
Optimisation de la revascularisation des îlots pancréatiques au cours de la transplantation: approche génétique ou pharmacologique?

pour l'obtention du grade de
**Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I**

par
Allan Langlois

Soutenue le 23 mai 2008 devant le jury composé de

Mme Laurence Kessler
Mme Michèle Kédinger
Mr Dominique Stephan
Mr Pierre-Yves Benhamou
Mr Serge Braun
Mr Michel Pinget
Mme Sèverine Sigrist

Professeur
Directeur de recherche
Professeur
Professeur
Directeur scientifique de l'AFM
Professeur
Responsable de Laboratoire

Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Rapporteur interne
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Invité
Invité

Je dédie ce travail à papi et mamie Rippol et à mes parents afin de leur exprimer toute ma reconnaissance. Je ne sais pas si cela sera suffisant mais je vous adresse un gigantesque MERCI pour votre amour sans borne, votre soutien moral et financier et d'avoir cru en moi depuis toujours.

Merci à mon frère Cédric et à ma belle sœur Nadège qui ont su me donner le plus beau des cadeaux, mon neveu, Antoine.

Merci à mon amour pour ta présence de tous les jours, même si tu ne voulais pas de remerciement mais bon c'est mon côté rebel qui ressort...

Merci à mes copains du Poitou-Charentes (Nico, Jav, Mickoul, Fab...) et de Bordeaux (Mag, Alex, Elo, Aline, Marie...) pour tous les bons moments passés et à venir. Je voudrais remercier plus particulièrement le Dr Nathalie Marissal-Arvy pour son amitié, son encadrement durant mon stage de maîtrise et mon M2 et surtout pour la grande confiance qu'elle a mise en moi. Sans toi je ne serais pas là.

Merci à toute ma famille pour leur intérêt et leur soutien sans faille depuis tant d'années.

J'exprime ma profonde gratitude au Professeur Michel Pinget pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son soutien, sa disponibilité et ses louanges concernant mon Anglais.

Je remercie le Professeur Laurence Kessler de m'avoir accordé toute sa confiance pour la réalisation de cette thèse et pour son aide apporté.

Merci au Docteur Michèle Kédinger d'avoir assuré la Co-direction de ma thèse et pour les échanges scientifiques très enrichissant que nous avons pu avoir durant ces trois dernières années.

Je remercie également les membres du jury: le Professeur Pierre-Yves Benhamou, le Docteur Serge Braun et le Professeur Dominique Stephan pour avoir accepté d'apporter leur contribution à mon travail.

Je tiens tout particulièrement à exprimer mon immense gratitude au Docteur Séverine Sigrist pour son encadrement, ses conseils et sa grande disponibilité tout au long de ma thèse. Merci pour ces longues heures passées à corriger mon mémoire, merci pour ton amitié et pour tes blagues, même si les miennes sont biens meilleures... Sans toi cette thèse n'aurait jamais pu être menée à bien. MERCI CHEF!!!

Mes remerciements vont également à William Bietiger et Elodie Seyfritz pour leur gargantuesque contribution technique, respectivement pour la biologie moléculaire et pour l'immunohistochimie. Je salue votre efficacité, votre patience et votre professionnalisme. Pour moi il ne peut pas exister de meilleurs techniciens que vous. William, merci pour ton amitié et pour les chifoumis du jeudi mais sache que désormais je gagnerai, alors fait attention à tes arrières.

Merci au Docteur Elisa Maillard, mon ancien binôme de thèse, mon Knacki Ball préféré, pour ton aide, tes conseils, ton amitié et surtout pour avoir écouté mes blagues, que tu trouves nulles (je ne comprends pas...).

Je remercie Karim Mandès et le Docteur Constant Vodouhe pour leur présence, leur gentillesse et leur aide tout au long de ma thèse.

Je tiens également à remercier le Docteur Alain Belcourt pour sa disponibilité de tous les instants, pour son soutien et ses corrections.

J'exprime toute mon amitié à Choupeta, Marie-Christine, Claudio et Nico et je les remercie pour leur soutien et pour les excellents moments passés ensemble.

Mes remerciements vont également aux autres membres du laboratoire: Nathalie S, Nathalie O, Nathalie R, Rachid, François... pour leur soutien, leur aide et les bons moments passés aux gâteaux du vendredi. Je remercie tout particulièrement, Nathalie Stiegler pour son soutien logistique, sa gentillesse et sa serviabilité.

Je remercie tous les membres du Ceed, les membres du RésoDiab67 et les infirmières de l'ASDIA pour leur professionnalisme et leur sympathie.

J'adresse un grand merci aux bénévoles du CeeD, Marlyse, Marie-Antoinette, Mr Brucker, Mr Blesch, Mme Gaertner, C'est grâce à leurs actions que notre travail prend toute sa dimension humaine et scientifique.

Bien sûr je n'oublie pas les Ch'tis dirigés d'une main de maître par Dominique Fitterer Présidente de l'antenne Nord-Pas de Calais du CeeD.

Enfin, je souhaite remercier tous ceux qui ne sont pas nommés ici mais qui ont contribué de près ou de loin à mon travail. Mille mercis.

Sommaire

Sommaire	1
Liste des abréviations	11
1. Introduction	15
1.1. Le diabète	15
1.1.1. Définition	15
1.1.2. Histoire du diabète	15
1.1.3. Epidémiologie du diabète.....	17
1.1.4. Le diabète non insulino-dépendant ou DNID ou diabète de type 2	18
1.1.5. Le diabète insulino-dépendant ou DID ou diabète de type 1	18
1.1.6. Complications liées au diabète et prévention	21
1.1.6.1. Complications liées au diabète	21
1.1.6.1.1. <i>Complications aiguës</i>	21
a) <i>Hyperglycémie</i>	22
b) <i>Hypoglycémie</i>	22
1.1.6.1.2. <i>Complications chroniques</i>	23
a) <i>Maladies cardiovasculaires</i>	23
b) <i>Néphropathie</i>	23
c) <i>Neuropathie</i>	23
d) <i>Rétinopathie</i>	24
e) <i>Sensibilité aux infections</i>	24
1.1.6.2. Prévention des complications liées au diabète	24
1.2. Insuline	25
1.2.1. Description	25
1.2.2. Biosynthèse	26
1.2.3. Régulation de l'insulinosécrétion.....	28
1.2.3.1. Rôle des nutriments dans l'insulinosécrétion	28
a) <i>Rôle du glucose</i>	28
b) <i>Rôle des nutriments non glucidiques</i>	29
1.2.3.2. Rôle des ions	31
1.2.3.3. Régulation hormonale rapide	33
a) <i>Hormones inhibitrices</i>	33
b) <i>Hormones stimulantes</i>	33
1.2.4. Actions physiologiques de l'insuline	34
a) <i>Effet sur le foie</i>	34
b) <i>Effets sur le tissu adipeux</i>	34
c) <i>Effets sur le muscle strié (squelettique et cardiaque)</i>	35
d) <i>Effets périphériques (adipocytes et muscles)</i>	35
1.3. Les thérapeutiques du diabète de type 1	35

1.3.1. Insulinothérapie.....	35
1.3.1.1. Les différents types d'insuline	35
1.3.1.2. Stylo à injection	36
1.3.1.3. Pompes à insuline	38
a) Pompe portable	38
b) Pompe implantable	39
c) Pancréas artificiel.....	40
d) Insuline inhalée	41
e) Insuline orale	42
1.3.2. Transplantation de pancréas.....	42
1.4. Diabète de type 1 et thérapie cellulaire	44
1.4.1. Les îlots pancréatiques	44
1.4.2. Greffe d'îlots pancréatiques	45
1.4.2.1. Historique de la greffe d'îlots	46
1.4.2.2. Transplantation d'îlots	46
a) Sélection des receveurs de la greffe.....	46
b) Sélection des donneurs.....	47
c) Prélèvement des pancréas et préparation des îlots pancréatiques.....	48
d) Transplantation.....	50
e) Traitement immunosuppresseur.....	51
1.4.2.3. Greffe d'îlots pancréatiques et protocole d'Edmonton	51
a) La greffe d'îlots pancréatiques avant 2000	51
b) La greffe d'îlots pancréatiques et protocole d'Edmonton	54
1.4.3. Transplantation et qualité de vie du patient	57
1.4.4. Les obstacles à la greffe d'îlots pancréatiques.....	58
1.4.4.1. Disponibilité des pancréas	58
1.4.4.2. Alternatives aux îlots pancréatiques humains	58
1.4.4.3. Rejet et traitements immunosuppresseurs	60
a) Définition du rejet	60
b) Les différentes formes de rejet	61
c) Rejet et greffe d'îlots pancréatiques	62
1.5. Optimisation de la viabilité des îlots pancréatiques et stimulation de l'angiogenèse	64
1.5.1. Revascularisation des îlots après transplantation.....	64
1.5.2. Définition	65
1.5.3. Mécanismes de l'angiogenèse.....	65
1.5.4. Régulateurs de l'angiogenèse.....	68
1.5.5. L'hypoxie.....	70
1.5.5.1. Hypoxia Inducible Factor-1	70
a) Structure du HIF-1	70
b) Régulation du HIF-1	71

c) Régulation par les basses pressions en oxygène.....	71
d) Régulation indépendante de l'oxygène	73
1.5.6. VEGF	75
1.5.6.1. Définition et membres de la famille VEGF	75
1.5.6.2. Récepteurs du VEGF	78
1.5.6.3. Voies de signalisations du VEGF	80
1.6. Approches thérapeutiques de la stimulation de la vascularisation	82
1.6.1. Rôle du VEGF dans la revascularisation des îlots pancréatiques au cours de la transplantation.....	82
1.6.2. La déferoxamine	84
1.6.2.1. Définition	84
1.6.2.2. Surcharge en Fer et insulino-résistance	84
1.6.2.3. Effet anti-prolifératif de la DFO	85
1.6.2.4. Effet anti-oxydant et anti-apoptotique de la DFO	86
1.6.2.5. Induction de l'expression du VEGF par la DFO	87
1.6.3. Thérapie génique.....	87
1.6.3.1. Historique	87
1.6.3.2. Vecteurs	88
a) Vecteurs non viraux	88
b) Vecteurs viraux	89
c) Vecteurs Rétroviraux.....	90
d) Les lentivirus	91
e) Le virus Herpes-Simplex	92
f) Les virus associés aux adénovirus (VAA)	93
g) Vecteurs Adénoviraux	93
1.6.3.3. Thérapie génique et problème de bioéthique	97
1.7. But de l'étude.....	98
2. Matériels et méthodes	99
2.1. Etude in vitro	99
2.1.1. Principe	99
2.1.2. Préparation des traitements	99
2.1.2.1. Préparation de la DFO.....	99
2.1.2.2. Préparation de l'adenovirus	100
2.1.3. Lignée cellulaire et culture.....	100
2.1.3.1. Lignée cellulaire RINm5F	100
2.1.3.2. Culture pour le test de viabilité et l'étude de la sécrétion de VEGF	101
2.1.3.3. Culture pour le marquage au Hoechst	101
2.1.3.4. Culture pour l'extraction d'ARN	101
2.1.3.5. Culture pour l'extraction de protéines	101
2.1.4. Culture primaire d'îlots pancréatiques.....	101

2.1.4.1.	Prélèvement du pancréas	101
2.1.4.2.	Digestion enzymatique	102
2.1.4.3.	Purification	103
2.1.4.4.	Culture d'îlots de Rat	104
	a) <i>Culture pour le test de viabilité, de fonctionnalité et pour l'étude de la sécrétion de VEGF</i>	104
	b) <i>Culture pour l'inclusion des îlots, l'extraction d'ARN et de protéines</i>	104
2.1.5.	Infection adénovirale.....	104
2.1.5.1.	Adénovirus	104
2.1.5.2.	Infection adénovirale in vitro	105
2.1.5.3.	Infection adénovirale in vivo	105
2.1.6.	Evaluation de l'efficacité de l'infection des cellules β RINm5F	107
2.1.7.	Mesure de la viabilité des cellules β RINm5F	107
2.1.8.	Marquage des cellules β RINm5F au Hoechst.....	107
2.1.9.	Mesure de la viabilité et de la fonctionnalité des îlots pancréatiques	108
2.1.9.1.	Viabilité	108
2.1.9.2.	Fonctionnalité	108
	a) <i>Test de stimulation au glucose</i>	108
	b) <i>Dosage de l'insuline</i>	109
2.1.10.	Etude de l'expression des gènes.....	110
	a) <i>Extraction des ARN totaux</i>	110
	b) <i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)</i>	110
2.1.11.	Etude de l'expression de la protéine HIF-1	111
2.1.11.1.	Extraction des protéines cellulaires	111
2.1.11.2.	Dosage des protéines	112
2.1.11.3.	Western blotting	112
	a) <i>Migration</i>	112
	b) <i>Electrotransfert</i>	113
	c) <i>Immunomarquage</i>	113
2.1.12.	Etude de la sécrétion de VEGF	114
2.1.12.1.	Dosage du VEGF par Test ELISA	114
2.1.12.2.	Extraction des protéines	114
2.1.12.3.	Dosage des protéines selon la méthode de Bradford	115
2.1.13.	Etude immunohistologique des îlots pancréatiques	115
2.1.13.1.	Inclusion des îlots pancréatiques	115
2.1.13.2.	Coupe des blocs d'îlots pancréatiques	115
2.1.13.3.	Coloration éosine/hématoxyline des coupes d'îlots	115
2.1.13.4.	Immunomarquage	116
2.2.	Etude in vivo	117
2.2.1.	Etude histologique.....	117

2.2.1.1.	<i>Principe de l'étude</i>	117
2.2.1.2.	<i>Induction du diabète par la streptozotocine (STZ)</i>	117
2.2.1.3.	<i>Transplantation d'îlots pancréatiques</i>	118
2.2.1.4.	<i>Histologie et immunomarquage</i>	119
2.2.2.	Etude métabolique.....	120
2.2.2.1.	<i>Principe</i>	120
2.2.2.2.	<i>Transplantation d'îlots pancréatiques</i>	121
2.2.2.3.	<i>Dosage du peptide C</i>	121
2.3.	Etude statistique.....	122
3.	Résultats	123
3.1.	Etude <i>in vitro</i>	123
3.1.1.	Effet de l'infection adénovirale et du traitement DFO sur l'expression du VEGF dans les cellules RINm5F.....	123
3.1.1.1.	<i>Efficacité de l'infection adénovirale</i>	123
3.1.1.2.	<i>Influence des différents traitements sur la viabilité cellulaire</i>	124
3.1.1.3.	<i>Influence des différents traitements sur l'expression de l'ARN messager de l'insuline</i>	125
3.1.1.4.	<i>Analyse de l'apoptose</i>	126
3.1.1.5.	<i>Mesure de l'expression et de la sécrétion de VEGF</i>	129
3.1.1.6.	<i>Discussion</i>	132
3.1.2.	Effet de l'infection adénovirale du gène du VEGF et de la DFO sur l'expression du VEGF sur les îlots pancréatiques de Rat.....	135
3.1.2.1.	<i>Evaluation de la viabilité, de la fonctionnalité et de l'expression d'insuline des îlots pancréatiques infectés ou traités à la DFO</i>	135
3.1.2.2.	<i>Analyse de l'apoptose</i>	139
3.1.2.3.	<i>Mesure de l'expression et de la sécrétion de VEGF</i>	140
3.1.2.4.	<i>Mesure de l'expression de la protéine HIF-1α</i>	141
3.1.2.5.	<i>Analyse immunohistochimique des îlots pancréatiques</i>	142
a)	<i>Marquage immunohistochimique de l'insuline dans les îlots pancréatiques</i>	142
b)	<i>Marquage immunohistochimique du VEGF dans les îlots pancréatique</i>	144
3.1.2.6.	<i>Discussion</i>	145
3.2.	Etude <i>in vivo</i>	147
3.2.1.	Mise au point du modèle de rat streptozotocine	147
3.2.2.	Etude immunohistologique	150
3.2.2.1.	<i>Transplantation d'îlots infectés ou traités à la DFO chez le rat sain</i>	150
3.2.2.2.	<i>Transplantation d'îlots pancréatiques dans un modèle hyperglycémique</i>	151
3.2.2.3.	<i>Transplantation d'îlots pancréatiques chez le Rat diabétique</i>	152
a)	<i>Analyse du marquage immunohistochimique de l'insuline</i>	152
b)	<i>Analyse du marquage immunohistochimique du VEGF</i>	157
c)	<i>Etude de la revascularisation des îlots par marquage immunohistochimique à la</i>	

<i>lectine</i>	161
3.2.2.4. Discussion	166
3.2.3. Etude métabolique.....	168
3.2.3.1. Evaluation du gain de masse corporelle	168
3.2.3.2. Evaluation de la glycémie	169
3.2.3.3. Evaluation de la sécrétion de peptide C	171
3.2.3.4. Discussion	174
4. Conclusion générale et perspectives	177
5. Références bibliographiques	181
6. Présentations et publications	192

Table des figures

Figure 1-1: Insuline, chaînes A et B réunies par deux ponts disulfures et le peptide C	26
Figure 1-2: Etapes cellulaires de la biosynthèse de l'insuline	27
Figure 1-3: Sécrétion de l'insuline.....	28
Figure 1-4: Sécrétion de l'insuline basale et pulsatile	29
Figure 1-5: La reformulation des mécanismes biochimiques à l'origine du cycle «glucose-acides gras»	31
Figure 1-6: Mécanismes intracellulaires principaux de la sécrétion d'insuline par le glucose dans la cellule β (27)	32
Figure 1-7: Stylos à injection.....	37
Figure 1-8: Pompe à insuline portable	38
Figure 1-9: Pompe à insuline implantable	40
Figure 1-10: Principe du pancréas artificiel.....	40
Figure 1-11: Schéma d'un îlot pancréatique	45
Figure 1-12: Détection par microscopie confocale de la distribution des cellules endocrines dans les îlots pancréatique humain	45
Figure 1-13: Représentation schématique des étapes de la greffe d'îlots (www.univ-lille2.fr)	49
Figure 1-14: Représentation schématique de la méthode automatique de digestion du pancréas	50
Figure 1-15: Insulinoindépendance au cours du temps des patients diabétiques transplanté selon de protocole d'Edmonton.....	55
Figure 1-16: Sécrétion de peptide C au cours du temps des patients diabétiques transplantés selon de protocole d'Edmonton.....	57
Figure 1-17: Vasculogénèse et angiogénèse.	66
Figure 1-18: Etapes principales de l'angiogénèse par bourgeonnement	67
Figure 1-19: Représentation en tridimensionnelle (a-d) et bidimensionnelle (a'-d') du processus de génération de nouveaux vaisseaux sanguins par intussusception	68
Figure 1-20: Modèle du « switch angiogène ».....	70
Figure 1-21: Régulation de l'activité de HIF1 dépendante de l'oxygène (d'après Éric Clottes, 2005).	73
Figure 1-22: Régulation de la synthèse protéique de HIF1 α indépendante de la pression en oxygène dans la cellule.....	75
Figure 1-23: Représentation schématique de 4 ligands caractérisés de la famille du VEGF	77
Figure 1-24: Les différentes isoformes de VEGF.....	77
Figure 1-25: Famille des VEGF et leurs récepteurs.....	79
Figure 1-26: Trois étapes dans l'activation d'un récepteur tyrosine kinase de type VEGFR.....	79
Figure 1-27: Voies de signalisations moléculaires du VEGF.....	80
Figure 1-28: Représentation schématique des voies classiques conduisant à l'activation de mTOR et à ses effets biologiques.....	81
Figure 1-29: Fig.38: Analyse histologique des bourgeons vasculaires.....	82
Figure 1-30: Déferoxamine mesylate.....	84

Figure 1-31: Mécanisme simplifié d'une thérapie génique.....	88
Figure 1-32: Représentation de la structure d'un rétrovirus	91
Figure 1-33: Représentation de la structure d'un lentivirus.....	91
Figure 1-34: Structure des herpèsvirus	92
Figure 1-35: Structure d'un adénovirus	94
Figure 1-36: Cycle d'infection de l'adénovirus et vecteurs adénoviraux	95
Figure 1-37: Infection adénovirale in vitro (A) et in vivo (B) du gène de la β -Galactosidase	96
Figure 2-1: Lignée cellulaire Rinm5F.....	100
Figure 2-2: Prélèvement d'un pancréas de Rat.....	102
Figure 2-3: Ilots pancréatiques humains avant (a) et après (b) purification	103
Figure 2-4: Schéma du vecteur adénoviral utilisé (www.cellbiolabs.com).....	105
Figure 2-5: Infection adénovirale in vivo d'un pancréas de Rat.....	106
Figure 2-6: Séquences de primers et conditions de RT-PCR pour les différentes amorces utilisées	111
Figure 2-7: Gel de PCR de l'insuline à partir d'ARN totaux de cellules RINm5F	111
Figure 2-8: Gel de PCR de l'insuline à partir d'ARN d'îlots pancréatiques de Rat.....	111
Figure 2-9: Dosage d'une gamme de BSA	112
Figure 2-10: Western blot sur le lysat d'îlots pancréatiques de Rat et immunomarquage de la β -Actine et du HIF-1.	113
Figure 2-11: Coloration éosine/hématoxyline d'une coupe d'îlots pancréatiques de Rat.	116
Figure 2-12: Coupe de pancréas: marquage de l'insuline.....	117
Figure 2-13: Face caudale du foie.....	119
Figure 2-14: Transplantation intrahépatique d'îlots pancréatiques	121
Figure 3-1: Photographie en microscopie inversée des cellules RINm5f infectée à l'aide de l'adéno β gal.....	123
Figure 3-2: Histogramme représentant la viabilité des cellules RINm5F.....	125
Figure 3-3: Histogramme représentant la quantification relative par RT-PCR l'ARNm de l'insuline des RINm5F	125
Figure 3-4: Photographies en microscopie à fluorescence des cellules RINm5F.	127
Figure 3-5: Graphique présentant l'étude par RT-PCR semi-quantitative de l'expression de l'ARNm de Bax (A) et de Bcl-2 (B) dans les cellules RINm5F.....	128
Figure 3-6: Histogramme représentant la mesure de la sécrétion du VEGF	130
Figure 3-7: Histogramme représentant la mesure semi-quantitative par RT-PCR de l'ARN messenger du HIF-1 α	131
Figure 3-8: (A) Photographie du fim du western blotting des protéines HIF-1 α et β -actine sur les cellules RINm5F	132
Figure 3-9: Photographies en microscopie à fluorescence d'îlot pancréatiques de Rat.	136
Figure 3-10: Histogramme représentant la viabilité des îlots pancréatiques en pourcentage.....	137
Figure 3-11: Histogramme représentant l'index de stimulation des îlots pancréatiques	137
Figure 3-12: Histogramme représentant la mesure semi-quantitative par RT-PCR de l'ARN	

messenger de l'insuline	138
Figure 3-13: Graphique présentant l'étude par RT-PCR semi-quantitative de l'expression de l'ARNm de Bax (A) et de Bcl-2 (B)	139
Figure 3-14: Histogramme représentant la mesure de la sécrétion du VEGF	140
Figure 3-15: (A) Photographie du film du western blotting des protéines HIF-1 α et β -actine sur les îlots pancréatiques contrôles	141
Figure 3-16: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'îlots pancréatiques inclus dans la paraffine et marqués à l'insuline	143
Figure 3-17: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'îlots pancréatiques inclus dans la paraffine et marqués au VEGF	144
Figure 3-18: Histogramme présentant l'évolution pondérale après injection de streptozotocine ..	148
Figure 3-19: Histogramme présentant l'évolution de la glycémie après injection de streptozotocine	149
Figure 3-20: Graphique représentant l'évolution de l'insulinémie lors de l'induction du diabète	150
Figure 3-21: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupe de foie de rats sains 3 jours après transplantation d'îlots pancréatiques	151
Figure 3-22: Photographies en microscopie à contraste de phase d'une coupe d'un lobe caudé du foie transplanté par des îlots pancréatiques	152
Figure 3-23: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques	153
Figure 3-24: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis	154
Figure 3-25: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis	155
Figure 3-26: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis	156
Figure 3-27: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques	157
Figure 3-28: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques	158
Figure 3-29: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques	159
Figure 3-30: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques	160
Figure 3-31: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques	162
Figure 3-32: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques	163
Figure 3-33: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé	

du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques	164
Figure 3-34: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5µm) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques	165
Figure 3-35: Graphique présentant l'évolution du gain de masse corporelle au cours du temps après transplantation	167
Figure 3-36: Graphique présentant l'évolution de la glycémie des rats diabétiques après transplantation	170
Figure 3-37: Graphique présentant l'évolution de la sécrétion de peptide C de rats diabétiques après transplantation	173
Figure 4-1: Schéma comparatif des effets de l'infection adénovirale et de la DFO	178

Liste des abréviations

AB/AM: Antibiotique Antimicotique
ACV: Accident Cardio Vasculaire
acyl-CoA: acyl-Coenzyme A
Ad: Adénovirus
ADN(c): Acide DesoxyriboNucléique (complémentaire)
AEC: 3-Amino-9-Ethyl-Carbazole
AFSSAPS: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AGL: Acides Gras Libres
AINS: Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
Ang-2: Angiotensine 2
ARD: N-Terminal acyltransferase complex
ARN(m): Acide RiboNucléique (messenger)
Asn: Asparagine
ATP: Adénosine TriPhosphate
Bcl-2: B-cell leukemia/lymphoma 2
bHLH: basic Helix-Loop-Helix
BSA: Bovin Serum Albumin
CAR: Coxsackie/Adenovirus Receptor
CBP: CREB Binding Protein
CD: Cluster of Differentiation
Cdk: Cyclin-dependent kinase
CE: Cellule Endothéliale
CL: Collagène
Co: Collagène
COX: Cyclooxygénase
DFO: Déferoxamine
kDa: kiloDalton
DID: Diabète Insulino-Dépendant
DNID: Diabète Non Insulino-Dépendant
DO: Densité Optique
EBP: E-box Binding Protein
EGF: Epidermal Growth Factor
EL: Elastine
ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases
Fb: Fibroblastes
FDA: Fluorescéine Diacétate

FGF: Fibroblast Growth Factor
Fib: Fibrilline
FIH1: Facteur Inhibant HIF1
FK506: Tacrolimus
FRAP: FKBP-Rapamycin-Associated Protein
G6P: Glucose 6 Phosphate
GAD: Glutamate Acide Decarboxylase
GIP: Gastric Inhibiting Peptide
GK: GlucoKinase
GLP-1: Glucagon-Like Peptide-1
GRAGIL: Groupe de Recherche Rhin Rhône-Alpes Genève pour la transplantation d'Ilots de Langerhans
Grb2: Growth factor receptor binding protein 2
HbA1c: Hémoglobine glycosylée A1C
HBSS: Hank's Buffered Salt Solution
HDL: High Density Lipoprotein
HGF: Hepatocyte growth factor
HIF: Hypoxia Inducible Factor
HLA: Human Leukocyte Antigen
HRE: Hypoxia Response Element
HRP: Horse Radish Peroxydase
HSV-1: Herpes Simplex Virus de type 1
IAK: Islets After Kidney transplantation
IBMIR: Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction
ICA: Islet Cell Antibody
IEQ: Islet Equivalent
IGF: Insuline like Growth Factor
IL: Interleukine
IP3: Inositol triPhosphate
IRS: Insulin Receptor Substrate
ITR: Inverted Terminal Repeat
Kb: Kilobase
LDL: Low Density Lipoprotein
LTR: Long Terminal Repeat
Lys: Lysine
MAP kinases: Mitogen-Activated Protein kinases
MB: Membrane Basale
MEC: Matrice ExtraCellulaire
MMF: Mycophénolate MoFétil
M-MLV: Moloney Murine Leukemia Virus

mmHg: millimètre de mercure
MMP: Métalloprotéinase matricielle
MNK: MAPK-interacting kinase
MOI: Multiplicity Of Infection
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase
NO: Nitric Oxyde
NOS: Nitric Oxide Synthase
ODDD: Oxygen Dependent Degradation Domain
OGM: Organisme Génétiquement Modifié
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
PAGE: Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
PAI-1: Inhibiteur des activateurs du plasminogène
PAK: Pancreas After Kidney transplantation
pb: paire de bases
PBS: Phosphate-Buffered Saline
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PDX-1: Pancreas Duodenum Hoeobox-1
PFA: Paraformaldéhyde
PHD: Prolyl Hydroxylases
PI: Propidium Iodure
PI3 kinase: Phosphatidyl Inositol 3-kinase
PIP2: Phosphatidyl-Inositol-diPhosphate
PKB: Protéine Kinase B
PKC: Protéine Kinase C
PLC: Phospholipase C
PIGF: Placenta Growth Factor
PR: Péricyte
Pro: Proline
PTA: Pancreas Transplantation Alone
RAC: Risk Assessment Corporation
RER: Réticulum Endoplasmique Rugueux
RIN: Rat INsulinoma
ROS: Reactive Oxygen Species
rpm: round per minute
RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SDS: Dodécyl Sulfate de Sodium
Ser: Sérine
Shc: Src homologous and collagen protein
SIK: Simultaneous Islets and Kidney transplantation

SMC: Smooth Muscle Cells
SPK: Simultaneous Pancreas and Kidney transplantation
STZ: Streptozotocine
SVF: Sérum de Veau Fœtal
TBS: Tris-Buffered Saline
TGF: Transforming Growth Factor
TMB: 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNF: Tumor Necrosis Factor
uPAR: urokinase Plasminogen Activator Receptor
UV: Ultra Violet
UW: University of Wisconsin
V: Volt
VAA: Virus Associés aux Adénovirus
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL: protéine de Von Hippel-Lindau
vi: viral infection
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine
Vp: Viral particule
X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

1. Introduction

1.1. Le diabète

1.1.1. Définition

Le diabète dit sucré est une maladie liée à une défaillance des mécanismes biologiques de régulation de la glycémie. Il s'agit d'une maladie chronique due à une carence ou à un défaut d'utilisation de l'insuline. Cette carence ou ce défaut entraîne une hyperglycémie, ce qui a de multiples conséquences néfastes. En effet, le diabète entraîne, entre autres, des complications rénales, des atteintes du système nerveux, des maladies cardio-vasculaires et peut causer la cécité. En pratique, on distingue le diabète insulino-dépendant (diabète de type 1) marqué par une carence absolue en insuline et le diabète non insulino-dépendant (diabète de type 2). Ainsi, on distingue les sujets normaux, les sujets hyperglycémiques non diabétiques (glycémie entre 1,10 et 1,25 g/L à jeun), les diabétiques (glycémie supérieure ou égale à 1,26 g/L à jeun, ou glycémie supérieure à 2 g/L à la 2^{ème} heure de l'hyperglycémie provoquée par voie orale) et les intolérants au glucose (glycémie comprise entre 1,40 et 2 g/L à la 2^{ème} heure de l'hyperglycémie provoquée par voie orale).

1.1.2. Histoire du diabète

Le diabète occupe une place singulière dans l'histoire de la médecine. Le texte le plus ancien qui y fait mention est le papyrus d'Eber, écrit en 1550 ans avant J-C. A cause de ses symptômes typiques, (urine abondante et sucrée, soif et faim excessives), il a pu être observé et décrit par les plus grands médecins dont Aristote, Galien, Avicenne et Paracelse. Le terme de diabète à proprement dit est attribué à Demetrios d'Apnée (275 avant J-C). Il provient du grec dia-baino qui signifie « passer au travers ». Les médecins grecs anciens avaient observé ce syndrome : les malades semblaient uriner aussitôt ce qu'ils venaient de boire, comme s'ils étaient "traversés par l'eau" sans pouvoir la retenir. Le terme latin « diabetes » est attribué à Arétée de Cappadoce (premier siècle avant J-C) qui a fait également une description de la maladie. Le nom de diabète mellitus

remonte au 16^{ème} ou 17^{ème} siècle lorsque le Dr Thomas Willis, médecin personnel du roi Charles II d'Angleterre, décrit que l'urine diabétique était merveilleusement sucrée comme si elle était imprégnée de miel ou de sucre. C'est à ce moment qu'il ajouta le nom de "diabète mellitus". Durant le 18^{ème} siècle, les médecins s'aperçurent que les patients présentant du diabète mellitus abaissaient leurs symptômes lorsqu'ils diminuaient leur consommation de sucre. Différentes diètes utilisées à cette époque permettaient de plus un amaigrissement. En 1848, Claude Bernard démontre la fonction glycogénique du foie, et c'est grâce aux travaux d'Oscar Minkowski et Joseph Von Mehring que le rôle du pancréas fut découvert en 1886 à l'université de Strasbourg. Ils notèrent qu'en enlevant le pancréas des chiens, ceux-ci devenaient diabétiques. À partir de ce moment, les chercheurs se mirent à chercher cette molécule appelée "Insuline" qui était responsable de la régularisation du sucre au niveau sanguin. En 1879, le Français Emile Lancereaux distingue, le premier, le diabète maigre (appelé encore diabète juvénile, diabète insulino-dépendant ou DID et plus tard diabète de type 1) du diabète gras (ou diabète de la maturité, diabète non insulino-dépendant ou DNID puis diabète de type 2 selon la dénomination actuelle). En août 1921, Paulesco à Bucarest fit la découverte d'une hormone pancréatique hypoglycémisante qu'il appela pancréine. Quelques mois après, en décembre 1921 à Toronto, les chercheurs canadiens, Frédéric Grant Banting et Charles Herbert Best (1) publient aussi la découverte d'une hormone pancréatique hypoglycémisante qu'ils appelèrent insuline (c'est cette dernière dénomination qui sera utilisée). Ils réussirent à isoler et à mettre au point une méthode de préparation des extraits pancréatiques à la fois sûre et efficace pour la production d'insuline, ce qui leur a valu un prix Nobel en 1923. Cette découverte a révolutionné le traitement du diabète, ainsi que la prévention de ses complications puisque jusqu'alors le diabète de type 1 était mortel pour les personnes atteintes. En effet, le 11 janvier 1922, pour la première fois, de l'insuline fut injectée à Léonard Thompson, un garçon de 14 ans en état d'acidocétose et à l'article de la mort. À ce moment, l'insuline lui sauva la vie et depuis ce jour, des millions d'êtres humains sont traités à l'insuline pour contrôler le diabète. Ce fut une découverte très importante pour les diabétiques de type 1 qui purent survivre à l'apparition de leur

maladie. Après l'apparition d'un traitement, la communauté médicale s'est aperçue graduellement que les patients mouraient peu de problèmes d'acidocétose et de coma diabétique mais que des complications à long terme apparaissaient au niveau oculaire, au niveau rénal, au niveau cardiovasculaire. Les mécanismes conduisant aux différentes formes de la maladie commencent à être précisés à partir de la deuxième moitié du 20^{ème} siècle, avec notamment la mise au point en 1959 par Salomon Berson et Rosalyn Yalow, de la méthode de radio-immunologie et le dosage de l'insuline (2).

La compréhension du diabète de type 1 et de ses mécanismes auto-immuns progresse avec la découverte en 1965 par Willy Gepts, de « l'insulite » (3), c'est-à-dire de l'infiltration par des cellules immunitaires des îlots de Langerhans au début du diabète de type 1. C'est en 1974 que furent découverts les auto-anticorps dirigés contre la cellule β par Gian Franco Botazzo du groupe de Deborah Doniach (4). En 1976, Andrew Cudworth (5) montre que la prédisposition génétique du diabète de type 1 est sous la dépendance, au moins en partie, des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité.

Enfin, la communauté médicale s'est vite rendue compte qu'il ne suffisait pas de contrôler l'acidocétose et le coma diabétique pour éviter les complications. Graduellement, le monde médical s'est aperçue qu'il fallait normaliser la glycémie chez tout patient diabétique pour éviter les complications à long terme.

1.1.3. Epidémiologie du diabète

En France, plus de 3 millions de personnes sont diabétiques, 15 % sont diabétiques insulino-dépendants (type 1) et 85% non insulino-dépendants (type 2). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diabète est un véritable problème de santé publique aussi bien en France, où l'on dénombre environ 3,5% de diabétiques, mais aussi en Europe où le nombre de diabétiques est évalué à 48 millions, et aux Etats-Unis où il y a 15 millions de diabétiques pour moitié méconnus. Les spécialistes estiment que plus de 500 000 français sont diabétiques sans le savoir. La répartition géographique de la maladie prend la forme étonnante d'un sablier. Avec des prévalences de diabète

de type 2 importantes (> 4%) en Europe du sud : Grèce, Italie, Portugal, Espagne, et en Europe du Nord : Finlande, Suède. Dans le monde entier, 246 millions de diabétiques peuvent être dénombrés et les prévisions font état d'au moins 380 millions de diabétiques d'ici à 2025.

La prévalence du diabète augmente parallèlement au vieillissement, à l'urbanisation, à la sédentarisation et au développement de l'obésité dans les populations des pays industrialisés. Cette maladie n'épargne pourtant pas les pays en voie de développement où le diabète non insulino-dépendant atteint parfois une prévalence de 20 à 30%, en raison d'une prédisposition génétique couplée à une modification rapide du mode de vie : urbanisation brutale, sédentarisation et alcoolisation des populations.

Le nombre de décès attribués au diabète a été estimé à un peu plus de 800 000, mais on sait depuis longtemps que ce chiffre a été largement sous-estimé. En réalité, il est plus probable qu'il se situe aux alentours de 4 millions de morts par an, soit 9% de la mortalité totale. En fait, le nombre des décès en relation avec le diabète est plus particulièrement dû à des complications cardiovasculaires.

1.1.4. Le diabète non insulino-dépendant ou DNID ou diabète de type 2

Le diabète non insulino-dépendant ou diabète de type 2 résulte de la conjonction de plusieurs gènes de susceptibilité, dont l'expression dépend de facteurs environnementaux, au premier rang desquelles, la consommation excessive de graisses saturées, de sucres rapides et la sédentarité.

L'insulino-déficience responsable de l'hyperglycémie du diabète de type 2 est précédée par 10 ou 20 ans d'hypersécrétion insulinique (hyperinsulinisme) secondaire à une insulino-résistance des tissus périphériques. Les anomalies métaboliques fondamentales qui précèdent le diabète de type 2 sont les insulino-résistances musculaire et hépatique.

1.1.5. Le diabète insulino-dépendant ou DID ou diabète de type 1

Autrefois appelé diabète insulino-dépendant (DID, ou encore diabète juvénile), cette maladie

est une forme de diabète sucré qui apparaît le plus souvent de manière brutale chez l'enfant ou chez le jeune adulte. Il se caractérise par une émission d'urine excessive (polyurie), une soif intense (polydipsie) et un appétit anormalement augmenté (polyphagie). Il a aussi pour conséquence un amaigrissement malgré une prise de nourriture abondante, une hyperglycémie supérieure à 2 g/L (la limite supérieure étant de 1,26 g/L à jeun) avec parfois présence d'acétone dans les urines et d'une haleine «de pomme reinette» caractéristique.

Le diabète de type 1 est dû à une destruction auto-immune des cellules insulino-sécrétrices dites cellules β . L'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 à 20% de cellules β fonctionnelles. Le processus auto-immun responsable d'une « insulite » pancréatique se déroule sur de nombreuses années (5 à 10 ans voire plus, avant l'apparition du diabète). Cette réaction auto-immune survient sur un terrain de susceptibilité génétique à la suite de facteurs déclenchant et peut être dépistée avant l'apparition de l'hyperglycémie par des dosages sanguins d'auto-anticorps.

Le terrain de susceptibilité génétique est décrit par une susceptibilité plurigénique avec au moins 10 gènes en cause :

- Le 1^{er} et le principal se situe sur le chromosome 6 au niveau des gènes ou du système HLA de classe II avec un risque relatif de 3 à 5, lorsqu'il existe un antigène HLA DR3 ou DR4. Le risque relatif atteint 20 à 40 lorsque les deux antigènes DR3 et DR4 sont associés, ce qui veut dire que l'association DR3-DR4 est fréquente dans la population diabétique alors qu'elle est exceptionnelle dans la population non diabétique. Ainsi, le risque pour des frères et sœurs peut être précisé en fonction de l'identité HLA avec le diabétique. Le risque est de 15% lorsque les frères ou sœurs présentent les deux haplotypes HLA en commun avec le diabétique. Il n'est que de 7% lorsqu'ils n'ont qu'un seul haplotype en commun et il est inférieur à 1 % lorsque les deux haplotypes sont différents.

- Le 2^{ème} gène repéré se situe dans la région du gène de l'insuline mais d'autres régions du génome sont impliquées. Leur étude permettra peut-être d'améliorer le dépistage du risque génétique. Mais elle devrait surtout permettre de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie.

Il est important de connaître le risque de survenue d'un diabète insulino-dépendant dans la fratrie d'un enfant diabétique ou lorsque l'un des deux parents est diabétique. Le risque pour une mère diabétique insulino-dépendante d'avoir un enfant diabétique est environ 2% alors que le risque est de 4 à 5% lorsque c'est le père qui est diabétique insulino-dépendant.

De plus, des facteurs environnementaux sont probablement à l'origine du déclenchement du processus auto-immunitaire, qu'il s'agisse de facteurs nutritionnels, toxiques ou viraux.

Le rôle des virus dans la pathogénie du diabète de type 1 est suspecté mais non démontré. En faveur de cette hypothèse, la haute prévalence du diabète de type 1 (environ 20%) en cas de rubéole congénitale ou la présence du virus coxsackie B4 isolé dans le pancréas d'enfant décédé lors d'une acido-cétose inaugurale. Certains virus pourraient présenter un antigène commun avec des protéines de cellule β (virus coxsackie ou cytomégalovirus).

L'infection virale pourrait être responsable de la sécrétion de cytokines, en particulier d'interféron γ , favorisant par différents mécanismes le développement de la réaction auto-immune au niveau pancréatique.

La destruction de la cellule β est essentiellement due à une infiltration des îlots par des lymphocytes T helper CD4 et des lymphocytes T cytotoxiques CD8. Ce processus se déroule à bas bruit pendant plusieurs années. Au cours de cette réaction sont produits des auto-anticorps dirigés contre certains antigènes pancréatiques. Ces auto-anticorps n'ont pas en eux-mêmes de rôle pathogène mais sont des marqueurs fiables du déroulement du processus auto-immun pathologique.

Ces anticorps sont essentiellement au nombre de 4 :

- Les anticorps anti-îlots (islet cell antibody: ICA).
- Les anticorps anti-GAD (glutamate acide décarboxylase). Ces anticorps sont dirigés contre une enzyme ubiquitaire mais qui est exprimée au niveau pancréatique. Leur présence traduit l'existence d'un processus auto-immun dirigé contre les cellules β du pancréas.
- Les auto-anticorps anti-insuline, retrouvés surtout chez l'enfant.
- L'anticorps anti-IA2 : c'est un anticorps dirigé contre une phosphatase membranaire des cellules β .

La recherche de ces auto-anticorps peut être effectuée dans deux indications :

- Le dépistage des sujets en train de développer une insulite auto-immune à bas bruit, soit dans la fratrie d'un enfant diabétique, soit chez les enfants d'un parent diabétique. Plus l'on retrouve d'auto-anticorps différents, plus le risque de développer un diabète de type 1 est important. Ce dépistage a un intérêt soit pour rassurer l'entourage s'il est négatif, soit pour démarrer le plus tôt possible une insulinothérapie a minima qui pourrait retarder la destruction des cellules β . Certaines équipes proposent des traitements préventifs du diabète mais ceci reste dans le cadre de la recherche.
- Dans le cas d'un diabète qui ne présente pas toutes les caractéristiques du diabète de type 1 ou de type 2, on peut parfois être amené à rechercher la présence d'un ou plusieurs auto-anticorps qui est un argument pour un diabète d'origine auto-immune.

1.1.6. Complications liés au diabète et prévention

1.1.6.1. Complications liées au diabète

1.1.6.1.1. Complications aiguës

Les complications liées au diabète ont une origine commune: l'excédent de glucose dans le sang. Après un certain temps, une trop grande quantité de glucose dans le sang a des effets néfastes

sur les reins (néphropathie), les yeux (rétinopathie), le système neurologique (neuropathie), le cœur (infarctus) et les vaisseaux sanguins (hypertension, artériosclérose, etc.).

a) Hyperglycémie

Le coma acido-cétosique avec hyperglycémie apparaît en cas de déficit sévère en insuline. Il complique le diabète de type 1 insulino-dépendant le plus souvent. L'acidocétose peut révéler le diabète ou survenir à l'occasion d'une erreur thérapeutique ou d'une complication récurrente. La polyurie et la polydipsie sont majorées; des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales peuvent égarer le diagnostic. La déshydratation est constante. Il y a évolution vers des troubles de la conscience et vers le coma. Le diagnostic de certitude se fait d'après les urines (glycosurie, acétonurie), celui de gravité s'établit grâce au dosage de la glycémie. Le traitement fait appel à la réhydratation, l'alcalinisation et l'insulinothérapie intraveineuse continue. Le plus souvent, le pronostic est bon.

b) Hypoglycémie

L'hypoglycémie est une complication fréquente. Les causes d'hypoglycémies sont multiples. Dans le diabète de type 1, il s'agit d'une inadéquation entre le régime alimentaire, l'activité physique et la dose d'insuline. Dans le diabète de type 2, il peut s'agir d'interactions médicamenteuses avec un sulfamide hypoglycémiant (sulfamide anti-bactérien, anti-vitamine K, aspirine, certains AINS) ou de tares viscérales surajoutées (insuffisance rénale).

Le traitement de l'hypoglycémie repose sur l'administration de sucre sous plusieurs formes : boissons sucrées, morceaux de sucre si le patient est conscient ; perfusion intraveineuse de glucose à 30% si le patient est inconscient; injection intra-musculaire de glucagon, sauf en cas de traitement par sulfamide.

1.1.6.1.2. Complications chroniques

a) Maladies cardiovasculaires

Le diabète contribue à l'émergence des maladies cardiovasculaires. En effet, le diabète favorise le développement de l'athérosclérose au niveau des grosses artères et augmente ainsi le risque d'obstruction de vaisseaux sanguins près du cœur (infarctus), au cerveau (ACV) ou aux pieds (gangrène). L'âge, l'hérédité, l'hypertension, l'embonpoint et le tabagisme influencent aussi leur apparition. Les diabétiques de type 2 ont souvent un profil qui les rend au départ plus à risque de ce genre de maladie. Les maladies cardiovasculaires sont deux à quatre fois plus fréquentes chez les diabétiques que chez les autres.

b) Néphropathie

Le terme néphropathie provient du grec nephros = rein. Le tissu des reins est constitué d'une multitude de minuscules vaisseaux sanguins qui forment un filtre dont le rôle est d'éliminer les toxines et déchets du sang. Comme le diabète cause des troubles vasculaires, ces petits vaisseaux peuvent en être affectés au point d'entraîner une détérioration progressive des reins qui se manifestera par divers troubles, allant de l'insuffisance rénale à la maladie rénale irréversible. Notons que l'hypertension contribue grandement aux troubles rénaux.

c) Neuropathie

La neuropathie est le nom générique donné aux affections qui touchent les nerfs et qui peuvent être passablement douloureuses, quelle qu'en soit la cause. Les troubles du système nerveux se développent dans les dix premières années du diabète chez 40% à 50% des personnes diabétiques de type 1 ou 2. Cela en raison d'une mauvaise circulation sanguine (donc d'un apport en oxygène insuffisant pour les nerfs) et du taux élevé de glucose, qui altère la structure des nerfs. Le plus souvent, le sujet ressent des picotements, des pertes de sensibilité et des douleurs qui se manifestent d'abord au bout des orteils ou des doigts, puis remontent progressivement le long des membres atteints. La neuropathie peut aussi toucher les nerfs qui contrôlent la digestion, la pression sanguine, le rythme cardiaque et les organes sexuels.

d) Rétinopathie

Le diabète peut conduire à une détérioration progressive de la vision. Il s'agit de la complication la plus fréquente : pratiquement toutes les personnes souffrant du diabète de type 1 développent des troubles oculaires, tandis qu'elle touche 60% des diabétiques de type 2. On appelle « rétinopathies » ces troubles aux yeux, même si d'autres parties de l'œil que la rétine peuvent être touchées (comme le nerf optique, par exemple). Cette détérioration peut mener à la formation de cataractes et au glaucome, voire à la perte de la vue.

e) Sensibilité aux infections

L'élévation de la glycémie et la fatigue parfois engendrée par la maladie, rendent les diabétiques plus à risque d'infections épisodiques parfois difficiles à guérir, notamment des infections de la peau, des gencives, des voies respiratoires, du vagin ou de la vessie. En outre, les troubles de la circulation sanguine peuvent avoir pour effet de ralentir le processus de cicatrisation après une blessure, ce qui peut causer des infections récalcitrantes dans les plaies.

1.1.6.2. Prévention des complications liées au diabète

La prise en charge du diabète requiert le contrôle des taux de glycémie. Plus le contrôle est renforcé, meilleure sera la prise en charge de la maladie. En effet, une prise en charge inadéquate du diabète sur une longue période peut entraîner des complications. En plus de la surveillance de la glycémie, il est important de surveiller la tension artérielle et les lipides dans le sang et de suivre quelques pratiques préventives pour les yeux, les reins et les pieds afin de limiter ou de retarder les complications liées au diabète.

Pour connaître le niveau de contrôle du glucose le test de l'hémoglobine A1c est réalisé. Une petite quantité du glucose qui se trouve dans le sang, en attente d'être utilisé par les cellules, se fixe de façon permanente aux globules rouges. Cette fixation se fait sur la molécule d'hémoglobine du globule rouge qui n'altère pas la capacité du globule rouge à contenir de l'oxygène. Chez le sujet non diabétique, l'organisme utilise le glucose dans les cellules d'une manière efficace et par conséquent il y a peu de glucose disponible pour s'attacher à l'hémoglobine. En revanche, chez le

patient diabétique, la quantité de glucose dans le sang est plus importante ce qui permet à une quantité plus importante de glucose de se fixer aux globules rouges. Ainsi, plus l'hémoglobine A1c est élevée, plus la quantité de sucre dans le sang est importante. Des études en Europe et dans d'autres pays du monde ont montré qu'une amélioration dans la prise en charge est bénéfique pour les diabétiques de type 1 ainsi que pour les diabétiques de type 2. D'une manière générale, pour une réduction de 1% du taux de l'hémoglobine A1c, le risque de développer des complications du diabète micro-vasculaires (yeux, reins et système nerveux) est réduit de 40%. De plus, le contrôle de la tension artérielle peut réduire les maladies cardio-vasculaires de 33 à 50% et peut réduire les complications micro-vasculaires (yeux, reins et système nerveux) d'environ 33%. En général, chaque réduction de 10 mm de mercure (mmHg) de la tension artérielle systolique entraîne une réduction d'environ 12% des complications liées au diabète. De même, un contrôle amélioré du cholestérol et des lipides (par exemple: HDL, LDL et triglycérides) peut réduire les complications cardio-vasculaires de 20 à 50%. De plus, la détection et le traitement des complications oculaires associées au diabète par la thérapie laser peut ralentir la progression d'une cécité d'environ 50 à 60%. De plus, les programmes d'entretien du pied peuvent diminuer le taux d'amputation de 45 à 85%. Enfin, la détection et le traitement au début d'une maladie rénale due au diabète peuvent réduire le développement de l'insuffisance rénale.

1.2. Insuline

1.2.1. Description

L'insuline est une hormone polypeptidique formée, après élimination du peptide C par hydrolyses, de deux chaînes de 21 et 30 acides aminés, reliées par deux ponts disulfures (6, Fig.1-1). Elle est sécrétée par les cellules β des îlots pancréatiques du pancréas et exerce un effet normoglycémiant. Elle fait partie du groupe des peptides appelés IGF (Insuline like Growth Factor) ou somatomédines.

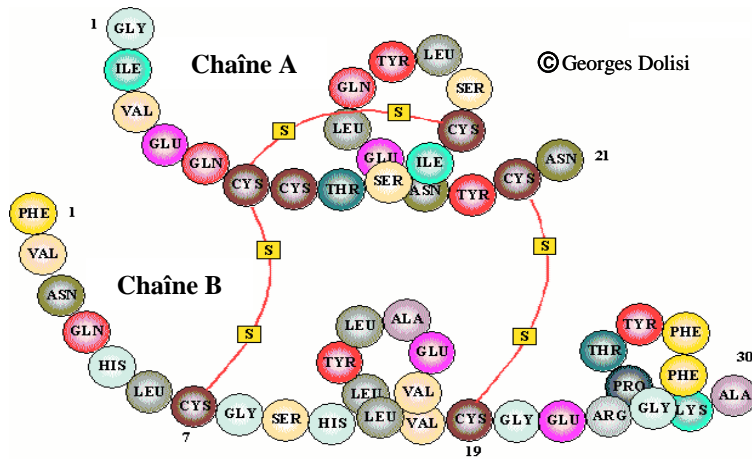


Figure 1-1: Insuline, chaînes A et B réunies par deux ponts disulfures et le peptide C.

1.2.2. Biosynthèse

L'insuline est produite dans les cellules β qui constituent 75% des îlots de Langerhans du pancréas. La biosynthèse de l'insuline s'amorce dans le noyau des cellules β , à partir de l'information contenue dans le code génétique, située sur le chromosome 11. La cellule β fabrique en premier un produit peu différencié, qui est une macromolécule : la pré-pro-insuline. Cette protéine, qui représente le produit de traduction de l'ARN messager de l'insuline, est constituée de pro-insuline agrandie d'une séquence peptidique supplémentaire de 2500 Da attachée sur l'extrémité aminotermine de la chaîne A. Depuis Steiner (1967), on sait que le produit immédiatement précurseur de l'insuline est la pro-insuline qui dérive donc de la pré-pro-insuline. La pro-insuline est synthétisée dans les ribosomes attachés au réticulum endoplasmique rugueux, sous le contrôle de la concentration des cellules β en calcium et glucose. Les ponts disulfures se forment, donnant sa structure définitive à la pro-insuline, qui s'accumule dans les citernes du réticulum endoplasmique rugueux (RER). La vitesse de cette étape serait rapide, de l'ordre d'une minute. La pro-insuline est composée de deux chaînes A et B de la molécule d'insuline et d'un troisième polypeptide, le peptide C (33 acides aminés) qui relie l'extrémité aminotermine de la chaîne A à l'extrémité carboxyterminale de la chaîne B (7). La synthèse se fait dans le cytoplasme, dans des régions riches en RER. La pro-insuline est ensuite transportée dans l'appareil de Golgi en moins d'une demi-heure. Là commence sa conversion en insuline pour se poursuivre dans les granules de stockage : l'étape de conversion, aboutissant à la formation d'insuline et de peptide C,

résulte d'actions enzymatiques (trypsine, carboxypeptidase B et probablement chymotrypsine) localisées à la face interne de la membrane du granule. Après leur formation, les granules de stockage augmentent de densité et renferment des inclusions semblables à des cristaux d'insuline entourées de peptide C. Le zinc contenu dans la cellule β favorise la formation d'hexamères d'insuline et de pro-insuline, en même temps qu'il protège l'insuline des attaques enzymatiques. (8, Fig.1-2).

Alors que la pro-insuline n'est normalement sécrétée qu'en petites quantités, insuline et peptide C sont sécrétés en quantité égale.

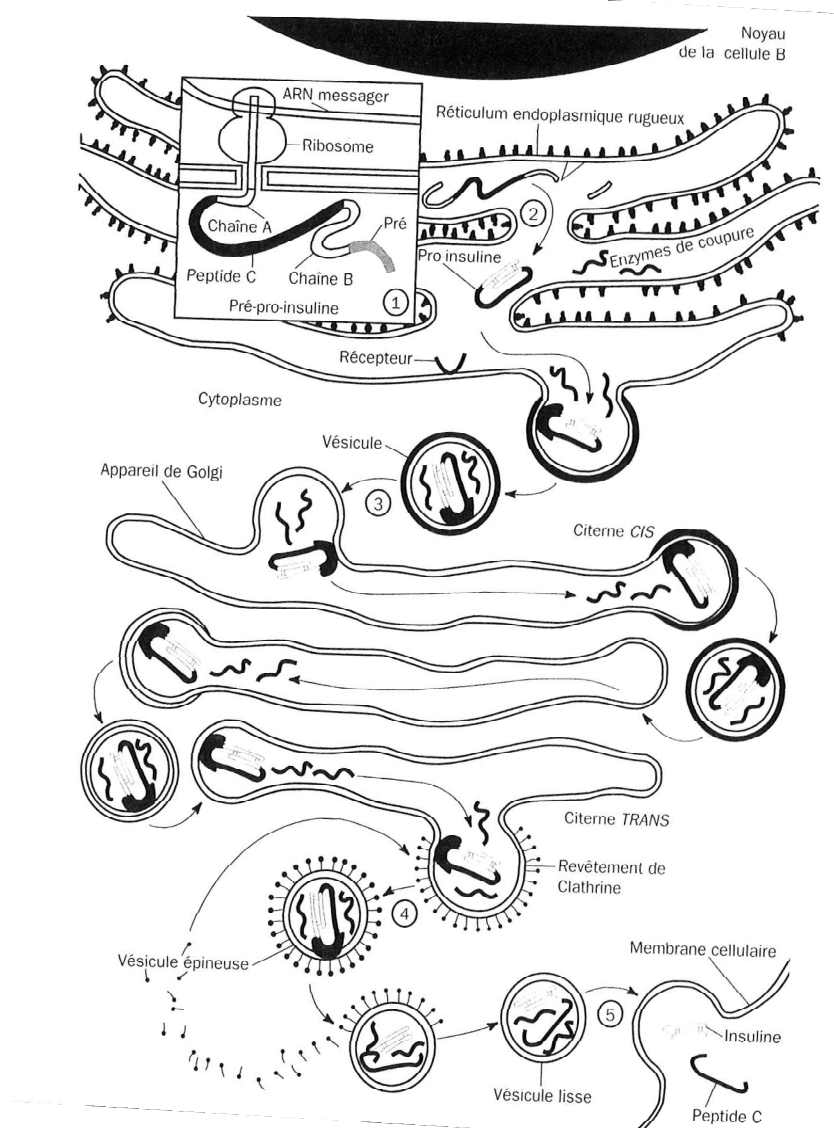


Figure 1-2: Etapes cellulaires de la biosynthèse de l'insuline (d'après Orci *et al.*, 1988).

- 1- Elaboration du précurseur (pré-proinsuline par les ribosomes)
- 2- Libération de la pro-insuline dans les cavités du réticulum endoplasmique
- 3- Scission dans les vésicules sécrétoires de la pro-insuline dans les vésicules de l'appareil de Golgi
- 4- Libération de l'insuline et du peptide C par exocytose

1.2.3. Régulation de l'insulinosécrétion

La régulation physiologique de l'insulinosécrétion est sous la dépendance des nutriments et des ions. Elle est modulée par des hormones d'action rapide et d'autres facteurs à plus long terme (9, Fig.1-3).

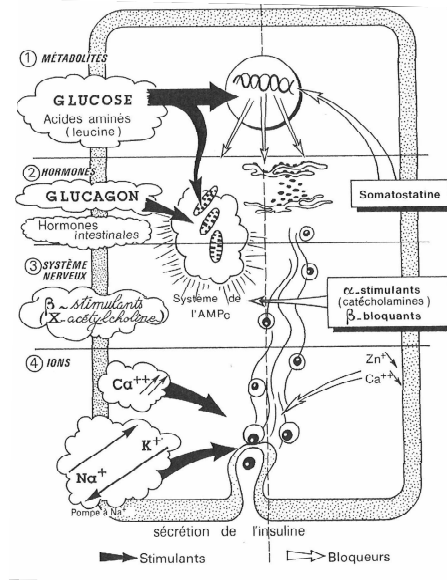


Figure 1-3: Sécrétion de l'insuline (d'après Perlemuter *et al.*, 2003).

1.2.3.1. Rôle des nutriments dans l'insulinosécrétion

a) Rôle du glucose

Le glucose représente l'agent insulino-stimulant le plus puissant. Le débit est étroitement lié à la concentration glucosée du plasma qui se manifeste pour des concentrations glucosées comprises entre 0,80 et 5 g/l. Le glucose stimule puissamment la synthèse de l'hormone qui se déroule en 2 phases: un premier pic précoce et intense, qui dure environ 3 minutes; une seconde phase durable et ascendante, qui tend vers un plateau (10, Fig.1-4). A chaque instant, la cellule β ajuste sa sécrétion au taux de glucose plasmatique, maintenant un taux glycémique stable. Le glucose pénètre dans la cellule grâce à une molécule appelée « transporteur du glucose » (11). Une fois dans la cellule, le glucose tient un double rôle. Un rôle énergétique par son métabolisme oxydatif aboutissant à la synthèse d'ATP, qui serait utilisé dans la libération de l'insuline et un rôle de signal de la sécrétion d'insuline.

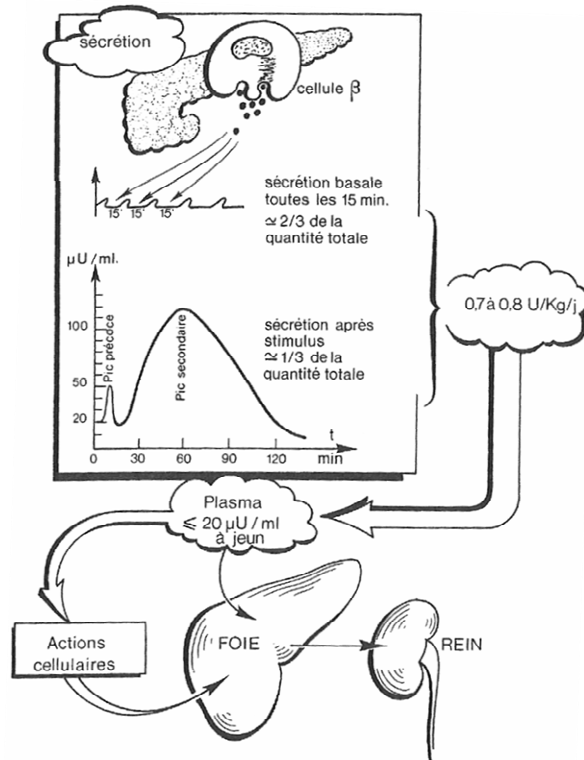


Figure 1-4: Sécrétion de l'insuline basale et pulsatile (d'après Perlemuter *et al.*, 2003).

b) Rôle des nutriments non glucidiques

Acides aminés

Suite aux travaux pilotes de Floyd *et al.*, (12), l'effet insulinothrompe de certains acides aminés est connu depuis plusieurs décennies. La L-leucine est le premier acide aminé dont le mode d'action en tant qu'agent insulinothrompe fut attentivement exploré (13). En bref, il fut d'abord établi que les effets de la L-leucine sur différents paramètres métaboliques et ioniques étaient parfaitement compatibles avec l'idée que son action insulinothrompe était étroitement liée à sa capacité d'agir comme nutriment dans les cellules insulaires. Par exemple, la L-leucine augmente la consommation d'oxygène par les îlots (14) et leur teneur en NADH et ATP, diminue la perméabilité membranaire au K^+ et affecte les mouvements du Ca^{2+} dans les îlots pancréatiques (15). De plus, l'effet insulinothrompe semble lié à la capacité de certains acides aminés d'agir comme nutriment dans les cellules insulaires et, dans le cas des acides aminés cationiques, à leur accumulation dans ces mêmes cellules (16). D'autres acides aminés augmentent la sécrétion d'insuline tels, que l'arginine, la lysine, la phénylalanine, la valine et la méthionine (17). Leur action est cependant conditionnée (à

l'exception de la leucine) par la concentration en glucose du milieu qui baigne les cellules β . Cependant, le mécanisme d'action des acides aminés est mal élucidé mais explique en partie qu'un repas mixte élève moins la glycémie qu'un repas glucidique. Enfin, l'action stimulante des acides aminés sur la sécrétion d'insuline semble se produire non pas sur la biosynthèse mais plutôt lors de l'émiocytose des granules d'insuline (16).

Acides gras

Un repas riche en lipide provoque une élévation du taux plasmatique des acides gras libres (AGL) induisant une augmentation de la réponse insulinaire au glucose (9). Les acides gras sont des substrats énergétiques majeurs de la cellule β des îlots pancréatiques (17, 18); ils stimulent l'insulinosécrétion en présence de concentrations normales ou élevées de glucose sanguin. Néanmoins, les effets insulinosécréteurs des acides gras sont faibles par rapport à leur contribution au métabolisme oxydatif des cellules β . Les acides gras utilisés par les cellules β ont plusieurs origines: les acides gras libres circulants, les acides gras contenus dans les lipoprotéines circulantes (les cellules β possèdent des récepteurs des LDL qui leur permettent de capter les lipoprotéines circulantes (19)) et les acides gras contenus dans les triglycérides stockés dans la cellule β . Des expériences récentes ont montré que l'exposition des cellules β à court terme (quelques heures) aux AGL potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, tandis que l'exposition à long terme (plusieurs jours) inhibe la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (20). In vivo, la sécrétion rapide d'insuline en réponse au glucose est la même chez le rat nourri ou à jeun, alors que la sécrétion tardive est diminuée chez le rat nourri. L'une des différences entre les deux groupes d'animaux est que la concentration en AGL est beaucoup plus élevée chez le rat à jeun (21). De plus, si l'on injecte un agent antilipolytique (acide nicotinique) au rat à jeun, afin de diminuer la concentration en AGL avant la perfusion de glucose, la sécrétion tardive d'insuline en réponse au glucose est supprimée. Si la concentration en AGL est maintenue par perfusion de triglycérides et d'héparine, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est restaurée. L'effet potentialisateur à court terme des acides gras sur l'insulinosécrétion en réponse au glucose est probablement dû à une

augmentation de la concentration d'acyl-CoA dans le cytosol. En effet, ceux-ci stimulent l'exocytose, soit directement, soit après formation de diacylglycérol, un stimulateur de la protéine kinase C (PKC) (22). De plus, l'excès d'acides gras libres dans le muscle entraîne une inhibition des mécanismes de la transmission du signal insulinique. L'accumulation de métabolites dérivés de ces acides gras libres (acyl-CoA et diacylglycérol) conduit à une activation de la protéine kinase C qui, en phosphorylant un résidu sérine (Ser) du substrat majeur du récepteur de l'insuline (IRS), entraîne une diminution du recrutement de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase) et donc une réduction du transport de glucose (23, Fig. 1-5). Bien qu'il existe une certaine controverse à ce sujet (22), l'exposition prolongée des îlots pancréatiques aux acides gras induit généralement in vivo une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (24, 25). En revanche, les études réalisées in vitro montrent clairement que l'exposition prolongée des îlots pancréatiques aux acides gras entraîne une inhibition de la sécrétion tardive d'insuline en réponse au glucose par le pancréas isolé et perfusé (22).

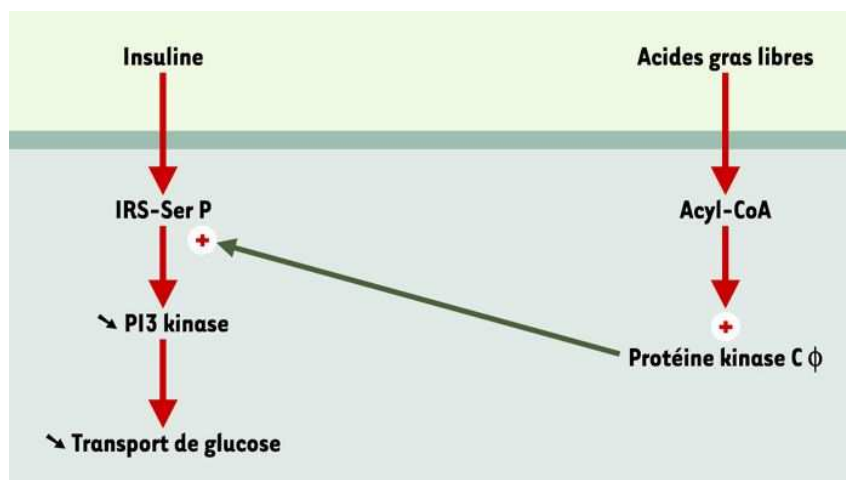


Figure 1-5: La reformulation des mécanismes biochimiques à l'origine du cycle «glucose-acides gras» dans les années 2000 (d'après Shulman *et al.*, 2000).

1.2.3.2. Rôle des ions

Les ions constituent des éléments primordiaux dans la libération de l'insuline et la régulation de l'insulinosécrétion. Le glucose, sur la membrane plasmique de la cellule β , pénètre facilement dans la cellule grâce à l'action d'une protéine favorisant l'entrée de ce sucre (transporteur de Glucose: Glut-2). Ce glucose va être phosphorylé par une glucokinase (GK). Le Glucose 6

Phosphate (G6P) produit est engagé dans deux voies de métabolisme importantes, la voie des pentoses phosphates et la voie de la glycolyse. Les résultats de ces voies métaboliques se traduisent par une élévation d'ATP intracellulaire qui inhibe alors les canaux K-ATP dépendants situés au niveau de la membrane cellulaire. Ainsi, la fermeture de ces canaux est accompagnée d'une dépolarisation des cellules qui permet l'ouverture de canaux Ca^{2+} . Le calcium intracellulaire va alors augmenter et se fixer sur la calmoduline pour former un complexe provoquant la phosphorylation de protéines du cytosquelette et des microfilaments. Ces modifications vont favoriser la migration des grains contenant l'insuline vers la membrane de la cellule β . Il y a ensuite fusion et exocytose vers le courant circulatoire. De plus, les cellules peuvent recevoir des informations mettant en jeu des enzymes membranaires (phospholipase C = PLC) qui stimulées par PIP₂, donnent l'Inositol triphosphate (IP₃) provoquant la libération du calcium contenu dans les organites du cytoplasme. Il se forme alors le complexe calmoduline- Ca^{2+} qui favorise l'exocytose de l'insuline (26, Fig. 1-6, 24).

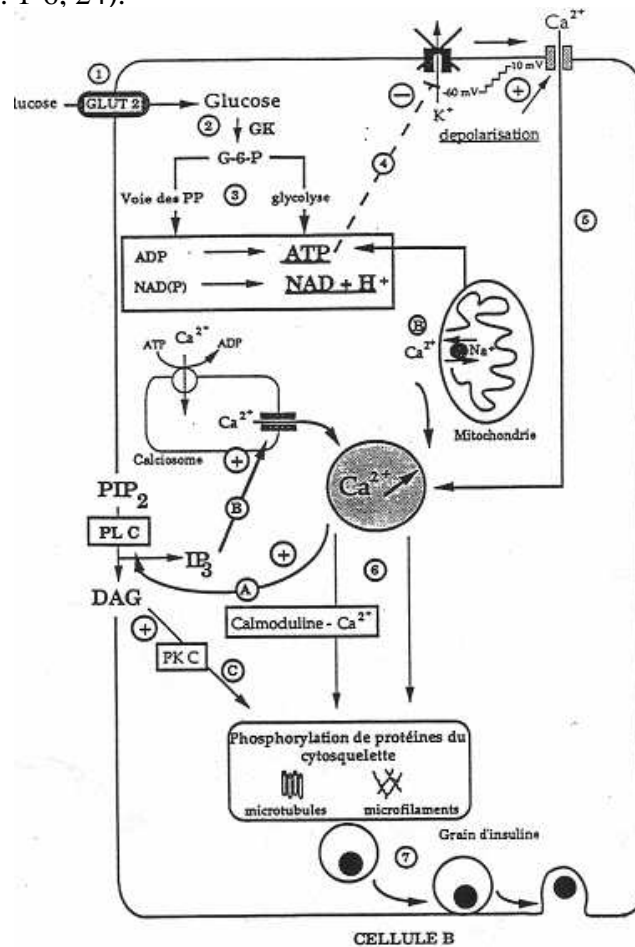


Figure 1-6: Mécanismes intracellulaires principaux de la sécrétion d'insuline par le glucose dans la cellule β (27)

1.2.3.3. Régulation hormonale rapide

A l'état physiologique, trois hormones sont inhibitrices et trois autres sont stimulantes de la sécrétion d'insuline.

a) Hormones inhibitrices

L'insuline a une action de rétrocontrôle sur sa propre sécrétion. Tout excès d'insuline met au repos la cellule β et inversement. Cette action semble avoir un effet majeur pour équilibrer le fonctionnement des cellules β chez le diabétique. L'adrénaline (comme les autres catécholamines) a un puissant effet inhibiteur sur la synthèse et la sécrétion de l'insuline sans que le mécanisme en soit réellement connu. La somatostatine bloque la sécrétion d'insuline et de glucagon. Elle diminue l'insulinémie de base, ainsi que la libération d'insuline provoquée par le glucose. Ceci est dû à une action directe de l'hormone sur la cellule β .

b) Hormones stimulantes

Les agents cholinergiques stimulent la sécrétion d'insuline; cet effet semblable à celui du nerf pneumogastrique est inhibé par les atropiniques; elle est impliquée dans la réponse insulinaire de la prise d'aliments.

Le glucagon a chez l'homme un effet insulino-sécréteur qui paraît dépendre de la concentration en glucose du milieu extracellulaire. Le glucagon, dont on connaît la puissance d'action hyperglycémiant, équilibre en sorte ses actions.

Certaines hormones gastro-intestinales sont stimulantes: le polypeptide pancréatique sécrété par les cellules endocrines dans les îlots pancréatiques mais dont le rôle physiologique est imparfaitement connu; le GIP (Gastric Inhibiting Peptide) qui est responsable de la phase céphalique de la sécrétion d'insuline, c'est-à-dire du pic précoce d'insulinosécrétion. Il agit en synergie avec le glucose. Ou bien encore le GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) qui est un polypeptide à effet anorexigène sécrété par le tractus digestif au cours de la prise alimentaire. Le principal effet du GLP-1 est de stimuler la sécrétion d'insuline et de réduire la sécrétion de glucagon. Il inhibe par ailleurs la sécrétion et la

motilité gastriques et, par action hypothalamique, il réduit l'appétit et la prise alimentaire.

