvarez, H. Noguchi, T. Okitsu, Y. Chen, T. Yuasa, K. Tanaka, M. Narushima, A. Miki, H. Misawa, Y. Tabata, H. S. Jun, S. Matsumoto, I. J. Fox, N. Tanaka and N. Kobayashi (2007). "Cell-permeable pentapeptide V5 inhibits apoptosis and enhances insulin secretion, allowing experimental single-donor islet transplantation in mice." *Diabetes* **56**(5): 1259-1267.
- Röder, P. V., B. Wu, Y. Liu and W. Han (2016). "Pancreatic regulation of glucose homeostasis." *Exp Mol Med* **48**(3): e219.
- Rodriguez-Díaz, R., M. H. Abdulreda, A. L. Formoso, I. Gans, C. Ricordi, P. O. Berggren and A. Caicedo (2011). "Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas." *Cell Metab* **14**(1): 45-54.
- Rolandsson, O., C. S. Hampe, S. J. Sharp, E. Ardanaz, H. Boeing, G. Fagherazzi, F. R. Mancini, P. M. Nilsson, K. Overvad, M.-D. Chirlaque, M. Dorransoro, M. J. Gunter, R. Kaaks, T. J. Key, K.-T. Khaw, V. Krogh, T. Kühn, D. Palli, S. Panico, C. Sacerdote, M.-J. Sánchez, G. Severi, A. M. W. Spijkerman, R. Tumino, Y. T. van der Schouw, E. Riboli, N. G. Forouhi, C. Langenberg and N. J. Wareham (2020). "Autoimmunity plays a role in the onset of diabetes after 40 years of age." *Diabetologia* **63**(2): 266-277.
- Romero, L. I., D. N. Zhang, G. S. Herron and M. A. Karasek (1997). "Interleukin-1 induces major phenotypic changes in human skin microvascular endothelial cells." *J Cell Physiol* **173**(1): 84-92.
- Roy, A., J. Sahoo, S. Kamalanathan, D. Naik, P. Mohan and B. Pottakkat (2020). "Islet cell dysfunction in patients with chronic pancreatitis." *World J Diabetes* **11**(7): 280-292.

- Ryu, J. H. and S. J. Kim (2011). "Clopidogrel effectively suppresses endothelial microparticle generation induced by indoxyl sulfate via inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway." Blood Purif **32**(3): 186-194.
- Sabatier, F., P. Darmon, B. Hugel, V. Combes, M. Sanmarco, J.-G. Velut, D. Arnoux, P. Charpiot, J.-M. Freyssinet, C. Oliver, J. Sampol and F. Dignat-George (2002). "Type 1 And Type 2 Diabetic Patients Display Different Patterns of Cellular Microparticles." Diabetes **51**(9): 2840-2845.
- Sánchez-Duffhues, G., A. García de Vinuesa, V. van de Pol, M. E. Geerts, M. R. de Vries, S. G. Janson, H. van Dam, J. H. Lindeman, M.-J. Goumans and P. Ten Dijke (2019). "Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMPR2." The Journal of pathology **247**(3): 333-346.
- Santiago, F. (2019). Perioperative Glucose Management to Reduce Surgical Site Infections: Clinical Practice Guideline. Glucose Management.
- Sapet, C., S. Simoncini, B. Lloriod, D. Puthier, J. Sampol, C. Nguyen, F. Dignat-George and F. Anfosso (2006). "Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2." Blood **108**(6): 1868-1876.
