UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ECOLE DOCTORALE 414-Sciences de la vie et de la santé

UMR-INSERM 1260 : Nanomédecine Régénérative
Dysfonction d'organe et transplantation

THÈSE

Présentée par :

Lamia AMOURA

Soutenue le : ***28 Novembre 2018***

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

Discipline/ Spécialité : **Recherche clinique translationnelle**

Caractérisation des microvésicules comme biomarqueurs de suivi de la greffe d'îlots pancréatiques et de l'efficacité thérapeutique dans l'athérosclérose en pathologies humaines.

THÈSE dirigée par :

Mme Laurence KESSLER	Professeur, Université de Strasbourg
Mme Florence TOTI	Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. Angela TESSE	Professeur, Université de Nantes
Mme. Anne WOJTUSCISZYN	Professeur, Université de Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr. Jérôme DE SEZE	Professeur, Université de Strasbourg
Mr. Paul KERTH	Directeur de Recherches, Préventor µTBC GmbH

Serment éthique des Chercheurs en Sciences de la Vie

« Je jure d'être fidèle à l'éthique du respect des personnes et des vies humaines et de contribuer au développement de la connaissance et à la plus large diffusion du savoir.

Je respecterai toutes les espèces dans leur biodiversité : ce respect inspirera mes actes et mes projets, notamment au cours de mes expérimentations sur les animaux ou les tissus humains.

Je m'efforcerai de soulager les souffrances de tous les êtres vivants.

Admise à avoir accès à l'intimité tissulaire ou génétique des personnes, je tairai leur identité et m'astreindrai au secret médical.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je m'informerai et réfléchirai au sens de mes expérimentations et à leurs connaissances.

Je veillerai à ce que mes travaux et recherches ne soient pas utilisés à des fins de destruction ou de manipulation.

Je respecterai les savoirs des ethnies et des sociétés traditionnelles. Je n'aurai garde d'oublier mes responsabilités à l'égard des générations présentes et futures.

Je n'accepterai pas que des considérations de nationalités, de culture, de politiques ou d'avantages matériels me détournent de mes devoirs.

J'interviendrai pour défendre, s'il m'en est donné l'occasion, l'ensemble de ces règles. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque. »

Le Serment éthique pour les chercheurs en sciences de la vie, adapté et inspiré du Serment d'Hippocrate médical, a été prononcé pour la première fois par un étudiant, Emmanuel LEMAZURIER, le 22 décembre 2000, soutenant sa thèse dans le laboratoire du Pr. Gilles–Eric SERALINI (Université de Caen). En 1999, le prix Nobel Joseph Rotblat a publié l'idée avec un texte en anglais plus court (Science Vol. 286, 19 Nov. 1999, p.1475).

Remerciements

Je remercie l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse : les Professeurs ***Angela TESSE*** *et* ***Anne WOJTUSCISZYN*** *d'avoir accepté d'évaluer cette thèse et d'en être rapporteurs. Je remercie également le Pr.* ***Paul KERTH*** *d'honorer la présidence du jury lors de ma soutenance ainsi que le Pr.* ***Jérôme DE SEZE*** *pour assister à la présentation de ce travail. Vous trouverez ici l'expression de ma profonde reconnaissance et l'expression de mes remerciements les plus sincères.*

Bien plus que les mots ne peuvent le dire, je souhaite remercier mes directrices de thèse Laurence Kessler et Florence Toti pour… pour… pour tout ! Duo de choc, duo en or ! Vous avez mis au cœur de votre vie professionnelle la formation de vos étudiants avant toute autre chose. Et cet enseignement, ce dévouement dépasse la simple transmission de savoir scientifique. Merci de m'avoir initié à une approche multidisciplinaire et transversale.

Madame Professeur Kessler. Merci d'avoir eu confiance en moi et de m'avoir accueilli dans votre équipe. Merci pour votre soutien, pour votre enthousiasme et pour vos conseils. Merci de m'avoir guidé au cours de ces quatre années, pour toutes les opportunités et les moyens que vous m'aviez offerts afin de m'épanouir scientifiquement et professionnellement.

Je tiens tout particulièrement à exprimer mon immense gratitude à ma co-directrice de thèse Professeur Florence TOTI pour sa patience inconditionnelle au quotidien, son encadrement, son investissement infatigable, ses conseils et sa grande disponibilité tout au long de ma thèse. Elle a toujours su me guider dans mes réflexions et m'a permis de développer un esprit scientifique critique. De part sa grande culture scientifique, sa force tranquille et sa douceur naturelle, elle fut pour moi un modèle. Merci pour ces heures passées à corriger mon mémoire. Sans vous, cette thèse n'aurait jamais pu être menée à bien. MERCI CHEF !!!

Je suis également très reconnaissante envers Professeur Valérie SCHINI-KERTH et à son laboratoire de recherche, pour le soutien généreux dans la réalisation de mes objectifs professionnels. J'ai eu la chance d'avoir travaillé avec vous et de vous avoir comme collaborateurs. Un grand merci à Cyril et Brigitte pour le partage scientifique.

Ce projet n'aurait pas pu aboutir sans le travail de notre technicienne de laboratoire

Fatiha EL GHAZOUANI-ZOBAIRI et de nos collaborateurs où je tiens à exprimer ma profonde gratitude :

- *Au centre investigateur de recherche clinique - INSERM CIC 1434 et en particulier au Dr. Catherine Mutter*
- *Dr. GEORG Yannick et tout le service de chirurgie vasculaire du NHC de Strasbourg*
- *Pr. Nelly Boehm l'ensemble de son équipe de l'Institut d'Histologie, Université de Strasbourg*

Je souhaiterais également exprimer ma profonde gratitude a « Clinicagroup » et à son fondateur Salah Sahraoui qui ont financé 2 ans de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma famille et tout d'abord à ses femmes fortes qui la composent et qui m'inspirent. Je remercie ma Maman, Lila, mon exemple, qui a soutenu mes choix pendant toutes les étapes de ma vie. Je remercie également, mes sœurs, Kenza, Anissa, pour tout évidemment ! Un soutien sans faille pendant ces années de thèse ! Il m'est impossible de ne pas citer ici ma sœur de cœur Moufida : merci d'avoir été un guide et d'avoir cru en moi, merci pour ton sourire et ta force ! Je remercie également mon papa, Abdelkader de m'avoir donné la liberté et la possibilité de faire les études de mon choix. C'est aussi grâce à toi si j'en suis arrivée là ! Je remercie également mon frère, Lamine, pour la force et la détermination qu'il m'a inspiré. Enfin, je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à mes enfants Lila, Wassime et Hannah d'être si merveilleux, si patients et qui m'ont rendu surtout plus forte, j'espère qu'ils seront fiers de leur Maman. L'arrivée de ma nièce avant l'envoi de mon manuscrit me permet de lui dédier une pensée … à toi ma petite Mellina !!!

Un grand MERCI à mes amis fidèles, particulièrement à Mohamad KASSEM, Ali HABHAB, Raed ALTAMIMY, Sonia KHEMAIS, Guillaume KRETTER pour leur soutien, leur amour et leur plaisir. Merci pour votre présence et votre amitié revigorante ! Je souhaite encore remercier sincèrement mes collègues de travail Malak, Blandine, Akmal, Abdelwahid, Suning, Margaux, Léa et Hanin. Je vous remercie de m'avoir soutenue et conseillée pendant toute la durée de la thèse, ainsi que votre implication dans ce projet.

Tous mes remerciements à Allah pour l'inspiration et toutes les opportunités qui ont rendu cela possible.

Table des matières

Table des matières iv
Liste des tableaux vi
Liste des figures vii
Liste des abréviations ix
I. Les vésicules membranaires Extracellulaires 2
I.1 Caractéristiques générales 2
I.2 Les différents types de vésicules motions épistémologiques 2
I.2.1 Corps apoptotiques 5
I.2.1 Microvésicules 5
I.3 Exosomes 7
I.4 Capture et internalisation des vésicules extracellulaires 10
I.5 Principe et méthodes différenciées d'isolement et d'analyse 12
II. Microvésicules 18
II.1 Pertinence physiopathologique des microvésicules 18
II.2 Mécanisme de formation des MVs 19
II.2.1 Asymétrie de la membrane plasmique 19
II.2.2 Remodelage membranaire à l'origine de la vésiculation 21
II.3 Cible des Microvésicules et Clairance 27
II.4 Isolement et dosage des microvésicules : Application en recherche clinique 30
II.4.1 Etapes pré-analytiques pour les études cliniques 30
III. Microvésicules marqueurs circulants de l'atteinte vasculaire 33
III.1 Les biomarqueurs actuels de l'atteinte vasculaire 33
III.2 Exigences pour les biomarqueurs futurs 35
III.3 Microvésicules comme marqueurs circulants de l'atteinte vasculaire 36
III.3.1 Impact du flux sanguin sur l'endothélium et la génération de MVs 36
III.3.2 Valeur pronostique des MVs circulantes dans les maladies cardiovasculaires 41
IV. Microvésicules effecteurs cellulaires du compartiment vasculaire 56
IV.1 MVs effecteurs de la dysfonction endothéliale 56
IV.1.1 MVs et inflammation vasculaire 59
IV.1.2 MVs, coagulation et thrombus 62
IV.2 MVs et réponse inflammatoire dans les tissus 64
IV.3 MVs, vieillissement et sénescence 64
IV.3.1 Vieillissement érythrocytaire et plaquettaire 64
IV.3.1 MVs et Sénescence endothéliale 65
V. Les microvésicules tissulaires 70
V.1 Les MVs du tissu athéro-thrombotique 70
V.1.1 Les microvésicules intra-plaque 70
V.1.2 Microvésicules dans la chronologie de l'athérosclérose : 73
V.2 Les MVs du tissu hépatique et la vascularisation du foie 76
V.2.1 Intérêt des MVs comme marqueur d'un remodelage hépatique 77
V.2.2 MVs et la regénération tissulaire 79
VI. Intérêt des microvésicules pour le suivi thérapeutique 82
VI.1 Transplantation et thérapie cellulaire 82
I.1.1 MVs en transplantation d'organes 82
VI.1.2 MVs en thérapie cellulaire 85
Hypothéses et objectifs 112
Travaux personnels 115

Partie I: Interét des MVs circulantes pour la détection précoce de la dysfonction du greffon chez les patients diabétiques de type 1 transplantés d'ilots et ulilités pour l'identification de la cause de la perte de fonction du greffon……116
I. Justification/contexte……117
II. Objectifs et méthodologie 118
II.1 Sélection des anticorps anti PSA-NCAM……120
II.2 Validation de l'anticorps anti PSA-NCAM pour la capture des MVs……..120
II.3 Validation du dosage des MVs PSA-NCAM^{+} en plasma……121
II.4 Etude pilote MIPIL : Méthodes d'analyse……....122

III. Article I : Interest of plasma microvesicles to monitor pancreatic islets graft dysfunction : beta- cell and leukocyte-derived microvesicles as specific features in a pilot longitudinal study……..123
VI. Limites et perspectives de l'étude pilote MIPIL……...172

Partie II: Approche méthodologique pour l'étude des MVs tissulaires chez l'homme et le rat…..174
I. Contexte……....175
I. 1 MVs intra plaque chez les patients présentant une sténose carotidienne opérable..... 175
I.1.1 Rationnel de l'étude POMEGA..... 175
I.1.2 Caractérisation de la cohorte de patients (étude POMEGA)..... 177
I.1.2.1 Objectifs de l'essai..... 177
I.1.2.2 Population étudiée 177
I.2 MVs aortiques chez les rats traités par EPA : DHA (6 :1) ……179
II.1 Approche méthodologique pour l'étude des MVs tissulaires chez l'homme……180
II.1.1 Validation d'un nouveau protocole d'isolement des MVs à partir de la plaque d'athérosclérose humaine chez les patients avec sténose carotidienne……...181
II.1.1.1 Outils de la phase pré-analytique……..181
II.1.1.2 Validation de la méthode de découpage de la plaque ……182
II.1.1.3 Optimisation du rendement de purification des MVs 183
II.1.2 Caractérisation de la plaque d'athérome chez les patients avec sténose carotidienne non traités par oméga 3 : MVs, marqueurs thrombotiques et d'instabilité..... 187
II.1.2.1 Matériels et méthodes..... 187
II.1.2.2 Résultats 189
II.2 : Approche méthodologique pour l'étude des MVs tissulaires chez le rat……195
II.2.1 Validation du protocole d'isolement des MVs à partir des aortes de rat jeune……..196
II.2.2 Impact des EPA : DHA (6 :1) sur l'émission des MVs par différents segments vasculaires dans un protocole d'étude optimisé……..197
II.2.3 Impact de la formulation en oméga sur l'émission de MVs aortiques par les rats jeunes 198
II.2.4 Article en préparation : Microvesicles of the aortic wall sense vasoprotection by VascazenTM in aged rats……200
Discussion et perspectives……215
Conclusion générale : de la MV biomarqueur à la MV effectrice……226
Références..... 230
…….....

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des différents types de vésicules extracellulaires. D'après (Yin, Loyer et al. 2015). 4
Tableau 2 : Les différentes méthodes de mesure de VEs. Adapté de (Burger, Schock et al. 2013). 14
Tableau 3 : Stimuli de la libération des Microvésicules à partir de cellules circulantes ou de la paroi vasculaire. Adapté de (Rautou, Vion et al. 2011) 22
Tableau 4 : Récapitulatif des résultats de transplantations pancréatiques et d'îlots. Adaptés de (Papas, Karatzas et al. 2013) (Anne Wojtusciszyn and group 2018) 94
Tableau 5: Nombre de patients nécessaires pour valider les MV-PSA-NCAM$^+$ en tant que marqueur du dysfonctionnement du greffon des îlots. 173

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des types de vésicules extracellulaires (VEs) libérées par une cellule. *D'après (Gustafson, Veitch et al. 2017)* 3
Figure 2 : Représentation schématique de molécules actives véhiculées par les MVs et les effets biologiques associés. Adaptés de (Dignat-George and Boulanger 2011)..... 6
Figure 3 : Biogenèse, sécrétion et composition des exosomes. (Kalra, Drummen et al. 2016)..... 8
Figure 4 : Principaux mécanismes impliqués dans l'internalisation des vésicules extracellulaires. 11
Figure 5 : Différentes méthodes d'isolement primaire utilisées dans les laboratoires (%). (Gardiner, Di Vizio et al. 2016). 12
Figure 6 : Isolement des vésicules extracellulaires...... 13
Figure 7 : Méthodes utilisées pour la caractérisation des VEs (%). D'après (Gardiner, Di Vizio et al. 2016). *FCM : cytométrie en flux* 16
Figure 8 : La fonction des transporteurs de phospholipides. (Coleman, Quazi et al. 2013)..... 20
Figure 9 : Les acteurs clés du remodelage membranaire et de l'excrétion des MV procoagulants. (Morel, Jesel et al. 2011) 25
Figure 10 : Acteurs classiques et potentiels de l'émission des MVs. Adapté de (Kalra, Drummen et al. 2016) 27
Figure 11 : Mécanismes impliqués dans la clairance des MVs circulantes. 28
Figure 12 : Probabilité d'apparition de la maladie (risque) selon le premier moment possible pour sa prédiction. *(Muller 2012)*..... 34
Figure 13 : Les différentes fonctions métaboliques et de synthèse des cellules endothéliales... 37
Figure 14 : Les caractéristiques classiques du dysfonctionnement endothélial. 39
Figure 15 : Flux sanguin et sites de formation des plaques d'athérosclérose. Adaptés de (Malek, Alper et al. 1999). 43
Figure 16 : Schéma des différentes étapes de la formation des plaques d'athéroscléroses...... 45
Figure 17 : Origine cellulaire des microparticules circulantes dans le sang périphérique et artériel de patients coronaires. (Leroyer, Isobe et al. 2007)..... 50
Figure 18 : Mécanismes conduisant à une dysfonction endothéliale dans le diabète. 52
Figure 19 : Caractéristiques des cellules sénescentes. (Burton and Krizhanovsky 2014)..... 66
Figure 20 : Caractérisation des Microvésicules intra-plaque par cytométrie en flux. D'après (Leroyer, Isobe et al. 2007). 71
Figure 21 : Composition des principaux métabolites des MVs de la plaque et des cellules endothéliales en culture par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton. D'après (Mayr, Grainger et al. 2009)..... 71
Figure 22 : Microvésicules dans la chronologie de l'athérosclérose. Adaptés de (Rautou, Vion et al. 2011). 74
Figure 23 : Variations du C-peptide, du besoin d'insuline et de taux de MVs circulantes lors de la transplantation d'îlots. (Toti, Bayle et al. 2011) (Moreau, Toti et al. 2012). 87
Figure 24 : Histoire naturelle du diabète de type 1. D'après (Eisenbarth 1986) 90
Figure 25 : La pathogenèse de DT1. D'après (Katsarou, Gudbjornsdottir et al. 2017)..... 91
Figure 26 : Illustration schématique de l'ensemble depuis l'isolement des îlots jusqu'à la transplantation intra-portale. D'après (Shapiro, Pokrywczynska et al. 2017) 96
Figure 27: Les facteurs affectant les résultats de la transplantation d'îlots pancréatiques.... 101
Figure 28 : Les différentes étapes de l'IBMIR. D'après (Nilsson, Ekdahl et al. 2011) 104
Figure 29 : Sélection des anticorps spécifiques de PSA-NCAM...... 119
Figure 30: Dosage ultrasensible de MV-PSA-NCAM de cellules RIN m5F...... 120
Figure 31: Valeurs moyennes des MV-PSA-NCAM$^+$ circulants chez les patients diabétiques de type 1 ou de type 2 et chez les volontaires sains...... 121

Figure 32 : Quantité de MVs isolées selon la phase pré-analytique. 183
Figure 33 : Impact de la première centrifugation sur le rendement d'extraction des MVs isolées de plaques découpées par lames de rasoirs. 183
Figure 34 : Optimisation des temps d'incubation pour l'extraction des MVs. 184
Figure 35 : Cinétique de libération des MVs par la plaque dans les 90 premières minutes d'incubation dans le milieu d'extraction. 184
Figure 36 : Impact de la durée d'incubation sur le rendement de purification des MVs de la plaque. 185
Figure 37 : Mesure des MVs tissulaires d'artères mammaires et de plaques d'athéromes humaines. (Abbas, Jesel et al. 2017). 186
Figure 38 : Caractérisation des MVs de la plaque d'athérome chez les patients avec sténose carotidienne non traités par oméga 3. 190
Figure 39 : Analyse immunohistochimique de la plaque carotidienne. 191
Figure 40 : Caractérisation comparative des marqueurs d'instabilité dans la plaque carotidienne et l'artère mammaire. 192
Figure 41 : Caractérisation comparative des marqueurs d'athérothrombose et de senescence dans la plaque carotidienne et l'artère mammaire. 193
Figure 42 : Cinétique de la libération de MV de l'aorte thoracique de jeunes rats. 196
Figure 43 : Les fragments de la crosse aortique des jeunes rats libèrent des quantités supérieures à celles de l'aorte thoracique et les apports d'EPA: DHA (6: 1) réduisent la libération de MV. 197
Figure 44 : Impact de la formulation en EPA : DHA sur l'émission de MVs. 199
Figure 45 : Acides gras poly-insaturés et production des Eicosanoïdes. Adapté de (Balanza-Martinez, Fries et al. 2011) 221
Figure 46 : Schéma récapitulatif des propriétés des MVs dans le contexte de leur libération par le tissu dans la circulation. 228