1.2.4. Actions physiologiques de l'insuline

L'insuline stimule le processus anabolique et la mise en réserve de l'énergie. Elle agit essentiellement sur 3 organes cibles et sur le métabolisme glucidique et lipidique des divers tissus périphériques. Son action métabolique générale s'exerce en favorisant l'entrée de certains substrats dans les cellules et en agissant sur le métabolisme cellulaire de ces substrats (28).

a) Effet sur le foie

Le foie est le siège de la néoglucogenèse (29). Le glucose y est produit à partir de précurseurs issus du catabolisme protidique et lipidique. L'insuline stimule la synthèse de la glucokinase, qui est une hexokinase spécifique du foie, favorisant la formation de G6P et sa transformation en glycogène (ce qui accroît son effet hypoglycémiant) ou son utilisation (glycolyse). Elle stimule aussi la lipogenèse hépatique et inhibe l'effet cétoène du glucagon (30). Elle possède également sur les protides une action à la fois anabolique et anti-catabolique. De plus, des études ont mis en question l'insulino-sensibilité du foie en mettant en évidence que la production hépatique de glucose diminuait lentement quand l'insulinémie systémique, et non portale, augmentait (31).

b) Effets sur le tissu adipeux

Le tissu adipeux constitue le principal réservoir d'énergie de l'organisme et la source des AGL. Par ailleurs, ces derniers, dont la diminution de concentration plasmatique est fortement corrélée à la suppression de la production hépatique de glucose, sont connus pour stimuler la gluconéogenèse (32). Enfin l'insuline diminue la libération des AGL par le tissu adipeux en inhibant la lipolyse et favorisant la lipogenèse (33). Ainsi, le mode de contrôle de la production hépatique de glucose par l'insuline peut être d'une part indirect, par la régulation de la libération des acides gras non estérifiés à partir des adipocytes et d'autre part, direct, via la néoglucogenèse.

c) Effets sur le muscle strié (squelettique et cardiaque)

L'insuline stimule la synthèse du glycogène par stimulation de l'hexokinase, mais elle stimule surtout la glycolyse. Elle inhibe la protéolyse et la lipolyse musculaires et favorise le transport actif de certains acides aminés à travers la membrane cellulaire (28).

d) Effets périphériques (adipocytes et muscles)

L'insuline stimule le transport du glucose par l'intermédiaire des transporteurs du glucose. Parmi les différentes formes de transporteurs aujourd'hui identifiés (Glut 1 à Glut 6), seul le Glut 4, présent principalement dans les tissus adipeux et musculaires, voit son activité et sa synthèse accrues par l'effet de l'insuline (34, 35). Les Glut 1 ubiquitaires sont, pour l'essentiel, régulés par la concentration du glucose assurant ainsi un apport énergétique aux tissus dont la fourniture en glucose est vitale (système nerveux, placenta en particulier, 36).

Les Glut 2, présents dans le foie et les cellules β pancréatiques, sont régulés par la glycémie et non par l'insuline (37). Le glucose est transformé ensuite en G6P dont les 3 voies métaboliques (glycolyse, voie des pentoses phosphates et glycogénogenèse) sont stimulées par l'insuline. De plus, en stimulant la lipogenèse, l'insuline augmente la cholestérolémie. Enfin sur les protéines, l'insuline exerce un double effet anabolique et anticatabolique (38, 39).

1.3. Les thérapeutiques du diabète de type 1

L'insulinothérapie est le principal traitement du diabète de type 1. Il s'agit d'un traitement substitutif par l'insuline exogène dont le but est de se rapprocher de la courbe de sécrétion physiologique d'insuline.

1.3.1. Insulinothérapie

1.3.1.1. Les différents types d'insuline

La plupart des insulines aujourd'hui disponibles sont produites par génie génétique (insertion du gène de la pro insuline humaine dans une bactérie ou une levure), ou par modification chimique de l'insuline de porc (47). L'utilisation d'insuline de séquence humaine a permis de réduire la

production par le patient, d'anticorps anti insuline par rapport à une insuline animale. Ceux-ci ne semblent pas responsables de l'apparition d'une résistance à l'insuline, mais peuvent perturber l'insulinémie par relargage de l'insuline et entraîner des hypoglycémies (48). Il existe quatre types d'insuline qui diffèrent par leur durée d'action après injection sous cutanée. Ces quatre types d'insuline sont tous à base d'insuline "ordinaire". C'est l'adjonction d'une quantité variable de protamine ou de zinc qui leur confère leurs propriétés pharmaco-cinétiques: ces complexes forment des cristaux (49).

Il existe donc **l'insuline d'action rapide** ("ordinaire") qui présente un délai d'action de 30 minutes et une durée d'action efficace 4 à 6 heures. C'est la seule insuline utilisable par voie intraveineuse, intramusculaire, par injection sous cutanée, ou intra péritonéale à l'aide de la pompe. Il existe également **une insuline d'action intermédiaire** avec un délai d'action 90 minutes et une durée d'action efficace de 12 heures. De même, on va trouver de **l'insuline d'action biphasique**. Il s'agit d'un mélange en proportions variables d'insuline rapide et d'action intermédiaire. De plus, le patient diabétique peut disposer d'une **insuline à longue durée d'action ou insuline lente** avec un délai d'action 2 à 3 heures et une durée d'action de 24 heures (50). Enfin, le but du traitement est de combiner les administrations d'insuline à durée d'action différente (insuline d'action rapide, intermédiaire, lente) pour obtenir des concentrations plasmatiques proches de l'insulinémie physiologique sans toutefois multiplier le nombre d'injections.

L'insuline, inactive par voie buccale, s'administre par voie parentérale et habituellement par voie sous-cutanée profonde sous forme de suspension injectable. Pour cela, il existe plusieurs systèmes d'administration de l'insuline en sous cutané : les seringues, les stylos et les pompes à insuline.

1.3.1.2. Stylo à injection

Un stylo injecteur (Fig. 1-7) est un moyen simple d'injecter l'insuline qui est contenue dans une cartouche située à l'intérieur du stylo. Les malades s'administrent alors eux-mêmes leur insuline par voie sous-cutanée. Avec ce système, Ils peuvent utiliser, en fonction de leur cinétique d'action,

les différents types d'insulines. Ainsi, l'utilisation combinée de ces types d'insuline permet aux malades d'obtenir une insulïnémie dont la concentration au cours du nycthémère tend à se rapprocher de l'insulïnémie physiologique. Il existe deux sortes de stylos injecteurs. Les stylos rechargeables, aussi appelés stylos réutilisables ou "à cartouche" et les stylos pré-remplis d'insuline, aussi appelés stylos "jetables" puisque l'ensemble du stylo est à jeter une fois vide. De plus, les stylos à insuline offrent le très net avantage d'injecter l'insuline d'une façon discrète et rapide. Par ailleurs, les aiguilles sont très fines, ce qui est confortable pour le patient. Chez les jeunes enfants et les personnes maigres, il peut être difficile d'injecter en sous-cutané, et l'injection intramusculaire accidentelle peut conduire à une hypoglycémie grave. C'est pourquoi, pour ces patients, il est préférable d'utiliser les stylos injecteurs, par rapport aux seringues, qui permettent de contrôler automatiquement la profondeur d'injection. De plus, la technique d'injection avec un stylo est simple, ce qui permet quelquefois de déléguer l'action d'injection d'une infirmière à une personne de la famille ou au patient lui-même, notamment dans le cas des enfants. Néanmoins, les injections répétées peuvent être douloureuses, même si des progrès considérables ont été réalisés concernant la taille de l'aiguille. De plus, il peut y avoir des effets locaux au niveau du site d'injection comme la lipoatrophie ou des réactions allergiques locales. De même, l'absorption de l'insuline est fortement affectée par le choix du site d'injection, la profondeur d'injection, la température et la vascularisation du tissu (51). Enfin, la cinétique d'action est modifiée en fonction de la dose injectée.



Figure 1-7: Stylos à injection

1.3.1.3. Pompes à insuline

La pompe à insuline est un appareil de petite dimension, discret et capable de perfuser en continu des quantités régulières d'insuline. De plus, plusieurs études ont montré qu'elle améliore le contrôle de la glycémie des malades, tout en diminuant les quantités d'insuline quotidiennes nécessaires. Cependant, elle est réservée à certains malades. Il existe alors 2 types de pompes à insuline: les pompes à insuline portables (externe) et les pompes implantables.

a) Pompe portable

Une pompe à insuline portable (Fig. 1-8) est un dispositif électronique de la taille d'un téléphone portable, qui se porte sur soi, et qui libère de l'insuline en continu par l'intermédiaire d'un cathéter placé en sous cutané. La pompe assure à la fois le débit insulinaire de base et les pics prandiaux d'insuline. De plus, une pompe à insuline externe permet une administration en continu de l'insuline (débit basal), adaptée aux besoins de l'utilisateur, avec des doses supplémentaires d'insuline (bolus) si nécessaire. Par ailleurs, une pompe est plus proche du fonctionnement normal du pancréas, en délivrant de l'insuline de façon continue avec un minimum de variation et de variabilité d'absorption. Ceci permet alors un meilleur contrôle de la glycémie pour la majorité des patients et une diminution du nombre d'hypoglycémies et hyperglycémies (52, 53). Cependant, le patient doit prendre sa glycémie et réguler le débit d'insuline ce qui reste contraignant. De plus une panne mécanique ou un blocage de l'appareillage sont susceptibles d'entraîner une acidocétose ou une hypoglycémie.



Figure 1-8: Pompe à insuline portable

b) Pompe implantable

Une pompe à insuline implantable fonctionne de la même manière qu'une pompe à insuline externe, avec 2 différences majeures. Elle est implantée sous la peau (la plupart du temps dans l'abdomen) et délivre ainsi l'insuline dans la cavité péritonéale et non dans les tissus sous cutanés. Par ailleurs, les pompes implantables utilisent une insuline hautement concentrée.

Une pompe implantable a la forme d'un disque de 8,1 cm de diamètre et de 2 cm d'épaisseur (Fig. 1-9). Elle est programmée en utilisant un communicateur externe. Contrairement aux pompes portables, les pompes implantables utilisent une insuline spéciale, hautement concentrée et sont remplies tous les 2 à 3 mois, selon les besoins en insuline du patient. Actuellement, les pompes à insuline implantables ne sont utilisées que dans plusieurs centres en Europe, par des médecins spécialisés.

Cependant, malgré les derniers rapports montrant que les pompes implantables permettent de réduire de façon significative les fluctuations glycémiques et d'améliorer la qualité de vie chez les diabétiques de type 1 (54), ce système reste une technique nécessitant un acte chirurgical lourd. De plus, les cathéters ne sont pas encore adaptés pour ce système et on observe chez les patients implantés des obstructions dues à un phénomène de cristallisation de l'insuline induisant un défaut de perfusion.

Ainsi, face aux divers problèmes rencontrés au travers des différents systèmes d'injection d'insuline, des recherches sont menées sur le développement de nouvelles voies d'administration d'insuline telles que l'insuline inhalée et l'insuline orale mais également sur la création d'un pancréas artificiel.



Figure 1-9: Pompe à insuline implantable

c) Pancréas artificiel

Le pancréas artificiel est formé d'une pompe délivrant de l'insuline en continu et d'un détecteur de glucose sanguin (Fig. 1-10). Le but de ce système est d'échapper à l'injection pluriquotidienne d'insuline, de réduire ou de supprimer complètement l'intervention humaine dans la prise en charge du diabète et d'obtenir un contrôle glycémique renforcé.

La pompe, qui mesure environ 2 cm d'épaisseur sur 9 de largeur, est placée directement dans l'abdomen. Elle est dotée d'une pile capable de durer dix ans. Quant au réservoir contenant l'insuline concentrée, il doit être rempli tous les deux à trois mois à travers la peau grâce à une seringue. Actuellement, les systèmes les plus avancés sont en essais cliniques. Cependant, des problèmes liés à une cristallisation de l'insuline au niveau du cathéter et à la fiabilité du capteur empêchent la propagation de ce système.

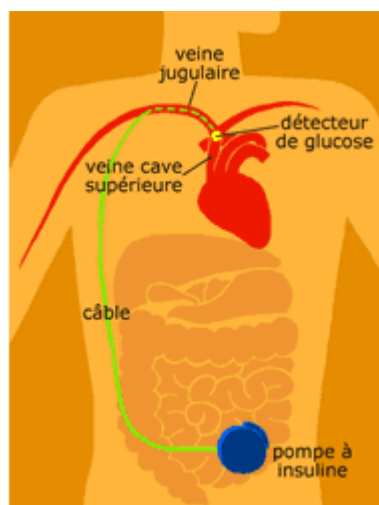


Figure 1-10: Principe du pancréas artificiel

d) Insuline inhalée

Des molécules de grande taille, comme l'insuline, peuvent difficilement être administrées par voie orale car elles sont détruites avant d'être assimilées dans le flux sanguin. Ainsi, le mode d'administration par aérosols présente de nombreux avantages. En effet, l'insuline se retrouve dans les poumons sous forme de millions de petites particules et peut atteindre le flux sanguin.

La première née de ces insulines est le résultat d'un programme de développement conjoint entre les laboratoires Sanofi-Aventis et Pfizer appelée Exubera[®]. Il s'agit d'une insuline d'action rapide devant être inhalée au moyen d'un dispositif spécial comprenant des doses sous plaquette thermoperforée et un inhalateur. L'Exubera[®] doit être administré dans les 10 minutes précédant le début du repas. Ces résultats montrent que l'insuline inhalée est particulièrement indiquée pour une utilisation en post-prandiale (55). Par ailleurs, quelques effets indésirables ont été notés lors des différentes études menées : les plus courants ont été l'hypoglycémie et la toux. Mais le mode d'administration peut poser problème pour certains patients. En effet, les fumeurs doivent avoir arrêté de fumer au moins 6 mois avant le début du traitement par Exubera[®] et ne pas reprendre sous peine de changer de traitement. De même, pour les patients présentant une fonction pulmonaire faible ou instable, comme l'asthme, l'emphysème ou la bronchite chronique, il est préférable de ne pas utiliser ce mode d'administration de l'insuline. De plus, l'insuline inhalée ne doit pas être utilisée chez les personnes susceptibles de présenter une hypersensibilité (allergie) à l'insuline humaine ou à l'un des autres ingrédients. Enfin, le développement d'anticorps anti-insuline chez certains patients nécessite aujourd'hui une surveillance particulière (56, 57).

L'insuline à inhaler Exubera[®] n'est plus disponible aux USA et dans certains pays européens où elle était distribuée. En dépit de la lourde charge de la promotion d'Exubera[®], les prescriptions s'élevaient à moins de 1% du marché de l'insuline aux USA. Exubera[®] n'a pas réussi à obtenir l'approbation des patients et des médecins, Pfizer en a conclu que la poursuite de l'investissement dans ce produit était injustifiée.

e) *Insuline orale*

Depuis de nombreuses années, différentes équipes essaient de mettre au point l'insuline administrée par voie orale. Ce mode d'administration se heurte d'une part à l'acidité gastrique qui détruit l'hormone et à une mauvaise absorption intestinale de l'insuline. Ainsi, de nombreuses études sont menées concernant la mise au point d'un matériau d'encapsulation de l'insuline qui permettra à cette dernière de franchir à la fois la barrière gastrique et la barrière intestinale et jouer son rôle de régulateur de la glycémie. Par exemple, Lin YH *et al.*, viennent de publier un mode original de protection de l'insuline permettant d'augmenter son absorption digestive (58). Cette équipe a eu l'idée d'enrober l'insuline dans une capsule dont les parois sont constituées de chitosane (un polysaccharide biocompatible et biodégradable extrait de la carapace de la crevette) et d'acide gamma-glutamique. La capacité d'absorption intestinale de cet assemblage a été testé *in vitro* avec succès sur des cellules intestinales CaCo-2 ce qui a permis de tester l'assemblage *in vivo* sur des rats diabétiques. Administré par voie orale, l'assemblage abaisse significativement la glycémie de 60% par rapport à sa valeur basale dès la 4ème heure après l'administration et durant 10 heures. De plus, l'efficacité glycémique est améliorée par la prise avant les repas, période où le pH gastrique est compris entre 2,5 et 3,7 (alors qu'il chute à 1,2 après un repas). Cette technologie paraît intéressante comme perspective d'administration de l'insuline et prouve l'avancée de cette recherche qui représente un grand espoir pour les patients diabétiques.

1.3.2. Transplantation de pancréas

La transplantation pancréatique se présente en théorie comme le moyen thérapeutique susceptible de rétablir le plus fidèlement la sécrétion endogène d'insuline, et de libérer définitivement le patient de toute contrainte de traitement insulinique en le rendant " insulino-indépendant " (59, 60, 61). En effet, les résultats de la transplantation pancréatique chez le patient diabétique de type 1 sont devenus tout à fait acceptable, avec un taux de patients insulino-indépendants pendant au moins 1 an, de 82% (62).

Le prélèvement du pancréas se fait le plus souvent chez des sujets en coma dépassé, l'appel à un

donneur vivant apparenté posant un double problème: celui de la récurrence du processus de destruction auto-immune du greffon comme cela a été démontré lors de transplantation entre jumeaux homozygotes, et celui du devenir du donneur, chez lequel on a pu observer des troubles de la tolérance au glucose après hémi-pancréatectomie (63). Le prélèvement du pancréas total ou segmentaire se fait le plus souvent lors de prélèvements multiples d'organes (cœur, rein, foie) et le temps d'ischémie froide peut aller jusqu'à 18-24 heures si l'organe est placé dans une solution de conservation (par exemple en présence de perfluorocarbones).

La greffe de pancréas entier s'adresse à des patients diabétiques de type 1 sans complications macrovasculaires majeures irréversibles, et ayant par exemple une fonction cardiaque ne présentant pas de risque anesthésique majeur. En effet, l'intervention chirurgicale est importante et comporte une morbidité non négligeable qui doit être expliquée aux patients avant l'intervention (64). Le pancréas peut être transplanté seul ou avec un greffon rénal, si le patient présente une insuffisance rénale terminale (61, 65). Différentes études ont analysé le rapport risque-bénéfice de la transplantation de pancréas, dans le cas de la greffe simultanée rein-pancréas, ou dans la greffe de pancréas après rein ou pancréas seul (66, 67). Les diverses études montrent que la survie des greffés rein-pancréas simultanés est meilleure que celle des patients demeurant en liste d'attente pour ce type de greffe. Pour la greffe de pancréas seul, les résultats sont controversés (66, 68).

Au niveau des résultats fonctionnels, les patients greffés de pancréas entier ont une survie du greffon à un an et trois ans de 78% et 66% pour les transplantations de pancréas seuls (PTA), de 81% et 68% pour les transplantations de pancréas ayant lieu après une greffe de rein (PAK) et 88% et 83% pour les transplantations simultanées reins-pancréas (SPK, 67).

Au niveau de l'immunosuppression, différentes combinaisons sont proposées. Dans leur méta-analyse, Demartines *et al.*, propose une quadruple immunosuppression, consistant en une thérapie d'induction (daclizumab ou anticorps antithymocytes), du tacrolimus (FK506), du mycophénolate mofétil (MMF) ou un de ses dérivés ainsi que des stéroïdes (69).

Finalement, au niveau du rapport coût-bénéfice, la greffe de rein-pancréas simultanée est

avantageuse quand on la compare au traitement classique de dialyse ou greffe de rein et insulinothérapie (69).

1.4. Diabète de type 1 et thérapie cellulaire

1.4.1. Les îlots pancréatiques

Les îlots pancréatiques sont des amas de cellules dispersés dans le pancréas qui représentent approximativement 1% de ce dernier. Chaque îlot est composé de différentes cellules endocrines jouant un rôle dans la synthèse et la sécrétion des hormones responsables du maintien de l'homéostasie du glucose (70). Ainsi, 4 types cellulaires sont présents dans les îlots, les cellules α , β , δ et PP, qui produisent chacune une hormone spécifique (71, Fig.1-11). Le glucagon est produit par les cellules alpha et l'insuline par les cellules β de chaque îlot ; les cellules delta sécrètent la somatostatine qui a un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline et de glucagon ; les cellules PP produisent le polypeptide pancréatique. La distribution de ces cellules est particulière d'une espèce à une autre (71). En effet, chez la souris chaque îlot pancréatique est constitué d'une masse centrale de cellules à insuline tandis que les cellules à glucagon, à somatostatine et à polypeptide pancréatique se localisent à la périphérie de l'îlot (71, Fig. 1-12). En revanche, chez le singe et l'humain, la répartition des cellules semble se faire au hasard tandis que chez le porc les cellules β s'organisent sous forme de petites unités (71, Fig. 1-12). Il faut noter également que la proportion de ces cellules varie selon qu'elles se situent dans la partie basse de la tête du pancréas ou, au contraire, dans la partie haute, le corps ou la queue du pancréas. La fonction des îlots pancréatiques est de détecter les variations physiologiques du glucose dans la circulation sanguine afin de sécréter les hormones adaptées pour répondre en temps réel à ces variations. En réalité, le contrôle métabolique, en condition normale, fait intervenir un complexe d'interaction entre les cellules pancréatiques, l'innervation, les incrétines et des métabolites du sang (72, 73).

Ainsi, de part ses propriétés fonctionnelles, l'îlot de Langerhans constitue un outil thérapeutique intéressant pour restaurer le contrôle physiologique de la glycémie chez le patient diabétique de

type 1.

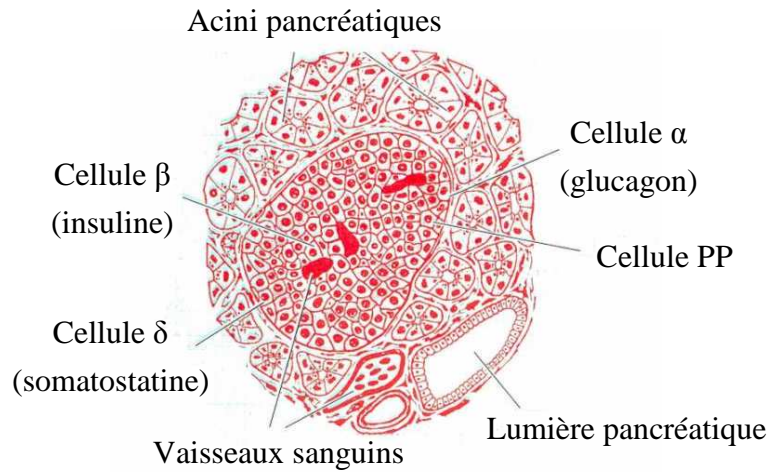


Figure 1-11: Schéma d'un îlot pancréatique

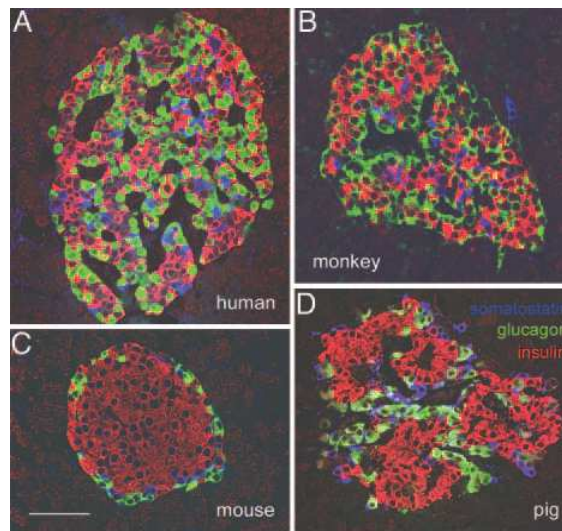


Figure 1-12: Détection par microscopie confocale de la distribution des cellules endocrines dans les îlots pancréatiques humains (A), de singe (B), de souris (C) et de porc (D) (d'après Cabrera *et al.*, 2006).

1.4.2. Greffe d'îlots pancréatiques

De nos jours, la restauration de la fonction insulino-sécrétrice des cellules β par la greffe d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à la greffe de pancréas pour les patients présentant un diabète de type 1 instable (70, 74, 75). Ainsi, l'objectif principal d'une transplantation d'îlots est d'obtenir une normoglycémie, d'améliorer la qualité de vie et de réduire les risques de rétinopathies, néphropathies et de neuropathies.

1.4.2.1. Historique de la greffe d'îlots

Dès les années 1970, la transplantation d'îlots a été considérée comme une alternative à la transplantation de pancréas, qui, à l'époque, en était encore à un stade expérimental. La greffe d'îlots a été rendue possible par le développement, en 1967, d'une méthode d'isolement des îlots dans le tissu pancréatique (76). Après des essais fructueux chez l'animal, la première transplantation autogène d'îlots a été réalisée en 1974 par David Sutherland à Minneapolis (77, 78). En 1977 a eu lieu la première greffe allogène d'îlots (79). Ces essais n'ont toutefois jamais permis aux patients de renoncer à l'apport extérieur d'insuline. En 1978, à Zurich, Felix Largiader réalisait en première mondiale une greffe combinée d'îlots et de rein. En 1980, à Zurich également, une équipe composée de Largiader, Kolb et Binswanger réussit pour la première fois la transplantation d'îlots pancréatiques à partir d'un donneur humain. Pendant les dix premiers mois suivant la greffe, le patient n'a pas eu besoin d'insuline externe. C'est seulement à partir de 1988 que la transplantation d'îlots a connu un véritable essor grâce à une méthode semi-automatique d'isolement des îlots, mise au point par Camillo Ricordi (80). Enfin, en 2000, des chercheurs d'Edmonton ont développé un nouveau protocole, appelé protocole d'Edmonton, grâce auquel la transplantation d'îlots permet de renoncer à l'administration d'insuline chez la majorité des patients diabétiques (81).

1.4.2.2. Transplantation d'îlots

a) Sélection des receveurs de la greffe

Les sujets réunissant les conditions pour être transplanté doivent âgés entre 18 et 65 ans. La greffe d'îlots s'adresse soit à des patients diabétiques ayant déjà reçu un rein et dont la glycémie est difficile à régler ou dont la maladie diabétique progresse (îlots après rein, IAK), soit à des patients diabétiques en insuffisance rénale terminale et ayant des complications macrovasculaires les empêchant de recevoir un pancréas entier, greffe qui est alors associée à une greffe de rein (rein-îlots simultanés, SIK), soit à une troisième catégorie de patients diabétiques souffrant d'un diabète

très instable (brittle diabetes), avec de multiples hypoglycémies, parfois non ressenties et péjorant la qualité de vie du patient (64). Par ailleurs, ces patients doivent présenter un taux en peptide C indétectable et il faut que tous les traitements par insulinothérapie aient montré leur incapacité à induire un contrôle métabolique satisfaisant. Pour vérifier si le patient réunit toutes les conditions, celui-ci est présenté à l'équipe de transplantation d'îlots par un endocrinologue ou un diabétologue. Cependant, même si le patient remplit toutes ces conditions, il existe des critères d'exclusion majeure à la greffe d'îlots. Ainsi, ne seront pas transplantés:

- les personnes présentant un index de poids corporel supérieur à 26,
- les femmes de plus de 70 kg,
- les hommes de plus de 75 kg,
- les patients ayant un besoin en insuline exogène de plus de 0,70U/kg de poids corporelle par jour,
- les patients ayant une HbA1C supérieure à 12%,
- les sujets présentant un taux en créatinine supérieure à 1,5 mg/L (133 μ mol/L), une clairance en créatinine inférieure à 80 mL/min/1,73m² de surface corporelle ou un taux en albumine supérieure à 300 mg/24h (macroalbuminurie),
- et les patients présentant le virus d'Epstein-Barr (82).

b) Sélection des donneurs

Les pancréas sont obtenus lors de dons multi organes de sujets en mort cérébrale âgés de 18 à 70 ans. Les critères standard d'exclusion sont également appliqués chez le donneur afin d'éviter les risques infimes d'infection et de cancer (82). La sélection du donneur est également très stricte et pour qu'un pancréas soit accepté pour la greffe d'îlots, un certain nombre de critères doivent être respectés :

- les donneurs ne doivent pas présenter d'antécédent d'alcoolisme, de pancréatite aiguë, ni de diabète,
- leurs glycémies doivent être inférieures à 3 g/L (<16,7 mmol/L),

- leur index de masse corporelle doit être supérieur à 20 kg/m²,
- les donneurs ne doivent pas avoir été en arrêt cardiaque prolongé ou en hypotension prolongée c'est-à-dire supérieure à 30 minutes,
- la durée d'hospitalisation (soins intensifs) doit être inférieure à 5 jours,
- et les concentrations d'amylase et de lipase sérique doivent être inférieures à deux fois la norme.

Enfin, le temps d'ischémie froide du pancréas ne doit pas dépasser 8 heures (64).

c) Prélèvement des pancréas et préparation des îlots pancréatiques

Les pancréas sont prélevés sur des donneurs en état de mort encéphalique, à l'occasion d'un prélèvement multi-organes et sont acheminés vers les centres d'isolement spécialisés qui sont en charge de préparer les solutions d'îlots à transplanter. En Europe, ils sont prélevés à Bruxelles, Lille, Milan, Giessen, Uppsala et sur le territoire couvert par le réseau GRAGIL (Groupe de Recherche Rhin Rhône-Alpes Genève pour la transplantation d'Îlots de Langerhans) créé en 1999 à l'initiative du Pr. P.Y. Benhamou. Ce réseau regroupe les Hôpitaux Universitaires de Besançon, Genève, Lyon, Strasbourg et Grenoble et s'est récemment élargi aux Hôpitaux de Nancy et Montpellier. Les pancréas prélevés dans ces centres sont envoyés au laboratoire d'isolement d'îlots de l'Hôpital Universitaire de Genève.

Les organes sont transportés dans une solution d'UW (University of Wisconsin) et peuvent être ainsi conservés pour un maximum de 8h à 4°C. Dès réception, un prélèvement bactériologique est réalisé sur ce liquide de conservation et les îlots sont ensuite isolés dans un délai le plus bref possible après le prélèvement. La transplantation d'îlots se fait en 2 étapes. La première consiste en l'isolement des îlots pancréatiques en laboratoire et la 2^{ème} en la transplantation de la préparation d'îlots qui se déroule à l'hôpital (Fig. 1-13).

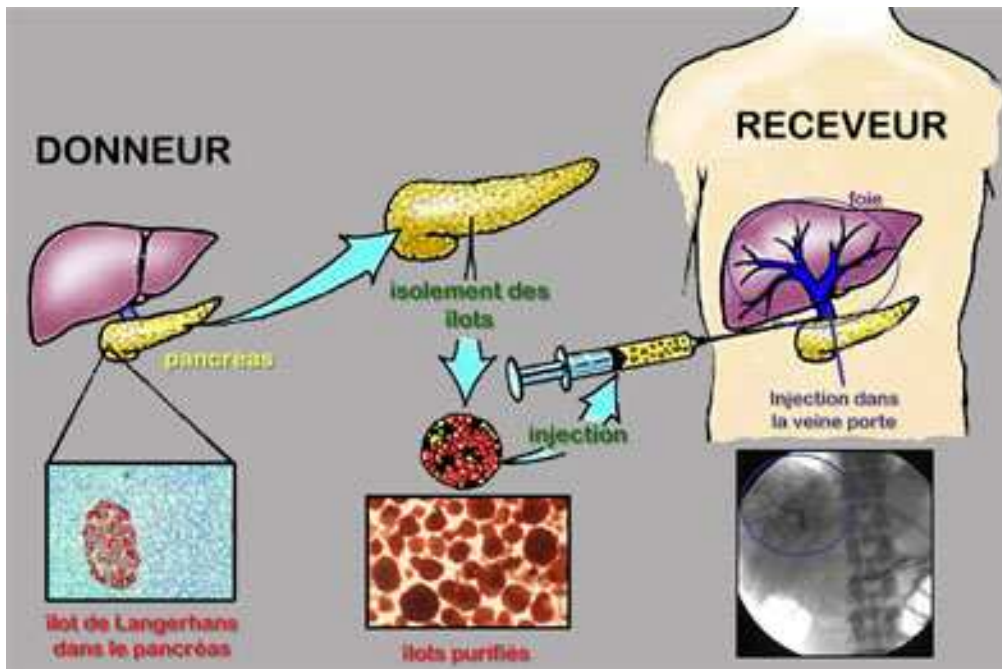


Figure 1-13: Représentation schématique des étapes de la greffe d'îlots (www.univ-lille2.fr)

L'isolement débute par la dissection du pancréas qui consiste à enlever le gras environnant, les vaisseaux sanguins, une partie de la rate et du duodénum prélevés avec le pancréas et en la cathétérisation du canal de Wirsung par lequel sera injecté l'enzyme de digestion.

Le pancréas est alors distendue, par perfusion intraductale contrôlée avec une libérase dont le lot a été préalablement validé par les différents sites d'isolement mondiaux (83, 84). Ensuite, l'organe est placé dans une chambre de digestion (Chambre de Ricordi), où la dissociation s'effectue à 37°C selon la méthode automatique d'isolement des îlots développée par Ricordi (74, 80, Fig. 1-14). Afin d'évaluer l'état de digestion, des échantillons sont prélevés et l'arrêt est effectué lorsque les îlots sont libérés du tissu exocrine, mais avant que ceux-ci ne soient abîmés par une digestion trop prolongée. L'arrêt se fait par dilution de la collagénase et par diminution de la température à 4°C (température à laquelle la collagénase est la moins active). La deuxième phase de l'isolement consiste à purifier les îlots du parenchyme exocrine digéré au moyen d'un gradient de densité (gradient discontinu de Ficoll, 85) à l'aide d'un système de séparation cellulaire (Cobe 2991, 86). Les îlots ont en effet une densité plus faible que le tissu exocrine. Au terme de l'isolement, les îlots peuvent être mis en culture avant la transplantation ou directement injectés. Un tel isolement dure de 6 à 9 heures.

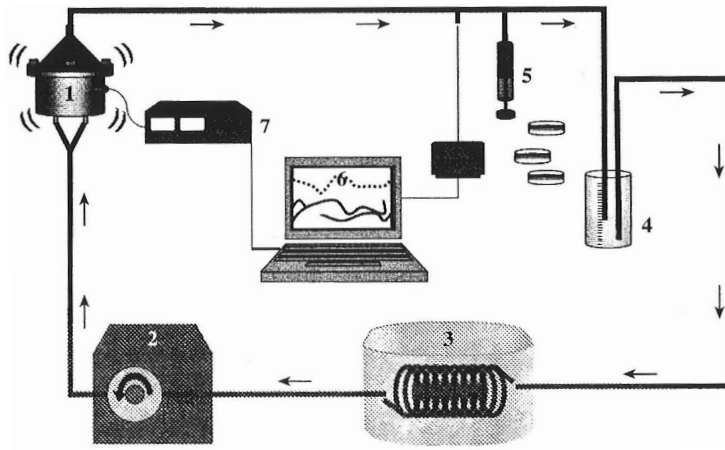


Figure 1-14: Représentation schématique de la méthode automatique de digestion du pancréas (d'après Pileggi *et al.*, 2006).

1- Chambre de digestion, 2- Pompe péristaltique, 3- Résistance chauffante, 4 et 5-Bécots collecteurs, 6- Moniteur de mesure de pH et de pression en O₂, 7- Sonde de mesure de pH et de pression en O₂.

d) *Transplantation*

Après purification, les îlots sont lavés et remis en suspension dans du milieu de culture sans sérum ni antibiotique et transférés dans une poche à transfusion. Le plus souvent, ils sont injectés lentement pendant une période de 15 à 30 minutes dans la veine porte hépatique qui est repérée par échographie (87) et ponctionnée sous anesthésie locale. Néanmoins, les îlots peuvent être également injectés dans le foie *via* la veine porte à l'aide d'une seringue après laparotomie. Les îlots vont alors se disperser dans le flux sanguin hépatique et s'implanter dans le foie. Il est à noter que les îlots sont le plus souvent transplantés après 12 à 24 heures de culture après l'achèvement de la procédure d'isolement et de purification. Ainsi, la transplantation d'îlots est une technique confortable pour le patient car l'intervention se fait sous anesthésie locale et ne dure que très peu de temps. De plus, en comparaison avec la greffe de pancréas entier, la greffe d'îlots a une morbidité moindre, essentiellement des risques d'hémorragie hépatique (10-15%), voire de thrombose porte (rare). Une laparotomie exploratrice en raison des complications hémorragiques est nécessaire dans moins de 15% des cas et la mortalité est exceptionnelle (88).

Les derniers critères de sélection de la préparation d'îlots pour pouvoir être injecté incluent une compatibilité de la solution avec le groupe sanguin ABO du receveur, une pureté de la préparation d'au moins 30%, une viabilité des îlots d'au moins 70%, un volume tissulaire inférieure à 10 ml, un test Gram négatif et une concentration en endotoxine inférieure ou égale à 5 unités d'endotoxine/kg

(82). Ensuite la transplantation va se dérouler selon le protocole d'Edmonton qui consiste en une première injection d'au moins 5000 îlots équivalent/kg, une 2^{ème} injection pour arriver à un total de 10000 îlots équivalent/kg ou plus transplanté chez le patient diabétique et en la mise en place d'un traitement immunosuppresseur. Une 3^{ème} injection pourrait être proposée au patient seulement si le peptide C circulant est détectable suite aux 2 précédentes transplantations (82).

e) Traitement immunosuppresseur

Le traitement immunosuppresseur a été établi par le protocole d'Edmonton et consiste en l'induction d'anticorps anti-récepteurs de l'IL-2 puis en de faibles doses de tacrolimus combinées à du sirolimus à forte dose (89). Ensuite, 5 doses de daclizumab (1 mg/kg) sont administrées en intraveineuse sur une période de 8 semaines après chaque transplantation. Le sirolimus est administré une fois par jour à des concentrations allant de 12 à 15 ng/mL pendant 3 mois après transplantation puis par la suite à des concentrations plus faibles de 7 à 12 ng/mL. Enfin, le tacrolimus est administré 2 fois par jour et ajusté à des concentrations allant de 3 à 6 ng/mL (82).

1.4.2.3. Greffe d'îlots pancréatiques et protocole d'Edmonton

a) La greffe d'îlots pancréatiques avant 2000

Le principal obstacle au succès de la greffe d'îlots, tel qu'il était décrit, était lié à la réalité anatomique du pancréas. En effet, le problème qui se posait était de savoir comment on pouvait isoler les îlots pancréatiques sachant qu'ils ne représentaient que 1% du volume total du pancréas car l'objectif était de transplanter uniquement des îlots isolés de tout tissu acinaire. Par ailleurs, des études concernant le rejet de la greffe de pancréas avaient montré que les îlots étaient relativement protégés par rapport au reste de l'organe (90). Ainsi, les chercheurs avaient espéré que la greffe d'îlots pouvait être protégée du phénomène de rejet. Cependant, l'espoir d'isoler des îlots intacts du pancréas se trouve dormant jusqu'à ce que Moskalewski ait décrit la digestion du pancréas par la collagénase (91). Cette technique fut réalisée par Lacy et Kostianovsky en 1967 en mettant au point une nouvelle méthode de digestion pancréatique basée sur l'utilisation de la collagénase (75). Ainsi,

cette technique devint la procédure standard d'isolement d'îlots de Rat dans de nombreux laboratoires (92, 93). Cette technique consistait en la distension du pancréas par injection intra ductale d'une solution de Hank's. Le pancréas était alors prélevé, finement haché et digéré avec une collagénase. Avec cette technique, les îlots isolés étaient histologiquement intacts et fonctionnels *in vitro*. Les îlots étaient alors purifiés par un gradient de densité au sucrose (76) mais en 1969, Lindall *et al.*, suggérèrent d'utiliser à la place un gradient discontinu de densité de Ficoll, un polymère de sucrose (94). Mais ce n'est qu'en 1973 que Sharp *et al.*, explorèrent cette approche de purification des îlots au Ficoll et montrèrent que grâce à cette technique on obtenait un meilleur rendement d'îlots viables (85). Un an plus tard cette même équipe améliora ce rendement en développant une technique de digestion-filtration pour supprimer le tissu acinaire au cours du processus de digestion (95). Le développement de ces techniques a permis d'isoler efficacement des îlots pancréatiques fonctionnels chez le Rat. Ainsi, par la suite, de nombreuses études montrèrent que la transplantation d'îlots pouvait réverser le diabète chez le Rat (96, 97) mais également chez le primate non humain (98).

Les chercheurs se sont alors interrogés sur le site optimum d'implantation des îlots pancréatiques. Le choix ne fut pas aisé car il y avait plusieurs considérations théoriques et pratiques importantes qui devaient être prises en compte dans la sélection d'un site approprié pour l'administration d'îlots chez les animaux diabétiques et surtout chez l'homme. Il fallait trouver un site facilement accessible par le chirurgien pour la transplantation mais également, le cas échéant, pour retirer la greffe en cas de rejet. En 1973, Kemp *et al.*, ont exploré l'importance du site d'implantation des îlots (99). Ainsi, ils montrèrent que la transplantation de 600 à 850 îlots en sous-cutanée n'améliorait pas la glycémie, la glucosurie et le volume urinaire chez le rat syngénique diabétique. De même, une implantation dans la cavité péritonéale de ce même nombre d'îlots dans le même modèle expérimental améliorait les paramètres cités ci-dessus mais ne permettait en aucun cas un retour à la normale. Cependant, lorsqu'ils réalisèrent leur implantation dans le foie via la veine porte, ils constatèrent l'installation d'une normoglycémie et d'un volume urinaire normale. De plus, l'étude

histologique révéla un foie intact et des îlots vascularisés situés dans les branches terminales du système porte hépatique. Par la suite, d'autres études se sont intéressées à d'autres sites d'implantation tels que le muscle (100) ou bien encore la rate (101) mais sans grand succès. Encore aujourd'hui, le foie semble être le meilleur site d'implantation des îlots.

Les chercheurs ont évalué la masse d'îlots à transplanter chez le rat diabétique afin de restaurer un contrôle métabolique normal (100). Ils arrivèrent à la conclusion qu'un minimum de 2 à 3 îlots par gramme de poids de corporel permettait d'obtenir une réponse métabolique et de maintenir une homéostasie normale.

En parallèle, des études ont porté sur l'antigénicité des îlots transplantés. Reckard *et al.*, montrèrent que sans traitement immunosuppresseur le rejet de la greffe d'îlots apparaissait dans les 1 à 3 jours après transplantation chez le rat (102) ce qui posa le problème de l'établissement d'une immunosuppression lors d'une greffe d'îlots chez l'homme. De plus, Barker *et al.*, mirent en avant que le foie est un site d'implantation intéressant car il permettrait une certaine protection immunologique (103).

Les chercheurs se sont également heurtés au problème de conservation et de mise en culture des îlots pancréatiques avant transplantation. Ainsi, de nombreux travaux portant sur la cryoconservation (104) et sur le développement de techniques de mise en culture des îlots ont vu le jour (105). Mais il faut attendre 1976, et les travaux de Hegre *et al.*, pour observer une préservation de la synthèse de la pro-insuline et de l'insuline et de la sécrétion d'insuline suite à une stimulation au glucose par des îlots pancréatiques en culture (106).

Suite à ces années de recherche, les îlots pancréatiques humains furent isolés avec succès et étaient fonctionnels (79). Ainsi, en 1977, Najarian *et al.*, transplantèrent pour la première fois 7 patients diabétiques (79). Cependant, malgré les techniques développées à cette époque et les résultats très encourageants obtenus sur l'animal, peu de patients pouvaient arrêter l'insulino-thérapie après l'intervention avec seulement 9% d'insulino-indépendance 1 an après la greffe. Ceci était lié aux problèmes auxquels les chercheurs se heurtaient depuis plus de 10 ans (rendement d'isolement des

îlots, conservation des îlots en culture, vascularisation des îlots après transplantation et rejet). Finalement, ce n'est qu'en 1988 que les essais cliniques de la greffe d'îlots ont vraiment débuté grâce à la mise au point par Ricordi d'un dispositif semi-automatique d'isolement des îlots humains (80).

b) La greffe d'îlots pancréatiques et protocole d'Edmonton

L'introduction de la méthode automatisée de dissociation du pancréas (80, 107) et l'utilisation de la purification semi automatisée du digest pancréatique humain (108, 109) ont permis d'obtenir de meilleurs rendements en îlots à transplanter mais également un meilleur contrôle métabolique chez les patients greffés au cours des années 1990 (75, 110). Dans les 10 années qui suivirent, de nombreuses améliorations de ces techniques ont pu être constatées avec l'introduction de nouvelles techniques (84, 108, 109, 111) qui permirent d'augmenter le rendement en îlot (112, 113), d'améliorer la transplantation en optimisant le management de la procédure (114) et d'apporter de nouveaux protocoles immunosuppresseurs plus efficaces (75, 115-119). En effet, en dépit des progrès remarquables il se posait les problèmes de la variabilité des lots de collagénase et du degré de purification des préparations ce qui rendait difficile la standardisation du processus, pourtant essentielle à la réalisation des essais cliniques. Ainsi, l'introduction de la Libérase[®], une collagénase de moindre variabilité et contenant moins d'endotoxine a été un progrès réel (84). De même, le séparateur de cellules Cobe 2991 a significativement amélioré l'automatisation et la standardisation de la procédure d'isolement (86).

Les résultats obtenus concernant la greffe d'îlots pancréatiques peuvent donc être séparés en 2 périodes : l'avant et l'après mai 2000. En effet, en mai 2000, le groupe d'Edmonton a rapporté un succès considérable : l'insulinoindépendance avec normoglycémie chez 80% des patients diabétiques de type 1 ayant reçu une greffe d'îlots après un an de suivi (89, Fig. 1-15).

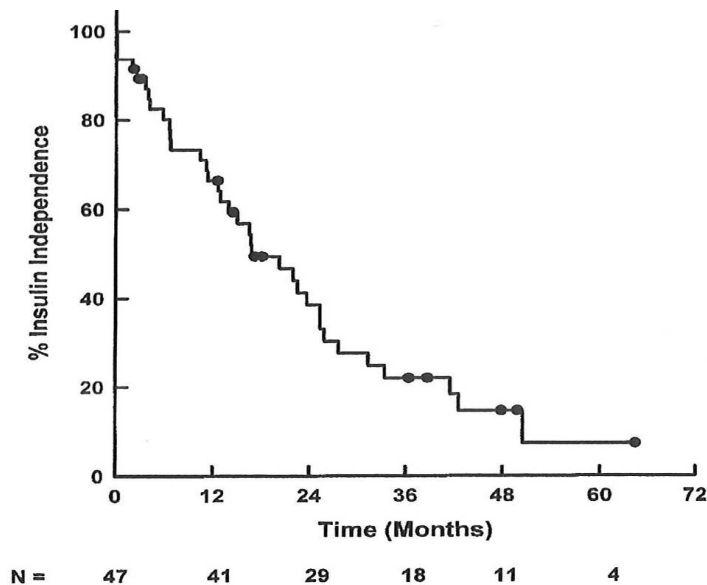


Figure 1-15: Insulino-indépendance au cours du temps des patients diabétiques transplanté selon de protocole d'Edmonton (d'après Ryan *et al.*, 2005).

Depuis, ces résultats ont été confirmés par certains centres (120) mais pas par d'autres (121). Les excellents résultats du groupe d'Edmonton sont la rançon de l'optimisation de toutes les étapes du processus. Tout d'abord, il a été procédé à une sélection des donneurs cadavériques pour ne disposer que de pancréas répondant aux critères de sélection. Ensuite, l'équipe de prélèvement était très spécialisée, attentive au refroidissement adéquate et rapide du pancréas du donneur avec le maintien aussi court que possible de la durée d'ischémie froide. Le processus d'isolement a reposé sur l'utilisation de la chambre de Ricordi avec tous les perfectionnements récents. L'injection de Libérase[®] a été effectuée en modulant la pression d'injection, celle-ci étant augmentée pendant la perfusion de telle sorte que les canalicules périphériques puissent être injectées et que l'effet de l'enzyme soit maximal. De plus, le milieu utilisé pour recueillir les îlots ne contenait que des protéines d'origine humaine et une purification satisfaisante a été obtenue grâce au gradient de Ficoll et au séparateur Cobe 2991. En effet, des études ont démontré que la pureté de la préparation d'îlots à injecter chez le patient influait sur l'activation des macrophages et par conséquent, jouait un rôle important dans le succès de la greffe. Ainsi, Sigrist *et al.*, ont montré une surexpression des récepteurs aux chémokines CCR5 en fonction de la diminution de la pureté (122) mais également une réduction des réactions inflammatoires ayant lieu immédiatement après la transplantation lors de l'utilisation de préparations d'îlots plus pures (étude en cours). Enfin, les receveurs étaient placés

sous une immunosuppression originale. Celle-ci comportant une induction par un anticorps anti-récepteur de l'interleukine 2, le daclizumab, et une immunosuppression de maintenance associant la rapamycine et le tacrolimus à faible dose, sans aucun recours à une corticothérapie (123). Il est à noter que l'insulinothérapie n'a pas été interrompue immédiatement après la greffe pour permettre l'organisation et la prise de la greffe sans à-coup métabolique. Un autre fait original du protocole d'Edmonton est qu'en raison du faible volume de la préparation d'îlots nécessaire, aucune intervention chirurgicale n'a été indispensable, l'injection des îlots s'effectuant dans la veine porte sous anesthésie locale ou générale sous contrôle échographique. Un point capital a été le choix du moment de la greffe, immédiat plutôt qu'après une période de culture. Dans le protocole d'Edmonton, le matériel était injecté quelques heures seulement après l'isolement. Dans d'autres centres, les îlots sont cultivés pendant des périodes de temps variables (124).

En 2002, l'équipe de Shapiro (125) confirme le succès du protocole d'Edmonton en présentant 17 cas transplantés avec un recul de 2 ans après transplantation dont 11 sont insulino-indépendant. Néanmoins, des complications mineures telles qu'une dyslipidémie, des ulcérations superficielles, de l'hypertension ont été relatées suite à la prise des immunosuppresseurs utilisés dans ce protocole. En 2005, la même équipe publie les résultats de la greffe d'îlots selon le protocole d'Edmonton avec 5 ans de recul et montre que sur 65 patients transplantés, seulement 10% restent insulinoindépendant après 5 ans (81, Fig.1-15), révélant un échec de la greffe à long terme. En revanche, malgré cette perte de l'insulinoindépendance au cours du temps, la sécrétion du peptide-C est maintenue dans la majorité des cas à long terme (Fig.1-16) démontrant la fonctionnalité du greffon (81). De plus, les récents essais cliniques montrent que bien que la plupart des patients présentent un greffon fonctionnel à long terme (sécrétion de peptide C mesurable, Fig.18), ceux-ci doivent de nouveau recourir à la prise d'insuline exogène pour maintenir un contrôle métabolique adéquat (81, 82, 126, 127). Cependant, les besoins en insuline restent moins importants qu'avant la transplantation et la persistance de la fonctionnalité des îlots transplantés permet de prévenir les hypoglycémies sévères et améliore les taux en HbA1C (82).

Ainsi, à l'heure actuelle, la transplantation d'îlots avec l'utilisation du protocole d'Edmonton permet de restaurer avec succès une production d'insuline endogène et une stabilité glycémique chez les patients diabétiques de type 1 présentant un contrôle métabolique instable; mais avec une insulinoindépendance qui n'est pas maintenue dans le temps (82).

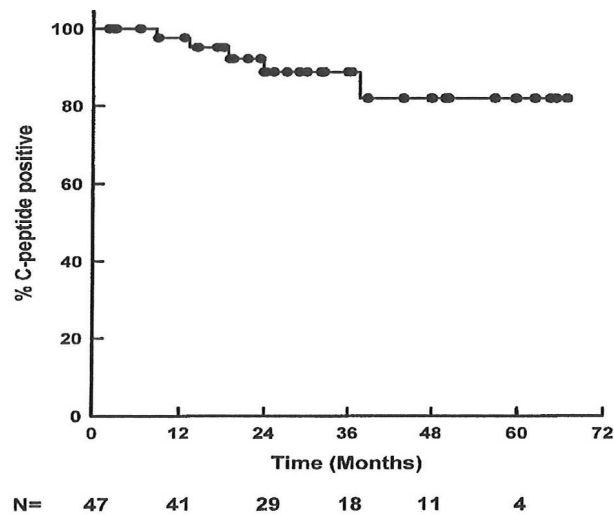


Figure 1-16: Sécrétion de peptide C au cours du temps des patients diabétiques transplantés selon de protocole d'Edmonton (d'après Ryan *et al.*, 2005).

1.4.3. Transplantation et qualité de vie du patient

Des études ont évalué la qualité de vie et la peur des hypoglycémies des patients après transplantation d'îlots (128, 82). Elles ont montré que la transplantation d'îlots n'avait aucun impact sur la qualité de vie en général mais avait un effet psychologique important. En effet, la greffe d'îlots permet de réduire la peur d'apparition des hypoglycémies par les patients (129). De plus, même si le traitement par insuline ne peut être totalement interrompu, une greffe fonctionnelle entraîne un meilleur contrôle glycémique et une meilleure qualité de vie avec diminution des épisodes d'hypoglycémie pour le patient diabétique de type 1 (82, 128). Ainsi, si le contrôle métabolique qu'apporte la greffe est suffisant, on pourrait imaginer qu'une transplantation d'îlots de pancréatiques pourrait être appliquée préventivement de manière à éviter l'apparition même des complications chroniques du diabète. Bien que ces dernières données soient très encourageantes, la greffe d'îlots se heurte encore à plusieurs obstacles parmi lesquels une reproductibilité insuffisante des résultats et le nombre restreint de patients à qui elle s'adresse.

1.4.4. Les obstacles à la greffe d'îlots pancréatiques

1.4.4.1. Disponibilité des pancréas

L'un des obstacles majeurs à la transplantation d'îlots pancréatiques, commun à toutes les greffes, est la disponibilité des organes. En effet, selon le protocole d'Edmonton, il est nécessaire d'effectuer 2 à 3 transplantations d'îlots pour induire une insulinoindépendance chez un patient diabétique de type 1; ce qui revient à utiliser 2 à 3 pancréas pour un patient. En réalité, il existe un gros problème de don d'organe à travers le monde. En France, les données de l'Agence de Biomédecine montrent que près de 50% des patients en état de mort cérébrale (900 à 1800 par an) ne sont pas prélevés dont 1/3 pour raison non médicale. A ce problème vient s'ajouter le fait que seul la moitié des isollements d'îlots effectués permettent d'obtenir une quantité et une qualité satisfaisantes d'îlots pancréatiques pour la transplantation. De plus, les pancréas disponibles sont partagés pour la greffe de pancréas et pour la greffe d'îlots. Par exemple, aux Etats-Unis, la greffe d'îlots ne peut concerner que 1000 patients, soit moins de 0,1% des diabétiques de types 1 (129).

1.4.4.2. Alternatives aux îlots pancréatiques humains

A l'heure actuelle, la transplantation d'îlots pancréatiques humain offre des perspectives encourageantes de traitement du diabète de type 1 mais elle est malheureusement associée à différents problèmes tels que le manque de donneurs d'organe, le traitement immunosuppresseur et l'incapacité d'offrir une efficacité de la greffe à long terme.

Un des inconvénients majeurs de la plupart des protocoles d'isolement d'îlots utilisés en clinique est l'absence de connaissance de la composition exacte du greffon. Ainsi, une meilleure connaissance de celui-ci serait une étape cruciale pour commencer à trouver des solutions à la pénurie d'organes. En effet, il existe des données intéressantes concernant le développement de nouvelles cellules β à partir de précurseurs présents dans la partie la moins « pure » de la préparation d'îlots. Ainsi, Bonner-Weir *et al.*, ont démontré le potentiel de génération de cellules β *in vitro* (130). De plus, la description de la composition exacte des isollements d'îlots pourrait révéler la présence de tels précurseurs et la possibilité pour le greffon de croître *in vivo*. Par ailleurs très récemment, le groupe

de recherche dirigé par Harry Heimberg (Centre de recherche sur le Diabète de l'Université libre de Bruxelles) en collaboration avec les équipes françaises dirigées par Gérard Gradwohl (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Département de Biologie Cellulaire et Développement, Strasbourg) et Raphaël Scharfmann (Unité Inserm 845, Faculté de Médecine Necker, « Centre de recherche Croissance et signalisation », Paris) a réussi à isoler, à partir du pancréas de souris adultes, des cellules dites « progénitrices » capables de former des cellules β productrices d'insuline (131). Ainsi, cette étude ouvre la perspective d'une thérapeutique du diabète de type 1 par régénération des cellules β . La greffe de cellules souches adultes, présentes au niveau des canaux pancréatiques, offre également une alternative intéressante pour réduire le besoin de donneurs humains mais reste associée au problème immunitaire et biotechnologique pour développer ces cellules souches en cellules insulino-sécrétrices. La recherche sur les cellules souches est pleine de promesses avec la perspective de disposer de cellules β en grande quantité et parfaitement histocompatibles dans la mesure où la moelle osseuse de chaque individu pourrait être un réservoir. Jusqu'à ce jour, de nombreuses cellules ont été générées à partir de cellules souches comme des cellules cutanées, hépatiques ou endothéliales mais aucun cas de cellules β fonctionnelles n'a été publié. En effet, la génération et la différenciation des cellules β sont soumises à une régulation précise dans laquelle les circuits Delta/Notch semblent jouer un rôle déterminant (132). Enfin, la greffe de cellules souches embryonnaires et le clonage thérapeutique permettront, dans le futur, d'offrir une grande réserve en cellules insuliniques non immunogènes (autogreffe) mais à l'heure actuelle, il faut encore comprendre les mécanismes de différenciation et de prolifération de ces cellules. En conclusion, la thérapie cellulaire offre de prometteuses perspectives de traitements du diabète de type 1 mais de nombreuses questions biotechnologiques et éthiques restent encore à investiguer.

Un autre champ d'investigation est l'utilisation d'îlots de donneurs xénogéniques. En effet, la xéno greffe d'îlots pancréatiques porcins offre une alternative intéressante à moyen terme car l'insuline porcine ne diffère de l'insuline humaine que d'un seul acide aminé. Cependant, bien que

la xéno greffe permette d'obtenir un grand nombre de donneurs potentiels, elle reste associée à des problèmes immunitaires et de zoonose ce qui la rend peu envisageable pour un usage chez l'homme dans un futur proche (133).

1.4.4.3. Rejet et traitements immunosuppresseurs

a) Définition du rejet

La principale complication de la greffe d'organe est le rejet. Ce rejet va dépendre essentiellement de la réaction immunologique du receveur contre l'organe greffé. Cette réaction de défense immunologique développée par le receveur met en jeu des cellules (essentiellement les lymphocytes T), des anticorps, et la production de médiateurs solubles qui participent à cette réaction (les cytokines).

Les cibles de la réaction immunologique de rejet sont les antigènes de transplantation propres au donneur et portés par le greffon. Le receveur va reconnaître ces antigènes de transplantation comme étrangers, au même titre qu'il reconnaît comme étranger un agent bactérien infectant, avant de mettre en place un processus de défense visant à son élimination. Les principaux antigènes de transplantation sont les antigènes d'histocompatibilité, appelés antigènes HLA. Ces antigènes sont des molécules présentes sur l'ensemble de nos cellules, très polymorphes au niveau de l'espèce humaine, ce qui en d'autres termes signifie que la probabilité que deux individus non apparentés soient HLA identiques, est un événement exceptionnel. Le système HLA pourrait ainsi être considéré comme une carte d'identité biologique, permettant de différencier les individus entre eux. Ceci explique qu'en situation de greffe d'organe, le greffon étant le plus souvent issu d'un donneur non apparenté, les différences dans le système HLA entre le donneur et le receveur (appelées aussi incompatibilités) existent et vont stimuler la réaction de rejet immunologique du receveur. Des différences dans d'autres systèmes antigéniques que le système HLA sont également capables de stimuler cette réaction de rejet immunologique. Citons pour exemple le système des groupes sanguins ABO dont le pouvoir stimulant est également très fort en cas d'incompatibilité. Heureusement dans ce dernier cas, compte tenu du polymorphisme beaucoup moins étendu de ce

système, il est plus facile de respecter l'appariement compatible du donneur et de son receveur.

b) Les différentes formes de rejet

Plusieurs formes de rejets existent. Elles se caractérisent par leur moment de survenue plus ou moins précoce après la greffe, par les mécanismes immunologiques mis en jeu et par les types de lésions constituées au niveau du greffon. Dans tous les cas, ces rejets mettent en péril la fonctionnalité du greffon. Ainsi il faut distinguer :

- **Le rejet suraigu:** il survient dans les heures qui suivent la transplantation et se manifeste sous la forme d'un infarctus du greffon (oblitération des vaisseaux qui irriguent l'organe). Ce type de rejet est essentiellement dû à des anticorps pré-existant chez le receveur et dirigés contre les antigènes de transplantation portés par le greffon. Il doit être prévenu par la pratique systématique de l'épreuve de compatibilité lymphocytaire (Cross match) qui précède la greffe et qui mime au laboratoire le conflit immunologique entre les antigènes du greffon et les anticorps du receveur. L'existence de tels anticorps préformés s'explique par une réaction immunologique antérieure à l'occasion d'une transfusion, par la formation d'anticorps générés lors d'une première greffe ou par une immunisation foeto-maternelle chez la femme.
- **Le rejet aigu:** il survient à partir du 4^{ème} jour post-greffe. L'organe greffé est le siège d'une infiltration par des cellules immuno-compétentes (monocytes, éosinophiles...) se manifestant par des signes fonctionnels et biologiques qui témoignent de sa survenue. Ces signes alertent le médecin qui met rapidement en place un traitement visant à contrecarrer cette réponse immunitaire de rejet. De la précocité de ce traitement va dépendre la réversibilité des lésions.

- **Le rejet chronique:** il s'agit de la principale cause d'échec des transplantations. Le rejet chronique s'installe insidieusement au cours du temps pour aboutir à une perte de l'architecture du greffon qui progressivement devient le siège d'une fibrose aboutissant à la perte des fonctions de l'organe greffé.

c) *Rejet et greffe d'îlots pancréatiques*

Le déclin du taux d'insulinoindépendance obtenu en clinique concernant la transplantation d'îlot n'est pas actuellement complètement caractérisé et son explication semble complexe (134). Ainsi, les facteurs préjudiciables à la greffe d'îlots incluent en partie, le problème récurrent de l'auto-immunité des cellules β (135), le rejet allogénique, l'épuisement du métabolisme, le problème du site d'injection intraportale des îlots et la toxicité chronique des traitements immunosuppresseurs (82, 134, 136, 137). En effet, de nombreux effets indésirables du traitement immunosuppresseur, établi par le protocole d'Edmonton, sont à noter tels que des ulcérations musculaires, des problèmes d'anémie et de leucopénie, auxquels s'ajoutent les effets secondaires de tout traitement suppresseur utilisé pour les greffes d'organes classiques (82). Ainsi, dans le rapport présenté par Shapiro *et al.*, en 2006 concernant le dernier bilan de l'étude clinique de la greffe d'îlots par utilisation du protocole d'Edmonton, les effets indésirables rattachés à l'immunosuppression ont provoqué un changement de stratégie thérapeutique chez 25% des patients transplantés voire même un retrait de temps à autre de l'étude de certains sujets (82). Par ailleurs, il fut inquiétant d'observer un déclin de la fonction rénale chez quelques sujets qui reflète sans doute les effets de toxiques de la combinaison des molécules immunosuppressives tacrolimus et sirolimus.

Le sirolimus est une drogue immunosuppressive qui pourrait être délétère à la greffe d'îlots par son effet anti-angiogénique et antiprolifératif, ce qui empêcherait les îlots de se revasculariser correctement et donc induire une perte de la masse du greffon (136, 138). De plus, des études récentes ont montré que le sirolimus induisait une réduction de l'expression du transporteur au glucose Glut-2 et du facteur de transcription PDX-1 (Pancreas Duodenum Homeobox-1) qui sont

essentiels pour le développement du pancréas, pour la production d'insuline et pour l'homéostasie du glucose (139); ce qui induit donc une perte de la 1^{ère} phase de sécrétion de l'insuline et par conséquent une diminution de la fonctionnalité des îlots (136). La toxicité du tacrolimus, quant à elle, se caractérise par une inhibition réversible de la transcription du gène de l'insuline et par conséquent de la sécrétion d'insuline (84, 140). Par ailleurs, l'utilisation de sirolimus et de tacrolimus, entraînerait une inhibition de la régénération des cellules β (135).

A l'heure actuelle, une variété d'approches a été explorée pour prévenir la destruction apoptotique des îlots au cours de la transplantation (inhibition de facteurs extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose...) et bien que les résultats *in vitro* furent prometteur, la démonstration de leur avantage *in vivo* sur la greffe d'îlots n'a pas été très concluante (141).

En plus des réactions immunitaire connues, à l'origine du rejet de la greffe d'îlots, telles que les activations lymphocytaires (142) et macrophagiques (143), il a été reconnu que les réactions inflammatoires post transplantatoire (réactions IBMIR: Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction, 144-147) étaient à l'origine d'une perte de fonctionnalité et de masse du greffon en provoquant l'activation plaquettaire, le recrutement des lymphocytes et une sécrétion locale de cytokines pro-inflammatoires. Ces réactions IBMIR pourraient alors participer au rejet allogénique (148) et/ou à la réactivation de l'auto-immunité (149, 150).

Enfin, le but ultime des futures stratégies d'immunosuppression des patients transplantés, est de leur restituer une propre tolérance du greffon en contrôlant le problème de l'auto-immunité et/ou en incitant une tolérance immunologique aux tissus du donneur allogénique pour permettre un succès de la greffe à long terme sans avoir besoin d'un traitement immunosuppresseur à vie (151, 152, 153).

1.5. Optimisation de la viabilité des îlots pancréatiques et stimulation de l'angiogenèse

1.5.1. Revascularisation des îlots après transplantation

Une des limites majeures à la transplantation d'îlots pancréatiques est liée à l'absence de vascularisation des îlots après transplantation, qui entraîne un manque d'oxygène et de nutriments à l'origine d'une hypoxie cellulaire qui conduit irrémédiablement à la perte du greffon (154, 155, 156, 157).

À la différence d'une transplantation d'organe entier où les greffons sont implantés en tant que tissus vascularisés, les îlots transplantés sont des structures isolées de tout système vasculaire suite à la digestion du tissu pancréatique à la collagénase et à l'isolement des îlots (158). Ainsi, la survie et la fonctionnalité des îlots nouvellement transplantés dépend uniquement de la réorganisation de nouveaux vaisseaux afin d'apporter au greffon l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa survie (159, 160, 161). En réalité, un îlot est comparable à un organe du fait de la présence d'un système vasculaire au sein même de sa structure, formé de cellules endothéliales fenêtrées, qui sont essentielles pour fournir l'oxygène et les nutriments au cœur de l'îlot (162, 163). En effet, les îlots pancréatiques endogènes possèdent une angioarchitecture complexe possédant une pression sanguine élevée de $5-7 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de tissu qui permet une distribution optimale de l'oxygène et des nutriments aux cellules de l'îlot et une dispersion adéquate des hormones sécrétées (164, 165). Par ailleurs, des études ont montré que des cellules endothéliales résiduelles étaient présentes dans les îlots isolés du donneur et qu'elles joueraient un rôle important dans le processus de revascularisation (166, 167). Ainsi, cette découverte remis en question la théorie selon laquelle seul le receveur était à l'origine de la revascularisation des îlots après transplantation (168, 169). Cependant, lorsque les îlots pancréatiques sont isolés et mis en cultures, on peut observer que ces cellules endothéliales se différencient et dégèrent (170). Ceci est en accord avec les travaux de Olsson *et al.*, qui ont montré qu'on pouvait améliorer la revascularisation et la fonctionnalité des îlots lorsqu'ils sont transplantés immédiatement après isolement (171). Par ailleurs, la viabilité, la fonctionnalité et la masse de cellules β des îlots pancréatiques diminuent dans les premiers jours qui

suivent la transplantation attestant que ces premiers jours sont critiques pour la revascularisation (172, 173). Ainsi, une revascularisation adéquate et rapide dans les 14 jours suivant la transplantation est cruciale pour permettre une fonction optimum du tissu transplanté (174-177). Ceci limiterait la perte des îlots pancréatiques dans les premiers jours qui suivent la transplantation et permettrait par la même occasion de réduire le nombre d'îlots à injecter au patient diabétique. Cependant, les mécanismes de revascularisation des îlots au cours de la transplantation sont inconnus à ce jour. Cependant, de récentes études ont démontré que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) semble jouer un rôle primordial (178).

1.5.2. Définition

L'angiogenèse est un mécanisme de néovascularisation prenant naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant (179, Fig.1-17). Elle se distingue de la vasculogenèse processus dans lequel des précurseurs hémangioblastiques se différencient pour former un plexus vasculaire primitif (Fig.1-17). Le contrôle moléculaire de l'angiogenèse commence à être mieux connu grâce à des progrès considérables concernant l'identification de gènes codant pour des facteurs de croissance, des récepteurs ou des facteurs de transcription impliqués dans ce processus et à l'étude de leur mécanisme d'action.

Au cours de la période embryonnaire, ce processus accompagne le développement de l'organisme. En revanche, chez l'adulte, le réseau vasculaire est quiescent (seulement 0,01% de cellules endothéliales sont en division), à l'exception de certaines circonstances physiologiques (cycle menstruel, effort physique, grossesse) ou pathologiques (179, 180). Il s'agit notamment du diabète, de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, de l'ischémie tissulaire (coeur, cerveau, membres inférieurs) et de tumeurs malignes. De nouveaux vaisseaux peuvent alors apparaître à partir de cellules endothéliales vasculaires réactives à l'hypoxie.

1.5.3. Mécanismes de l'angiogenèse

L'angiogenèse peut se dérouler selon trois mécanismes: par bourgeonnement ("sprouting"), par élargissement et séparation des vaisseaux déjà formés ("intussusception") ou encore par

separation où les cellules poussent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés ("bridging") (181, Fig. 1-17).

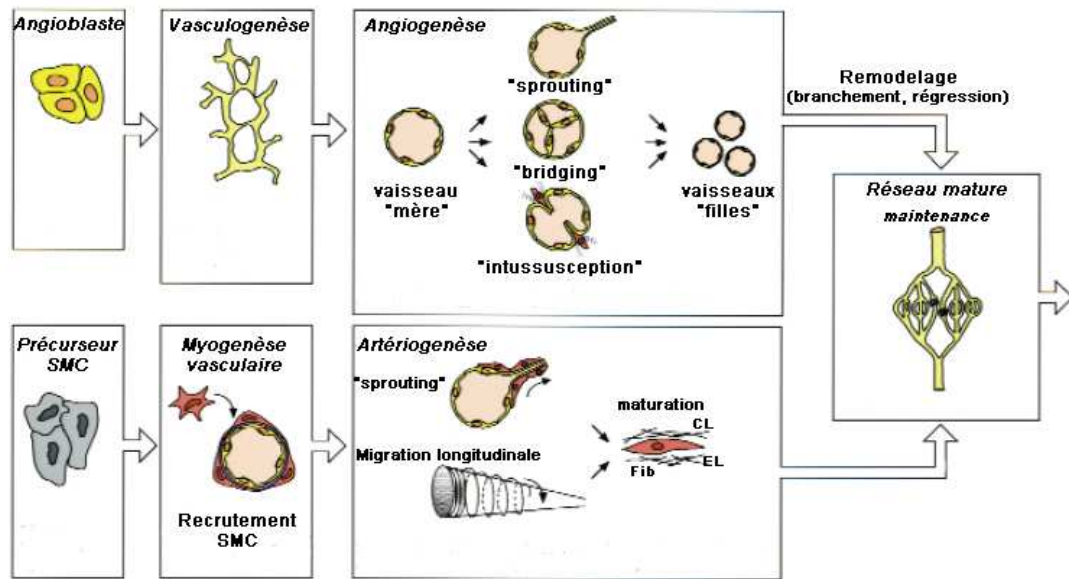


Figure 1-17: Vasculogénèse et angiogénèse (d'après Carmeliet, 2000).

SMC: cellules musculaires lisses ; CL: collagène ; EL: élastine ; Fib: fibrilline

- Le sprouting:** le sprouting a été le premier mécanisme de l'angiogénèse à être identifié. Il se produit en plusieurs étapes bien caractérisées. Tout d'abord, les signaux biologiques connus comme des facteurs de croissance angiogénique, activent des récepteurs présents sur les cellules endothéliales présentes dans les vaisseaux sanguins préexistants. Puis, l'activation des cellules endothéliales libère des protéases qui dégradent la membrane basale des cellules endothéliales, leur permettant ainsi de se détacher de la paroi des vaisseaux préexistants. Les cellules endothéliales migrent dans l'espace périvasculaire vers les stimuli angiogènes et prolifèrent alors en forme de solides tubes dans la matrice extracellulaire, formant ainsi des vaisseaux primitifs. Les cellules endothéliales migrent en tandem, à l'aide de molécules d'adhésion appelées intégrines. Lors de la maturation, certains de ces vaisseaux deviennent des capillaires après différenciation et apposition de cellules mésenchymateuses spécialisées, les péricytes; d'autres se transforment en vaisseaux de plus grands calibres (artères et veines) après la mise en place d'une paroi constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses (Fig. 1-18, 182).

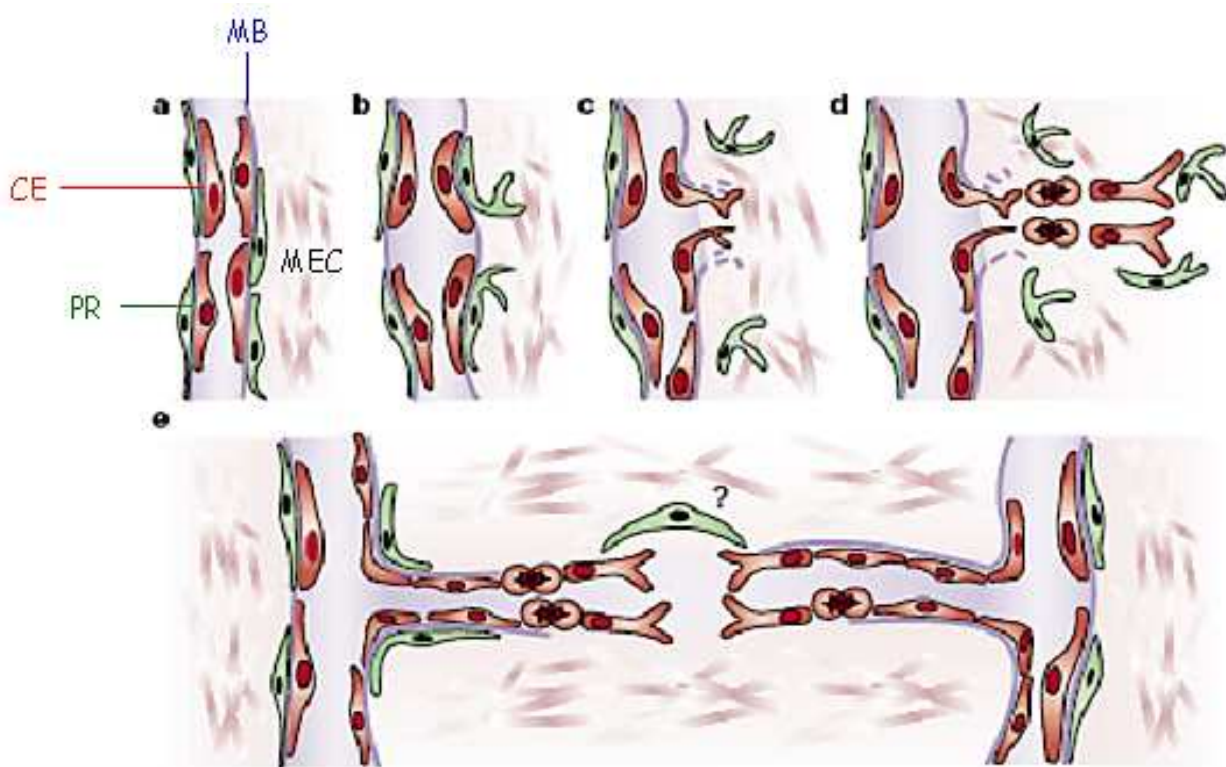


Figure 1-18: Etapes principales de l'angiogenèse par bourgeonnement (d'après Bergers, 2003).