- Saunders, A., L. H. Messer and G. P. Forlenza (2019). "MiniMed 670G hybrid closed loop artificial pancreas system for the treatment of type 1 diabetes mellitus: overview of its safety and efficacy." Expert Review of Medical Devices **16**(10): 845-853.
- Schuppan, D., M. Ruehl, R. Somasundaram and E. G. Hahn (2001). "Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis." Semin Liver Dis **21**(3): 351-372.
- Scrocchi, L. A., T. J. Brown, N. McClusky, P. L. Brubaker, A. B. Auerbach, A. L. Joyner and D. J. Drucker (1996). "Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene." Nat Med **2**(11): 1254-1258.
- Serebruany, V. L., A. I. Malinin, A. N. Pokov and D. F. Hanley (2008). "Antiplatelet profiles of the fixed-dose combination of extended-release dipyridamole and low-dose aspirin compared with clopidogrel with or without aspirin in patients with type 2 diabetes and a history of transient ischemic attack: a randomized, single-blind, 30-day trial." Clin Ther **30**(2): 249-259.
- Shantsila, E., B. J. Wrigley, A. D. Blann, P. S. Gill and G. Y. Lip (2012). "A contemporary view on endothelial function in heart failure." Eur J Heart Fail **14**(8): 873-881.
- Shapiro, A. M. (2011). "State of the art of clinical islet transplantation and novel protocols of immunosuppression." Curr Diab Rep **11**(5): 345-354.
- Shapiro, A. M., J. R. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbutt, E. Toth, G. L. Warnock, N. M. Kneteman and R. V. Rajotte (2000). "Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen." N Engl J Med **343**(4): 230-238.
- Shapiro, A. M., M. Pokrywczynska and C. Ricordi (2017). "Clinical pancreatic islet transplantation." Nat Rev Endocrinol **13**(5): 268-277.
- Shapiro, A. M. J., M. Pokrywczynska and C. Ricordi (2017). "Clinical pancreatic islet transplantation." Nature Reviews Endocrinology **13**(5): 268-277.
- Silambanan, S., R. S. Hermes, E. Bhaskar and S. Gayathri (2020). "Endothelial Microparticle as an early Marker of Endothelial Dysfunction in Patients with Essential Hypertension: A Pilot Study." Indian J Clin Biochem **35**(2): 245-250.
- Simmons, R. A. (2012). "Developmental origins of diabetes: The role of oxidative stress." Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism **26**(5): 701-708.
- Simoncini, S., M. S. Njock, S. Robert, L. Camoin-Jau, J. Sampol, J. R. Harlé, C. Nguyen, F. Dignat-George and F. Anfosso (2009). "TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation." Circ Res **104**(8): 943-951.
- Sims, P. J., T. Wiedmer, C. T. Esmon, H. J. Weiss and S. J. Shattil (1989). "Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity." J Biol Chem **264**(29): 17049-17057.
- Singh, N., E. Van Craeyveld, M. Tjwa, A. Ciarka, J. Emmerechts, W. Droogne, S. C. Gordts, V. Carlier, F. Jacobs, S. Fieuws, J. Vanhaecke, J. Van Cleemput and B. De Geest (2012). "Circulating apoptotic