Liste des abréviations

AA	Acide Arachidonique
ADAM17	Domaine 17 de la Metallopeptidase ADAM
ADAMTs	Désintégrine A et une métalloprotéase avec un motif de thrombospondine de type 1
AgII	Angiotensine II
AGE	Produit finale de glycation avancé
AHA	Association américaine du coeur
Akt	Protéine kinase B
AlloSCT	Transplantation de cellule souche allogénique
AV^+	Annexin-5^+
AVK	Anti vitamines K
AP-1	Protéine activatrice-1
APC/C	Complexe/cyclosome favorisant l'anaphase
aPC	la protéine C activée
ARF6	ADP-ribosylation facteur 6
ASGPR	Récepteur de l'asialoglycoprotéine
ATP	Adénosine tri-phosphate
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CE	Cellules endothéliales
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CML	Cellules musculaires lisses
COX	Cyclooxygénase
CRP	Protéine C-réactive
CsA	Cyclosporine A
Del-1	Locus 1 du développement endothélial
DHE	Dihydroethidium
DMEM	
DSA	Anticorps spécifique au donneur
ELISA	Dosage immunoenzymatique
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothélial
ERK	Kinases extracellulaires à signal régulé
ESCRT	Complexe de tri endosomal nécessaires au transport
EPCR	Récepteur spécifique de l'aPC
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
Flk-1	Récepteur 1 du facteur de croissance endothéliales vasculaire
fMLP	formyl-méthionine-leucine-phénylalanine
FPR2 / ALX	Récepteur 2 du peptide N-formyl
FCM	Cytométrie en flux
FP3	Facteur plaquettaire 3
FMD	Dilatation médiée par le flux
FT	Facteur tissulaire
GAD	Acide glutamique décarboxylase
GLA	Acide y-carboxyglutamique
GLP-1R	Récepteur du glucagon-like peptide-1 (GLP-1R)

GPR32	Récepteur 32 couplé au protéine G
GR	Globule rouge
GRRC	Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire
LPS	Lipopolyssacharide
LXA4	Lipoxine-A4
LXB4	Lipoxine-B4
L-NAME	N(G)-Nitro-L-arginine méthyl ester
HBSS	Solution tamponnée saline de Hank
HLA	Antigènes des leucocytes humains
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
hsCRP	Protéine C-réactive à haute sensibilité
HUVEC	Cellules endothéliales de veine ombilicale humaine
H_2O_2	Peroxide d'hydrogène
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HMGB1	Groupe de grande mobilité box-1
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire 1
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleukine
iNOS	NO-synthase inductible
ISTH	Société internationale pour la transplantation cardiaque et pulmonaire
IMC	Indice de masse corporelle
MCP-1	Protéine chimioattractante monocytaire-1
Mets	Syndrome métabolique
MFG-E8	Protéine du facteur 8 de l'EGF, globule du lait
MLC	Chaîne légère de la myosine
MLCK	Myosine kinase à chaîne légère
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MVB	Corps multivésiculaire
MVE	Corps multivésiculaires endothéliales
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB	Facteur nucléaire kappa β
NO	Oxyde nitrique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
oxLDL	Lipoprotéine de basse densité oxydée
PDGF	Facteur de croissance dérivée des plaquettes
PECAM-1	Molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaires-1 (ou CD31)
PI	Iodure de propidium
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PL	Phospholipide
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLD	Phospholipase D
PM	Membrane plasmique
PSer	Phosphatidylsérine

PSGL-1	Ligand de glycoprotéine P-sélectine 1
PPP	Plasma pauvre en plaquettes
PSA-NCAM	Acide PolySialique de la protéine Neural cell adhesion molécule
KO	knock-out
RAGE	Récepteur du produit final de glycation avancé
RANTES	Cellule T normal exprimé et sécrété régulé à l'activation
RE	Réticulum endoplasmique
RLO	Rdicaux libres de l'oxygène
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
S100B	Protéine marqueur de souffrance cérébrale
SAHF	Foyer d'hétérochromatine associés à la sénescence
SOCE	Entrée du canal
SCID	Immunodéficiente sévère combinée
TACE	Enzyme de conversion du TNFα
TASCC	Compartiment spatial d'autophagie TOR
TFs	Facteurs de transcription
TFPI	Inhibiteur du facteur tissulaire
TGFß1	Facteur de croissance transformant beta1
THP-1	Lignée cellulaire de cellules leucémiques humaines
TKRs	Récepteurs de la tyrosine kinase
TMEM16F	Anoctamine 6
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale
TRPC6	Canal potentiel du récepteur transitoire
Tsg 101	Gène 101 de susceptibilité tumorale
TEP	Tomographie par émission de positrons
uPA	Activateur du plasminogène de type urokinase
uPAR	Récepteur d'activateur du plasminogène de type urokinase
VE	Vésicules membranaires extracellulaires
VE-cadhérine	Cadhérine de l'endothélium vasculaire
VCAM-1	Molécule d'adhésion vasculaire-1
XO	Xanthine oxydase
XBP1	X-box binding protein 1

Chapitre I

Les vésicules membranaires Extracellulaires

I. Les vésicules membranaires Extracellulaires

I.1 Caractéristiques générales

La découverte initiale de vésicules membranaires dans l'espace extracellulaire date de 1940, au cours d'études portant sur « l'importance biologique de la protéine thromboplastique du sang ». Elles ont été identifiées comme des particules procoagulantes par Chargaff et West (Chargaff and West 1946) qui remarquèrent que leur déplétion du plasma augmentait le temps de coagulation. En 1967, cette fraction subcellulaire a été identifiée par microscopie électronique comme petites vésicules à bicouche membranaire dans les surnageants de plaquettes activées et dénommées «poussière de plaquettes» (Wolf 1967). Parce que les poussières identifiées étaient des vésicules plaquettaires procoagulantes et qu'elles contenaient des phospholipides procoagulants elles ont été désignées comme facteur plaquettaire 3 (FP3) de la coagulation.

Les vésicules ont été longtemps considérées comme des débris inertes résultant de la destruction cellulaire ou d'un renouvèlement dynamique de la membrane plasmique (Cocucci, Racchetti et al. 2009). Ces dernières décades, l'importance des vésicules extracellulaires (VEs) dans la communication intercellulaire a été mise en évidence dans des modéles cellulaires utilisant des milieux de culture conditionnés ou chez l'animal après réinjection dans la circulation systémique de vésicules lavées, cette propriété étant renforcée par la découverte que les VEs contiennent des ARN qui peuvent être transférés aux cellules (Ratajczak, Miekus et al. 2006, Valadi, Ekstrom et al. 2007).

I.2 Les différents types de vésicules motions épistémologiques

Récemment, la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (International Society for Extracellular Vesicles ; ISEV) a recommandé d'utiliser le terme « vésicules extracellulaires » comme terme générique pour tous les types de vésicules présentes dans l'espace extracellulaire.

Cependant, elles ont été le plus souvent étudiées dans le compartiment vasculaire et l'ISTH (Société internationale pour la transplantation cardiaque et pulmonaire) a depuis plus de 15 ans initié des protocoles de standardisation des microvésicules, leur isolement et leur caractérisation, tandis que l'ISEV s'attache plus récemment aux exosomes.

Les VEs sont généralement répertoriées dans trois catégories distinctes d'après les processus de leur biogenèse et leurs caractéristiques physiques : les corps apoptotiques ; des microvésicules, également appelées microparticules et les exosomes, (Figure 1 ; Tableau 1). Enfin, dans un contexte oncogène, un type spécifique de VE dérivant de grandes protubérances cellulaires de cellules cancéreuses de 1 à 10 μm a également été considéré et désigné sous le nom d'oncosomes (Minciacchi, Freeman et al. 2015).

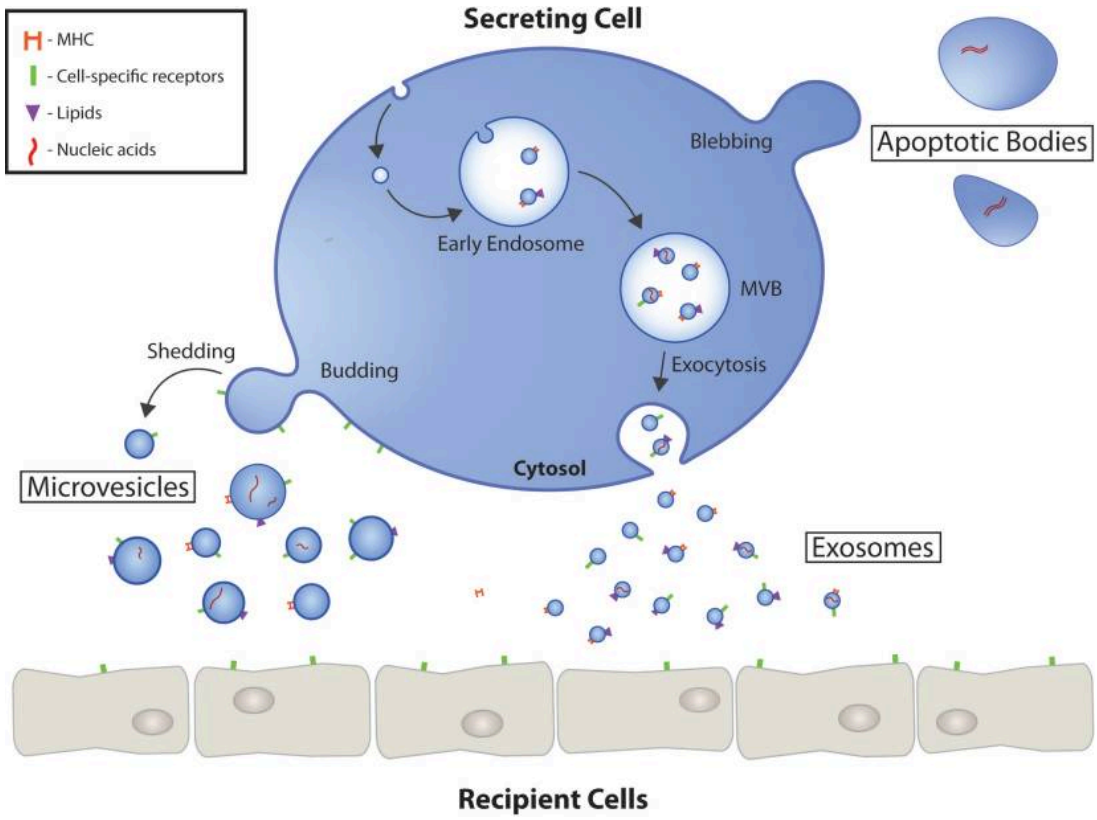


Figure 1 : Représentation schématique des types de vésicules extracellulaires (VEs) libérées par une cellule. *D'après (Gustafson, Veitch et al. 2017)*

Trois types de VE, à savoir les exosomes, les microvésicules ou les ectosomes et les corps apoptotiques, sont sécrétés par la cellule dans l'espace extracellulaire. Les exosomes sont libérés par exocytose, alors que les microvésicules, ou ectosomes, sont sécrétés par bourgeonnement de la membrane plasmique. Les corps apoptotiques sont émis aussi par la membrane plasmique en réponse à un stimulus apoptotique et constituent parfois une voie d'élimination de déchets ou de toxiques.

Différentes bases de données relatives aux vésicules extracellulaires incluant leur contenu en protéines, en ARNs et en lipides sont disponibles sur Vesiclepedia (www.microvesicles.org) (Kalra, Simpson et al. 2012) , EVpedia (www.evpedia.info) (Kim, Kang et al. 2013) et ExoCarta (www.exocarta.org) (Simpson, Kalra et al. 2012)

	Corps apoptotiques	**Microvésicules**	**Exosomes**
Taille	1 - 5 µm	100 - 1000 nm	30 - 100 nm
Densité (g/ml)	1,16 - 1,28	1,04 - 1,07	1,13 - 1,19
Formation	Bourgeonnement vers l'extérieur à partir de la membrane plasmique apoptotique	Bourgeonnement vers l'extérieur à partir de la membrane plasmique	Voie endolysosomale, fusion des corps multivésiculaires avec la membrane cellulaire
Contenu	Fractions nucléaires, ADNs, ARNs, microARNs, protéines, organelles cellulaires	ARNs, microARNs, autres ARNs non codants, protéines cytoplasmiques et membranaires, organelles cellulaires, lipides actifs, complexe majeur d'histocompatibilité	ARNs, microARNs, autres ARNs non codants, protéines cytoplasmiques
Propriétés membranaires	Membrane perméable (PI positive)	Membrane imperméable (PI négative)	Membrane imperméable (PI négative)
Marqueurs	Annexine-5	Annexine-5, Integrines actives, facteur tissulaire	MFG-E8, famille des tétraspanines (CD81, CD9, CD63), protéines ESCRT (alix, TSG101), actine, flotilline, clathrine

Tableau 1 : Classification des différents types de vésicules extracellulaires. D'après (Yin, Loyer et al. 2015).

ESCRT indique endosomal sorting complexes required for transport ; MFG-E8, Milk Fat Globule-EGF factor8 ; PI, iodure de propidium.

I.2.1 Corps apoptotiques

Les corps apoptotiques identifiés par Kerr en 1972 (Kerr, Wyllie et al. 1972), sont des structures membranaires qui empaquettent des organites cellulaires (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, fragment nucléaires ….) (Dive, Gregory et al. 1992). Les corps apoptotiques sont formés pendant la mort cellulaire programmée (apoptose) et sont reconnus tardivement par le système de la clairance phagocytaire comparativement aux cellules (Freyssinet 2003, Elmore 2007, Taylor, Cullen et al. 2008, Poon, Lucas et al. 2014). Ils exposent les phosphatidylsérines et leur membrane est perméable à l'iodure de propidium. Tout comme celle de la membrane plasmique des cellules, ils contiennent également de l'ARN et de l'ADN provenant de la fragmentation du noyau (Beyer and Pisetsky 2010). Plus grands que les exosomes et les microvésicules, leur diamètre est très variable, entre 1 et 5 µm, (Hristov, Erl et al. 2004).

Le processus de formation des corps apoptotiques dépend des réarrangements des lipides membranaires et de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et de l'activité de la Rho associée à la kinase1 (ROCK1), qui devient constitutivement active après clivage par la caspase 3, ce qui induit une augmentation de forces contractiles des filaments d'actomyosine et des vésicules membranaires subséquentes (Sebbagh, Renvoize et al. 2001). L'impact de l'émission des vésicules apoptotique reste controversé : elles seraient cytoprotectrices par l'exportation de molécules toxiques au début du procéssus et des médiateurs pro-apoptotiques à un stade plus avancé d'apoptose.

I.2.1 Microvésicules

Les microvésicules (MVs), souvent appelées microparticules, également parfois désignées nanoparticules ectosomes ou oncosomes lorsqu'elles sont émises par des cellules cancéreuses (Stein and Luzio 1991).

Les MVs ont un diamètre compris entre 100 et 1000 nm. Tout comme les corps apoptotiques les MVs sont émises après remodelage des phospholipides de la bicouche de la membrane plasmique qui conduit au bourgeonnement cellulaire en réponse à une activation cellulaire sans destruction de la cellule (Mause and Weber 2010) (Morel, Jesel et al. 2011, Ridger, Boulanger et al. 2017) (cf chapitre II Microvésicules).

Les MVs présentent à leur surface « la carte d'identité » cellulaire (Figure 2), et sont le reflet de l'homéostasie cellulaire. De plus, elles participent à la survie cellulaire, à l'apoptose, aux réponses inflammatoires, au remodelage vasculaire, à l'angiogenèse soit en transférant un message, en le capturant dans le milieu environnant ou en l'évacuant de la cellule émettrice.

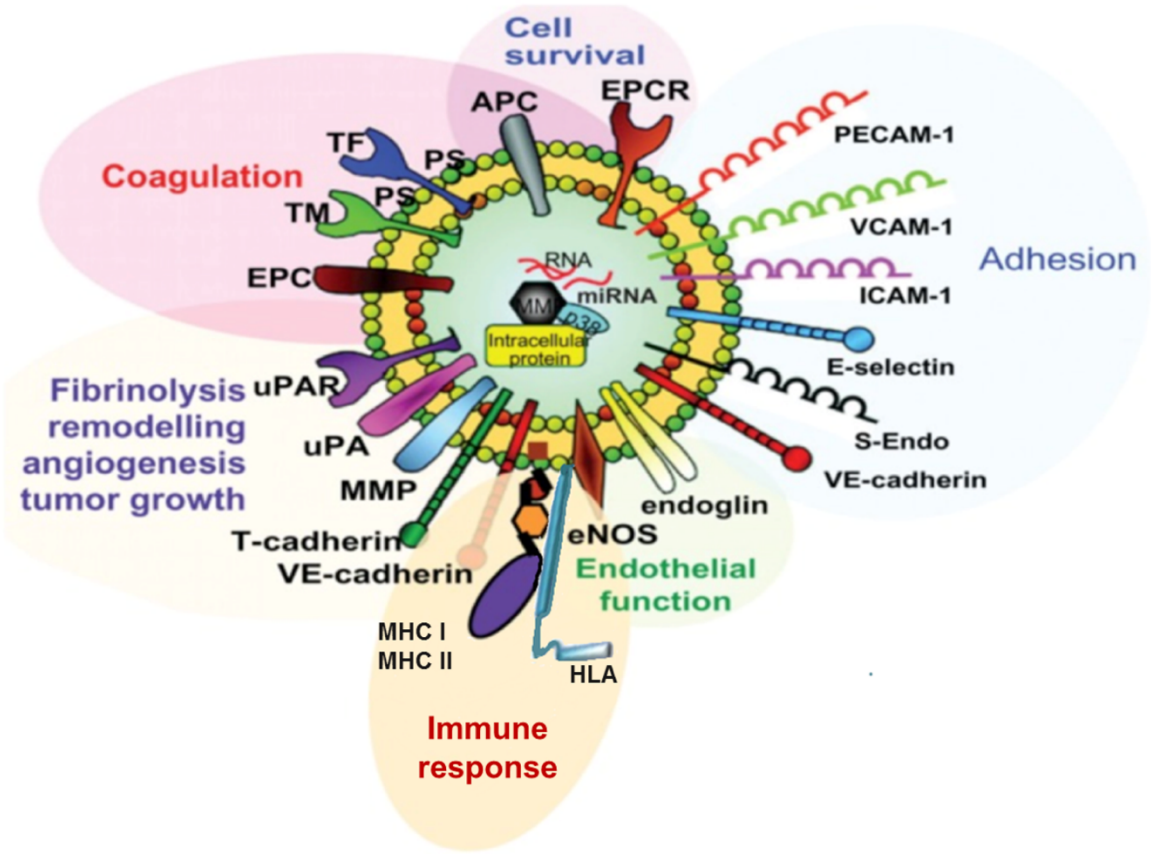


Figure 2 : Représentation schématique de molécules actives véhiculées par les MVs et les effets biologiques associés. Adaptés de (Dignat-George and Boulanger 2011)

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

En effet les MVs convoient des protéines et des lipides actifs (Tual-Chalot, Leonetti et al. 2011), qu'ils soient membranaires ou cytoplasmiques. Dans le vaisseau les MVs sont généralement procoagulantes parce qu'elles exposent la phosphatidylserine (PSer, cf chapitre II Microvésicules).

Fait intéressant, le transfert d'information dépendrait de l'origine et de la composition des MVs, plutôt que de leur concentration dans la circulation (Diamant, Tushuizen et al. 2004).
Les MVs sont des biomarqueurs très sensibles. Ainsi des MVs porteurs du HLA caractéristique du donneur ont été détectées dans le sang périphérique d'un receveur de greffe de la main (Kim, Kelesidis et al. 2017).

Des études ont montré que les MVs enferment aussi du matériel génétique tel que des miRNA (Simak and Gelderman 2006, Reich and Pisetsky 2009). Cette observation ouvre la perspective d'une éventuelle utilité pour mieux caractériser les MVs à la fois par leur origine cellulaire et leur contenu en miRNA caractéristiques des désordres vasculaires ou de leur évolution (Baron, Boulanger et al. 2012). La biogénèse des MVs est détaillée dans le chapitre suivant.