- Vaisseau sanguin. CE: cellule endothéliale; PR: péricyte; MB: membrane basale; MEC: matrice extracellulaire.
- Les péricytes se détachent et les vaisseaux se dilatent avant que la membrane basale et la matrice extracellulaire soient dégradées.
- Les cellules endothéliales peuvent alors migrer dans l'espace périvasculaire vers les stimuli angiogènes.
- Les cellules endothéliales prolifèrent et migrent.
- Les cellules endothéliales adhèrent les unes aux autres et forment un lumen. S'ensuivent la formation de la membrane basale et l'attachement des péricytes. Finalement les bourgeons capillaires fusionnent avec d'autres bourgeons pour former de nouveaux systèmes circulatoires.

- L'angiogenèse intussusceptive:** l'angiogenèse intussusceptive (Fig. 1-19), également connu sous le nom d'angiogenèse splitting, a été observée pour la première fois chez des rats nouveau-nés. Dans ce processus de formation des vaisseaux, le capillaire s'élargit et se scinde pour former 2 nouveaux vaisseaux sanguins. Quatre phases sont distinguables dans l'angiogenèse intussusceptive. Tout d'abord, les deux capillaires opposés créent une zone de contact. Puis, les jonctions des cellules endothéliales sont réorganisées et le vaisseau, résultant du contact des 2 capillaires, est perforé pour permettre la croissance des cellules et la pénétration dans la lumière des facteurs angiogéniques. Troisièmement, un noyau se forme entre les deux nouveaux vaisseaux au niveau de la zone de contact qui présente des péricytes et des myofibroblastes. Ainsi, ces cellules projettent des fibres de collagène dans le noyau capillaire pour former une matrice extracellulaire nécessaire à la croissance de la lumière du vaisseau sanguin. Enfin, le noyau est étoffé, sans modification de la structure de base.

L'intussusception est un processus angiogénique très important car il s'agit d'une réorganisation des cellules existantes et elle permet une grande augmentation du nombre de capillaires sans augmentation du nombre des cellules endothéliales (183).

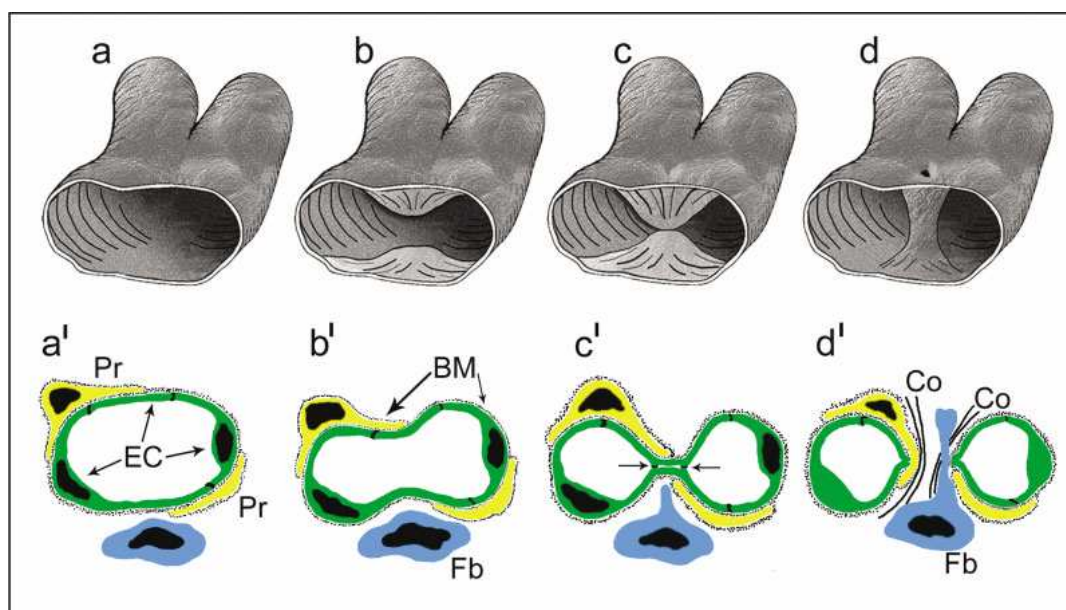


Figure 1-19: Représentation en tridimensionnelle (a-d) et bidimensionnelle (a'-d') du processus de génération de nouveaux vaisseaux sanguins par intussusception (**d'après Kurtz *et al.*, 2003**).

a, b, a', b': Le processus commence par la protrusion de 2 capillaires opposés dans la lumière du vaisseau sanguin. Après l'établissement d'un contact inter endothélial (c, c'), la double couche de cellules endothéliales (CE) ainsi formée et la membrane basale (MB) sont perforées au centre. La colonne nouvellement formée s'accroît suite à l'invasion de fibroblastes (Fb) et de péricytes (Pr) qui produisent des fibres de collagènes (Co) (d-d').

- **La septation:** au cours de la septation, les cellules endothéliales poussent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés.

1.5.4. Régulateurs de l'angiogénèse

Les mécanismes moléculaires de ces différents modes d'angiogénèse sont complexes, puisqu'ils mettent en jeu des signaux extra et intracellulaires. Au cours de ces dernières années, il est devenu clair que l'angiogénèse n'est pas contrôlée par un seul facteur, mais par une balance d'inducteurs et d'inhibiteurs produits par les cellules normales ou tumorales. En effet, l'ensemble des activateurs et inhibiteurs de l'angiogénèse forme la balance angiogénique, qui se situe entre la cellule endothéliale et la cellule environnante. Ainsi, un changement dans l'équilibre de ces régulateurs peut induire une angiogénèse excessive ou insuffisante. L'induction de l'angiogénèse (ou «switch» angiogène) décrit la transition des cellules endothéliales de la phase de quiescence à la

phase d'activation angiogène (Fig. 1-20). Dans les tissus normaux, les inhibiteurs de l'angiogenèse prédominent et les vaisseaux sont quiescents. Cette balance peut-être renversée soit en réduisant les inhibiteurs soit en augmentant les inducteurs. Par exemple, on peut avoir une sécrétion continue d'activateurs mais une sécrétion beaucoup plus importante d'inhibiteurs entraînant une inactivation de l'angiogenèse. Ainsi, expérimentalement, il est possible d'activer l'angiogenèse soit en augmentant la quantité d'activateur soit en diminuant celle d'inhibiteur (184). Il existe aussi des facteurs angiogéniques indirects qui interviennent dans les interactions entre la cellule endothéliale et la cellule environnante, notamment pour augmenter la stabilité du vaisseau.

Parmi les régulateurs clés de l'angiogenèse figurent, les « Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) » et leurs récepteurs (185), les « Fibroblast Growth Factor (FGF) » et leurs récepteurs (186), les angiopoïétines, et leurs récepteurs Tie-1, Tie-2 (187), les métalloprotéinases et leurs inhibiteurs (188) et les activateurs du plasminogène (182, 186). D'autre part, des régulateurs négatifs endogènes comme la thrombospondine, l'angiostatine, l'endostatine (189), et le facteur plaquettaire-4 ont été décrits (190). En dehors des facteurs solubles, les intégrines jouent un rôle considérable dans ce processus en contrôlant l'adhésion et la migration des cellules endothéliales grâce aux interactions avec la matrice extracellulaire (186). Enfin, parmi les divers facteurs angiogéniques, la famille la plus étudiée est celle des VEGF qui a pour cible principale les cellules endothéliales (191).

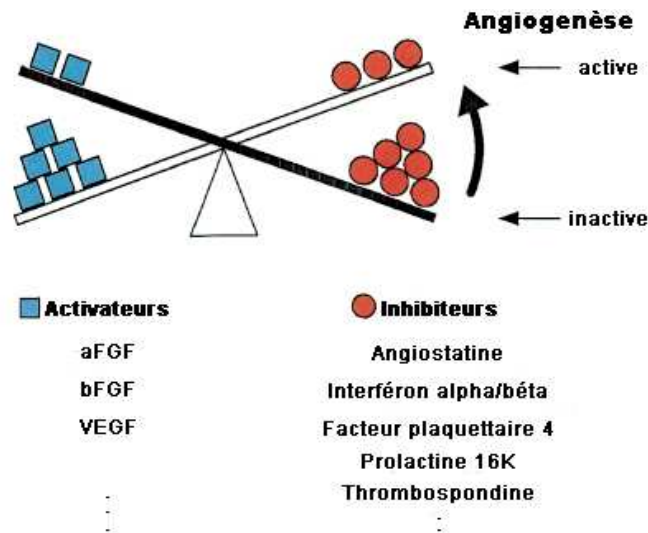


Figure 1-20: Modèle du « switch angiogène » (d'après Hanahan *et al.*, 1996).

1.5.5. L'hypoxie

L'hypoxie constitue un autre facteur stimulateur de la formation de nouveaux capillaires et le recrutement des cellules précurseurs endothéliales. Ainsi, au cours l'hypoxie insulaire post-isolement, les îlots pancréatiques activent les voies de l'hypoxie menant à la formation de nouveaux vaisseaux permettant l'irrigation des cellules β . L'hypoxie fournit sa réponse par l'activation des facteurs de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor). Ces facteurs surrégulent de nombreux gènes affectant la croissance des cellules endothéliales tels que le VEGF, l'Ang-2, l'HGF, le PlGF, Tie-2, Flt-1, le PDGF-B, la Nitric Oxyde Synthase (NOS), l'IL-6, l'IL-8, la MMP-2, la MMP-13, la PAI-1, l'uPAR, etc. (192). Mais ils régulent également le recrutement des cellules musculaires lisses, la vasorégulation et l'attraction des leucocytes (192). Les voies du HIF et du VEGF ont été privilégiées dans notre étude.

1.5.5.1. Hypoxia Inducible Factor-1

a) Structure du HIF-1

Le facteur de transcription HIF-1 est un hétérodimère composé d'une sous-unité HIF-1 α à l'expression fortement régulée et d'une sous-unité HIF-1 β exprimée de façon constitutive. Ce facteur de transcription permet aux cellules des eucaryotes supérieurs de s'adapter aux baisses de pression en oxygène en modulant l'expression d'un certain nombre de leurs gènes. La sous-unité 1 α

apporte sa spécificité au dimère puisque HIF-1 β peut s'associer avec d'autres protéines nucléaires. Le gène HIF-1 α est composé de 15 exons. Il produit, après transcription et traduction, une protéine de 826 acides aminés comprenant un domaine de liaison à l'ADN (participant également à la dimérisation avec HIF-1 β) appelé bHLH pour basic helix-loop-helix, un domaine de dimérisation avec la sous unité HIF-1 β appelé PAS pour PER-ARNT-SIM), un domaine ODDD (oxygen dependent degradation domain) et deux domaines de transactivation N- et C-terminaux (N- et C-TAD) (193).

b) Régulation du HIF-1

Les ARNm des gènes HIF-1 α et HIF-1 β sont retrouvés dans la plupart des types cellulaires. Leur expression était considérée comme constitutive mais il s'avère qu'elle peut rapidement varier dans certaines conditions. Cependant, la régulation transcriptionnelle des deux gènes HIF-1 α et HIF-1 β est assez peu illustrée dans la littérature. Les régulations traductionnelle et post-traductionnelle de la sous-unité 1 α sont les plus détaillées.

c) Régulation par les basses pressions en oxygène

En condition de normoxie, les deux ARNm codant les sous-unités de HIF-1 s'expriment mais la protéine HIF-1 α n'est pas détectable dans les cellules contrairement à la sous-unité HIF-1 β . Lors d'une diminution de pression en oxygène intracellulaire, la quantité de HIF-1 α augmente rapidement, en particulier au niveau nucléaire, sans qu'il y ait nécessairement un accroissement de la quantité de l'ARNm codant cette sous-unité. L'expression de la sous-unité α est régulée par des prolyl hydroxylases (PHD 1-3) qui ont besoin d'oxygène moléculaire et de fer pour fonctionner (194). Ces trois protéines sont les détecteurs d'oxygène qui permettent à la cellule de produire HIF-1 à bon escient. En normoxie, les PHD utilisent de l'O₂ comme substrat et hydroxylent au niveau du domaine ODDD les résidus Pro402 et Pro564 de la protéine HIF-1 α qui est synthétisée en permanence dans la cellule (195). L'utilisation de fer comme cofacteur des PHD explique l'action mimétique de l'hypoxie des ions cobalt et nickel ou de la déferoxamine, un agent chélateur du fer.

L'hydroxylation de ces prolines ainsi que l'acétylation du résidu Lys532 par l'acétyltransférase ARD1 (196) favorisent l'interaction de la sous-unité α avec la protéine de Von Hippel-Lindau (VHL), un composant du complexe multiprotéique E3-ubiquitine ligase du protéasome (197). HIF-1 α ubiquitinylée est alors reconnue par la sous-unité 26S du protéasome et dégradée (Fig.1-21, 193).

La fonction de transactivation de HIF-1 α , assurée par les domaines N-TAD et C-TAD de la protéine, est également régulée par une enzyme qui utilise l'oxygène moléculaire comme substrat. FIH1 (facteur inhibant HIF1) est une asparagyl hydroxylase qui ajoute un groupement – OH sur le résidu Asn803 de HIF1 α , n'empêchant pas l'accumulation de la protéine, mais prévenant son interaction avec ces co-activateurs p300 et CBP (198) (Fig. 1-21, 193). Ce mécanisme empêche HIF-1 de fonctionner en normoxie, dans le cas où la synthèse de sous-unité α surpasserait les capacités de dégradation de HIF-1 α par le système VHL-E3 ubiquitine ligase-protéasome.

En hypoxie, les enzymes prolyl et asparagyl hydroxylases ne trouvent plus suffisamment d'oxygène pour modifier la sous-unité α . En outre, les quantités d'acétyltransférase ARD1 sont diminuées par un mécanisme restant encore à élucider (196). En conséquence, la sous-unité HIF-1 α n'est plus reconnue par la protéine VHL et s'accumule. Elle interagit avec la protéine chaperonne Hsp90, effectue une translocation dans le noyau et s'associe avec HIF1 β . L'hétérodimère ainsi formé reconnaît les HRE présents sur les promoteurs de gènes cibles, fixe les facteurs de transcription auxiliaires comme CBP/p300 et augmente la transcription des gènes reconnus (Fig.21, 193).

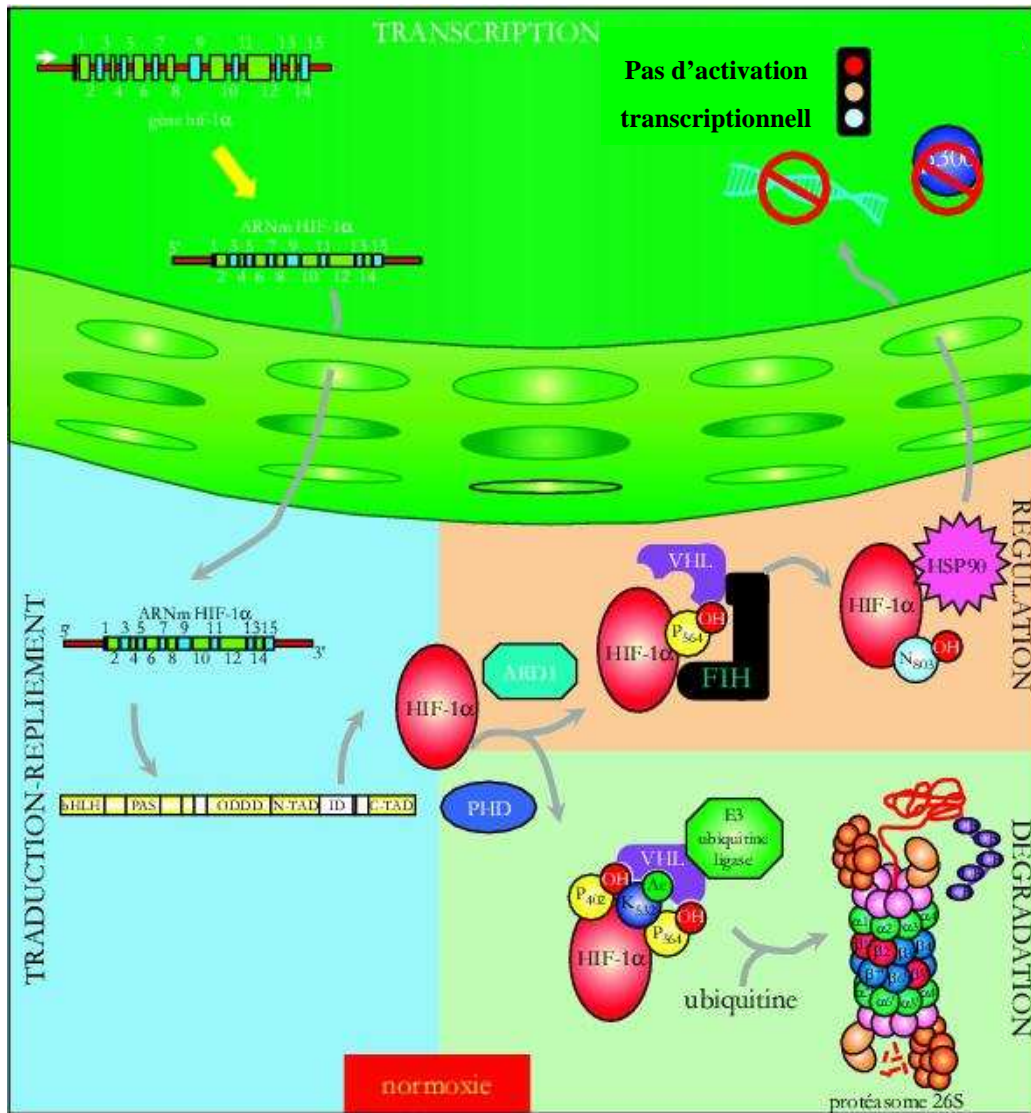


Figure 1-21: Régulation de l'activité de HIF-1 dépendante de l'oxygène (d'après Éric Clottes, 2005).

d) *Régulation indépendante de l'oxygène*

Un autre type de régulation de la sous-unité HIF-1 α , indépendant de l'oxygène, a été démontré.

Certaines cellules en multiplication rapide sous l'effet de facteurs de croissance ont une expression accrue de HIF-1 α malgré un environnement correctement pourvu en oxygène. Alors que l'hypoxie augmente l'expression de HIF-1 α , donc les quantités de HIF-1, dans tous les types cellulaires en diminuant la vitesse de dégradation de la sous-unité α , la stimulation de la croissance cellulaire par des facteurs trophiques permet d'accroître la quantité de protéine HIF-1 α en augmentant la traduction de son ARNm.

La synthèse accrue de HIF-1 α peut être inhibée par la rapamycine, un antibiotique produit par la

bactérie actinomycète *Streptomyces lygrosopicus*, qui cible la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin), également appelée FRAP (FKBP-rapamycin-associated protein), située en aval de la PI3K et de l'Akt (ou protéine kinase B). La kinase mTOR phosphoryle une autre kinase appelée p70S6K qui elle-même active par phosphorylation la protéine ribosomale S6. En outre, mTOR inhibe en la phosphorylant la protéine 4E-BPI, un régulateur négatif du facteur d'initiation de la traduction eIF-4E (Fig. 1-22, 193).

L'activation de la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases), comprenant RAF-MEK-ERK, peut également stimuler la traduction de la sous-unité 1α par phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF-4E via la protéine MNK (MAPK-interacting kinase). Cette voie de signalisation augmente également la fonction transactivatrice de HIF-1 en agissant directement sur l'état de phosphorylation du co-activateur p300 (199) qui interagit avec le domaine de transactivation C-terminal de HIF-1 α (Fig. 1-24, 193). Une phosphorylation directe de HIF-1 α par les MAPK est également envisagée (200) mais, à ce jour, aucune preuve directe de l'identité du ou des résidus de HIF-1 α phosphorylés n'a été apportée.

L'expression de HIF-1 α dépend donc en grande partie des vitesses relatives de synthèse et de dégradation de la protéine. La vitesse de synthèse peut être augmentée et la vitesse de dégradation peut, quant à elle, être diminuée comme lors d'une hypoxie. Enfin, si les protéines impliquées dans la dégradation de HIF-1 α sont inhibées ou mutées, alors HIF-1 α aura tendance à s'accumuler (193).

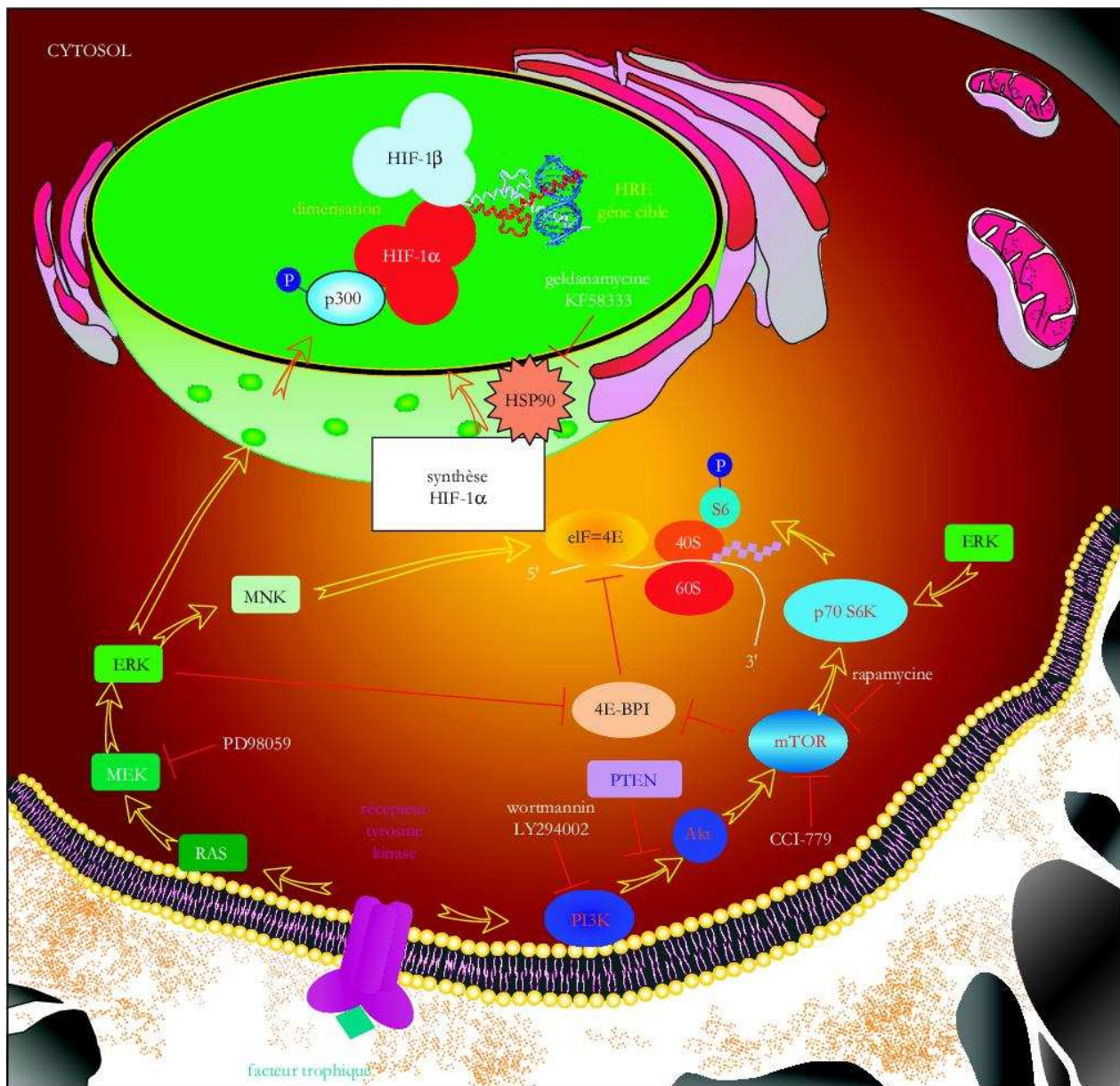


Figure 1-22: Régulation de la synthèse protéique de HIF1 α indépendante de la pression en oxygène dans la cellule (d'après **Éric Clottes, 2005**).

1.5.6. VEGF

1.5.6.1. Définition et membres de la famille VEGF

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGF, encore appelé VPF (pour facteur de perméabilité vasculaire) est une glycoprotéine dimérique liée par un pont disulfure hautement conservé, avec une masse moléculaire de 34-45 kDa, qui perd son activité biologique en présence d'agents réducteurs (201). Le VEGF a une activité mitogène spécifique pour les cellules endothéliales *in vitro* (202) et un fort pouvoir angiogénique *in vivo* en augmentant la perméabilité vasculaire (203), ce qui permet l'extravasation des protéines du plasma et la formation d'une matrice

extracellulaire favorable à la migration des cellules endothéliales et stromales. L'expression de ce facteur et de ses récepteurs est corrélée avec le développement embryologique, le développement cyclique de l'endomètre, du placenta, des hémangiomes ou des tumeurs.

La famille du gène VEGF comprend 6 membres: VEGF-A (ou VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et PlGF (Fig. 1-23, 204). Le VEGF, qui a d'abord été étudié pour sa capacité à induire la perméabilité et l'épanchement vasculaire, est principalement impliqué dans l'angiogenèse tandis que les VEGF-C et -D sont principalement impliqués dans la lympho-angiogenèse (185, Fig. 1-23).

La transcription de l'ARNm du VEGF est induite par différents facteurs de croissance et cytokines (PDGF, EGF, TNF- α , TGF- β et Il-1 β), par l'activation de la cyclooxygénase-2 (COX-2), par l'hypoxie, mais aussi par des forces mécaniques de stress (186, 201). Le VEGF-B est structurellement similaire au VEGF et au PlGF. Des niveaux élevés des VEGF-B et -C ont été associés à la formation de métastases dans les nodules lymphatiques du cancer colorectal mais son rôle dans la progression tumorale n'a pas été complètement éclairci (185). Le VEGF-C a été isolé du milieu conditionné de cellules cancéreuses prostatiques humaines PC3. Les VEGF-C et -D promeuvent la mitogenèse et la survie des cellules endothéliales lymphatiques (185). Le VEGF-E est l'homologue viral du VEGF codé par le virus Orf (185).

Chez l'homme, le gène du VEGF (ou VEGF-A) est constitué de 8 exons dont l'épissage alternatif donne des variants qui se distinguent entre autres par leur capacité à lier l'héparine et l'héparine sulfate. Les isoformes les plus communs sont constitués de 121, 145, 165, 189, et 206 acides aminés (188, Fig. 1-24, 205). Toutes les isoformes montrent des activités biologiques identiques, mais les VEGF121 et VEGF165 sont sécrétés dans l'environnement extracellulaire tandis que les VEGF145, VEGF189 et VEGF206 restent associés à la cellule ou à la matrice via leur affinité pour l'héparine sulfate. L'isoforme prédominant est le VEGF165 qui est également le plus puissant en terme de stimulation de l'angiogenèse (204).

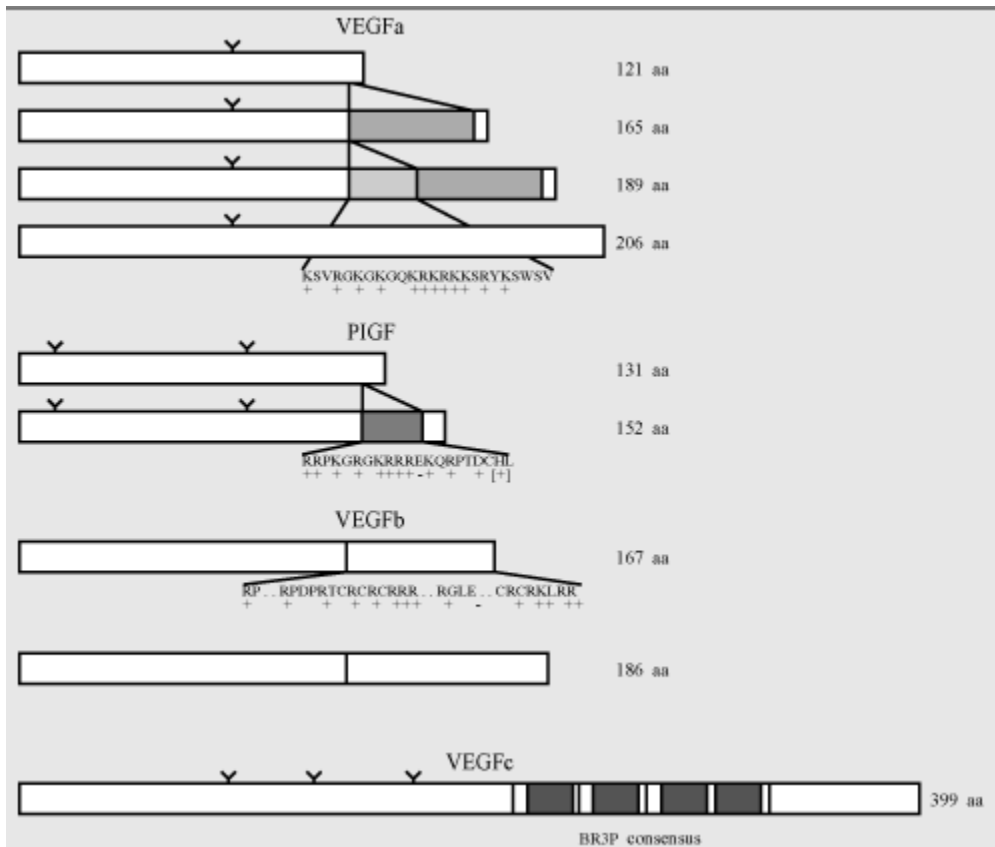


Figure 1-23: Représentation schématique de 4 ligands caractérisés de la famille du VEGF (d'après Fournier *et al.*, 1997).

Diverses isoformes sécrétées de la famille du VEGF sont représentées à l'aide de barres. Les sites potentiels de N-glycosylation sont indiqués par le Y. Les séquences codées par les exons épissés alternativement sont montrées en différents niveaux de gris ; les résidus positivement chargés dans ces séquences sont supposés interagir avec la matrice extracellulaire. Les répétitions de portions riches en cystéine trouvées dans le VEGFc, sont en gris.

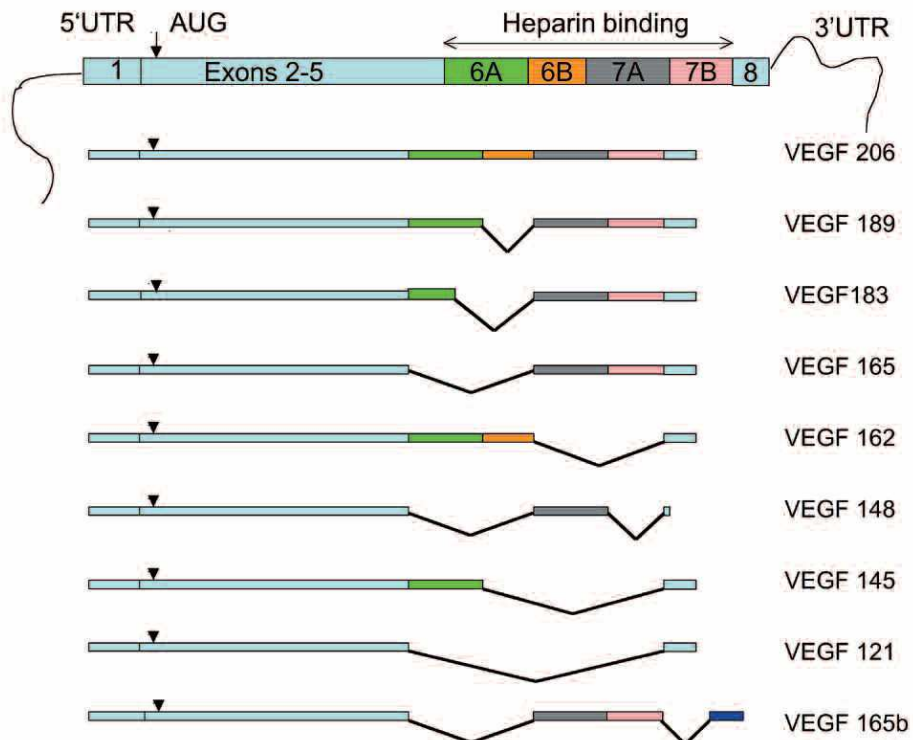


Figure 1-24: Les différentes isoformes de VEGF (d'après Fergelot *et al.*, 2005).

1.5.6.2. Récepteurs du VEGF

L'activité biologique des VEGF dépend de son interaction spécifique avec des récepteurs. En effet, le VEGF se lie à des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase spécifiques des cellules endothéliales (Fig. 1-25). Ainsi, l'effet des VEGF se fait par l'intermédiaire de trois récepteurs tyrosine kinase nommé VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1 et VEGFR-3/Flt-4. Le profil de liaisons des VEGF à ces récepteurs n'est pas spécifique à un membre en particulier. En effet, VEGFR-1 lie VEGF-A, -B et PlGF-1,-2, VEGFR-2 lie VEGF-A, -C et -D tandis que VEGFR-3 lie VEGF-C et -D (Fig. 1-25). Cette interaction VEGF-récepteur aboutit à la formation de dimères, à une auto-phosphorylation et à une activation des protéines kinases (206, Fig. 1-26, 204). Les VEGFR sont exprimés à un faible niveau dans beaucoup de tissus adultes mais leur niveau d'expression dans les cellules endothéliales est augmenté pendant le développement ainsi que dans des pathologies où l'angiogenèse joue un rôle important. Ainsi, l'inactivation des gènes codant pour VEGFR-1, VEGFR-2 ou VEGFR-3 résulte chacune en une létalité embryonnaire chez la souris (207). Des études ont montré que la différenciation des cellules endothéliales, ainsi que la vasculogenèse, ne sont pas affectées par l'absence de VEGFR-3, par contre le développement de l'hématopoïèse au niveau de la membrane vitelline est diminuée, suggérant un rôle pour VEGFR-3 dans l'hématopoïèse (208). Ainsi, dans le cadre de l'angiogenèse, seuls les récepteurs VEGFR-1 et -2 sont impliqués.

Ces récepteurs sont régulés par des mécanismes autocrine et paracrine (209). Des études menées sur des modèles knock-out des récepteurs du VEGF ont montré que ces derniers jouaient un rôle important dans la régulation de la prolifération des cellules endothéliales et dans la formation des vaisseaux sanguins (210). VEGFR-1 et -2 sont retrouvés sur l'endothélium vasculaire, mais ont des fonctions différentes in vivo. Le VEGFR-2 est un récepteur actif impliqué dans la médiation de la croissance vasculaire et dans l'action de perméabilité vasculaire du VEGF. Le rôle du VEGFR-1 est de moduler l'activité de VEGFR2, en inhibant l'interaction VEGFR-2-VEGF (209). En effet, VEGFR-1 inhibe la prolifération excessive et la migration de cellules endothéliales vasculaires

(211, 212), alors que VEGFR-2 permet leur prolifération et leur différenciation (191, 208).

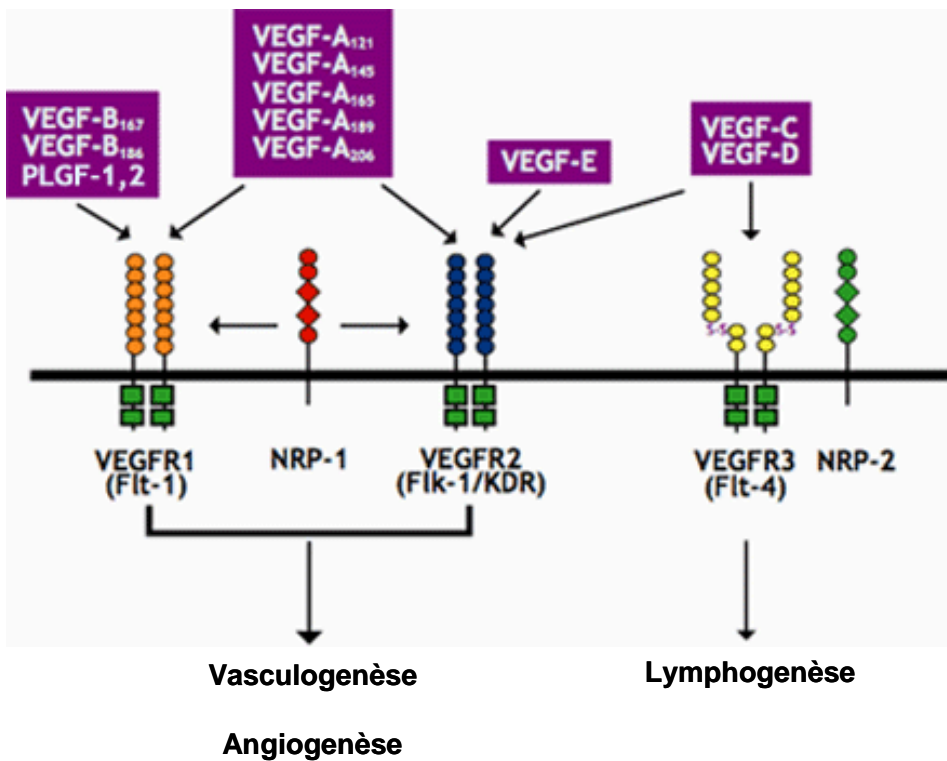


Figure 1-25: Famille des VEGF et leurs récepteurs (www.researchvegf.com).

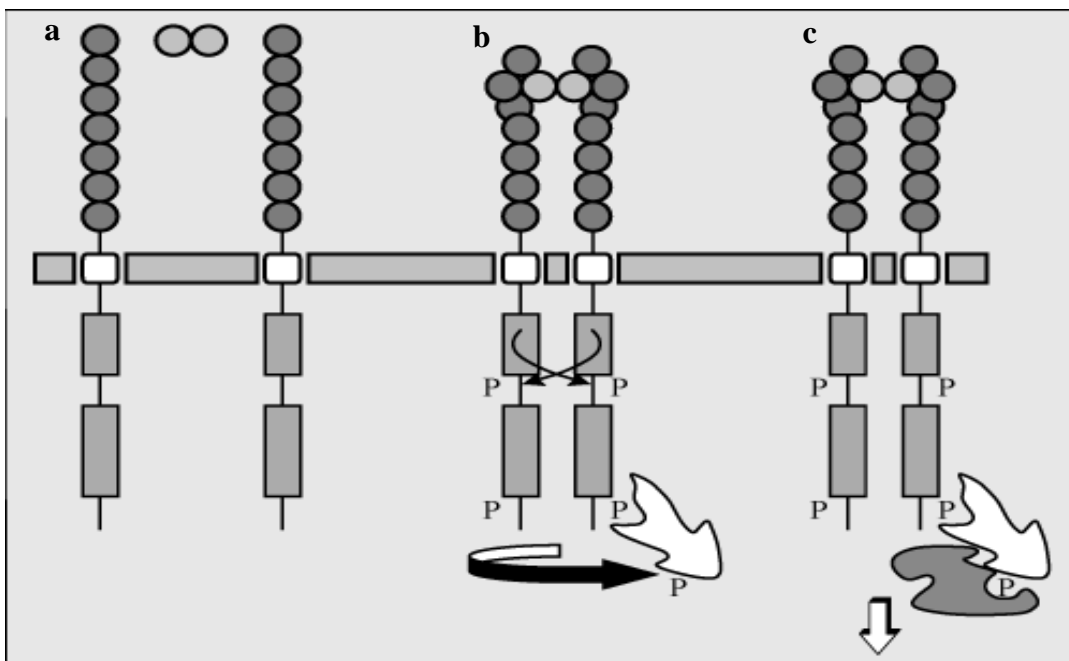


Figure 1-26: Trois étapes dans l'activation d'un récepteur tyrosine kinase de type VEGFR. (d'après Fournier E *et al.*, 1997).

a- liaison du ligand (ici un ligand VEGF dimérique).

b- dimérisation et transphosphorylation du récepteur.

c- activation (phosphorylation et association) de molécules de la cascade de signalisation en aval.

1.5.6.3. Voies de signalisations du VEGF

Le VEGF régule plusieurs fonctions de la cellule endothéliale, incluant la prolifération, la différenciation, la perméabilité, la tonicité vasculaire et la production de molécules vasoactives. La fixation du VEGF à son récepteur VEGFR-2 induit la phosphorylation de ce dernier, ce qui permet au récepteur d'activer une gamme de molécules de signalisation, en incluant la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Shc, Grb2 et les phosphatases SHP-1 et SHP-2. La phosphorylation du récepteur du VEGF peut également activer la cascade des MAPK via la stimulation de Raf à l'origine de l'expression de gènes et de la prolifération cellulaire. Elle permet également, l'activation de la PI3K qui induit l'activation de PKB (ou Akt) et la survie cellulaire, l'activation de la PLC- γ qui stimule la prolifération cellulaire, la vasoperméabilité par stimulation de la production d'oxyde d'azote (NO) via l'activation de la NO Synthase III (Fig. 1-27). Ainsi, le recrutement de toutes ces voies moléculaires par l'interaction VEGF/VEGFR-2 est à l'origine de l'angiogénèse.

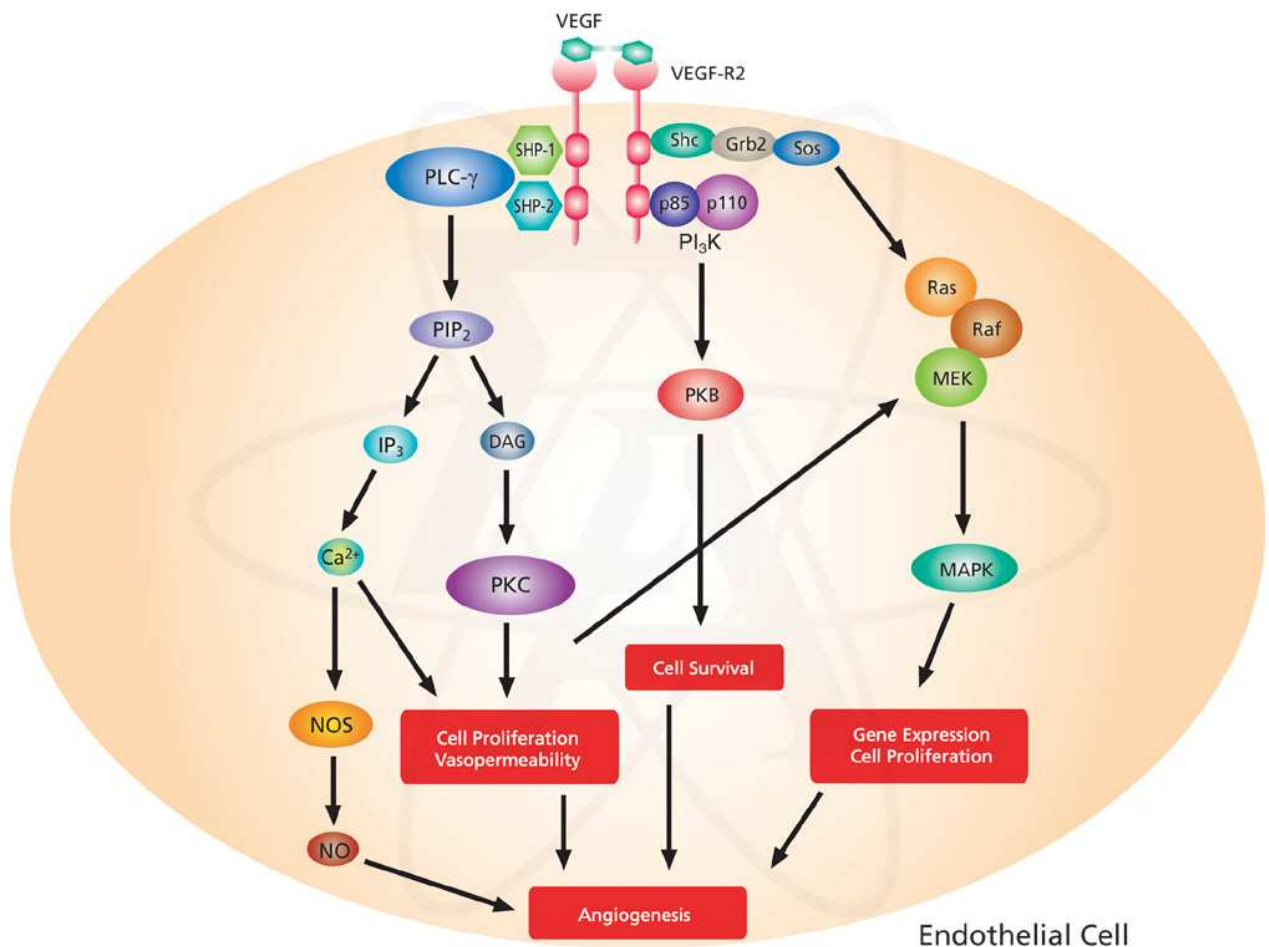


Figure 1-27: Voies de signalisations moléculaires du VEGF (Sigma-Aldrich).

Par ailleurs, des études ont démontré qu'en réponse à des signaux prolifératifs tel que le VEGF, la protéine mTOR joue un rôle clé dans la régulation traductionnelle de protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (p27, cycline D1, c-myc, VEGF ou HIF1 α) (213, 214). Au total l'activation de mTOR aboutit à la progression du cycle cellulaire, donc à la prolifération cellulaire et par conséquent à l'angiogenèse dans le cas d'une stimulation au VEGF via la voie PI3K/Akt (215, 216). Pour ce faire, mTOR active deux protéines majeures de l'induction de la traduction protéique. Premièrement, la protéine ribosomale p70S6K qui est impliquée dans la biogenèse des ribosomes. Deuxièmement, mTOR phosphoryle 4EBP1 et induit la dissociation de cet inhibiteur du facteur d'initiation de la traduction eIF4E qui va alors pouvoir induire et augmenter la traduction CAP-dépendante (213, 214, Fig. 1-28, 216).

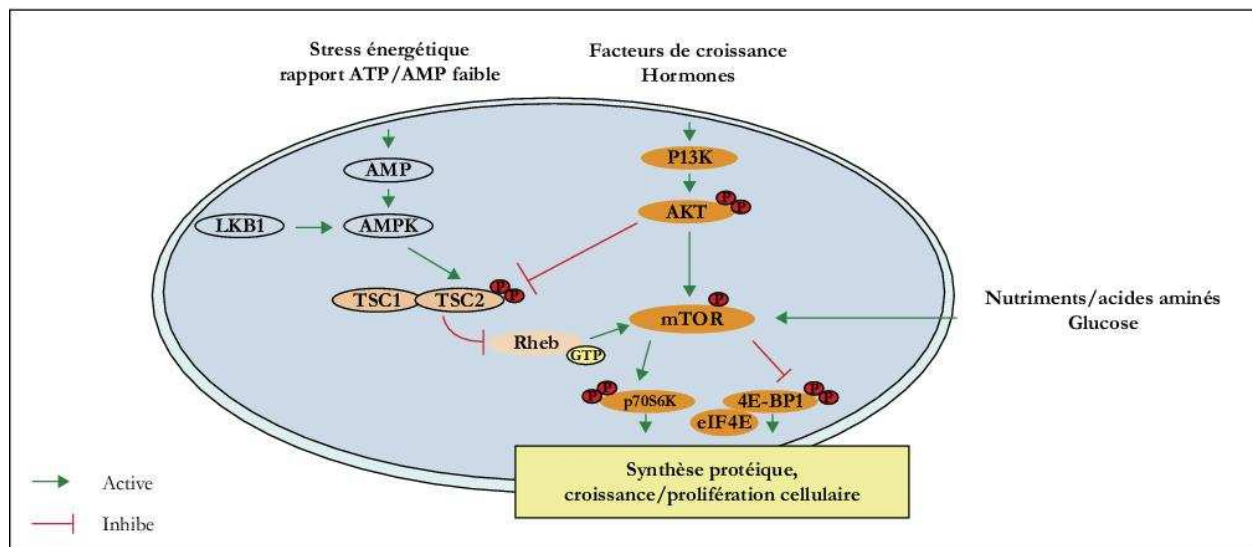


Figure 1-28: Représentation schématique des voies classiques conduisant à l'activation de mTOR et à ses effets biologiques (d'après Cédric Dos Santos *et al.*, 2006).

La description du rôle de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans l'angiogenèse est très importante dans le cadre de la revascularisation des îlots pancréatiques. En effet, un des traitements immunosuppresseur utilisé pour la transplantation d'îlots selon le protocole d'Edmonton est la Rapamycine. Or, cette molécule, utilisée en tant que traitement anti cancéreux (216, 217), a comme propriété d'inhiber la protéine mTOR et par conséquent la synthèse protéique, la croissance et la prolifération cellulaire. Ainsi, la Rapamycine constitue un obstacle supplémentaire à la revascularisation des îlots après transplantation.

1.6. Approches thérapeutiques de la stimulation de la vascularisation

1.6.1. Rôle du VEGF dans la revascularisation des îlots pancréatiques au cours de la transplantation

Bien qu'un certain nombre de facteurs jouent un rôle important dans la revascularisation des îlots (218, 219), les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus de revascularisation des îlots après transplantation, sont encore mal connus. Parmi ces facteurs, on retrouve le VEGF, la molécule clé de l'angiogenèse.

Des études préliminaires menées au laboratoire ont montré que l'ajout local de VEGF dans un modèle de transplantation allogénique d'îlots de Rat encapsulés, augmentait, au cours du temps, le diamètre et la densité des vaisseaux sanguins du tissu épiploïque en regard du module d'encapsulation (Fig. 1-29, 220). De plus, Sigrist *et al.*, ont également montré que cet ajout local de VEGF dans un module d'encapsulation d'îlots de Rat, augmentait de façon significative la viabilité des îlots transplantés, entraînant une normoglycémie prolongée des souris diabétiques (221). Ainsi, une production locale élevée de VEGF au niveau de la greffe d'îlots facilite le processus de revascularisation, contribue à l'augmentation de la masse d'îlot et améliore le contrôle glycémique.

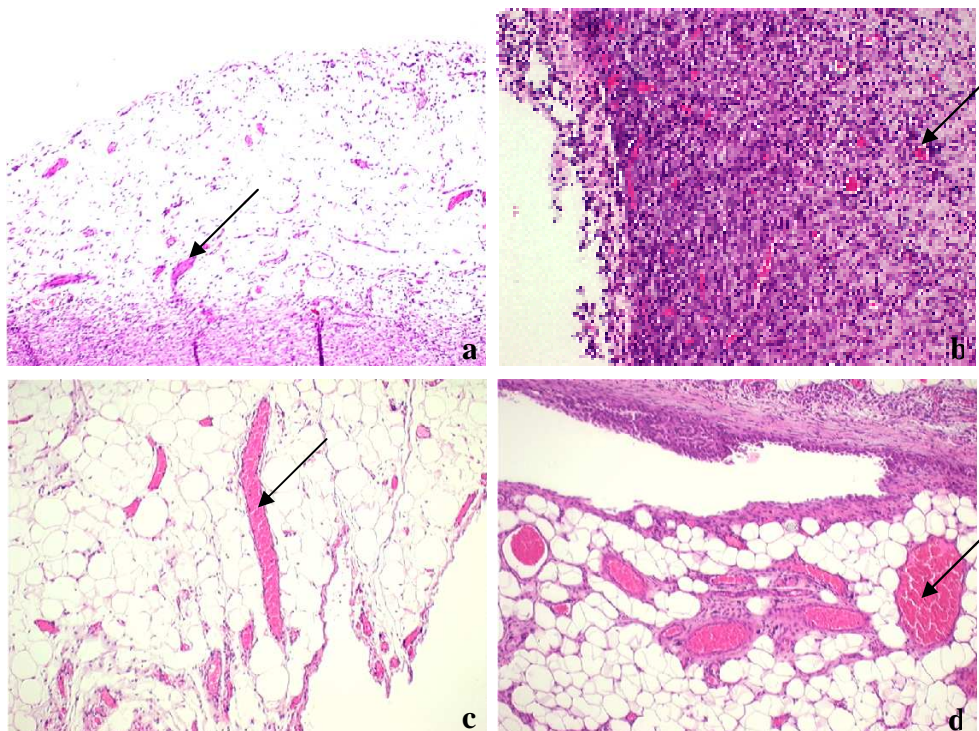


Figure 1-29: Analyse histologique des bourgeons vasculaires 7 (a, b) et 28 jours (c, d) après implantation des modules contenant des îlots seuls (a, c) ou supplémentés avec du VEGF (b, d). x40, (d'après Sigrist *et al.*, 2003).

Plusieurs études *in vitro* ont montré que l'expression et la sécrétion du VEGF étaient augmentées dans les îlots lorsqu'ils étaient en condition hypoxique (222). Ainsi, étant donné que les îlots sont en hypoxie les premiers jours qui suivent la transplantation, le VEGF apparaît comme un stimulus important intervenant dans la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins et le développement de leurs fenestrations (222, 223). En effet, en 2006, Brissova *et al.*, montrèrent que l'inactivation spécifique de l'expression du VEGF-A dans les cellules β induit une perte significative de la densité, de la taille et de la perméabilité des vaisseaux des îlots pancréatiques (224). Ainsi, la vascularisation des îlots est liée au niveau d'expression du VEGF-A. Par conséquent, le VEGF-A est le régulateur majeur de la vascularisation des îlots au cours de la transplantation (224). De plus, le VEGF-A est constitutivement exprimé par les cellules β des îlots pancréatiques (218, 225) et la microvasculature des îlots expriment les récepteurs principaux du VEGF-A c'est-à-dire VEGFR-1 et -2 (226, 227). Par ailleurs, le VEGF-A stimule la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans les îlots pendant le développement foetal (225, 227), après la transplantation d'îlots isolés (178) et pendant la carcinogenèse de l'îlot (225).

En plus d'être un important stimulateur de l'angiogenèse (225, 227), le VEGF inhibe l'apoptose des cellules β et augmente la sécrétion d'insuline des îlots transplantés (228). De plus il a été montré que le VEGF mobilisait les cellules endothéliales progénitrices (229) qui augmente la revascularisation des îlots transplantés (230).

Ainsi, l'apport de VEGF au site de transplantation des îlots, pourrait être envisagé comme stratégie originale pour accélérer la revascularisation des îlots et améliorer la survie et la fonctionnalité du greffon après transplantation. Cependant, les limites d'une telle approche sont liées à la courte durée de vie du VEGF qui ne permet pas une action à long terme s'il est ajouté localement. Il serait cependant envisageable de faire surexprimer le VEGF par les îlots pancréatiques eux mêmes soit en leur apportant le gène du VEGF par thérapie génique, soit par une approche pharmacologique en utilisant par exemple de la déferoxamine (DFO).

1.6.2. La déferoxamine

1.6.2.1. Définition

La DFO ($C_{25}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_4O_3S$, Fig. 1-30), est un sidérophore issu de la bactérie *Streptomyces pilosus* (231). Les sidérophores sont des molécules de bas poids moléculaires, chélatrices du fer ferrique, excrétées par les microorganismes pour solubiliser le fer de l'environnement et permettre sa nécessaire «capture» par le microorganisme (232). La DFO capture aussi bien le fer ferrique (Fe^{3+}) libre que le fer lié à l'hémossiderine et à la ferritine mais ne chélate pas le fer de l'hémoglobine ni des cytochromes et améliore son élimination dans les urines. A l'heure actuelle, la DFO, qui fut découverte dans les années 60, est le seul chélateur utilisé cliniquement pour traiter les désordres rattachés à la surcharge et à l'accumulation pathologique en fer chez l'homme tel que la Thalassémie ou l'hémochromatose, sous le nom de Desféral[®] (méthane sulfonate de la desferrioxamine B naturelle, 231, 233). Ainsi, en enlevant l'excès de fer, la DFO réduit les dommages fait aux différents organes et aux tissus, tel que le foie.

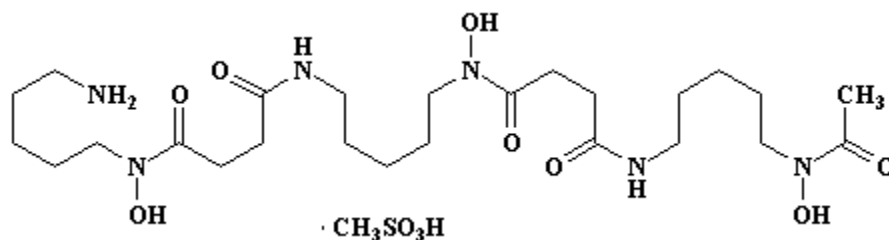


Figure 1-30: Déferoxamine mesylate.

N'-[5-(Acetylhydroxyamino) pentyl]-N-(5-{3-[(5-aminopentyl) hydroxycarbonyl] propanoylamino} pentyl)-N-hydroxysuccinamide monome thanesulfonate.

1.6.2.2. Surcharge en Fer et insulino-résistance

La responsabilité du fer dans l'apparition du diabète est étayée par la fréquence élevée de diabète et d'intolérance au glucose observée dans les surcharges en fer post-transfusionnelles (234). De plus, des études menées sur le Rat et le Lapin ont montré que l'administration de fer par voie orale (235) ou intra-péritonéale (236) induisait un diabète, dont l'apparition pouvait être prévenue par les saignées répétées. Par ailleurs, dans l'hémochromatose génétique chez l'homme, une régression des altérations précoces du métabolisme du glucose (augmentation du peptide C à jeun et

après charge glucosée) peut être obtenue après déplétion en fer (237). Il existe donc une relation directe entre l'importance de la surcharge en fer, appréciée par la concentration ferrique du foie, et l'existence d'un diabète comme cela a été montré sur différentes études dans l'hémochromatose (238, 239) mais aussi dans une population non hémochromatosique (240). Tuomainen *et al.*, ont observé que la glycémie et insulinémie sont élevées lorsque le taux de ferritine est modérément élevé (150 µg/L) chez des patients non hémochromatosiques (241). De plus, des études *in vitro* ont montré que l'expression de l'ARNm de la H-ferritine était 4 à 8 plus fois plus élevée dans les îlots pancréatiques de Rat traités avec 20 mmol/L de glucose que dans les îlots traité avec 1 mmol/l de glucose (242). Ainsi, il existe un lien entre surcharge en fer et hyperglycémie. En effet, les dépôts de fer dans les cellules β des îlots de Langerhans provoquent une réduction de la sécrétion d'insuline (243). De même, Fernandez-Real *et al.*, (244) a démontré une relation directe entre glycémie et ferritinémie et une relation inversement directe entre sensibilité à l'insuline et ferritinémie lors de l'hyperglycémie provoquée par voie intraveineuse chez le sujet normal. Par ailleurs, Cavallo-Perin *et al.*, ont montré que la sensibilité à l'insuline était diminuée de 40% chez les patients thalassémiques (245). Enfin, les concentrations sériques en ferritine sont augmentées de façon significative chez les patients ayant un diabète mal contrôlé (246) et l'amélioration à court terme du contrôle glycémique est associée à une nette diminution de la concentration sérique en ferritine (247).

1.6.2.3. Effet anti-prolifératif de la DFO

De nombreuses études *in vitro* et des essais cliniques ont démontré la capacité des chélateurs du fer, tel que la DFO, à inhiber la croissance tumorale dans quelques tumeurs comme le neuroblastome et la leucémie (248, 249, 250). De même, Chenoufi *et al.*, ont démontré que sous l'effet de la DFO, la progression du cycle cellulaire des hépatocytes porcins était arrêtée en phase G1 (245). Il faut d'ailleurs noter que la DFO, par chélation du fer, induit une diminution de la phosphorylation de pRb (retinoblastoma susceptibility gene product), de l'expression de la famille des cyclines D (cyclin D1–D3) et du Cdk2 (cyclin-dependent kinase 2) qui sont essentielles pour la

progression du cycle cellulaire de la phase G1 à S (252). Ainsi, ces données reflètent l'importance du rôle du fer dans différentes voies métaboliques telles que la synthèse d'ADN et la production ATP (10). Ainsi, le fer est indispensable à la prolifération cellulaire et peut être considéré comme un facteur de croissance (253). Bien que cette prolifération ne soit pas démontrée à ce jour dans les îlots pancréatiques transplantés, ceci suggère que le fer pourrait également être nécessaire à la prolifération cellulaire des cellules β pancréatiques, et que la DFO jouerait un rôle anti prolifératif sur ces mêmes cellules.

1.6.2.4. Effet anti-oxydant et anti-apoptotique de la DFO

Le stress oxydant a des effets néfastes sur la santé de la population générale et de certains groupes de patients avec des maladies chroniques et aiguës, que certains micronutriments et habitudes alimentaires peuvent moduler. L'éventail des modifications qui peuvent survenir en réponse au stress oxydant comprend, entre autres, l'augmentation de l'insulino-résistance (254), de la lipoperoxydation (255), de l'oxydation des protéines (256) et des altérations de l'ADN (257). Ainsi, le fer est intimement relié au stress oxydant (244). En effet, le fer libre génère des radicaux libres très réactifs et extrêmement toxiques comme l'hydroxyde et l'anion superoxyde, à partir de l'espèce peu réactive H_2O_2 , par une réaction appelée réaction de Fenton (244, 258). Toutefois, le fer ne peut donner cette réaction de Fenton que lorsqu'il est libre, c'est à dire non lié aux protéines comme la transferrine non saturée ou la ferritine (244). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que la DFO prévenait la dégénérescence cellulaire et l'apoptose induites par le stress oxydant sur différents types cellulaires, dont les cellules RIN, par sa propriété chélatrice du fer (258, 259). De même, un traitement à la DFO augmente de façon significative la survie de rats présentant une infection et altère l'expression de la protéine Bax au niveau du cœur, du rein et du foie (260). Enfin, Mendola *et al.*, ont également montré que la DFO pouvait protéger les îlots pancréatiques de souris de la destruction immunitaire après transplantation dans un modèle de souris diabétique induit par la streptozotocine (261).

1.6.2.5. Induction de l'expression du VEGF par la DFO

Des études *in vitro* ont montré que la DFO pouvait également stimuler l'expression du VEGF dans différents types cellulaires en mimant un état d'hypoxie (262, 263). En effet, la DFO est connu pour sa capacité à simuler un stress hypoxique en induisant l'expression et la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α responsable de la transcription du gène du VEGF (264).

Ainsi, de part ses propriétés anti-oxydante, anti-apoptotique et stimulatrice de l'expression du VEGF, la DFO semble être un outil intéressant pour stimuler la revascularisation des îlots pancréatiques et améliorer la viabilité du greffon au cours de la transplantation.

1.6.3. Thérapie génique

1.6.3.1. Historique

Le concept de thérapie génique, réparer ou modifier le patrimoine génétique pour traiter une pathologie, a été réellement évoqué par la communauté scientifique à la fin des années 1960 (265). Mais si tous les éléments théoriques étaient présents, le niveau technologique ne permettait pas encore de réaliser pratiquement cette approche. L'amélioration des connaissances concernant les liens entre certains gènes mutés et certaines pathologies, la création de système de transfert de gènes à partir de virus sécurisés et l'amélioration des technologies de manipulation de l'ADN ont permis à cette idée théorique de voir le jour sous la forme d'un premier essai clinique dans le traitement du mélanôme, initié par Rosenberg aux États-Unis à la fin des années 1980 (266). Les années 1990 et le début du XXI^{ème} siècle voient éclore une kyrielle d'essais cliniques dans des pathologies très diverses : cancer, maladies cardiaques et vasculaires, infections virales, immunodéficiences héréditaires, ... associée à un engouement majeur du public (notamment à travers le Téléthon) et des investisseurs (267, 268, 269). Cependant, aucun bénéfice réel n'est observé pour les quelques 4000 patients enrôlés dans les 400 à 600 essais réalisés durant cette période. Ainsi, l'entrée de la thérapie génique dans le XXI^{ème} siècle a été marquée par des difficultés de communication entre la communauté scientifique académique et celle de l'industrie, par un désengagement progressif des capitaux-risqueurs sur les approches de thérapie génique et par une méfiance concernant le réel

potentiel de cette stratégie. Le succès thérapeutique du protocole d'Alain Fischer sur le traitement des enfants-bulles atteints d'immunodéficience sévère dans les années 2000, démontrant formellement l'intérêt du concept mais mitigé par certains effets secondaires graves, ne parvint pas à relancer totalement les efforts des divers acteurs sur ce domaine (270). Aujourd'hui, de nombreuses équipes internationales continuent à travailler pour faire de la thérapie génique un outil supplémentaire à la panoplie des traitements hospitaliers (271).

1.6.3.2. Vecteurs

Une fois le gène sélectionné pour son potentiel thérapeutique face à une pathologie, une étape cruciale de la thérapie génique est de faire pénétrer la nouvelle information génétique dans l'organisme du patient. Dans cet esprit, est qualifié de vecteur de thérapie génique tout système permettant le transfert de ce gène dans une cellule (Fig. 1-31). Les vecteurs utilisés en thérapie génique, et les cellules modifiées génétiquement par ces vecteurs sont classifiés comme des OGMs (Organismes Génétiquement Modifiés) (272).



Figure 1-31: Mécanisme simplifié d'une thérapie génique (Transgène®).

1. Insertion d'un gène dans un vecteur ; 2. Transfert du vecteur transportant le gène "thérapeutique" dans la cellule cible ; 3. Entrée et transport du gène dans le noyau cellulaire ; 4. Transcription de l'ARNm à partir du gène et Traduction de l'ARNm en protéine ; 6. Sécrétion, fixation membranaire ou expression cytoplasmique de la protéine.

a) Vecteurs non viraux

De multiples vecteurs ont été envisagés dans le cadre de la thérapie génique. Si les premiers

étudiés étaient les virus, depuis une dizaine d'années, de nombreux systèmes non viraux ont été mis au point. Les deux principales approches, la lipofection et la polyfection, reposent sur des interactions entre les charges négatives de l'ADN et les charges positives du vecteur afin de faciliter la traversée de la membrane des cellules et l'entrée des molécules d'ADN (273). Ces vecteurs produits par des bactéries, facilement purifiables, sont des particules inertes et n'ont pas les caractères potentiellement pathogènes des virus qui sont à l'origine des vecteurs viraux. A l'inverse des vecteurs viraux, ils sont plus faciles à produire, à manipuler et à stocker et sont caractérisables comme des produits pharmaceutiques classiques. Cependant, leur efficacité est bien moindre que celle des virus permettant de transférer une information génétique dans une grande population de cellules, rendant difficile leur utilisation dans certains cas (modification d'une grande partie des cellules d'une tumeur par exemple) (273). En outre, ils n'ont qu'une capacité très réduite à intégrer l'information génétique dans le génome, les rendant ainsi inutiles pour des modifications génétiques pérennes de populations cellulaires en prolifération active. Cette technologie peut être cependant parfaitement adaptée à certaines stratégies thérapeutiques reposant sur le déclenchement d'une cascade d'évènements à partir de quelques cellules modifiées génétiquement (273).

b) Vecteurs viraux

L'utilisation de virus modifiés pour transporter un gène thérapeutique repose sur le constat d'efficacité des virus pour transférer leur propre matériel génétique dans les cellules humaines. Pour produire des vecteurs viraux, on utilise des virus modifiés génétiquement, dits sécurisés. Le principe consiste à éliminer les séquences du virus qui codent des protéines, notamment celles associées à un éventuel comportement pathogène du virus, et à ne conserver que celles qui sont utilisées pour construire la particule virale et assurer le cycle d'infection. Le génome du virus est reconstruit pour porter les séquences du gène thérapeutique. Les protéines virales qui potentiellement manqueraient à la formation des particules virales thérapeutiques sont fournies par des cellules dites productrices ou d'encapsidation lors de la phase de production des vecteurs (272).

c) Vecteurs Rétroviraux

Les rétrovirus sont des virus à ARN monocaténaire enveloppés dont la taille du génome est de sept à onze kilobases. Une fois qu'il est entré dans la cellule cible, son ARN est transcrit en ADN bicaténaire pour ensuite être intégré dans la chromatine de l'hôte. Ces virus causent des maladies chroniques qui peuvent être latentes pendant un certain temps. Le génome des rétrovirus contient deux régions appelées Long Terminal Repeat (LTR) séparées par les gènes gag, pol et env codant respectivement pour les protéines structurales, les polymérases et les intégrases ainsi que pour les glycoprotéines de surface (Fig.1-32). Lorsqu'ils sont utilisés comme vecteur, ils peuvent emmagasiner jusqu'à huit kilobases d'ADN (274). Plusieurs avantages sont rattachés à l'utilisation de ce vecteur: il infecte seulement les cellules en division, ce qui procure une certaine sécurité pour les cellules quiescentes entourant une tumeur et l'ADN transporté par le rétrovirus est intégré dans le génome de l'hôte, ce qui permet une expression prolongée du transgène. Les inconvénients liés à l'utilisation de ce vecteur sont toutefois nombreux: les titres obtenus sont bas, 10^5 à 10^7 vi/mL; le virus peut se recombiner, lui permettant de redevenir de type sauvage et retrouver son pouvoir de réplication; l'intégration de l'ADN dans le génome se fait de façon aléatoire risquant ainsi d'activer des oncogènes ou d'inhiber des gènes suppresseurs de tumeur; le virus est inactivé par le complément (275) et il n'est pas spécifique d'un tissu en particulier d'où le risque d'infecter des cellules non visées par le traitement (276). Malgré tout, le rétrovirus est le plus utilisé jusqu'à présent dans les études cliniques de thérapie génique (274), surtout pour celles *ex vivo* où les cellules sont infectées en culture avant d'être réintroduites chez le patient ou pour infecter les cellules en division rapide comme dans le cas des tumeurs (277).

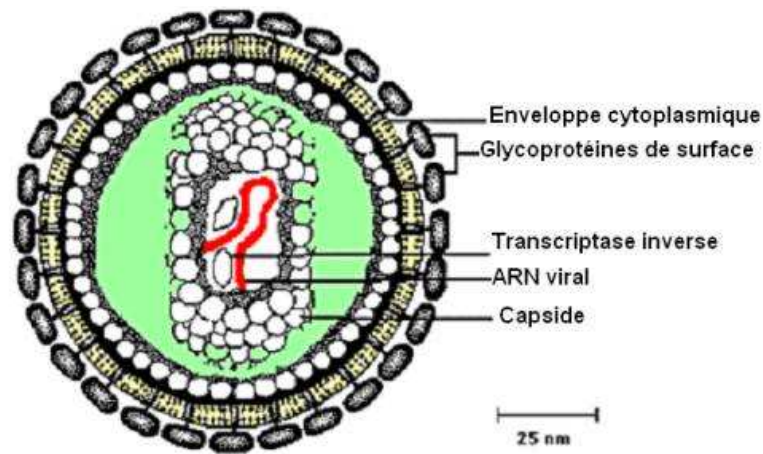


Figure 1-32: Structure d'un rétrovirus (www.chups.jussieu.fr).

d) Les lentivirus

Les lentivirus sont des virus à ARN monocaténaire dérivés des virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Fig. 1-33). Le génome des lentivirus, en plus de contenir les gènes de base des rétrovirus, contient deux gènes de régulation, *tat* et *rev* qui sont essentiels pour l'expression du génome ainsi que des gènes accessoires (274). Les avantages des lentivirus sont les suivants: l'intégration de l'ADN des lentivirus dans le génome de l'hôte ne nécessite pas de division cellulaire, ils utilisent plutôt le transport actif de la machinerie nucléaire de la cellule à travers les nucléopores; l'expression du transgène est longue et stable et sans conséquence pathologique détectable (274). L'inconvénient majeur de ce vecteur est qu'étant donné qu'il dérive du VIH, il peut être potentiellement très dangereux. Donc, avant de l'utiliser en thérapie génique, il faut s'assurer que le vecteur ne puisse pas se recombiner et ainsi se répliquer.

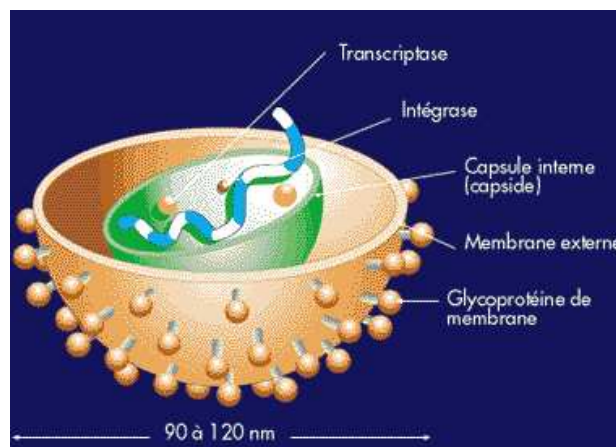


Figure 1-33: Structure d'un lentivirus (www.medisite.fr).

e) *Le virus Herpes-Simplex*

Le virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1) est le virus herpes le plus utilisé en thérapie génique (Fig. 1-34, 278). Il est composé d'un ADN linéaire bicaténaire de 152 kilobases contenant au moins 84 gènes dont la moitié n'est pas essentielle pour la réplication virale en culture cellulaire. Cela permet à ce vecteur de pouvoir emmagasiner une très grande quantité d'ADN étranger. De plus, il peut infecter les cellules quiescentes (277) et être produit à de très bons titres (279). Aussi, il peut produire un effet cytotoxique pour les cellules tumorales tout en étant incapable de se répliquer dans les tissus humains normaux (280). De plus, le HSV-1 a un pouvoir infectieux très efficace pour plusieurs types cellulaires différents et donc une bonne capacité de transduction ce qui permet l'administration répétée de ce vecteur même dans un hôte immunisé. Un très grand avantage du HSV-1 est sa persistance après l'infection primaire à un stade latent. Toutefois, la persistance de l'expression du transgène peut devenir nuisible dans certains tissus comme le cerveau (274). Un autre problème associé aux vecteurs HSV-1 est sa toxicité pour plusieurs types cellulaires. Toutefois, la construction de vecteurs contenant des délétions dans plusieurs des gènes précoces a pu diminuer cet effet nuisible (277).