- endothelial cells and apoptotic endothelial microparticles independently predict the presence of cardiac allograft vasculopathy." *J Am Coll Cardiol* **60**(4): 324-331.
- Sinning, J. M., J. Losch, K. Walenta, M. Böhm, G. Nickenig and N. Werner (2011). "Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes." *Eur Heart J* **32**(16): 2034-2041.
- Skrzypek, K., M. G. Nibbelink, L. P. Karbaat, M. Karperien, A. van Apeldoorn and D. Stamatialis (2018). "An important step towards a prevascularized islet macroencapsulation device-effect of micropatterned membranes on development of endothelial cell network." *J Mater Sci Mater Med* **29**(7): 91.
- Song, R., Y. I. Chou, J. Kong, J. Li, B. Pan, M. Cui, E. Zhou, Y. Zhang and L. Zheng (2015). "Association of endothelial microparticle with NO, eNOS, ET-1, and fractional flow reserve in patients with coronary intermediate lesions." *Biomarkers* **20**(6-7): 429-435.
- Souilhol, C., M. C. Harmsen, P. C. Evans and G. Krenning (2018). "Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis." *Cardiovasc Res* **114**(4): 565-577.
- Stendahl, J. C., D. B. Kaufman and S. I. Stupp (2009). "Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation." *Cell Transplant* **18**(1): 1-12.
- Sutherland, D. E., R. Sibley, X. Z. Xu, A. Michael, A. M. Srikanta, F. Taub, J. Najarian and F. C. Goetz (1984). "Twin-to-twin pancreas transplantation: reversal and reenactment of the pathogenesis of type I diabetes." *Trans Assoc Am Physicians* **97**: 80-87.
- Suzuki, H. I., M. Horie, H. Mihira and A. Saito (2018). "Molecular Analysis of Endothelial-mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling." *J Vis Exp*(138).
- Suzuki, T., Y. Tada, S. Gladson, R. Nishimura, I. Shimomura, S. Karasawa, K. Tatsumi and J. West (2017). "Vildagliptin ameliorates pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced lung injury by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition." *Respir Res* **18**(1): 177.
- Suzuki, T., Y. Tada, S. Gladson, R. Nishimura, I. Shimomura, S. Karasawa, K. Tatsumi and J. West (2017). "Vildagliptin ameliorates pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced lung injury by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition." *Respiratory Research* **18**(1).
- Takaki, T. and M. Shimoda (2020). "Pancreatic islet transplantation: toward definitive treatment for diabetes mellitus." *Global health & medicine* **2**(4): 200-211.
- Tan, J. and G. Zhou (2005). "Chemokine receptors and transplantation." *Cell Mol Immunol* **2**(5): 343-349.
- Tando, Y., M. Yanagimachi, Y. Matsushashi, T. Nakamura and T. Kamisawa (2010). "A brief outline of the history of the pancreatic anatomy." *Dig Surg* **27**(2): 84-86.
- Teoh, N. C., H. Ajamieh, H. J. Wong, K. Croft, T. Mori, A. C. Allison and G. C. Farrell (2014). "Microparticles mediate hepatic ischemia-reperfusion injury and are the targets of Diannexin (ASP8597)." *PloS one* **9**(9): e104376-e104376.
- Thorens, B. (1992). "Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(18): 8641-8645.
- Toso, C., R. Pawlick, S. Lacotte, R. Edgar, J. Davis, M. McCall, P. Morel, G. Mentha, T. Berney and A. M. J. Shapiro (2011). "Detecting Rejection after Mouse Islet Transplantation Utilizing Islet Protein-Stimulated ELISPOT." *Cell Transplantation* **20**(6): 955-962.
- Toti, F., F. Bayle, T. Berney, H. Egelhofer, M. J. Richard, M. Greget, D. Masson, F. Zobairi, P. Y. Benhamou and L. Kessler (2011). "Studies of circulating microparticle release in peripheral blood after pancreatic islet transplantation." *Transplant Proc* **43**(9): 3241-3245.
- Tsai, T. H., C. H. Lee, C. I. Cheng, Y. N. Fang, S. Y. Chung, S. M. Chen, C. J. Lin, C. J. Wu, C. L. Hang and W. Y. Chen (2019). "Liraglutide Inhibits Endothelial-to-Mesenchymal Transition and Attenuates Neointima Formation after Endovascular Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice." *Cells* **8**(6).
- Tsimerman, G., A. Roguin, A. Bachar, E. Melamed, B. Brenner and A. Aharon (2011). "Involvement of microparticles in diabetic vascular complications." *Thromb Haemost* **106**(2): 310-321.
- Tsimerman, G., A. Roguin, A. Bachar, E. Melamed, B. Brenner and A. Aharon (2011). "Involvement of microparticles in diabetic vascular complications." *Thrombosis and haemostasis* **106**: 310-321.