I.3 Exosomes

Les exosomes ont été décrits pour la première fois dans les années 1980 lors de travaux sur la maturation des réticulocytes (Johnstone, Adam et al. 1987). Ces vésicules de diamètre compris entre 30 et 100 nm, sont dérivées du système endosomal et formées l'invagination vers le cytoplasme des membranes endosomales formant des vésicules intraluminales (*intraluminal vesicles*: ILVs) puis des corps multivésiculaires (*multivesicular bodies*: MVBs). Les MVBs se dirigent soit vers les lysosomes qui les dégradent, soit vers la membrane plasmique, par l'intermédiaire des petites protéine G rab, où elles libèrent leur contenu exosomiques par exocytose (Hurley, Boura et al. 2010) (Figure 3).

Le principal mécanisme d'invagination de l'ILV et de sécrétion d'exosomes, implique le complexe protéique ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) (Colombo, Moita et al. 2013). Dans la voie ESCRT-dépendante, les quatre complexes ESCRT, comprenant chacun plusieurs sous-unités, sont recrutés séquentiellement sur la membrane endosomale et jouent des rôles distincts : Hrs se lie au phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP_3) et au 3,5-bisphosphate (PIP_2) à travers des domaines de liaison aux lipides, et à la protéine ubiquitinée STAM (ESCRT-0). Le (ESCRT-I) Tsg101 et (ESCRT-II) initient le bourgeonnement des ILVs, durant lequel la cargaison est transportée dans la lumière endosomale, et ESCRT-III par son interaction avec les protéines Alix et Vps4 participe à la déubiquitination des protéines pour achever le bourgeonnement et entraîner la scission des vésicules.

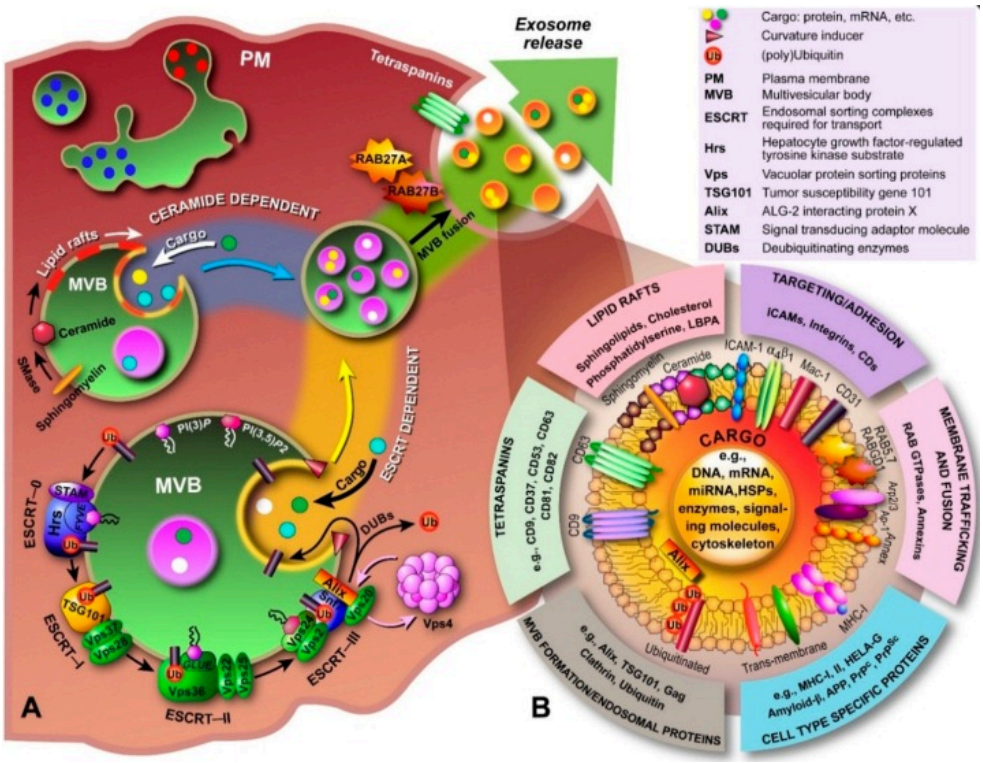


Figure 3 : Biogenèse, sécrétion et composition des exosomes. (Kalra, Drummen et al. 2016)

*(**A**) la biogenèse et la sécrétion des exosomes sont médiées par une voie céramidique et / ou ESCRT-dépendante. La voie céramide-dépendante est basée sur la formation de radeaux lipidiques dans lesquels la sphingomyéline est convertie en céramide par les sphingomyélinases. Ces domaines enrichis en céramides présentent des déséquilibres structuraux entre les feuillets qui font que la membrane se plie vers l'intérieur. Dans la voie ESCRT, dépendante d'un recrutement des composants de la machinerie ESCRT séquentiellement sur la membrane endosomale. (**B**) Cargaison Luminal Exosomal se compose principalement de fragments ARNm, miARN et gDNA, et une myriade de différentes protéines en fonction de la cellule d'origine. Généralement, les protéines impliquées dans la formation de MVB, les tétraspanines, le transport membranaire et la fusion, les protéines transmembranaires, les composants cytosquelettiques et les protéines d'origine cytosolique font partie des exosomes dans des proportions variables.*

En effet, la sécrétion d'exosomes diminue avec la déplétion des sous-unités du complexe ESCRT et les protéines associées (STAM, Vps, Alix) et le degré d'expression des composants ESCRT modifie la taille et la teneur en protéines des exosomes, y compris les cellules cancéreuses (Coleman, Hanssen et al. 2012, Bobrie and Thery 2013, Colombo, Moita et al. 2013). Dans les cellules HEK293T surexprimant Tsg101 et/ou la protéine ARRDC1 (Arrestin domain containing protein 1), qui est nécessaire à l'expression de Tsg101 à la membrane plasmique, la formation de vésicules membranaires de taille <45 nm mais ne contenant que des phospholipides de la membrane plasmique nécessite une ATPase (VPs4) (Nabhan, Hu et al. 2012).

La voie céramide dépendante est basée sur la formation de radeaux lipidiques dans lesquels la sphingomyéline est convertie en céramide par les sphingomyélinases et a été décrite dans une lignée murine d'oligodendrocyte (Trajkovic, Hsu et al. 2008). Ces rafts enrichis en céramides induisent un remodelage entre les feuillets membranaires et une coalescence des microdomaines qui font que la membrane endosomale se plie vers l'intérieur et déclenche la formation d'ILV.

Un ensemble d'acteurs et de mécanismes a été proposés pour la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire qui implique Rab GTPases (Rab11 / 35, Rab27), les microdomaines de tétraspanine et la SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment protein receptor*) (Kalra, Drummen et al. 2016). La libération des exosomes par des cellules naïves ne relève donc pas d'un remodelage de la membrane plasmique stricto sensu. Ils présentent des marqueurs de surface, potentiellement spécifiques comme CD63, CD81, CD9, LAMP1 et TSG101 (Mathivanan, Lim et al. 2010). Leur principale caractéristique est qu'ils sont enrichis en tétraspanine (CD63) (Thery, Zitvogel et al. 2002, Chaput and Thery 2011). Les données de la littérature sont plus documentées sur le contenu des exosomes en miRNA (Lawson, Vicencio et al. 2016).

Malgré une variété de similitudes morphologiques et structurelles, les corps apoptotiques, microvésicules d'une part et les exosomes d'autre part semblent différer considérablement en ce qui concerne leur mécanisme de formation, leur composition moléculaire ainsi que les signaux et les mécanismes libérateurs. Des études récentes de protéomique sur les VE permettent de s'affranchir de l'idée d'une éventuelle contamination par des exosomes au cours de la préparation des MVs *in vitro* selon les recommandations de l'ISTH, puisque on ne retrouve pas dans ces analyses les tétraspanines qui sont des protéines exosomales (Banfi, Brioschi et al. 2005).

I.4 Capture et internalisation des vésicules extracellulaires

Des preuves directes (sondes lipidiques ou marquage membranaire) et indirectes (transfert de molécules solubles : ARNm, miARN, siRNA ou la luciférine) suggèrent que les VEs sont internalisées dans les cellules du receveur (Mulcahy, Pink et al. 2014).

Les principaux mécanismes non-exclusifs d'internalisation des VEs décrits dans une multitude de lignées et de conditions expérimentales sont : (Figure 4).

- L'endocytose dépendante de l'interaction récepteur-ligand (Morelli, Larregina et al. 2004, Nanjundappa, Wang et al. 2011).
- La phagocytose.
- La fusion directe de la membrane vésiculaire à la surface cellulaire

L'internalisation des VEs est inhibée après un pré-traitement des cellules avec de la méthyl-β-cyclodextrine, un déstabilisant des rafts (Escrevente, Keller et al. 2011, Svensson, Christianson et al. 2013, Gleizes, Constantinescu et al. 2014). Les protéines principalement impliquées sont les tétraspanines (Escola, Kleijmeer et al. 1998, Helming and Gordon 2007), la lactadhérine (MFL-E8) et les intégrines. Les souris déficientes en lactadhérine ont un taux élevé de MVs plasmatiques (Dasgupta, Abdel-Monem et al. 2009).

Les exosomes sont enrichis en tétraspanines ce qui facilite leur internalisation par interaction avec des ligands spécifiques situés à la surface des cellules cibles. Ainsi, le complexe tétraspanines Tspan8-alpha4 en interagissant avec CD54 favorise la capture des exosomes par les cellules endothéliales ou d'adénocarcinome pancréatique de rat (Rana, Yue et al. 2012).

Le récepteur macrophagique de la PSer est important dans la phagocytose PSer-dépendante des MVs (Fadok, Voelker et al. 1992) et son masquage par un anticorps (anti TIM4) réduit l'internalisation des MVs dans les macrophages (Miyanishi, Tada et al. 2007), de même que le pré-traitement des MVs avec l'annexine-5, une protéine de forte affinité pour la PSer. D'autres récepteurs ou intégrines, comme la β2 glycoprotéine 1, ICAM-3, les protéines CD36 et CD14 présentes à la surface des phagocytes, peuvent également interagir avec les MVs et activent leur phagocytose (Greenberg, Sun et al. 2006, Abdel-Monem, Dasgupta et al. 2010, Torr, Gardner et al. 2012). Ainsi, l'intéraction des MVs porteuses des intégrines α4 et β1 avec les CE est détectable par le transfert de leurs ARN aux CE (Deregibus, Cantaluppi et al. 2007).

Une étude récente a monté que les régulateurs de l'héparan sulfate (HSPG) jouent un rôle important dans l'internalisation des exosomes, et que le prétraitement des exosomes par l'héparine réduit leur absorption cellulaire (Atai, Balaj et al. 2013, Christianson, Svensson et al.

2013). Le récepteur scavenger de type B1 (SR-B1), récepteur des HDL, semble lui, impliqué dans l'interaction des exosomes avec les radeaux lipidiques (Plebanek, Mutharasan et al. 2015).

En conclusion, le mode d'absorption dépend probablement de l'outillage cellulaire de la cellule réceptrice et des ligands sur les cellules émettrices. Les interactions des VEs avec les cellules cibles déclenchent une multitude de cascades de signalisation cellulaire, et leur internalisation dans les cellules receveuses peut faciliter le transfert de cargaison fonctionnelle ou sa clairance (Plebanek, Mutharasan et al. 2015) (Figure 4).

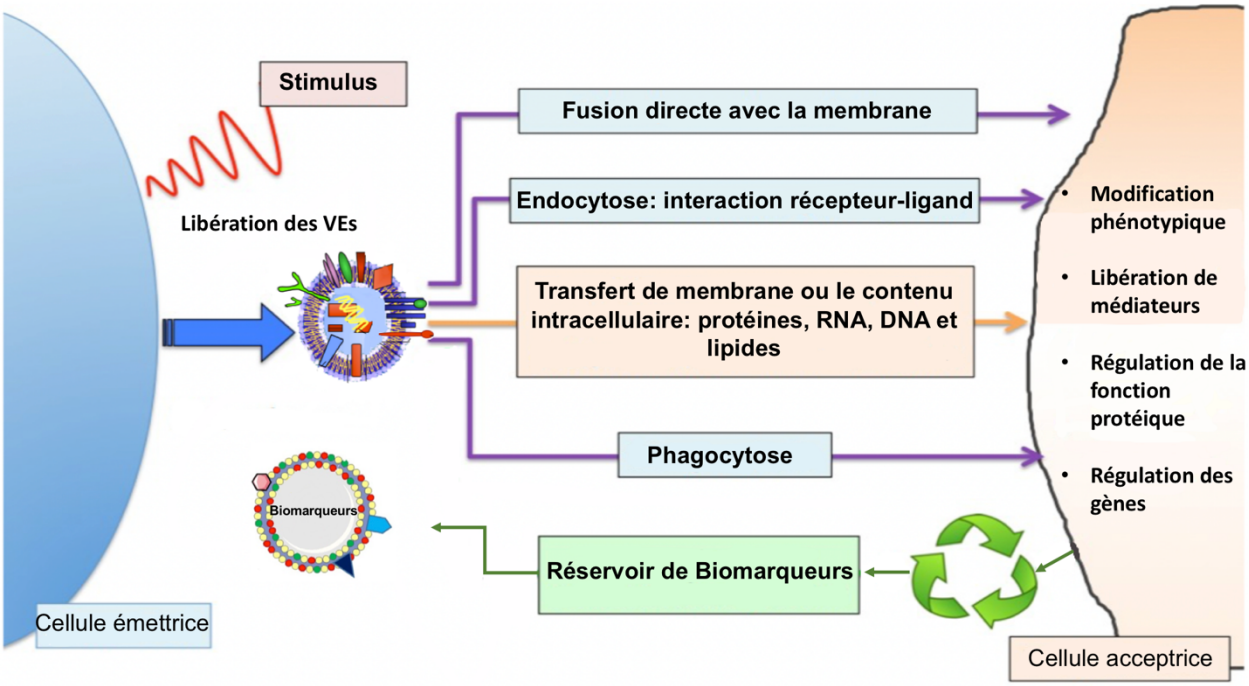


Figure 4 : Principaux mécanismes impliqués dans l'internalisation des vésicules extracellulaires.

I.5 Principe et méthodes différenciées d'isolement et d'analyse

Afin de mieux étudier les fonctions physiopathologiques des VEs d'échantillons d'animaux ou d'humains, il est essentiel de standardiser les procédures d'isolement et prendre en compte l'âge, le sexe, les médicaments, les activités physiques, les facteurs de risque cardio-vasculaires et les antécédents médicaux lors de l'interprétation des résultats.

En plus de la centrifugation différentielle, des gradients de densité, des méthodes de précipitation à base de polymères, de microfiltration et d'exclusion de taille ont été développés pour l'isolation des VEs. Ces méthodes d'isolements ont toutes un impact sur la quantité, le type et la pureté des VEs recueillies (Van Deun, Mestdagh et al. 2014).

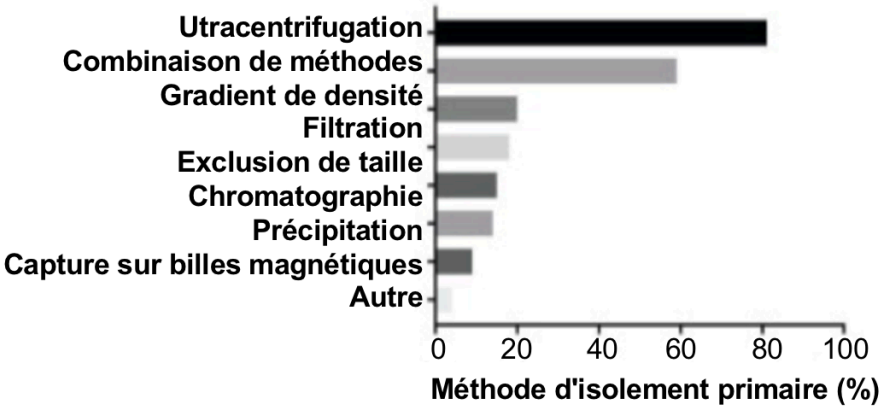


Figure 5 : Différentes méthodes d'isolement primaire utilisées dans les laboratoires (%). (Gardiner, Di Vizio et al. 2016).

La centrifugation séquentielle demeure la méthode d'isolement et de séparation des VEs circulantes la plus couramment utilisée à partir du sang et du surnageant dans des modèles cellulaires (Figure 5). L'isolement des VEs est aussi être réalisée à partir du surnageant de tissus après découpage et broyage standardisé comme pour la plaque d'athérome isolée puis incubée dans un milieu d'extraction (Leroyer, Isobe et al. 2007).

Dans la plupart des études, les vésicules sont isolées selon le schéma expérimental suivant : centrifugation à 200 - 1500 g pour éliminer les cellules et les débris cellulaires, suivi d'une centrifugation à 10 000 - 20 000 g pour concentrer des vésicules de plus de 100 nm et une centrifugation à 100 000 g - 200 000 g pour isoler des vésicules de moins de 100 nm (Figure 6). Cette dernière centrifugation peut entraîner une fusion des vésicules. De plus, les propriétés fonctionnelles des vésicules peuvent également être modifiées.

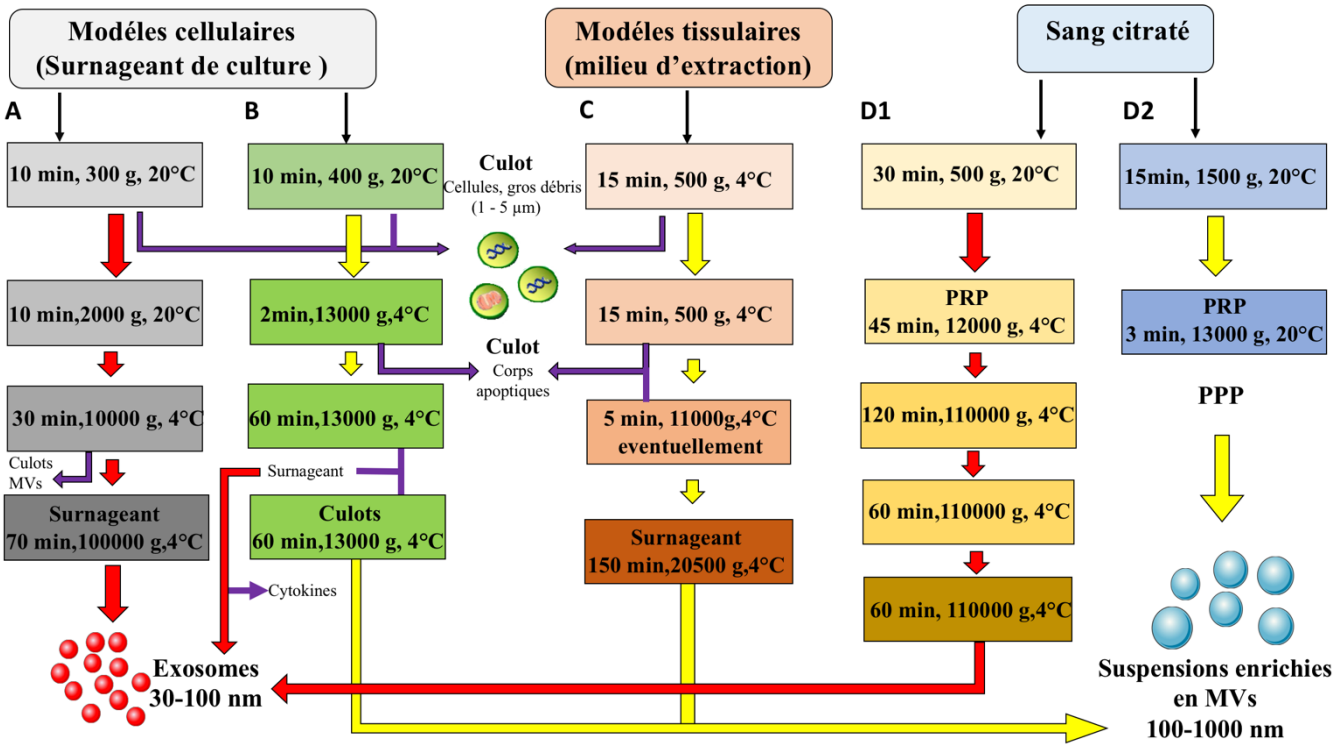


Figure 6 : Isolement des vésicules extracellulaires.