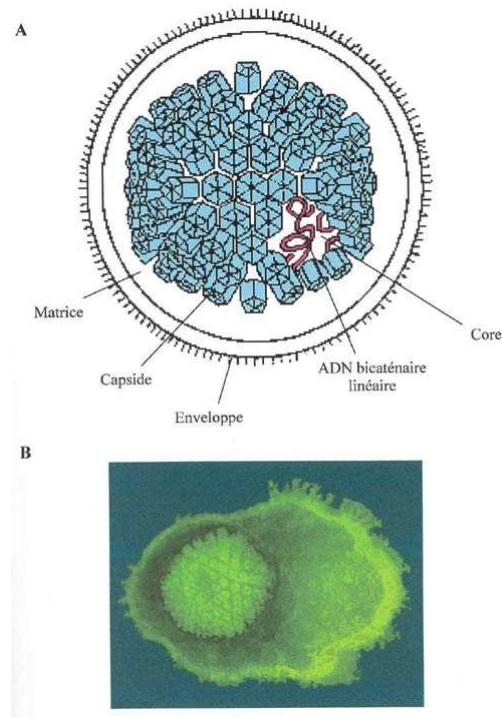


Figure 1-34: Structure des herpesvirus (d'après Collot-Teixeira S, 2003).

A- Schéma de la structure classique des herpesvirus.

B- Photo en microscopie électronique d'une particule de l'herpèsvirus simplex de type 1 (HSV1).

f) Les virus associés aux adénovirus (VAA)

Les VAA sont des parvovirus humains nécessitant un virus "helper" comme un adénovirus ou un HSV-1 pour permettre sa réplication (277). Il existe six différents sérotypes ayant des tropismes différents. Le VAA est un virus à ADN monocaténaire contenant deux gènes pouvant produire plusieurs polypeptides: rep pour la réplication virale et cap pour l'encapsidation. Ces deux gènes sont entourés de régions ITR (Inverted Terminal Repeat) de 145 nucléotides. Ce virus peut emmagasiner seulement cinq kilobases ce qui n'est pas énorme. Un avantage très important de ce virus est qu'on ne lui connaît aucune maladie associée ce qui fait de ce vecteur un choix de premier ordre quant à sa sécurité. De plus, puisque le génome du vecteur ne contient pas les séquences virales, ce vecteur n'est associé à aucune toxicité ni à aucune réponse inflammatoire. Toutefois, il y a production d'anticorps neutralisants ce qui limite l'administration répétée (274). Finalement, le VAA peut transduire efficacement les cellules qui ne se divisent pas (281).

g) Vecteurs Adénoviraux

Les adénovirus constituent une famille de virus qui regroupe une centaine de variétés, dont une quarantaine environ peut infecter l'Homme. C'est en 1953 que ceux-ci ont été mis en évidence par Wallace P. Rowe à partir de fragments d'amygdale (282). Les adénovirus sont des virus à ADN bicaténaire de 36 kilobases codant pour plus de 50 polypeptides (274). Leur ADN est entouré d'une capsidie icosaédrale composée de trois protéines majeures soit les hexons, les pentons et les fibres (Fig. 1-35). Puisque les adénovirus ont une large gamme d'hôtes et qu'ils livrent leur ADN au noyau se répliquant ainsi de façon très efficace, ce sont de bons candidats pour la thérapie génique.

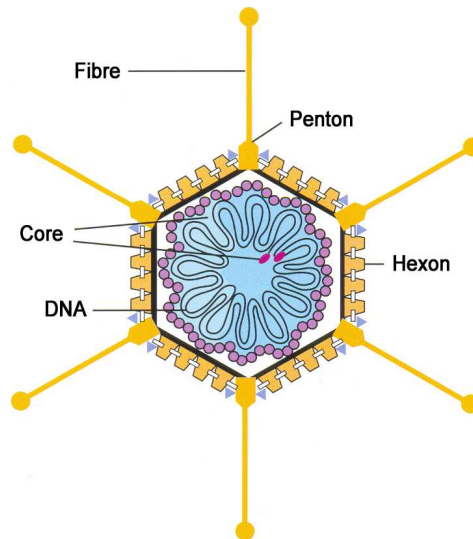


Figure 1-35: Structure d'un adénovirus (www.biomarker.cdc.go.kr).

Le cycle d'infection de l'adénovirus se divise en deux phases : une phase plus précoce qui concerne l'entrée du virus dans la cellule hôte, le passage du génome viral au noyau cellulaire suivi par la transcription des gènes précoces et une phase plus tardive (Fig. 1-36 A, 283). L'adsorption du virus à la cellule cible se fait par la liaison de la partie Knob des fibres aux récepteurs adénovirus/coxsackie (CAR). Par la suite, son internalisation se produit par endocytose médiée par les clathrines (284). Elle est déclenchée par la reconnaissance d'un motif RGD sur le penton (285) qui interagit avec les intégrines cellulaires $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$. Ces intégrines, ainsi que les récepteurs, CAR joueraient un rôle important dans le tropisme de l'adénovirus pour certains tissus (284). Une fois que le virus est à l'intérieur de la cellule, ses protéases virales altèrent la capsid permettant ainsi à son génome de pénétrer dans le noyau cellulaire par les pores nucléaires (274) où débute la transcription primaire des gènes précoces des régions E1 à E4 (Fig. 1-36 B, 280). Les protéines E1 sont divisées en deux groupes soit E1A et E1B. E1A module le métabolisme cellulaire pour rendre la cellule plus susceptible à la réplication virale (284) alors que E1B promeut l'oncogénèse (286) en empêchant l'apoptose entre autre par l'inactivation de la protéine p53 (284). Les protéines E2A et E2B fournissent la machinerie pour la réplication de l'ADN virale (287) et la transcription des gènes tardifs alors que les protéines E3 suppriment les mécanismes de défense de l'hôte (284). Pour ce qui est des produits géniques de E4, ils promeuvent la réplication de leur ADN, l'expression des gènes

tardifs et empêche la synthèse des protéines cellulaires (288). La transcription tardive du génome viral donnera, quant à elle, les protéines L1 à L5 impliquées dans la production des composés structuraux ainsi que dans l'encapsidation et la maturation des particules virales dans le noyau. Finalement, l'encapsidation est suivie par la perméabilisation du noyau et la désintégration de la membrane cellulaire permettant la libération des virions (284).

Les sérotypes 2 et 5 sont les deux plus utilisés pour la thérapie génique contre le cancer (276). Dans les vecteurs adénoviraux, la région E1 a été déléetée permettant d'emmagasiner environ huit kilobases d'ADN étranger et de prévenir la transcription des gènes viraux nécessaires à la réplication (276, Fig. 1-36 C, 283). Toutefois, même en absence de la région E1, le vecteur exprime un léger niveau d'antigènes viraux, stimulant ainsi la réponse immunitaire et la perte de l'expression du transgène (289). Pour remédier à cette situation, un vecteur adénoviral où tous les gènes viraux ont été enlevés à l'exception des régions ITR et des séquences d'encapsidation a été construit (274, Figure 1-36 D, 283).

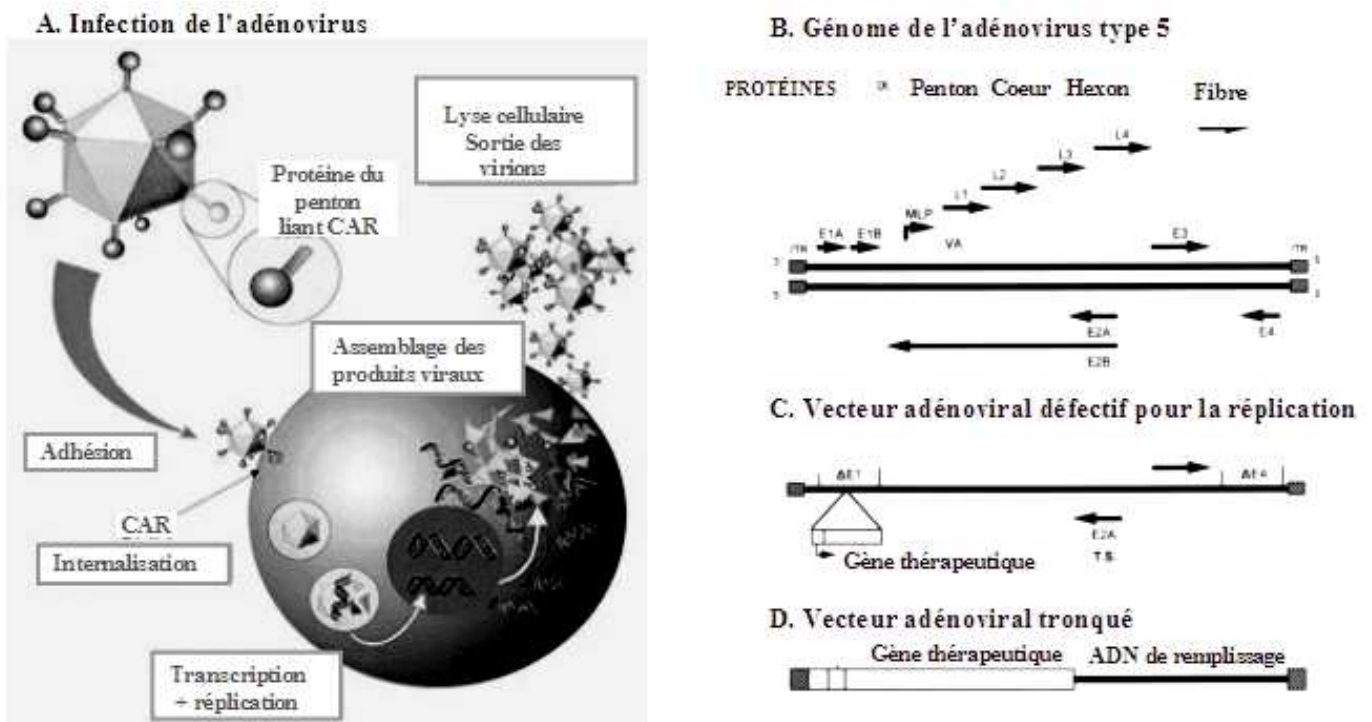


Figure 1-36: Cycle d'infection de l'adénovirus et vecteurs adénoviraux (d'après Fortier P, 2005).
 A. Cycle d'infection de l'adénovirus dans une cellule.
 B. Structure du génome de l'adénovirus de type 5 ainsi que les protéines produites.
 C. Types de mutations introduites dans le génome du vecteur adénoviral déficient pour la réplication. Δ : délétion.
 D. Vecteur adénoviral tronqué où on a enlevé toutes les protéines viraux excepté les régions ITR.

Il existe plusieurs avantages à utiliser les vecteurs adénoviraux. Tout d'abord, l'infection est relativement sécuritaire, causant à la limite une légère infection respiratoire (290). Ensuite, le transgène n'est pas intégré dans le génome prévenant ainsi l'activation d'oncogènes (275). Le vecteur peut être produit à de hauts titres (10¹³ particules de vecteur/mL) et il peut contenir une grande quantité d'ADN étranger (8kb) (274). Aussi, il infecte plusieurs types cellulaires différents ainsi que les cellules quiescentes ou en division (275). Par ailleurs, des études ont démontré la faisabilité et l'efficacité du transfert de gène à l'aide d'un vecteur adénoviral dans les îlots pancréatiques (285, 286). Cependant, cette efficacité dépend de la méthode d'infection utilisée (292, 293). En effet, une infection adénovirale *in vitro* ne permet d'infecter que les cellules périphériques de l'îlot (292, 293, Fig.1-37 A). Au contraire, des études menées au laboratoire ont montré qu'une infection *in vivo* d'îlots pancréatiques de Rat, permettait une infection globale de l'îlot (293, Fig. 1-37 B).

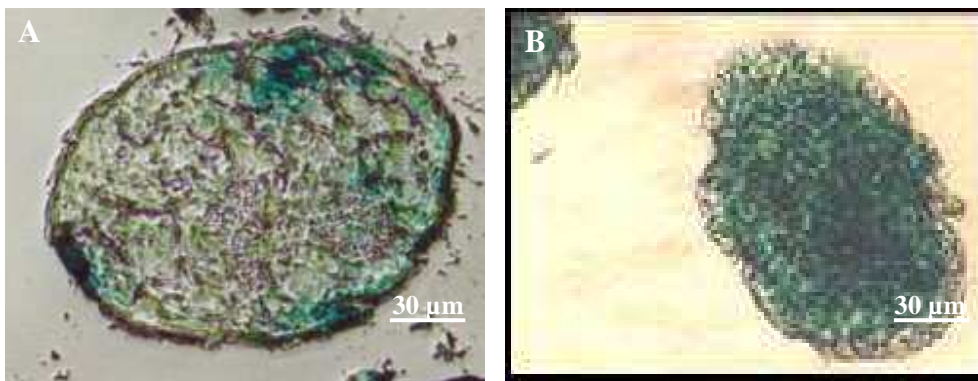


Figure 1-37: Infection adénovirale *in vitro* (A) et *in vivo* (B) du gène de la β -Galactosidase ($1,6 \cdot 10^8$ pfu) d'îlot pancréatique de Rat (d'après Sigrist *et al.*, 293).

Toutefois, certains inconvénients sont liés à ce type de vecteur. Tout d'abord, il peut être toxique puisqu'une grande quantité de vecteur est nécessaire à un bon transfert du transgène (294). Ensuite, son expression est transitoire (une à deux semaines) (293, 295) car le vecteur peut être perdu durant la division cellulaire. De plus les produits du gène étranger ou les protéines de la capsid induisent une réponse immunitaire de type cellulaire par l'activation des lymphocytes T cytotoxiques CD8+

(289). De même, les protéines de la capsid provquent une réponse immunitaire humorale empêchant ainsi la réinjection du vecteur (289). En général, ces inconvénients sont mineurs. Toutefois, l'utilisation d'un vecteur adénoviral s'est avérée fatale pour un patient traité contre la déficience de l'ornithine carbamylase. En effet, les protéines de la capsid du virus auraient entraîné une réponse immunitaire innée déclenchant la libération massive de cytokines. Par contre, bien que la mort soit liée directement à l'injection du vecteur, des facteurs de l'hôte seraient également responsables puisque les deux autres patients ayant reçu la même dose de vecteur n'ont pas subi ces conséquences désastreuses (296).

1.6.3.3. Thérapie génique et problème de bioéthique

Alors que la thérapie génique fonctionne bien dans le modèle animal (souris, chiens, ...), elle est le plus souvent inefficace chez l'homme en raison de la combinaison de plusieurs paramètres: l'inefficacité des vecteurs à transduire un pourcentage important de cellules, la difficulté de créer des vecteurs qui permettent de reproduire les cinétiques complexes d'expression des gènes, parfois l'utilisation de gènes thérapeutiques inadéquats en raison d'erreurs conceptuelles concernant les mécanismes de la maladie, l'état de santé de certains patients pour lesquels la thérapie génique ne pourrait de toute façon rien apporter, le ciblage de l'organe *etc...* Cette inefficacité rend plus aiguë les considérations éthiques, sociologiques, et sécuritaires. A cela vient s'ajouter les problèmes liés au risque de diffusion du virus vecteur dans la population, ainsi que celui d'une transmission germinale qui conduirait à transmettre à l'enfant du malade les nouveaux gènes lors de la fécondation. Bien que ces risques de toxicité pour le patient sont actuellement pratiquement inexistant, et que les effets secondaires, s'ils restent dramatiques au niveau humain, sont globalement très rares, il faut se demander s'il est éthiquement envisageable d'utiliser un vecteur viral pour transduire un gène chez un patient malade. Ainsi, dans le cadre de la transplantation d'îlots pancréatiques chez le patient diabétique, est-il concevable d'utiliser un adénovirus encodant le gène du VEGF pour stimuler la revascularisation des îlots afin d'améliorer la viabilité du greffon malgré le risque de toxicité existant pouvant faire encourir un risque vital au patient, comme décrit

dans la littérature? C'est pourquoi, les diverses instances impliquées dans le contrôle des essais en thérapie génique (l'AFSSAPS en France, Le RAC aux États-Unis) commencent à adopter des cadres réglementaires permettant une protection optimale du patient et de son entourage, et on peut considérer aujourd'hui que la thérapie génique n'est "pas plus risquée" que les autres approches thérapeutiques expérimentales (297).

1.7. But de l'étude

Malgré les progrès considérables réalisés depuis 2000 concernant la greffe d'îlots pancréatiques chez le patient diabétique de type 1, de nombreux obstacles restent à franchir pour obtenir un succès à long terme de cette approche thérapeutique. Ainsi, en dehors des réactions inflammatoires post transplantation (réactions IBMIR), des phénomènes de rejet et de la toxicité des traitements immunosuppresseurs utilisés actuellement, l'absence de revascularisation des îlots pancréatiques transplantés apparaît comme un problème majeur à la survie et au bon fonctionnement du greffon au cours de la transplantation.

Bien qu'un certain nombre de facteurs jouent un rôle important dans l'angiogenèse et que les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de revascularisation des îlots après transplantation soient encore mal connus, le VEGF semble y jouer un rôle clé. Ainsi, le but de ce projet de thèse était de valider une nouvelle approche de surexpression du VEGF par les îlots pancréatiques, soit par thérapie génique en utilisant un adénovirus encodant le gène du VEGF, soit par une approche pharmacologique en utilisant la déferoxamine (DFO), un puissant chélateur du fer afin d'optimiser la revascularisation des îlots pancréatique au cours de la transplantation. Ces deux approches ont été comparées d'un point de vue biologique, biochimique et métabolique *in vitro* sur une lignée de cellules β RINm5F et sur les îlots pancréatiques de Rat et *in vivo* sur la revascularisation et le contrôle métabolique des îlots pancréatiques chez le rat diabétique.

2. Matériels et méthodes

2.1. Etude *in vitro*

2.1.1. Principe

La surexpression du VEGF a été étudiée, d'une part sur une lignée de cellules β RINm5F (LGC Promochem Sarl, Molsheim, France) et d'autre part sur des îlots pancréatiques de Rat.

Afin d'évaluer l'approche pharmacologique sur la surexpression du VEGF, les cellules β RINm5F et les îlots pancréatiques ont été mis en culture dans des milieux supplémentés avec des concentrations croissantes en DFO (Déferoxamine mésylate, Sigma, L'Isle d'Abeau, France, paragraphe 2.1.2.1).

En ce qui concerne la surexpression du VEGF par thérapie génique, les cellules β RINm5F et les îlots pancréatiques ont été infecté à l'aide d'un adénovirus de deuxième génération encodant le gène de la β -Galactosidase ou du VEGF 165 humain (paragraphe 2.1.5.1) (Cell Biolabs, San Diego, USA) selon une méthode d'infection *in vitro* pour les cellules β (paragraphe 2.1.5.2) et *in vivo* pour les îlots (paragraphe 2.1.5.3).

Enfin, les différentes mesures ont été réalisées 1 et 3 jours après traitement.

2.1.2. Préparation des traitements

2.1.2.1. Préparation de la DFO

La DFO (C₂₅H₄₈N₆O₈.CH₄O₃S), de poids moléculaire 656,79 Da, se présente sous forme lyophilisée avec une pureté d'environ 95% et est soluble dans l'eau. Une solution mère de 100 mmol/L de DFO est préalablement préparée par solubilisation de la poudre avec de l'eau déionisée. Puis 3 concentrations de DFO (10, 100 et 1000 μ mol/L) ont été préparées par dilution de la solution mère dans du milieu de culture (RPMI 1640 pour les cellules RINm5F (paragraphe 2.1.3.1) et M199 pour les îlots pancréatiques (paragraphe 2.1.4.4)).

2.1.2.2. Préparation de l'adénovirus

Les différentes concentrations en adénovirus (Ad VEGF et Ad β -Galactosidase) ont été préparées à partir de solution mère de concentration 10^{11} Vp/mL (Viral particule/ml) de TBS contenant 10% de glycérol. Des concentrations de 100 MOI (Multiplicity Of Infection) et 200 MOI en adénovirus ont été préparées par dilution de la solution mère avec du PBS. La MOI correspond au nombre de particules virales incubées par cellule.

2.1.3. Lignée cellulaire et culture

2.1.3.1. Lignée cellulaire RINm5F

La lignée RINm5F (Fig.2-1) est une lignée cellulaire issue d'insulinôme de Rat (LGC PromoChem, Molsheim, France). Il s'agit d'un clone dérivé de la lignée RINm5F issue d'îlots pancréatiques de Rat, qui a la particularité d'adhérer sur un support traité; et de former des amas cellulaires appelés pseudo-îlots sur un support non traité. Les cellules RINm5F sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Sigma) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, Lonza, Verviers, Belgique) et de 1% d'un mélange de 2 antibiotiques (10 000 UI/mL de pénicilline, 10 mg/mL de streptomycine) et d'un antimycotique (25 μ g/mL Amphotéricine B (AB/AM, Sigma)). Les cellules RINm5F sont décollées à l'aide de trypsine (Sigma) puisensemencées tous les 3 jours à raison de 5 millions de cellules par boîte traitées de 75 cm² (Dutscher, Brumath, France).

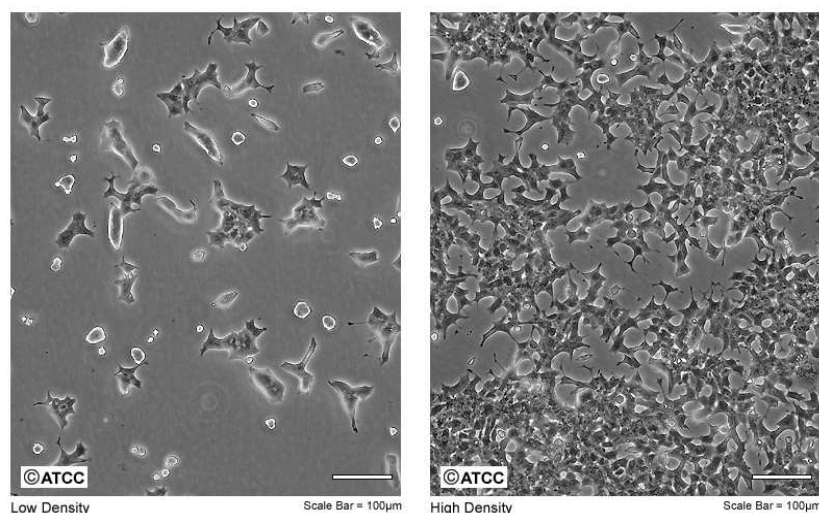


Figure 2-1 : Lignée cellulaire RINm5F

2.1.3.2. Culture pour le test de viabilité et l'étude de la sécrétion de VEGF

Les cellules sont mises en culture dans des plaques 96 puits traitées (Becton Dickinson, Le Pont De Claix, France), à raison de 30.000 cellules par puits pour un volume final de milieu de culture de 200 µL. Les cellules sont mises en culture pendant 24h, à 37°C dans une atmosphère humide comprenant 5% de CO₂, afin d'obtenir une confluence de 80%.

2.1.3.3. Culture pour le marquage au Hoechst

Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits traitées (Becton Dickinson), à raison de 250.000 cellules par puits pour un volume final de milieu de culture de 500 µL et sont placées dans les mêmes conditions de culture que celles décrites dans le paragraphe 2.1.3.2.

2.1.3.4. Culture pour l'extraction d'ARN

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes traitées 60x15mm (Becton Dickinson) à raison de 100.0000 de cellules par boîte pour un volume final de milieu de culture de 5 mL et sont placées dans les mêmes conditions de culture que celles décrites dans le paragraphe 2.1.3.2.

2.1.3.5. Culture pour l'extraction de protéines

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes traitées 100x15 mm (Becton Dickinson) à raison de 500.0000 de cellules par boîte pour un volume final de milieu de culture de 10 mL et sont placées dans les mêmes conditions de culture que celles décrites dans le paragraphe 2.1.3.2.

2.1.4. Culture primaire d'îlots pancréatiques

2.1.4.1. Prélèvement du pancréas

L'isolement d'îlots pancréatiques est réalisé sur des pancréas de rats de poids corporel variant entre 250 g et 300 g. Les rats Wistar (Elevage Depré, Saint Doulchard, France) sont utilisés pour les études *in vitro* et les rats Lewis (Harlan, Gannat, France) pour les études *in vivo*. Avant le prélèvement, les rats sont anesthésiés avec de l'imalgène® (Ketamine, Merial, Lyon, France) complété avec 2,7 mL de Rompun® (Xylazine 2%, Bayer, Puteaux, France) par voie

intrapéritonéale à raison de 100 μ L/100g de poids corporel.

Une laparotomie est alors réalisée sur les rats. Après avoir dégagé le pancréas, le canal cholédoque est ligaturé à l'embouchure duodénale et cathétérisé à l'embouchure hépatique. 10 mL de collagénase (Clostridiopeptidase de type IV, Sigma) sont alors injectés dans le pancréas et l'animal est sacrifié par exanguination pour le prélèvement de l'organe (Fig. 2-2).

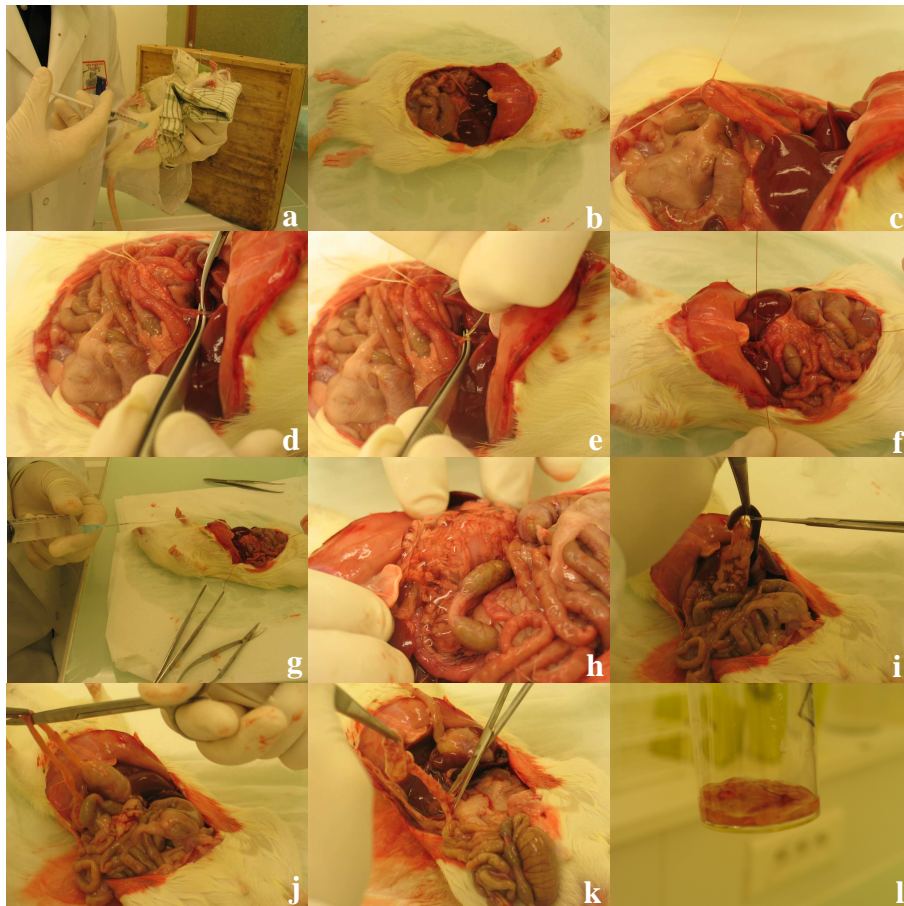


Figure 2-2: Prélèvement d'un pancréas de Rat.

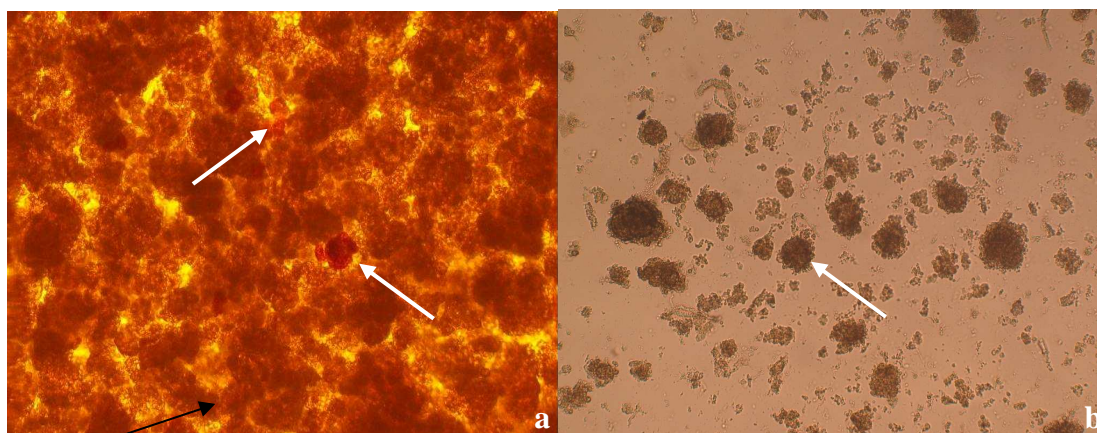
a- Anesthésie du rat, b- Laparotomie, c- Ligature du canal cholédoque à l'embouchure duodénale, d- Incision du canal cholédoque, e- Insertion du cathéter dans le canal cholédoque, f- Fixation du cathéter dans le canal cholédoque à l'embouchure hépatique, g- Injection de la collagénase, h- Pancréas dilaté,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

2.1.4.2. Digestion enzymatique

Les pancréas sont mis à digérer sous agitation à 37°C au bain marie pendant 10 minutes environ jusqu'à obtention d'un aspect en « grain de sable ». La digestion est stoppée avec 40 mL de solution saline d'HBSS à 4°C, additionné de 10% de SVF décomplémenté + 1% AB/AM.

2.1.4.3. Purification

Le digestat obtenu est filtré dans un tamis (porosité de 500 µm, Sigma), rincé avec de l'HBSS + 10% SVF + 1% AB/AM puis récupéré dans des tubes de 50 mL (Falcon[®], Becton Dickinson) à raison d'un pancréas par tube. Le filtrat est centrifugé 10 minutes à 400xg et à 4°C. Les culots sont récupérés dans de l'HBSS + 1% AB/AM et centrifugés de nouveau 10 minutes à 400xg et à 4°C. Les surnageants sont alors éliminés et les culots sont transférés dans des tubes de 15 mL (Falcon[®], Becton Dickinson) où ils subiront un dernier lavage avec de l'HBSS + 1% AB/AM. Après élimination des surnageants, les îlots sont séparés du tissu exocrine à l'aide d'un gradient discontinu de ficoll (Ficoll[®] PM 400, Sigma), préparé au laboratoire et constitué de 4 densités (1,110; 1,096 ; 1,069 et 1,032). Ce gradient est centrifugé 20 minutes à 700xg sans accélération ni frein. Le gradient est alors constitué de 4 phases : la majorité des îlots est concentrée dans les phases 1 et 2, la 3^{ème} phase a une pureté en îlots estimée à 20%, la 4^{ème} phase et le culot contiennent essentiellement du tissu exocrine. Enfin, les phases 1 et 2 sont rincées 2 à 3 fois avec de l'HBSS + 1% d'AB/AM par centrifugation de 5 minutes à 400xg afin d'éliminer le ficoll qui est toxique pour les cellules (Fig. 2-3).



Tissu exocrine
non insulaire

Figure 2-3: Ilots pancréatiques humains avant (a) et après (b) purification.
Flèches blanches: îlots pancréatiques.

2.1.4.4. Culture d'îlots de Rat

Les îlots contrôles et infectés sont cultivés dans du milieu M199 (Lonza) + 10% SVF + 1% AB/AM. En ce qui concerne les îlots traités à la DFO, les milieux sont supplémentés avec 10, 100 ou 1000 $\mu\text{mol/L}$ de DFO + 10% SVF + 1% AB/AM.

a) Culture pour le test de viabilité, de fonctionnalité et pour l'étude de la sécrétion de VEGF

Les îlots sont isolés et purifiés un à un sous loupe binoculaire à l'aide d'une micropipette (hand-picking) et mis en culture dans des plaques 48 puits non traitées (CELLSTAR[®], Greiner Bio-one, Kremsmünster, Autriche), à raison de 20 îlots par puits pour un volume final de 500 μL de milieu de culture. Les îlots sont ensuite cultivés à 37°C dans une atmosphère humide comprenant 5% de CO₂.

b) Culture pour l'inclusion des îlots, l'extraction d'ARN et de protéines

Les îlots sont prélevés par hand-picking et mis en culture dans des boîtes de Pétri 60x15 mm non traitées (Greiner Bio-one), à raison de 200 îlots par puits pour un volume final de 5 mL de milieu de culture. L'utilisation de moins de 200 îlots ne permet pas d'obtenir des quantités en ARN et en protéine suffisantes pour la réalisation des RT-PCR et des westerns blotting.

2.1.5. Infection adénovirale

2.1.5.1. Adénovirus

Deux adénovirus différents (Ad VEGF et Ad β -Galactosidase) ont été utilisés pour l'étude de la surexpression du VEGF:

- un vecteur adénovirale recombinant exprimant le gène rapporteur codant pour la β -Galactosidase afin de déterminer l'efficacité de l'infection sur les cellules β .
- un adénovirus recombinant exprimant le gène codant le VEGF165 pour stimuler l'expression du VEGF au sein des cellules β et des îlots pancréatiques.

Ces 2 vecteurs sont des adénovirus humains de type 5 avec délétion de la majorité de la région E3 et défectifs pour leur réplication par la délétion des régions E1a E1b (Fig. 2-4).

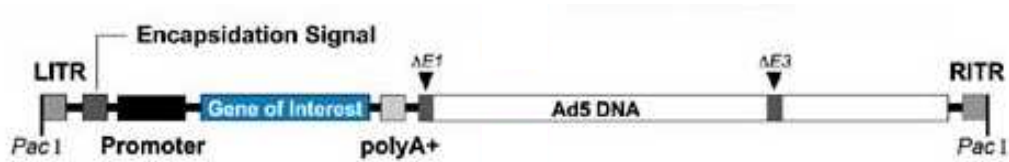


Figure 2-4: Schéma du vecteur adénoviral utilisé (www.cellbiolabs.com).

2.1.5.2. Infection adénovirale *in vitro*

La méthode d'infection adénovirale a été réalisée sur les cellules β RINm5F.

Après 24 heures de culture (confluence de 80%), les cellules sont rincées avec du PBS (Lonza) puis incubées pendant 3 heures, à 37°C en atmosphère humide avec 5% CO₂, dans un volume minimal (50 μ L pour les plaques 96 puits et 2 mL pour les boîtes 60x15 mm) de solution adénovirale aux concentrations de 3.10⁶ Vp/mL (100 MOI) ou 6.10⁶ Vp/mL (200 MOI). Après 3 heures d'incubation, on complète ces volumes minimaux à 200 μ L pour les plaques 96 puits ou à 5 mL pour les boîtes 60x15 mm avec du milieu RPMI 1640 + 10% SVF + 1% AB/AM. Les cellules sont enfin mises en culture à 37°C en atmosphère humide avec 5% CO₂.

2.1.5.3. Infection adénovirale *in vivo*

L'infection adénovirale *in vivo* a été réalisée sur les îlots pancréatiques de Rat. Cette technique d'infection *in vivo* a été mise au point au laboratoire en vue d'obtenir une infection efficace dans tout l'îlot pancréatique.

Les rats sont préalablement anesthésiés puis incisés par une simple laparotomie afin de dégager le pancréas. Le canal cholédoque est ligaturé à l'embouchure duodénale puis cathétérisé à l'embouchure hépatique. 10 ml d'HBSS sont alors injectées par voie intraductale pour dilater le pancréas et mettre en évidence les vaisseaux sanguins environnant le pancréas. Ces derniers sont ligaturés au niveau de la rate, de l'estomac, du duodénum, du mésentère, des reins et de l'aorte pour que la solution adénovirale injectée reste localisée dans le pancréas. La veine porte hépatique est ensuite clampée puis 2 mL de la solution adénovirale à la concentration souhaitée sont administrés à l'aide d'une seringue par voie intraportale en direction du pancréas (Fig. 2-5) Après injection de collagénase, le pancréas est prélevé et maintenu à 4°C pendant 30 minutes. L'isolement est ensuite

réalisé selon le protocole décrit dans la section 2.1.4. Ces derniers sont enfin mis en culture dans du milieu M199 + 10% SVF + 1% AB/AM.

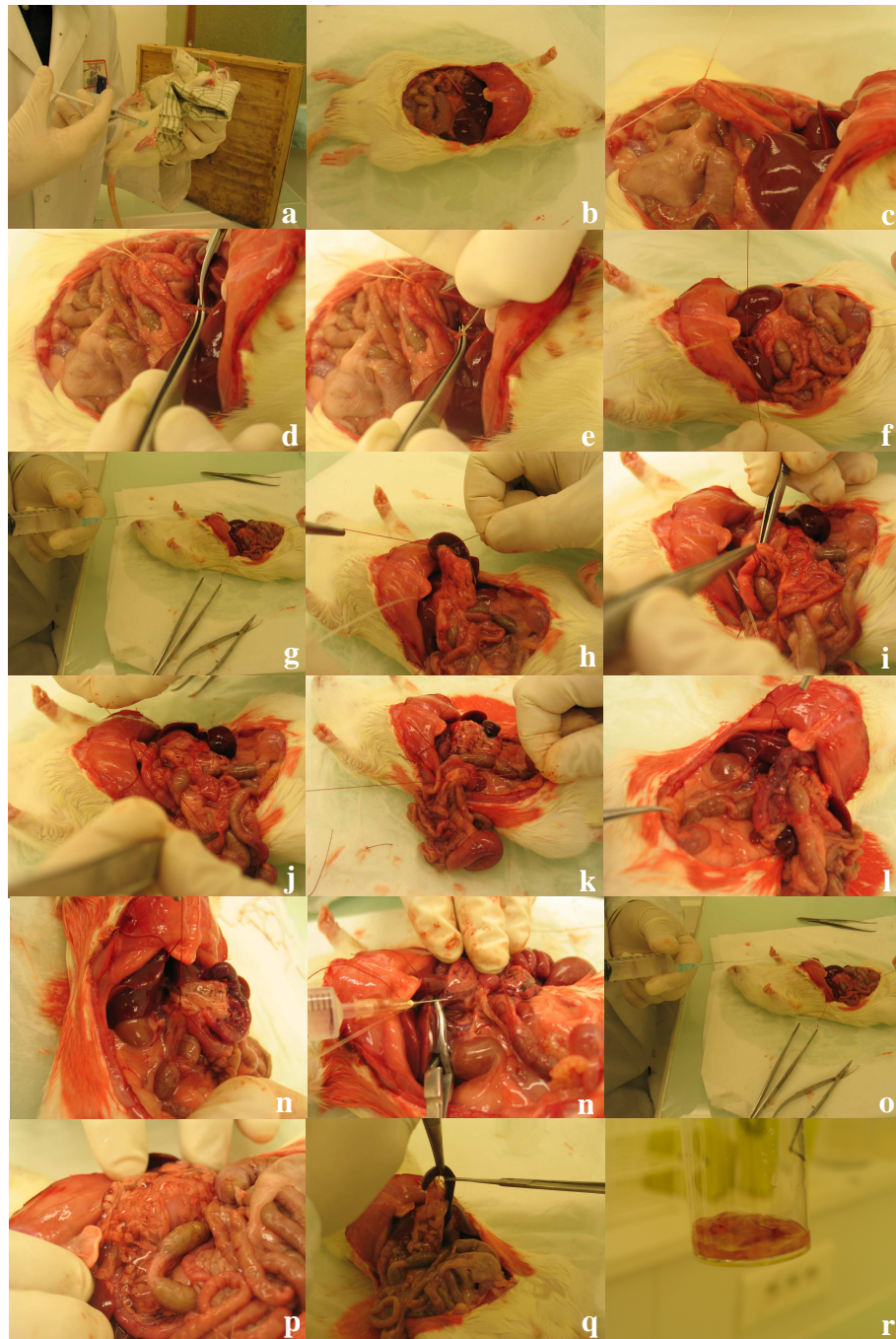


Figure 2-5: Infection adénovirale in vivo d'un pancréas de Rat.

a- Anesthésie du rat, b- Laparotomie, c- Ligature du canal cholédoque à l'embouchure duodénale, d- Incision du canal cholédoque, e- Insertion du cathéter dans le canal cholédoque, f- Fixation du cathéter dans le canal cholédoque à l'embouchure hépatique, g- Injection de l'HBSS, Ligature des vaisseaux : de la rate (h), de l'estomac (i), du duodénum (j), du mésentère (k), des reins (l), de l'aorte (m). n- Clampage de la veine porte et injection de la solution adénovirale, o- injection de la collagénase, p- pancréas dilaté, q- et r- prélèvement du pancréas.

2.1.6. Evaluation de l'efficacité de l'infection des cellules β RINm5F

Le gène de la β -Galactosidase a été utilisé dans cette étude en tant que gène rapporteur pour déterminer l'efficacité de l'infection. La détection de l'activité de la β -Galactosidase a été réalisée à l'aide d'un kit de révélation (β -Galactosidase Reporter Gene Staining Kit, Sigma). Le substrat utilisé pour le marquage est le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), qui génère une coloration indigo dans les cellules exprimant la β -Galactosidase. Ce test permet alors de déterminer le pourcentage de cellules infectées avec le gène de la β -Galactosidase par observation au microscope.

Le X-Gal est dilué dans une solution de PBS contenant du $MgCl_2$, ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) et du ferrocyanure de potassium ($K_4Fe(CN)_6$). Ainsi, le X-Gal pénètre la cellule et est hydrolysé par la β -Galactosidase induisant une coloration indigo dans la cellule infectée.

2.1.7. Mesure de la viabilité des cellules β RINm5F

La viabilité des cellules β RINm5F a été déterminée par la technique du CellTiter 96[®] (Promega, Madison, USA). Il s'agit d'une technique colorimétrique déterminant le nombre de cellules vivantes adhérentes dans les puits de culture. Le CellTiter 96[®] contient un dérivé de tétrazolium, réductible par les cellules en formazan, de couleur brune absorbant à 490 nm. Après rinçage des puits avec du milieu, un mélange de 100 μ L de milieu + 20 μ L de CellTiter 96[®] est ajouté sur les cellules. Les cellules sont alors incubées pendant 2h à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO_2 et la densité optique est ensuite lue au spectrophotomètre à 490 nm. Le pourcentage de cellules viables, en fonction des traitements, est déterminé par le ratio entre la densité optique des cellules traitées et la densité optique des cellules contrôles.

2.1.8. Marquage des cellules β RINm5F au Hoechst

Afin de détecter la fragmentation de l'ADN des cellules RINm5F au cours de l'apoptose, un marquage au Hoechst 33258 (Sigma) a été réalisé.

Le Hoechst fait partie des intercallants de l'ADN fluorescents (Hoechst 33258 et Hoechst 33342). Il

est excité par la lumière UV à une longueur d'onde de 350 nm et émet une fluorescence bleu/cyan à une longueur d'onde de 461 nm. Pour chaque condition expérimentale, les cellules décollées sont récupérées, de même que les cellules adhérentes après décollement à l'aide de la trypsine (Sigma). A l'aide du cytopsin (Shandon Cytospin 2, International medical equipment, Canada), les cellules sont fixées sur lames puis marquées par un bain de 5 minutes avec du Hoechst 33258 diluée au 1/1000. Les lames sont ensuite observées au microscope à fluorescence (Axioskop 20, Zeiss, Allemagne).

2.1.9. Mesure de la viabilité et de la fonctionnalité des îlots pancréatiques

2.1.9.1. *Viabilité*

La viabilité est estimée par microscopie à fluorescence à l'aide de 2 marqueurs : le diacétate de fluorescéine (FDA, Sigma) et l'iodure de propidium (PI, Sigma) utilisés aux concentrations respectives de 0,67 $\mu\text{mol/L}$ et de 4 $\mu\text{mol/L}$. Le diacétate de fluorescéine, ester non polaire, diffuse à travers les membranes des cellules vivantes et est immédiatement métabolisé en fluorescéine par les estérases cellulaires. La fluorescéine formée, polaire, ne peut plus sortir des cellules vivantes et s'y accumule donnant une fluorescence verte caractéristique. L'iodure de propidium traverse les membranes des cellules mortes et se lie aux acides nucléiques produisant une fluorescence rouge. Ainsi, la viabilité est déterminée de façon empirique en estimant visuellement le pourcentage de cellules viables au pourtour de l'îlot par rapport à l'ensemble des cellules visibles de ce même îlot. Cette estimation, subjective, ne donne aucun renseignement sur la viabilité des cellules au centre de l'îlot. L'estimation est reproduite sur une dizaine d'îlots pour chaque condition.

2.1.9.2. *Fonctionnalité*

La sécrétion d'insuline permet d'évaluer la fonctionnalité des îlots en culture. Elle est évaluée par un test de stimulation au glucose et par la mesure de la sécrétion d'insuline qui en découle.

a) *Test de stimulation au glucose*

Pour chaque condition expérimentale, un test de stimulation au glucose a été réalisé 1 et 3

jours après traitement.

Dix îlots pancréatiques sont prélevés et incubés dans 4 mL d'une solution de Kreb's Ringer à 2,5 mmol/L de glucose, dite solution basale, pendant 1 heure à 37°C. Ensuite, les cellules sont de nouveau placées dans 4 mL de cette solution basale pendant 1 heure 30 minutes à 37°C. Le surnageant est alors récolté dans le but de doser l'insuline sécrétée à l'état basal. Les îlots sont ensuite placés dans une solution de Kreb's Ringer à 25 mmol/L de glucose, dite solution stimulée. Après 1 heure 30 minutes d'incubation à 37°C, les surnageants sont prélevés afin de doser l'insuline sécrétée à l'état stimulé.

b) Dosage de l'insuline

Le but du dosage de l'insuline est de comparer la quantité d'insuline produite par les îlots stimulés avec 25 mmol/L de glucose par rapport à la quantité d'insuline produite par les îlots stimulés avec 2,5 mmol/L de glucose en fonction des différents traitements.

Le dosage de l'insuline se fait à l'aide d'un test immunoenzymatique: Mercodia Rat insulin Elisa (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Mercodia, Uppsala, Suède). Le dosage immunologique enzymatique repose sur une technique de type « sandwich direct », dans laquelle 2 anticorps monoclonaux sont dirigés contre 2 déterminants antigéniques distincts de l'insuline. Pendant l'incubation, les molécules d'insuline de l'échantillon se lient, d'une part, aux anticorps anti-insuline fixés sur la plaque et réagissent, d'autre part, avec les anticorps anti-insuline présents dans la solution de « peroxydase conjugué ». Un rinçage simple élimine les anticorps marqués non liés. Le conjugué est détecté par réaction avec la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). Pour arrêter la réaction, on ajoute de l'acide chlorhydrique 0,5 mol/L. Cette solution fournit un point d'évaluation colorimétrique, qui sera lu par spectrophotométrie à 450 nm. La sécrétion des îlots est alors exprimée par l'index de stimulation qui représente le rapport entre la quantité d'insuline sécrétée par les îlots mis en présence de 25 mmol/L de glucose et la quantité d'insuline sécrétée par les îlots mis en présence de 2,5 mmol/L de glucose. La fonctionnalité des îlots est exprimée en index de stimulation.

2.1.10. Etude de l'expression des gènes

L'étude de l'expression des gènes de l'insuline, du VEGF, du HIF, du gène pro-apoptotique Bax et du gène anti-apoptotique Bcl-2 a été réalisée afin de déterminer d'évaluer l'effet positif ou délétère de l'infection adénovirale ou du traitement à la DFO.

a) Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux de 200 îlots ont été isolés par le kit d'extraction TRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Il s'agit d'une extraction phénol/chloroforme. Les îlots sont lysés pendant 15 minutes dans 500 µL de TRIZOL et les ARN totaux sont récupérés, séchés à l'air pendant 10 minutes puis dissout dans 20 µL d'eau DEPC (diethylpyrocarbonate, Sigma). Ils sont ensuite incubés à 65°C pendant 10 minutes. L'absorbance des échantillons à des longueurs d'onde de 260 et 280 nm est mesurée afin de déterminer respectivement la quantité d'ARN et de protéines présentes. Enfin le rapport DO_{260}/DO_{280} permet d'évaluer la qualité de ces ARN.

b) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

L'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé par M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Brièvement, 4 µg d'ARN totaux ont été transcrits en utilisant un random hexamer primer dans un mélange réactif de 20 µL. La PCR a été réalisée à partir d'1,5 µg d'ADNc. La séquence réactionnelle est de 1 minute à 95°C, 1 minute à 60°C puis 1 minute à 72°C. Les jeux de primers (Sigma) et la taille des fragments amplifiés sont indiqués dans la figure 2-6. Le produit de l'amplification a été séparé sur gel d'agarose 1000 (Invitrogen) à 1,5% afin de contrôler que le produit de l'amplification par PCR correspond bien à la cible. Les gels ont été marqués au moyen de bromure d'éthidium et révélés aux UV (Gel Doc 2000, BIO-RAD) (Fig. 2-7 ; Fig. 2-8). Les bandes sont quantifiées au moyen du logiciel ImageJ, et les valeurs rapportés à la quantité d'ARNm de β -Actine exprimé.

	Nom	Amorce	Taille attendue du fragment	MgCl2 (mmole/L)
beta-actine*	5'-3'	aacatggcattgtcatgga	570 pb	3
	3'-5'	tacatggcgggtaccaacaga		
beta-actine**	5'-3'	gctacagcttcaccaccaca	94 pb	3
	3'-5'	gccatctcttgctcgaagtc		
insuline	5'-3'	ctacaatcatagaccatag	241 pb	2
	3'-5'	cgttcacgggtgtgacct		
VEGF (298)	5'-3'	caatgatgaagccctggagt	211 pb	2,5
	3'-5'	tttctgcgctttcgTTTT		
HIF	5'-3'	tcaagtcagcaacgtggaag	198 pb	2
	3'-5'	tatcgaggctgtgctgactg		
Bax	5'-3'	tgcagaggatgattgctgac	173 pb	2
	3'-5'	gatcagctcgggcactttag		
Bcl-2	5'-3'	atacctgggccacaagtgag	207 pb	2
	3'-5'	tgatttgaccatttgctgta		

Figure 2-6: Séquences de primers et conditions de RT-PCR pour les différentes amorces utilisées.

* Amorces de β -actine utilisé pour l'étude de l'expression des gènes sur les cellules RINm5F.

** Amorces de β -actine utilisé pour l'étude de l'expression des gènes sur les îlots pancréatiques.

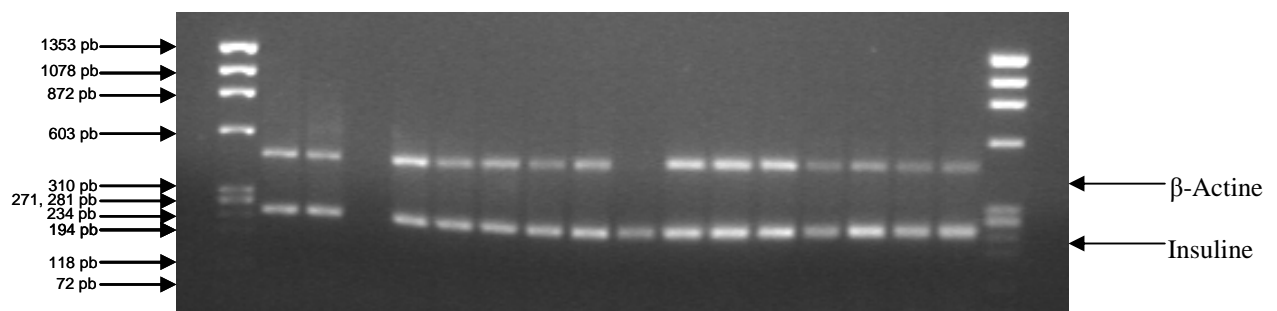


Figure 2-7: Gel de PCR de l'insuline à partir d'ARN totaux de cellules RINm5F.

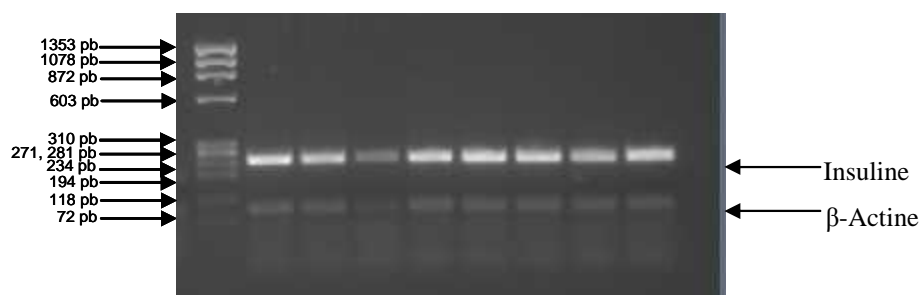


Figure 2-8: Gel de PCR de l'insuline à partir d'ARN d'îlots pancréatiques de Rat.

2.1.11. Etude de l'expression de la protéine HIF-1

2.1.11.1. Extraction des protéines cellulaires

Pour préparer le lysat cellulaire, les cellules RINm5F ont été solubilisés dans 1 mL d'un tampon de lyse constitué de dithiothreitol (20 mmol/L), de SDS 6% (Euromedex, Souffelweyersheim, France),

de tampon Tris-HCl (0,25 mol/L, Eurobio, Paris, France), pH=6,8, de 10% glycérol et de bleu de bromophénol (Sigma) et soniquées à l'aide d'une sonde à sonication (PolyTron[®] PT-MR 2100, Kinematica AG, Luzern, Suisse) à raison de 3 à 4 impulsions de 5 à 10 secondes chacun.

2.1.11.2. Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées selon le protocole établi par Henkel et Bieger (299). Une gamme étalon de BSA a été préalablement préparée à partir de la dilution avec de l'eau distillée d'une solution mère de 1,4 mg/mL (BIO-RAD). 5 μ L de chaque standard et de chaque échantillon de protéines ont été placés sur une membrane de nitrocellulose puis séchés sous vide pendant 1 minute. La membrane de nitrocellulose a ensuite été colorée au Rouge Ponceau S (Sigma) pendant 5 minutes. L'intensité des points a été finalement révélée par le logiciel ImageJ et la concentration des protéines de chaque échantillon a été déterminée par comparaison avec la gamme de BSA. La concentration des échantillons est exprimée en mg/mL (Fig. 2-9).

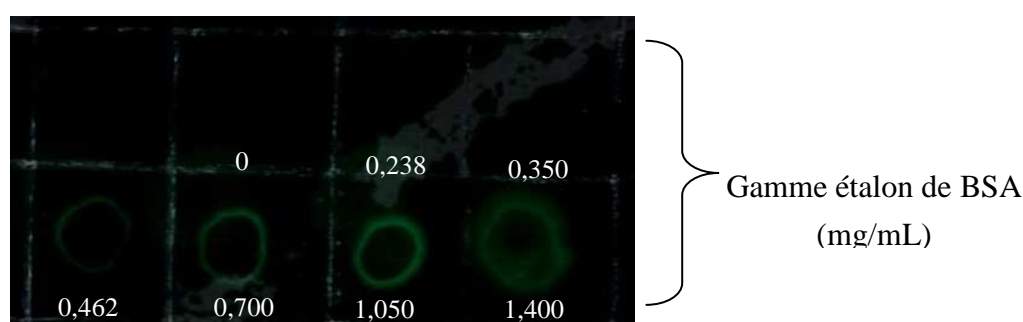


Figure 2-9: Dosage d'une gamme de BSA selon la méthode de Henkel *et al.*, révélé par le logiciel Image J.

2.1.11.3. Western blotting

a) Migration

L'électrophorèse a été réalisée sur un gel SDS-PAGE (BIO-RAD) à 4-12 % en acrylamide. Les lysats cellulaires, après avoir été chauffés à 70°C, ont été déposés à raison de 25 μ g de protéines par puits. La migration se fait à 200 V pendant 1 heure dans du tampon de migration XT-MES (Bio-Rad). Des marqueurs de poids moléculaires ont été utilisés comme standard (Precision Plus Protein all blue standards; MagicMark XP protein standard; Invitrogen).

b) Electrotransfert

Le gel a été mis en contact avec une membrane de nitrocellulose (BIO-RAD). Le transfert s'est déroulé pendant 30 minutes à 100 V dans du tampon de transfert contenant 20% de méthanol (BIO-RAD).

c) Immunomarquage

Après coloration au Rouge Ponceau S permettant de contrôler le transfert, la membrane a été incubée 30 minutes à température ambiante dans une solution de blocage (Invitrogen). L'anticorps primaire a été placé au contact de la membrane pendant une heure à température ambiante. Les anticorps primaires utilisés sont:

- un anticorps monoclonal anti β -Actine dilué au 1/5000 (Santa Cruz Biotechnology, Californie, USA)
- un anticorps monoclonal anti HIF-1 α dilué au 1/1000 (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Après trois lavages, l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (Anti souris 1:100000 (Sigma) a été incubé 30 minutes à température ambiante. Enfin, après trois nouveaux lavages, la révélation s'est effectuée par autoradiographie à l'aide d'un kit de détection en chimioluminescence (Invitrogen) et de film photographique (Kodak, Fig.: 2-10).

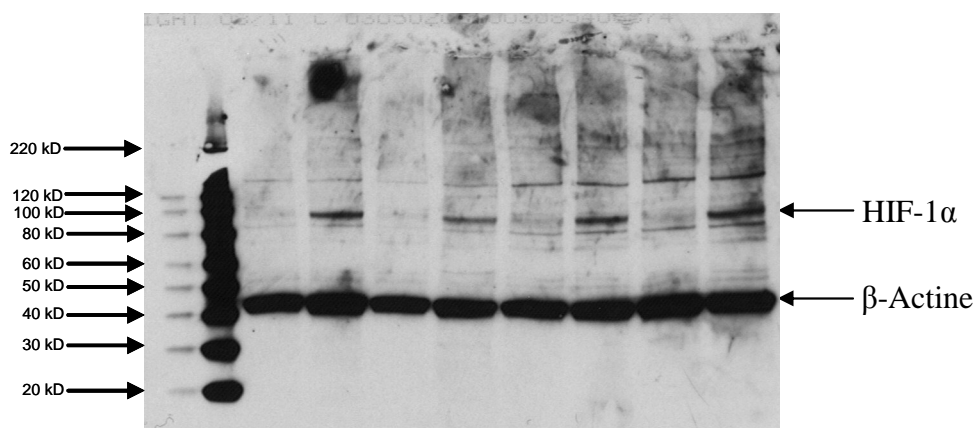


Figure 2-10: Western blot sur le lysat d'îlots pancréatiques de Rat et immunomarquage de la β -Actine et du HIF-1.

2.1.12. Etude de la sécrétion de VEGF

Après 1 et 3 jours de culture des cellules β RINm5F et des îlots infectés ou mis en présence de DFO, les surnageants sont récoltés et analysés par Test ELISA (Raybiotech, Norcross, USA). Les cellules β RINm5F et les îlots sont lysés et la quantité de protéines mesurée par Bradford.

2.1.12.1. Dosage du VEGF par Test ELISA

Le dosage immunologique enzymatique repose sur une technique de type "sandwich direct". Des anticorps anti-VEGF de rat sont fixés sur la plaque 96 puits. Lorsque les échantillons sont incubés sur la plaque, le VEGF présent va se lier au premier anticorps. Après rinçage, le second anticorps biotinylé anti-VEGF est ajouté. Un rinçage simple élimine les anticorps marqués non liés. Le conjugué (streptavidine couplée à HRP (Horse Radish Peroxydase)) est détecté par réaction avec le TMB. La réaction est enfin stoppée à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 0,5 mol/L. Une coloration proportionnelle à la quantité de VEGF est lue au spectrophotomètre à 450 nm. Les résultats sont exprimés par le ratio entre la quantité de VEGF et la quantité de protéines totales dans l'échantillon.

2.1.12.2. Extraction des protéines

L'extraction des protéines totales est réalisée à 4°C à l'aide de 1 mL pour 10^6 cellules RINm5F et de 150 μ L pour 20 îlots pancréatiques, d'un tampon de lyse constitué de Tris pH=8 (20 mmol/L, Euromedex), de NaCl (137 mmol/L, Sigma), d'IgPAL 1% (Sigma), de Phénylmethanesulfonyl fluoride (31 mmol/L, Sigma) et de glycérol 10% (Sigma). 30 minutes avant l'utilisation du tampon de lyse sur les cellules et les îlots, nous avons ajouté une pastille de cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche Dignostics GmbH, Mannheim, Germany) pour 10 mL de tampon d'extraction. Après 30 minutes d'extraction, une centrifugation de 10 minutes à 13.000xg des échantillons est réalisée et les aliquots sont dosés par la méthode Bradford (300).

2.1.12.3. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

Pour réaliser ce dosage, on utilise le kit BioRad Protein Assay. Ce dosage est basé sur le changement de coloration du Bleu de Coomassie proportionnellement à la quantité de protéines présentes. Une fraction de la solution à doser est prélevée et complétée à 50 µL d'eau ultrapure (en fonction de la dilution à donner à ces échantillons). On ajoute 2,5 mL de solution de Bradford diluée 5 fois dans l'eau. Après incubation de 5 à 30 minutes à l'obscurité et une légère agitation, la DO est lue à 595 nm (Spectrophotomètre DU[®] 640B, Beckman). La concentration est déterminée en comparaison avec une gamme étalon de BSA réalisée dans les mêmes conditions. La concentration des échantillons est exprimée en mg/mL.

2.1.13. Etude immunohistologique des îlots pancréatiques

2.1.13.1. Inclusion des îlots pancréatiques

Après culture des îlots infectés ou mis en présence de DFO, 200 îlots sont récupérés dans des tubes eppendorf de 2 mL puis rincés dans du PBS. Les îlots sont alors incubés pendant 30 minutes dans du parformaldéhyde (PFA, Sigma) dilué à 4% dans du PBS. Après 2 rinçages de 5 minutes dans du PBS additionné d'éosine (Eosine 225[®], Réactifs RAL[®], Labonord, Templemars, France), les îlots sont inclus dans la paraffine (Labonord).

2.1.13.2. Coupe des blocs d'îlots pancréatiques

Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica RM 2265, Leica, Rueil-Malmaison, France) à 4 µm d'épaisseur. Le ruban de tissu obtenu est placé au bain marie et récupéré sur une lame SuperFrost[®]Plus (Labonord).

2.1.13.3. Coloration éosine/hématoxyline des coupes d'îlots

Dans le but de vérifier l'intégrité et la qualité de la coupe, une coloration éosine/hématoxyline est réalisée sur la lame avant de procéder à l'immunomarquage. Les lames sont d'abord plongées dans du Harris haematoxylin (Surgipath[®], Cambridgeshire, Grande Bretagne), rincées dans de l'eau

distillée puis plongées dans de l'éthanol/acide (10% d'éthanol à 96%, 1 mL HCl). Les lames sont ensuite plongées dans de l'eau/NH₄ (0,25% d'ammoniaque à 20%), rincées dans de l'eau distillée puis colorées à l'éosine. Les coupes sont alors observées au microscope optique (Axioskop 20, Zeiss, Allemagne) (Fig.2-11).

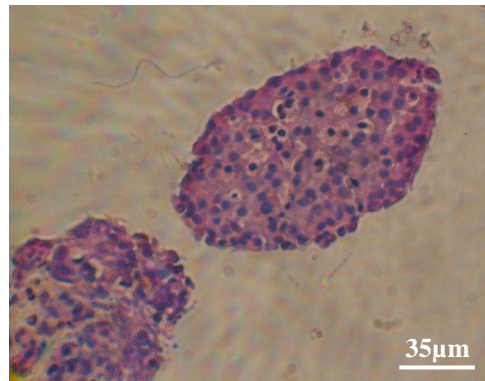


Figure 2-11: Coloration éosine/hématoxyline d'une coupe d'îlots pancréatiques de Rat.

2.1.13.4. Immunomarquage

Le marquage a été mis au point sur des coupes de pancréas (Fig.2-12) et réalisé sur des îlots isolés. Des marquages immunohistochimiques de l'insuline et du VEGF 165 ont été effectués sur des coupes de 4 µm. Pour le marquage de l'insuline, un anticorps primaire anti-insuline de souris (Sigma) dilué au 1/1.000 est utilisé et pour le marquage du VEGF, l'anticorps primaire est un anticorps anti-VEGF de souris (Abcam, Paris, France), dilué au 1/200. L'anticorps secondaire anti-souris biotinylé, dilué au 1/200 est utilisé avec la peroxydase couplée à l'avidine (Sigma). La protéine recherchée est alors révélée par la peroxydase qui va réduire le peroxyde d'hydrogène afin d'oxyder la molécule d'AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole).

Après le déparaffinage, les sites antigéniques sont démasqués par un bain de trypsine à 0,1% pendant 20 minutes. Afin de neutraliser l'activité peroxydase endogène, les lames sont incubées pendant 10 minutes dans une solution à 3% en H₂O₂. Après incubation avec l'anticorps primaire durant la nuit à 4°C, les lames sont rincées puis incubées avec l'anticorps secondaire pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite mises en présence de l'extravidine-Peroxydase (Sigma) pendant 30 minutes. Enfin, après rinçage, le substrat de la peroxydase est ajouté pendant 5 minutes. Les lames sont montées avec un milieu aqueux (Microscopy Aquatexc, Merck) (Fig. 2-12).

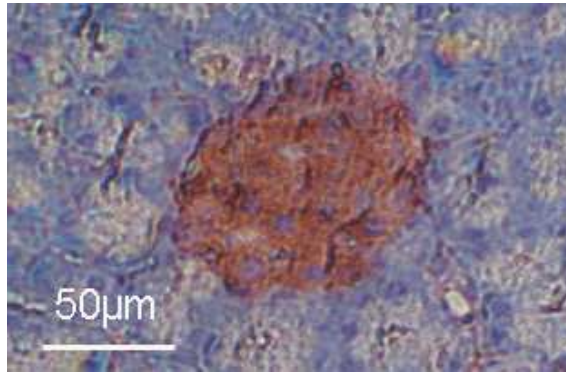


Figure 2-12: Coupe de pancréas: marquage de l'insuline.

2.2. Etude *in vivo*

2.2.1. Etude histologique

2.2.1.1. Principe de l'étude

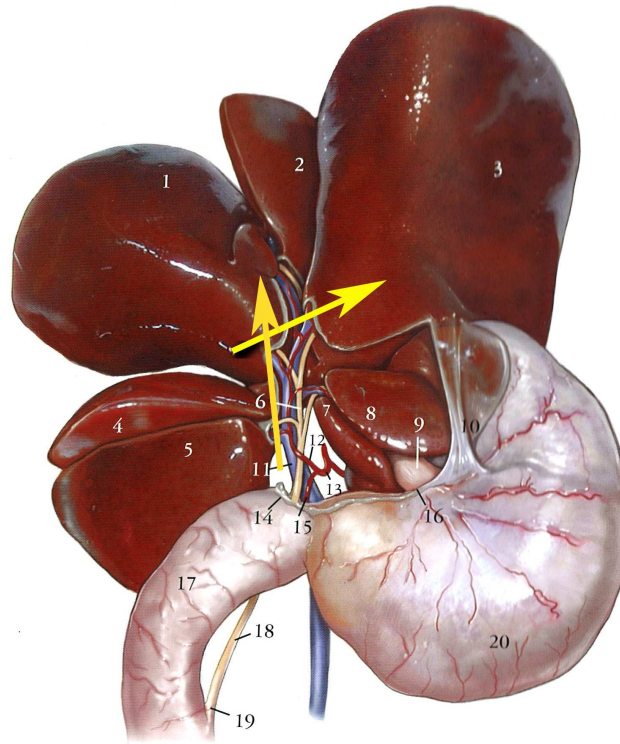
Le but de cette étude était de comparer les effets de l'infection adénovirale du gène du VEGF (après 1 jour d'incubation) et de la préincubation des îlots en présence de DFO (1 et 3 jours d'incubation), sur la viabilité et la revascularisation des îlots pancréatiques au cours de la transplantation. Pour cela, afin de s'affranchir de tous phénomènes de rejet, notre choix s'est porté sur une transplantation syngénique dans un modèle de rat Lewis sain ou diabétique.

2.2.1.2. Induction du diabète par la streptozotocine (STZ)

L'induction du diabète est réalisée par injection intra-péritonéale d'une solution de STZ (Sigma) à raison de 75 mg/kg de poids corporelle. La STZ [2-deoxy-2(3-méthyl-3-nitrosourée)1-D-glucopyranose] est un antibiotique à large spectre produit par *Streptomyces achromogens*. La réponse diabéto-gène à la STZ est due à la nécrose des cellules β des îlots de Langerhans. Du fait de sa faible stabilité, la STZ est préparée extemporanément dans un tampon citrate 0,1 M pH=4,5 composé d'acide citrique monohydrate 0,1 mol/L (Sigma), d'acide citrique trisodique 0,1 mol/L (Sigma), d'eau ultrapure et de soude (Sigma). Cette solution est alors mise dans la glace le temps de procéder aux injections de 500 μ L de STZ par rat. La glycémie des rats est alors vérifiée 5 jours après injection à l'aide d'un lecteur de glycémie (AccuChek (Roche)) par prise d'une goutte de sang à la queue du rat.

2.2.1.3. *Transplantation d'îlots pancréatiques*

La transplantation a été réalisée sur des rats Lewis sain ou diabétique de 200-250 g et élevés dans des conditions standard d'hébergement. Les îlots, infectés (paragraphe 2.1.5.3) ou traités à la DFO pendant 1 et 3 jours après isolement (paragraphe 2.1.4.1 à 4.3), sont sédimentés et suspendus dans 1 mL de CMRL 1066 (Invitrogen) juste avant l'intervention. Après anesthésie sous isoflurane (Baxter, Maurepas, France), le rat est incisé au niveau de la cavité péritonéale. Tous les lobes du foie sont clampés excepté le lobe caudé (lobes 7 et 8) qui recevra les îlots (Fig. 2-12 pour le site de clampage). Ce site d'implantation a été choisi afin de permettre une étude histologique plus fine des îlots transplantés. 200 îlots sont chargés dans une seringue de 1 mL et injectés via la veine porte. Une fois l'injection terminée, les lobes hépatiques sont déclampés et une compression au point d'injection permet de limiter les saignements. Enfin, les lobes caudés ont été prélevés 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 30 et 60 jours après transplantation.



- | | |
|--|---|
| 1. Lobe droit médial du foie
(<i>lobus hepatis dexter medialis</i>) | 12. Artère hépatique propre
(<i>arteria hepatica propria</i>) |
| 2. Lobe gauche médial du foie
(<i>lobus hepatis sinister medialis</i>) | 13. Artère hépatique commune
(<i>arteria hepatica communis</i>) |
| 3. Lobe gauche latéral du foie
(<i>lobus hepatis sinister lateralis</i>) | 14. Ligament hépatoduodénal
du petit omentum sectionné
(<i>ligamentum hepato-duodenale</i>
<i>omentum minoris</i>) |
| 4. Lobe droit latéral dorsal
(<i>lobus dexter lateralis dorsalis</i>) | 15. Artère gastroduodénale
(<i>arteria gastroduodenalis</i>) |
| 5. Lobe droit latéral ventral
(<i>lobus dexter lateralis ventralis</i>) | 16. Feuillet antérieur du petit
omentum sectionné
(<i>lamina anterior omenti minoris</i>) |
| 6. Conduit hépatique
(<i>ductus hepaticus</i>) | 17. Duodénum
(<i>duodenum</i>) |
| 7. Lobe caudé, processus caudé
(<i>lobus caudatus, processus caudatus</i>) | 18. Conduit commun
hépatopancréatique
(<i>ductus hepaticopancreaticus</i>) |
| 8. Lobe caudé, processus
papillaire
(<i>lobus caudatus, processus papillaris</i>) | 19. Papille duodénale
(<i>papilla duodeni</i>) |
| 9. Œsophage
(<i>oesophagus</i>) | 20. Estomac
(<i>gaster ventriculus</i>) |
| 10. Ligament hépatogastrique
du petit omentum
(<i>ligamentum hepato-gastricum</i>
<i>omentum minoris</i>) | |
| 11. Veine porte
(<i>vena portae</i>) | |

Figure 2-13: Face caudale du foie (d'après Aphramian et Freund, 2004).

Le clampage permettant l'injection spécifique dans le lobe caudé est schématisé par les flèches jaunes.

2.2.1.4. Histologie et immunomarquage

Une fois prélevés, les lobes ont été incubés pendant 4 heures dans de la PFA 4% puis inclus dans de la paraffine (paragraphe 2.1.13.1) afin de réaliser des coupes de tissu de 4 µm d'épaisseur (paragraphe 2.1.13.2). Avant d'effectuer l'immunomarquage, les coupes ont été déparaffinées et des coupes de foie ont subi une coloration éosine/hématoxyline (paragraphe 2.1.13.3) afin de vérifier l'intégrité et la qualité du tissu. En effet, cette coloration accentue les contrastes et permet de

reconnaître plus facilement les différents éléments du tissu. Ensuite, nous avons réalisé sur les coupes de foie l'immunomarquage de l'insuline, du VEGF 165 (paragraphe 2.1.13.4). Enfin, afin de mettre en évidence la revascularisation des îlots après transplantation un marquage des tissus à la lectine biotinylée (Lectin de *Bandeiraea simplicifolia* (*Griffonia simplicifolia*), Sigma) diluée au 1/50 a été réalisé. Cette lectine a une affinité importante pour les résidus terminaux α -D-galactosyl et une affinité secondaire pour les résidus terminaux N-acétyl- α -D-galactosaminyl (301) et marque les cellules endothéliales de manière intense et régulière, ce qui constitue une méthode de choix pour l'observation du réseau vasculaire (302). L'anticorps secondaire et le mode de révélation utilisé pour la lectine sont identiques à ceux utilisés pour l'insuline et le VEGF (paragraphe 2.1.13.4).

2.2.2. Etude métabolique

2.2.2.1. *Principe*

Le but de cette étude était d'évaluer et de comparer l'effet de la transplantation d'îlots pancréatiques infectés (après 1 jour de culture) et d'îlots ayant été préincubés en présence de DFO (pendant 1 et 3 jours) sur le contrôle métabolique des rats diabétiques. Comme pour l'étude histologique, notre choix s'est porté sur une transplantation syngénique dans un modèle de rat Lewis diabétique. Pour cette étude 5 groupes de 4 rats Lewis de 200-250 g ont été composés : le groupe standard positif qui correspond aux rats non diabétiques (S+), le groupe standard négatif (S-) qui correspond aux rats diabétiques non transplantés, le groupe des rats transplantés avec des îlots infectés (ADENO) et le groupes des rats transplantés avec des îlots préincubés pendant 1 (DFO1) et 3 jours (DFO3) en présence de DFO. Des mesures de poids corporel, de glycémie à l'aide d'un lecteur à glycémie AccuChek (Roche) et de sécrétion du peptide C par prise de sang au niveau de la queue, ont été effectuées au cours du temps à jeun (24 heures de jeûne) et en post-prandiale (2h après réalimentation).