- Tsutsumi, T., T. Nagaoka, T. Yoshida, L. Wang, S. Kuriyama, Y. Suzuki, Y. Nagata, N. Harada, Y. Kodama, F. Takahashi, Y. Morio and K. Takahashi (2019). "Nintedanib ameliorates experimental pulmonary arterial hypertension via inhibition of endothelial mesenchymal transition and smooth muscle cell proliferation." *PLOS ONE* **14**(7): e0214697.
- Ursoli Ferreira, F., L. Eduardo Botelho Souza, C. Hassibe Thomé, M. Tomazini Pinto, C. Origassa, S. Salustiano, V. Marcel Faça, N. Olsen Câmara, S. Kashima and D. Tadeu Covas (2019). "Endothelial Cells Tissue-Specific Origins Affects Their Responsiveness to TGF- $\beta$ 2 during Endothelial-to-Mesenchymal Transition." *Int J Mol Sci* **20**(3).
- van der Burg, M. P., P. T. van Suylichem, O. R. Guicherit, M. Frölich, H. H. Lemkes and H. G. Gooszen (1997). "Glucoregulation after canine islet transplantation: contribution of insulin secretory capacity, insulin action, and the entero-insular axis." *Cell Transplant* **6**(5): 497-503.
- VanWijk, M. J., E. VanBavel, A. Sturk and R. Nieuwland (2003). "Microparticles in cardiovascular diseases." *Cardiovasc Res* **59**(2): 277-287.
- Versari, D., E. Daghini, A. Virdis, L. Ghiadoni and S. Taddei (2009). "The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man." *Exp Physiol* **94**(3): 317-321.
- Villanueva-Peñacarrillo, M. L., J. Puente, A. Redondo, F. Clemente and I. Valverde (2001). "Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models." *Endocrine* **15**(2): 241-248.
- Wang, Y., M. Qi, J. J. McGarrigle, B. Rady, M. E. Davis, P. Vaca and J. Oberholzer (2013). "Use of glucagon-like peptide-1 agonists to improve islet graft performance." *Current diabetes reports* **13**(5): 723-732.
- Wang, Z., Z. Han, J. Tao, J. Wang, X. Liu, W. Zhou, Z. Xu, C. Zhao, Z. Wang, R. Tan and M. Gu (2017). "Role of endothelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- $\beta$ 1 in transplant kidney interstitial fibrosis." *J Cell Mol Med* **21**(10): 2359-2369.
- Wei, Y. and S. Mojsov (1995). "Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences." *FEBS Lett* **358**(3): 219-224.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2005). "Inflammation, stress, and diabetes." *J Clin Invest* **115**(5): 1111-1119.
- Wiviott, S. D., I. Raz, M. P. Bonaca, O. Mosenzon, E. T. Kato, A. Cahn, M. G. Silverman, T. A. Zelniker, J. F. Kuder, S. A. Murphy, D. L. Bhatt, L. A. Leiter, D. K. McGuire, J. P. H. Wilding, C. T. Ruff, I. A. M. Gause-Nilsson, M. Fredriksson, P. A. Johansson, A. M. Langkilde and M. S. Sabatine (2019). "Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes." *N Engl J Med* **380**(4): 347-357.
- Wolf, P. (1967). "The nature and significance of platelet products in human plasma." *Br J Haematol* **13**(3): 269-288.
- Wu, K. Q., C. S. Muratore, E. Y. So, C. Sun, P. M. Dubielecka, A. M. Reginato and O. D. Liang (2017). "M1 Macrophage-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition Promotes Infantile Hemangioma Regression." *Am J Pathol* **187**(9): 2102-2111.
- Wynn, T. A. (2008). "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." *J Pathol* **214**(2): 199-210.
- Yamaji, T., T. Harada, Y. Hashimoto, Y. Takaeko, M. Kajikawa, Y. Kihara, E. Hida, K. Chayama, C. Goto, Y. Han, F. M. Yusoff, S. Kishimoto, T. Maruhashi, A. Nakashima and Y. Higashi (2020). "Pre-impaired fasting glucose state is a risk factor for endothelial dysfunction: Flow-mediated Dilation Japan (FMD-J) study." *BMJ Open Diabetes Research & Care* **8**(1): e001610.
- Yáñez-Mó, M., P. R. M. Siljander, Z. Andreu, A. B. Zavec, F. E. Borràs, E. I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, E. Colás, A. Cordeiro-da Silva, S. Fais, J. M. Falcon-Perez, I. M. Ghobrial, B. Giebel, M. Gimona, M. Graner, I. Gursel, M. Gursel, N. H. H. Heegaard, A. Hendrix, P. Kierulf, K. Kokubun, M. Kosanovic, V. Kralj-Iglic, E.-M. Krämer-Albers, S. Laitinen, C. Lässer, T. Lener, E. Ligeti, A. Linē, G. Lipps, A. Llorente, J. Lötvall, M. Manček-Keber, A. Marcilla, M. Mittelbrunn, I. Nazarenko, E. N. M. Nolte-<sup>t</sup> Hoen, T. A. Nyman, L. O'Driscoll, M. Olivan, C. Oliveira, É. Pállinger, H. A. Del Portillo, J. Reventós, M. Rigau, E. Rohde, M. Sammar, F. Sánchez-Madrid, N. Santarém, K. Schallmoser, M. S. Ostendorf, W. Stoorvogel, R. Stukelj, S. G. Van der Grein, M. H. Vasconcelos, M. H. M. Wauben and O. De Wever