Exemples de protocoles d'isolements par centrifugations séquentielle à partir des vésicules extracellulaires de différents fluides biologiques (surnageant de culture cellulaire et tissulaire et du sang citraté). PRP : plasma riche en plaquettes ; PPP : plasma pauvre en plaquettes

A- Suspension enrichie en exosomes

B- Suspension de MV lavées de cellules

C- Suspension de MV lavées de cellules d'extrait tissulaire

D- Suspension de MV sanguines lavées (D1) ou plasmatique (D2)

	Méthode de quantification	Avantages	Inconvénients
Cytométrie de flux (Ibrahim and van den Engh 2007, Robert, Poncelet et al. 2009)	- Sondes de fluorescence - Propriétés de diffusion de la lumière - VE en suspension	- Rapide - Plusieurs antigènes analysables dans un seul échantillon - VEs analysées individuellement	- Impossibilité de détecter des VEs inférieur à 100-400 nm - L'identification de l'origine cellulaire dépend des anticorps
Elisa (Horstman, Jy et al. 2004)	- Immunocapture	- Répandu - Pas de restriction de taille	- Analyse effectuée par lots - Aucune détermination de taille possible - Quantification sur la base d'un seul antigène
Essais fonctionnels	- Activité procoagulante - Activité enzymatique	- Indépendant de la taille - Fournit une indication de l'activité biologique	- Analyse effectuée par série - Pas de détermination de la taille possible
Microscopie à force atomique (Leong, Podor et al. 2011, Calo, Reguera et al. 2014)	- Comptage	- Détection précise de taille, de structure 3D - Quantification et analyse fonctionnelle de leur teneur en protéine	- Technologie délicate - Développement de surface coatés d'anticorps spécialisés
Nanoparticle tracking (Dragovic, Gardiner et al. 2011, van der Pol, Coumans et al. 2014)	- Diffusions de la lumière - Mouvements browniens des VEs	- Visualisation des VEs de taille comprise entre 25 et 1500 nm - Enumération - Marquage individuel	- Technologie pas facilement disponible - Temps d'analyse long - Coûteux

Tableau 2 : Les différentes méthodes de mesure de VEs. Adapté de (Burger, Schock et al. 2013).

Le besoin de quantifier les VEs en tant que biomarqueurs physiopathologiques a conduit au développement d'une pléthore de techniques avec des principes et des coûts différents, possédant chacune des avantages et des inconvénients (Tableau 2).

Ces méthodes se basent sur une évaluation de la taille, de la morphologie, de la concentration, de la composition biochimique et/ou de l'origine cellulaire ou tissulaires des VEs (van der Pol, Hoekstra et al. 2010).

La cytométrie en flux reste une méthode populaire d'analyse des VEs, parfois après capture sur billes. Le dosage du contenu en protéine le plus souvent par BCA / micro BCA ou Bradford est majoritairement utilisé pour quantifier les VEs dans les préparations et encore très peu de chercheurs énumèrent les VEs sur la base de leur taille par technique de Nano-Sizing (qNano, Nanosizer) ou par microscopie de force atomique par la dynamic light scattering (DSL). Un petit nombre de laboratoires utilise en routine des tests fonctionnels (tests procoagulants, spectroscopie Raman, ELISA, tests d'activité acétylcholine / acétylcholinestérase), d'immunoélectrophorèse, d'analyse par HPLC, spectroscopie infrarouge du contenu moléculaire. Le nombre de méthodes utilisées pour la caractérisation des VEs a varié considérablement. Dans un questionnaire auquel ont répondu 196 chercheurs de 30 pays différents, 9% ont déclaré n'utiliser qu'une seule méthode de caractérisation, 23% deux méthodes, 33% trois méthodes, 23% quatre méthodes et 12% cinq méthodes de caractérisation ou plus (Gardiner, Di Vizio et al. 2016).

D'autres techniques comme (i) l'analyse Western blot (individuation des biomarqueurs), (ii) la technique de suivi de particules individuelles « single-particle tracking » utilisant l'analyse de suivi des nanoparticules (Nanosight ou Zeta View) (Dragovic, Gardiner et al. 2011), de détection d'impulsions résistives (Izon qNano) (Vogel, Coumans et al. 2016) (Vogel et coll., 2016, Anderson et al., 2015) et de diffusion dynamique de la lumière (van der Pol, Hoekstra et al. 2010) (iii) la microscopie électronique (caractérisation morphologique et structurale, Sharma et al 2010, Van der Pol et al., 2012) (Figure 7).

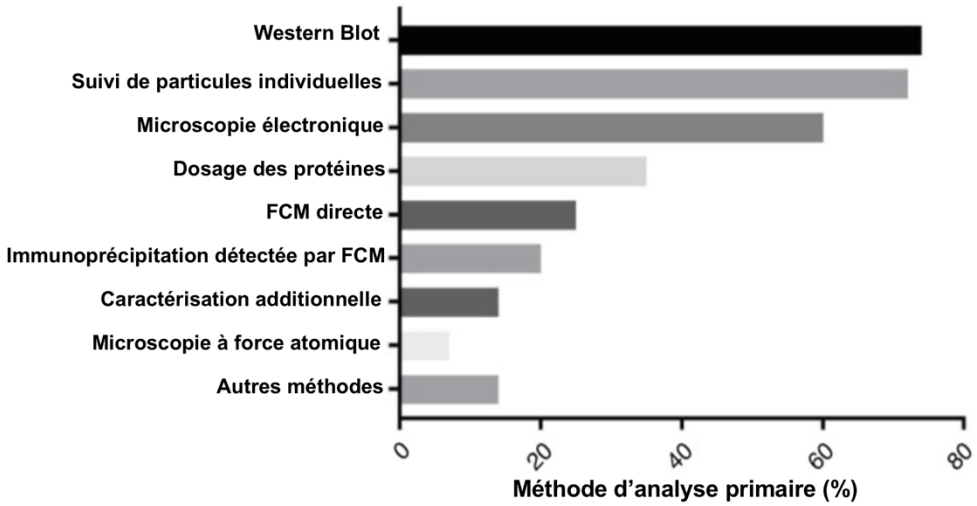


Figure 7 : Méthodes utilisées pour la caractérisation des VEs (%). D'après (Gardiner, Di Vizio et al. 2016). *FCM : cytométrie en flux*

La pureté des préparations de VE isolées à partir de surnageant de culture tissulaire et de fluides corporels est limitée par la présence de structures macromoléculaires non vésiculaires (telles que les lipoprotéines, certaines protéines de haut poids moléculaire telle que le fibrinogène, l'albumine et les complexes immuns) qui sont susceptibles d'interférer avec les expériences cellulaires ou avec le système de détection et de mesure des MVs. Dans certains cas un lavage extensif est alors nécessaire (centrifugation, chromatographie).

D'autres artéfacts méthodologiques peuvent être le résultat de la phase préanalalytique de traitement de la source tissulaire ou cellulaire à partir de laquelle les VEs sont isolées. C'est pourquoi la réalisation de suspensions à partir de sources contrôles (cellules non stimulées ou tissus sain) reste incontournable.

Chapitre II

Microvésicule

II. Microvésicules

II.1 Pertinence physiopathologique des microvésicules

L'intérêt scientifique et clinique pour les MVs, longtemps négligées et étiquetées comme des débris cellulaires a considérablement augmenté. Ces vésicules submicroniques émises par la membrane plasmique des cellules en réponse au stress apoptotique ou à l'activation cellulaire (Ridger, Boulanger et al. 2017), sont des effecteurs cellulaires disséminant divers médiateurs bioactifs, susceptibles d'amplifier et de propager le signal responsable de leur émission dans les vaisseaux et l'espace extracellulaire des tissus d'une manière autocrine ou paracrine (Camussi, Deregibus et al. 2010, Loyer, Vion et al. 2014).

Le stimulus cellulaire détermine leur nombre, leur taille, leur composition biochimique et leurs caractéristiques fonctionnelles, avec des différences de cinétique de libération en fonction de la lignée. Les dernières données montrent que les MVs pourraient également être libérées par les cellules endothéliales sénescentes (Abbas, Jesel et al. 2017).

Dans le sang, les MVs ne sont pas seulement des marqueurs de l'activation ou des dommages cellulaires et tissulaires, mais aussi des acteurs de réponses physiologiques majeures telles que l'hémostase, l'inflammation, la survie cellulaire et l'apoptose, la fonction endothéliale, le remodelage vasculaire et l'angiogenèse (Owens and Mackman 2011, Ridger, Boulanger et al. 2017) (Diamant, Tushuizen et al. 2004, Tushuizen, Diamant et al. 2011). Les MVs agissent sur la fonction vasculaire en interagissant avec les cellules circulantes (plaquettes, leucocytes, érythrocytes) et endothéliales et contribuent ainsi à l'homéostasie vasculaire (Burnier, Fontana et al. 2009). Parce qu'elles exposent la PSer, elles sont généralement procoagulantes mais possèdent aussi des propriétés cytoprotectrices en préservant les fonctions de l'endothélium (Morel, Toti et al. 2009). Leur utilisation potentielle en tant que biomarqueurs circulants d'altérations tissulaires est suggéré par l'étude des maladies vasculaires et cardiovasculaires qui montre que leur taux circulants sont proportionnels à la sévérité de la maladie (Boulanger, Amabile et al. 2006) (Bakouboula, Morel et al. 2008). De même, elles apparaissent comme une cible pivot pour le suivi thérapeutique (Deng, Wang et al. 2017) et le traitement (Zhao, Wu et al. 2017).

Parce que les MVs sont issues de la membrane plasmique (cf. chapitre I), ce sont les VEs les plus aptes à caractériser l'origine cellulaire voire le stress initiateur du dommage cellulaire et tissulaire, grâce à la présence de CD caractéristiques à leur surface. La propriété ubiquiste des MVs et leur phénotype procoagulant découvert sont largement étudiés dans les maladies cardiovasculaires et de l'hémostase. En exposant la PSer et parfois le facteur tissulaire (FT) (Morel, Toti et al. 2006), la MV constitue une surface catalytique pour l'assemblage et

l'activation des complexes de coagulation sanguine et la génération de thrombine (Diamant, Tushuizen et al. 2004) (Nomura, Ozaki et al. 2008).

À l'état physiologique les MVs circulent à de faibles concentrations dans le sang humain, bien que 80% des MVs proviennent de plaquettes ou mégacaryocytes (Flaumenhaft, Dilks et al. 2009), les MVs sont également libérées en minorité des leucocytes, globules rouges, lymphocytes, cellules endothéliales (CE), et cellules musculaires lisses (CML). Il existe des différences substantielles entre les fractions de MVs ou sous-populations libérées dans la circulation systémique de sujets sains et celles corrélées à une réponse hémostatique anormale survenant dans les lits veineux (Chirinos, Heresi et al. 2005) (Abdullah, Kachman et al. 2009) et artériels (van der Zee, Biro et al. 2006). La présence de MVs procoagulantes dans le sang de sujets sains peut être considérée comme un reflet dynamique de leur production par les cellules au repos, activées et apoptotiques et de leur clairance de la circulation.

II.2 Mécanisme de formation des MVs

La biogenèse et la libération des MVs de la membrane plasmique impliquent principalement des constituants membranaires et leur réarrangement, le cytosquelette, et des protéines recrutées au feuillet interne et impliquées dans l'abscission membranaire.

II.2.1 Asymétrie de la membrane plasmique

La flexibilité de la membrane plasmique et son épaisseur locale sont des facteurs essentiels pour sa fluidité membranaire et le maintien de la fonctionnalité des cellules. Elles sont dépendantes à la fois de la composition en phospholipides (PL), de leur longueur de chaîne et leur degré d'insaturation, et de la température. (Hugel, Martinez et al. 2005, Ridger, Boulanger et al. 2017).

Dans les conditions physiologiques, la répartition des PLs de la membrane plasmique des cellules est asymétrique grâce à l'activité de différents transporteurs qui maintiennent la séquestration des PLs anioniques tel que la PSer et la phosphatidyléthanolamine (PhEth) sur le feuillet interne du coté cytoplasmique. Les autres lipides, comme les stérols et les céramides, sont distribués de façon homogène entre les feuillets car ils sont capables de diffuser spontanément au sein de la membrane (Morel, Jesel et al. 2011).

D'une manière passive, les PLs traversent la membrane plasmique pour équilibrer les charges de leurs têtes polaires. Dans la cellule au repos, le maintien d'un déséquilibre de charge se fait sous le contrôle de trois types de transporteurs phospholipidiques complémentaires (i) Les

scramblases, des translocases à activité bidirectionnelles, non spécifiques et calcium-dépendante (Daleke 2003), et (ii) les aminophospholipides translocases qui sont des transporteurs ABC (ATP binding cassette), protéines ATP-dépendantes qui transportent les PLs contre le gradient de concentration comme les ABC A-1. Ce sont des floppases occasionnelles responsable de l'externalisation (Flop) de la PSer en particulier et de manière moins importante la PhEth et qui sont inactives au repos (Hamon, Broccardo et al. 2000). Au contraire, les flippases (P4-ATP) sont des ATPases qui n'appartiennent pas à la famille des transporteurs ABC qui rapatrient les PLs chargés négativement (Flip) dans le feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique, sont activées au repos et à faible concentration de calcium (Folmer, Elferink et al. 2009) (Figure 8). La caractérisation moléculaire des flippases est plus avancée que celle des floppases. La difficulté initiale était que l'activité scramblase peut être assurée par de nombreuses protéines notamment les transporteurs ABC A-1 ou les protéines MDR (Varga-Szabo, Braun et al. 2009).

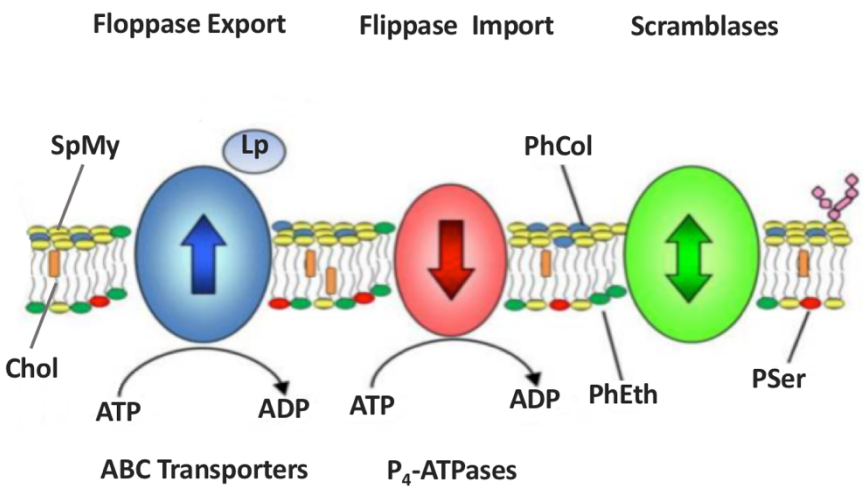


Figure 8 : La fonction des transporteurs de phospholipides. (Coleman, Quazi et al. 2013)

La plupart des transporteurs de type floppase catalysent le transport des lipides, en utilisant l'ATP, du feuillet cytoplasmique de la bicouche vers le feuillet extracellulaire tandis que le transport par les flippases se fait dans la direction opposée. Les scramblases sont des transporteurs activés par des concentrations calciques élevées. Elles assurent, et de manière non spécifique, le mouvement des phospholipides en fonction de leur gradient de concentration.

PhCol : phosphatidylcholine ; SpMy : sphingomyeline ; PSer : phosphatidylsérine PhEth : phosphatidyléthanolamine ; Lp : Lipoprotéine ; Chol ; cholestérol.

L'importance fonctionnelle de la distribution asymétrique des PLs dans les membranes plasmiques est suggérée par leur impact sur l'assemblage de plateformes de signalisation lipidique comme les rafts, et des interactions sélectives du feuillet cytoplasmique avec certaines protéines régulatrices et structurales péri-membranaires incluant la protéine kinase C (Palfrey and Waseem 1985), l'annexine-5 (Meers and Mealy 1993) mais aussi avec les protéines interagissant avec le cytosquelette telles que la spectrine (MacDonald 1993) qui se fixe sur le feuillet interne cytoplasmique de la membrane par interaction avec la PSer. Cette focalisation du réseau du cytosquelette sous la membrane la stabilise (Manno, Takakuwa et al. 2002).

D'autre part, l'exposition d'aminophospholipides et notamment la PSer sur le feuillet externe de la membrane plasmique, lui confère une surface procoagulante (Segawa, Kurata et al. 2014) et l'impossibilité d'exposer la PSer conduit à l'absence de microvésiculation et au syndrome hémorragique de Scott (Toti, Satta et al. 1996). Enfin, la PSer est un signal de reconnaissance pour la clairance par phagocytose (Coleman, Quazi et al. 2013). Il a été démontré qu'une inhibition partielle ou totale de l'expression de la floppase occasionnelle ABCA1 diminue la phagocytose des cellules apoptotiques en réduisant l'externalisation de la PSer (Pradhan, Williamson et al. 1994), ce qui conduit à des anomalies morphologiques chez la souris.

II.2.2 Remodelage membranaire à l'origine de la vésiculation

II.2.2.1 Influx calcique et rupture de l'asymétrie membranaire par les floppases

La perte de cette asymétrie des lipides membranaires est le résultat d'un déséquilibre entre activité translocase, scramblase et flippases qui sont régulées par la concentration intracellulaire de calcium. De nombreux stimuli sont susceptibles d'induire le flip flop et l'émission MV pro- coagulantes. Il s'agit de médiateurs biologiques mais également mécaniques et toxiques (tableau 3).

Ainsi, le phénotype et la quantité de MVs libérées varient avec l'intensité et la nature du stimulus qui impacte également la composition lipidique et protéique des MVs (Jimenez, Jy et al. 2003). Par exemple, les MVs issues de monocytes stimulées par le LPS ou par la P- sélectine diffèrent dans le degré d'expression de la PSer et de l'antigène « leucocyte associated immunoglobulin-like receptor-1 », ce dernier étant spécifique de la stimulation des monocytes par la P-sélectine (Bernimoulin, Waters et al. 2009). De plus, l'environnement lipidique peut modifier l'activité des protéines portées par les MVs. Liu et ses collaborateurs ont montré que l'enrichissement des monocytes humains en cholestérol peut induire la production de MV pro-coagulantes exprimant le FT et la PSer (Liu, Reilly et al. 2007).