2.2.2.2. *Transplantation d'îlots pancréatiques*

Mille îlots, infectés ou traités à la DFO, sont sédimentés et suspendus dans 1 mL de CMRL 1066 juste avant l'intervention. Après anesthésie sous isoflurane, le rat est incisé au niveau de la cavité péritonéale et les îlots pancréatiques sont transplantés par voie intraportale dans la totalité du foie à l'aide d'une seringue (Fig. 2-14). Des études préliminaires ont montré que la transplantation de 500 îlots était insuffisante pour observer un effet de la greffe et qu'avec 2000 îlots nous avons une guérison du rat diabétique. Ainsi, afin de pouvoir observer une différence entre les traitements, nous avons fait le choix de transplanter 1000 îlots.

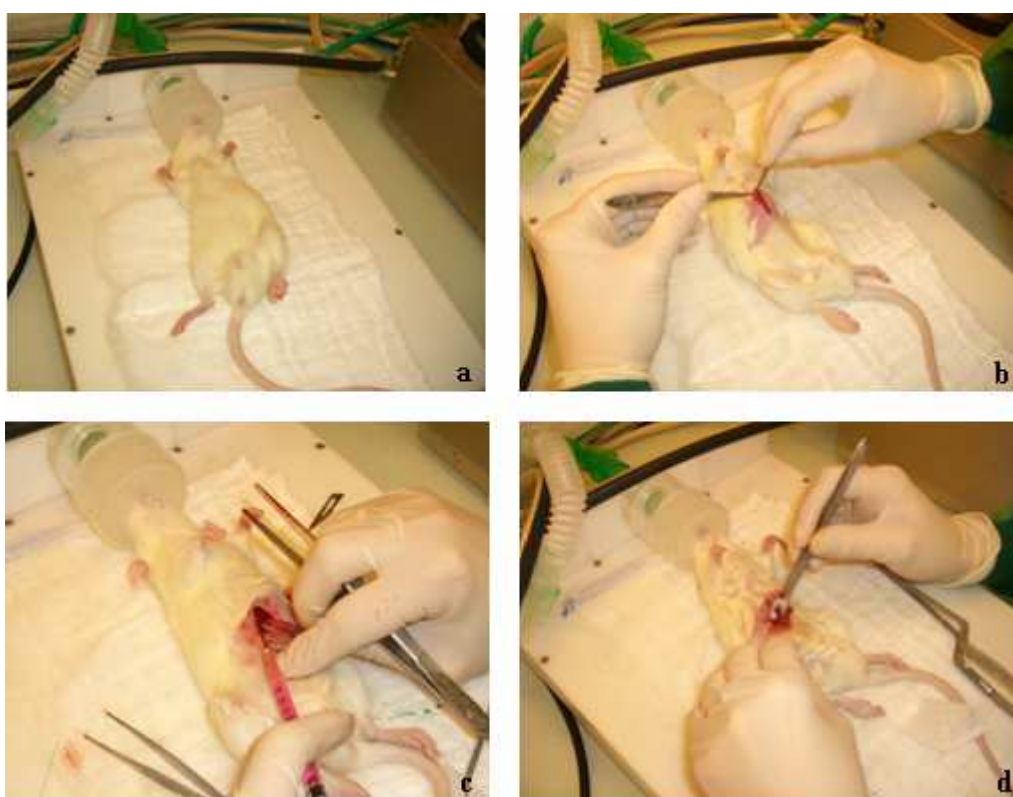


Figure 2-14: Transplantation intrahépatique d'îlots pancréatiques dans un modèle de rat syngénique diabétique induit par la streptozotocine.

a- anesthésie au gaz du rat; b- laparotomie; c- injection des îlots pancréatiques par voie intraportale; d- point de compression.

2.2.2.3. *Dosage du peptide C*

Préalablement, des prises de sang des rats de chaque groupe ont été réalisées pendant 2 mois à partir de la queue des rats, à jeun et en post-prandiale. Le dosage du peptide C a été réalisé à partir du plasma sanguin obtenu par centrifugation du sang dans des tubes complétés d'un anticoagulant (BD Microteiner[®], Becton Dickinson) pendant 2 minutes à 12000xg. Le dosage du

peptide C a été réalisé à l'aide d'un test immunoenzymatique: Mercodia Rat peptide C Elisa (Mercodia) dont le principe a été décrit paragraphe 2.1.9.2.b. Enfin, les concentrations en peptide C sont exprimées en pmol/L.

2.3. Etude statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart-type. Les tests statistiques ont été réalisés selon la méthode classique (ANOVA) respectant les critères de normalité par Sigmastat. Le test réalisé est le test de Student. Un $p < 0,05$ est considéré comme significatif dans tous les tests statistiques. L'effet traitement et l'effet temps sont représentés respectivement par * et #.

3. Résultats

3.1. Etude *in vitro*

3.1.1. Effet de l'infection adénovirale et du traitement DFO sur l'expression du VEGF dans les cellules RINm5F

3.1.1.1. Efficacité de l'infection adénovirale

La figure 3-1 représente le marquage β -galactosidase des cellules RINm5F après infection à l'aide de l'adéno β gal. L'analyse quantitative a montré que 10% des cellules sont infectées avec une quantité d'adénovirus de 100 MOI (Fig.3-1A) contre 20% avec 200 MOI (Fig.3-1B) après un jour de traitement. On observe également une augmentation de l'efficacité de l'infection 3 jours après traitement puisque 40% des cellules sont marquées avec 100 MOI et 60% des cellules sont marquées avec 200 MOI attestant que l'infection adénovirale permet une surexpression prolongée du gène de la β -galactosidase.

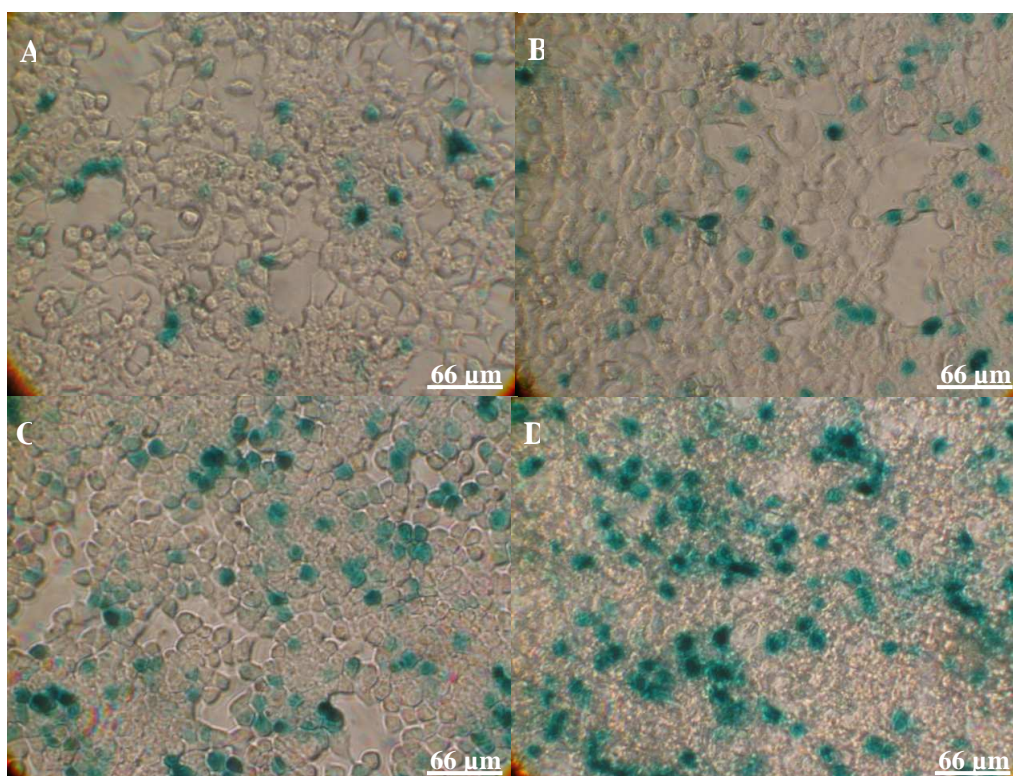


Figure 3-1: Photographie en microscopie inversée des cellules RINm5f infectées à l'aide de l'adéno β gal et révélées après marquage à la β -Galactosidase 1 jour (A, B) et 3 jours (C, D) après infection avec 100 MOI (A, C) ou 200 MOI (B, D).

3.1.1.2. *Influence des différents traitements sur la viabilité cellulaire*

L'étude de la viabilité des cellules RINm5F après traitement à la DFO ou infection adénovirale a été évaluée afin de comparer la toxicité probable de ces deux approches (Fig.3-2). Le traitement des cellules RINm5F en présence de DFO 10 $\mu\text{mol/L}$ a montré une préservation de la viabilité des cellules après 1 jour de traitement ($103,95 \pm 5,66\%$; $n=4$, Fig.3-2A). Par contre, de plus fortes concentrations en DFO induisaient une perte de viabilité ($68,92 \pm 5,83\%$ avec 100 $\mu\text{mol/L}$ et $65,89 \pm 5,83\%$ avec 1000 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,001$, $n=4$) attestant de la toxicité de la DFO. Des résultats identiques ont été trouvés après 3 jours de traitement avec un effet majoré aux plus fortes concentrations ($66,95 \pm 16,55\%$, avec 10 $\mu\text{mol/L}$; $40,23 \pm 7,78\%$ avec 100 $\mu\text{mol/L}$ et $31,46 \pm 7,55$ avec 1000 $\mu\text{mol/L}$; $p < 0,001$, $n=4$). Nos études se focaliseront donc pour la suite des expériences sur la concentration de 10 $\mu\text{mol/L}$ de DFO qui semble la moins toxique.

La mesure de la viabilité des cellules RINm5F traitées avec l'adénoVEGF (Fig. 3-2A) a montré une absence de toxicité du traitement pendant toute la durée de l'étude quelque soit la concentration utilisée ($n=4$).

En parallèle, une étude de l'effet du VEGF a été réalisée afin d'évaluer le rôle de ce facteur de croissance sur la prolifération cellulaire. Ainsi, l'addition de VEGF sur les cellules RINm5F entraînait une stimulation significative de la prolifération cellulaire entre 300 pg/mL ($115,59 \pm 4,72\%$) et 1000 pg/mL de VEGF ($116,68 \pm 7,17\%$) après 1 jour de traitement ($p < 0,001$; $n=3$; Fig. 3-2B). Des résultats identiques ont été obtenus après 3 jours de traitement attestant du rôle bénéfique de ce facteur.

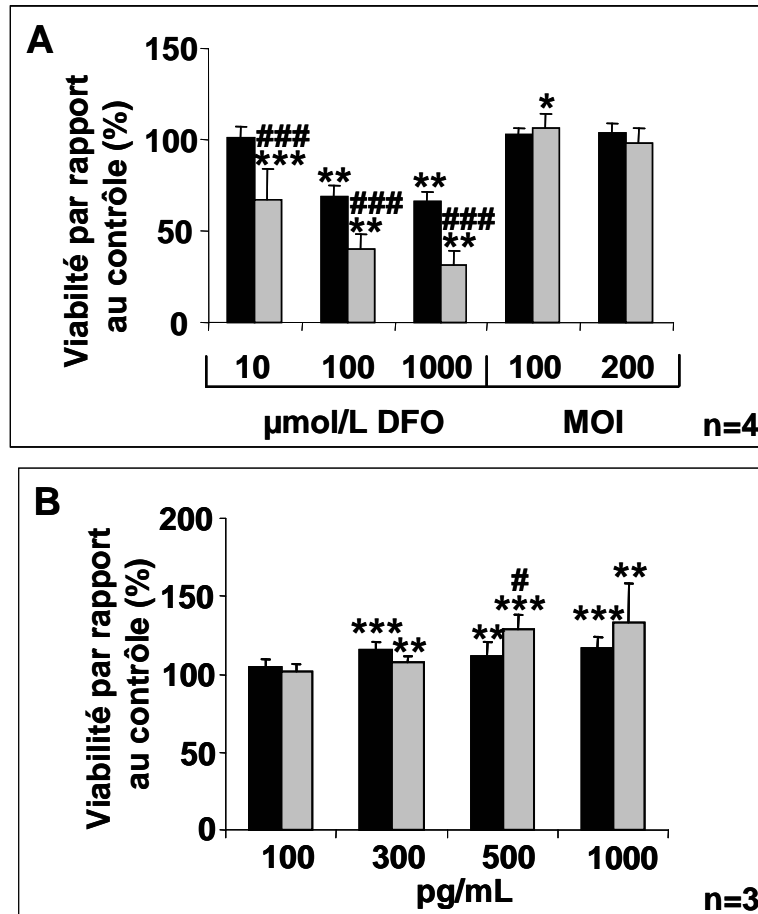


Figure 3-2: Histogramme représentant la viabilité des cellules RINm5F en pourcentage par rapport au contrôle après 1 (barre noire) et 3 jours (barre grise) de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype (***, ### $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; *, # $p < 0,05$).

3.1.1.3. Influence des différents traitements sur l'expression de l'ARN messenger de l'insuline

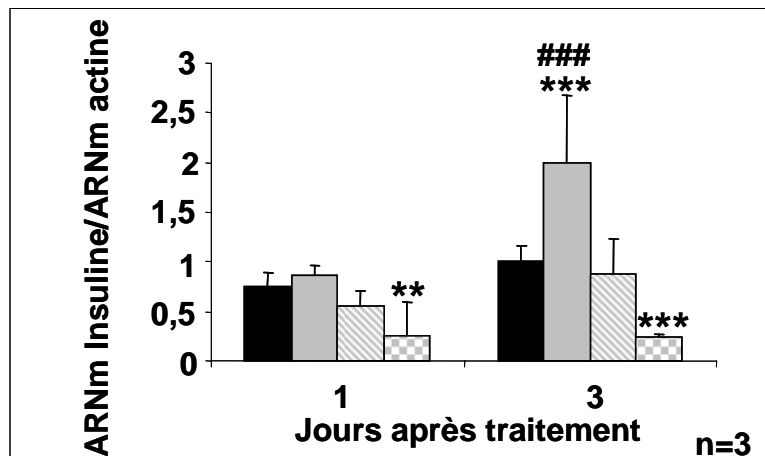


Figure 3-3: Histogramme représentant la quantification relative par RT-PCR semi-quantitative de l'ARNm de l'insuline par rapport à l'ARNm de la β actine des RINm5F à 1 et 3 jours dans les conditions contrôles (barre noire), après traitement à le DFO (barre grise), après infection adévirale avec 100 MOI (barre hachurée) ou 200 MOI (barre quadrillée). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype (***, ### $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

Nous avons analysé par RT-PCR l'expression de l'ARNm de l'insuline (Fig. 3-3) en fonction des différents traitements. Une préservation de l'expression du messenger de l'insuline a ainsi été observée après 1 jour de traitement en présence de DFO ou d'une infection adénovirale à 100 MOI ($0,87\pm 0,09$ avec DFO et $0,55\pm 0,16$ avec 100 MOI contre $0,75\pm 0,15$ pour le contrôle; $n=3$). De plus, après 3 jours de traitement, l'infection adénovirale permettait de conserver des taux d'expression du messenger comparables aux contrôles mais uniquement dans le cas d'une infection réalisée en présence de 100 MOI ($0,88\pm 0,35$ contre $1,01\pm 0,14$ pour le contrôle; $n=3$) puisque l'infection adénovirale avec 200 MOI a induit une diminution significative de l'expression de l'ARNm de l'insuline que ce soit après 1 jour ($0,25\pm 0,34$ contre $0,75\pm 0,15$; $n=3$; $p < 0,01$) ou après 3 jours de traitement ($0,24\pm 0,03$ contre $1,01\pm 0,14$; $n=3$, $p < 0,001$).

En revanche, une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de l'insuline a été observée avec $10 \mu\text{mol/L}$ de DFO après 3 jours de traitement ($2,00\pm 0,68$ contre $1,01\pm 0,14$; $p < 0,01$; $n=3$) suggérant que cette approche semble bénéfique pour les îlots.

3.1.1.4. Analyse de l'apoptose

L'étude de l'apoptose a été réalisée par le marquage de la fragmentation de l'ADN à l'aide du Hoechst. Les résultats présentés figure 3-4 n'ont pas permis de mettre en évidence d'apoptose dans les cellules RINm5F après traitement à la DFO ou infection adénovirale.

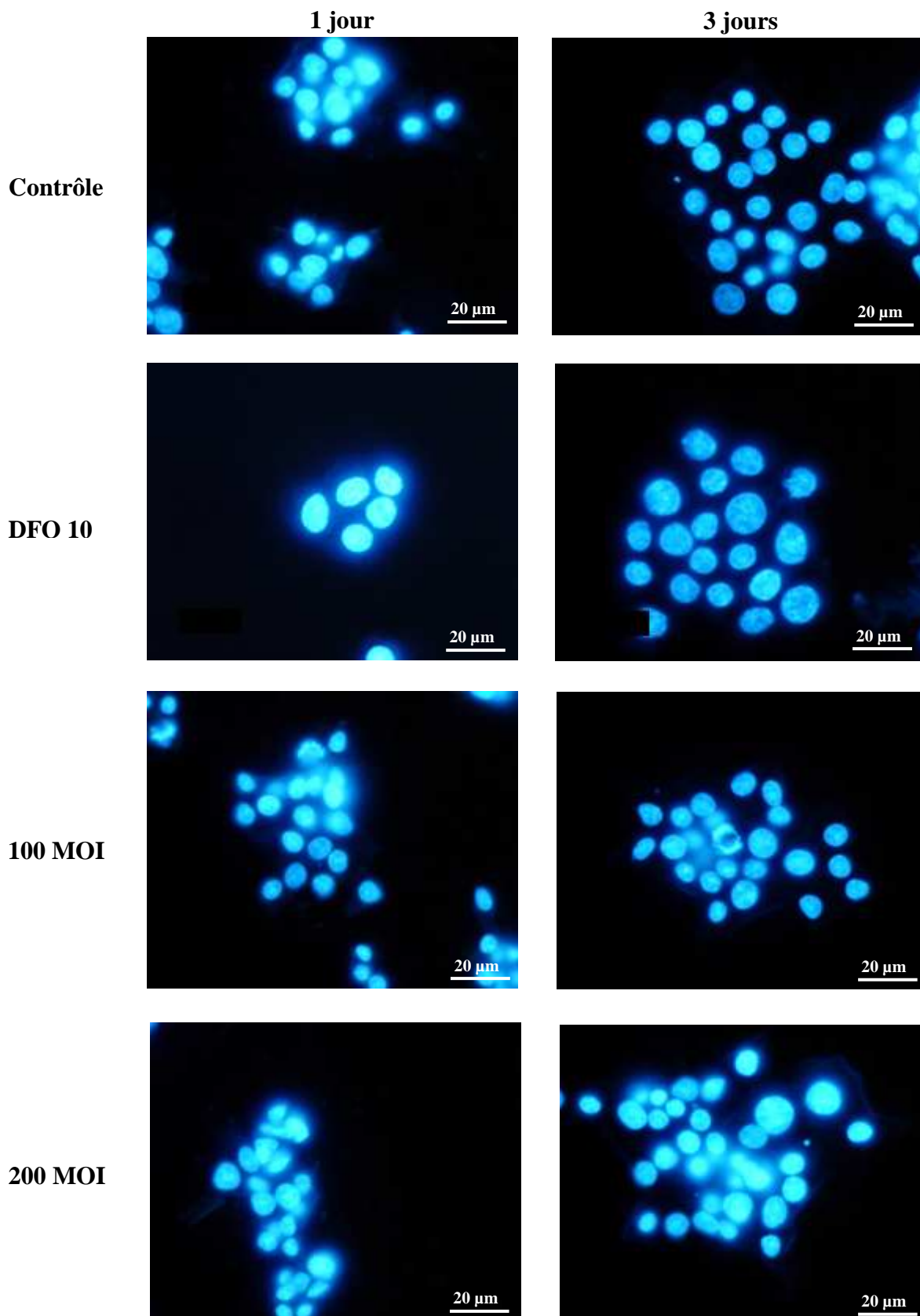


Figure 3-4: Photographies en microscopie à fluorescence des cellules RINm5F après 1 et 3 jours de traitement (DFO ou infection adénovirale 100 et 200 MOI) ou sans traitement et marquées à l'aide du colorant Hoescht.

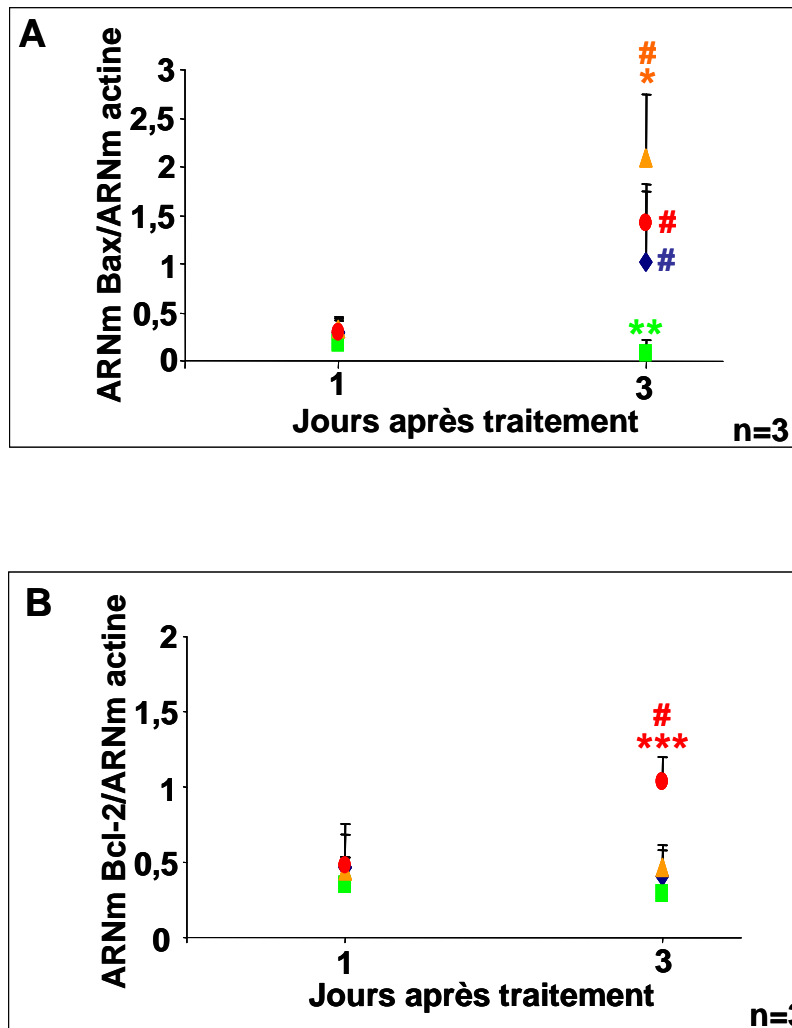


Figure 3-5: Graphique présentant l'étude par RT-PCR semi-quantitative de l'expression de l'ARNm de Bax (A) et de Bcl-2 (B) par rapport à l'ARNm de la β actine dans les cellules RINm5F contrôles (♦), traitées à la DFO (■), infectées avec 100 MOI (▲) ou 200 MOI (●) après 1 et 3 jours de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; *, # $p < 0,05$).

En accord avec ces données, l'étude de l'expression de l'ARNm des facteurs pro-apoptotiques (Bax) et anti-apoptotiques (Bcl-2) par RT-PCR semi-quantitative n'a pas montré de variation significative de ces facteurs après un jour de traitement (Fig.3-5). Cependant, l'expression de l'ARNm de Bax est significativement augmentée après 3 jours de traitement dans les cellules contrôles (de $0,3 \pm 0,13$ à $1,01 \pm 0,73$; $n=3$; $p < 0,05$) et dans les cellules infectées (de $0,33 \pm 0,09$ à $2,10 \pm 0,64$ avec 100 MOI; de $0,30 \pm 0,15$ à $1,42 \pm 0,40$ avec 200 MOI ($p < 0,05$; $n=3$; Fig.3-5A) alors que cette expression est significativement moins élevée après 3 jours de traitement à la DFO (de

0,18±0,05 à 0,07±0,14; $p < 0,01$; $n=3$). De plus, l'expression de l'ARNm de Bcl-2 reste inchangée au cours de l'expérimentation dans les contrôles (de 0,46±0,23 à 0,41±0,17), avec la DFO (de 0,35±0,18 à 0,29±0,12) et avec l'infection à 100 MOI (de 0,44±0,1 à 0,46±0,16, Fig.3-5B). Enfin, l'infection à 200 MOI induit une surexpression significative de l'expression de l'ARNm de Bcl-2 de 0,48±0,28 à 1,04±0,16; ($p < 0,001$; $n=3$). Ces données suggèrent que les cellules traitées à la DFO semblent s'orienter dans un processus anti-apoptotique alors que les autres traitements orienteraient les cellules dans une voie pro-apoptotique.

3.1.1.5. *Mesure de l'expression et de la sécrétion de VEGF*

La mesure du VEGF sécrété par test ELISA a montré une stimulation significative de sécrétion du VEGF par les cellules traitées à la DFO ou infectées (200 MOI) par rapport au contrôle après 1 jour de traitement (2,45±0,15 avec la DFO ($p < 0,01$; $n=4$), 2,89±0,39 avec 200 MOI; ($p < 0,05$; $n=3$) contre 2,12±0,06 pg/μg de protéines totales pour le contrôle) (Fig.3-6A). Des résultats similaires ont été obtenus pour 3 jours de traitement. Cependant, l'infection adénovirale présente la particularité de permettre une surexpression du transgène à plus long terme, comme cela a déjà été démontré au laboratoire lors d'études préalables (293). Ainsi, l'infection adénovirale stimule la sécrétion du VEGF durant 14 jours avec un pic de sécrétion 7 jours après infection alors que cette sécrétion du VEGF en présence de DFO est plus transitoire et ne dépasse pas 3 jours dans nos essais *in vitro* (résultats non présentés).

L'étude de l'expression du messenger du VEGF par RT-PCR apporte une toute autre information. En effet, sur une étude ne dépassant pas 3 jours, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative d'expression du messenger du VEGF avec les différents traitements développés. Toutefois, l'expression de l'ARNm du VEGF augmente au cours du temps pour les cellules contrôles, traitées à la DFO et infectées avec 100 MOI. Ces données suggèrent que l'augmentation de sécrétion du VEGF en présence de DFO n'est pas due à une synthèse accrue de l'ARN messenger mais uniquement à une libération plus importante de ce facteur. Au contraire, dans le cas de l'adénovirus, la sécrétion de VEGF à long terme passe bien par la voie génomique.

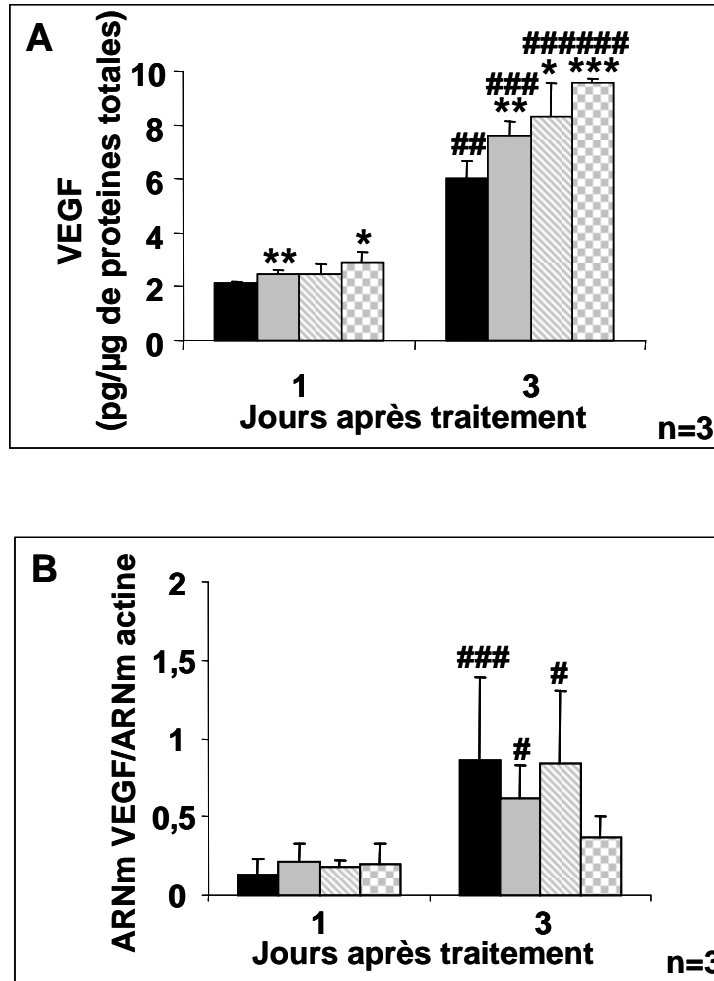


Figure 3-6: Histogramme représentant la mesure de la sécrétion du VEGF en pg/μg de protéines totales par test ELISA (A) et la mesure semi-quantitative par RT-PCR de l'ARNm du VEGF par rapport à l'ARNm de la β actine (B) dans les cellules RINm5F sans traitement (barre noire) ou avec traitement à la DFO (barre grise) ou après infection avec 100 MOI (barre rayée) ou 200 MOI (barre quadrillée) après 1 et 3 jours de traitement. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écartype (***, ### p < 0,001; **, ## p < 0,01; *, # p < 0,05).

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans cette sécrétion et l'expression du VEGF, nous nous sommes donc intéressés à l'expression de l'Hypoxia Inducible Factor 1α (HIF-1α) qui est un facteur de transcription impliqué dans l'expression du VEGF.

L'analyse par RT-PCR de l'expression du messenger de HIF-1α montre une augmentation significative de l'expression du HIF-1α de $1,07 \pm 0,37$ à $2,64 \pm 1,00$ après 1 et 3 jours de culture pour des cellules non traitées (p < 0,001, n=6, Fig.3-7). Cependant, en présence de DFO, l'expression de l'ARNm du HIF-1α était comparable au contrôle 1 jour après traitement et était significativement

réduite par rapport au contrôle à 3 jours ($0,95 \pm 0,20$ contre $2,64 \pm 1,00$; $p < 0,001$; $n=6$; Fig.3-7).
Finalement, l'analyse de l'expression par western blotting de la protéine HIF-1 α a révélé une surexpression significative de cette protéine en présence de DFO 1 et 3 jours après traitement ($0,65 \pm 0,08$ contre $0,19 \pm 0,06$ à 1 jour; $1,12 \pm 0,38$ contre $0,24 \pm 0,18$ à 3 jours; $p < 0,001$; $n=3$, Fig.3-8).

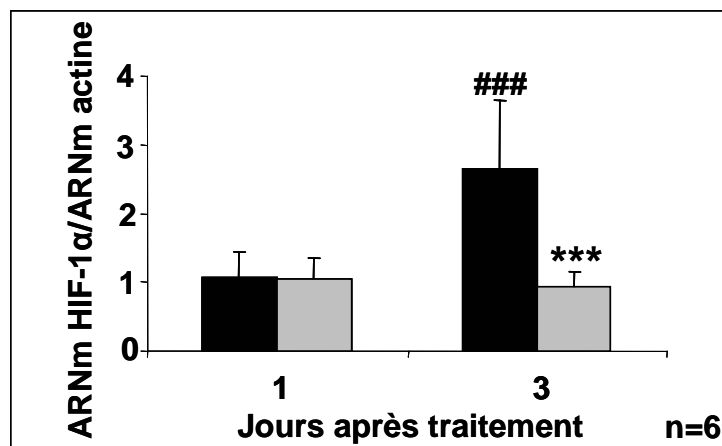


Figure 3-7: Histogramme représentant la mesure semi-quantitative par RT-PCR de l'ARNm du HIF-1 α par rapport à l'ARNm de la β actine dans les cellules RINm5F sans traitement (barre noire) ou avec traitement à la DFO (barre grise) après 1 et 3 jours de culture. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écartype (***, ### $p < 0,001$).

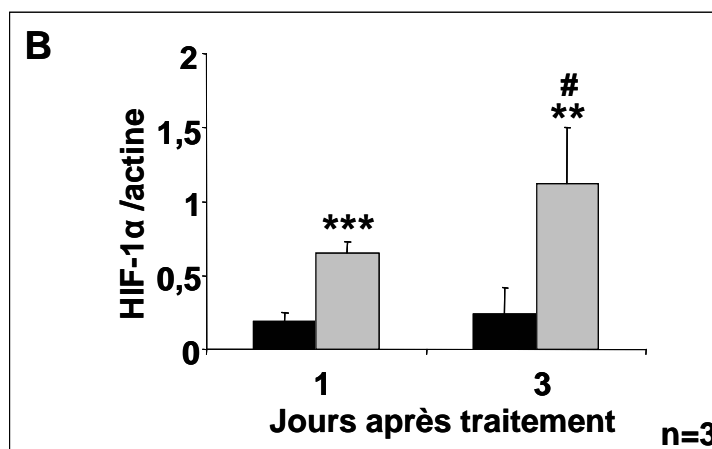
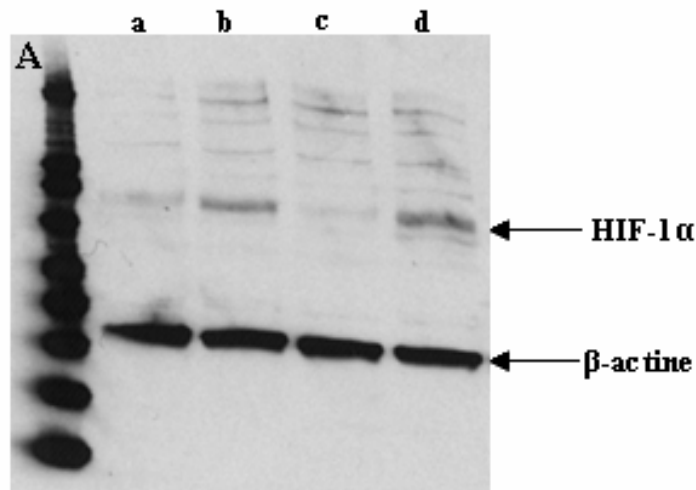


Figure 3-8: (A) Photographie du film du western blotting des protéines HIF-1 α et β -actine sur les cellules RINm5F contrôles (a, c) et traitées à la DFO (b, d) après 1 (a, b) et 3 jours (c, d) de traitement et (B) histogramme représentant la mesure de l'expression de la protéine HIF-1 α par western blotting sans (barre noire) ou avec traitement DFO (barre grise) après 1 et 3 jours de culture. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écartype (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$).

3.1.1.6. Discussion

Dans cette étude, afin de permettre la surexpression du VEGF, nous nous sommes intéressés à deux techniques : l'infection adévirale et le traitement des cellules avec la DFO. Nous avons ainsi évalué le retentissement de ces deux approches sur la viabilité, la fonctionnalité et l'expression du VEGF sur une lignée de cellules β RINm5F. Le but était ici de vérifier que ces différents traitements n'étaient pas toxiques et d'évaluer leur efficacité sur la surexpression du VEGF en vue d'une application sur des îlots pancréatiques de Rat.

Le traitement des cellules β à l'aide de la DFO a dans un premier temps montré que cette molécule

inhibait la prolifération cellulaire. Bien que surprenant, ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont suggéré que le fer est nécessaire pour la prolifération des cellules β . Nous avons également observé une surexpression de l'ARNm de l'insuline en utilisant 10 $\mu\text{mol/L}$ de DFO. Ces résultats sont confortés par l'étude d'Olejnicka *et al.*, (258, 259) qui a montré que la DFO est un bon anti-oxydant et protège les cellules β du stress oxydant; cette protection conduirait à l'amélioration de l'expression de l'ARNm de l'insuline. Ces données ne peuvent être confirmées qu'à une concentration de 10 $\mu\text{mol/L}$ car au delà nous avons pu observer un effet délétère de la DFO par une diminution de la viabilité cellulaire. Nos études se sont donc focalisées dans une deuxième phase sur la concentration de 10 $\mu\text{mol/L}$ de DFO. Cette concentration en DFO permet en effet d'orienter la cellule vers une voie de survie cellulaire, comme cela a été confirmé par la diminution de l'expression de l'ARNm de Bax, facteur pro-apoptotique et le maintien de l'expression de Bcl-2, facteur anti-apoptotique (260). De plus, le traitement des cellules à l'aide de la DFO permet une surexpression du VEGF par les cellules RINm5F. Cette surexpression n'est cependant que transitoire puisqu'elle n'est pas maintenue au delà de 3 jours de traitement. L'étude des mécanismes cellulaires à l'origine de la surexpression du VEGF a permis de démontrer que cette surexpression était due à une augmentation de l'hypoxie cellulaire caractérisée par une surexpression de la protéine HIF-1 α comme précédemment décrit dans la littérature (264). D'ailleurs, seule les modifications d'expression de la protéine HIF-1 α nous ont permis d'identifier précisément le rôle de ce facteur dans l'hypoxie cellulaire, l'étude de l'expression du ARNm n'apportant aucune information. De ce fait, durant l'hypoxie, seule la quantité de protéine HIF-1 α augmente, sans être pour autant accompagnée d'une augmentation de l'expression du messenger.

En conclusion, malgré une certaine toxicité de la DFO pour des concentrations supérieures à 10 $\mu\text{mol/L}$, cette molécule améliore la viabilité et la fonctionnalité de cellules RINm5F, induit une surexpression transitoire du VEGF par la voie de l'hypoxie et protège les cellules contre le stress oxydant.

Les études utilisant la thérapie génique pour permettre la surexpression du VEGF ont montré une

préservation de la prolifération cellulaire lors de l'infection adénovirale du gène du VEGF165 humain. Cette surexpression pourrait s'expliquer par l'effet activateur du VEGF sur la prolifération de cellules, sachant qu'il s'agit aussi d'un puissant et spécifique facteur de croissance mitogénique (202). Conformément à ces données (202), cette étude a permis de confirmer que le VEGF induit une augmentation significative de la prolifération cellulaire 3 jours après l'infection en utilisant 100 MOI d'adénovirus. Cependant, l'infection adénovirale est toxique pour des concentrations supérieures à 100 MOI induisant une perte d'insuline par les cellules β malgré une préservation de la viabilité cellulaire. De plus, l'étude de l'apoptose a suggéré que l'utilisation de l'infection adénovirale était à l'origine d'une destruction des cellules β . Ce résultat a d'ailleurs été confirmé par la surexpression de l'ARNm de Bax après infection adénovirale en utilisant 200 MOI. Ainsi, l'usage de l'infection adénovirale pour surexprimer le VEGF serait délétère pour la viabilité et la fonctionnalité de cellules aux fortes concentrations bien qu'elle permette une surexpression efficace du transgène jusqu'à 14 jours. Ces données ont par conséquent suggéré qu'une infection adénovirale à l'aide d'une concentration en adénovirus de 100 MOI permettrait une surexpression suffisante du transgène tout en limitant la toxicité cellulaire liée à l'utilisation d'un adénovirus. En conclusion, cette étude nous a montré la faisabilité et l'efficacité de ces deux approches pour surexprimer le VEGF par les cellules β . De plus, elle nous a permis de déterminer les concentrations en adénovirus et en DFO permettant d'induire une surexpression du VEGF comparable avec les deux approches sans modification de la viabilité et de la fonctionnalité des cellules β . Enfin, l'utilisation de la DFO permet de stimuler la fonctionnalité des cellules β , effet probablement lié à ses propriétés anti-oxydantes et anti-apoptotiques que nous avons pu évaluer au cours de cette étude.

3.1.2. Effet de l'infection adénovirale du gène du VEGF et de la DFO sur l'expression du VEGF sur les îlots pancréatiques de Rat

3.1.2.1. *Evaluation de la viabilité, de la fonctionnalité et de l'expression d'insuline des îlots pancréatiques infectés ou traités à la DFO*

L'analyse de la viabilité des îlots pancréatiques a été réalisée à partir d'une coloration FDA/PI (Fig. 3-9 et 3-10). Bien que ce marquage soit informatif, il n'indique pas pour autant la viabilité au centre de l'îlot pancréatique et reste par conséquent une technique assez subjective. Cependant, il n'existe pas à ce jour d'autre technique de marquage permettant d'analyser rapidement la viabilité des îlots pancréatiques. Le marquage FDA/PI a permis de montrer que les différents traitements proposés, que ce soit la DFO ou l'infection adénovirale, permettent une préservation de la viabilité des îlots pancréatiques au cours du temps. La viabilité de ces îlots après 3 jours de traitement à la DFO était de $91,38 \pm 6,95\%$ (n=8) contre $89,71 \pm 8,30\%$ pour l'infection (n=7) et $87,86 \pm 11,50\%$ pour le contrôle (n=7).

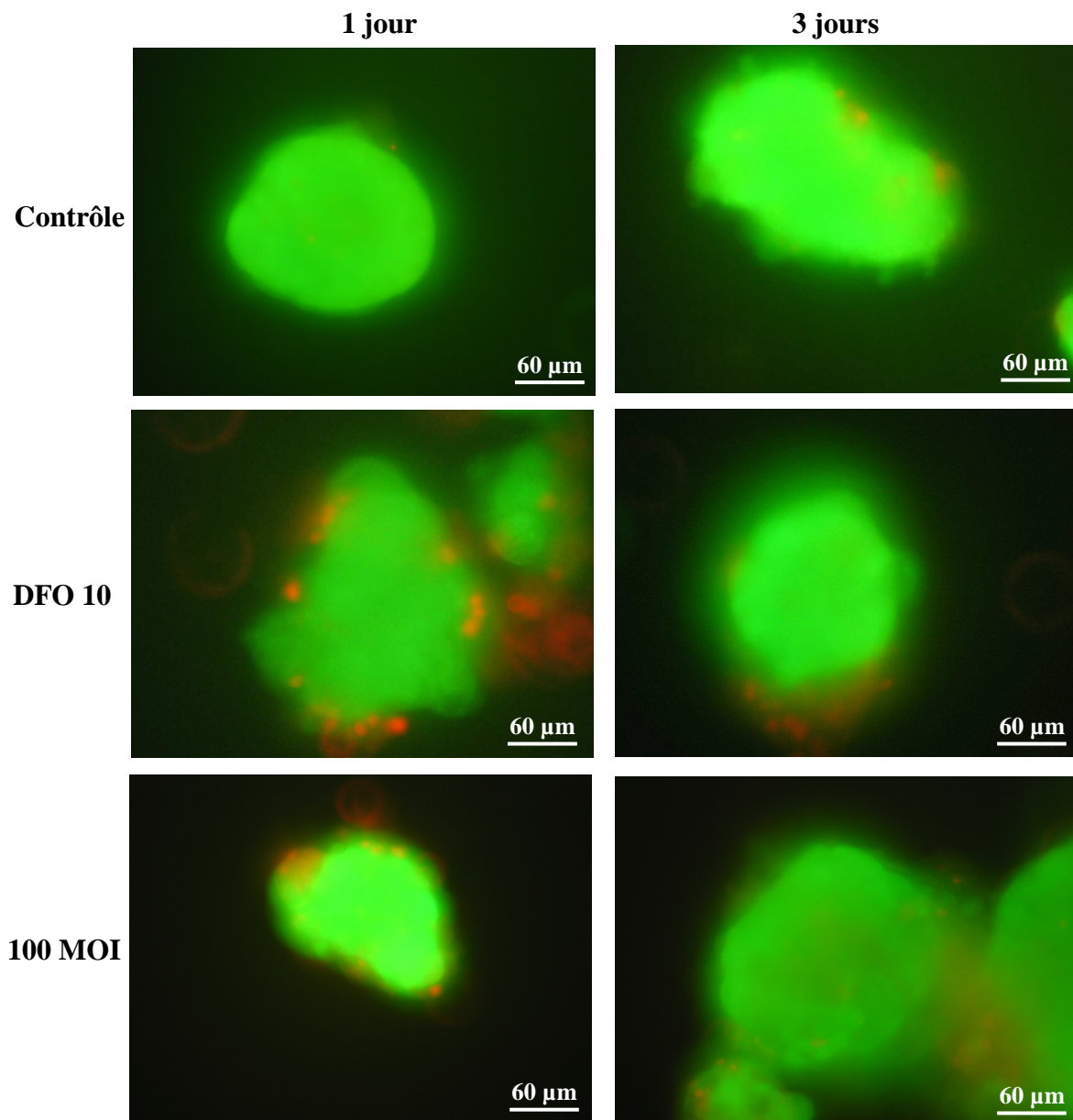


Figure 3-9: Photographies en microscopie à fluorescence d'îlots pancréatiques de Rat après 1 et 3 jours de traitement (DFO ou infection adénovirale 100) ou sans traitement et marquées à l'aide de la technique du FDA/PI.

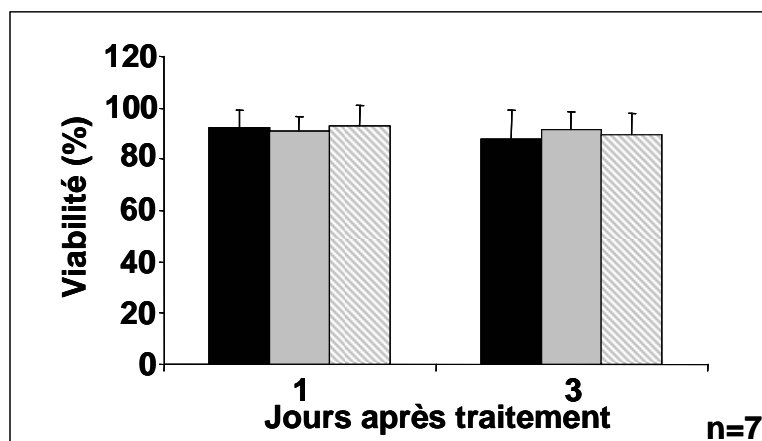


Figure 3-10: Histogramme représentant la viabilité des îlots pancréatiques en pourcentage sans traitement (barre noire) ou après traitement DFO (barre grise) ou infection 100 MOI (barre hachurée) après 1 et 3 jours de culture. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype.

Les analyses du test de stimulation au glucose (Fig. 3-11) attestant de la fonctionnalité des îlots pancréatiques ont révélé une augmentation significative de la fonctionnalité des îlots en présence de DFO après 1 jour de traitement par rapport aux îlots contrôles et aux îlots infectés ($3,74 \pm 0,58$ versus $1,96 \pm 0,83$ et $2,03 \pm 1,06$, $n=3$; $p < 0,001$). Par contre, l'index de stimulation diminue au cours du traitement pour devenir comparable aux conditions contrôles après 3 jours ($1,91 \pm 0,22$ versus $2,02 \pm 0,45$, $n=6$). L'infection adénovirale entraîne une diminution significative de cette fonctionnalité après 3 jours de traitement ($1,15 \pm 0,13$, $n=4$; $p < 0,01$). Ainsi, malgré les informations apportées par le test de viabilité, les résultats concernant la fonctionnalité révèlent une toxicité de l'infection adénovirale au cours du temps.

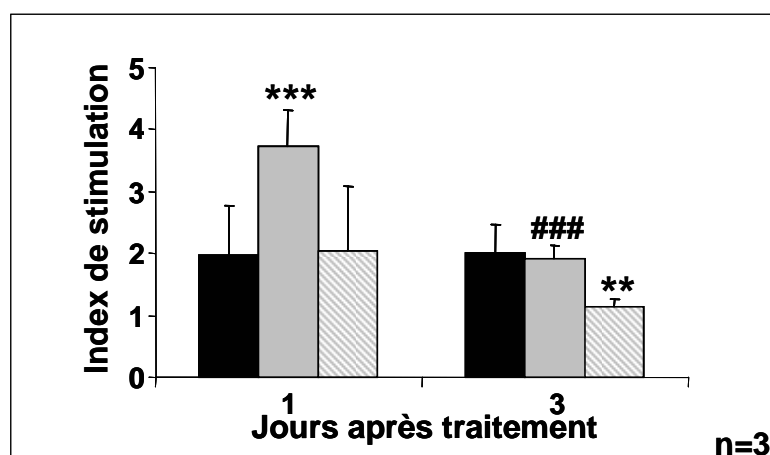


Figure 3-11: Histogramme représentant l'index de stimulation des îlots pancréatiques après 1 ou 3 jours de culture (barre noire) ou après traitement DFO (barre grise) ou infection 100 MOI (barre hachurée). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype (***, ### $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

L'étude de l'expression de l'ARNm de l'insuline n'indique pas de modification d'expression de l'insuline avec ces différents traitements attestant que cette méthode apporte peu d'informations sur la fonctionnalité du système (Fig. 3-12).

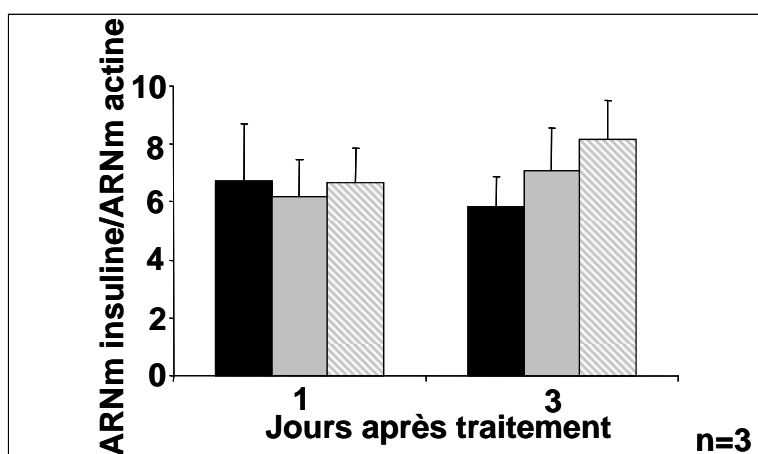


Figure 3-12 : Histogramme représentant la mesure semi-quantitative par RT-PCR de l'ARNm de l'insuline par rapport à l'ARNm de la β actine après 1 ou 3 jours de culture (barre noire) ou après traitement DFO (barre grise) ou infection 100 MOI (barre hachurée) des îlots pancréatiques de rat. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype.

3.1.2.2. Analyse de l'apoptose

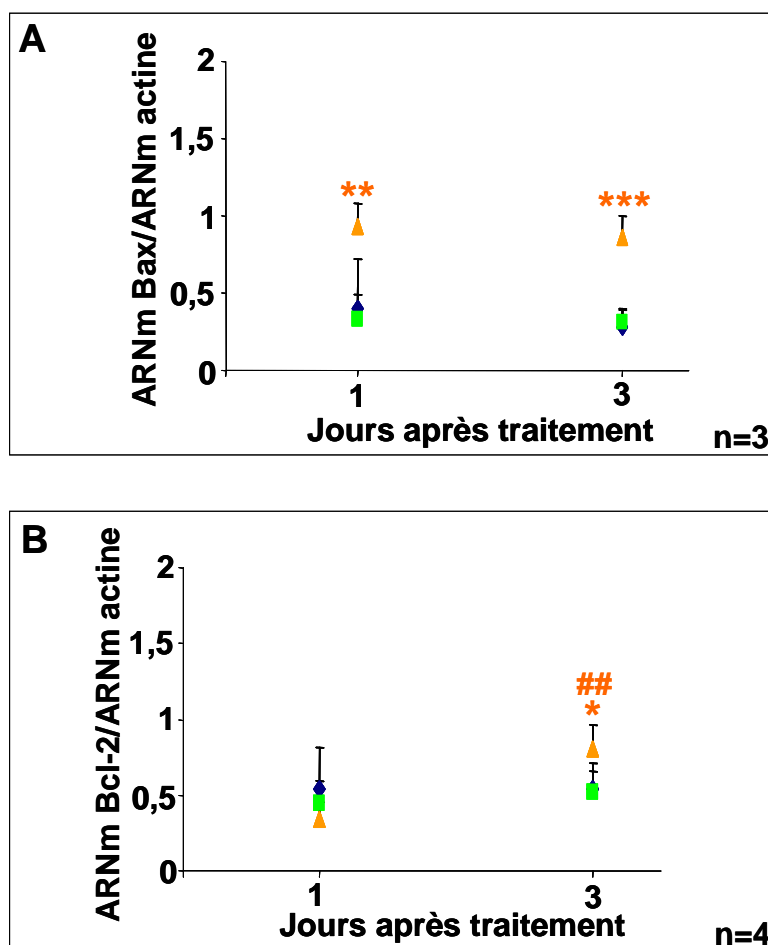


Figure 3-13 : Graphique présentant l'étude par RT-PCR semi-quantitative de l'expression de l'ARNm de Bax (A) et de Bcl-2 (B) dans les îlots pancréatiques contrôles (◆), traités à la DFO (■), infectés avec 100 MOI (▲) après 1 et 3 jours de traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype (***) $p < 0,001$; **, ## $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

L'étude de l'expression des ARNm de Bax n'a pas montré de différence significative d'expression au cours de l'expérimentation que ce soit dans les îlots contrôles (de $0,40 \pm 0,32$ à $0,28 \pm 0,11$, $n=5$) ou dans les îlots traités à la DFO (de $0,33 \pm 0,16$ à $0,31 \pm 0,09$, $n=3$). Par contre, les résultats obtenus après infection adénovirale montrent un doublement de l'expression du facteur pro-apoptotique par rapport aux îlots contrôles ou aux îlots traités à la DFO indiquant l'effet délétère de ce traitement quelques soient les temps de l'étude. L'étude de l'expression de l'ARNm de Bcl-2 n'indique pas de différence significative pour les différents traitements après un jour de culture (contrôle: $0,54 \pm 0,28$, $n=6$; DFO: $0,44 \pm 0,15$, $n=5$ et infection: $0,34 \pm 0,11$, $n=4$). D'ailleurs, à

chaque étape de l'étude, l'expression des ARNm de Bax et de Bcl-2 reste identique et inchangée pour les îlots contrôles et traités à la DFO. L'infection adénovirale apporte de tout autre renseignement. En effet, après 3 jours de traitement, l'expression de Bcl-2 des îlots infectés est significativement augmentée par rapport aux îlots contrôles et aux îlots traités à la DFO (contrôle: $0,54 \pm 0,17$, $n=5$; DFO: $0,52 \pm 0,14$, $n=4$ et infection: $0,80 \pm 0,16$, $n=4$, $p < 0,05$). D'ailleurs, pour les îlots infectés, l'expression de Bax reste toujours supérieure à celle de Bcl-2 durant toute l'étude indiquant que les îlots s'orienteraient dans la voie de la mort cellulaire.

3.1.2.3. Mesure de l'expression et de la sécrétion de VEGF

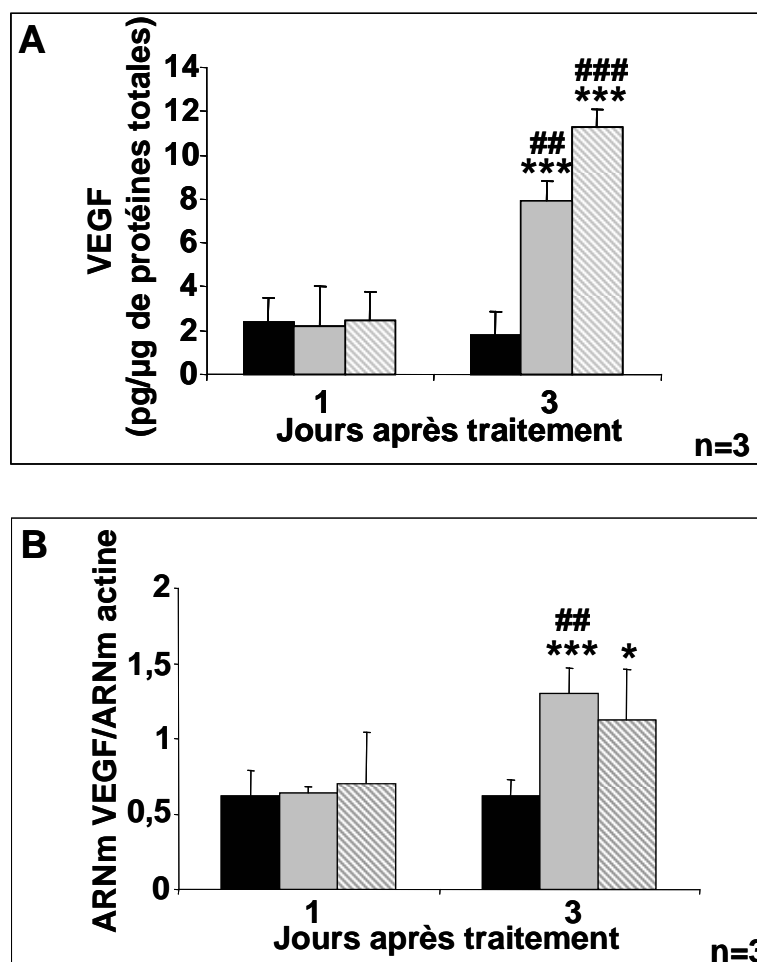


Figure 3-14 : Histogramme représentant la mesure de la sécrétion du VEGF en pg/μg de protéine totale par test ELISA (A) et la mesure semi-quantitative par RT-PCR de l'ARNm du VEGF par rapport à l'ARNm de la β actine (B) dans les îlots pancréatiques en absence de traitement (barre noire) ou avec traitement à la DFO (barre grise) ou après infection avec 100 MOI (barre hachurée) après 1 et 3 jours de traitement. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écartype (***, ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

L'étude de la sécrétion du VEGF (Fig. 3-14A) par les îlots pancréatiques a montré que l'infection adénovirale et la DFO (10 $\mu\text{mol/L}$) entraînent une augmentation significative de la sécrétion du VEGF. Cette sécrétion est 3 fois plus importante que dans les îlots contrôles après 3 jours de traitement (Contrôle: $1,80\pm 1,40$; DFO: $7,95\pm 0,84$ et infection: $11,26\pm 0,82$ pg/ μg de protéines totales; $p < 0,001$; $n=3$). Cette surexpression se maintient environ 14 jours pour l'infection adénovirale (287) alors qu'elle est plus transitoire (3 jours) en présence de DFO (10 $\mu\text{mol/L}$).

De même, l'expression des ARNm du VEGF (Fig. 3-14B) est également stimulée en présence de DFO et après infection 3 jours après culture ($1,10\pm 0,21$ avec la DFO ($p < 0,01$; $n=5$) et $1,12\pm 0,34$ avec 100 MOI ($p < 0,05$; $n=3$) contre $0,62\pm 0,11$ en contrôle).

3.1.2.4. Mesure de l'expression de la protéine HIF-1 α

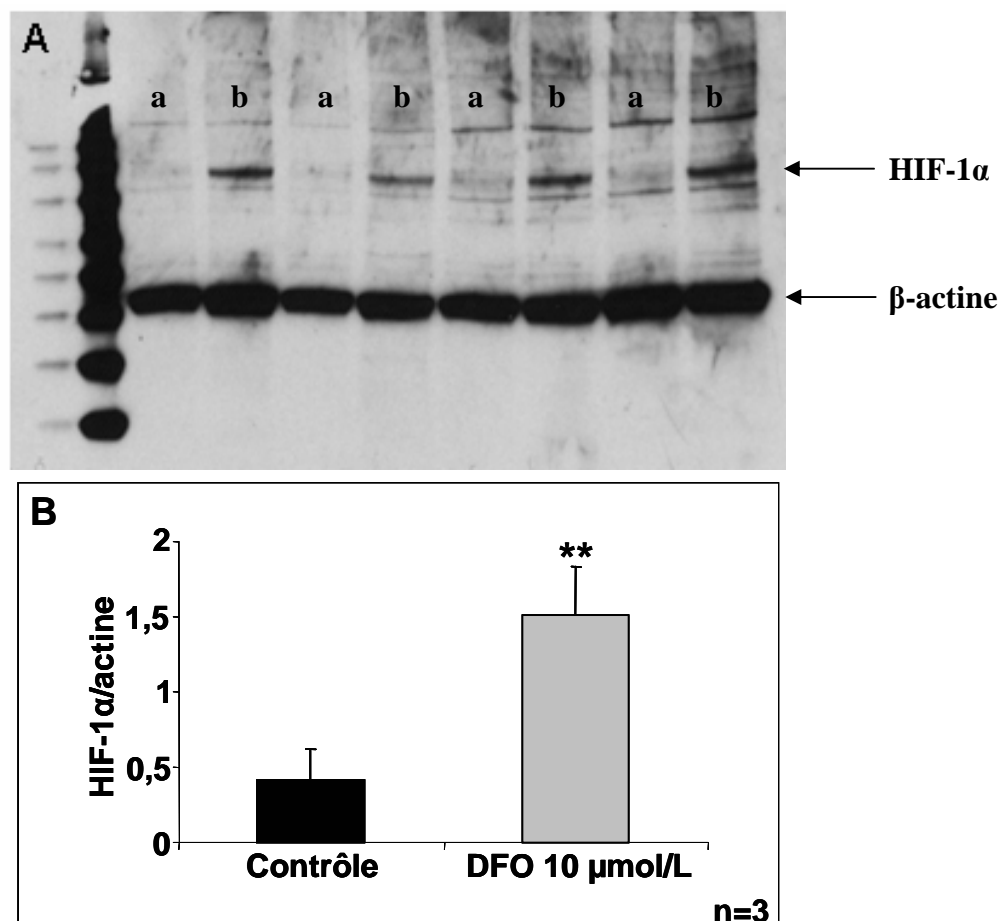


Figure 3-15: (A) Photographie du film du western blotting des protéines HIF-1 α et β -actine sur les îlots pancréatiques contrôles (a) et traités à la DFO (b) 3 jours après traitement et (B) histogramme représentant la mesure de l'expression de la protéine HIF-1 α par western blotting sans (barre noire) ou avec traitement DFO (barre grise) après 3 jours de culture. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écartype (** $p < 0,01$).

Pour vérifier l'origine de la surexpression du VEGF induite par la DFO, nous avons mesuré l'expression de la protéine HIF-1 α par western blotting (Fig. 3-15) sur des îlots contrôles et traités à la DFO après 1 et 3 jours de traitement. L'analyse de l'expression de la protéine HIF-1 α n'a pas permis de révéler de quantité détectable de cette protéine après 1 jour de traitement pour les îlots contrôles et les îlots traités à la DFO. Néanmoins, après 3 jours de traitement, une expression est quantifiable dans les deux situations avec une surexpression significative de cette protéine en présence de DFO ($0,42\pm 0,20$ contre $1,51\pm 0,31$; $p < 0,01$; $n=3$).

3.1.2.5. Analyse immunohistochimique des îlots pancréatiques

a) Marquage immunohistochimique de l'insuline dans les îlots pancréatiques

L'analyse des îlots pancréatiques a été réalisée après marquage immunohistochimique de l'insuline. Nous avons ainsi pu observer environ 20 îlots par condition (Fig. 3-16).

L'étude a révélé que le marquage à l'insuline est aussi intense dans les îlots contrôles et les îlots traités à la DFO après 1 jour de culture mais semble diminué dans les îlots infectés. Nous pouvons également observer que le marquage diminue après trois jours de culture dans les îlots contrôles et que l'on voit apparaître de petites zones de nécrose au sein de ces îlots. Des résultats similaires sont obtenus avec l'infection adénovirale mais avec une nécrose centrale très marquée attestant d'une destruction progressive de l'îlot montrant la toxicité de l'infection adénovirale. Le traitement à la DFO permet au contraire de préserver la structure de l'îlot sans nécrose centrale visible à ce stade et le marquage à l'insuline semble maintenu attestant de la bonne fonctionnalité de l'îlot. Cette étude confirme les données obtenues dans le chapitre précédent: le traitement des îlots pancréatiques à la DFO permet de préserver la viabilité et la fonctionnalité des îlots pancréatiques *in vitro*.

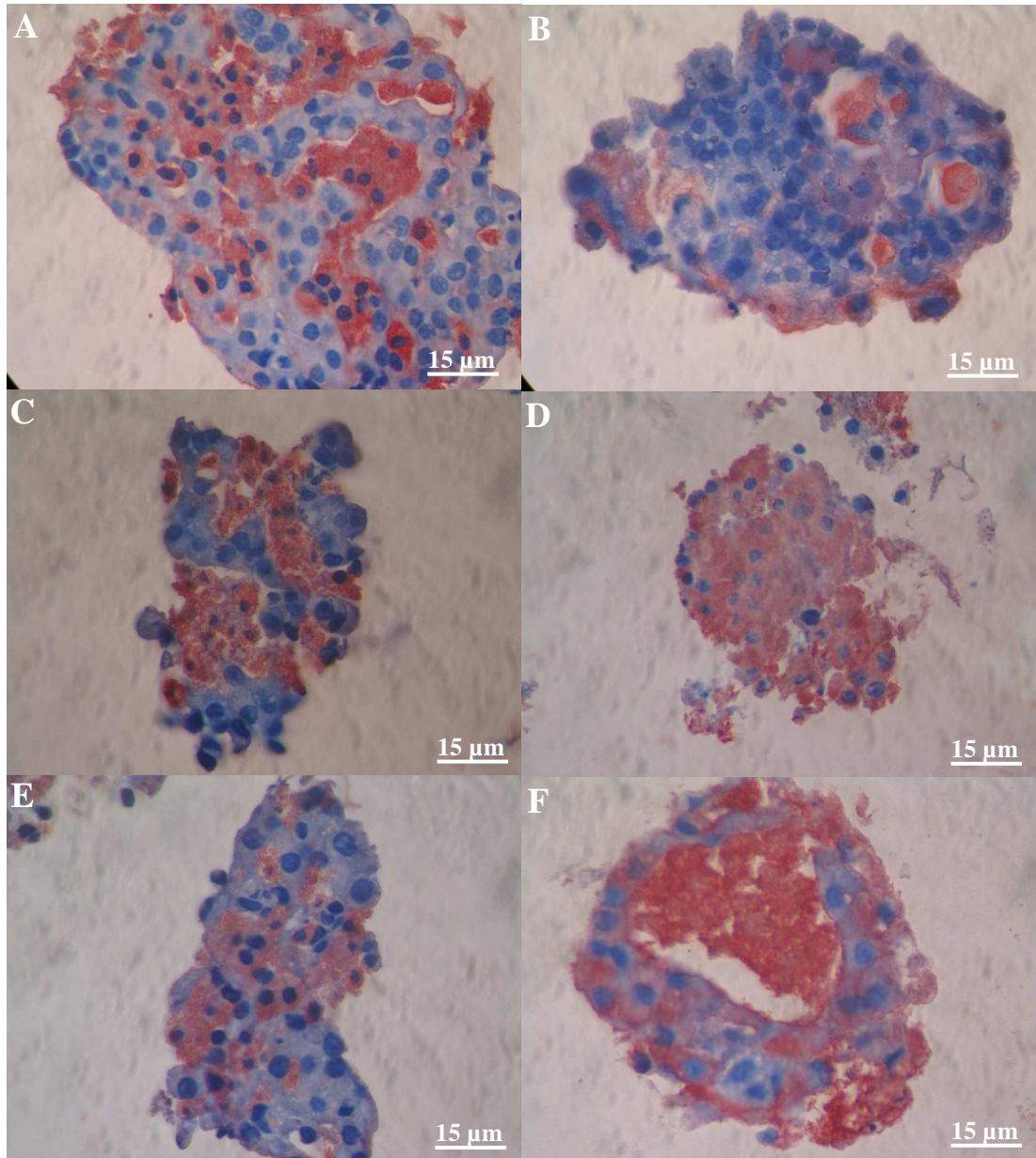


Figure 3-16: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 µm) d'îlots pancréatiques inclus dans la paraffine et marqués à l'insuline: (A, B) îlots pancréatiques contrôles; (C, D) traités à la DFO; (E, F) infectés après 1 jour (A, C, E) et 3 jours (B, D, F) de culture.

b) Marquage immunohistochimique du VEGF dans les îlots pancréatique

Dans cette étape, les îlots pancréatiques ont été marqués à l'aide de l'anticorps anti-VEGF afin de visualiser l'expression de ce facteur au sein de l'îlot (Fig. 3-17).

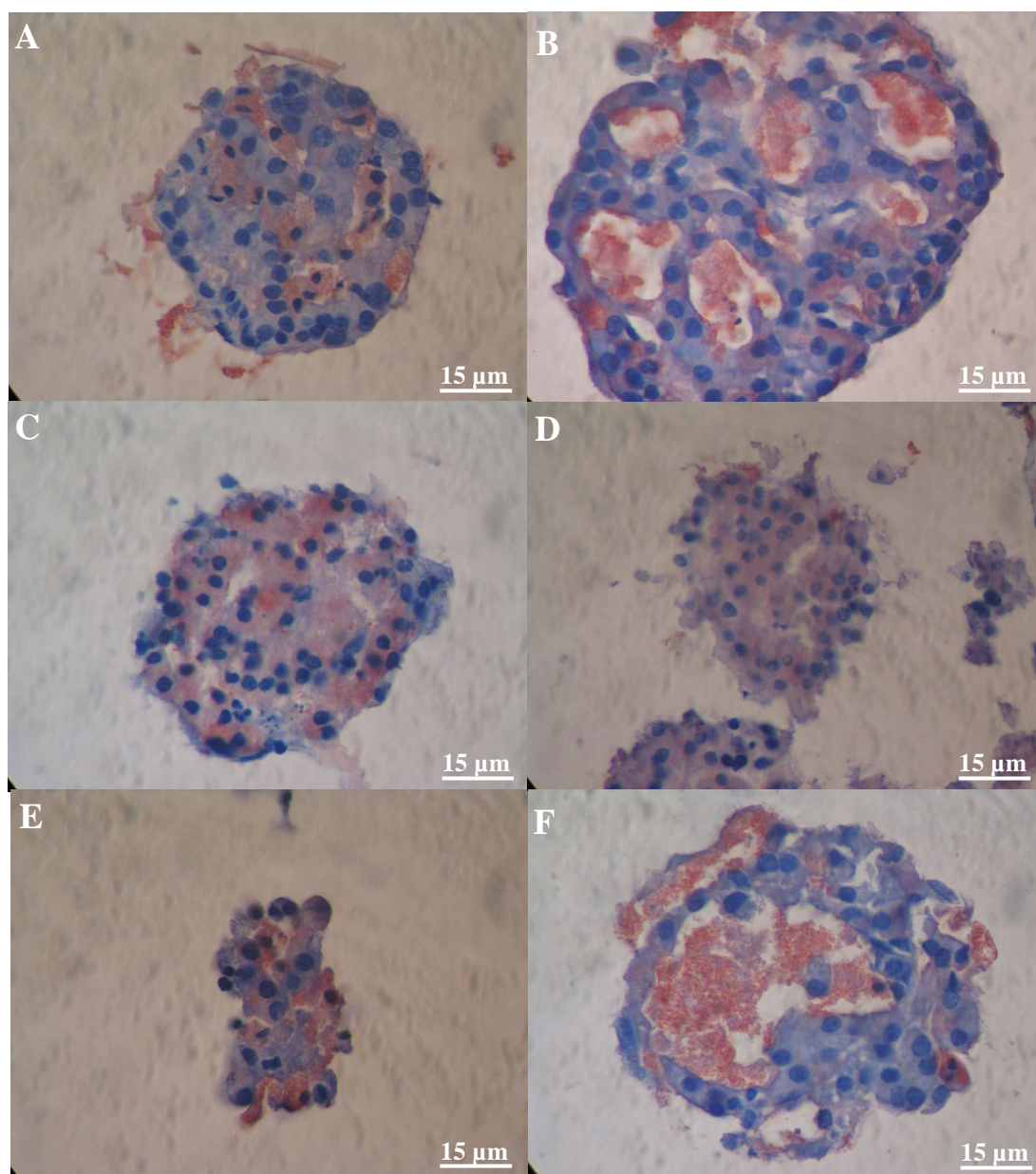


Figure 3-17: Photographies en microscopie à contraste de phase de coupes (5 µm) d'îlots pancréatiques inclus dans la paraffine et marqués au VEGF: (A, B) îlots pancréatiques contrôles; (C, D) traités à la DFO; (E, F) infectés après 1 jour (A, C, E) et 3 jours (B, D, F) de culture.

L'étude immunohistochimique du VEGF a montré une expression du VEGF dès le premier jour de l'expérimentation quelque soit le traitement. Cependant, le marquage semble plus intense et diffus pour les îlots traités à la DFO après 1 jour de traitement indiquant une surexpression du VEGF par rapport aux îlots contrôles et aux îlots infectés dès le premier jour de l'expérience. Après 3 jours de traitement, l'expression du VEGF est augmentée pour les îlots contrôles et les îlots infectés mais on observe toujours cette nécrose centrale majorée dans les îlots infectés. En revanche le traitement à la DFO ne semble pas stimuler cette expression après 3 jours de traitement car le marquage semble aussi intense qu'à 1 jour.

3.1.2.6. Discussion

Dans cette étape, nous avons voulu vérifier que les effets des deux approches pharmacologiques ou géniques évaluées précédemment sur une lignée de cellules β pouvaient être reproduites sur des îlots pancréatiques de Rat.

Le traitement des îlots à la DFO a ainsi pu montrer la non toxicité de cette molécule pour une concentration de 10 $\mu\text{mol/L}$ ce qui confirme que les résultats obtenus sur la lignée cellulaire étaient bien dus à un effet anti-prolifératif (251). Par contre, nous n'avons pas observé comme dans le cas des cellules β de surexpression de l'ARNm de l'insuline en présence de DFO mais une stimulation de la fonctionnalité des îlots pancréatiques après 1 jour de traitement attestant que cette molécule jouerait un rôle dans l'insulino-sécrétion. Ainsi, la chélation du fer par la DFO semble limiter l'inhibition de l'expression de l'insuline liée à la présence du fer comme cela a déjà été largement démontré (238, 239, 240, 243, 244). Cette stimulation de la fonctionnalité des îlots n'est cependant pas maintenue au cours du temps. Cet effet limité peut être attribué à la durée de vie de la molécule. Néanmoins, l'étude immunohistochimique des îlots pancréatiques nous apporte d'autres informations. D'une part, on observe une stimulation de l'expression de l'insuline après traitement à la DFO qui se maintient au cours du temps. D'autre part, une nécrose centrale est mise en évidence dans des îlots non traités après 3 jours de culture, nécrose qui n'est pas identifiée dans les îlots traités DFO. Ces données sont confortées par l'étude des facteurs pro et anti-apoptotique par RT-

PCR qui montre que l'absence de traitement oriente les cellules vers une voie pro-apoptotique. Ces résultats peuvent être expliqués par le pouvoir anti-oxydant de la DFO (258, 259). Il est en effet connu que les îlots pancréatiques *in vitro* souffrent d'hypoxie, à l'origine d'un stress oxydant. L'effet protecteur de la DFO semble ainsi jouer un rôle majeur et inattendu à ce stade de l'étude dans la lutte contre le stress oxydant. Cependant, notre objectif premier était d'utiliser cette molécule pour induire la surexpression du VEGF. Dans ce contexte, nous avons pu observer que la DFO induisait une surexpression de l'ARNm du VEGF et une stimulation de la sécrétion de ce facteur après 3 jours de traitement montrant que la DFO n'agirait pas seulement sur la libération du VEGF, comme démontré sur les cellules β , mais aussi sur son expression. Enfin, l'analyse de la protéine HIF-1 α montre que la DFO induit une expression de ce facteur indiquant bien que la surexpression du VEGF passe par la voie du HIF-1 α donc de l'hypoxie.