- (2015). "Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions." Journal of extracellular vesicles **4**: 27066-27066.
- Yao, Y., Y. Li, X. Zeng, Z. Ye, X. Li and L. Zhang (2018). "Losartan Alleviates Renal Fibrosis and Inhibits Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Under High-Fat Diet-Induced Hyperglycemia." Frontiers in Pharmacology **9**(1213).
- Yong, P. J., C. H. Koh and W. S. Shim (2013). "Endothelial microparticles: missing link in endothelial dysfunction?" Eur J Prev Cardiol **20**(3): 496-512.
- Yoon, J. W. and H. S. Jun (2005). "Autoimmune destruction of pancreatic beta cells." Am J Ther **12**(6): 580-591.
- Yu, M., D. Agarwal, L. Korutla, C. L. May, W. Wang, N. N. Griffith, B. J. Hering, K. H. Kaestner, O. C. Velazquez, J. F. Markmann, P. Vallabhajosyula, C. Liu and A. Naji (2020). "Islet transplantation in the subcutaneous space achieves long-term euglycaemia in preclinical models of type 1 diabetes." Nat Metab **2**(10): 1013-1020.
- Yuan, Q., A. Pan, Y. Fu and Y. Dai (2021). Chapter 1 - Anatomy and physiology of the pancreas. Integrative Pancreatic Intervention Therapy. M. Li, L. Lu, Y. Xiao, D. Fu and H. Zhang, Elsevier: 3-21.
- Yuan, S. and R. Rigor (2011). "In Regulation of Endothelial Barrier Function." Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function **3**: 1-146.
- Yuana, Y., R. Bertina and S. Osanto (2010). "Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles." Thrombosis and haemostasis **105**: 396-408.
- Yuana, Y., T. H. Oosterkamp, S. Bahatyrova, B. Ashcroft, P. Garcia Rodriguez, R. M. Bertina and S. Osanto (2010). "Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles." J Thromb Haemost **8**(2): 315-323.
- Yun, E., Y. Kook, K. H. Yoo, K. I. Kim, M. S. Lee, J. Kim and A. Lee (2020). "Endothelial to Mesenchymal Transition in Pulmonary Vascular Diseases." Biomedicines **8**(12).
- Zaccone, P., Z. Fehervari, J. M. Phillips, D. W. Dunne and A. Cooke (2006). "Parasitic worms and inflammatory diseases." Parasite Immunology **28**(10): 515-523.
- Zanone, M. M., E. Favaro and G. Camussi (2008). "From endothelial to beta cells: insights into pancreatic islet microendothelium." Curr Diabetes Rev **4**(1): 1-9.
- Zarà, M., G. F. Guidetti, M. Camera, I. Canobbio, P. Amadio, M. Torti, E. Tremoli and S. S. Barbieri (2019). "Biology and Role of Extracellular Vesicles (EVs) in the Pathogenesis of Thrombosis." International journal of molecular sciences **20**(11): 2840.
- Zeisberg, E. M., S. Potenta, L. Xie, M. Zeisberg and R. Kalluri (2007). "Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts." Cancer Res **67**(21): 10123-10128.
- Zeisberg, E. M., S. E. Potenta, H. Sugimoto, M. Zeisberg and R. Kalluri (2008). "Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition." J Am Soc Nephrol **19**(12): 2282-2287.
- Zeisberg, E. M., O. Tarnavski, M. Zeisberg, A. L. Dorfman, J. R. McMullen, E. Gustafsson, A. Chandraker, X. Yuan, W. T. Pu, A. B. Roberts, E. G. Neilson, M. H. Sayegh, S. Izumo and R. Kalluri (2007). "Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis." Nat Med **13**(8): 952-961.
- Zeisberg, E. M., O. Tarnavski, M. Zeisberg, A. L. Dorfman, J. R. McMullen, E. Gustafsson, A. Chandraker, X. Yuan, W. T. Pu, A. B. Roberts, E. G. Neilson, M. H. Sayegh, S. Izumo and R. Kalluri (2007). "Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis." Nature Medicine **13**(8): 952-961.
- Zernecke, A., K. Bidzhekov, H. Noels, E. Shagdarsuren, L. Gan, B. Denecke, M. Hristov, T. Köppel, M. N. Jahantigh, E. Lutgens, S. Wang, E. N. Olson, A. Schober and C. Weber (2009). "Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection." Sci Signal **2**(100): ra81.
- Zhang, C. (2008). "The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction." Basic Research in Cardiology **103**(5): 398-406.
- Zhang, C., Q. Ou, Y. Gu, G. Cheng, R. Du, L. Yuan, R. L. Cordiner, D. Kang, J. Zhang, Q. Huang, C. Yu, L. Kang, X. Wang, X. Sun, X. Mo, H. Tian, E. R. Pearson, W. Meng and S. Li (2019). "Circulating Tissue Factor-Positive Procoagulant Microparticles in Patients with Type 1 Diabetes." Diabetes Metab Syndr Obes **12**: 2819-2828.