Stimuli	Type de cellule					
	Des cellules endothéliales	**Plaquettes**	**Cellule musculaire lisse**	**Monocyte / Macrophage**	**Érythrocytes**	**Lymphocytes**
Cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL1β) et CRP	Combes et al Curtis et al Abid Hussein et al Wang et al	Nomura et al Piguet et al	Schecter et al	Jungel et al	...	...
Thrombine	Sapet et al Simoncini et al	Barry et coll., Dale et coll., Chang et coll.,	...	...	...	...
Stress oxydant	Vince et al Szotowski et al	...	...	...	Freikman et al	...
Augmentation du Ca^{2+} intra-cellulaire		Barry et al. Chang et al Morel et al	...	Neri et al, cerri et al, Aharon et al	Bavers et al, Comfuris et al Ratajczak etal	...
LDL modifié	Nomura et al	...	Llorente-Cortes et al	...	...	...
Cholestérol HDL	Liu et al	...	...	Liu et al	...	...
Toxine urémique	Faure et al	...	...	...	...	...
LPS	...	Larsson et al	...	Gauley et al, Gerrits et al, Sarkar et al	...	...
Activateurs de PKC (PMA, Staurosporine)	...	...	Schecter et al	Mesri et al	...	Ullal et al Scanu et al
Actinomycine D	...	...	...	...	...	Martin et al
Collagène	...	Barry et coll., Boilard et coll., Chang et coll.,	...	...	...	...
Homocystéine	Sekula et al	Olas et al	...	...	...	...
PDGF		Schecter et al	...	...	...	...
PAI-1	Brodsky et al	...	...	...	...	...
Fas ligand	...	...	Essayagh et al	...	...	...
Protéine C activée	Pérez-Casal et al	...	...	Pérez-Casal et al	...	...
Conditions de cisaillement	Ramkhelawon et al	Nomura et al	Stampfuss et al	...	...	...
Extrait de cigarette	...	...	...	Li et al	...	...

Tableau 3 : Stimuli de la libération des Microvésicules à partir de cellules circulantes ou de la paroi vasculaire. Adapté de (Rautou, Vion et al. 2011)

Dans les conditions d'activation ou de stress cellulaire, l'influx calcique apparaît comme central pour le flip flop et l'émission des MVs. L'ouverture des canaux ioniques ainsi que la libération des stocks intracellulaires conduit à une augmentation importante de la concentration cytoplasmique du calcium (30 à 350 µM contre 1µM à l'état basal) (Martinez and Freyssinet 2001). De plus, dans les conditions d'apoptose ou de forte stimulation, la dépolarisation de la membrane externe des mitochondries entraine l'ouverture des pores mitochondriaux et l'augmentation de l'entrée calcique (Figure 9). Ainsi, la machinerie SOCE (Store operated channel entry), incluant le canal Orai 1 et les capteurs de calcium STIM1 (Bergmeier, Oh-Hora et al. 2009, Gilio, van Kruchten et al. 2010), mais aussi d'autres canaux calciques comme les TRPC6 (Transient receptor potential channel), le prurinorécepteur P2X1 dans les plaquettes, pérennisent l'influx de calcium dans la cellule lorsque la stimulation est forte ou prolongée.

Concomitamment, à l'élévation du Ca^{2+} cytosolique, les flippases qui maintiennent l'asymétrie de répartition des PLs membranaires entre les 2 feuillets sont inhibées. Les floppases sont activées du feuillet exoplasmique (Daleke 2003, Wolfs, Comfurius et al. 2005) (Bevers and Williamson 2010). Des preuves indirectes du rôle de l'activité scramblase dans la génération des MVs ont été apportées par inhibition pharmacologique de l'externalisation de PSer, notamment avec R5421, dans les érythrocytes (Gonzalez, Gibbons et al. 2009).

Par ailleurs, de nombreuses données de la littérature sur le flip flop sont basées sur des études érythrocytaires ou monocytaires (Ridger, Boulanger et al. 2017), ce qui ne reflète pas les mêmes conditions physiologiques. Chez les patients atteints du syndrome de Scott, un trouble hémorragique héréditaire rare, l'activité procoagulante plaquettaire est déficiente en raison d'un défaut d'externalisation de la PSer à la surface de la membrane plasmique. Ce défaut est retrouvé dans les globules rouges et les lymphocytes, et est associé à un déficit de génération des MVs (Figure 9). Cette absence de flip-flop rapide en réponse à l'influx calcique et l'absence de vésiculation témoigne de la fonction hémostatique de la PSer et des MVs. L'identification du transporteur de lipide défectueux dans le syndrome de Scott reste délicate (Toti, Satta et al. 1996) (Lhermusier, Chap et al. 2011). Une mutation faux-sens dans les gènes du transporteur ABC A-1 qui sont des floppases occasionnelles a été rapportée chez un patient suspecté du syndrome de Scott (Albrecht, McVey et al. 2005), suggérant que ce transporteur contribuerait à la machinerie impliquée dans l'exposition de la PSer. Cependant, son implication directe dans le flip-flop est contestée car le défaut d'externalisation de PSer est consécutif à une perte de trafic intracellulaire d'ABC A-1 et d'autres protéines (Williamson, Halleck et al. 2007, Bevers and Williamson 2010, Freyssinet and Toti 2010). Un autre candidat, une protéine de la membrane

plasmique appelée scramblase 1 ou PLSCR1, peut être écarté car présente à des taux normaux dans les lymphocytes d'un patient atteint du syndrome de Scott (Zhou, Sims et al. 1998). Ceci a été confirmé par l'absence de défaut de la réponse hémostatique chez les souris portant une knock-out du gène de la scramblase 1(Zhou, Zhao et al. 2002).

Sur la base d'une analyse bio-informatique, Suzuki et ses collaborateurs ont proposé les anoctamines et plus particulièrement la protéine TMEM16F, comme une floppase calcium-dépendante (Suzuki, Umeda et al. 2010) (Lhermusier, Chap et al. 2011, Yang, Kim et al. 2012, Whitlock and Hartzell 2017). De même, les plaquettes activées des souris KO en TMEM-16F présentaient des défauts d'exposition de la PSer, de la génération des MVs et des saignements (Fujii, Sakata et al. 2015). TMEM-16F est peut-être la floppase spécifique de l'externalisation de la PSer.

Qu'il s'agisse de scramblases, de floppases ou des deux, la translocation unidirectionnelle de la PSer du feuillet interne vers le feuillet externe génère un déséquilibre structurel au sein de la bicouche lipidique. La biogenèse et la libération des MVs de la membrane plasmique impliquent principalement des constituants membranaires et leur réarrangement, le cytosquelette, et des protéines recrutées impliquées dans l'abscission membranaire.

II.2.2.2 Influx calciques et dégradation du cytosquelette

Lors de l'augmentation des concentrations de Ca^{2+} intracellulaire, l'interaction entre les protéines cytosquelettiques et les particules est progressivement perdue par différents mécanismes :

- Une déstabilisation des filaments d'actine dépendante du recrutement d'enzymes cytosoliques protéolytiques sensibles au Ca^{2+} comme les calpaïnes et les cystéines-protéases. Ainsi, le prétraitement de plaquettes lavées par la calpeptine, un inhibiteur perméant de la calpaïne, réduit significativement la génération de MVs dans les premières minutes de la réponse à la thrombine et au collagène ou au ionophore A2318 (Yano, Shiba et al. 1993).
- Le désassemblage du cytosquelette grâce au clivage des glycoprotéines tel que la filamine-1, la gélosine, la taline et la myosine.
- La rupture du cytosquelette due à la phosphorylation de la protéine MLC (Myosin light chain) par la MLCK est activée par les Rho-kinases (ROCK), effecteurs des petites protéines G Rho (Bishop and Hall 2000) sous dépendance des caspases. Ainsi, la caspase 3 activée par un stress apoptotique clive la ROCK-I dans les cellules Jurkat, une lignée

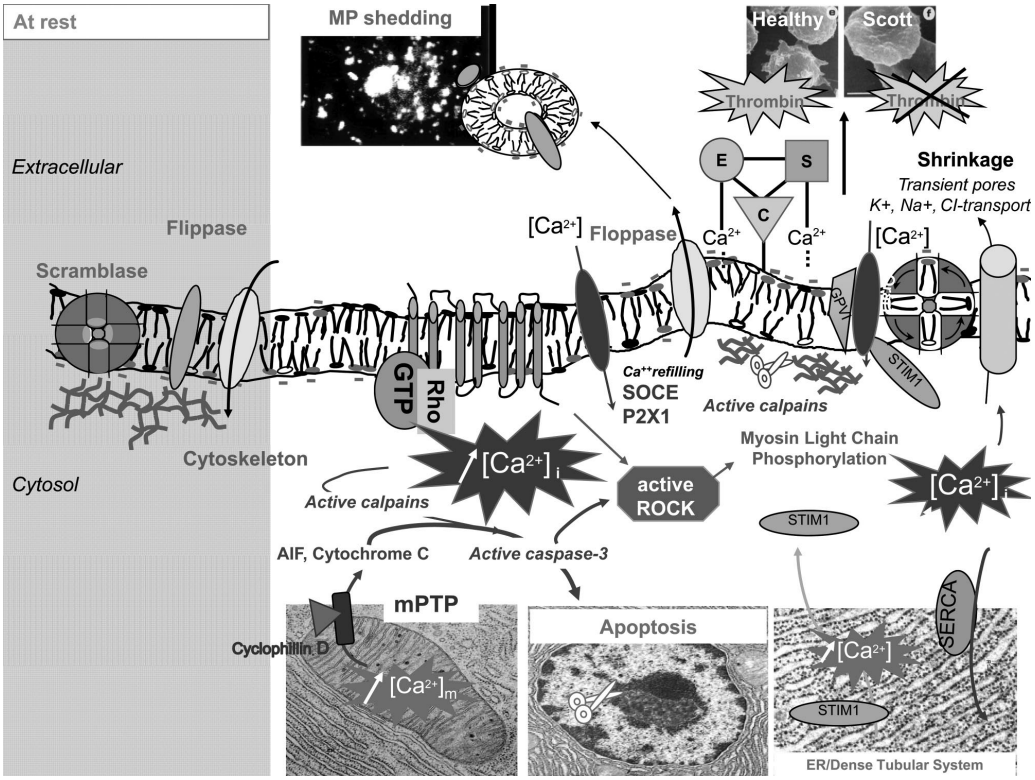


Figure 9 : Les acteurs clés du remodelage membranaire et de l'excrétion des MV procoagulants. (Morel, Jesel et al. 2011)

Les PLs de la membrane plasmique des cellules au repos (à gauche) présentent une distribution asymétrique entre les deux feuillets. L'extérnalisation des PLs membranaires nécessite une réorganisation du cytosquelette impliquant des protéases activées par le calcium telles que les caspases et les calpaïnes. Une augmentation soutenue des ions calcium intracellulaires est obligatoire pour l'exposition au PSer, éventuellement associée à des changements dans la perméabilité des mitochondries. En outre, l'élévation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} pourrait activer le canal K + et l'anoctamine TMEM-16F. Chez les patients atteints du syndrome de Scott, les mutations de TMEM-16F sont associés à des saignements en situation provoquée. Le clivage et la réorganisation du cytosquelette nécessite l'activation des Rho-kinases, favorisant la libération de MV.

cellulaire immortalisée de lymphocyte T CD4 humain, (Sebbagh, Renvoize et al. 2001), tandis qu'une activation de la caspase 2 en réponse à la thrombine, conduit ainsi à la formation de MVs dépendante de la ROCK-II dans les cellules endothéliales, et ce en absence de signaux d'apoptose (Sapet, Simoncini et al. 2006).

De cette manière, une délamination initiale du cytosquelette sous membranaire se produit, facilitant le bourgeonnement de la membrane plasmique (Figure 9).

II.2.2.3 Autres acteurs du remodelage membranaire

Des modifications de l'organisation de la membrane plasmique peuvent survenir via des mécanismes indépendants des translocases. Ces modifications favorisent l'enrichissement différencié en PLs entre les feuillets de la bicouche ou bien modifient la composition de la membrane plasmique en protéines de courbure. Dans un modèle de cellules tumorales, la cascade de signalisation dépendante du facteur ADP-ribosylation 6 (ARF6), jouerait un rôle dans la sécrétion des MVs (Muralidharan-Chari, Clancy et al. 2009) en activant la phospholipase D et l'hydrolyse de la phosphatidylcholine de la membrane plasmique en acide phosphatidique qui recrute aux abords du feuillet interne la MAP kinase ERK et aussi les protéines de courbure.

Les rafts sont fortement impliqués dans les phénomènes de vésiculation. Ces radeaux lipidiques sont des assemblages dynamiques de protéines transmembranaires et de lipides (le cholestérol, les sphingolipides, les gangliosides) (Figure 10) qui flottent librement dans le plan de la membrane et se regroupent pour former de plateforme de signalisation plus grandes (Simons and Ehehalt 2002). Ces plateformes dynamiques trient lipides et protéines de la membrane plasmique et sont impliqués dans le renouvellement de ses composants. Ainsi, la libération de MVs se réalise concomitamment à la formation de rafts qui sont enrichis à leur périphérie en PSer et peuvent aussi contenir du FT (Kunzelmann-Marche, Freyssinet et al. 2002) ou des protéines caractéristiques de la lignée comme la glycoprotéine P-sélectine ligand-1 (PSLG-1) dans les leucocytes (Del Conde, Shrimpton et al. 2005) (Sonnino and Prinetti 2013), ou le récepteur du glucagon-like peptide-1 (GLP-1R) dans les cellules ß (Gleizes, Kreutter et al. 2016).

Ces différentes données soulignent clairement la complexité des voies menant à la formation des MVs.

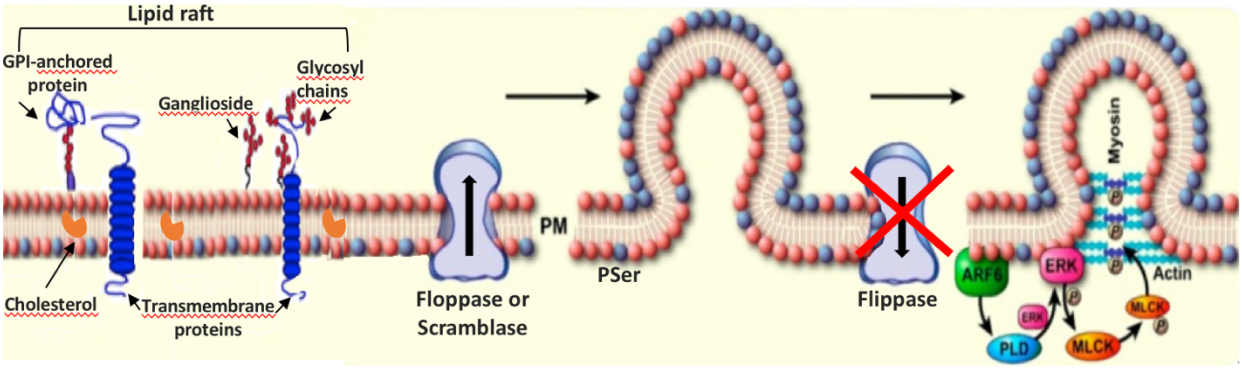


Figure 10 : Acteurs classiques et potentiels de l'émission des MVs. Adapté de (Kalra, Drummen et al. 2016) .
A la suite d'une activation cellulaire et à l'augmentation intracellulaire du calcium, le bourgeonnement est favorisé par l'externalisation de la PSer (activités floppase et scramblase). La destruction locale du cytosquelette et la formation de rafts favorise la constitution de la vésiculation. L'initiation d'une cascade de signalisation par ARF6 par l'activation et le recrutement de PLD / ERK et à la phosphorylation de MLCK peut aussi induire la contraction de la myosine et l'émission de MVs.

II.3 Cible des Microvésicules et Clairance

L'externalisation de la PSer à la surface des MVs est un déterminant majeur de la clairance par les macrophages (Fadok, Bratton et al. 1998, Schlegel and Williamson 2001). De part, la petite taille des MVs et de la faible expression antigénique, l'élimination des MVs est limitée et leur biodisponibilité est supérieure à celle des cellules activées (Baj-Krzyworzeka, Baran et al. 2010).

Les récepteurs spécifiques de la PSer (PSR) (Fadok, Bratton et al. 2000), participent à la clairance des MVs endothéliales par reconnaissance de l'Annexine-I (Jansen, Yang et al. 2012) et contribuent à la phagocytose des débris par les macrophages, fibroblastes et cellules épithéliales et endothéliales.

Un autre mécanisme d'interaction entre les cellules cibles et les MVs (Dasgupta, Abdel-Monem et al. 2009) repose sur la capacité de la lactadhérine à se lier à la PSer par son domaine discoïde I-like et aux intégrines comme les αvβ3 via la séquence Arg-Gly-Asp (RGD). La lactadhérine est sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques immatures et contribuerait à la clairance des MVs par les macrophages spléniques (Dasgupta, Abdel-Monem et al. 2009).En clinique, la lactadhérine est indétectable dans le plasma des sujets sains mais s'exprime à la surface des MVs plaquettaires. Symétriquement, des souris KO pour le gène de la lactadhérine présentent des concentrations de MVs circulantes élevées et une hypercoagulabilité,

réversibles par complémentation en lactadhérine (Dasgupta, Abdel-Monem et al. 2009). La glycoprotéine β2, présente à la surface des macrophages interagit avec les MVs plaquettaires de manière dose dépendante et active la phagocytose (Abdel-Monem, Dasgupta et al. 2010).

Une étude a identifié une voie de phagocytose médiée par les IgM et non pas par les IgG (Litvack, Post et al. 2011). Il a été également montré que le CD36, un « Scavenger de classe B » largement exprimé à la surface de multiples types cellulaires (macrophages, adipocytes, plaquettes, CE microvasculaires et les cellules épithélialesles), interagit avec les MVs porteuses de lipoprotéines oxydées de basse densité (oxLDL) (Greenberg, Sun et al. 2006). Par ailleurs, le CD14, ligand du LPS exprimé à la surface des macrophages, reconnait ICAM-3 des cellules apoptotiques (Devitt, Moffatt et al. 1998).

Une nouvelle voie de de clearance des MVs impliquerait la glycoprotéine Del-1(developmental endothelial locus-1) par les CE. Comme la lactadhérine, elle participerait à la clairance des MVs plaquettaires par l'endothélium vasculaire en se fixant par son domaine I à la PSer des MVs, le complexe ainsi formé étant ensuite reconnu par les intégrines αvβ3 et αvβ5 endothéliales (Dasgupta, Le et al. 2012) (Figure 11).

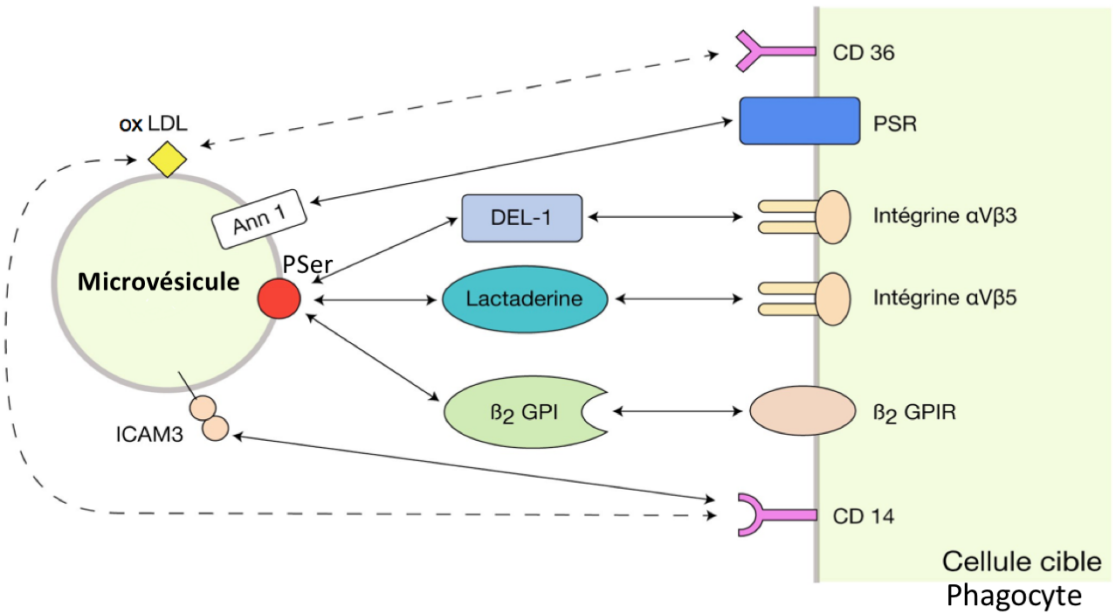


Figure 11 : Mécanismes impliqués dans la clairance des MVs circulantes.