Concernant les îlots infectés, l'étude de la viabilité par le test du FDA/PI n'a pas permis de visualiser de perte de viabilité des îlots pancréatiques. L'analyse de la viabilité par la technique de FDA/PI, bien qu'utilisée couramment, ne permet pas de visualiser le centre des îlots. D'ailleurs, l'analyse histologique donne une toute autre information. Ainsi, nous avons pu révéler une forte nécrose centrale dans ces îlots après 3 jours de traitement attestant de la toxicité de l'infection adénovirale. Cette nécrose centrale s'accompagne d'une lyse cellulaire à l'origine d'une libération massive d'insuline que l'on retrouve dans ces cavités centrales. L'étude de la fonctionnalité des îlots infectés a, en outre, démontré que la fonctionnalité des îlots infectés est fortement diminuée confirmant la toxicité de l'approche. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'étude de l'expression des ARNm des facteurs pro- et anti-apoptotique (Bax et Bcl-2) qui a montré qu'après un jour de traitement, les îlots infectés sont déjà orientés vers la voie de la mort cellulaire. D'autres études indiquent d'ailleurs que l'infection adénovirale est toxique puisqu'une grande quantité de vecteur est nécessaire à un bon transfert du gène (294). L'infection adénovirale du gène du VEGF a permis d'induire une surexpression du VEGF au cours de l'expérience par rapport aux îlots contrôles confirmant la faisabilité et l'efficacité de ce système pour transférer le gène du

VEGF dans les îlots pancréatiques (291, 292). Enfin, l'étude de l'expression de l'ARNm du VEGF dans les îlots infectés a montré que l'adénovirus était à l'origine d'une surexpression de ce messenger 3 jours après traitement. Cependant, il faut rappeler que nous ne quantifions par RT-PCR que l'expression du VEGF de rat et non celle du transgène. Il semblerait donc que l'adénovirus a un effet sur l'expression génique propre de l'îlot au cours du temps. Néanmoins, cette surexpression pourrait être simplement liée à l'hypoxie induite lors de l'isolement et de la culture des îlots comme cela a été observé sur les îlots contrôles.

En conclusion, comme pour les cellules β RINm5F, cette étude nous a montré la faisabilité et l'efficacité de la thérapie génique et de l'approche pharmacologique par la DFO pour surexprimer le VEGF par les îlots pancréatiques. De plus, elle nous a permis de confirmer les effets bénéfiques de la DFO sur la fonctionnalité des îlots et son effet protecteur contre le stress oxydant par rapport à une infection adénovirale qui se révèle être toxique pour les îlots pancréatiques à court terme *in vitro*.

3.2. Etude *in vivo*

3.2.1. Mise au point du modèle de rat streptozotocine

Avant de pouvoir étudier l'influence de ces différents traitements *in vivo*, il nous a semblé nécessaire d'étudier précisément le modèle de rat diabétique induit par la streptozotocine.

L'état diabétique est caractérisé par un syndrome polyuro-polydipsique, un amaigrissement et une hyperglycémie à jeun.

En ce qui concerne les évolutions pondérales constatées en 14 jours sur les animaux de l'étude, chez les rats sains, l'augmentation moyenne de la masse est de 12,11% alors qu'elle est significativement inférieure de 6% chez les rats diabétiques ($p < 0,001$; $n=9$) (Fig. 3-18).

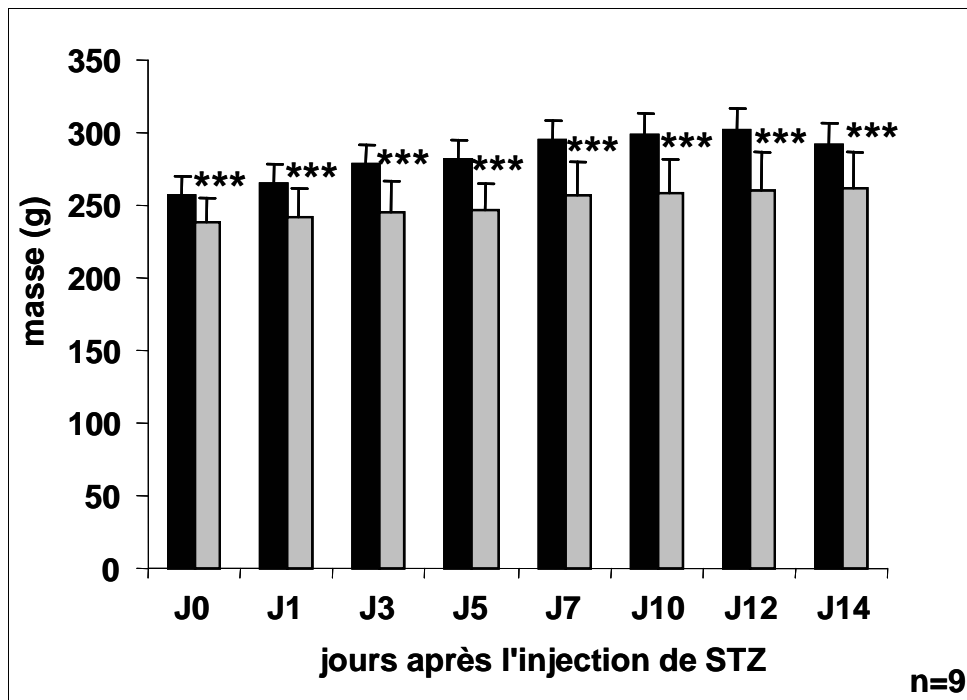


Figure 3-18: Histogramme présentant l'évolution pondérale jusqu'à 14 jours après l'injection de 65 mg/kg de streptozotocine (barre grise) ou pour les rats contrôles (barre noire). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écartype (***) $p < 0,001$.

La glycémie des animaux sains reste dans les normes physiologiques: à J0, la glycémie est de $1,08 \pm 0,078$ g/L et à J14 de $1,05 \pm 0,13$ g/L ($n=9$; Fig. 3-19).

L'injection de streptozotocine à la dose administrée induit un état diabétique un jour après injection. En effet, la glycémie à jeun est de $4,03 \pm 0,56$ g/L ($n=9$). L'hyperglycémie atteinte perdure dans le temps. Statistiquement, les différences de glycémie entre les animaux sains et les animaux diabétiques sont significatives ($p < 0,001$) (Fig. 3-19).

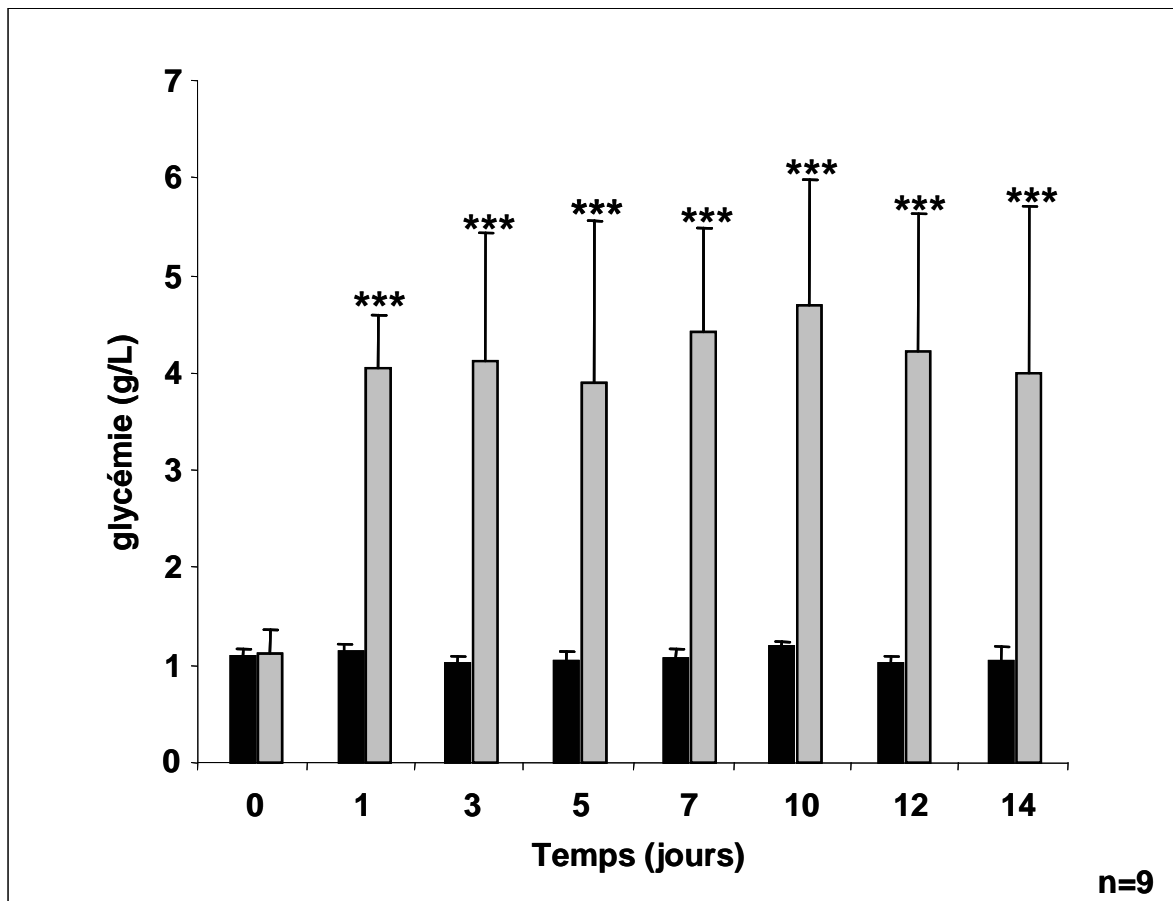


Figure 3-19: Histogramme présentant l'évolution de la glycémie après injection de streptozotocine à 65 mg/kg (barre grise) ou sans injection (barre noire). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écartype (***) $p < 0,001$.

L'insulinémie des rats sains est stable à $0,9 \pm 0,07 \mu\text{g/L}$ ($n=16$). La mesure de l'insulinémie des rats diabétiques montre une chute de 15,5% en trois jours (de $0,83 \pm 0,15 \mu\text{g/L}$ à J0 à $0,13 \pm 0,18 \mu\text{g/L}$ à J3, $n=7$) par rapport aux rats témoins. Après ces trois jours, l'insulinémie reste stable à $0,1 \mu\text{g/L}$ de sécrétion résiduelle. Les deux courbes évoluent de façon significativement différente ($p < 0,001$) (Fig. 3-20).

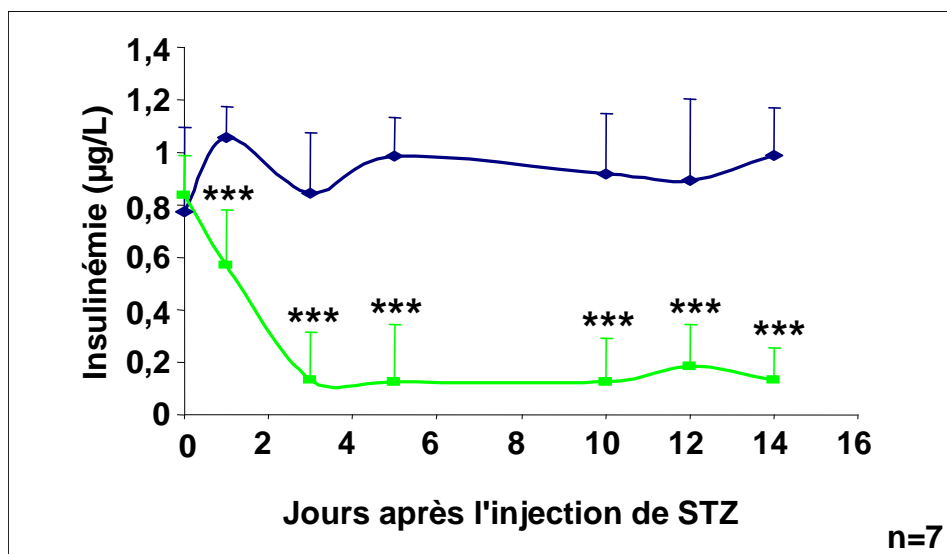


Figure 3-20: Graphique représentant l'évolution de l'insulinémie lors de l'induction du diabète par la streptozotocine (courbe verte) ou chez les animaux sains (courbe bleue). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écartype (***) $p < 0,001$).

3.2.2. Etude immunohistologique

3.2.2.1. Transplantation d'îlots infectés ou traités à la DFO chez le rat sain

L'étude immunohistochimique réalisée sur les rats sains a permis de mettre en évidence la revascularisation des îlots pancréatiques après transplantation, quelque soit le traitement à l'aide d'un marquage à la lectine (Fig. 3-21A). Cependant, nous n'avons pas observé de marquage du VEGF (Fig. 3-21B) ni de l'insuline (Fig. 3-21C) ce qui suggérerait que la transplantation d'îlots pancréatiques chez un rat non diabétique ne serait pas un environnement favorable à l'implantation des îlots dans le foie et à l'expression de l'insuline par ces îlots transplantés.

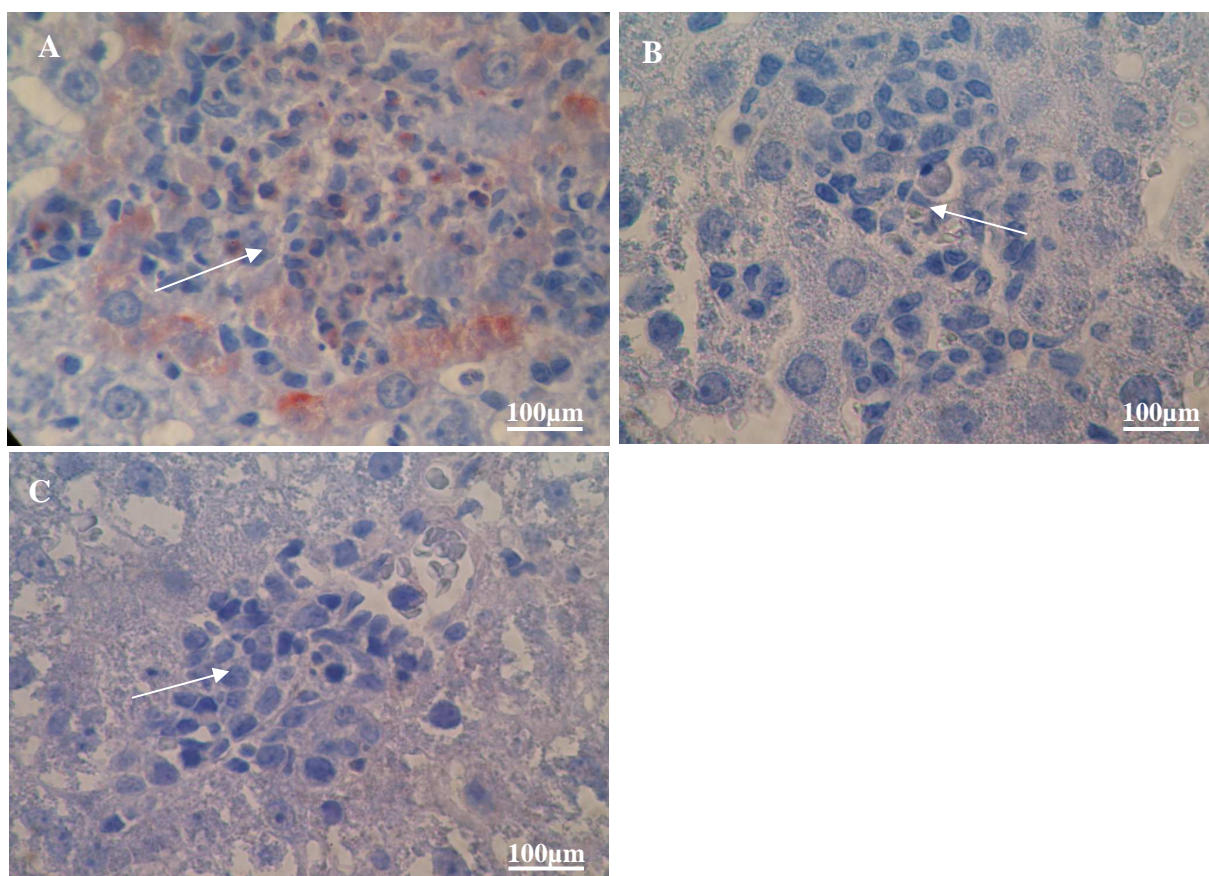


Figure 3-21: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupe de foie de rats sains 3 jours après transplantation d'îlots pancréatiques après marquage immunohistochimique de la lectine (A), du VEGF (B) et de l'insuline (C). La flèche montre l'îlot pancréatique.

3.2.2.2. *Transplantation d'îlots pancréatiques dans un modèle hyperglycémique*

Afin d'évaluer si l'environnement hyperglycémique est plus adapté à l'étude immunohistologique des îlots pancréatiques transplantés, une transplantation d'îlots non traités a été effectuée dans le lobe caudé. Trois jours après transplantation, le rat a été placé en hyperglycémie par gavage au glucose durant les trois heures qui précèdent le prélèvement du lobe transplanté. L'étude immunohistochimique par marquage à l'insuline a alors révélé qu'en condition hyperglycémique, l'insuline était révélée dans les îlots pancréatiques (Fig.3-22). Ainsi, ce test a confirmé que l'étude immunohistochimique devait être réalisée dans un environnement hyperglycémique (hyperglycémie chronique par gavage ou diabète). Toutes les études qui suivront seront donc réalisées chez le rat diabétique streptozotocine.

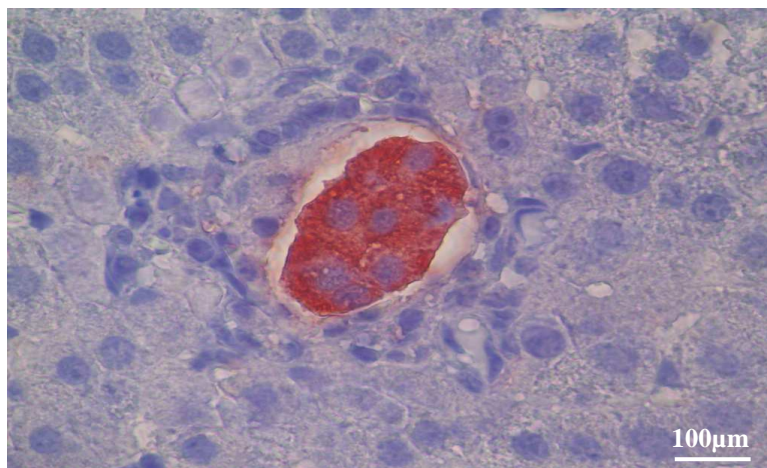


Figure 3-22: Photographie en microscopie à contraste de phase d'une coupe d'un lobe caudé du foie transplanté par des îlots pancréatiques après marquage immunohistochimique de l'insuline 3 jours après transplantation dans un modèle hyperglycémique.

3.2.2.3. *Transplantation d'îlots pancréatiques chez le Rat diabétique*

a) *Analyse du marquage immunohistochimique de l'insuline*

L'étude immunohistochimique a été réalisée 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 jours, 1 mois et 2 mois après transplantation. Pour des raisons de clarté, nous avons fait le choix de ne présenter que les photographies des temps les plus représentatifs mais les résultats sont résumés dans un tableau à la fin de chaque partie. Ainsi, l'étude immunohistochimique a révélé que le marquage à l'insuline était très intense après 1 jour de transplantation pour les îlots contrôles, diminuait après 21 jours de transplantation pour ne plus être détectable à 2 mois (Fig. 3-23 et tableau 1).

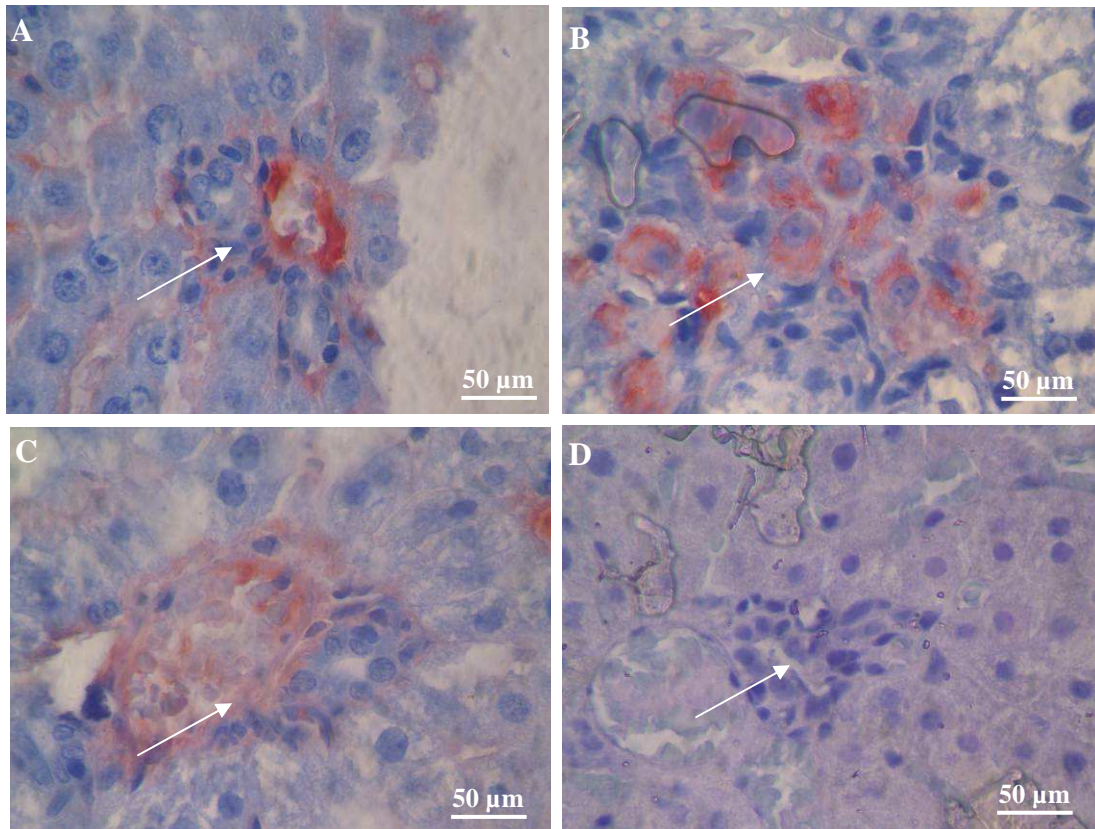


Figure 3-23: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5µm) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis non traités, après marquage immunohistochimique de l'insuline 1 jour (A), 10 jours (B), 1 mois (C) et 2 mois (D) après transplantation.

Pour les îlots traités à la DFO pendant 24 heures, la diminution de l'intensité du marquage de l'insuline est plus précoce que pour les îlots contrôles et est nettement visible 10 jours après transplantation (Fig. 3-24 et tableau 1). De manière surprenante, nous avons pu mettre en évidence un nouveau marquage après 2 mois de transplantation. Ce marquage intense, semble se localiser dans de grosses cavités et rappelant la nécrose centrale observée sur les îlots traités *in vitro*. Ces données suggèrent donc qu'à ce stade de l'étude il y aurait une lyse massive des cellules de l'îlot.

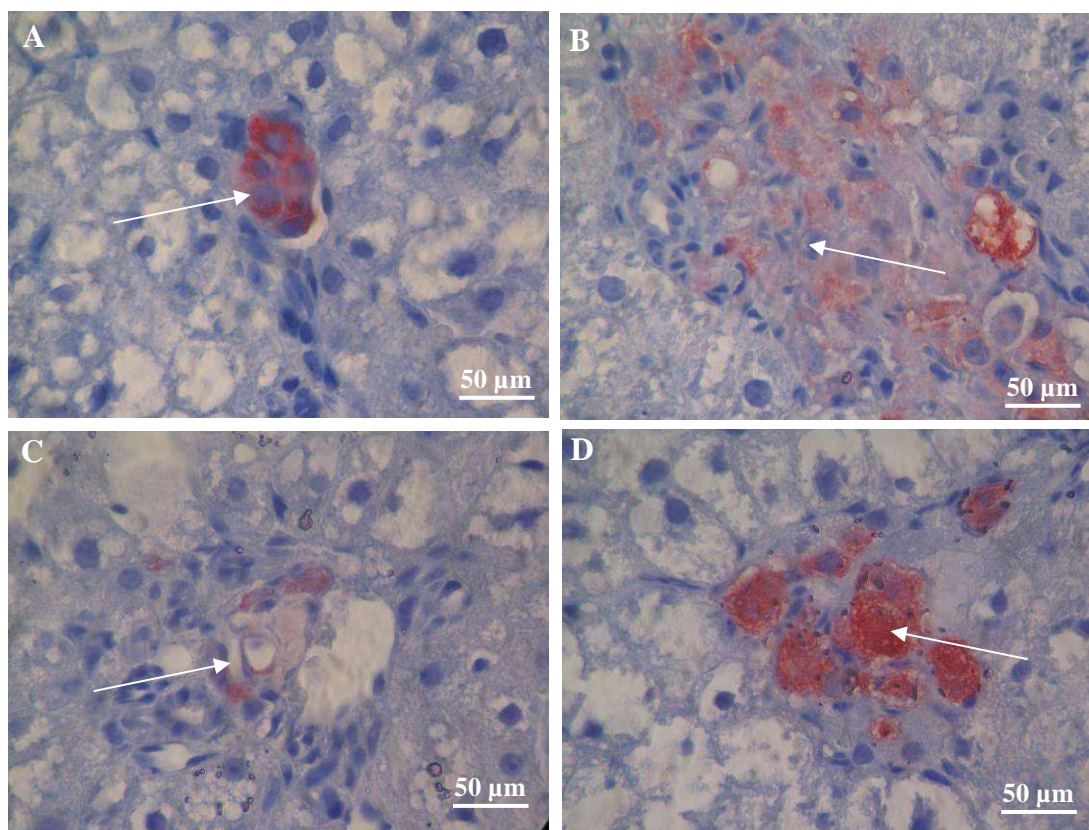


Figure 3-24: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis traités à la DFO pendant 24 heures, après marquage immunohistochimique de l'insuline 1 jour (A), 10 jours (B), 14 jours (C) et 2 mois (D) après transplantation.

L'étude immunohistochimique des îlots traités à la DFO pendant 3 jours et transplantés n'a pas permis de visualiser de marquage à l'insuline avant 7 jours d'implantation alors que ce marquage est visible immédiatement après transplantation dans les autres conditions testées (Fig.3-25 et tableau 1). Cependant, l'effet bénéfique du traitement à la DFO pendant 3 jours peut être évalué à long terme puisqu'un marquage à l'insuline des îlots pancréatiques est toujours détectable 2 mois après la transplantation. Il semblerait de plus que l'intensité du marquage reste identique tout au long de l'expérience attestant du maintien de la fonction des îlots pendant toute la durée de l'étude.

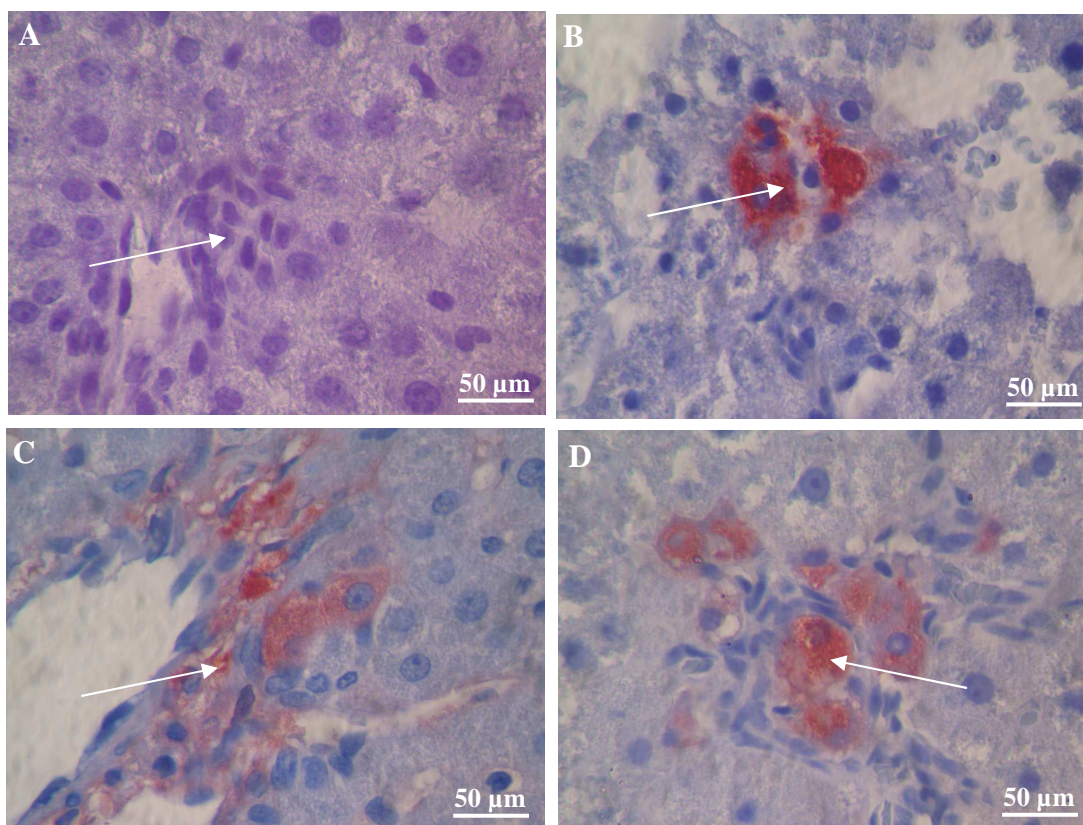


Figure 3-25: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5μm) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis traités à la DFO pendant 3 jours après marquage immunohistochimique de l'insuline 1 jour (A), 7 jours (B), 1 mois (C) et 2 mois (D) après transplantation.

Enfin, concernant les îlots infectés, bien que le marquage à l'insuline soit très intense 1 jour après transplantation, il diminue rapidement au cours de l'expérience mais reste détectable après 2 mois ce qui n'est pas le cas dans les conditions contrôles. (Fig. 3-26 et tableau 1). Cependant, comme dans le cas du traitement des îlots en présence de DFO pendant 24 heures, ce marquage semble être localisé dans des cavités présentes au sein de l'îlot pancréatique attestant d'une probable lyse cellulaire.

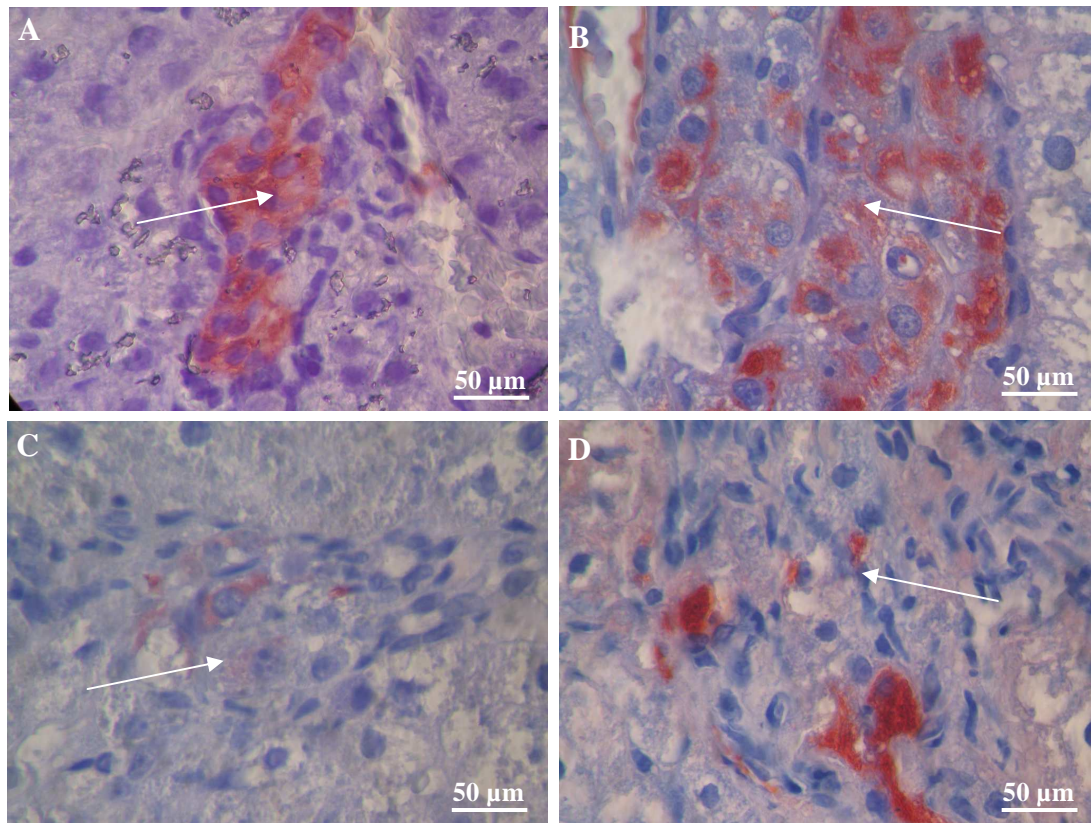


Figure 3-26: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5µm) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis infectés, après marquage immunohistochimique de l'insuline 1 jour (A), 10 jours (B), 1 mois (C) et 2 mois (D) après transplantation.

Insuline	1jour	3jours	5jours	7jours	10jours	14jours	21jours	1mois	2mois
C	+++	+++	+/-	+	+++	+++	+++	+	-
DFO24H	+++	+++	+++	++	++	+	+/-	+/-	++
DFO3J	-	-	-	+++	++	++	++	++	++
100MOI	+++	+++	+++	++	+++	++	++	+	+

Tableau 1: Récapitulatif des marquages immunohistochimiques de l'insuline dans les îlots pancréatiques implantés dans le lobe caudé des rats diabétiques (+++: marquage intense; ++: marquage; +: marquage moyen; +/-: faible marquage; -: absence de marquage).

b) *Analyse du marquage immunohistochimique du VEGF*

Cette étape de marquage nous a permis dans une deuxième partie, d'identifier les mécanismes à l'origine de la sécrétion au VEGF au cours de la revascularisation des îlots pancréatiques.

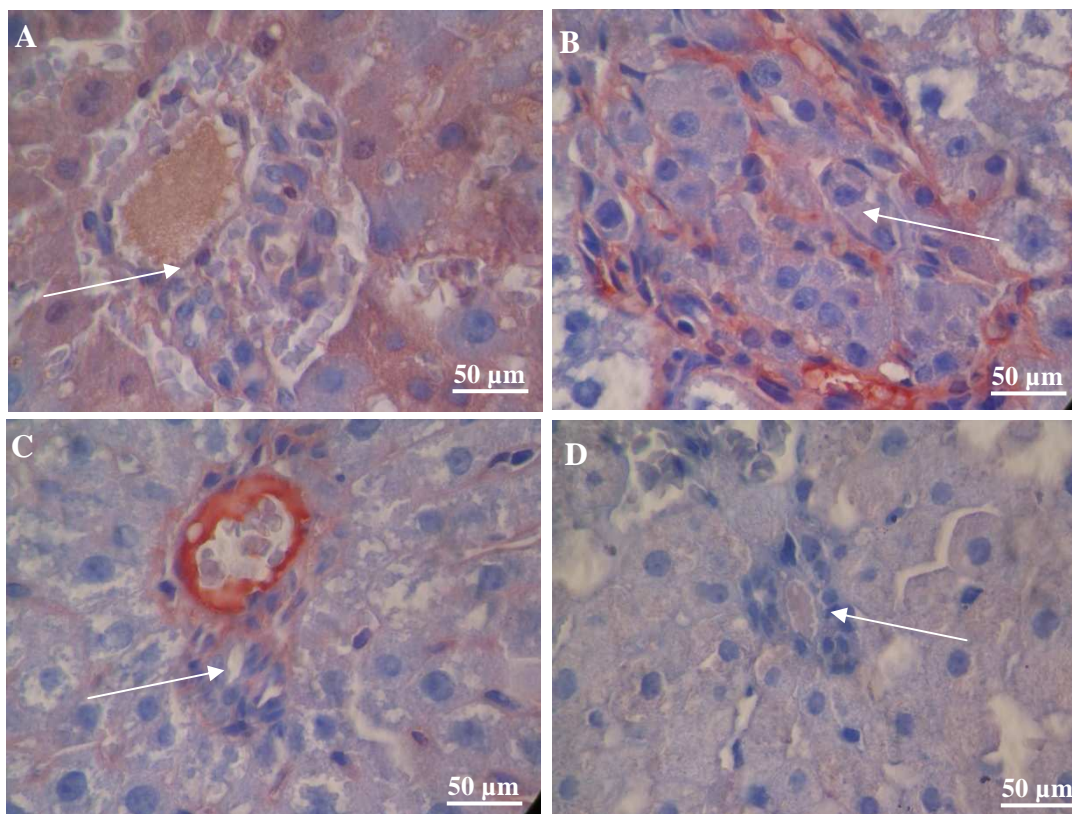


Figure 3-27: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5µm) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis non traités, après marquage immunohistochimique du VEGF 1 jour (A), 21 jours (B), 1 mois (C) et 2 mois (D) après transplantation.

L'étude immunohistochimique du VEGF a montré que dans les conditions contrôles il existait deux phases distinctes d'expression du VEGF : une première phase au tout début de la transplantation où le marquage est diffus et l'expression du VEGF semble provenir du tissu receveur et non de l'îlot pancréatique et une deuxième phase plus localisée à 21 jours où cette fois-ci un marquage intense du VEGF est localisé précisément dans l'îlot pancréatique (Fig. 3-27 et tableau 2). Par ailleurs, entre ces phases, le VEGF semble peu exprimé. Enfin, après 21 jours le marquage diminue progressive pour n'être plus visible deux mois après transplantation.

Concernant les îlots traités à la DFO pendant 24 heures, les résultats sont différents. En effet, nous observons après un jour de transplantation un marquage diffus dans l'îlot pancréatique et le tissu hépatique. Quatorze jours après implantation, le marquage n'est visible qu'au sein de l'îlot pancréatique mais demeure très diffus. Enfin, ce marquage diminue au cours du temps pour n'être plus visible 2 mois après implantation (Fig. 3-28 et tableau 2). Ces données comparées aux conditions contrôles suggèrent que l'îlot incubé avec de la DFO pendant 24 heures secrète du VEGF dans les premiers jours qui suivent l'implantation alors qu'aucune sécrétion de VEGF n'est visible à ces temps dans l'îlot pancréatique non traité. Cependant, cette sécrétion précoce ne semble pas modifier le profil d'expression à long terme de VEGF dans les îlots pancréatiques.

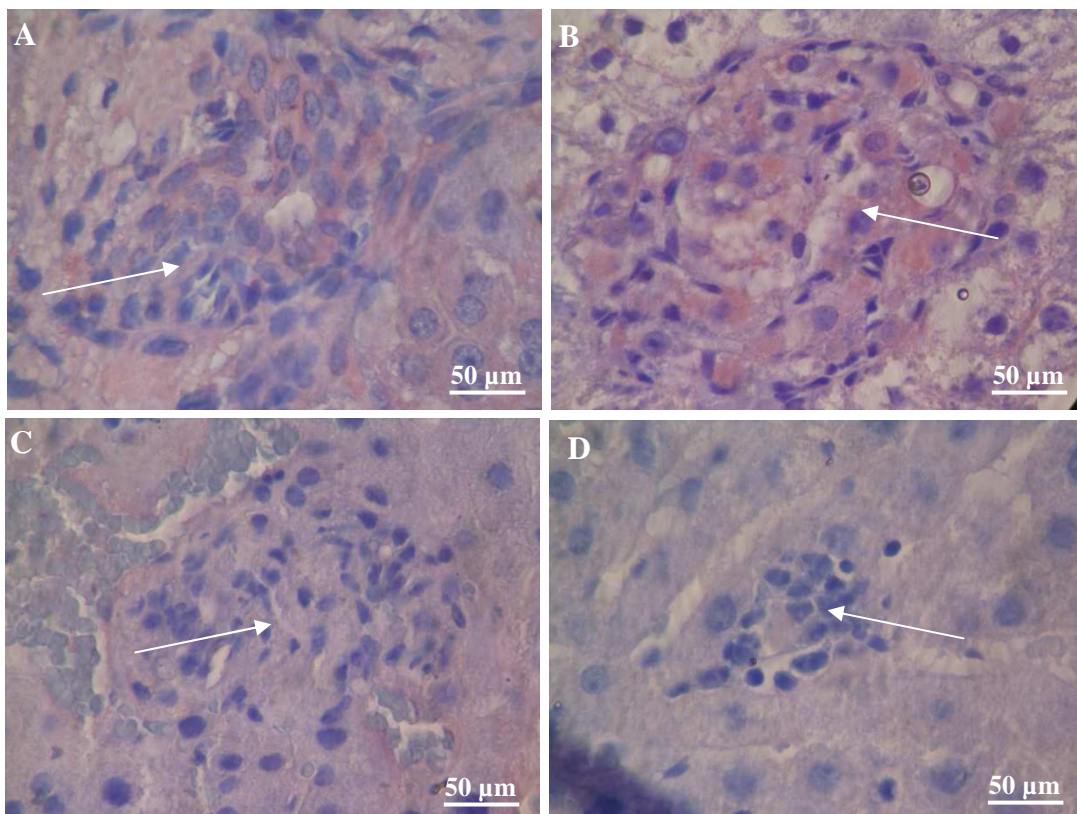


Figure 3-28: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5µm) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis traités à la DFO pendant 24 heures, après marquage immunohistochimique du VEGF 1 jour (A), 14 jours (B), 21 jours (C) et 1 mois (D) après transplantation.

Dans le cas des îlots traités à la DFO pendant 3 jours, on observe comme dans la situation contrôle deux phases d'expression du VEGF : une première précoce et transitoire où l'expression du

VEGF est diffuse et localisée dans le tissu du receveur et une deuxième phase plus tardive où l'expression du VEGF est localisée dans l'îlot pancréatique. A ce stade de l'étude, il n'est pas possible de déterminer si l'expression de VEGF est majorée par l'incubation dans la DFO. Par contre, on voit très nettement un effet à long terme de cette incubation puisque 2 mois après transplantation, on observe un maintien de l'expression du VEGF dans le tissu du receveur et l'îlot pancréatique. (Fig. 3-29 et tableau 2).

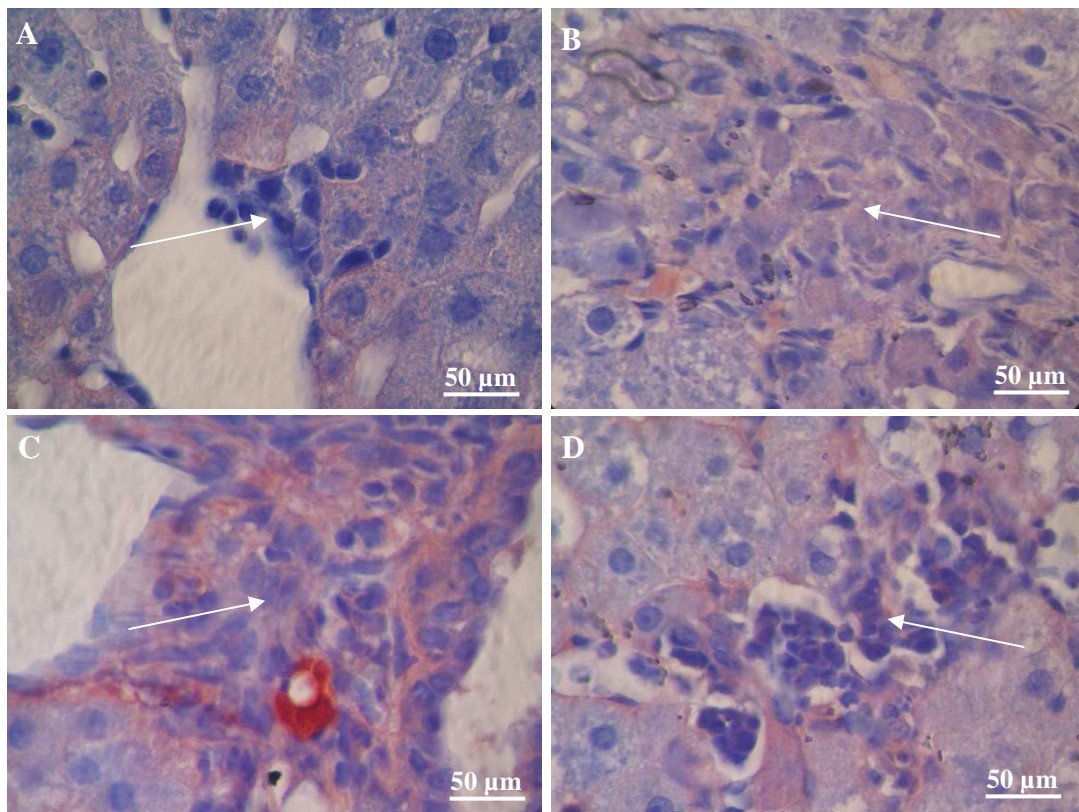


Figure 3-29: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5µm) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis traités à la DFO pendant 3 jours, après marquage immunohistochimique du VEGF 1 jour (A), 21 jours (B), 1 mois(C) et 2 mois (D) après transplantation.

Enfin, les résultats obtenus avec l'infection adénovirale montre une expression du VEGF au sein même de l'îlot pancréatique immédiatement après transplantation suggérant que la sécrétion de VEGF dans cette situation est due à l'infection adénovirale (Fig. 3-30 et tableau 2). En accord avec les données *in vitro* montrant que cette surexpression se maintient à long terme, on observe

effectivement pendant toute la durée de l'étude un maintien de cette expression de VEGF au sein de l'îlot. Il faut cependant attendre un mois pour observer un marquage du VEGF dans le tissu hépatique contrairement aux autres conditions testées suggérant que la réponse du tissu receveur à cette implantation est plus tardive. Cette expression du VEGF reste maintenue pendant toute la durée de l'étude.

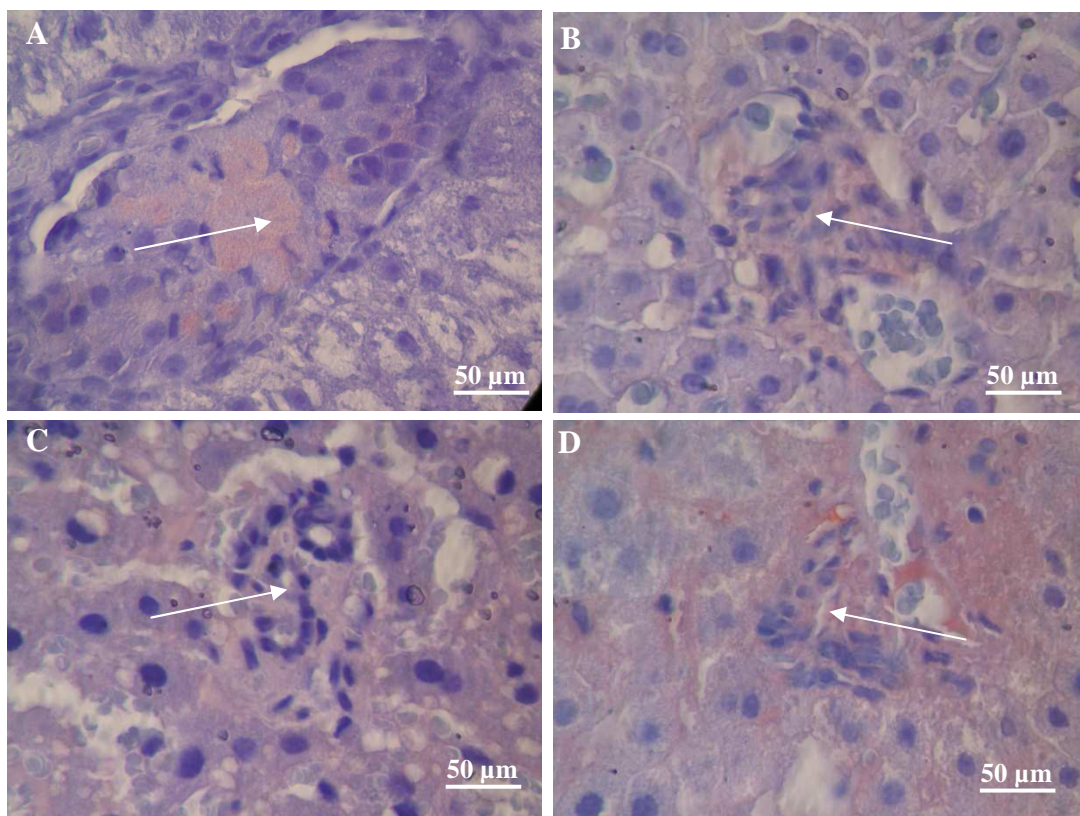


Figure 3-30: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5µm) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis infectés à l'aide de l'adenoVEGF, après marquage immunohistochimique du VEGF 1 jour (A), 21 jours (B), 1 mois (C) et 2 mois (D) après transplantation.

VEGF	1jour	3jours	5jours	7jours	10jours	14jours	21jours	1mois	2mois
C	++	+/-	-	-	+	+/-	+++	++	-
DFO24H	+	-	-	+/-	+/-	++	+	-	-
DFO3J	+	+	-	+/-	-	-	+	+++	++
100MOI	+	+	++	+	++	++	+	+	++

Tableau 2: Tableau récapitulatif des marquages immunohistochimiques du VEGF (+++ : marquage intense; ++ : marquage; + : marquage moyen; +/- : faible marquage; - : absence de marquage).

c) Etude de la revascularisation des îlots par marquage immunohistochimique à la lectine

L'étude de la revascularisation des îlots après transplantation par marquage immunohistochimique de la lectine est résumée dans le tableau 3. Nous avons ainsi observé qu'un îlot implanté semble posséder sa propre vascularisation ce qui peut expliquer ce marquage intense 1 jour après implantation. La phase critique de revascularisation semble opérer dans les 10 premiers jours après implantation ce qui est identifié par le maintien et les variations du marquage pendant cette période. Après cette première phase, toute vascularisation « opérationnelle » reste nettement visualisable dans l'îlot lui-même mais on observe cependant une diminution progressive du marquage à la lectine qui peut être expliquée par la perte des îlots au cours du temps. (Fig. 3-31 et tableau 3).

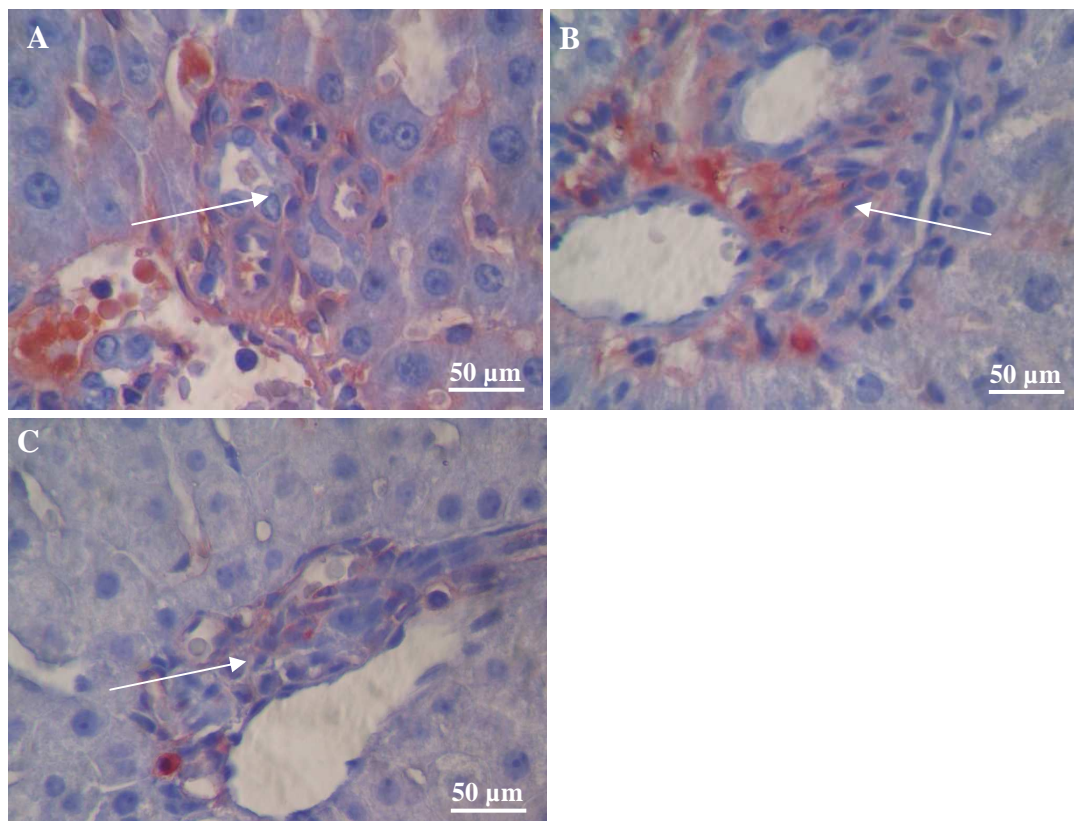


Figure 3-31: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis non traités, après marquage immunohistochimique de la lectine 1 jour (A), 10 jours (B), 2 mois (C) après transplantation.

Des résultats très comparables ont été obtenus avec les îlots traités à la DFO pendant 24 heures. En effet, on peut nettement visualiser les vaisseaux présents dans l'îlot pancréatique immédiatement après transplantation. Cependant, ce marquage semble beaucoup plus intense que pour la situation contrôle. Enfin, comme précédemment, on observe une diminution progressive du marquage qui n'est pratiquement plus détectable 2 mois après transplantation attestant une fois de plus de la perte probable des îlots transplantés (Fig. 3-32 et tableau 3).

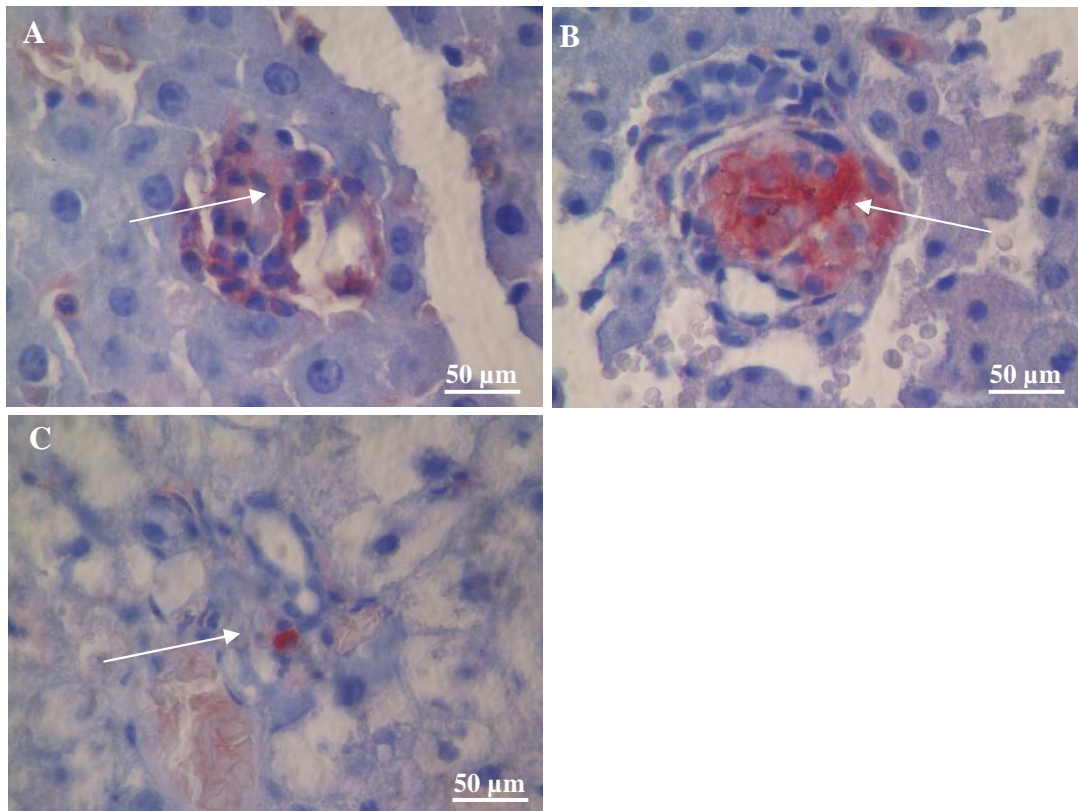


Figure 3-32: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5 μ m) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis incubés 24 heures en présence de DFO, après marquage immunohistochimique de la lectine 1 jour (A), 10 jours (B), 2 mois (C) après transplantation.

Les résultats obtenus avec les îlots traités trois jours en présence de DFO sont ici également différents. Ainsi, nous avons pu observer que le marquage à la lectine était intense et maintenu tout au long de l'étude attestant que la vascularisation des îlots transplantés est rapide et maintenue à long terme. Par conséquent, ces données suggèrent que les îlots implantés restent vivants et fonctionnels (Fig. 3-33 et tableau 3).

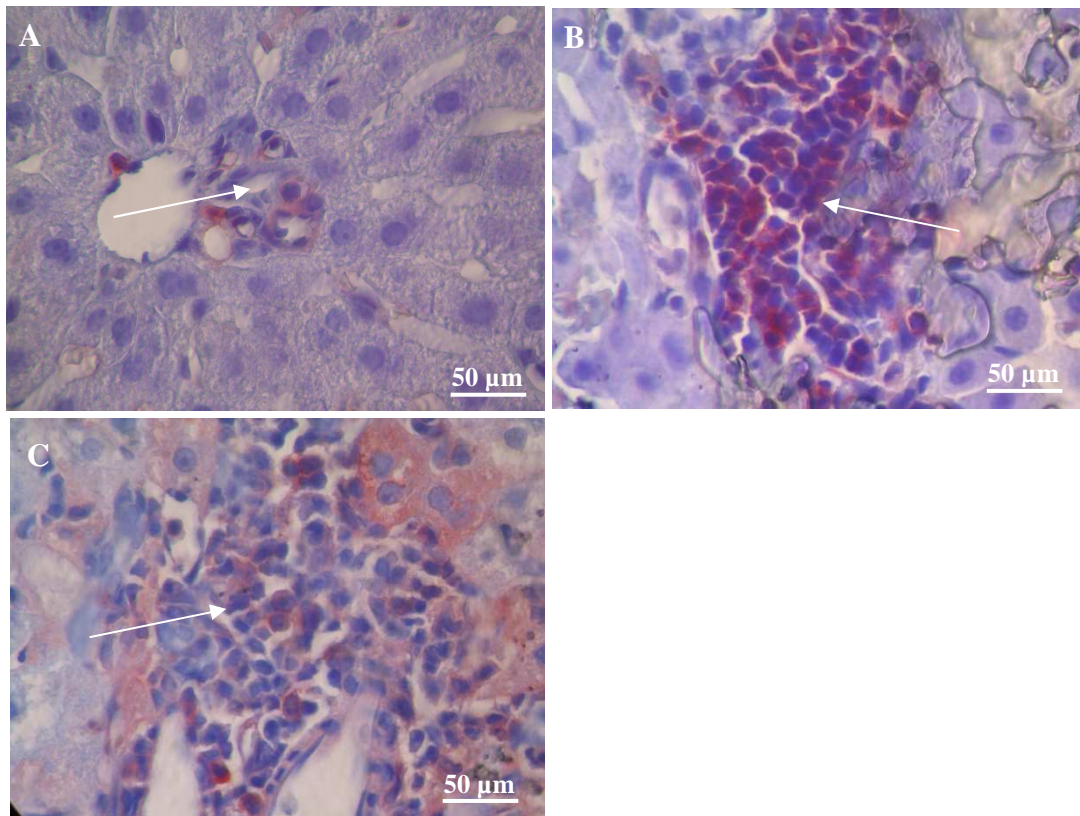


Figure 3-33: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5µm) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis incubés 3 jours en présence de DFO, après marquage immunohistochimique de la lectine 1 jour (A), 10 jours (B), 2 mois (C) après transplantation.

Enfin, l'analyse immunohistochimique des îlots infectés à l'aide de l'adénoVEGF et transplantés chez le rat diabétique, semble montrer des résultats comparables au pré-traitement des îlots pendant 3 jours à la DFO. Ces données suggèrent que ces deux traitements pourraient être bénéfique pour la revascularisation des îlots. Il faut cependant noter une différence majeure: le marquage est beaucoup plus intense avec la DFO indiquant probablement une meilleure vascularisation des îlots (Fig. 3-34 et tableau 3).

Il est important de noter que toute cette étude immunohistochimique a montré un marquage de la vascularisation uniquement dans l'îlot et non dans le tissu hépatique environnant.

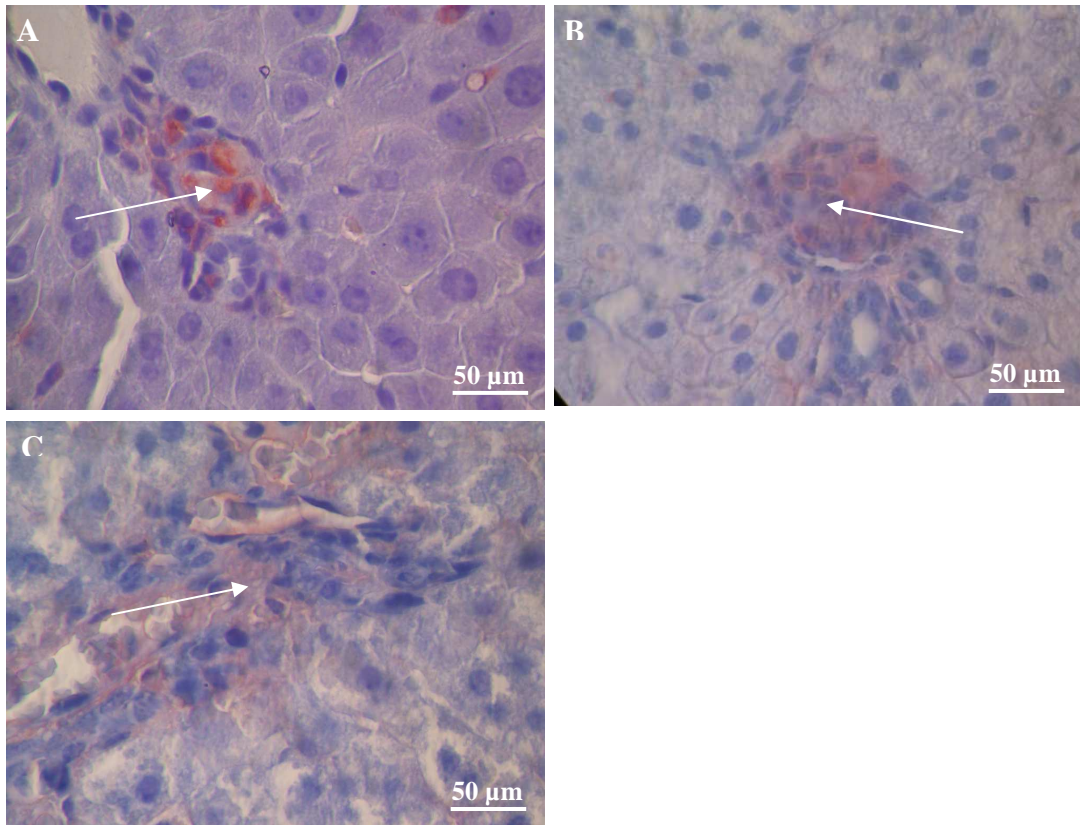


Figure 3-34: Photographie en microscopie à contraste de phase de coupes (5µm) d'un lobe caudé du foie de rat Lewis diabétique transplanté par des îlots pancréatiques de rat Lewis infectés à l'aide de l'adénoVEGF, après marquage immunohistochimique de la lectine 1 jour (A), 10 jours (B), 2 mois (C) après transplantation.

Lectine	1jour	3jours	5jours	7jours	10jours	14jours	21jours	1mois	2mois
C	+++	++	+	+/-	+++	++	+	+	+/-
DFO24H	++	-	+/-	+/-	+++	-	+	+/-	+/-
DFO3J	++	+	+	++	+++	+/-	++	++	++
100MOI	+++	+++	++	+	++	++	+	+	+

Tableau 3: Tableau récapitulatif des marquages à la lectine (+++ : marquage intense; ++ : marquage; + : marquage moyen; +/- : faible marquage; - : absence de marquage).

3.2.2.4. Discussion

Par une étude immunohistochimique, nous avons comparé *in vivo* les effets de la DFO et de l'infection adénovirale du gène du VEGF sur l'implantation, la fonctionnalité et la revascularisation des îlots pancréatiques.

Il est important de noter que le processus de revascularisation des îlots pancréatiques après transplantation intra-hépatique est inconnu à ce jour et que l'étude histologique présentée dans ce travail apporte une nouvelle connaissance dans ces mécanismes. Le modèle utilisant les îlots pancréatiques contrôles, c'est-à-dire n'ayant subi aucun traitement, a ainsi montré que la revascularisation des îlots *in vivo* semble suivre deux phases bien distinctes: une première phase précoce où le receveur, c'est-à-dire le tissu hépatique, envoie un signal à l'îlot pancréatique par la sécrétion de VEGF et une seconde phase plus tardive après 21 jours où l'îlot sécrète à son tour du VEGF. Ces deux phases sont également identifiées par le marquage de la lectine indiquant que les 21 premiers jours après implantation semblent être critiques pour la mise en place de la vascularisation des îlots pancréatiques après transplantation. En effet, de nombreuses études ont déjà montré que les 14 à 21 premiers jours sont critiques dans ces mécanismes de revascularisation (174-177). Cependant, le rôle du donneur et du receveur dans ces réactions a longtemps été discuté (223, 303, 304) et notre étude suggère que la vascularisation ne vient pas uniquement du donneur ou du receveur mais que ce sont des échanges organisés entre ces deux milieux qui sont à l'origine de cette revascularisation de l'îlot pancréatique après implantation. Notre modèle d'étude a cependant montré les limites de ce système puisque les mécanismes de revascularisation semblent insuffisants pour permettre un maintien à long terme de l'îlot dans l'environnement hépatique.

La stimulation de la revascularisation par l'approche pharmacologique a montré qu'il était possible de bouleverser cette chronologie mais uniquement dans le cas d'une pré-incubation des îlots pancréatiques pendant 3 jours en présence de DFO. En effet, les études *in vitro* et *in vivo* réalisées ont montré qu'une pré-incubation des îlots pendant 24 heures en présence de DFO n'est pas suffisante pour stimuler la revascularisation des îlots mais semble de plus être délétère pour leur

survie. Par contre, une incubation de 3 jours permet de stimuler ces mécanismes de revascularisation et de maintenir à long terme la survie des îlots transplantés. Etant donné que l'expression de VEGF par les îlots incubés trois jours en présence de DFO n'est que transitoire, il est difficile d'attribuer ces résultats à cette seule surexpression du VEGF. Le rôle anti-oxydant de cette molécule (259, 261) ainsi que la chélation du fer pourrait expliquer cet effet mais les mécanismes cellulaires responsables de ces réactions doivent être élucidés. Il est cependant important de ne pas oublier que le VEGF est un facteur de croissance qui agit comme un facteur de survie protégeant les cellules de l'apoptose et particulièrement lors d'un stress hypoxique, ce qui est le cas lors de la transplantation (305). Par conséquent, la DFO est une molécule qui permet d'améliorer la viabilité des îlots pancréatiques après transplantation seulement si ces derniers ont été pré-incubés pendant 3 jours, correspondant au temps nécessaire à une surexpression du VEGF en culture.

L'étude réalisée sur les îlots infectés avec l'adénoVEGF montre que le marquage à l'insuline est identique aux conditions contrôles indiquant que la thérapie génique n'améliore pas la viabilité des îlots au cours de la transplantation. Cependant, il a été mis en évidence une stimulation de la sécrétion de VEGF par ces mêmes îlots et que cette surexpression se maintient durant toute la durée de l'étude indiquant que l'infection adénovirale permet un maintien à long terme de la sécrétion du VEGF comme montré précédemment dans les analyses *in vitro* (291, 292, 293). Cette expression est continue et ne présente pas de fluctuation comme dans la situation contrôle ou lors de la préincubation de 3 jours avec la DFO. D'ailleurs, la diminution du marquage à la lectine au cours de l'étude suggère que bien que le VEGF permette la mise en place initiale d'une vascularisation, celle-ci n'est ni physiologique, ni fonctionnelle et se détériore au cours de l'étude.

En conclusion, une pré-incubation des îlots pendant 3 jours en présence de DFO, stimule la revascularisation et améliore la viabilité des îlots pancréatiques par rapport à des îlots non traités. En revanche, une infection adénovirale ne permet pas de maintenir viables les îlots après transplantation malgré sa capacité à stimuler la revascularisation des îlots dans les premiers jours

après greffe, ce qui semble confirmer son effet toxique préalablement mis en avant lors de l'étude *in vitro*.

3.2.3. Etude métabolique

3.2.3.1. Evaluation du gain de masse corporelle

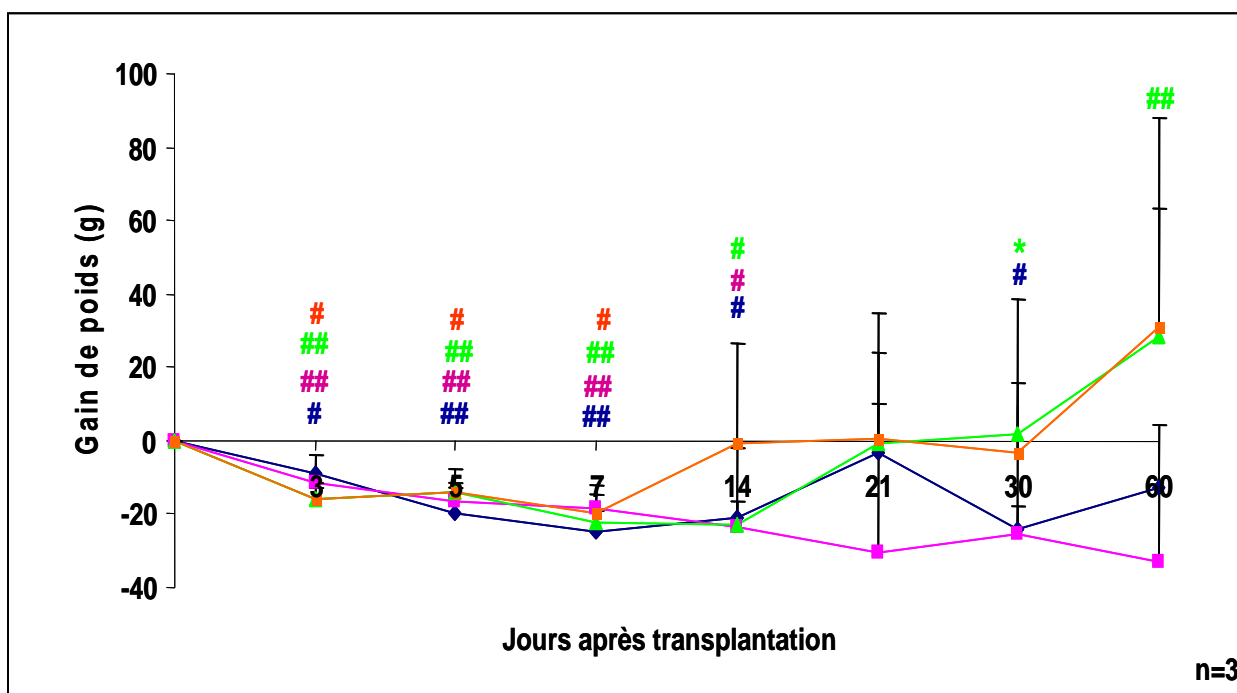


Figure 3-35: Graphique présentant l'évolution du gain de masse corporelle au cours du temps après transplantation d'îlots non traités (courbe bleue), traités avec de la DFO pendant 24 heures (courbe rose), traités avec de la DFO pendant 3 jours (courbe verte) ou infectés (courbe orange). Les résultats sont exprimés en moyenne ± écartype (## p < 0,01; *, # p < 0,05).

L'estimation du gain de masse a été réalisée par la différence entre les masses des animaux mesurées pré et post-opératoire sur 2 mois après transplantation (Fig. 3-35).

L'étude du gain de masse des animaux diabétiques a montré une diminution significative de cette masse jusqu'à 14 jours après transplantation pour les rats transplantés avec des îlots contrôles et avec des îlots traités à la DFO pendant 1 (groupe DFO1) et 3 jours (groupe DFO3) (**3 jours:** contrôle: $-8,75 \pm 5,00$, p < 0,05, n=3; DFO1: $-11,65 \pm 5,02$, p < 0,01, n=4; DFO3: $-16,17 \pm 4,89$, p < 0,01, n=6; **14 jours:** contrôle: $-20,77 \pm 19,09$, p < 0,05, n=3; DFO1: $-23,33 \pm 5,86$, p < 0,05, n=3; DFO3: $-23,00 \pm 6,52$, p < 0,05, n=3). On observe dans le cas des rats transplantés avec des îlots

infectés avec l'adénoVEGF (groupe ADENO) une diminution significative de leur masse mais cette diminution n'est maintenue que jusqu'à 7 jours contrairement aux autres conditions expérimentales (**3 jours:** $-16,00 \pm 3,46$, $p < 0,05$, $n=3$; **7 jours:** $-20,00 \pm 5,57$, $p < 0,05$, $n=3$). Les masses corporelles des rats contrôles et des rats DFO1 évoluent de façon identique durant l'expérimentation. De plus, malgré la non significativité des résultats, il semblerait que l'évolution de leur masse se maintienne à un niveau inférieur à celui mesuré avant transplantation (contrôle: $-12,70 \pm 17,03$; DFO1: $-33,00 \pm 22,63$; $n=3$). Au contraire, un gain de masse significatif est observé pour les rats DFO3 après 2 mois de transplantation par rapport à leur masse pré-opératoire ($28,50 \pm 34,45$, $p < 0,01$, $n=4$). Par ailleurs, ce gain est significativement plus important 1 mois après transplantation par rapport aux rats contrôles ($1,50 \pm 14,37$, $n=4$ vs $-24,37 \pm 6,37$, $n=3$, $p < 0,05$) et semble se confirmer à 2 mois (contrôle: $-12,70 \pm 17,03$, $n=3$; DFO3: $28,50 \pm 34,45$, $n=4$). Concernant les rats ADENO, un retour à la masse corporelle initiale est observé à partir du 14^{ème} jour post-transplantation et est maintenu jusqu'à 1 mois (**14 jours:** $-0,50 \pm 27,01$; **1 mois:** $-3,33 \pm 42,19$; $n=3$). De plus, on observe une augmentation de la masse des rats ADENO après 2 mois ($30,67 \pm 57,33$; $n=3$). Enfin, il semblerait que le gain de masse observé à partir du 14^{ème} jour de transplantation soit supérieur à celui obtenu pour les rats contrôles (**14 jours:** contrôle: $-20,77 \pm 19,09$; ADENO: $-0,5 \pm 27,01$; $n=3$; **2 mois:** contrôle: $-12,70 \pm 17,03$; ADENO: $30,67 \pm 57,33$; $n=3$).