Zhang, N., A. Richter, J. Suriawinata, S. Harbaran, J. Altomonte, L. Cong, H. Zhang, K. Song, M. Meseck, J. Bromberg and H. Dong (2004). "Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization." *Diabetes* **53**(4): 963-970.

Zhang, W., S. Chen and M.-L. Liu (2018). "Pathogenic roles of microvesicles in diabetic retinopathy." *Acta pharmacologica Sinica* **39**(1): 1-11.

Zou, J., Y. Liu, B. Li, Z. Zheng, X. Ke, Y. Hao, X. Li, X. Li, F. Liu and Z. Zhang (2017). "Autophagy attenuates endothelial-to-mesenchymal transition by promoting Snail degradation in human cardiac microvascular endothelial cells." *Bioscience reports* **37**(5): BSR20171049.

## 10- Production scientifique et communication orales

### Communication orale

1- **SFT, Société francophone de Transplantation**, Bordeaux, 5 décembre 2019 :

Effet du Dulaglutide sur la transition endothélio-mésenchymateuse des cellules endothéliales insulaires murines induite par le stress cytokinique de la phase initiale de la greffe d'îlots pancréatiques.

2- **EPITA**, 26-28 Janvier 2020, Autriche:

Dulaglutide prevents endothelial-mesenchymal transition of intra-islets pancreatic endothelial cells in response to cytokine stress.

3- Est Tranplant, 16 Novembre 2021

Etude de la transition endothélio-mésenchymateuse des cellules endothéliales Intra-insulaires de souris et modulation pharmacologique : Intérêt dans la greffe d'îlots pancréatiques

- Prix de Recherche : 1500 euro

### Communication affichée

1- **SFD, Société francophone de Diabète**, Bruxelles (reportée à cause du COVID) :

Effet d'un analogue du GLP-1 sur la transition Endothélio- Mésenchymateuse (EndMT) des cellules endothéliales intra-insulaires pancréatiques induite par le stress cytokinique à la phase initiale de la greffe d'îlots pancréatiques



## Noura Sbat

### Etude de la transition endothélio-mésenchymateuse des cellules endothéliales intra-insulaires de souris et modulation pharmacologique : Intérêt dans la greffe d'îlots pancréatiques

La revascularisation des îlots greffés est déterminante pour le succès de la greffe. Le contact des îlots avec le sang de la veine porte induit une réaction inflammatoire précoce appelée IBMIR caractérisée par la production de cytokines pro-inflammatoires dans l'environnement des îlots. Une des réponses endothéliales au stress de l'ischémie et de l'IBMIR est la transition endothélio-mésenchymateuse (EndTM). Notre étude réside dans la caractérisation de l'EndTM et dans l'étude de l'effet protecteur du Dulaglutide sur l'endothélium intra-insulaire contre l'EndMT induite par les cytokines de l'IBMIR. Nos données indiquent une diminution progressive des marqueurs endothéliaux et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux des cellules endothéliales accompagnée de la libération de microvésicules pro-inflammatoires. Le Dulaglutide exerce une cytoprotection contre les réponses induites par les cytokines de manière GLP-1R dépendante, ainsi que diminue l'effet proinflammatoire cytotoxique des MVs. Le Dulaglutide représente une potentielle thérapie adjuvante pour améliorer l'efficacité de la greffe d'îlots.

Mots clés : EndTM, endothélium, Dulaglutide, MVs

Revascularization of the transplanted islets is crucial for the success of the transplant. Islet contact with portal blood induces an early inflammatory response called IBMIR characterized by the production of pro-inflammatory cytokines. One of the endothelial responses to the ischemia and IBMIR is the endothelial-mesenchymal transition (EndMT). Our study lies in the characterization of EndMT and in the investigation of the protective effect of Dulaglutide on the intra-insular endothelium against IBMIR cytokine induced-EndMT. Our data indicate a progressive decrease in endothelial markers and acquisition of mesenchymal markers, accompanied by the release of proinflammatory microvesicles by endothelial cells. Dulaglutide exerts cytoprotection against cytokine-induced responses in a GLP-1R-dependent manner, as well as decreases the cytotoxic proinflammatory effect of MVs. Dulaglutide represents a potential adjuvant therapy to improve the efficacy of islet transplantation.

Keyword: EndMT, endothelium, Dulaglutide, MVs