Contrairement à la lactadhérine, Del-1 est retrouvée chez les sujets sains. De plus, chez les souris KO en Del-1 l'élévation du taux de MVs circulantes, comparativement aux souris sauvages, ne se produit qu'après application d'un stress endotoxique, suggérant que la clairance des MVs médiée par Del-1 est mobilisée seulement en condition de stress. La clairance médiée par Del-1 est réservée aux MVs plaquettaires avec un tropisme cérébral et pulmonaire résultant de sa distribution ciblée dans les territoires endothéliaux spécifiques (Del-1 est absente de l'endothélium splénique et hépatique chez la souris) (Dasgupta, Le et al. 2012).

Les MVs ont une demi-vie qui varie de quelques minutes à plusieurs heures. L'injection de MVs plaquettaires chez le lapin (Rand, Wang et al. 2006), de MVs érythrocytaires chez le rat (Willekens, Werre et al. 2005), ou de MVs endothéliales chez la souris montre que 80% des MVs sont éliminées de la circulation dans les 10 minutes suivant l'injection (Al Faraj, Gazeau et al. 2012). Chez l'homme, les données sont parcellaires. La transfusion de plaquettes issues d'aphérèse et contenant des taux élevés de MVs plaquettaires aux patients souffrant de thrombocytopenie (Rank, Nieuwland et al. 2011), montre une réduction de 50% de leur taux circulant après 5h. Ce temps parait plus long comparativement à celui qui a pu être observé dans les modèles animaux. Cependant, dans les modèles animaux, les MVs sont généralement produites à partir de cultures cellulaires et leur temps de clairance dépendra du type de stimulus. Dans les études cliniques, la faible numération de macrophages et neutrophiles susceptibles de contribuer à la phagocytose, peut expliquer cette disparité, du moins chez les sujets sans infection ou inflammation.

Augustine et ses collaborateurs, évaluant les patients subissant une échocardiographie de stress à la dobutamine, ont rapporté une élévation de MVs dérivées de différents types de cellules (plaquettes, érythrocytes et cellules endothéliales) immédiatement après le test, suivi d'une clairance microvésiculaires rapide de la circulation pendant l'heure qui suit la réponse au stress cardiaque. Ces auteurs ont suggéré que la libération de MV est un mécanisme protecteur pour éliminer le stress cellulaire chez ces patients (Augustine, Ayers et al. 2014). Chez les patients post-infarctus du myocarde et après traitement angioplastique et antiplaquettaire, les taux élevés de MVs plaquettaires disparaissent plus rapidement (1-2 jours) que les MVs leucocytaires (6 jours) (Morel, Toti et al. 2004).

Lorsque l'on étudie la localisation des MVs après clairance, celles-ci sont principalement localisées dans le foie (45%) mais aussi assez fortement dans les os (23%), on en retrouve également dans la peau (10%), les muscles (6%), la rate (3%) et les poumons (2%) (Willekens, Werre et al. 2005). Le rôle de la rate comme organe de clairance a été suggéré dans une étude sur patients splénectomisés (Fontana, Jy et al. 2008).

II.4 Isolement et dosage des microvésicules : Application en recherche clinique

La concentration circulante des MVs reflète un processus d'activation ou d'apoptose des cellules dans la circulation, ou séquestrées dans les tissus, inaccessibles à la détection par des moyens non-invasifs. C'est aussi la résultante entre la production de MV liée à l'activation cellulaire et leur élimination par le système réticulo-endothélial ou leur séquestration dans des agrégats cellulaires. Le besoin de quantifier ces MVs en tant que biomarqueurs physiopathologiques a conduit au développement de plusieurs méthodes, avec des principes et des coût différents. Dans le contexte d'études cliniques, il est important d'avoir une méthode d'isolement et de détection précise et standardisée.

II.4.1 Etapes pré-analytiques pour les études cliniques

L'identification des MVs circulantes nécessite de nombreuses précautions de prélèvement et de traitement des échantillons sanguins. Toute activation artéfactuelle des cellules sanguines est source de libération de MVs dans le tube de prélèvement. La taille de l'aiguille (18 ou 21G), le site du prélèvement, l'utilisation du garrot, la méthode d'aspiration, l'anticoagulant (Krueger, Barnard et al. 2002), ont un impact. D'après les recommandations de l'ISTH et des sociétés savantes nationales (GRRC), le système vacutainer et une faible compression du garrot sont à préférer (Shah, Bergeron et al. 2008). Au cours des 2 dernières décades, la phase préanalytique a extrêmement varié selon les équipes, expliquant des divergences observées sur les taux de MVs circulantes dans la littérature (Jy, Horstman et al. 2004) (Hugel, Zobairi et al. 2004, Chironi, Boulanger et al. 2009). Il est maintenant recommandé de ne pas dépasser 90 min suivant le prélèvement pour effectuer la phase préanalytique, c'est à dire la réalisation du plasma pauvre en plaquettes qui devra être immédiatement congelé à (-80°C) (Shah, Bergeron et al. 2008).

La plupart des équipes réalisent deux centrifugations successives à basse vitesse et faible durée. L'ensemble de ces précautions a pour objectif de (i) réduire l'activation des plaquettes et (ii) empêcher la formation d'agrégats artéfactuels leuco-endothélio-plaquettaire avec les MVs tout en préservant la structure et les propriétés des MVs (activités enzymatiques ou molécules actives). L'ensemble des paramètres pré-analytiques est régulièrement évalué de manière multicentrique, par un groupe de travail européen (ISTH pour international society on thrombosis and haemostasis) qui fournit des recommandations (Lacroix, Judicone et al. 2013).

Les méthodes de dosages et de détection sont cruciales pour la définition des concentrations de MVs qui peuvent être considérées comme pathologiques. Des efforts récents (Szatanek, Baj-Krzyworzeka et al. 2017) de mesure métronimique pour la normalisation des

procédures d'extraction et d'analyse des MVs entre les instruments et les laboratoires sont en cours (Valkonen, van der Pol et al. 2017) .

La plupart des méthodes de mesure et d'analyse sont basées sur la reconnaissance de la PSer exposée à des antigènes de surface portés par les MVs avec une éventuelle mesure du diamètre de la MV. Notre laboratoire a développé des méthodes de dosage fonctionnel qui offre l'avantage de s'affranchir des contraintes de taille et est adaptable à de grandes séries d'échantillons (Hugel, Zobairi et al. 2004). Cette méthode combine une phase de capture des MVs sur surface fonctionnalisée avec de l'annexine-5 ou des anticorps spécifiques des antigènes de surface caractérisant la lignée cellulaire ou le stress. Si cette méthode enzymatique en phase hétérogène offre l'avantage d'un lavage extensif, elle ne permet pas l'analyse individuelle des MVs et fournit des mesures de concentrations de MVs correspondant à une surface totale sans distinction de taille.

Chaque méthode a ses inconvénients et avantages, et dépend souvent de la qualité des réactifs, habituellement des anticorps. De plus, l'interférence possible des antigènes solubles libérés de la membrane des cellules stimulées ou présents dans les fluides biologiques, peut conduire à une sous-estimation de concentrations de MV que ce soit par cytométrie en flux ou par capture antigénique, tandis que la liaison de l'annexine-5 nécessite habituellement la présence de PSer accessible (Freyssinet 2003), c'est à dire non masquée par un ligand d'affinité supérieure (10^{-10} - 10^{-14} M).

De ce fait, l'interprétation des résultats obtenus avec les MVs générées *in vitro* à partir de cultures cellulaires doit être prudente, car les ligands éventuels des MVs différent selon leur environnement c'est à dire le milieu de culture ou le fluide biologique. Enfin, *in vivo*, les fluides biologiques sont le réceptacle de MVs d'origines cellulaires multiples.

Chapitre III

Microvésicules marqueurs circulants de l'atteinte vasculaire

III. Microvésicules marqueurs circulants de l'atteinte vasculaire

III.1 Les biomarqueurs actuels de l'atteinte vasculaire

Actuellement, la période estimée du développement d'une maladie vasculaire métabolique avant son diagnostic est de 5 à10 ans. Le diagnostic et le pronostic thérapeutique de la maladie sont basés sur des paramètres sériques facilement accessibles, tels que glucose, triacylglycérol, cholestérol, lipoprotéines, dont les concentrations augmentent lors d'un excès énergétique comme dans le syndrome métabolique, ou de la résistance à l'insuline dans le DT2, ou de l'obésité. Ces concentrations augmentées sont aussi associées à un risque d'athérothrombose. L'inflammation chronique (Conen, Rexrode et al. 2009) et le stress oxydatif (Holvoet, Kritchevsky et al. 2004, Holvoet, Lee et al. 2008) sont par ailleurs des causes reconnues de dommage endothélial. L'inflammation endothéliale favorise la diapédèse monocytaire et la dysfonction endothéliale athérothrombotique (Heilbronn and Campbell 2008). Certaines adipokines pro-inflammatoires, telles que IL-2/6, TNFα, adiponectine, ferritine et CRP sont positivement corrélées au degré de résistance à l'insuline, à l'altération de la tolérance au glucose, et à l'excès de masse tissulaire adipeuse (Pradhan, Manson et al. 2001, Duncan, Schmidt et al. 2003).

Dans la pratique clinique, les biomarqueurs dits traditionnels combinés permettent la prédiction de la maladie métabolique (diabète DT2) (Samuel and Shulman 2012) avec une probabilité d'environ 0,65 à 0,75 (Figure 12). Les paramètres morphologiques anormaux (IMC, rapport taille-hanches) l'hygiène de vie des patients (tension artérielle, tabagisme, forme physique, consommation alimentaire) sont des facteurs de risque augmentant l'efficacité prédictive de 0,85 ou 0,90 (Schulze, Weikert et al. 2009). Actuellement, des tests fonctionnels sont appliqués pour le diagnostic et la confirmation d'une maladie métabolique, tels que des tests de glucose et de tolérance à l'insuline, ainsi que des études de clamp euglycémique, des procédures d'imagerie non invasives, comme l'IRM de la masse des cellules β pour le DT2 , tomographie par émission de positrons (TEP) de la masse de tissu adipeux brun pour l'obésité (Matthews, Rabiner et al. 2011), pour augmenter la valeur prédictive des biomarqueurs traditionnels qui reste cependant tardive.

Cependant, le désavantage des biomarqueurs traditionnels, fonctionnels et d'imagerie est qu'ils sont élevés seulement dans la phase aiguë de la maladie. Ils sont donc moins informatifs pour la prédiction de la susceptibilité à cette maladie, invalidant la prévention potentielle et la prise en charge précoce.

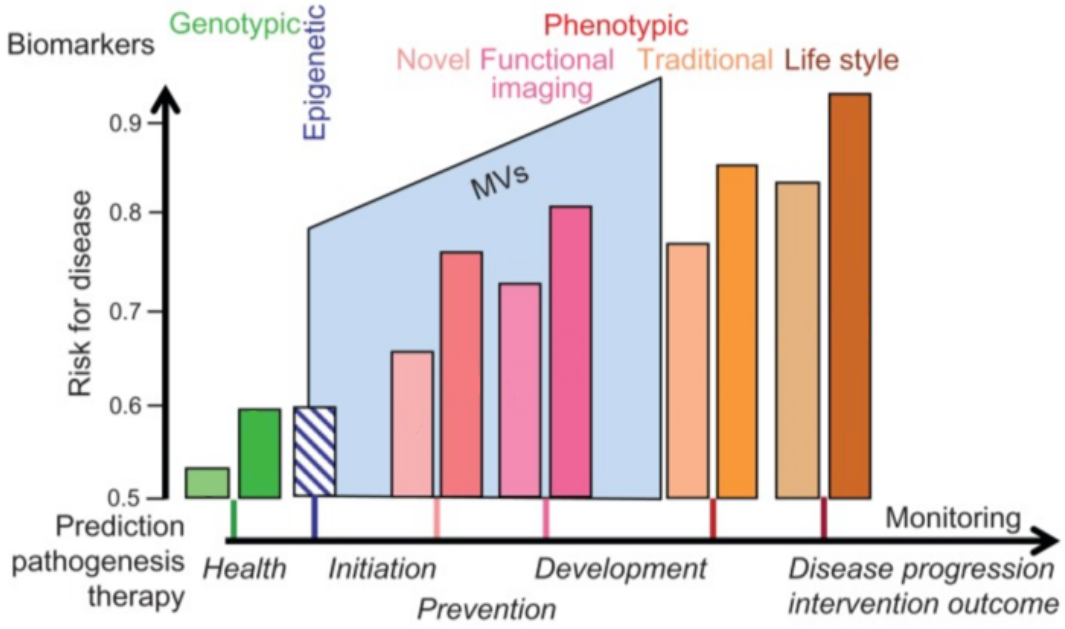


Figure 12 : Probabilité d'apparition de la maladie (risque) selon le premier moment possible pour sa prédiction. *(Muller 2012)*

Les risques de maladie sont donnés pour des biomarqueurs génétiques (en vert), des biomarqueurs épigénétiques (en bleu rayé), des biomarqueurs nouveaux / fonctionnels (en rose) et des biomarqueurs traditionnels / de mode de vie (en brun). Des MVs (en bleu). Pour chaque type de biomarqueur, le nombre de biomarqueurs mesurés et combinés pour la prédiction est indiqué dans les barres. La prédictivité à 0,5 correspond à une prédiction au hasard. Les valeurs prédictives associées aux MVs seraient plus précoces et aussi puissantes que les marqueurs traditionnels et proportionnelles à la sévérité de la maladie.

Le plus souvent les profils d'expression de RNA circulant n'identifient que les individus à haut risque de développer la maladie athérothrombotique ou métabolique (Ling and Groop 2009, Bonauer, Boon et al. 2010, Heneghan, Miller et al. 2010). Les biomarqueurs génotypiques sont également décevants. Ainsi, la combinaison de 18 gènes pour des polymorphismes mono-nucléotidiques avait une faible valeur prédictive pour le DT2 et n'a amélioré que marginalement la prédiction du DT2 au-delà des caractéristiques cliniques (Lango, Palmer et al. 2008). A l'heure actuelle, même si certaines variantes génétiques des maladies sont identifiées, leurs marqueurs sont insuffisants dans le cas des maladies métaboliques multifactorielles complexes (Seeleang 2011). Ainsi, il existe un écart critique entre les biomarqueurs génotypiques et leur efficacité plutôt limitée à prédire très tôt et indépendamment du stade de vie et les biomarqueurs traditionnels ainsi que fonctionnels et d'imagerie, avec leur capacité de prédire plutôt tardivement la pathogenèse (Figure 12).

III.2 Exigences pour les biomarqueurs futurs

Cet écart doit être comblé par la découverte de nouveaux biomarqueurs relativement faciles à mesurer, cohérents et reproductibles avec un pouvoir prédictif significatif sur les facteurs de risque conventionnels. Des biomarqueurs plasmatiques permettent le suivi non invasif (i) de la pathogenèse globale ou des étapes critiques de la pathologie ; (ii) de l'efficacité du médicament d'une manière indépendante de la cible, et ont un coût d'investigation préclinique et clinique faible. L'énorme quantité de composants protéiques du plasma entrave la découverte et la détermination de nouveaux biomarqueurs dont les seuils varient individuellement et sont biaisés par les procédures de fractionnement complexes et fastidieuses.

En revanche, la protéomique plasmatique basée sur les MVs présente l'avantage distinct que les informations obtenues peuvent englober un réservoir considérable de nouveaux candidats biomarqueurs transférés des organes, des tissus et des cellules à ce compartiment circulant et protégé de la dégradation. Leur concentration et composition sont déterminées par des stimuli spécifiques (médicaments) ou des micro-environnements pathogènes (par exemple, stress cellulaire, taux de glucose élevé) et le profil de MV constitue une signature du degré d'activation cellulaire susceptible d'articuler une prédiction très précoce, avec une probabilité de prédiction élevée de la maladie, de son diagnostic.

Bien que les MVs fournissent des informations sur le contenu en protéines et molécules actives mobilisées par la cellule parentale en réponse au stress, la sensibilité des MVs vis-à-vis des stimuli environnementaux nécessite des conditions préanalytiques rigoureuses.

III.3 Microvésicules comme marqueurs circulants de l'atteinte vasculaire

Les concentrations plasmatiques de MVs sont modifiées par les principaux états pathologiques associés à un dysfonctionnement vasculaire comme un tonus vasculaire inapproprié, l'athérothrombose et des désordres métaboliques auquel il est associé.

III.3.1 Impact du flux sanguin sur l'endothélium et la génération de MVs

L'endothélium vasculaire joue un rôle crucial dans la régulation du tonus et de la structure vasculaire. L'endothélium inhibe l'adhésion des leucocytes et des plaquettes et maintient un équilibre entre l'activité profibrinolytique et thrombotique (Landmesser, Hornig et al. 2004). Les cellules endothéliales (CE) exercent de plus des fonctions de barrière naturelle par le biais de médiateurs endothéliaux à actions paracrine et autocrine et par l'expression contrôlée de connexine 43 et de VE cadhérine (Johnson, Roach et al. 2018) (Figure 13). Le phénotype des CE varie en réponse à des stimuli mécaniques et biochimiques, le plus souvent systémiques et parfois associés à des conditions d'hygiène et environnementales.

La contrainte de cisaillement au niveau artériel (>15 dyne/cm^2) constante et tangentielle à l'endothélium et qui est appelée « force de cisaillement laminaire » induit une quiescence endothéliale athéro-protectrice (Dewey, Bussolari et al. 1981) avec phénotype anti-inflammatoire, anti-oxydant et anti-thrombotique. Le flux sanguin faible (<4 dyne/cm^2) et perturbé aux embranchements et courbures artériels entraine un changement phénotypique des CE qui prolifèrent (DePaola, Gimbrone et al. 1992), ne sont plus organisées dans le sens du flux, sont moins jointives et plus perméables aux éléments circulants, y compris les LDL (Lusis 2000) (Xing, Moerman et al. 2018). L'endothélium subit des altérations phénotypiques, devient pro-oxydant et secrète des radicaux libres de l'oxygène (RLO). Ce phénotype conduisant à une perte de capacité de la réponse vasodilatatrice favorise un état thrombogéne, et pro-inflammatoire avec l'adhésion des leucocytes et la diapédèse monocytaire (Sitia, Tomasoni et al. 2010) (Figure 14).

La dysfonction endothéliale qui induit l'expression du facteur tissulaire, est observée au stade précoce de la plupart des maladies cardiovasculaires (Yang, Lucas et al. 2010) et est associée à l'hypertension, le diabète, l'athérosclérose, les cardiopathies ischémiques et les maladies rénales chroniques. Parce que les MVs sont circulantes, le territoire endothélial et des contraintes de flux doivent être considérés comme des paramètres susceptibles de modifier l'origine cellulaire des MVs.