3.2.3.2. *Evaluation de la glycémie*

La glycémie à jeun mesurée sur les rats Lewis non diabétiques (groupe S+) est de $0,74 \pm 0,05$ g de glucose par litre de sang (g/L) ($n=12$) tandis que celle obtenue sur les rats Lewis diabétiques (groupe S-) s'élève à $4,49 \pm 0,19$ g/L ($n=6$).

Quelque soit le traitement, un retour à la normoglycémie a été observé à jeun chez les rats transplantés avec 1000 îlots pancréatiques (**3 jours:** contrôle: $0,77 \pm 0,41$ g/L, $p < 0,001$, $n=4$, DFO1: $0,94 \pm 0,33$ g/L, $p < 0,001$, $n=4$; DFO3: $0,75 \pm 0,18$ g/L, $p < 0,001$, $n=4$; ADENO: $1,30 \pm 0,50$ g/L, $p < 0,05$, $n=3$, Fig. 3-36).

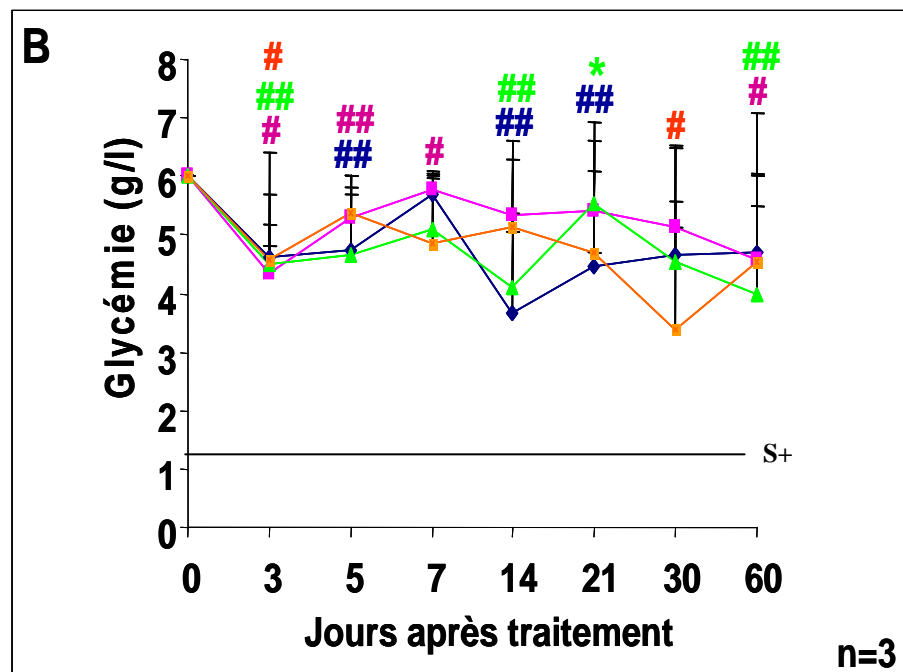
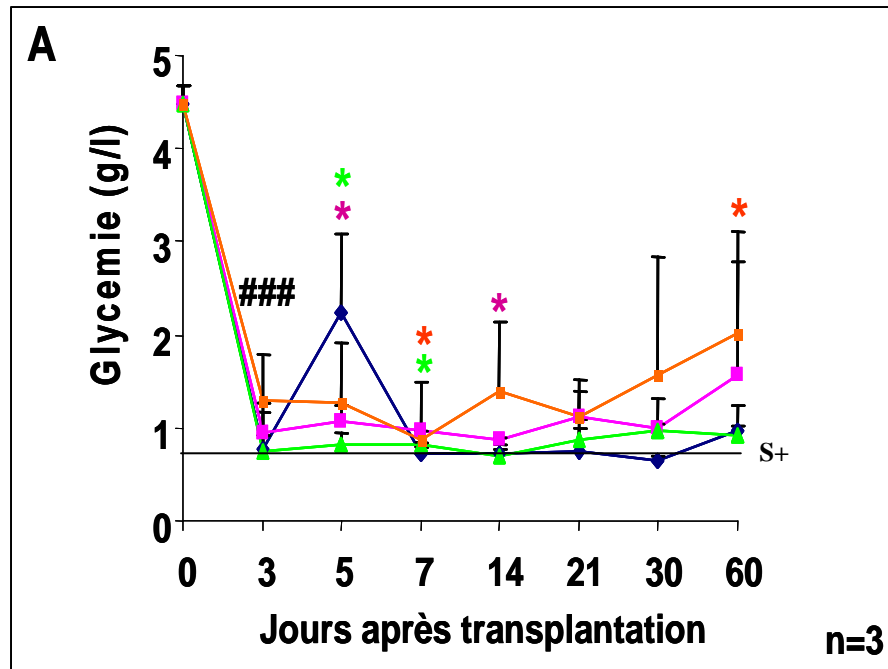


Figure 3-36: Graphique présentant l'évolution de la glycémie des rats diabétiques à jeun (A) et en postprandiale (B) au cours du temps après transplantation d'îlots non traités (courbe bleue), traités avec de la DFO pendant 24 heures (courbe rose), traités avec de la DFO pendant 3 jours (courbe verte) ou infectés (courbe orange). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype (### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$; *, # $p < 0,05$).

Cinq jours après transplantation, une augmentation de la glycémie à jeun est observée chez les rats contrôles, glycémie qui reste néanmoins inférieure à celle mesurée avant transplantation ($2,25 \pm 0,83$ g/L, $p < 0,001$, $n=4$). De façon surprenante, nous avons observé une deuxième chute de la glycémie avec retour à la normoglycémie à 10 jours, normoglycémie qui s'est maintenue pendant

toute la durée de l'expérience (**7 jours**: $0,72 \pm 0,07$ g/L, $p < 0,01$, $n=5$; **2 mois**: $0,98 \pm 0,27$ g/L, $p < 0,001$, $n=4$). Par conséquent, la glycémie des rats DFO1 et DFO3 est significativement inférieure à celle des rats contrôles 5 jours après transplantation (DFO1: $1,07 \pm 0,17$ g/L; DFO3: $0,83 \pm 0,11$ g/L, $p < 0,05$, $n=4$) et reste à un niveau comparable aux rats S+ tout au long de l'étude uniquement pour les rats DFO3 (**2 mois**: DFO3: $0,93 \pm 0,08$ g/L, $p < 0,001$, $n=3$). En effet la glycémie des rats DFO1 augmente 2 mois après transplantation et semble supérieure aux conditions contrôles ($1,57 \pm 1,55$ g/L, $n=3$ vs $0,98 \pm 0,27$ g/L, $n=4$). Enfin, les rats ADENO maintiennent une normoglycémie seulement durant 21 jours contrairement aux autres conditions expérimentales ($1,12 \pm 0,39$ g/L, $p < 0,001$, $n=3$). Leur glycémie semble en effet s'accroître après un mois ($1,58 \pm 1,25$ g/L, $n=3$) pour être significativement augmentée 2 mois après transplantation par rapport aux contrôles ($2,00 \pm 0,79$ g/L, $n=3$, vs $0,98 \pm 0,27$, $n=4$, $p < 0,05$) mais reste inférieure à celle mesurée avant transplantation attestant d'une fonctionnalité résiduelle de la greffe.

La glycémie post-prandiale mesurée sur les rats S+ est de $1,12 \pm 0,10$ g/L ($n=12$) tandis que celle obtenue sur les rats Lewis diabétiques (groupe S-) est supérieure à 6 g/L ($n=6$).

Quelque soit le traitement notre modèle de transplantation de 1000 îlots pancréatiques ne permet pas, d'une part, d'induire une normoglycémie en post-prandiale chez les rats après transplantation et d'autre part, de distinguer des différences entre les conditions expérimentales.

3.2.3.3. *Evaluation de la sécrétion de peptide C*

La sécrétion de peptide C sanguin à jeun mesurée sur les rats S+ est de $1111,50 \pm 364,54$ pmol/L ($n=5$) tandis que celle obtenue sur les rats S- est de $122,42 \pm 26,96$ pmol/L ($n=6$).

Concernant les rats contrôles, DFO3 et ADENO, la sécrétion de peptide C sanguin à jeun était significativement supérieure à celle obtenue avant transplantation tout au long de l'expérience (**3 jours**: contrôles: $263,67 \pm 33,29$ pmol/L, $p < 0,001$, $n=3$; DFO3: $410,29 \pm 246,33$ pmol/L, $p < 0,01$, $n=6$; ADENO: $192,50 \pm 33,59$ pmol/L, $p < 0,05$, $n=3$; **2 mois**: contrôles: $323,44 \pm 89,24$ pmol/L, $p < 0,01$, $n=4$; DFO3: $506,06 \pm 250,13$ pmol/L, $p < 0,01$, $n=4$; ADENO: $397,27 \pm 31,82$ pmol/L, $p < 0,001$, $n=3$; Fig. 3-37). En revanche, pour les rats DFO1, une augmentation significative de la

sécrétion de peptide C n'est observée que 2 jours après transplantation ($195,17 \pm 62,56$ pmol/L, $p < 0,05$, $n=3$). De plus, les rats DFO1 et ADENO présentent une sécrétion de peptide C significativement inférieure à celle observée pour les rats contrôles 3 jours après transplantation (DFO1: $178,13 \pm 69,53$ pmol/L, $p < 0,05$, $n=4$; ADENO: $192,50 \pm 33,59$ pmol/L, $p < 0,001$, $n=3$ vs $263,67 \pm 33,29$ pmol/L, $n=3$), sécrétion qui semble rester inférieure aux contrôles jusqu'à 21 jours après transplantation (DFO1: $195,17 \pm 62,56$; ADENO: $210,00 \pm 19,45$ pmol/L vs $353,00 \pm 162,73$ pmol/L, $n=3$). Par contre, la transplantation d'îlots traités pendant 3 jours avec de la DFO permettrait d'induire une sécrétion de peptide C plus importante que celle obtenue lors d'une greffe d'îlots contrôles (**3 jours**: $410,29 \pm 246,33$ pmol/L, $n=6$ vs $263,67 \pm 33,29$ pmol/L, $n=3$; **2 mois**: $506,06 \pm 250,13$ pmol/L, $n=4$ vs $323,44 \pm 89,24$ pmol/L, $n=4$).

La sécrétion de peptide C sanguin en post-prandiale mesurée sur les rats S+ s'élevait à $1759,20 \pm 554,07$ pmol/L ($n=6$) tandis que celle obtenue sur les rats S- était de $96,40 \pm 24,62$ pmol/L ($n=6$).

Quelque soit la condition expérimentale, la sécrétion de peptide C en post-prandiale est significativement plus importante que celle obtenue avant transplantation (**3 jours**: contrôles: $428,75 \pm 33,64$ pmol/L, $p < 0,001$, $n=3$; DFO1: $204,67 \pm 76,67$ pmol/L, $p < 0,05$, $n=3$; DFO3: $797,42 \pm 646,34$ pmol/L, $p < 0,05$, $n=4$; ADENO: $238,13 \pm 20,33$ pmol/L, $p < 0,001$, $n=3$; **2 mois**: contrôles: $573,83 \pm 193,84$ pmol/L, $p < 0,001$, $n=3$; DFO1: $337,33 \pm 311,06$ pmol/L, $p < 0,05$, $n=3$; DFO3: $485,63 \pm 350,35$ pmol/L, $p < 0,05$, $n=4$; ADENO: $528,50 \pm 8,84$ pmol/L, $p < 0,001$, $n=3$). Par ailleurs, cette étude a montré une sécrétion de peptide C en post-prandiale significativement inférieure pour les rats DFO1 et ADENO jusqu'à 14 jours après transplantation par rapport aux îlots contrôles (**3 jours**: DFO1: $204,67 \pm 76,67$ pmol/L, $p < 0,01$, $n=3$; ADENO: $238,13 \pm 20,33$ pmol/L, $p < 0,01$, $n=3$ vs $428,75 \pm 33,64$ pmol/L, $n=3$; **14 jours**: DFO1: $173,53 \pm 109,37$ pmol/L, $p < 0,05$, $n=3$; ADENO: $236,25 \pm 56,57$ pmol/L, $p < 0,05$, $n=3$ vs $477,50 \pm 44,50$ pmol/L, $n=3$).

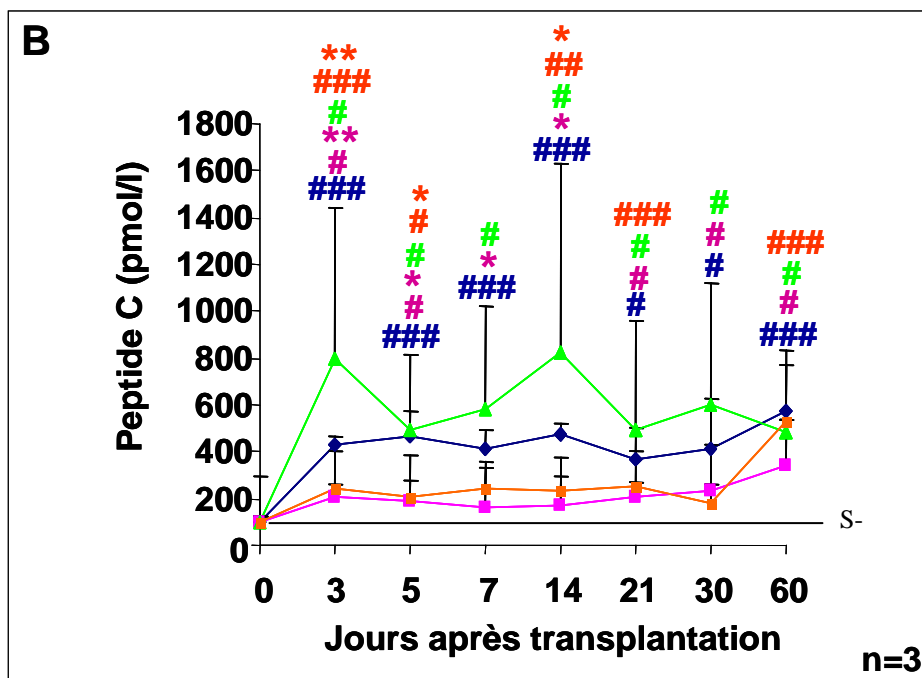
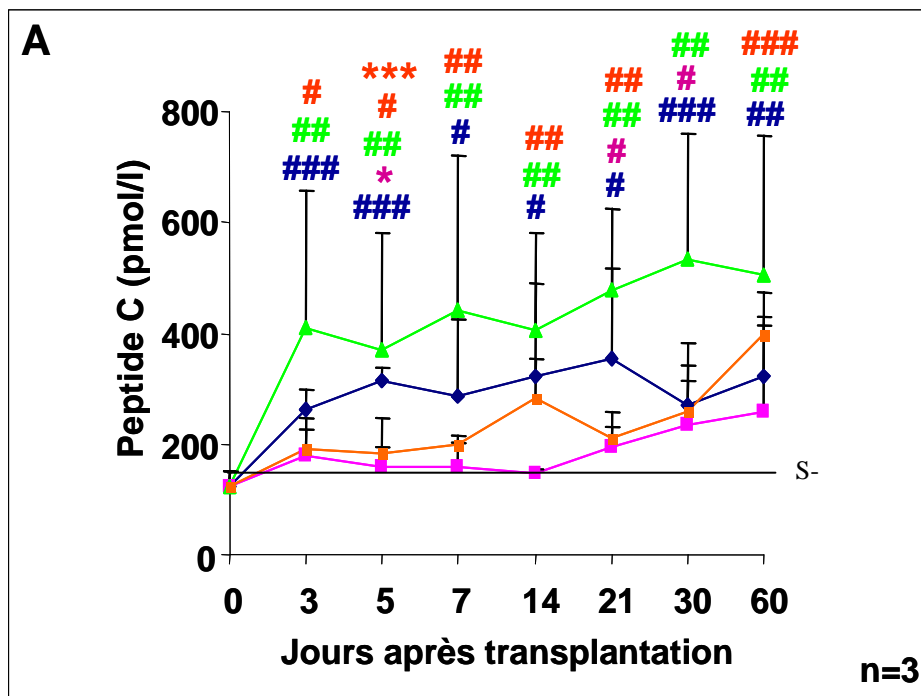


Figure 3-37: Graphique présentant l'évolution de la sécrétion de peptide C de rats diabétiques à jeun (A) et en postprandiale (B) au cours du temps après transplantation d'îlots non traités (courbe bleue), traités avec de la DFO pendant 24 heures (courbe rose), traités avec de la DFO pendant 3 jours (courbe verte) ou infectés (courbe orange). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype (***, ### p < 0,001; ## p < 0,01; *, # p < 0,05).

En revanche, dans le cas de la transplantation d'îlots pré-incubés en présence de DFO pendant 3 jours, la sécrétion de peptide C en post-prandiale semble être plus importante que celle mesurée

avec les îlots contrôles jusqu'à 1 mois après transplantation (**1 mois**: $598,15 \pm 521,17$, $n=4$ vs $412,42 \pm 211,09$, $n=3$). Enfin, 2 mois après transplantation, la sécrétion de peptide C en post-prandiale est comparable pour les îlots contrôles, DFO3 et ADENO tandis que celle des îlots DFO1 semble rester inférieure à celle des îlots contrôles.

3.2.3.4. Discussion

Le but de cette étude était de comparer *in vivo* les effets de la transplantation d'îlots ayant été pré-incubés en présence de DFO (1 ou 3 jours) ou infectés avec un adénovirus encodant le gène du VEGF sur le contrôle métabolique de rats diabétiques.

L'évaluation du gain de masse après transplantation montre, quelque soit la condition expérimentale, une diminution du poids des rats, pouvant aller jusqu'à 20% dans les 14 premiers jours qui suivent cette transplantation. Bien que la perte de masse soit couramment documentée chez l'homme, nous n'avons pas trouvé de référence bibliographique faisant état de cette perte chez le rat. Ces résultats, bien que surprenants, peuvent être expliqués d'une part par le choc opératoire. Les rats se nourrissent en effet moins dans les premiers jours qui suivent la transplantation. La laparotomie qui précède la transplantation est douloureuse pour le rat comme l'atteste le comportement des animaux dans leur cage (poil ébouriffé, animal recroquevillé et endormi, ...). Afin de vérifier ces données, une nouvelle étude sera réalisée avec un groupe de rat appelé groupe Sham, c'est-à-dire des rats ayant subi la même intervention mais avec une injection intra portale d'une solution sans îlots pancréatiques. D'autre part, cette perte de poids pourrait s'expliquer par une polyurie induite par l'hyperglycémie. Concernant les rats DFO1, l'évolution du poids corporel est comparable à celle des rats contrôles durant l'expérimentation ce qui démontre qu'une pré-incubation des îlots pendant 1 jour avec de la DFO ne permet pas d'améliorer l'efficacité de la greffe par rapport à une transplantation classique. En revanche une pré-incubation de 3 jours avec de la DFO induit une augmentation du poids corporel par rapport aux rats contrôles au cours du temps. Ainsi, en association avec les résultats obtenus lors de l'étude immunohistochimique de l'insuline, ce gain de poids pourrait s'expliquer par le maintien de l'insulino-sécrétion au cours du

temps par rapport aux îlots contrôles qui va favoriser la lipogenèse (33). L'étude du contrôle glycémique a montré l'efficacité de la transplantation de 1000 îlots avec un rétablissement de la normoglycémie à jeun au cours de l'expérience qui est comparable entre les rats contrôles et les rats DFO. Néanmoins, le maintien de la normoglycémie à jeun, observé 5 jours après transplantation pour les rats DFO1 et DFO3 par rapport aux rats contrôles, suggérerait que la DFO améliorerait l'implantation des îlots dans les tous premiers jours après la greffe. Cette amélioration pourrait s'expliquer d'une part, par la surexpression du VEGF induite lors de l'incubation des îlots en présence de DFO pendant 3 jours qui stimule la revascularisation des îlots, comme démontré dans l'étude immunohistochimique, dans la littérature (220) et par son pouvoir anti-apoptotique (228). D'autre part, l'effet anti-oxydant de la DFO (232), pourrait également expliquer cette amélioration notamment pour les îlots incubés 24 heures en présence de DFO car l'étude *in vitro* n'a pas montré de surexpression du VEGF dans ces mêmes conditions.

L'étude du contrôle glycémique des rats diabétiques après transplantation n'a pas apporté les résultats attendus. Bien que le modèle de transplantation de 1000 îlots pancréatiques chez le rat diabétique permette de restaurer une normoglycémie à jeun, il n'est pas suffisant pour restaurer une normoglycémie post-prandiale et ne permet pas de mettre en évidence de différences significatives entre les différents groupes. En revanche, ce modèle de transplantation a permis de mettre en avant des différences entre les traitements pour la sécrétion de peptide C à jeun et en post-prandiale. Tout d'abord, nous avons mesuré du peptide C chez les rats diabétiques attestant que le rat STZ présente une insulïnémie résiduelle. Malgré le nombre insuffisant de rat pour déterminer des différences statistiques pour tous les temps de l'étude, nous avons de plus constaté que la sécrétion de peptide C à jeun et en post-prandiale des rats DFO1 n'augmentait quasiment pas après transplantation et restait à un niveau très proche de celle des rats diabétiques, contrairement aux rats contrôles et aux rats DFO3. Par ailleurs, les rats DFO3 sécrèteraient plus de peptide C par rapport aux rats contrôles ce qui conforterait l'effet bénéfique d'une pré-incubation des îlots pendant 3 jours en présence de DFO par rapport à une transplantation standard. Cependant, ces données doivent être confirmées en

augmentant le nombre d'animaux car les différences ne sont pas significatives à ce stade de l'étude. Néanmoins, cette étude a montré un effet bénéfique de la DFO pour une incubation des îlots durant 3 jours sur la viabilité du greffon au cours du temps par rapport à une transplantation classique. Cette amélioration pourrait s'expliquer, d'une part, par la surexpression du VEGF induite lors de la mise en culture des îlots en présence de DFO pendant 3 jours, à l'origine d'une stimulation de la revascularisation des îlots et à son maintien au cours de la transplantation et d'autre part par l'effet anti-oxydant de la DFO.

Concernant l'étude métabolique menée sur les rats ADENO, l'infection adénovirale du gène du VEGF permet d'augmenter la masse corporelle des rats diabétiques au cours de la transplantation par rapport aux rats contrôles. Ces données attesteraient alors de l'effet bénéfique de ce traitement par rapport à une transplantation classique, mais ces résultats devront être vérifiés car le nombre d'animaux étudiés est insuffisant pour observer des différences statistiques entre ces deux conditions expérimentales. Pour répondre à cette interrogation, l'augmentation de la glycémie à jeun au cours du temps et la sécrétion de peptide C à jeun et en post-prandiale plus faible pour les rats ADENO par rapport aux rats contrôles, seraient plutôt en faveur d'une toxicité de l'infection adénovirale. Ces résultats sont d'ailleurs plus en adéquation avec les données obtenues *in vitro* et celles de l'étude immunohistochimique qui montrent bien que l'adénovirus permet une surexpression du VEGF, stimule et maintient une revascularisation des îlots au cours de la transplantation. Cependant, la toxicité de cette infection est telle qu'elle ne permet pas de mettre en évidence un effet bénéfique de ce traitement.

En conclusion, cette étude confirme qu'une pré-incubation des îlots pancréatiques pendant 3 jours en présence de DFO améliore le contrôle métabolique des rats diabétiques après transplantation par rapport à une greffe standard. En revanche l'approche génique de surexpression du VEGF par infection adénovirale est délétère à la survie du greffon au cours du temps. Ainsi, l'approche pharmacologique de surexpression du VEGF par la DFO semble être une approche prometteuse pour améliorer la viabilité des îlots au cours de la transplantation.

4. Conclusion générale et perspectives

La comparaison de l'approche pharmacologique par traitement à la DFO et de la thérapie génique par infection adénovirale est résumée figure 4-1.

L'étude *in vitro* réalisée sur la lignée de cellules β RINm5F a montré que :

-la DFO entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire et est toxique pour des concentrations supérieures à 10 $\mu\text{mol/L}$. En conservant cette concentration, nous avons pu observer que la DFO stimule l'expression de l'ARNm de l'insuline des cellules β après 3 jours de traitement et permet de diminuer l'expression des messagers pro-apoptotique. Ces effets sont accompagnés d'une surexpression du VEGF par la voie du HIF donc de l'hypoxie après 3 jours de traitement

-l'infection adénovirale entraîne, d'une part, une diminution de l'expression de l'ARNm de l'insuline et d'autre part une augmentation des messagers pro-apoptotiques dans la cellule. Ces effets s'accompagnent cependant d'une stimulation de la sécrétion de VEGF par transfert du gène du VEGF.

Par la suite, l'étude *in vitro* réalisée sur les îlots pancréatiques a permis de confirmer les données obtenues sur les lignées de cellules β et d'apporter des résultats complémentaires en comparant ces deux approches. Il a ainsi été confirmé que :

-la DFO n'est pas toxique sur les îlots pancréatiques pour une incubation de 3 jours à 10 $\mu\text{mol/L}$. On observe ainsi une stimulation de la fonctionnalité des îlots après 24 heures de traitement, et une diminution des marqueurs pro-apoptotiques avec préservation de l'intégrité structurelle de l'îlot. Ce traitement permet par ailleurs une surexpression du VEGF par la voie du HIF donc de l'hypoxie.

-l'infection adénovirale, bien qu'elle permette une surexpression plus prolongée du VEGF entraîne une diminution de la fonctionnalité des îlots avec une augmentation également des marqueurs pro-apoptotiques et apparition d'une forte nécrose centrale dans l'îlot infecté.

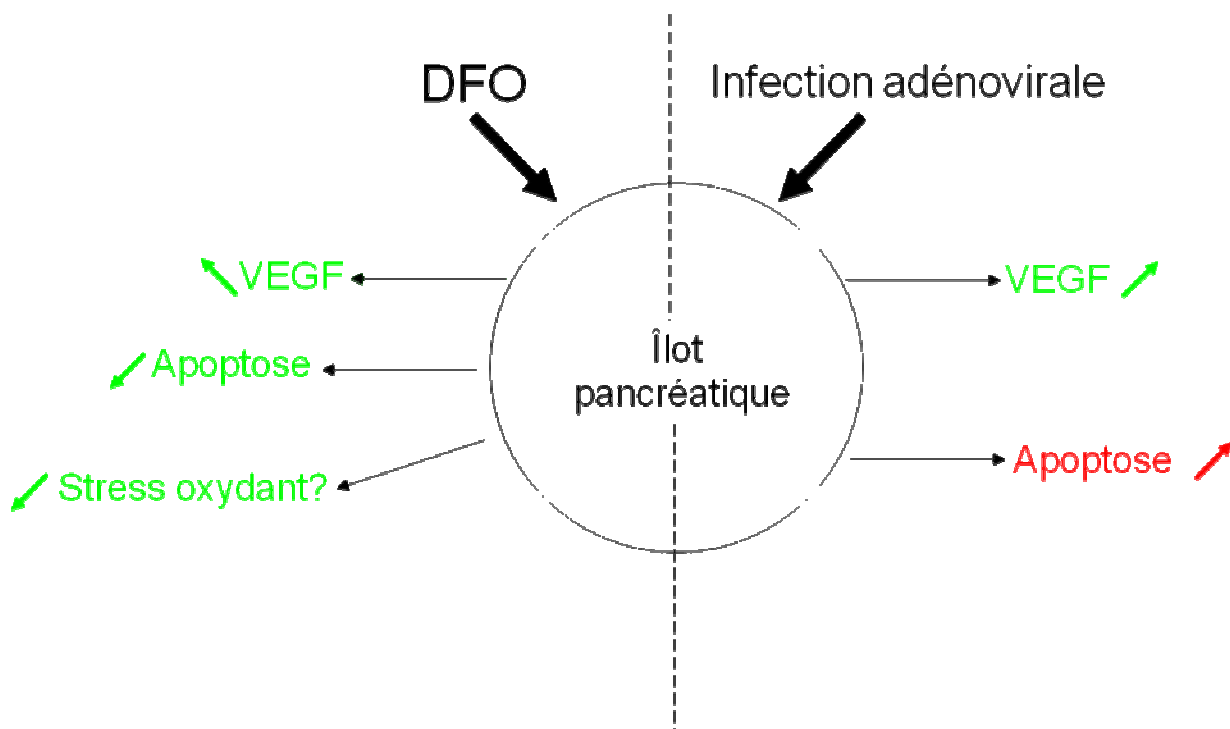


Figure 4-1: Schéma comparatif des effets de l'infection adénovirale et de la DFO.

Ces résultats indiquent que l'infection adénovirale semble délétère pour la survie et la fonctionnalité des îlots pancréatiques contrairement à la DFO.

Bien que notre étude *in vitro* semble démontrer l'effet bénéfique de la DFO, il semble nécessaire de comprendre certains des résultats obtenus. Ainsi, l'effet insulino-sécréteur de la molécule semble être attribué à ses propriétés anti-oxydantes par chélation du fer. Différentes techniques sont envisageables pour identifier ce rôle de protecteur contre le stress oxydant comme le dosage de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) qui est un des bio-marqueurs les plus sensibles et est formé quand l'ADN est endommagé par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). De plus, pour vérifier l'effet anti-apoptotique de la DFO et l'action pro-apoptotique de l'infection adénovirale, des mesures plus précises devront être mises en place comme l'analyse du clivage de la caspase 3 qui est l'indicateur de l'entrée des cellules en apoptose. Enfin, la recherche de molécules ayant les mêmes propriétés que la DFO devra être envisagée. Le mersalyl semble déjà répondre à ces critères (258). Concernant l'infection adénovirale, l'utilisation de virus de troisième génération moins toxique devra être envisagée. Des résultats précédemment obtenus au laboratoire avec ce

type de virus dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire Transgène, étaient assez encourageant mais l'étude n'a pu être continuée faute de matériel.

L'étude immunohistochimique de la revascularisation des îlots au cours de la transplantation a montré :

- que la revascularisation des îlots semble se réaliser en deux phases : un premier signal précoce provient du receveur qui secrète du VEGF pour stimuler la croissance des vaisseaux de l'îlot pancréatique et un deuxième signal plus tardif qui provient, cette fois-ci, de l'îlot pancréatique qui secrète à son tour du VEGF pour stimuler et maintenir la vascularisation. Ces données indiquent que la revascularisation des îlots implique le donneur et le receveur.

- un effet bénéfique de la DFO sur l'insulino-sécrétion pour une pré-incubation des îlots de 3 jours accompagnée d'une stimulation de la revascularisation des îlots. En revanche, un traitement des îlots avec de la DFO durant 24 heures n'apporte aucune amélioration.

- l'infection adénovirale n'améliore pas la viabilité des îlots pancréatiques après transplantation malgré une stimulation de leur revascularisation qui est le résultat de la surexpression du VEGF dans les îlots.

La stimulation de la vascularisation, d'après ces données, doit être précoce car l'îlot doit envoyer au receveur rapidement un signal permettant sa connexion au système. Or, dans la situation contrôle, ce signal est tardif et la surexpression du VEGF doit se focaliser sur la première phase précoce. C'est ce que semble permettre à la fois le traitement à la DFO et l'infection adénovirale avec une surexpression prolongée pour cette dernière.

Une quantification plus précise par analyse d'image de ces mécanismes de revascularisation semble nécessaire pour compléter notre compréhension. De plus, d'autres marquages pourront être envisagés afin d'évaluer si d'autres facteurs ne peuvent pas être impliqués dans l'angiogenèse (b-FGF, HGF...)

Enfin, l'étude métabolique de l'effet de la DFO et de l'infection adénovirale sur les îlots pancréatiques au cours de la transplantation confirme d'une part, l'effet bénéfique de la DFO pour

une incubation de 3 jours et d'autre part l'effet délétère de l'infection adénovirale sur le contrôle métabolique des rats diabétiques transplantés. Néanmoins, le nombre insuffisant de rats par condition expérimentale ne permet pas d'observer de significativité à tous les temps de l'expérimentation. Ainsi, nous devons augmenter le nombre d'animaux pour confirmer ces données. Par ailleurs, cette étude indique une perte de poids immédiatement après transplantation quelque soit la condition expérimentale. Afin de vérifier si cette perte est due à l'acte chirurgical, nous allons réaliser un groupe d'animaux contrôle appelé Sham qui aura reçu une injection intra-portale d'une solution ne contenant pas d'îlots pancréatiques.

Finalement, ces différentes études montrent que l'approche pharmacologique de surexpression du VEGF par la DFO semble être un outil plus prometteur pour améliorer la viabilité des îlots au cours de la transplantation par rapport à une infection adénovirale qui est toxique.

5. Références bibliographiques

- 1- Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. 1922. *CMAJ*. 1991;145(10):1281-6.
- 2- Berson SA, Yalow RS. Recent studies on insulin-binding antibodies. *Ann N Y Acad Sci*. 1959; 82:338-44.
- 3- Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. 1965; 14(10):619-33.
- 4- Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 1974; 2(7892):1279-83.
- 5- Cudworth AG, Woodrow JC. Genetic susceptibility in diabetes mellitus: analysis of the HLA association. *Br Med J*. 1976; 2(6040):846-8.
- 6- Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischer E, Goodman HM. Sequence of the human insulin gene. *Nature*. 1980; 284(5751):26-32.
- 7- Steiner DF. Evidence for a precursor in the biosynthesis of insulin. *Trans N Y Acad Sci*. 1967; 30(1):60-8.
- 8- Orci L, Vassalli JD, Perrelet A. The insulin factory. *Sci Am*. 1988; 259(3):85-94. Review.
- 9- Perlemuter L, Sélam JL, Collin de l'Hortet. *Diabète et maladies métaboliques*. Edition Masson. 2003.
- 10- Caumo A, Luzi L. First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; 287(3):E371-85. Review.
- 11- Brozinick JT Jr, Berkemeier BA, Elmendorf JS. "Actin" g on GLUT4: membrane & cytoskeletal components of insulin action. *Curr Diabetes Rev*. 2007; 3(2):111-22.
- 12- Floyd JC, Fajans SS, Conn JW. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest*, 1966; 45: 1487-1502.
- 13- Malaisse WJ. Branched-chain amino and keto acid metabolism in pancreatic islets. *Adv Enzyme Regul*. 1986; 25:203-17. Review.
- 14- Hutton JC, Malaisse WJ. Dynamics of O₂ consumption in rat pancreatic islets. *Diabetologia*. 1980; 18(5):395-405.
- 15- Malaisse WJ, Hutton JC, Carpinelli AR, Herchuelz A, Sener A. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release: metabolism and cationic effects of leucine. *Diabetes*. 1980; 29(6):431-7.
- 16- Malaise WJ. Acides aminés et insulinosécrétion. *Médecine/Sciences éditons Flammarion, journées de diabétologie*. 2002.
- 17- Sener A, Blachier F, Raschaert. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Comparison with lysine-induced insulin secretion. *Endocrinology*, 1988, 124: 2558-2567.
- 18- Roden M, Price TB, Perseghin G, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996; 97: 2859-2865.
- 19- Gruppig AY, Cnop M, Van Schravendijk C, Hannaert J, Van Berkel T, Pipeleers D. Low density lipoprotein binding and uptake by human and rat islet β -cells. *Endocrinology* 1997; 138: 4064-8.
- 20- Girard J. Rôle des acides gras libres dans la sécrétion et l'action de l'insuline: mécanismes de la lipotoxicité. *M/S : médecine sciences*. Volume 19, numéros 8-9, 2003.
- 21- Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, Hellerström C. Participation of endogenous fatty acids in the secretory activity of the pancreatic β -cell. *Biochem J* 1985; 227: 995-1002.
- 22- Girard J. Acides gras, insulinosécrétion et lipotoxicité. *Med Ther Endocrinol* 2000; 2 (suppl2): 29-36.
- 23- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 171-6.
- 24- Mason TM, Goh T, Tchipashvili V, et al. Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes* 1999; 48: 524-30.
- 25- Paolisso G, Gambardella A, Amato L, Tortoriello R, D'Amore A, Varricchio M, D'Onofrio F. Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 1995; 38: 1295-9.
- 26- Henquin JC. Glucose-induced electrical activity in beta-cells. Feedback control of ATP-sensitive K⁺ channels by Ca²⁺? *Diabetes*. 1990; 39(11):1457-60.
- 27- Joffre M. *Cours de maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie*. Université de Poitiers. 2003.
- 28- Idelman S, Verdetti J. *Endocrinologie et communications cellulaires*. Collection Grenoble Sciences. 2000.
- 29- Verne J, Hebert S. Neoglucogenesis in hepatocytes cultivated in vitro. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1964; 158:1804-7.
- 30- Soman V, Felig P. Glucagon and insulin binding to liver membranes in a partially nephrectomized uremic rat model. *BJ Clin Invest*. 1977; 60(1):224-32.
- 31- Bergman RN. Non-esterified fatty acids and the liver: why is insulin secreted into the portal vein? *Diabetologia*. 2000; 43(7):946-52. Review.
- 32- Van Kempen AA, van der Crabben SN, Ackermans MT, Endert E, Kok JH, Sauerwein HP. Stimulation of gluconeogenesis by intravenous lipids in preterm infants: response depends on fatty acid profile. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290(4):E723-30.
- 33- Mittelman SD, Bergman RN. Inhibition of lipolysis causes suppression of endogenous glucose production independent of changes in insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279(3):E630-7.
- 34- Scheepers A, Joost HG, Schürmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPENJ Parenter Enteral Nutr*. 2004; 28(5):364-71. Review.
- 35- Ishiki M, Klip A. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology*. 2005; 146(12):5071-8. Review.
- 36- Wiernsperger NF. Is non-insulin dependent glucose uptake a therapeutic alternative? Part 2: Do such mechanisms

- fulfil the required combination of power and tolerability? *Diabetes Metab.* 2005; 31(6):521-5. Review.
- 37- Milburn JL Jr, Ohneda M, Johnson JH, Unger RH. Beta-cell GLUT-2 loss and non-insulin-dependent diabetes mellitus: current status of the hypothesis. *Diabetes Metab Rev.* 1993; 9(3):231-6. Review.
- 38- Timmerman KL, Volpi E. Amino acid metabolism and regulatory effects in aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008; 11(1):45-9.
- 39- González-Sánchez JL, Serrano-Ríos M. Molecular basis of insulin action. *Drug News Perspect.* 2007; 0(8):527-31.
- 47- Timsit J. Insulinothérapie dans le diabète insulino dépendant. *Médecine thérapeutique.* 1995; Vol 1, N° 8.
- 48- Aubert JP. Insulinothérapie en médecine générale. Cycle diabète, séance n°3. SFTG PARIS NORD MAI 1997.
- 49- Sept insulines en cartouches. *La revue prescrire.* 1991 ; Tome 11, n° 107.
- 50- Guide 1989 de l'insulinothérapie. *La revue prescrire.* 1988 ; Tome 8, n° 80.
- 51- Zinman B. Insulin regimens and strategies for IDDM. *Diabetes Care.* 1993; 16 Suppl 3:24-8. Review.
- 52- Lauritzen T, Pramming S, Deckert T, Binder C. Pharmacokinetics of continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetologia.* 1983; 24(5):326-9.
- 53- Bode BW, Steed RD, Davidson PC. Reduction in severe hypoglycemia with long-term continuous subcutaneous insulin infusion in type I diabetes. *Diabetes Care.* 1996; 19(4):324-7.
- 54- Renard E, Schaepelynck-Bélicar P. Implantable insulin pumps. A position statement about their clinical use. *Diabetes & Metabolisme.* 2007; Vol 33 - n° 2.
- 55- Pozzilli P, Manfrini S, Costanza F, Coppolino G, Cavallo MG, Fioriti E, Modi P. Biokinetics of buccal spray insulin in patients with type 1 diabetes. *Metabolism.* 2005; 54(7):930-4.
- 56- Conférence de presse du Leem sur les nouveautés thérapeutiques du 29/01/07.
- 57- Communiqué de presse de Pfizer du 26/01/06.
- 58- Lin YH, Mi FL, Chen CT, Chang WC, Peng SF, Liang HF, Sung HW. Preparation and Characterization of Nanoparticles Shelled with Chitosan for Oral Insulin Delivery. *Biomacromolecules.* 2007; 8(1):146-152.
- 59- Pavlakis M, Khwaja K. Pancreas and islet cell transplantation in diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007; 14(2):146-50. Review.
- 60- Bertuzzi F, Verzaro R, Provenzano V, Ricordi C. Brittle type 1 diabetes mellitus. *Curr Med Chem.* 2007; 14(16):1739-44. Review.
- 61- Ming CS, Chen ZH. Progress in pancreas transplantation and combined pancreas-kidney transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2007; 6(1):17-23. Review.
- 62- Sutherland DE, Cecka M, Gruessner AC. Report from the International Pancreas Transplant Registry--1998. *Transplant Proc.* 1999; 31(1-2):597-601.
- 63- Dieterle CD, Veitenhansl M, Gutt B, Arbogast H, Meier GR, Illner WD, Schlamp A, Seissler J, Landgraf R. Impaired glucose tolerance in pancreas grafted diabetic patients is due to insulin secretory defects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007; 115(10):647-53.
- 64- Baertschiger RM, Morel P, Berney T. La transplantation d'îlots de Langerhans ou de pancréas dans le traitement du diabète de type 1. *Revue Médicale Suisse.* 2006; 3068.
- 65- Schmied BM, Müller SA, Mehrabi A, Welsch T, Büchler MW, Zeier M, Schmidt J. Immunosuppressive standards in simultaneous kidney-pancreas transplantation. *Clin Transplant.* 2006; 20 Suppl 17:44-50. Review.
- 66- Gruessner RWG, Sutherland DEV, Gruessner AC. Mortality assessment for pancreas transplants. *Am J Transplant.* 2004; 4:2018.
- 67- Gruessner AC, Sutherland DER. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin Transplant.* 2005; 19:443.
- 68- Venstrom JM, McBride MA, Rother KI, Hirshberg B, Orchard TJ, Harlan DM. Survival after pancreas transplantation in patients with diabetes and preserved kidney function. *JAMA.* 2003; 290:2817.
- 69- Demartines N, Schiesser M, Clavien PA. An evidence-based-analysis of simultaneous pancreas-kidney and pancreas transplantation alone. *Am J Transplant.* 2005; 5: 2688.
- 70- Pileggi A, Alejandro R, Ricordi C. Clinical islet transplantation. *Minerva Endocrinol.* 2006; 31(3):219-32. Review.
- 71- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(7):2334-9.
- 72- Skyler JS. *Atlas of Diabetes.* Philadelphia, PA: Current Medicine LLC; 2006.
- 73- LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
- 74- Pileggi A, Alejandro R, Ricordi C. Clinical islet transplantation: steady progress and current challenges. *Curr Opin Organ Transplant.* 2006; 11:7-13.
- 75- Ricordi C. Islet transplantation: a brave new world. *Diabetes.* 2003; 52(7):1595-603.
- 76- Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes.* 1967; 16(1):35-9.
- 77- Sutherland DE, Steffes MW, Bauer GE, McManus D, Noe BD, Najarian JS. Isolation of human and porcine islets of Langerhans and islet transplantation in pigs. *J Surg Res.* 1974; 16(2):102-11.
- 78- Sutherland DE, Steffes MW, Mauer SM, Najarian JS. Reversal of secondary lesions of diabetes in rats by pancreatic islet transplantation. *Surg Forum.* 1974; 25(0):309-11.
- 79- Najarian JS, Sutherland DER, Matas AT, Steffes MW, Simmons RL, and Goetz FC. Human islet transplantation: a

- preliminary report. *Transplantation Proceedings*. 1977; 9, 233-236.
- 80- Ricordi C, Finke EH, Dye ES, Socci C, Lacy PE. Automated isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation*. 1988; 46(3):455-7.
- 81- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005; 54(7):2060-9.
- 82- Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbitt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006; 355(13):1318-30.
- 83- Lakey JR, Warnock GL, Shapiro AM, Korbitt GS, Ao Z, Kneteman NM, Rajotte RV. Intraductal collagenase delivery into the human pancreas using syringe loading or controlled perfusion. *Cell Transplant*. 1999; 8(3):285-92.
- 84- Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C. Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. *Diabetes*. 1997; 46(7):1120-3.
- 85- Scharp DW, Kemp CB, Knight MJ, Ballinger WF and Lacy PE. The use of ficoll in the preparation of viable islets of Langerhans from the rat pancreas. *Transplantation*. 1973; 16, 686-688.
- 86- Robertson GS, Chadwick DR, Contractor H, James RF, London NJ. The optimization of large-scale density gradient isolation of human islets. *Acta Diabetol*. 1993; 30(2):93-8.
- 87- Owen RJ, Ryan EA, O'Kelly K, Lakey JR, McCarthy MC, Paty BW, Bigam DL, Kneteman NM, Korbitt GS, Rajotte RV, Shapiro AM. Percutaneous transhepatic pancreatic islet cell transplantation in type 1 diabetes mellitus: radiologic aspects. *Radiology*. 2003; 229(1):165-70.
- 88- Bucher P, Mathe Z, Bosco D, Becker C, Kessler L, Greget M, Benhamou PY, Andres A, Oberholzer J, Buhler L, Morel P, Berney T. Morbidity associated with intraportal islet transplantation. *Transplant Proc*. 2004; 36(4):1119-20.
- 89- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000; 343(4):230-8.
- 90- Lillehei RC, Simmons RL, Najarian JS, Weil R, Uchida H, Ruiz JO, Kjellstrand CM and Goetz FC. Pancreatico-duodenal allotransplantation: experimental and clinical experience. *Annals of Surgery*. 1970; 172, 405-436.
- 91- Moskalewski, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *General and Comparative Endocrinology*. 1965; 5, 342-353.
- 92- Scharp DW. Isolation and transplantation of islet tissue. *World J Surg*. 1984; 8(2):143-51. Review.
- 93- Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery*. 1972; 72(2):175-86.
- 94- Lindall, A., Steffes, M. W., and Sorenson, R. Immunoassayable insulin content of subcellular fractions of rat islets. *Endocrinology*. 1969; 85, 218-223.
- 95- Scharp DW, Murphy JJ, Newton WT, Ballinger WF and Lacy PE. Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus monkeys. *Surgery*. 1974; 77, 100-105.
- 96- Steffes MW, Sutherland DE, Mauer SM, Najarian JS, Brown DM. Islet transplantation in diabetic rats receiving corticosteroids. *Transplantation*. 1975; 19(6):449-55.
- 97- Karl RC. Transplantation of islets of Langerhans. *Arch Pathol*. 1975; 99(8):401-2.
- 98- Kenyon NS, Fernandez LA, Lehmann R, Masetti M, Ranuncoli A, Chatzipetrou M, Iaria G, Han D, Wagner JL, Ruiz P, Berho M, Inverardi L, Alejandro R, Mintz DH, Kirk AD, Harlan DM, Burkly LC, Ricordi C. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in baboons treated with humanized anti-CD154. *Diabetes*. 1999; 48(7):1473-81.
- 99- Kemp, C. B., Knight, M. J., Scharp, D. W., Ballinger, W. F., and Lacy, P. E. Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia*. 1973; 9, 486-491.
- 100- Koncz, L., Davidoff, F., DeLellis, R. A., Selby, M., and Zimmerman, C. E. Quantitative aspects of the metabolic response to pancreatic islet transplantation in rats with severe ketotic diabetes. *Metabolism*. 1976; 25, 147-156.
- 101- Feldman, S. D., Hirshberg, G. E., Dodi, G., Raizman, M. E., Scharp, D. W., Ballinger, W. F., and Lacy, P. E. Intrasplenic islet isografts. *Surgery*. 1977; 82, 386-394.
- 102- Reckard, C. R., Ziegler, M. M., and Barker, C. F. Physiological and immunological consequences of transplanting isolated pancreatic islets. *Surgery*. 1973; 74, 91-99.
- 103- Barker O, C. F., Reckard, C. R., Ziegler, M. M., and Naji, A. The liver as an immunologically privileged site for rat pancreatic islet allografts. *Diabetes*. 1975; 24, suppl. 2, 418.
- 104- Ferguson J, Allsopp RH, Taylor RMR and Johnston IDA. Isolation and long term preservation of pancreatic islets from mouse, rat, and guinea pig. *Diabetologia*. 1976; 12, 115-121.
- 105- Takaki R, Ono J, Fukuma M, Ikegami T. Long-term culture of isolated pancreatic islet cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1975; 149(2):402-6.
- 106- Hegre OD, Leonard RJ, Schmitt RV and Lazarow A. Isotransplantation of organ-cultured neonatal pancreas: reversal of alloxan diabetes in the rat. *Diabetes*. 1976; 25, 180-189.
- 107- Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Boyle PJ, Falqui L, Marchetti P, Ricordi C, Gingerich RL, et al. Results of our first nine intraportal islet allografts in type 1, insulin-dependent diabetic patients. *Transplantation*. 1991; 51(1):76-85.
- 108- Alejandro R, Strasser S, Zucker PF, Mintz DH. Isolation of pancreatic islets from dogs. Semiautomated

- purification on albumin gradients. *Transplantation*. 1990; 50(2):207-10.
- 109- Lake SP, Bassett PD, Larkins A, Revell J, Walczak K, Chamberlain J, Rumford GM, London NJ, Veitch PS, Bell PR, et al. Large-scale purification of human islets utilizing discontinuous albumin gradient on IBM 2991 cell separator. *Diabetes*. 1989; 38 Suppl 1:143-5.
- 110- Tzakis AG, Ricordi C, Alejandro R, Zeng Y, Fung JJ, Todo S, Demetris AJ, Mintz DH, Starzl TE. Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. *Lancet*. 1990; 336(8712):402-5.
- 111- Ichii H, Pileggi A, Molano RD, Baidal DA, Khan A, Kuroda Y, Inverardi L, Goss JA, Alejandro R, Ricordi C. Rescue purification maximizes the use of human islet preparations for transplantation. *Am J Transplant*. 2005; 5(1):21-30.
- 112- Mulliez E, Pattou F, Kerr-Conte J, Amrouni H, Proye C, Lefebvre J. Islet intraportal transplant through a percutaneous catheter placed in a portal vein tributary in pigs. *Transplant Proc*. 1997; 29(4):2101-2.
- 113- Pattou F, Vantyghem MC, Noel C, Kerr-Conte J, Gmyr V, Martinache I, Vandewalle B, N'Guyen H, Lecomte-Houcke M, Lefebvre J, Proye C. Sequential intraportal islet allografts in immunosuppressed type I diabetic patients: preliminary results. *Transplant Proc*. 2000; 32(2):391-2.
- 114- Bretzel RG, Brandhorst D, Brandhorst H, Eckhard M, Ernst W, Friemann S, Rau W, Weimar B, Rauber K, Hering BJ, Brendel MD. Improved survival of intraportal pancreatic islet cell allografts in patients with type-1 diabetes mellitus by refined peritransplant management. *J Mol Med*. 1999; 77(1):140-3.
- 115- Pileggi A, Ricordi C, Kenyon NS, Froud T, Baidal DA, Kahn A, Selvaggi G, Alejandro R. Twenty years of clinical islet transplantation at the Diabetes Research Institute--University of Miami. *Clin Transpl*. 2004; 177-204. Review.
- 116- Alejandro R, Lehmann R, Ricordi C, Kenyon NS, Angelico MC, Burke G, Esquenazi V, Nery J, Betancourt AE, Kong SS, Miller J, Mintz DH. Long-term function (6 years) of islet allografts in type 1 diabetes. *Diabetes*. 1997; 46(12):1983-9.
- 117- Oberholzer J, Toso C, Triponez F, Ris F, Bucher P, Demirag A, Lou J, Majno P, Buehler L, Philippe J, Morel P. Human islet allotransplantation with Basiliximab in type I diabetic patients with end-stage renal failure. *Transplant Proc*. 2002; 34(3):823-5.
- 118- Oberholzer J, Triponez F, Mage R, Andereggen E, Bühler L, Crétin N, Fournier B, Goumaz C, Lou J, Philippe J, Morel P. Human islet transplantation: lessons from 13 autologous and 13 allogeneic transplantations. *Transplantation*. 2000; 69(6):1115-23.
- 119- Luzi L, Hering BJ, Socci C, Raptis G, Battezzati A, Terruzzi I, Falqui L, Brandhorst H, Brandhorst D, Regalia E, Brambilla E, Secchi A, Perseghin G, Maffi P, Bianchi E, Mazzaferro V, Gennari L, Di Carlo V, Federlin K, Pozza G, Bretzel RG. Metabolic effects of successful intraportal islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1996; 97(11):2611-8.
- 120- Badet L, Benhamou PY, Wojtuszczyk A, Baertschiger R, Milliat-Guittard L, Kessler L, Penfornis A, Thivolet C, Renard E, Bosco D, Morel P, Morelon E, Bayle F, Colin C, Berney T; GRAGIL Group. Expectations and strategies regarding islet transplantation: metabolic data from the GRAGIL 2 trial. *Transplantation*. 2007; 84(1):89-96.
- 121- Ault A. Edmonton's islet success tough to duplicate elsewhere. *Lancet*. 2003; 361(9374):2054.
- 122- Sigrist S, Ebel N, Langlois A, Bosco D, Toso C, Kleiss C, Mandes K, Berney T, Pinget M, Belcourt A, Kessler L. Role of chemokine signaling pathways in pancreatic islet rejection during allo- and xenotransplantation. *Transplant Proc*. 2005; 37(8):3516-8.
- 123- Benhamou PY, Penfornis A. La transplantation d'îlots en 2001 : quelle place dans le traitement du diabétique de type 1? *Médecine Thérapeutique Endocrinologie & Reproduction*. 2001; Volume 3, Numéro 4, 283-7.
- 124- Keymeulen B, Ling Z, Gorus FK, Delvaux G, Bouwens L, Gruppig A, Hendrieckx C, Pipeleers-Marichal M, Van Schravendijk C, Salmela K, Pipeleers DG. Implantation of standardized beta-cell grafts in a liver segment of IDDM patients: graft and recipients characteristics in two cases of insulin-independence under maintenance immunosuppression for prior kidney graft. *Diabetologia*. 1998; 41(4):452-9.
- 125- Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, Imes S, Korbitt GS, Kneteman NM, Bigam D, Rajotte RV, Shapiro AM. Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes*. 2002; 51(7):2148-57.
- 126- Frank A, Deng S, Huang X, Velidedeoglu E, Bae YS, Liu C, Abt P, Stephenson R, Mohiuddin M, Thambipillai T, Markmann E, Palanjian M, Sellers M, Naji A, Barker CF, Markmann JF. Transplantation for type I diabetes: comparison of vascularized whole-organ pancreas with isolated pancreatic islets. *Ann Surg*. 2004; 240(4):631-40.
- 127- Froud T, Ricordi C, Baidal DA, Hafiz MM, Ponte G, Cure P, Pileggi A, Poggioli R, Ichii H, Khan A, Ferreira JV, Pugliese A, Esquenazi VV, Kenyon NS, Alejandro R. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant*. 2005; 5(8):2037-46.
- 128- Toso C, Shapiro AM, Bowker S, Dinyari P, Paty B, Ryan EA, Senior P, Johnson JA. Quality of life after islet transplant: impact of the number of islet infusions and metabolic outcome. *Transplantation*. 2007; 84(5):664-6.
- 129- Rother KI, Harlan DM. Challenges facing islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 2004; 114(7):877-83.
- 130- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(14):7999-8004.
- 131- Xu X, D'Hoker J, Stangé G, Bonnè S, De Leu N, Xiao X, Van De Casteele M, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, Bouwens L, Scharfmann R, Gradwohl G, Heimberg H. Beta cell progenitors can be generated from endogenous

- progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*. 2008; 132, 197-207.
- 132- Heremans Y, Van De Casteele M, in't Veld P, Gradwohl G, Serup P, Madsen O, Pipeleers D, Heimberg H. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol*. 2002; 159(2):303-12.
- 133- Groth CG, Tibell A, Wennberg L, Korsgren O. Xenoislet transplantation: experimental and clinical aspects. *J Mol Med*. 1999; 77(1):153-4. Review.
- 134- Emamaullee JA, Stanton L, Schur C, Shapiro AM. Caspase inhibitor therapy enhances marginal mass islet graft survival and preserves long-term function in islet transplantation. *Diabetes*. 2007; 56(5):1289-98.
- 135- Nir T, Melton DA, Dor Y. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest*. 2007; 117(9):2553-61.
- 136- Zhang N, Su D, Qu S, Tse T, Bottino R, Balamurugan AN, Xu J, Bromberg JS, Dong HH. Sirolimus is associated with reduced islet engraftment and impaired beta-cell function. *Diabetes*. 2006; 55(9):2429-36.
- 137- Fernandez LA, Lehmann R, Luzi L, Battezzati A, Angelico MC, Ricordi C, Tzakis A, Alejandro R. The effects of maintenance doses of FK506 versus cyclosporin A on glucose and lipid metabolism after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 1999; 68(10):1532-41.
- 138- Cantaluppi V, Biancone L, Romanazzi GM, Figliolini F, Beltramo S, Ninniri MS, Galimi F, Romagnoli R, Franchello A, Salizzoni M, Perin PC, Ricordi C, Segoloni GP, Camussi G. Antiangiogenic and immunomodulatory effects of rapamycin on islet endothelium: relevance for islet transplantation. *Am J Transplant*. 2006; 6(11):2601-11.
- 139- Stanojevic V, Habener JF, Thomas MK. Pancreas duodenum homeobox-1 transcriptional activation requires interactions with p300. *Endocrinology*. 2004; 145(6):2918-28.
- 140- Uchizono Y, Iwase M, Nakamura U, Sasaki N, Goto D, Iida M. Tacrolimus impairment of insulin secretion in isolated rat islets occurs at multiple distal sites in stimulus-secretion coupling. *Endocrinology*. 2004; 145(5):2264-72.
- 141- Emamaullee JA, Shapiro AM. Interventional strategies to prevent beta-cell apoptosis in islet transplantation. *Diabetes*. 2006; 55(7):1907-14. Review.
- 142- Kang HG, Zhang D, Degauque N, Mariat C, Alexopoulos S, Zheng XX. Effects of cyclosporine on transplant tolerance: the role of IL-2. *Am J Transplant*. 2007; 7(8):1907-16.
- 143- Sigrist S, Oberholzer J, Bohbot A, Esposito G, Mandes K, Lamartine R, Toso C, Bucher P, Pinget M, Kessler L. Activation of human macrophages by allogeneic islets preparations: inhibition by AOP-RANTES and heparinoids. *Immunology*. 2004; 111(4):416-21.
- 144- Bottino R, Fernandez LA, Ricordi C, Lehmann R, Tsan MF, Oliver R, Inverardi L. Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes*. 1998; 47(3):316-23.
- 145- Moberg L, Johansson H, Lukinius A, Berne C, Foss A, Källen R, Østraat Ø, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Elgue G, Nilsson Ekdahl K, Korsgren O, Nilsson B. Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. *Lancet*. 2002; 360(9350):2039-45.
- 146- Yin D, Ding JW, Shen J, Ma L, Hara M, Chong AS. Liver ischemia contributes to early islet failure following intraportal transplantation: benefits of liver ischemic-preconditioning. *Am J Transplant*. 2006; 6(1):60-8.
- 147- Yasunami Y, Kojo S, Kitamura H, Toyofuku A, Satoh M, Nakano M, Nabeyama K, Nakamura Y, Matsuoka N, Ikeda S, Tanaka M, Ono J, Nagata N, Ohara O, Taniguchi M. Valpha14 NK T cell-triggered IFN-gamma production by Gr-1+CD11b+ cells mediates early graft loss of syngeneic transplanted islets. *J Exp Med*. 2005; 202(7):913-8.
- 148- Han D, Xu X, Baidal D, Leith J, Ricordi C, Alejandro R, Kenyon NS. Assessment of cytotoxic lymphocyte gene expression in the peripheral blood of human islet allograft recipients: elevation precedes clinical evidence of rejection. *Diabetes*. 2004; 53(9):2281-90.
- 149- Stegall MD, Lafferty KJ, Kam I, Gill RG. Evidence of recurrent autoimmunity in human allogeneic islet transplantation. *Transplantation*. 1996; 61(8):1272-4.
- 150- Worcester Human Islet Transplantation Group. Autoimmunity after islet-cell allotransplantation. *N Engl J Med*. 2006; 355(13):1397-9.
- 151- Ricordi C, Strom TB. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(4):259-68. Review.
- 152- Inverardi L, Linetsky E, Pileggi A, Molano RD, Serafini A, Paganelli G, Ricordi C. Targeted bone marrow radioablation with ¹⁵³Samarium-lexidronam promotes allogeneic hematopoietic chimerism and donor-specific immunologic hyporesponsiveness. *Transplantation*. 2004; 77(5):647-55.
- 153- Inverardi L, Ricordi C. Tolerance and pancreatic islet transplantation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356(1409):759-65. Review.
- 154- Carlsson PO, Palm F, Mattsson G. Low revascularization of experimentally transplanted human pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(12):5418-23.
- 155- Mattsson G, Jansson L, Carlsson PO. Decreased vascular density in mouse pancreatic islets after transplantation. *Diabetes*. 2002; 51(5):1362-6.
- 156- Carlsson PO, Liss P, Andersson A, Jansson L. Measurements of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. *Diabetes*. 1998; 47(7):1027-32.
- 157- Ballian N, Brunicardi FC. Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. *World J Surg*. 2007; 31(4):705-14. Review.
- 158- Zhang N, Qu S, Xu J, Bromberg JS, Dong HH. Inhibition of angiogenesis is associated with reduced islet

- engraftment in diabetic recipient mice. *Transplant Proc.* 2005; 37(10):4452-7.
- 159- Carlsson PO, Olsson R, Källskog O, Bodin B, Andersson A, Jansson L. Glucose-induced islet blood flow increase in rats: interaction between nervous and metabolic mediators. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 283(3):E457-64.
- 160- Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B. Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg.* 2001; 25(4):509-15. Review.
- 161- Konstantinova I, Lammert E. Microvascular development: learning from pancreatic islets. *Bioessays.* 2004; 26(10):1069-75. Review.
- 162- Narang AS, Mahato RI. Biological and biomaterial approaches for improved islet transplantation. *Pharmacol Rev.* 2006; 58(2):194-243. Review.
- 163- Menger MD, Vajkoczy P, Beger C, Messmer K. Orientation of microvascular blood flow in pancreatic islet isografts. *J Clin Invest.* 1994; 93(5):2280-5.
- 164- Brunicardi FC, Stagner J, Bonner-Weir S, Wayland H, Kleinman R, Livingston E, Guth P, Menger M, McCuskey R, Intaglietta M, Charles A, Ashley S, Cheung A, Ipp E, Gilman S, Howard T, Passaro E Jr. Microcirculation of the islets of Langerhans. Long Beach Veterans Administration Regional Medical Education Center Symposium. *Diabetes.* 1996; 45(4):385-92. Review.
- 165- Jansson L. The regulation of pancreatic islet blood flow. *Diab Metab Rev.* 1994; 10:407-416.
- 166- Brissova M, Fowler M, Wiebe P, Shostak A, Shiota M, Radhika A, Lin PC, Gannon M, Powers AC. Intra-islet endothelial cells contribute to revascularization of transplanted pancreatic islets. *Diabetes.* 2004; 53(5):1318-25.
- 167- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995; 376(6535):62-6.
- 168- Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B. Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg.* 2001; 25(4):509-15.
- 169- Vajkoczy P, Olofsson AM, Lehr HA, Leiderer R, Hammersen F, Arfors KE, Menger MD. Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin. *Am J Pathol.* 1995; 146(6):1397-405.
- 170- Parr EL, Bowen KM, Lafferty KJ. Cellular changes in cultured mouse thyroid glands and islets of Langerhans. *Transplantation.* 1980; 30(2):135-41.
- 171- Olsson R, Carlsson PO. Better vascular engraftment and function in pancreatic islets transplanted without prior culture. *Diabetologia.* 2005; 48(3):469-76.
- 172- Davalli AM, Scaglia L, Zangen DH, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC. Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes.* 1996; 45(9):1161-7.
- 173- Davalli AM, Scaglia L, Zangen DH, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC. Early changes in syngeneic islet grafts: effect of recipient's metabolic control on graft outcome. *Transplant Proc.* 1995; 27(6):3238-9.
- 174- Menger MD, Vajkoczy P, Leiderer R, Jäger S, Messmer K. Influence of experimental hyperglycemia on microvascular blood perfusion of pancreatic islet isografts. *J Clin Invest.* 1992; 90(4):1361-9.
- 175- Sandberg JO, Margulis B, Jansson L, Karlsten R, Korsgren O. Transplantation of fetal porcine pancreas to diabetic or normoglycemic nude mice. Evidence of a rapid engraftment process demonstrated by blood flow and heat shock protein 70 measurements. *Transplantation.* 1995; 59(12):1665-9.
- 176- Rooth P, Dawidson I, Lafferty K, Diller K, Armstrong J, Pratt P, Simonsen R, Täljedal IB. Prevention of detrimental effect of cyclosporin A on vascular ingrowth of transplanted pancreatic islets with verapamil. *Diabetes.* 1989; 38 Suppl 1:202-5.
- 177- Andersson A, Korsgren O, Jansson L. Intra-arterially transplanted pancreatic islets revascularized from hepatic arterial system. *Diabetes.* 1989; 38 Suppl 1:192-5.
- 178- Zhang N, Richter A, Suriawinata J, Harbaran S, Altomonte J, Cong L, Zhang H, Song K, Meseck M, Bromberg J, Dong H. Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization. *Diabetes.* 2004; 53(4):963-70.
- 179- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005; 438(7070):932-6. Review.
- 180- Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86(3): 353-64.
- 181- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000; 6(4): 389-95.
- 182- Pepper MS. Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire: de la biologie cellulaire à la clinique. *Médecine/Sciences.* 2000; 16: 1378-86.
- 183- Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn.* 2004; 231(3):474-88. Review.
- 184- Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86(3): 353-64.
- 185- Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ and Hargreaves JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* 2005; 9(4): 777-94.
- 186- Liekens S, De Clercq E and Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 2001; 61(3): 253-70.
- 187- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003; 9(6): 685-93.
- 188- Silvestre JS, Lévy BI. Role of matrix proteolysis in angiogenesis. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu.* 2002; 23-32.

Review.

- 189- Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005; 9(2):267-85. Review.
- 190- Jouan V, Canron X, Alemany M, Caen JP, Quentin G, Plouet J and Bikfalvi A. Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action. *Blood.* 1999; 94(3): 984-93.
- 191- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9(6):669-76. Review.
- 192- Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med.* 2004; 255(5):538-61. Review.
- 193- Clottes E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy. *Bulletin du Cancer.* 2005; Volume 92, Number 2, 119-27.
- 194- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001; 107 : 43-54.
- 195- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 2001; 292(5516):464-8.
- 196- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* 2002; 111(5):709-20.
- 197- Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL. *Nature.* 2002; 417(6892):975-8.
- 198- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 2002; 295(5556):858-61.
- 199- Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem.* 2003; 278:14013-9.
- 200- Richard DE, Berra E, Gothi   E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem.* 1999; 274:32631-7.
- 201- Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL and Haas TL. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(3):333-57.
- 202- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996; 380(6573):435-9.
- 203- Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. 2008; sous presse.
- 204- Fournier E, Birnbaum D, Borg JP. Les r  cepteurs pour les facteurs de la famille du VEGF. *Bulletin du Cancer.* 1997. Volume 84, Num  ro 4, 397-403.
- 205- Fergelot P, Rioux-Leclercq N, Patard JJ. Molecular pathways of tumour angiogenesis and new targeted therapeutic approaches in renal cancer. *Prog Urol.* 2005; 15(6):1021-9. Review.
- 206- Papetti M and Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282(5): C947-70.
- 207- Veeravagu A, Hsu AR, Cai W, Hou LC, Tse VC, Chen X. Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* 2007; 2(1):59-71. Review.
- 208- Hamada K, Oike Y, Takakura N, Ito Y, Jussila L, Dumont DJ, Alitalo K and Suda T. VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and hematopoiesis. *Blood.* 2003; 96, 3793-3800.
- 209- Kanazawa H. Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Monit.* 2007; 13(11):RA189-195. Review.
- 210- Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science.* 1997; 277(5322):48-50.
- 211- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M and Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995; 376, 66-70.
- 212- Fong G.H, Zhang L, Bryce DM and Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development.* 199; 126, 3015-3025.
- 213- Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(5):335-48. Review.
- 214- Thomas GV. mTOR and cancer: reason for dancing at the crossroads? *Curr Opin Genet Dev.* 2006; 16(1):78-84. Epub 2005 Dec 15. Review.
- 215- Dos Santos C, R  cher C, Demur C, Payrastre B. The PI3K/Akt/mTOR pathway: a new therapeutic target in the treatment of acute myeloid leukaemia. *Bull Cancer.* 2006; 93(5):445-7.
- 216- R  cher C, Dos Santos C, Demur C, Payrastre B. mTOR, a new therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell Cycle.* 2005; 4(11):1540-9.
- 217- R  cher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM, Benzaquen D, Laurent G, Huguet F, Payrastre B. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005; 105(6):2527-34.
- 218- Vasir B, Reitz P, Xu G, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC. Effects of diabetes and hypoxia on gene markers of angiogenesis (HGF, cMET, uPA and uPAR, TGF- α , TGF- β , bFGF and Vimentin) in cultured and transplanted

- rat islets. *Diabetologia*. 2000; 43(6):763-72.
- 219- Vasir B, Jonas JC, Steil GM, Hollister-Lock J, Hasenkamp W, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC. Gene expression of VEGF and its receptors Flk-1/KDR and Flt-1 in cultured and transplanted rat islets. *Transplantation*. 2001; 71(7):924-35.
- 220- Sigrist S, Mechine-Neuville A, Mandes K, Calenda V, Legeay G, Bellocq JP, Pinget M, Kessler L. Induction of angiogenesis in omentum with vascular endothelial growth factor: influence on the viability of encapsulated rat pancreatic islets during transplantation. *J Vasc Res*. 2003; 40(4):359-67.
- 221- Sigrist S, Mechine-Neuville A, Mandes K, Calenda V, Braun S, Legeay G, Bellocq JP, Pinget M, Kessler L. Influence of VEGF on the viability of encapsulated pancreatic rat islets after transplantation in diabetic mice. *Cell Transplant*. 2003; 12(6):627-35.
- 222- Vasir B, Aiello LP, Yoon KH, Quickel RR, Bonner-Weir S, Weir GC. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene and protein expression in cultured rat islet cells. *Diabetes*. 1998; 47(12):1894-903
- 223- Linn T, Schneider K, Hammes HP, Preissner KT, Brandhorst H, Morgenstern E, Kiefer F, Bretzel RG. Angiogenic capacity of endothelial cells in islets of Langerhans. *FASEB J*. 2003; 17(8):881-3.
- 224- Brissova M, Shostak A, Shiota M, Wiebe PO, Poffenberger G, Kantz J, Chen Z, Carr C, Jerome WG, Chen J, Baldwin HS, Nicholson W, Bader DM, Jetton T, Gannon M, Powers AC. Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor--a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes*. 2006; 55(11):2974-85.
- 225- Inoue M, Hager JH, Ferrara N, Gerber HP, Hanahan D. VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis. *Cancer Cell*. 2002; 1(2):193-202.
- 226- Christofori G, Naik P, Hanahan D. Vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and flk-1, are expressed in normal pancreatic islets and throughout islet cell tumorigenesis. *Mol Endocrinol*. 1995; 9(12):1760-70.
- 227- Lammert E, Gu G, McLaughlin M, Brown D, Brekken R, Murtaugh LC, Gerber HP, Ferrara N, Melton DA. Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol*. 2003; 13(12):1070-4.
- 228- Stagner J, Mokshagundam S, Wyler K, Samols E, Rilo H, Stagner M, Parthasarathy L, Parthasarathy R. Beta-cell sparing in transplanted islets by vascular endothelial growth factor. *Transplant Proc*. 2004; 36(4):1178-80.
- 229- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999; 18(14):3964-72.
- 230- Contreras JL, Smyth CA, Eckstein C, Bilbao G, Thompson JA, Young CJ, Eckhoff DE. Peripheral mobilization of recipient bone marrow-derived endothelial progenitor cells enhances pancreatic islet revascularization and engraftment after intraportal transplantation. *Surgery*. 2003; 134(2):390-8.
- 231- Flores FJ, Rincón J, Martín JF. Characterization of the iron-regulated desA promoter of *Streptomyces pilosus* as a system for controlled gene expression in actinomycetes. *Microb Cell Fact*. 2003; 2(1):5.
- 232- Müller G, Matzanke BF, Raymond KN. Iron transport in *Streptomyces pilosus* mediated by ferrichrome siderophores, rhodotorulic acid, and enantio-rhodotorulic acid. *J Bacteriol*. 1984; 160(1):313-8.
- 233- Peter HH. Therapeutic application of iron chelators--present state and research trends. *J Pharmacol*. 1985; 16(4):365-71.
- 234- Schafer AI, Cheron RG, Dluhy R, Cooper B, Gleason RE, Soeldner JS, Bunn HF. Clinical consequences of acquired transfusional iron overload in adults. *N Engl J Med*. 1981 F; 304(6):319-24.
- 235- Iancu TC, Ward RJ, Peters TJ. Ultrastructural changes in the pancreas of carbonyl iron-fed rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1990; 10(1):95-101.
- 236- Awai M, Narasaki M, Yamanoi Y, Seno S. Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am J Pathol*. 1979; 95(3):663-73.
- 237- Inoue Y, Nakanishi K, Hiraga T, Okubo M, Murase T, Kosaka K, Miyakoshi S, Mutoh Y, Kobayashi T. Recovery of pancreatic beta-cell function in hemochromatosis: combined treatment with recombinant human erythropoietin and phlebotomy. *Am J Med Sci*. 1997; 314(6):401-2.
- 238- Adams PC, Deugnier Y, Moirand R, Brissot P. The relationship between iron overload, clinical symptoms, and age in 410 patients with genetic hemochromatosis. *Hepatology*. 1997; 25(1):162-6.
- 239- Niederau C, Fischer R, Pürschel A, Stremmel W, Häussinger D, Strohmeyer G. Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*. 1996; 110(4):1107-19.
- 240- Salonen JT, Tuomainen TP, Nyyssönen K, Lakka HM, Punnonen K. Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study. *BMJ*. 1998; 317(7160):727.
- 241- Tuomainen TP, Nyyssönen K, Salonen R, Tervahauta A, Korpela H, Lakka T, Kaplan GA, Salonen JT. Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. Population study in 1,013 eastern Finnish men. *Diabetes Care*. 1997; 20(3):426-8.
- 242- MacDonald MJ, Cook JD, Epstein ML, Flowers CH. Large amount of (apo)ferritin in the pancreatic insulin cell and its stimulation by glucose.
- 243- Thielen V, Close P, Hennen G. Hemochromatosis: the most common of rare diseases. *Rev Med Liege*. 2004; 59(3):149-54. Review. *FASEB J*. 1994; 8(10):777-81.
- 244- Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Ricart W. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes*.