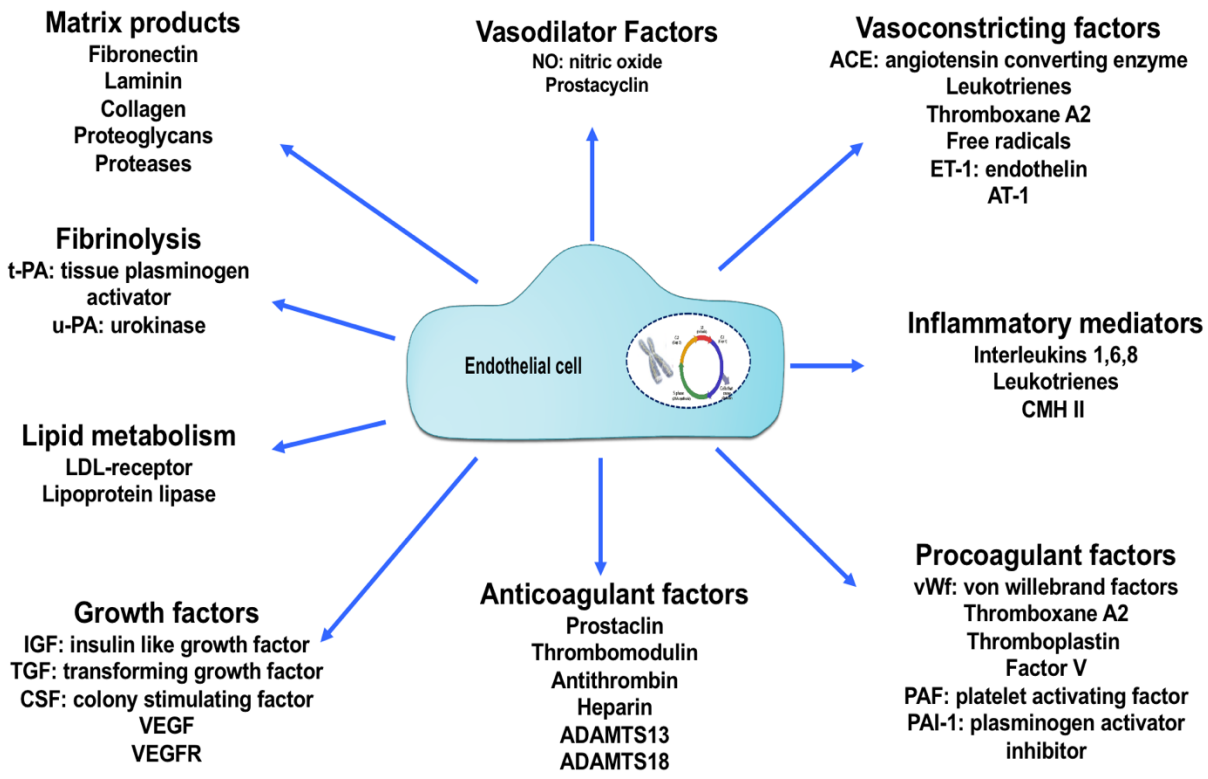


Figure 13 : Les différentes fonctions métaboliques et de synthèse des cellules endothéliales.

III.3.1.1 Les caractéristiques classiques du dysfonctionnement endothélial lié au flux sanguin

Une altération de la fonction de la eNOS, une diminution de la biodisponibilité du NO, ou les deux, sont des anomalies fondamentales pouvant mener aux manifestations physiopathologiques du dysfonctionnement endothélial (Widlansky, Gokce et al. 2003). La diminution de la synthèse du NO conduit à la perte de eNOS libre par association à la cavéoline-1 qui l'inactive (Martin, Tesse et al. 2004) (Figure 14).

Le postulat actuel propose que les faibles contraintes de cisaillement favorisent la production endothéliales de ROS par plusieurs mécanismes (Forrester, Kikuchi et al. 2018). La eNOS peut être découplée ou se trouver en manque d'un de ses substrats et produit alors des anions superoxydes (Vasquez-Vivar, Kalyanaraman et al. 1998). Les intégrines participeraient au couplage de la eNOS (Herranz, Marquez et al. 2012). De plus, l'augmentation de l'activité NADPH oxydase induite par les flux turbulents conduit aussi à la production de ROS (Malek and Izumo 1994) (Wang, Zhang et al. 2010). Enfin, les activités xanthine oxydase et COX sont aussi modulées (McNally, Davis et al. 2003).

La perte de NO cytoprotecteur ainsi que la production de ROS rendent les cellules susceptibles à l'apoptose. Alors que le NO prévient l'apoptose induite par le TNF alpha, les faibles contraintes de cisaillement favorisent l'action des molécules pro-apoptotiques, notamment XBP1, protéine de réponse au stress du réticulum endoplasmique qui est surexprimée et active les caspases endothéliales (Zeng, Zampetaki et al. 2009). Les faibles forces de cisaillement augmentent également la prolifération endothéliale (DeStefano, Williams et al. 2017) grâce à une activation pérenne d'ERK (Chiu, Wang et al. 1998). Enfin, les cellules exposées à des faibles forces de cisaillement présentent des télomères plus courts et une accélération de la sénescence (Chang and Harley 1995). L'endothélium devient pavimenteux du fait d'un cytosquelette fragilisé (Vyalov, Langille et al. 1996).

Différents études ont de plus montré *in vivo* que les zones de faibles contraintes de cisaillement comme les embranchements étaient plus perméables que les zones linéaires de l'arbre vasculaire (Xing, Moerman et al. 2018) . Les faibles contraintes de cisaillement qui sont retrouvées aux embranchements artériels, sont connues pour activer SREBP (« Sterol regulatory element binding protein »), un facteur de transcription permettant l'expression de protéines responsables de la capture et la synthèse d'acides gras et des gènes pro- inflammatoires dont NF-κB (Passerini, Polacek et al. 2004). L'inflammation est aussi augmentée dans ces conditions,

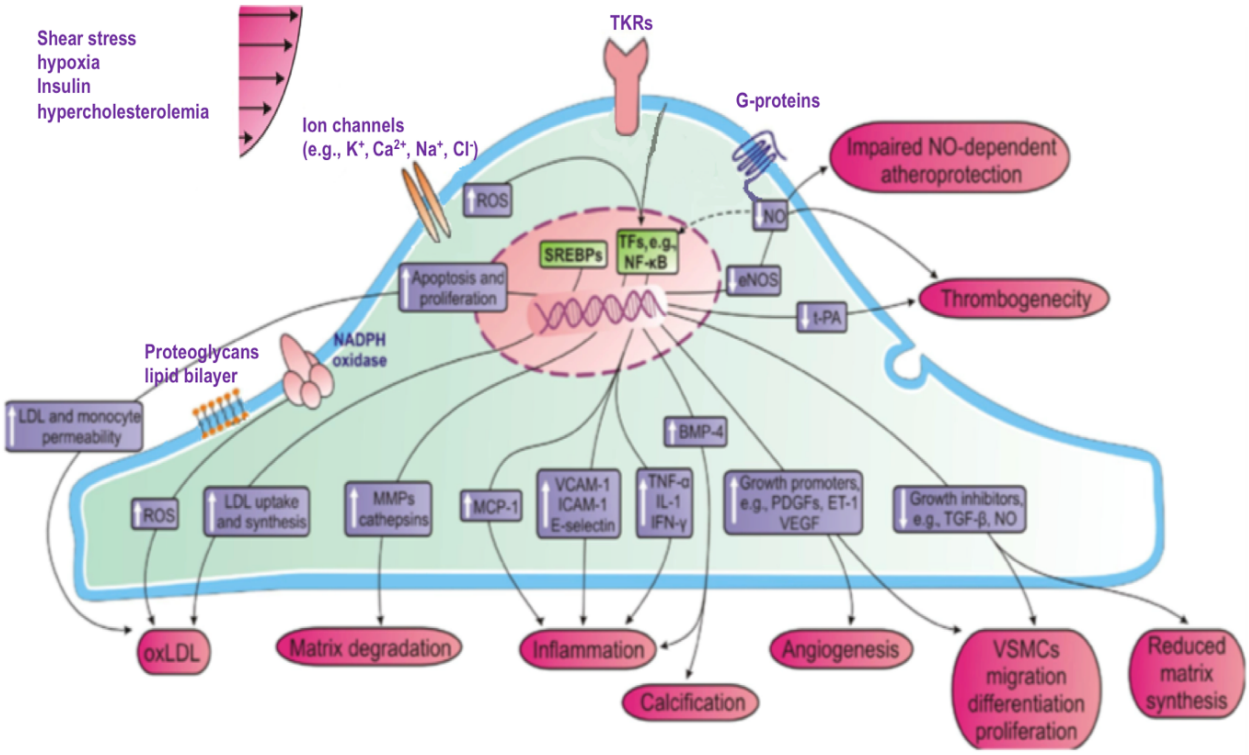


Figure 14 : Les caractéristiques classiques du dysfonctionnement endothélial.

Adapté de (Chatzizisis, Coskun et al. 2007)

Différents stimuli physiopathologiques induisent les altérations phénotypiques de l'endothélium favorisant ainsi la dysfonction des CE, la formation et la progression de la plaque athéroscléreuse, et le remodelage vasculaire.
BMP = protéine morphogénique osseuse; ET = endothéline; ICAM = molécule d'adhésion intercellulaire; IFN = interféron; IL = interleukine; LDL = cholestérol des lipoprotéines de basse densité; MCP = protéine chimioattractive monocytaire; MMP = métalloprotéinase matricielle; NO = oxyde nitrique; PDGF = facteur de croissance dérivé des plaquettes; SREBP = protéine de liaison des éléments régulateurs du stérol; TF = facteur de transcription; TGF = facteur de croissance transformant; TNF = facteur de nécrose tumorale; t-PA = activateur du plasminogène tissulaire; VCAM = molécule d'adhésion cellulaire vasculaire; VEGF = facteur de croissance endothélial vasculaire; VSMC = cellule musculaire lisse vasculaire.

tout comme la perméabilité endothéliale. Les faibles contraintes de cisaillement influencent également l'expression ou l'activation de molécules d'adhésion comme ICAM-1, VCAM1, MCP1 et la sélectine endothéliale (Chiu, Lee et al. 2004), promouvant le recrutement leucocytaire.

III.3.1.2 Microvésicules marqueurs circulants de la dysfonction endothéliale

Les MVs endothéliales sont des biomarqueurs potentiels de maladies cardiovasculaires avec une composante endothéliale dysfonctionnelle. Des taux circulants de MVs porteuses de cadhérine (MVs $CD144^{+}$) sont inversement corrélés à l'amplitude de la dilatation médiée par le flux (FMD) dans l'artère brachiale de patients insuffisant rénaux. Cette observation est en accord avec le caractère endothélium-dépendant de la FMD. D'ailleurs, aucune corrélation n'est observée avec les MVs plaquettaires ou identifiées par marquage annexine-5 chez les patients insuffisants rénaux (Amabile, Guerin et al. 2005) (Amabile, Guerin et al. 2005, Faure, Dou et al. 2006). Cette observation est retrouvée dans le DT2 non compliqué après consommation de repas riches en matières grasses entraînant des changements dysmétaboliques, suggérant une susceptibilité endothéliale au stress métabolique, avec des conséquences potentielles athérogènes et un risque de maladie cardiovasculaire supérieur (Tushuizen, Nieuwland et al. 2007). Parce que la corrélation est indépendante de l'âge des patients ou de leur pression artérielle, les MVs $CD144^{+}$ seraient un bon marqueur pour quantifier le dysfonctionnement endothélial.

De nombreuses études chez les patients coronariens confirment cette hypothèse. Les taux circulants de MV endothéliales exprimant à la fois le CD31 (PECAM-1) et la PSer (Annexine-5^{+}) sont inversement corrélés à l'augmentation du diamètre de l'artère coronaire suite à l'administration de l'acétylcholine (Werner, Wassmann et al. 2006). Cependant, les MV endothéliales $CD144^{+}$ sont aussi prédictives d'un dysfonctionnement des CE chez les patients atteint de DT2 sans maladie coronarienne obstructive (Koga, Sugiyama et al. 2006) et corrélées à la dysfonction endothéliale chez la patiente obèse (Esposito, Ciotola et al. 2006).

Ainsi, l'ensemble des données de la littérature suggère que les MV endothéliales sont la signature d'un stress endothélial plutôt que stricto-sensu de la maladie coronarienne. Ainsi, les taux circulants de MV endothéliales sont corrélés à une rigidité artérielle chez des patients hémodialysés (Amabile, Guerin et al. 2005) et les taux circulants de MV endothéliales ont augmentés chez les patients en choc septique (Mostefai, Meziani et al. 2008). De plus, même une brève exposition à la fumée augmente les concentrations plasmatiques de MV endothéliales (Heiss, Amabile et al. 2008), de manière corrélée à la baisse de la FMD.

Plusieurs études montrent que les MV endothéliales circulantes indiquent la sévérité hémodynamique ou un mauvais pronostic chez les patients souffrant d'hypertension artérielle pulmonaire (Amabile, Heiss et al. 2008, Bakouboula, Morel et al. 2008, Amabile, Heiss et al. 2009), la mortalité cardiovasculaire dans l'insuffisance rénale terminale (Amabile, Guerin et al. 2012) et les événements cardiovasculaires ultérieurs chez les patients à haut risque de maladie coronarienne (Morel, Hugel et al. 2004, Nozaki, Sugiyama et al. 2010). De plus, dans une sous-cohorte de 844 patients de l'étude Framingham, après 8 ans d'antécédents cardiovasculaires, des taux élevés de MV endothéliales étaient associés à au moins 1 facteur de risque (Amabile, Cheng et al. 2014). L'évaluation des taux de MV endothéliales serait donc un nouvel outil de stratification des patients à risque cardiovasculaire, à condition d'identifier les facteurs confondants comme le diabète, la dyslipidémie.

De fait, l'amélioration de la fonction endothéliale favorisée par l'administration séparée d'un agent hypocholestérolémiant (simvastatine), d'un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II (losartan) ou d'un antagoniste des canaux calciques antihypertenseurs (nifédipine) à des patients présentant une pression artérielle élevée réduisait les taux circulants de MV endothéliales et/ou plaquettaires, ainsi que les marqueurs endothéliaux circulants de l'inflammation comme VCAM-1(Nomura, Kanazawa et al. 2002) (Nomura, Shouzu et al. 2005) (Nomura, Inami et al. 2007). Par ailleurs, le Probucol un hypolipémiant et antioxydant, et la ticlopidine un inhibiteur des récepteurs plaquettaires P2Y12 de l'ADP (Nomura, Takahashi et al. 2004), diminue les taux circulants des MV endothéliales et plaquettaires chez des patients diabétiques et dyslipidémiques après infarctus du myocarde. Fait intéressant, chez le rat, un bolus d'oméga-3 avant la reperfusion diminue significativement la lésion d'I/R et la libération de MV endothéliales $CD54^+$ par rapport aux rats non traités. Par conséquent, les MV endothéliales $CD54^+$ seraient un bon marqueur d'évolution du traitement de l'infarctus du myocarde (Burban, Meyer et al. 2016).

III.3.2 Valeur pronostique des MVs circulantes dans les maladies cardiovasculaires

III.3.2.1 Enseignements des études sur le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique (Mets) est un ensemble d'anomalies métaboliques incluant l'obésité viscérale, de l'hypertension, l'hyperglycémie, la dyslipidémie et le DT2 (Fulop, Tessier et al. 2006) qui sont individuellement associées à une augmentation du risque cardiovasculaire (Wilson, D'Agostino et al. 2005). Des corrélations ont été trouvées entre le taux de MV exposant le (FT^+) et les composants du Mets (l'indice de masse corporelle, la glycémie à

jeun et l'insuline, et le cholestérol HDL sérique), mais pas l'hypercoagulabilité (Diamant, Nieuwland et al. 2002). Les MV endothéliales $CD51^+$ seraient un biomarqueur de la dysfonction endothéliale chez les patients obèses souffrant d'hypertension (Hu, Zhang et al. 2015).

Parce que le Mets confère un statut pro-inflammatoire, pro-athérogène et pro-thrombotique prédisposant à l'athérosclérose, il est intéressant d'évaluer la valeur pronostique des MV vasculaires dans leur ensemble. Chez 33 patients atteints d'un Mets mais sans signe clinique d'athérothrombose, des taux élevés de MV endothéliales favorisant l'activation *ex-vivo* des plaquettes et des leucocytes a pu être corrélée à une activation leucocytaire *in vivo* (Arteaga, Chirinos et al. 2006). Parce que les taux de MV endothéliales $CD62E^+$ restaient normaux, l'apoptose des CE, plutôt que l'activation a été évoquée (Berezin, Kremzer et al. 2016). De fait, Chironi et ses collaborateurs ont démontré que ce sont les concentrations circulantes de MVs dérivées des leucocytes qui augmentaient de façon dépendante du nombre de composantes du Mets (Chironi, Simon et al. 2006), avec une valeur prédictive du risque cardiovasculaire directement corrélée à l'indice de Framinghan et au nombre de sites de plaques athérothrombotiques de taille infraclinique. Dans une étude bicentrique incluant 88 patients avec un Mets comparés à 27 contrôles sains, l'augmentation des taux de MV de plaquettes ($CD41^+$), d'érythrocytes ($CD235^+$) et de CE ($CD144^+$) est corrélée à l'augmentation des marqueurs de stress oxydant, comme la glutathion peroxydase plasmatique et la 8-iso-prostaglandine F2α urinaire, alors qu'aucune différence significative des concentrations de MVs de leucocytes et de granulocytes n'a pas pu être détectée (Helal, Defoort et al. 2011).

Ainsi, ces données suggèrent que la caractérisation des MVs est un possible outil de la stratification du risque cardiovasculaire mais que leur origine cellulaire varie avec la sévérité de la maladie métabolique.

III.3.2.2 MVs et athérothrombose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique de la paroi artérielle, silencieuse à évolution lente souvent identifiée par la survenue d'accidents ischémiques aigus (angor instable, mort subite, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, ischémie des membres inférieurs), suite à une rupture ou à une érosion de la plaque d'athérosclérose avec formation d'un thrombus (Lusis 2000).

L'athérosclérose, est associée à des facteurs de risque physiopathologique ou environnementaux tels que l'hypertension, l'hyperlipidémie, le diabète, tabagisme, sédentarité, infections et stress. Par ailleurs, le territoire vasculaire et les conditions de flux modifient l'expression génique des artères (Zhang, Goddard et al. 2002). Elle affecte les courbures de tronc

artériel ou les bifurcations (les artères coronaires, les artères crâniennes et extra-crâniennes, la crosse aortique, les artères fémorales et dans une moindre mesure, les artères rénales) (Figure 15).

L'athérosclérose représente aujourd'hui la première cause de mortalité mondiale. D'après l'OMS, on estime à 17.3 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardiovasculaires, soit 30% de la mortalité mondiale totale. 7.3 millions seraient dus à une cardiopathie coronarienne et 6.2 millions à un accident vasculaire cérébral (Statistique 2008). De par les changements de style de vie et le vieillissement global de la population, on estime que d'ici 2030, 23 millions de personnes mourront d'une maladie cardiovasculaire. Un marqueur prédictif applicable individuellement serait un outil complémentaire aux scores cliniques actuels pour une prise en charge du patient.

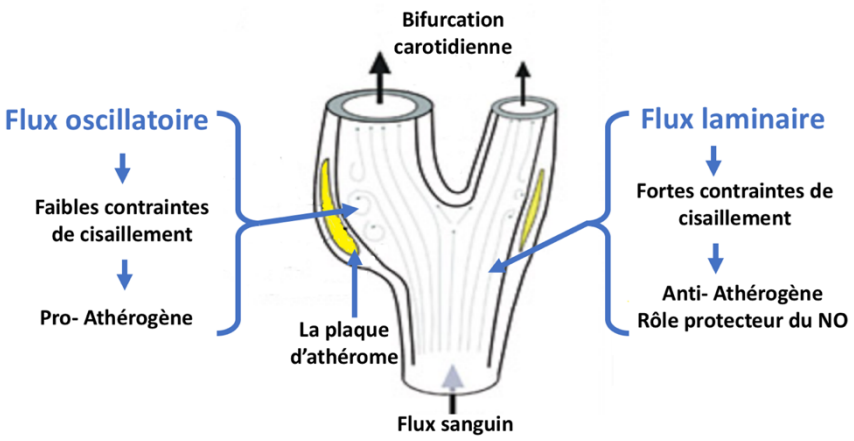


Figure 15 : Flux sanguin et sites de formation des plaques d'athérosclérose. Adaptés de (Malek, Alper et al. 1999).