- 2002; 51(8):2348-54. Review.
- 245- Cavallo-Perin P, Pacini G, Cerutti F, Bessone A, Condo C, Sacchetti L, Piga A, Pagano G. Insulin resistance and hyperinsulinemia in homozygous beta-thalassemia. *Metabolism*. 1995; 44(3):281-6.
- 246- Gallou G, Guilhem I, Poirier JY, Ruelland A, Legras B, Cloarec L. Increased serum ferritin in insulin-dependent diabetes mellitus: relation to glycemic control. *Clin Chem*. 1994; 40(6):947-8.
- 247- Kaye TB, Guay AT, Simonson DC. Non-insulin-dependent diabetes mellitus and elevated serum ferritin level. *J Diabetes Complications*. 1993; 7(4):246-9.
- 248- Hoffbrand AV, Ganeshaguru K, Hooton JW, Tattersall MHN. Effect of iron deficiency and desferrioxamine on DNA synthesis in human cells. *Br. J. Haematol*. 1976; 33: 517-526.
- 249- Torti SV, Torti FM, Whitman SP, Brechbiel MW, Park G, Planalp RP. Tumor cell cytotoxicity of a novel metal chelator. *Blood*. 1998; 92(4):1384-9.
- 250- Kemp JD, Thorson JA, Stewart BC, Naumann PW. Inhibition of hematopoietic tumor growth by combined treatment with deferoxamine and an IgG monoclonal antibody against the transferrin receptor: evidence for a threshold model of iron deprivation toxicity. *Cancer Res*. 1992; 52(15):4144-8.
- 251- Chenoufi N, Baffet G, Drénou B, Cariou S, Desille M, Clément B, Brissot P, Lescoat G, Loréal O. Deferoxamine arrests in vitro the proliferation of porcine hepatocyte in G1 phase of the cell cycle. *Liver*. 1998; 18(1):60-6.
- 252- Chaston TB, Lovejoy DB, Watts RN, and Richardson DR. Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(1):402-14.
- 253- Defrère S, Van Langendonck A, Vaesen S, Jouret M, González Ramos R, Gonzalez D, Donnez J. Iron overload enhances epithelial cell proliferation in endometriotic lesions induced in a murine model. *Hum Reprod*. 2006; 21(11):2810-6.
- 254- Bertelsen M, Anggård EE, Carrier MJ. Oxidative stress impairs insulin internalization in endothelial cells in vitro. *Diabetologia*. 2001; 44(5):605-13.
- 255- Hernández SM, Sánchez MS, de Tarlovsky MN. Polyamines as a defense mechanism against lipoperoxidation in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2006; 98(1):94-102.
- 256- Calabrese V, Mancuso C, Sapienza M, Puleo E, Calafato S, Cornelius C, Finocchiaro M, Mangiameli A, Di Mauro M, Stella AM, Castellino P. Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress Chaperones*. 2007;12(4):299-306.
- 257- Berni A, Meschini R, Filippi S, Palitti F, De Amicis A, Chessa L. l-Carnitine enhances resistance to oxidative stress by reducing DNA damage in Ataxia telangiectasia cells. *Mutat Res*. 2008; 650(2):165-74.
- 258- Olejnicka BT, Ollinger K, Brunk UT. A short exposure to a high-glucose milieu stabilizes the acidic vacuolar apparatus of insulinoma cells in culture to ensuing oxidative stress. *APMIS*. 1997; 105(9):689-98.
- 259- Olejnicka BT, Andersson A, Tyrberg B, Dalen H, Brunk UT. Beta-cells, oxidative stress, lysosomal stability, and apoptotic/necrotic cell death. *Antioxid Redox Signal*. 1999; 1(3):305-15.
- 260- Messaris E, Antonakis PT, Memos N, Chatzigianni E, Leandros E, Konstadoulakis MM. Deferoxamine administration in septic animals: improved survival and altered apoptotic gene expression. *Int Immunopharmacol*. 2004; 4(3):455-9.
- 261- Mendola J, Wright JR Jr, Lacy PE. Oxygen free-radical scavengers and immune destruction of murine islets in allograft rejection and multiple low-dose streptozocin-induced insulinitis. *Diabetes*. 1989; 38(3):379-85.
- 262- Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, Lahm T, Meldrum KK, Lillemoe KD, Rescorla FJ, Meldrum DR. Iron chelation acutely stimulates fetal human intestinal cell production of IL-6 and VEGF while decreasing HGF: the roles of p38, ERK, and JNK MAPK signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 292(4):G958-63.
- 263- Chong TW, Horwitz LD, Moore JW, Sowter HM, Harris AL. A mycobacterial iron chelator, desferri-exochelin, induces hypoxia-inducible factors 1 and 2, NIP3, and vascular endothelial growth factor in cancer cell lines. *Cancer Res*. 2002; 62(23):6924-7.
- 264- Agani F, Semenza GL. Mersalyl is a novel inducer of vascular endothelial growth factor gene expression and hypoxia-inducible factor 1 activity. *Mol Pharmacol*. 1998; 54(5):749-54.
- 265- Lederberg J, Tatum E. *Reflections on Research and the Future of Medicine*. 1966; Columbia University.
- 266- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*. 1990; 323(9):570-8.
- 267- Onodera M, Ariga T, Kawamura N, Kobayashi I, Ohtsu M, Yamada M, Tame A, Furuta H, Okano M, Matsumoto S, Kotani H, McGarrity GJ, Blaese RM, Sakiyama Y. Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood*. 1998; 91(1):30-6.
- 268- Ladeinde AL, Ogunlewe MO, Adeyemo WL, Bamgbose BO. Gene therapy in the management of oral cancer: a review of recent developments. *Niger Postgrad Med J*. 2005; 12(1):18-22. Review.
- 269- Nikol S. Therapeutic angiogenesis for peripheral artery disease: gene therapy. *Vasa*. 2007; 36(3):165-73. Review.
- 270- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bouso P, Le Deist F, Fischer A. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science*. 2000; Vol. 288. no. 5466, pp. 669 - 672.
- 271- Heard JM, Danos O, Peschanski M. Réflexions sur l'avenir de la thérapie génique. *Médecine/Sciences*. 2000; vol.16, n°12, pp.1305-9.

- 272- Primrose SB, Twyman R, Old RW. Principes de génie génétique. 2004; Edition De Boeck Université.
- 273- Faivre V, Fessi H. Thérapie génique et vecteurs non viraux. Lyon Pharmaceutique. 2000; 51, 1, 1-13.
- 274- Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.* 2001; 7 (1): p. 33-40.
- 275- Kerr DJ, Young LS, Searle PF, McNeish IA. Gene directed enzyme prodrug therapy for cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997; 26(2-3):173-184.
- 276- Sangro B, Herraiz M, Prieto J. Gene therapy of neoplastic liver diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35 (2): p. 135-48.
- 277- Robbins PD, Tahara H, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.* 1998; 16 (1): p. 35-40.
- 278- Collot-Teixeira S. Implication de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) dans la lymphomogénèse du lymphome de Hodgkin: Rôle de l'oncogène viral DR7. 2003; Thèse Biologie, Sciences, Santé.
- 279- Samaniego LA, Neiderhiser L, DeLuca NA. Persistence and expression of the herpes simplex virus genome in the absence of immediate-early proteins. *J Virol.* 1998; 72 (4): p. 3307-20.
- 280- Gottesman MM. Cancer gene therapy: an awkward adolescence. *Cancer Gene Ther.* 2003; 10 (7): p. 501-8.
- 281- Miao CH, Nakai H, Thompson AR, Storm TA, Chiu W, Snyder RO, Kay MA. Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J Virol.* 2000; 74(8):3793-803.
- 282- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953; 84(3):570-3.
- 283- Fortier P. Mise au point d'un système de thérapie génique utilisant le gène HSV-TK couplé au promoteur muté de l'alpha-foetoprotéine dans un vecteur adénoviral. Thèse de Sciences. 2005; Université de Laval.
- 284- Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 2000; 81 (Pt 11): p. 2573-604.
- 285- Stewart PL, Chiu CY, Huang S, Muir T, Zhao Y, Chait B, Mathias P, Nemerow GR. Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. *EMBO J.* 1997; 16(6):1189-98.
- 286- Kannabiran C, Morris GF, Mathews MB. Dual action of the adenovirus E1A 243R oncoprotein on the human proliferating cell nuclear antigen promoter: repression of transcriptional activation by p53. *Oncogene.* 1999; 18 (54): p. 7825-33.
- 287- Fax P, Lipinski KS, Esche H, Brockmann D. cAMP-independent activation of the adenovirus type 12 E2 promoter correlates with the recruitment of CREB-1/ATF-1, E1A(12S), and CBP to the E2-CRE. *J Biol Chem.* 2000; 275(12):8911-20.
- 288- Halbert DN, Cutt JR, Shenk T. Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol.* 1985; 56 (1): p. 250-7.
- 289- Yang Y, Su Q, Wilson JM. Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs. *J Virol.* 1996; 70 (10): p. 7209-12.
- 290- Barnett BG, Crews CJ, Douglas JT. Targeted adenoviral vectors. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1575 (1-3): p. 1-14.
- 291- Csete ME, Benhamou PY, Drazan KE, Wu L, McIntee DF, Afra R, Mullen Y, Busuttill RW, Shaked A. Efficient gene transfer to pancreatic islets mediated by adenoviral vectors. *Transplantation.* 1995; 59(2):263-8.
- 292- Sigalla J, David A, Anegon I, Fiche M, Huvelin JM, Boeffard F, Cassard A, Soullillou JP, Le Mauff B. Adenovirus-mediated gene transfer into isolated mouse adult pancreatic islets: normal beta-cell function despite induction of an anti-adenovirus immune response. *Hum Gene Ther.* 1997; 8(13):1625-34.
- 293- Sigrist S, Langlois A, Mandès K, Calenda V, Braun S, Pinget M, Kessler L. Optimisation of VEGF overexpression into pancreatic Rat islets due to an in vivo transduction method. *Molecular Genetic. Soumis.*
- 294- Kim M, Zinn KR, Barnett BG, Sumerel LA, Krasnykh V, Curiel DT, Douglas JT. The therapeutic efficacy of adenoviral vectors for cancer gene therapy is limited by a low level of primary adenovirus receptors on tumour cells. *Eur J Cancer.* 2002; 38(14):1917-26.
- 295- Sung MW, Yeh HC, Thung SN, Schwartz ME, Mandeli JP, Chen SH, Woo SL. Intratumoral adenovirus-mediated suicide gene transfer for hepatic metastases from colorectal adenocarcinoma: results of a phase I clinical trial. *Mol Ther.* 2001; 4(3):182-91.
- 296- Stephenson J. Studies illuminate cause of fatal reaction in gene-therapy trial. *JAMA.* 2001; 285(20):2570.
- 297- Chenivresse X, Ridoux V, Tissier MH. Quality control of gene therapy products: approach of the French Agency for the Safety of Health Products. *Med Sci (Paris).* 2003; 19(4):481-8.
- 298- Rogers SA, Chen F, Talcott M, Hammerman MR. Islet cell engraftment and control of diabetes in rats after transplantation of pig pancreatic anlagen. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004; 286(4):E502-9.
- 299- Henkel AW, Bieger SC. Quantification of proteins dissolved in an electrophoresis sample buffer. *Anal Biochem.* 1994; 223(2):329-31.
- 300- Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-254.
- 301- Hayes CE, Goldstein IJ. An alpha-D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Isolation by affinity chromatography and characterization. *J Biol Chem.* 1974; 249(6):1904-14.
- 302- Roussel F. Marquage immunoperoxydasique (PAP) des vaisseaux sanguins par trois lectines: *Ulex europaeus* I (UEA I), *Lotus tetragonolobus* (LTA), *Dolichos biflorus* (DBA) = Immunoperoxydase (PAP) libelling of blood vessels with lectins: *Ulex europaeus* I (UEAI), *Lotus tetragonolobus* (LTA) *Dolichos biflorus* (DBA). *Comptes rendus des*

- séances de la Société de biologie et de ses filiales (C. r. séances Soc. biol. fil.) ISSN 0037-9026 CODEN CRSBAW. 1985; vol. 179, no1, pp. 59-69.
- 303- Vajkoczy P, Olofsson AM, Lehr HA, Leiderer R, Hammersen F, Arfors KE, Menger MD. Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin. *Am J Pathol.* 1995; 146(6):1397-405.
- 304- Tillmar L, Welsh N. In vitro cultured rat islets express genes that both prevent and promote angiogenesis. *JOP.* 2004; 5(2):81-91.
- 305- Related Articles, LinksBarr MP, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JJ. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for breast tumour cells under hypoxia. *Int J Oncol.* 2008; 32(1):41-8.

6. Présentations et publications

a) *Communications orales*

Cellular or gene therapy for type 1 diabetic patients: Overexpression of VEGF during islets transplantation. A.Langlois, K.Mandès, A.Belcourt, M.Pinget, L.Kessler, S.Sigrist, AIDPIT (Février 2006, Pise, Italie).

Surexpression de VEGF au cours de la transplantation d'îlots: thérapie génique ou cellulaire ? A.Langlois, K.Mandes, A.Belcourt, M.Pinget, L.Kessler, S.Sigrist, Alfediam (Mars 2006; Paris, France). *Diabetes&Metabolism*. 2006; p1S26.

Preservation of islets viability during transplantation: VEGF overexpression using cellular or gene therapy. A.Langlois, K.Mandès, A.Belcourt, M.Pinget, L.Kessler, S.Sigrist, TONECA (Juin 2006, Sitges, Espagne).

Effect of the deferoxamine in the overexpression of VEGF during islets transplantation. A.Langlois, K.Mandes, A.Belcourt, M.Pinget, L.Kessler, S.Sigrist, AIDPIT (Février 2007, Montpellier, France).

Overexpression of VEGF in vitro using deferoxamine: new drug to increase islet vascularisation during transplantation. A.Langlois, W.Bietiger, K.Mandes, E.Maillard, M.Pinget, L.Kessler, S.Sigrist, IPITA (Septembre 2007, Minneapolis, USA). *Xenotransplantation*. 2007; p405.

Overexpression of VEGF in vitro using deferoxamine: new drug to increase islet vascularisation during transplantation. A.Langlois, W.Bietiger, K.Mandes, E.Maillard, M.Pinget, L.Kessler, S.Sigrist, International Symposium Bioengineering and Regenerative Medicine (Septembre 2007, Mulhouse, France).

Approche pharmacologique ou génique pour la surexpression du VEGF par les îlots pancréatiques au cours de la transplantation? A.Langlois, W.Bietiger, E.Seyfritz, K.Mandes, E.Maillard, A.Belcourt, M.Pinget, L.Kessler, S.Sigrist, Alfediam (Mars 2008; Bruxelles, Belgique). *Diabetes&Metabolism*. 2008; pA30.

Pharmacologic approach or gene therapy for VEGF overexpression in pancreatic islets during transplantation? A.Langlois, W.Bietiger, E.Seyfritz, K.Mandes, E.Maillard, A.Belcourt, M.Pinget, L.Kessler, S.Sigrist, AIDPIT (Janvier 2008, Igls, Autriche).

b) *Communications affichées*

Immunomodulation des îlots pancréatiques : effet de l'irradiation UVB sur l'activation macrophagique. A.Langlois, G.Guidicelli, K.Mandes, M.Pinget, L.Kessler, S. Sigrist, SFE (Octobre 2005, Strasbourg, France). *Annales d'Endocrinologie*. 2005; p414-415.

Immunomodulation of pancreatic islets: Effect of UVB irradiation on macrophage activation. A.Langlois, G.Guidicelli, K.Mandes, M.Pinget, L.Kessler, S.Sigrist, AIDPIT (Février 2006, Pise, Italie).

Immunomodulation des îlots pancréatiques : effet de l'irradiation UVB sur l'activation macrophagique. A.Langlois, G.Guidicelli, K.Mandes, A.Belcourt, M.Pinget, L.Kessler, S.Sigrist, Alfediam (Mars 2006; Paris, France). *Diabetes&Metabolism*. 2006; p1S41.

Rôle de la déferoxamine dans la surexpression de VEGF au cours de la transplantation d'îlots. A.Langlois, K.Mandes, A.Belcourt, M.Pinget, L.Kessler, S.Sigrist, (Mars 2007; Marseille, France). *Diabetes&Metabolism*. 2007, p70.

c) *Prix de recherche*

Prix de recherche Est Transplant (Nancy, Novembre 2006): Apport de la surexpression du VEGF pour améliorer la viabilité des îlots pancréatiques au cours de la transplantation.

d) Articles

- Publié ou sous presse

Comparison of fat storage between Fischer 344 and obesity-resistant Lou/C rats fed different diets. Héliès JM, Diane A, Langlois A, Larue-Achagiotis C, Fromentin G, Tomé D, Mormède P, Marissal-Arvy N. *Obes Res.* 2005; 13(1):3-10.

Role of chemokine signaling pathways in pancreatic islet rejection during allo- and xenotransplantation. Sigrist S, Ebel N, Langlois A, Bosco D, Toso C, Kleiss C, Mandes K, Berney T, Pinget M, Belcourt A, Kessler L. *Transplant Proc.* 2005 ; 37(8):3516-8.

Strain differences in hypothalamic pituitary adrenocortical axis function and adipogenic effects of corticosterone in rats. Marissal-Arvy N, Gaumont A, Langlois A, Dabertrand F, Bouchecareilh M, Tridon C, Mormède P. *J Endocrinol.* 2007; 195(3):473-84.

Overexpression of VEGF *in vitro* using deferoxamine: new drug to increase islet vascularisation during transplantation. Langlois A, Bietiger W, Mandes K, Maillard E, Belcourt A, Pinget M, Kessler L, Sigrist S. *Transplant Proc.* 2008 (sous presse).

Perfluorocarbons, new tool for islets preservation *in vitro*. Maillard E, Sanchez-Dominguez M, Kleiss C, Langlois A, Sencier M.C, Vodouhe C, Bietiger W, Krafft M.P, Pinget M, Belcourt A, Sigrist S. *Transplant Proc.* 2008 (sous presse).

Sigrist S, Langlois A, Mandès K, Calenda V, Braun S Pinget M, Kessler L. Optimisation of VEGF overexpression into pancreatic Rat islets due to an *in vivo* transduction method. *Molecular Genetic.* (Soumis).

Adenoviral infection or deferoxamine? Two approaches to overexpress VEGF in β -cell lines.

Langlois A, Bietiger W, Vodouhe C, Mandes K, Maillard E, Pinget M, Belcourt A, Kessler L, Sigrist S. Laboratoire de recherche, CeeD Strasbourg, France. *Experimental Cell Research.* (Soumis).

- En rédaction

New tool for VEGF overexpression in pancreatic islets before transplantation: gene therapy using adenovirus or cellular approach with DFO? Langlois A, Bietiger W, Seyfritz E, Mandes K, Maillard E, Belcourt A, Pinget M, Kessler L, Sigrist S. *Cell Transplantation.*

Role of chemokine signaling pathways in pancreatic islet rejection during allo- and xenotransplantation.

Sigrist S, Ebel N, Langlois A, Bosco D, Toso C, Kleiss C, Mandes K, Berney T, Pinget M, Belcourt A, Kessler L.

Transplant Proc. 2005; 37(8):3516-8.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Role of chemokine signaling pathways in pancreatic islet rejection during allo- and xenotransplantation

S. SIGRIST, N. EBEL, A. LANGLOIS, D. BOSCO, C. TOSO, C. KLEISS, K. MANDES, T. BERNEY, M. PINGET, A. BELCOURT and L. KESSLER

Transplantation Proceedings, 2005, vol. 37, n° 8, pages 3516-3518

Articles : p. 193-... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.09.048>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Overexpression of VEGF in vitro using deferoxamine: new drug to increase islet vascularisation during transplantation.

Langlois A, Bietiger W, Mandes K, Maillard E, Belcourt A, Pinget M, Kessler L, Sigrist S. Transplant Proceeding. 2008 (sous presse).

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Overexpression of vascular endothelial growth factor in vitro using deferoxamine : a new drug to increase islet vascularization during transplantation

A. LANGLOIS, W. BIETIGER, K. MANDES, E. MAILLARD, A. BELCOURT, M. PINGET, L. KESSLER and S. SIGRIST

Transplantation Proceedings, 2008, vol. 40, pages 473-476

Articles : p. 193-... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.01.003>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Perfluorocarbons, new tool for islets preservation *in vitro*.

Maillard E, Sanchez-Dominguez M, Kleiss C, Langlois A, Sencier M.C, Vodouhe C, Beitiger W, Krafft M.P, Pinget M, Belcourt A, Sigrist S.
Transplant Proceeding. 2008 (sous presse).

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Perfluorocarbons : new tool for islets preservation in vitro

E. MAILLARD, M. SANCHEZ-DOMINGUEZ, C. KLEISS, A. LANGLOIS, M.C. SENCIER, C. VODOUHE, W. BEITIGIER, M.P. KRAFFT, M. PINGET, A. BELCOURT and S. SIGRIST

Transplantation proceedings, 2008, vol. 40, n° 2, pages 372-374

Articles : p. 193-... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.01.006>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Adenoviral infection or deferoxamine? Two approaches to overexpress VEGF in β -cell lines.

Langlois A, Bietiger W, Vodouhe C, Mandes K, Maillard E, Pinget M, Belcourt A, Kessler L, Sigrist.

Experimental Cell Research, soumis, 2008.

Adenoviral infection or deferoxamine? Two approaches to overexpress VEGF in β -cell lines

Langlois A, Bietiger W, Vodouhe C, Mandes K, Maillard E, Pinget M, Belcourt A, Kessler L, Sigrist S. *Laboratoire de recherche, CeeD Strasbourg, France*

Abstract

Introduction: A major obstacle to the success of islet transplantation is the inadequate vascularisation of pancreatic islet which may result in the death of islet tissue after transplantation. VEGF could play a critical role regarding islet revascularisation. The aim of this work was to compare two strategies to overexpress VEGF in pancreatic islets: gene therapy through adenoviral infection and a pharmacological approach using deferoxamine (DFO) **Materials and methods:** β -cell lines from rat insulinoma (RINm5F) were infected using an adenovirus encoding the gene of human VEGF 165 or incubated with DFO (10, 100 and 1000 $\mu\text{mol/L}$). The viability of RINm5F was measured and the expression of insulin, VEGF, Bax, Bcl-2 and HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) mRNAs quantified using RT-PCR. HIF-1 protein expression was performed using Western blotting. Finally, VEGF secretion was determined by Elisa test after 1 and 3 days treatment. **Results:** Addition of 10 $\mu\text{mol/L}$ DFO preserved RINm5F cell viability but decreased from $103.95 \pm 5.66\%$ at day 1 to $66.95 \pm 16.55\%$ at day 3 (n=4). In comparison, measurement of RINm5F viability of infected cells showed a preservation of cell proliferation during the experiment whatever the concentration used. In both durations, VEGF proved efficiently overexpressed in a comparable level. Analysis of the ratio Bax/Bcl-2 indicated that β -cells treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ DFO were surviving and infected β -cells were undergoing apoptosis. **Conclusion:** The pharmacological approach of VEGF overexpression using DFO seemed more tool to improve islets vascularization after transplantation than adenoviral infection with human VEGF 165 gene.

Address for correspondence

Allan Langlois
Centre européen d'étude du Diabète
Boulevard René Leriche
BP 30029
67033 STRASBOURG Cedex 2
Tel: (+33)390201212 Fax : (+33)390201219
E-mail: a.langlois@ceed-diabete.org

Introduction

One of the therapeutic alternatives of the treatment of type 1 diabetes is the intra liver transplantation of pancreatic islets aiming to reproduce the physiological secretion of insulin (1). Following the Edmonton protocol, islets transplantation can successfully induce a long term restoration of the insulin production, the normalization of the haemoglobin A1C and the lowering of hypoglycaemia excursions (2, 3). Nowadays, pancreatic islets grafting results in 80 % insulino-independence one year after transplantation. However, this rate falls to 10 % after 5 years despite a C peptide positive in a majority of patients (1).

Beside immune rejection, a major obstacle to the success of islet transplantation is the destruction of vascularization of pancreatic islets during isolation, inducing hypoxia, dysfunction and death of the graft (4, 5). Indeed, islets are like an organ with extensive inraislet vessels, formed of fenestrated capillary endothelial cell lining, essential to supply oxygen and nutrients to the cells in their inner core and to ensure rapid dispersal of pancreatic hormones in blood stream (6, 7). Moreover, indicating a low yield in the transplantation of isles, presumably due to impaired revascularization, were reported and can be explained by the insufficient angiogenesis to achieve optimal oxygenation of the transplanted islets (8, 9, 10). Therefore, a rapid and adequate revascularization of graft islets to occur within 7-14 days is crucial for islet survival and functioning (7, 11, 12).

The molecular mechanisms underlying islet revascularization are unknown. However, islet revascularization seems controlled by several factors (14, 15) such as the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) a powerful angiogenic growth factor stimulating new vessels formation (16, 17). Indeed, it plays a role in the maintenance of capillary system (18), by increasing vascular permeability (19) and initiates the revascularization of islets after transplantation (20). This expression of VEGF in pancreatic islets (21) decreases significantly in the first few days after transplantation (22). Genetic data indicate that VEGF is a major regulator of islet vascularization and revascularization of transplanted islets (23). Previous studies have shown that a local addition of VEGF during

transplantation of encapsulated rat islets increased the vascularization of the tissue surrounding the device (22) and induced a long term normoglycemia after transplantation in a model of diabetic mouse (24). Moreover, grafted islet proved stimulated when an elevated VEGF was produced by transfected vascular endothelial cells in the site of islet transplantation (25). The exploration of news strategies of VEGF overexpression in pancreatic islets could enhance islets neovascularization in early stage of transplantation and could improve the success of the graft.

Our purpose was to develop strategies to overexpress VEGF in β -cell lines through gene therapy or using a pharmacological approach with deferoxamine (DFO). The adenoviral infection allows an efficient overexpression of vectorized sequences (26, 27, 28) in non proliferating cells, such as pancreatic islets (26, 29, 30). In addition, adenovirus vectors can be produced in high titers without risk of insertional mutagenesis as their genomes are not integrated into chromosomes (29, 30). Previous studies have shown the improvement in islet function and vascularization following *ex vivo* transfection of human vascular endothelial growth factor gene (31). However, numerous risks are linked to gene therapy including the short-life nature of gene therapy, immune response, problems with viral vectors, chance of inducing a tumor (insertional mutagenesis), ... Thus, the pharmacological approach seems more conceivable to overexpress VEGF. For this purpose, DFO ($C_{25}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_4O_3S$), a bacterial siderophore (32) constitutes a potentially interesting method. Indeed, DFO is an aluminium and iron (III) chelator which has been used in the treatment of acute iron poisoning, chronic iron or aluminum overload and diseases like thalasemias (33). DFO removes both free and bound iron from hemosiderin and ferritin but not from hemoglobin, transferrin or cytochromes. Moreover, DFO was used to protect myocytes against peroxide-induced damages (34), stimulate VEGF expression in cells (35) and protect them against oxydative stress (36, 37) and macrophagic activation (37, 38).

The aim of this work was to evaluate the effect of these two approaches on proliferation, functionality and VEGF expression in a model of β cell lines.

Materials and methods

Cell lines and culture

RINm5F cells (Rat insulinoma β -cell line, LGC PromoChem, Molsheim, France) were grown to 80% confluence at 37°C in humidified air with 5% CO₂ i) in 96-wells culture plate (Becton Dickinson, Meylan, France) for viability and VEGF secretion studies, ii) in 24-wells treated culture plate (Becton Dickinson) for apoptosis study, iii) in 60x15mm culture dishes (Becton Dickinson) for mRNA extraction or iv) in 100x15mm culture dishes (Becton Dickinson) for protein extraction. RINm5F were cultured in a medium composed of RPMI 1640 (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium), 1% of a mixture of penicillin (10 000 UI/mL), streptomycin (10 mg/mL) and an Amphotericine B (25 μ g/mL) (ABAM, Sigma)).

Adenoviral infection

Two different adenovirus (Ad VEGF and Ad β -Galactosidase, Cell Biolabs, San Diego, USA) were used to infect β -cell lines RINm5F. These adenoviral vectors Ad β -Galactosidase (Ad β Gal) and Ad VEGF are built from human serotype 5 adenoviral deleted in E1 gene and E3 gene. Ad VEGF contains an expression including the human VEGF 165 gene. These viruses were thus non-replicative.

At 80% confluence, RINm5F cells were incubated for 3 hours at 37°C in 50 ml of medium with Ad β Gal or Ad VEGF with 3×10^6 VP/mL (100 Multiplicity Of Infection = MOI) or 6×10^6 VP/mL (200 MOI). The percentage of infected cells was determined using a β -Galactosidase Reporter Gene Staining Kit (Sigma) 1 and 3 days after infection.

reverse 5'-TCCAGTTGTGCCACTTGTC (39);

for Rat VEGF: forward 5'-CCCACTGAGGATCCAACAT,

reverse 5'-CATACCTCCCCTGTGCAACT;

for Rat HIF-1 α : forward 5'-TCAAGTCAGCAACGTGGAAG,

reverse 5'-TATCGAGGCTGTGTCGACTG.

Amplified products were loaded onto 1.5% agarose gels previously stained with 0.5 μ g/ml ethidium bromide, electrophoresed at 100 V for 30 minutes and then examined under a UV gel imaging system (Gel Doc 2000, BIO-RAD). Images were analyzed with the ImageJ and the semi-quantitative measurement of mRNA expression was given as the ratio of integrated OD with Insulin or VEGF or HIF-1 α toward β -actin.

VEGF protein secretion

After 1 and 3 days, culture medium was collected and stored at -20°C. VEGF measurements were performed using Rat VEGF Elisa Kit (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) and human VEGF Elisa Kit (Bender MedSystems, Austria) respectively for the pharmacological approach, and for the infection. The results were expressed in pg/ μ g of total protein.

Total protein extraction was performed at 4°C using 1 mL of extraction buffer for 10⁶ cells, containing 20 mmol/L Tris pH=8 (Euromedex), 137 mmol/L NaCl (Sigma), 1% IgPAL (Sigma), 31 mmol/L Phenylmethanesulfonyl fluoride (Sigma) and 10% glycerol (Sigma). Thirty minutes before use the buffer was supplemented with one tablet of protease inhibitor cocktail (Roche Dignostics GmbH, Mannheim, Germany) per 10 ml. Total protein concentration was quantified using Bradford assay (40)

Western blotting

Total cell lysates was obtained from cells solubilised in gel sample buffer (20 mmol/L dithiothreitol, 6% SDS, 0,25 mol/L Tris, pH 6.8, 10% glycerol and bromophenyl blue) sonicated with 3-4 burst of 5-

10 seconds each. Aliquots of nuclear extracts were heated in boiling water bath for 5 minutes. Equal amounts of protein (25 µg/lane) were separated using 4-12% SDS-PAGE (Biorad) and transferred to nitrocellulose membranes (Biorad), blocked with 3% nonfat dry milk in PBS 0.1% Tween-20 buffer (PBS-T) and incubated overnight at 4° C with with anti-rat HIF-1α monoclonal antibody (1/1000, R&D Systems, Minneapolis, USA) or with anti-mouse β-Actin monoclonal antibody (1/5000, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) diluted in blocking buffer. The membranes were washed three times for five minutes in PBS-T buffer, incubated with phosphatase alkaline-conjugated anti-mouse antibodies (1:2000, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for one hour at room temperature and developed with chemiluminescence reagent (Western Breeze, Invitrogen). Membranes were exposed to Kodak BioMax light film (Sigma). Images were scanned at 16-bit/600dpi resolution saved as tiff files and calibrated to an optical density scale. The integrated optical density of bands was quantified using the ImageJ v.1.34 software and normalize against β-Actin.

Hoechst staining

The detection of DNA fragmentation was performed using Hoechst 33258 (Sigma) staining after 1 and 3 days after treatment. Cells were recovered after trypsin treatment (Sigma) and fixed using cytospin technique. Then, the slides were incubated 5 minutes in the presence of Hoechst (1/1000) and observed in fluorescent microscopy.

Statistical analysis

All data were expressed as mean ± SD. Statistical analysis was performed using, t-test, or correlation analysis where appropriate (Sigmastat, Systat Software, Point Richmond, USA). In all statistical tests, p<0.05 was considered significant. The influence of the duration of the experiment and that of the treatment were represented respectively with (#) and (*).

Results

Adenoviral infection efficiency

RINm5F cells infection with adenoviral vectors proved efficient for β -galactosidase gene transfer (Fig 1). The quantification of adenoviral infection using β -galactosidase showed that 10% of cells were infected with 100 MOI (Fig. 1A) and 20% with 200 MOI (Fig. 1B) after 1 day treatment. However, the efficiency of infection increased after 3 days treatment: 40% of cells were infected with 100 MOI (Fig. 1C) and 60% with 200MOI (Fig. 1D).

Evaluation of cell viability and insulin expression

The study of RINm5F viability (Fig. 2A) has shown a preservation after 1 day incubation in the presence of 10 $\mu\text{mol/L}$ of DFO ($103.95\pm 5.66\%$; $n=4$). However, higher concentrations in DFO induced a significant decreased in β -cell viability by approximately 35% with both 100 $\mu\text{mol/L}$ and 1000 $\mu\text{mol/L}$ ($p<0.001$, $n=4$). A significant decrease by 35-70% in viability was observed after 3 days treatment with 10, 100 and 1000 $\mu\text{mol/L}$. Thus, only the concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ of DFO was selected for the ensuing experiments. The viability of infected RINm5F proved preserved during the experiment whatever the MOI used ($n=4$, Fig. 2A).

The study of the effect of VEGF on RINm5F revealed a significant stimulation of cell proliferation between 300 pg/mL ($115.59\pm 4.72\%$) and 1000 pg/mL ($116.68\pm 7.17\%$) of VEGF (Fig. 2B) after 1 day treatment ($p<0.001$; $n=3$). Similar results were observed after 3 days treatment.

Finally, the preservation of the expression of insulin mRNA (Fig. 2C) was observed after 1 day treatment using DFO (0.87 ± 0.09) and 100 MOI of adenoviral infection (0.55 ± 0.16) in comparison to control (0.75 ± 0.15) ($n=3$). In addition, after 3 days treatment, the insulin mRNA expression remained preserved with 100 MOI of adenovirus (0.88 ± 0.35 vs 1.01 ± 0.14 ; $n=3$) whereas adenoviral infection

with 200 MOI induced a significant decreased of the insulin mRNA expression during the treatment (0.25 ± 0.34 vs 0.75 ± 0.15 ; $n=3$; $p<0.01$ at day 1; 0.24 ± 0.03 vs 1.01 ± 0.14 ; $n=3$, $p<0,001$ at day 3). However, a significant overexpression of insulin mRNA was observed with 10 $\mu\text{mol/L}$ of DFO after 3 days treatment (2.00 ± 0.68 vs 1.01 ± 0.14 ; $p<0.01$; $n=3$).

Apoptosis:

Using Hoechst staining to analyse apoptosis, no DNA fragmentation after treatment with DFO or adenoviral infection was observed (Fig. 3).

Indeed, mRNA expressions of pro-apoptotic (Bax) and anti-apoptotic (Bcl-2) factors were similar after 1 day treatment (Fig. 4A). However, the expression of Bax mRNA increased significantly from 0.3 ± 0.13 to 1.01 ± 0.73 after 3 days treatment in control, from 0.33 ± 0.09 to 2.10 ± 0.64 and from 0.30 ± 0.15 to 1.42 ± 0.40 with respectively 100 MOI and 200 MOI under infection conditions ($p<0.05$; $n=3$) and was significantly lowered from 0.18 ± 0.05 to 0.07 ± 0.14 ($p<0,01$; $n=3$) with DFO treatment. The mRNA expression of Bcl-2 remained unchanged from 1 to 3 days of treatment in controls (from 0.46 ± 0.23 to 0.41 ± 0.17), DFO (from 0.35 ± 0.18 to 0.29 ± 0.12) and infection (from 0.44 ± 0.1 to 0.46 ± 0.16) using 100 MOI of adenovirus (Fig. 4B). However, infection with 200 MOI of adenovirus induced a significant overexpression of Bcl-2 mRNA from 0.48 ± 0.28 to 1.04 ± 0.16 ($p<0.001$; $n=3$).

Measurement of VEGF secretion

Study of VEGF expression (Fig. 5A) showed a significant stimulation of secretion with DFO and infection (200 MOI) as compared to control after 1 day treatment (2.45 ± 0.15) with DFO ($p<0.01$; $n=4$), 2.89 ± 0.39 with 200 MOI; ($p<0.05$; $n=3$) vs $2,12\pm 0,06$ $\text{pg}/\mu\text{g}$ total protein in controls). Similar results were obtained after 3 days treatment. Moreover, previous studies performed in our laboratory (Sigrist *et al.*, unpublished data) showed that adenoviral infection maintained VEGF overexpression during 14

days with a maximum at day 7 while VEGF overexpression was only maintained during 3 days with DFO.

However, it should be pointed out that, if the various treatments and the control exhibited no difference within the same duration, a significant difference was observed between and 3 days treatments. (Fig. 5B).

To understand the signalling pathway of VEGF overexpression using DFO, the expression of the HIF-1 α , a transcriptional factor involved in VEGF expression was measured.

RT-PCR analysis showed a significant increase of HIF-1 α mRNA expression from 1.07 ± 0.37 to 2.64 ± 1.00 after 1 to 3 days of culture for control ($p<0.001$, $n=6$, Fig. 6A). However, using DFO, HIF-1 α mRNA expression was comparable to control after 1 day treatment and was significantly reduced at day 3 (0.95 ± 0.20 ; $p<0.001$; $n=6$). Finally, western blotting analysis revealed an overexpression of HIF-1 α protein in the presence of DFO after 1 and 3 days treatments (0.65 ± 0.08 vs 0.19 ± 0.06 at 1 day; 1.12 ± 0.38 vs 0.24 ± 0.18 at 3 days; $p<0.001$; $n=3$).

Discussion

The importance of a rapid and adequate revascularization of transplanted islets to improve the success of the graft was demonstrated (10, 11, 12).and it was reported that VEGF seems to play a crucial role in islets revascularization (14, 15, 22, 24). Several studies have then focused on the development of strategies to overexpress VEGF using viral infection (25, 29). However, gene therapy exposes to risks and suffers from limitations. Viruses and other agents used to deliver the "good" genes can affect more than the target cells. Genes can also be "overexpressed," meaning they can drive the production of so much of a protein that they can be harmful. Contamination by the vector virus of other people or the environment constitutes a major and permanent risk.

Furthermore, the efficiency of an *in vitro* method of transfection proved insufficient to infect the entire islet only peripheral cells (27), thus representing a main limitation of the technique. Therefore, using DFO, we developed a pharmacological approach of VEGF overexpression in β -cell lines more conceivable for human use. In this work, gene therapy and the pharmacological approach displayed a comparable efficiency VEGF overexpression during the first few days after treatment. In addition, DFO (10 $\mu\text{mol/L}$) proved capable to improve RINm5F β -cells viability and functionality during transplantation by the transitional overexpression of VEGF and the chelation of free iron, suggesting that the pharmacological approach could be a more promising approach for the stimulation of VEGF expression in pancreatic islets to improve revascularization after transplantation.

The study has shown that DFO inhibited β -cell proliferation. This result was in accordance with the observation Chenoufi *et al.* who demonstrated that iron chelation by DFO prohibited the progression of porcine hepatocytes in the G1 phase of the cell cycle suggesting that iron was required for β -cell proliferation (41). Surprisingly, overexpression of insulin mRNA was also observed under 10 $\mu\text{mol/L}$ DFO. In fact, the origin of insulin resistance could be related to iron as this metal could play a crucial role in the inhibition of insulin expression in β cell (42, 43). Our results might find some explanation in the data reported by Olejnicka *et al.*, (36, 37) who have demonstrated that DFO protected β -cells against oxidative stress and improved insulin mRNA expression through iron chelation. However, higher concentrations of DFO proved deleterious for cell viability and functionality justifying the use of 10 $\mu\text{mol/L}$ DFO. At this concentration, an inhibition of cell apoptosis was observed with a decrease of Bax expression, a regulating protein involved in the activation of apoptosis (32). Similarly, the expression of Bcl-2, another apoptosis regulating protein, was preserved during the experiment. Therefore, the comparison of Bax and Bcl-2 expression indicated that β -cells treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ of DFO were in a survival phase whereas control β -cells underwent a way of death. Finally, the study of VEGF secretion showed a beneficial effect of DFO and demonstrated the capacity of β -cells to express this factor. In fact, this transient overexpression with DFO (after 3 days treatment) was due to an

increase in hypoxia characterized by an overexpression of HIF-1 α protein as previously described (35) because HIF-1 is a transcriptional factor composed of a subunit α with an expression hardly regulated and of a subunit β constitutively expressed. In conclusion, despite its toxicity at concentration above 10 $\mu\text{mol/L}$, DFO improved cells viability and functionality inducing a transient overexpression of VEGF. Regarding gene therapy, the preservation of cell proliferation through adenoviral infection with human VEGF165 could be explained by this potent and specific mitogenic growth factor (44). In agreement with previous data (44), this study confirmed that VEGF induced a significant increase in cell proliferation after 3 days infection with 100 MOI of adenovirus (44). However, adenoviral infection proved toxic for concentration higher than 100 MOI which induced a loss of β -cells function despite the preservation of cell viability. After adenoviral infection with 200 MOI, this result was confirmed by the overexpression of Bcl2 mRNA, probably due to VEGF overexpression. Consequently, the use of adenoviral infection to overexpress VEGF seemed to be deleterious for β - cells viability and functionality. As described elsewhere (25, 29), the adenoviral infection allowed an efficient VEGF overexpression comparable to 100 or 200 MOI of adenovirus. Moreover, in a previous study (Sigrist *et al.*, unpublished data), this overexpression was shown to be maintained in rat during 14 days with a peak of expression at day 7. Finally, the concentration of 100 MOI of adenovirus proved appropriate as compared to 200 MOI because it allowed an overexpression of VEGF without alteration of β -cell functionality.

In the first few days after treatments, VEGF overexpression was comparable with DFO and through gene therapy. The more transient overexpression with DFO might induce a lesser availability of VEGF after 3 days, the critical period of islets revascularisation *in vivo*. However, DFO was less toxic than adenovirus and induced a stimulation of β -cells functionality. Moreover, DFO protected cells against immune destruction (38) and enhanced insulin internalization and biological actions in chelating free iron (43), characteristic already used in human therapy as a treatment of iron overload like Thalasemias mellitus.

In conclusion, the pharmacological approach of VEGF overexpression using DFO seemed more promising to improve islets vascularization after transplantation than adenoviral infection with human VEGF 165 gene.

Figure 1

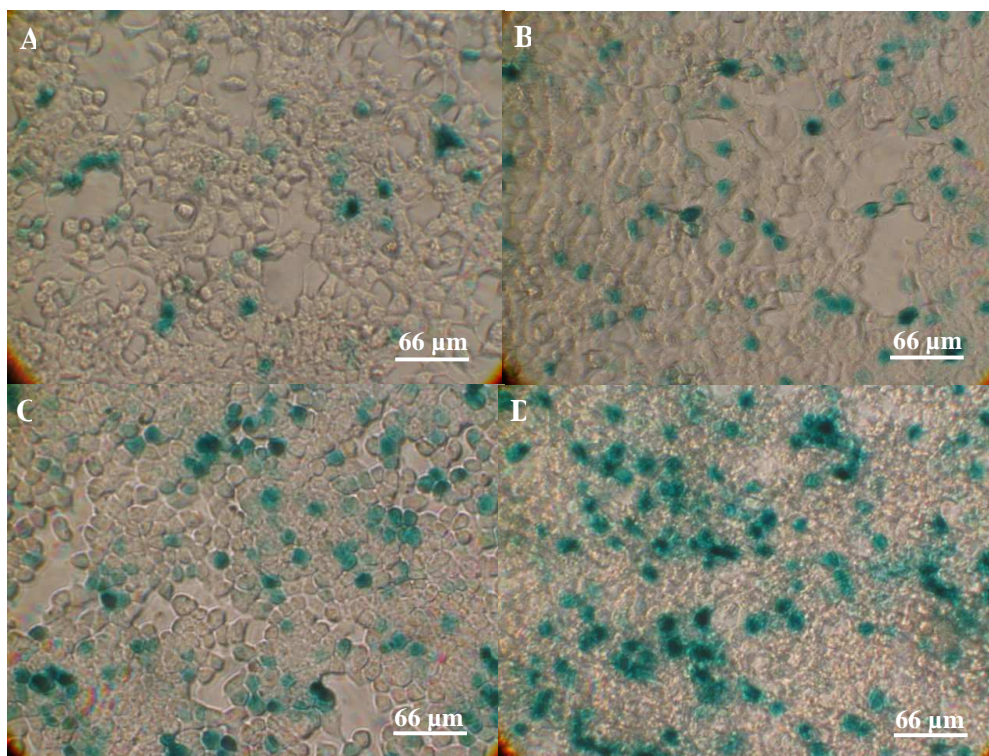


Figure 2

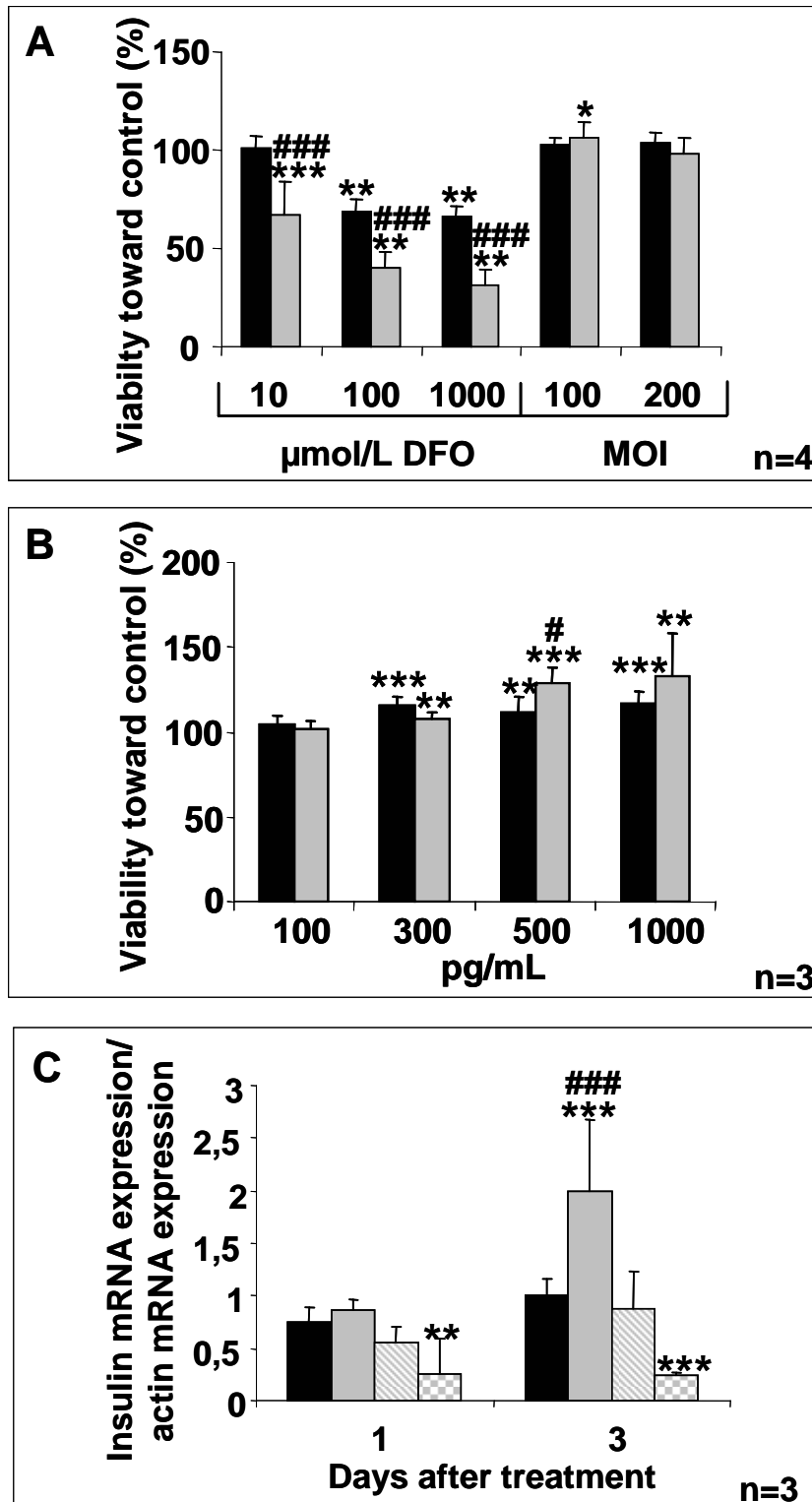


Figure 3

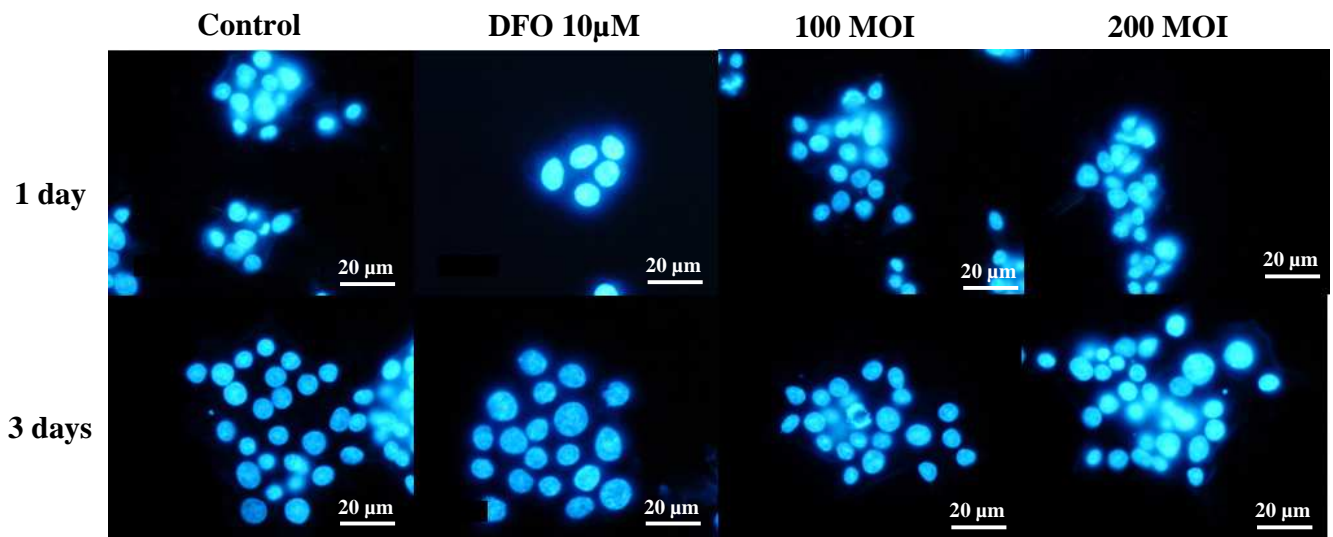


Figure 4

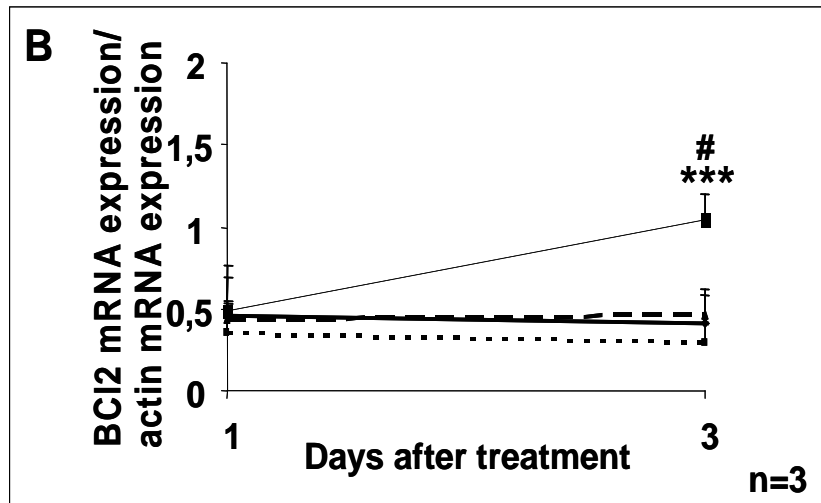
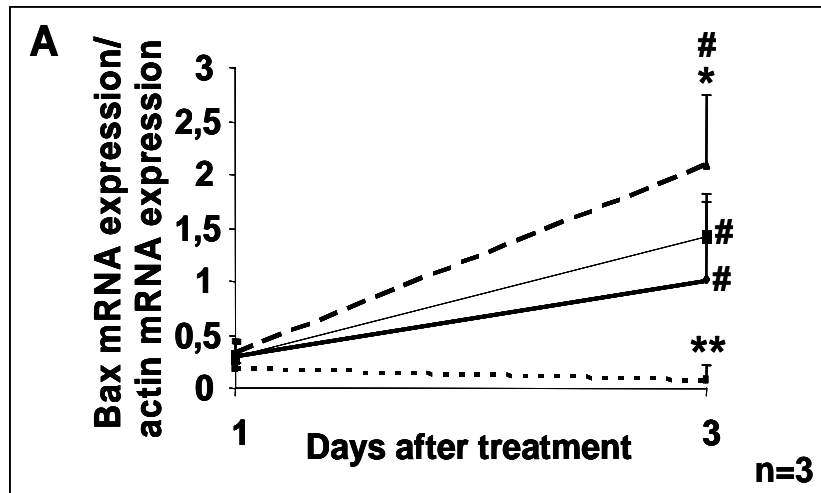


Figure 5

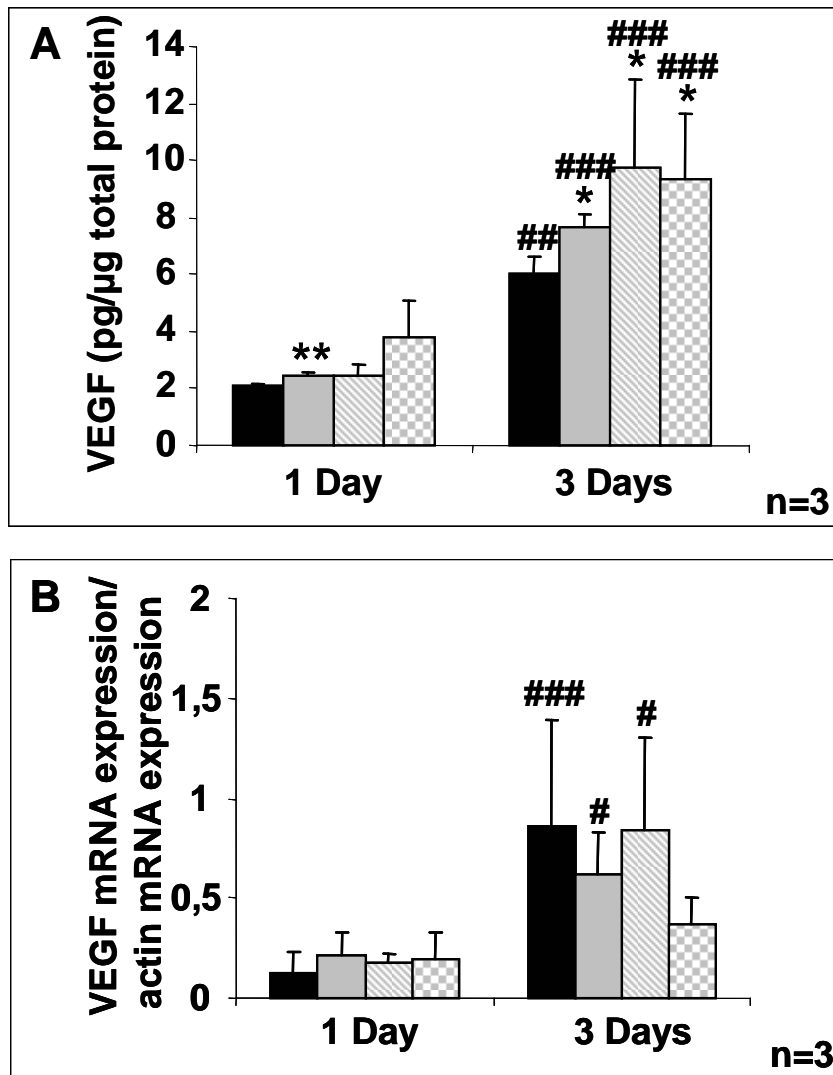
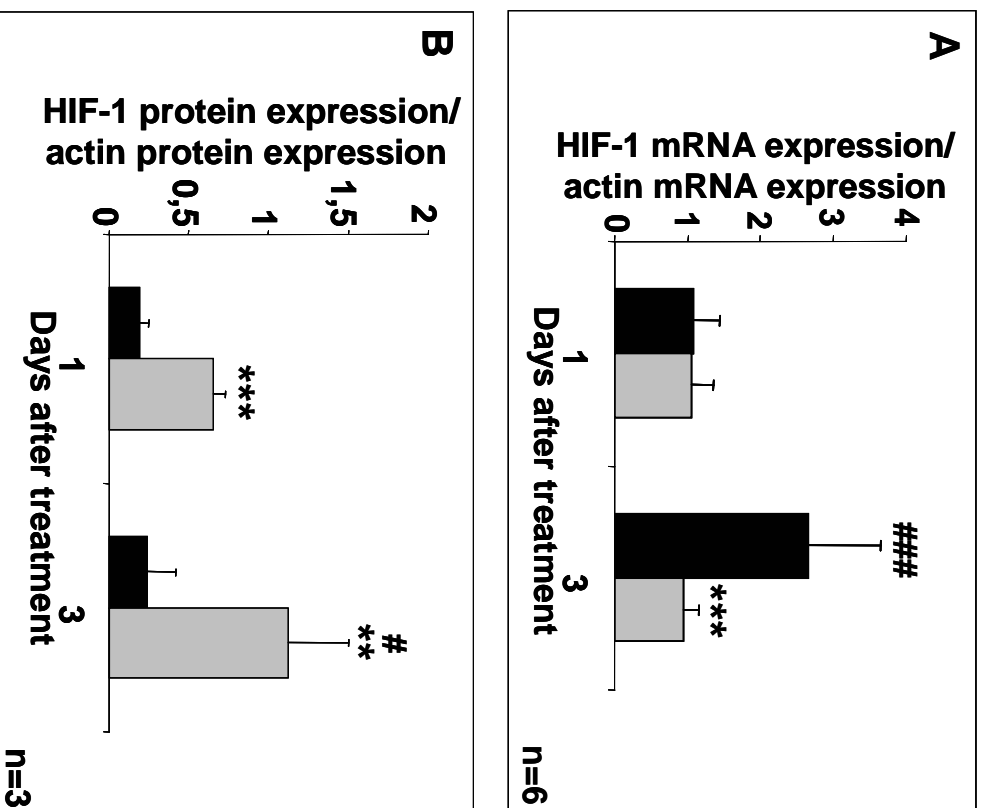


Figure 6



Legende

FIG.1: Adenoviral infection efficiency in RINm5F using β -galactosidase staining 1 day (A, B) and 3 days (C, D) after infection with 100 MOI (A, C) or 200 MOI (B, D) of adenovirus.

FIG.2: A, B: Viability of RINm5F cells using CellTiter 1 (black bar) and 3 days (grey bar) after treatment. C: Analysis of insulin expression after treatment (black bar: control, grey bar: 10 μ mol/L DFO, lined bar: 100 MOI and dotted bar: 200 MOI). Results were expressed as mean \pm SEM (***,###p<0.001; **p<0.01; *,#p<0.05).

FIG. 3: Detection of DNA fragmentation using Hoechst staining on RINm5F cells 1 and 3 days after treatment.

FIG.4: Comparison of Bax (A) and Bcl-2 (B) mRNA expression in control (—), DFO (- . - .), 100 MOI (— —) and 200 MOI. (——) 1 and 3 days after treatment. Results were expressed as mean \pm SEM (***,# p<0.001; ** p<0.01; *, # p<0.05).

FIG.5: RIN m5F VEGF secretion (A) and VEGF mRNA expression (B) after treatment (black bar: control, grey bar: 10 μ mol/L DFO, lined bar: 100 MOI and dotted bar: 200 MOI). Results were expressed as means \pm SEM (### p<0.001; **p<0.01; *, # p<0.05).

FIG. 6: Analysis of HIF-1 mRNA expression (A) and determination of HIF-1 protein expression (B) after treatment (black bar: control, grey bar: 10 μ mol/L DFO). Results were expressed as mean \pm SEM (***,# p<0.001; **p<0.01; ### p<0.001; # p<0.05).

REFERENCE

1. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbitt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med.* 2006; 355(13):1318-30.
2. Kessler L, Bucher P, Milliat-Guittard L, Benhamou PY, Berney T, Penfornis A, Badet L, Thivolet C, Bayle F, Oberholzer J, Renoult E, Brun MJ, Rifle G, Atlan C, Colin C, Morel P; GRAGIL Group. Influence of islet transportation on pancreatic islet allotransplantation in type 1 diabetic patients within the Swiss-French GRAGIL network. *Transplantation.* 2004; 77(8):1301-4.
3. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 2005; 54(7):2060-9.
4. Stagner JJ, Samols E. The induction of capillary bed development by endothelial cell growth factor before islet transplantation may prevent islet ischemia. *Transplant Proc.* 1990; 22(2):824-8.
5. Davalli AM, Scaglia L, Zangen DH, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC. Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes.* 1996; 45(9):1161-7.
6. Narang AS, Mahato RI. Biological and biomaterial approaches for improved islet transplantation. *Pharmacol Rev.* 2006; 58(2):194-243. Review.
7. Zhang N, Richter A, Suriawinata J, Harbaran S, Altomonte J, Cong L, Zhang H, Song K, Meseck M, Bromberg J, Dong H. Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization. *Diabetes.* 2004; 53(4):963-70.
8. Mattsson G. The endothelial cells in islets of langerhans. *Ups J Med Sci.* 2005; 110(1):1-15. Review.

9. Carlsson PO, Palm F, Andersson A, Liss P. Chronically decreased oxygen tension in rat pancreatic islets transplanted under the kidney capsule. *Transplantation*. 2000; 69(5):761-6.
10. Carlsson PO, Liss P, Andersson A, Jansson L. Measurements of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. *Diabetes*. 1998; 47(7):1027-32.
11. Menger MD, Vajkoczy P, Leiderer R, Jäger S, Messmer K. Influence of experimental hyperglycemia on microvascular blood perfusion of pancreatic islet isografts. *BJ Clin Invest*. 1992; 90(4):1361-9.
12. Andersson A, Korsgren O, Jansson L. Intraportally transplanted pancreatic islets revascularized from hepatic arterial system. *Diabetes*. 1989; 38 Suppl 1:192-5.
13. Hermann M, Margreiter R, Hengster P. Molecular and cellular key players in human islet transplantation. *J Cell Mol Med*. 2007; 11(3):398-415. Review.
14. Vasir B, Reitz P, Xu G, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC. Effects of diabetes and hypoxia on gene markers of angiogenesis (HGF, cMET, uPA and uPAR, TGF-alpha, TGF-beta, bFGF and Vimentin) in cultured and transplanted rat islets. *Diabetologia*. 2000; 43(6):763-72.
15. Vasir B, Jonas JC, Steil GM, Hollister-Lock J, Hasenkamp W, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC. Gene expression of VEGF and its receptors Flk-1/KDR and Flt-1 in cultured and transplanted rat islets. *Transplantation*. 2001; 71(7):924-35.
16. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res*. 2000; 55:15-35; discussion 35-6. Review.
17. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000; 407(6801):242-8. Review.
18. Gorden DL, Mandriota SJ, Montesano R, Orci L, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor is increased in devascularized rat islets of Langerhans in vitro. *Transplantation*. 1997; 63(3):436-43.
19. Lai Y, Schneider D, Kiszun A, Hauck-Schmalenberger I, Breier G, Brandhorst D, Brandhorst H, Iken M, Brendel MD, Bretzel RG, Linn T. Vascular endothelial growth factor increases functional

beta-cell mass by improvement of angiogenesis of isolated human and murine pancreatic islets. *Transplantation*. 2005; 79(11):1530-6.

20. Kuroda M, Oka T, Oka Y, Yamochi T, Ohtsubo K, Mori S, Watanabe T, Machinami R, Ohnishi S. Colocalization of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) and insulin in pancreatic islet cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80(11):3196-200.

21. Vasir B, Aiello LP, Yoon KH, Quickel RR, Bonner-Weir S, Weir GC. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene and protein expression in cultured rat islet cells. *Diabetes*. 1998; 47(12):1894-903.

22. Sigrist S, Mechine-Neuville A, Mandes K, Calenda V, Legeay G, Bellocq JP, Pinget M, Kessler L. Induction of angiogenesis in omentum with vascular endothelial growth factor: influence on the viability of encapsulated rat pancreatic islets during transplantation. *J Vasc Res*. 2003; 40(4):359-67.

23. Brissova M, Shostak A, Shiota M, Wiebe PO, Poffenberger G, Kantz J, Chen Z, Carr C, Jerome WG, Chen J, Baldwin HS, Nicholson W, Bader DM, Jetton T, Gannon M, Powers AC. Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor--a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes*. 2006; 55(11):2974-85.

24. Sigrist S, Mechine-Neuville A, Mandes K, Calenda V, Braun S, Legeay G, Bellocq JP, Pinget M, Kessler L. Influence of VEGF on the viability of encapsulated pancreatic rat islets after transplantation in diabetic mice. *Cell Transplant*. 2003; 12(6):627-35.

25. Cheng Y, Liu YF, Zhang JL, Li TM, Zhao N. Elevation of vascular endothelial growth factor production and its effect on revascularization and function of graft islets in diabetic rats. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(20):2862-6.

26. Csete ME, Benhamou PY, Drazan KE, Wu L, McIntee DF, Afra R, Mullen Y, Busuttill RW, Shaked A. Efficient gene transfer to pancreatic islets mediated by adenoviral vectors. *Transplantation*. 1995; 59(2):263-8.

27. Sigalla J, David A, Anegon I, Fiche M, Huvelin JM, Boeffard F, Cassard A, Soullillou JP, Le Mauff B. Adenovirus-mediated gene transfer into isolated mouse adult pancreatic islets: normal beta-cell function despite induction of an anti-adenovirus immune response. *Hum Gene Ther.* 1997; 8(13):1625-34.
28. Leibowitz G, Beattie GM, Kafri T, Cirulli V, Lopez AD, Hayek A, Levine F. Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors. *Diabetes.* 1999; 48(4):745-53.
29. Cheng K, Fraga D, Zhang C, Kotb M, Gaber AO, Guntaka RV, Mahato RI. Adenovirus-based vascular endothelial growth factor gene delivery to human pancreatic islets. *Gene Ther.* 2004; 11(14):1105-16.
30. Muruve DA, Manfro RC, Strom TB, Libermann TA. Ex vivo adenovirus-mediated gene delivery leads to long-term expression in pancreatic islet transplants. *Transplantation.* 1997; 64(3):542-6.
31. Narang AS, Sabek O, Gaber AO, Mahato RI. Co-expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-1 receptor antagonist improves human islet survival and function. *Pharm Res.* 2006; 23(9):1970-82.
32. Messaris E, Antonakis PT, Memos N, Chatzigianni E, Leandros E, Konstadoulakis MM. Deferoxamine administration in septic animals: improved survival and altered apoptotic gene expression. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4(3):455-9.
33. Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, Meldrum KK, Lillemoie KD, Meldrum DR. The struggle for iron: gastrointestinal microbes modulate the host immune response during infection. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(2):393-400.
34. Le CT, Hollaar L, Van der Valk EJ, Van der Laarse A. Desferrioxamine protects myocytes against peroxide-induced myocyte damage without affecting glutathione redox cycle turnover. *J Mol Cell Cardiol.* 1994; 26(7):877-87.
35. Agani F, Semenza GL. Mersalyl is a novel inducer of vascular endothelial growth factor gene expression and hypoxia-inducible factor 1 activity. *Mol Pharmacol.* 1998; 54(5):749-54.

36. Olejnicka BT, Ollinger K, Brunk UT. A short exposure to a high-glucose milieu stabilizes the acidic vacuolar apparatus of insulinoma cells in culture to ensuing oxidative stress. *APMIS*. 1997; 105(9):689-98.
37. Olejnicka BT, Andersson A, Tyrberg B, Dalen H, Brunk UT. Beta-cells, oxidative stress, lysosomal stability, and apoptotic/necrotic cell death. *Antioxid Redox Signal*. 1999; 1(3):305-15.
38. Mendola J, Wright JR Jr, Lacy PE. Oxygen free-radical scavengers and immune destruction of murine islets in allograft rejection and multiple low-dose streptozocin-induced insulinitis. *Diabetes*. 1989; 38(3):379-85.
39. Rogers SA, Chen F, Talcott M, Hammerman MR. Islet cell engraftment and control of diabetes in rats after transplantation of pig pancreatic anlagen. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; 286(4):E502-9.
40. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*. 1976; 72:248-254.
41. Chenoufi N, Baffet G, Drénou B, Cariou S, Desille M, Clément B, Brissot P, Lescoat G, Loréal O. Deferoxamine arrests in vitro the proliferation of porcine hepatocyte in G1 phase of the cell cycle. *Liver*. 1998; 18(1):60-6.
42. Guillygomarc'h A, Mendler MH, Moirand R, Lainé F, Quentin V, David V, Brissot P, Deugnier Y. Venesection therapy of insulin resistance-associated hepatic iron overload. *J Hepatol*. 2001; 35(3):344-9.
43. Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Ricart W. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes*. 2002; 51(8):2348-54. Review.
44. Xiao YF, Wu DD, Liu SX, Chen X, Ren LF. Effect of arsenic trioxide on vascular endothelial cell proliferation and expression of vascular endothelial growth factor receptors Flt-1 and KDR in gastric cancer in nude mice. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(48):6498-6505.

Optimisation de la revascularisation des îlots pancréatiques au cours de la transplantation: approche génétique ou pharmacologique?

Une revascularisation rapide et efficace des îlots pancréatiques au cours de la transplantation est essentielle pour la survie et la fonctionnalité du greffon à long terme. Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), un puissant facteur de croissance vasculaire, pourrait être un facteur clé dans la modulation de la revascularisation des îlots après la transplantation. Le but de ce travail était d'étudier l'effet de l'infection adénovirale ou de la déferoxamine (DFO), un chélateur du fer, sur la viabilité, la fonctionnalité et l'expression du VEGF sur les cellules β et les îlots pancréatiques *in vitro* et sur la revascularisation des îlots et le contrôle métabolique de rats diabétiques après transplantation.

In vitro, la DFO et l'infection adénovirale induisent une surexpression du VEGF qui dure respectivement 3 et 14 jours. La DFO pour une concentration de 10 $\mu\text{mol/L}$ permet une préservation de la viabilité, une stimulation de la fonctionnalité et est anti-apoptotique sur les cellules β et les îlots pancréatiques. Par contre, l'infection adénovirale est pro-apoptotique et induit une diminution de la fonctionnalité et de l'expression de l'ARNm de l'insuline dans les cellules β et les îlots pancréatiques. Finalement, l'étude *in vivo* confirment les données *in vitro*, montrant une stimulation de la revascularisation des îlots et une amélioration du contrôle métabolique chez le rat diabétique pour une pré-incubation des îlots pendant 3 jours en présence de DFO. De même, l'étude *in vivo* confirme l'effet délétère de l'infection adénovirale sur le contrôle métabolique par rapport à une transplantation classique malgré une stimulation de la revascularisation.

En conclusion, l'approche pharmacologique de surexpression du VEGF par la DFO semble être un outil plus prometteur qu'une infection adénovirale du gène du VEGF pour améliorer la viabilité du greffon après transplantation.

Optimization of pancreatic islets revascularization after transplantation: Pharmacological approach or gene therapy?

Rapid and adequate revascularisation of transplanted islets is important for islet survival and function during transplantation. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), a major angiogenic growth factor, may be a key factor in modulating the revascularization of islets after transplantation. The aim of this work was to study the effect of adenoviral infection or deferoxamine (DFO), an iron chelator, on β cells and pancreatic islets viability, functionality and VEGF expression *in vitro* and on islets revascularisation and on metabolic control of diabetics rats after transplantation.

In vitro, DFO and adenoviral infection induce VEGF overexpression during respectively 3 and 14 days. DFO, for a concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$, allows a preservation of β cells and pancreatic islets viability, a stimulation of functionality and present an anti-apoptotic effect. Adenoviral infection is pro-apoptotique and induces a reduction of functionality and expression of insulin mRNA in β cells and islets. Finally, the *in vivo* study confirms the *in vitro* data, showing a stimulation of islets revascularization and an improvement of metabolic control of diabetics rats for a pre-incubation of islets during 3 days in the presence of DFO. Also, the *in vivo* study confirms the deleterious effect of adenoviral infection on metabolic control in comparison with a classical transplantation, despite a stimulation of islets revascularisation.

In conclusion, the pharmacological approach of VEGF overexpression using DFO seemed more promising to improve islets vascularization after transplantation than adenoviral infection with human VEGF 165 gene.