Représentation schématique de l'effet du flux sanguin sur la formation des plaques d'athéromes.

III.3.2.2.1 Constitution et évolution de la plaque

Le développement de l'athérosclérose est un processus pathogénique multiple qui implique la réponse inflammatoire, le dysfonctionnement endothélial, l'activation plaquettaire et des cellules circulantes et enfin la formation de thrombus. Il résulte d'une interaction entre lipoprotéines modifiées, monocytes-macrophages, lymphocyte T et les cellules vasculaires (Hansson 2005). La plaque d'athérosclérose est le siège d'une apoptose massive affectant le muscle lisse et tous les types cellulaires présents au sein de la lésion athéromateuse (Walsh, Smith et al. 2000, Kolodgie, Narula et al. 2001, Tedgui and Mallat 2001) (Littlewood and Bennett 2003). A l'état physiologique, les phagocytes éliminent les cellules apoptotiques et les débris cellulaires sans induire de réponse inflammatoire. Dans la plaque, la présence de nombreux lipides oxydés affecte la reconnaissance des débris par les macrophages (Chang,

Bergmark et al. 1999), conduisant à un engorgement de cytoplasme des macrophages (Schrijvers, De Meyer et al. 2005), à leur lyse et à l'accumulation locale de débris cellulaires.

III.3.2.2.1.a Formation de la plaque d'athérome

Le dysfonctionnement endothélial survient à un stade précoce de la maladie athéromateuse au site de bifurcation où les CE sont soumises à des forces de cisaillement oscillatoire favorisant une perméabilité endothéliale accrue et la pénétration des LDL circulantes en excès plasmatique dans la matrice sous-endothéliale conduisant à une expression des molécules d'adhésion principalement les sélectines CD26P, CD26E et CD26L (Bevilacqua, Butcher et al. 1991) à la surface de l'endothélium. La E-sélectine interagit avec son ligand de haut affinité PGSL-1, constitutivement exprimé par les leucocytes favorisant ainsi le recrutement et la diapédèse leucocytaire dans l'intima de la paroi artérielle. Ce processus de transmigration des leucocytes au travers de l'endothélium est un mécanisme de défense physiologique lors d'une réaction inflammatoire locale (Figure 16).

Les LDL retenues dans la matrice extracellulaire sous forme oxydée vont déclencher le recrutement monocytaire et lymphocytaire, sous l'effet des chimiokines MCP-1 et CCL5 (RANTES) surexprimées par les CE (Mause, von Hundelshausen et al. 2005). L'administration d'un anticorps neutralisant le MCP-1 inhibe la transmigration (Navab, Imes et al. 1991) et l'inhibition successive de ces chimiokines ou de leurs récepteurs respectifs CCR2 et CCR5 (Weber, Weber et al. 2001) limite l'adhésion et le rolling des leucocytes sur l'endothélium (Ley 2003).

L'adhésion ferme et stable des cellules à l'endothélium est contrôlée majoritairement par les intégrines leucocytaires αLβ2, αMβ2, CD11a, CD11b, CD11c et les molécules d'adhérence cellulaire ICAM-1(CD54), VCAM-1(CD106) et PECAM-1 au niveau des jonctions endothéliales. Les souris déficientes pour les gènes ICAM-1 ou VCAM-1 et ApoE présentent ainsi une diminution de la taille des plaques (Bourdillon, Poston et al. 2000, Collins, Velji et al. 2000). La migration des monocytes dans l'intima par les jonctions inter-endothéliales est rapide (90 secondes) et se poursuit par la transformation macrophagique sous l'action du facteur hématopoïétique M-CSF synthétisé par les CE et les CML. La production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages saturés en LDL oxydés amplifie la différenciation monocytaire. Les macrophages qui ont accumulé une quantité très importante de cholestérol via leurs récepteurs « scavenger » (SR) (SR-AI , SR-AII, CD36 ou CD68), se transforment en cellules spumeuses (Silverstein 2009) séquestrées dans le cœur de la plaque d'athérome (Figure 16).

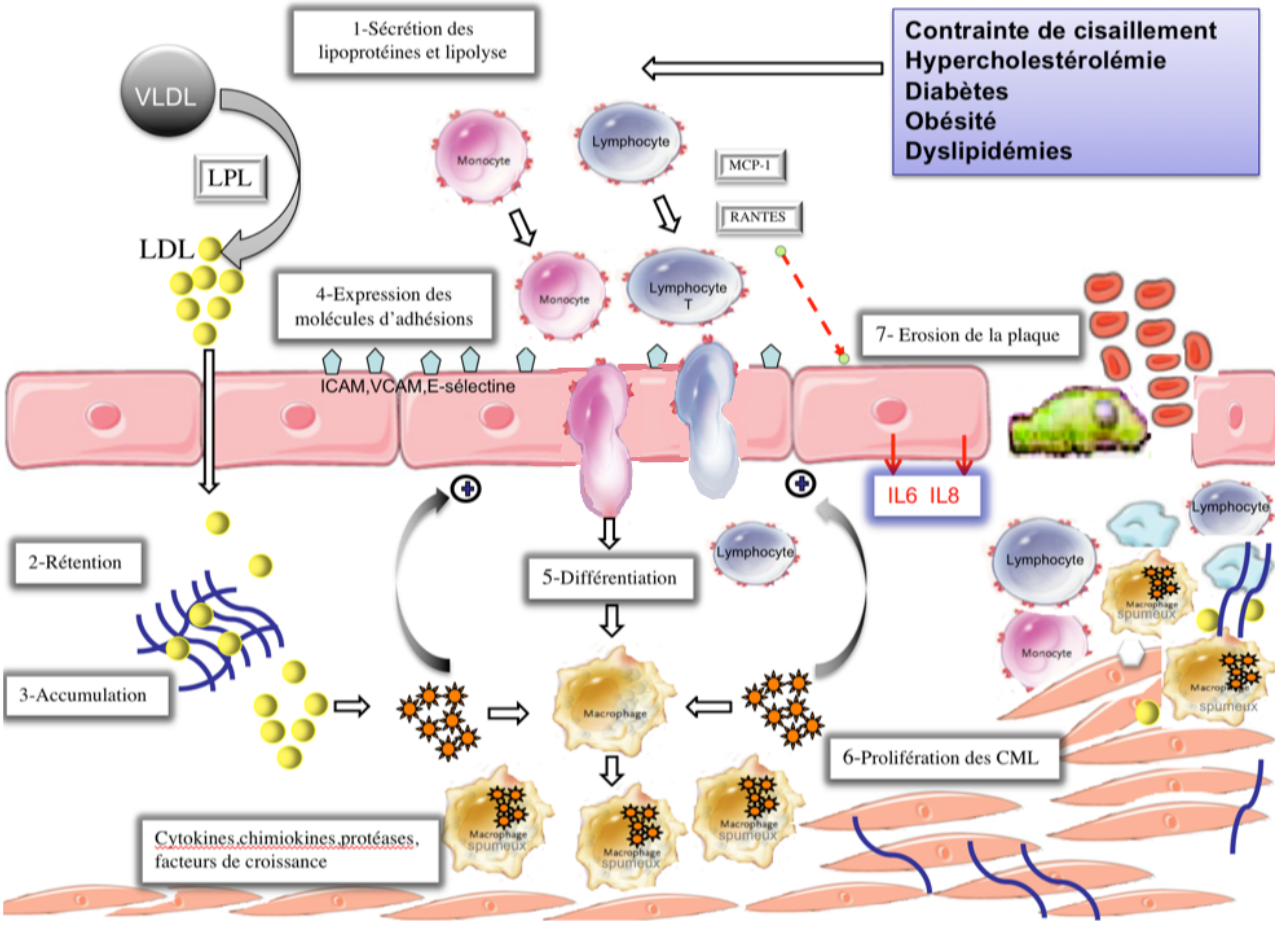


Figure 16 : Schéma des différentes étapes de la formation des plaques d'athéroscléroses.

L'accumulation de LDL-cholestérol dans l'intima artérielle est la conséquence de l'augmentation de la perméabilité endothéliale (1,2). Les LDL retenues par la matrice extracellulaire (3) sont oxydées et ont des effets pro-inflammatoires. Elles entrainent le recrutement des leucocytes via l'augmentation des molécules d'adhérence (4). A leur tour, les macrophages différenciés (5) expriment divers récepteurs qui reconnaissent les LDL oxydés, ce qui facilite leur internalisation. L'accumulation intracellulaire de cholestérol entraine la formation des cellules spumeuses qui secrètent des facteurs pro-inflammatoires et thrombogénes favorisant la progression de la plaque et sa fragilisation (6,7).

Les cellules spumeuses secrètent des médiateurs chimio-attractifs tel que IL-1β ou le TNF-α qui augmentent le recrutement des leucocytes et entretient la réaction inflammatoire (Swirski, Pittet et al. 2006), accompagné de strie lipidiques. Les cellules spumeuses caractérisent les types I et II de lésion dans la classification anatomo-pathologique de l'AHA, ces cœurs lipidiques apparaissent macroscopiquement comme des lésions jaunâtres (Viikari, Raitakari et al. 2002).

Dans ce processus, les monocytes et neutrophiles, mais aussi les cellules dendritiques sont présentes dans la plaque et exposent des antigènes spécifiques (notamment ceux des ox-LDL) aux lymphocytes T (Libby, Ridker et al. 2009).

III.3.2.2.1.b Formation de la chape fibro-musculaire

Au sein d'une strie lipidique, les macrophages spumeux sécrètent des facteurs de croissance tels que le PDGF et le FGF qui induisent la migration des CML de la media vers l'intima et leurs proliférations. Les CML passent d'un phénotype contractile à un profil sécrétoire, elles sécrètent du collagène, de l'élastine, des protéase et de cytokines (Doran, Meller et al. 2008) qui participent à la formation de « la chape fibreuse ». La chape fibreuse recouvre le cœur nécrotique ou il y a accumulation de macrophages spumeux apoptotiques, de lipides et de débris cellulaires. Le type cellulaire prédominant de la chape fibreuse est la CML pour environ 60%, le reste est occupé par les macrophages (24%) et par des lymphocytes T (16%). Le cœur lipidique est essentiellement constitué de macrophages (61%), le reste étant occupé par des CML ou des lymphocytes T (Hedrick 2015).

III.3.2.2.1.c Érosion et évolution vers une thrombose

L'instabilité de la plaque est due à l'amincissement de la chape fibreuse lié à la dégradation de la matrice extracellulaire induite par les cytokines pro-inflammatoires et les MMPs sécrétées par les macrophages et les lymphocytes T. De plus, la plaque est irriguée par de nouveaux vaisseaux, les vasa vasorum, pré-existant de l'adventice et normalement absents de l'intima, qui favorisent le recrutement inflammatoire mais aussi provoquent des hémorragies intra plaques, fragilisant ainsi la lésion artérioscléreuse. La néo-vascularisation est plus importante dans les plaques rompues que dans celles non rompues et est corrélée au degré de l'infiltration leucocytaire (Sedding, Boyle et al. 2018). La calcification dans la plaque et son éventuel effet stabilisateur de la plaque reste débattu (Criqui, Denenberg et al. 2014).

Les plaques d'athérome sont différenciées selon leur stabilité :

- Les plaques stables avec chape fibreuse épaisse, petit cœur lipidique, peu de nécrose, endothélium présent sur toute la surface de la plaque. Elles ont un faible risque de complications thrombotiques.
- Les plaques instables avec large cœur lipidique, souvent nécrosées, très fine chape fibreuse. Ces plaques ont un fort potentiel thrombotique.

Le passage d'un état stable à l'instable est possible est médié par la dégradation de la matrice extracellulaire ainsi que par la raréfaction des cellules musculaires lisses (mort cellulaire) (Stefanadis, Antoniou et al. 2017) .

Deux principaux évènements conduisent à l'initiation de la réaction thrombotique :

- L'érosion de la plaque dévoilant les facteurs pro-coagulants sous-endothéliaux.
- La rupture de la plaque ; plus subite, cette rupture met en contact direct le sang avec tous les éléments contenus dans la plaque.

III.3.2.2.2 Microvésicules marqueurs circulants des processus athérothrombotiques

Plusieurs données soutiennent le rôle de marqueur prédictif des MVs circulantes dans l'athérothrombose, dès les premiers stades liés à la présence de facteurs de risque cardiovasculaires classiques (hyperlipidémie, diabète et hypertension), aux plus tardifs associés aux événements cardiovasculaires et cérébrovasculaires aigus.

Quelques études cliniques montrent que les taux de MV plaquettaires circulantes (Nomura, Inami et al. 2009) et les MV-FT^{+} des lymphocytes T ou des neutrophiles (Diamant, Nieuwland et al. 2002) sont corrélés négativement avec les taux plasmatiques de HDL.

L'implication de MV leucocytaires dans l'athérosclérose a déjà été rapportée chez des patients symptomatiques atteints d'une artériopathie cliniquement manifestée (Mallat, Hugel et al. 1999), mais leur participation au stade asymptomatique de la maladie athéroscléreuse a été suggérée pour la première fois au sein d'une cohorte de 216 sujets sans maladie cardiovasculaire. Chironi et ses collaborateurs ont mis en évidence une relation entre les taux de MV dérivées de leucocytes circulants CD11a^{+}, le degré de risque cardiovasculaire mesuré par le « Score de Framingham » et le nombre de sites athéromateux détectés par échographie artérielle (carotide, aorte abdominale et artères fémorales) et ce de manière indépendante des facteurs de risque cardiovasculaires coexistants, de la numération leucocytaire et des traitements antihypertenseurs ou hypolipidémiants (Chironi, Simon et al. 2006). Ces données que les MVs dérivées de

leucocytes ont une valeur prédictive d'athérosclérose sub-clinique chez les sujets asymptomatiques, potentiellement utile en prévention de risque CV primaire.

Le fait que les MVs soit un facteur pronostique de récidive a été rapporté très précocement chez les patients avec un premier infarctus du myocarde dans l'étude GRACE (Mallat, Steg et al. 2004) et dans l'étude MICRO (Boulanger, Amabile et al. 2006) concernant de grandes cohortes (500 patients), suggérant que les MVs endothéliales circulantes notamment, persistaient chez les patients faisant une récidive et étaient détectables par technique de capture/ELISA et dosage prothombinase.

D'autres études dans de plus petites cohortes, ou ne respectant pas les méthodes pré-analytiques recommandées (Chiva-Blanch, Suades et al. 2016) et/ou utilisant d'autres méthodes de mesure (cytométrie) confirment une valeur prédictive du risque secondaire cardio-vasculaire pour les MVs endothéliales, plaquettaires ou leucocytaires (CD45) circulant dans le sang veineux, et plusieurs études décrivent une cinétique décroissante après la prise en charge thérapeutique (angioplastie, anti-plaquettaires, anti-thrombine) (Morel, Hugel et al. 2004) assez rapide de l'ordre de la semaine, tandis qu'une prise en charge additionnelle nutritionnelle dans la cohorte PREDIMED (25 patients traités) aurait un effet plus lent (1 an) mais durable (4 ans) pour baisser les taux circulants (Chiva-Blanch, Crespo et al. 2016).

En utilisant des prélèvements sanguins veineux sur EDTA, Suades et ses collaborateurs rapportent une telle cinétique, en suggérant que les MV monocytaires ($CD14^+$) et lymphocytaires ($CD45^+$, $CD3^+$) resteraient d'un niveau élevé après 72h en raison de la réponse inflammatoire massive dès le début de l'infarctus (Suades, Padro et al. 2016). Bien que les conditions de prélèvement utilisées (EDTA) n'aient pas été optimales, l'étude de Suades confirme des différences observées par Morel et Pereira (Morel, Pereira et al. 2009) qui suggèrent que les MVs porteuses d'antigènes indicateurs d'une forte activation cellulaire ($CD11b^+$ leucocytaires, $CD62P^+$ plaquettaire, $CD62E^+$ endothéliale, et les MVs porteuses de FT) soient en forte concentration dans le sang coronarien comparativement aux MVs du sang périphérique.

Ainsi, si les taux circulants reflètent le dommage cardiovasculaire après infarctus du myocarde, le contenu dans l'artère coronaire responsable est différent de celui du sang veineux. Ainsi, les taux de MV endothéliales $CD105^+$ sont significativement plus élevés dans les échantillons d'artères coronaires occluses que dans le sang périphérique, la restauration du flux sanguin épicardique entraînent leur réduction significative. Ces données suggèrent une contribution locale des MVs endothéliales dans le développement de lésions coronariennes (Morel, Pereira et al. 2009).

Bien que la majorité des MV circulantes dans le sans périphérique des patients cardiovasculaires est d'origine plaquettaire, la mesure des taux de MV endothéliales ou leucocytaires semble tout aussi informative que ce soit en risque primaire ou secondaire (Diamant, Tushuizen et al. 2004) (Hugel, Martinez et al. 2005).

En outre, les MV circulantes d'origine endothéliale (CD31 $^{+}$/Annexine 5^{+}) sont augmentées chez les patients avec une coronaropathie stable et porte le miARN-199a et le miARN-126 retrouvés fréquemment associés aux événements cardiovasculaires majeurs (Sinning, Losch et al. 2011) (Jansen, Yang et al. 2014).

L'ensemble de ces données suggère que le processus athérothrombotique au moins dans sa phase aigüe, repose sur des boucles d'amplification de la réponse cellulaire. De manière intéressante, les MVs de sang veineux périphérique de patients ayant subi un infarctus dans les 2 à 8 semaines précédentes sont plus élevées chez ceux ayant présenté une défaillance cardiaque suggérant que même les concentrations circulantes de MV sont indicatives de la sévérité de l'infarctus (Chiva-Blanch, Bratseth et al. 2017). Ainsi, Sarlon-Bartoli et ses collaborateurs ont mesuré les taux plasmatiques de MV dérivées de leucocytes chez 42 individus avec une sténose carotidienne supérieure à 70%. Ils ont montré que les patients ayant une plaque instable avaient des taux accrus de MV leucocytaires CD11bCD66b^{+} et CD15^{+}, suggérant que même les sous-populations de MV les moins fréquemment rencontrées sont informatives de la vulnérabilité des plaques athéromateuses (Sarlon-Bartoli, Bennis et al. 2013).

Des niveaux comparables de MV annexin-5^{+} ont été détectés par cytométrie en flux dans le sang veineux et artériel de 26 patients endartériectomisés (Leroyer, Isobe et al. 2007), la plupart d'origine plaquettaire, leucocytaire et érythrocytaire (Figure 17). Les propriétés pro-coagulantes des MV de CE, musculaires lisses et globules rouges mesurées par un test de génération de thrombine étaient significativement supérieures à celles des MVs monocytaires et plaquettaires. (Leroyer, Isobe et al. 2007).

En ce qui concerne les maladies cérébrovasculaires, les MVs circulantes seraient des marqueurs prédictifs de l'accident ischémique cérébral. Par ailleurs, une récente étude pilote cas-témoin suggère que les MV circulantes dérivées des monocytes de phénotype M2, mais pas ceux de phénotype M1, sont significativement augmentées chez les patients présentant une hémorragie intracérébrale dans les 12 heures suivant l'apparition des symptômes (Walsh, Campos et al. 2017).

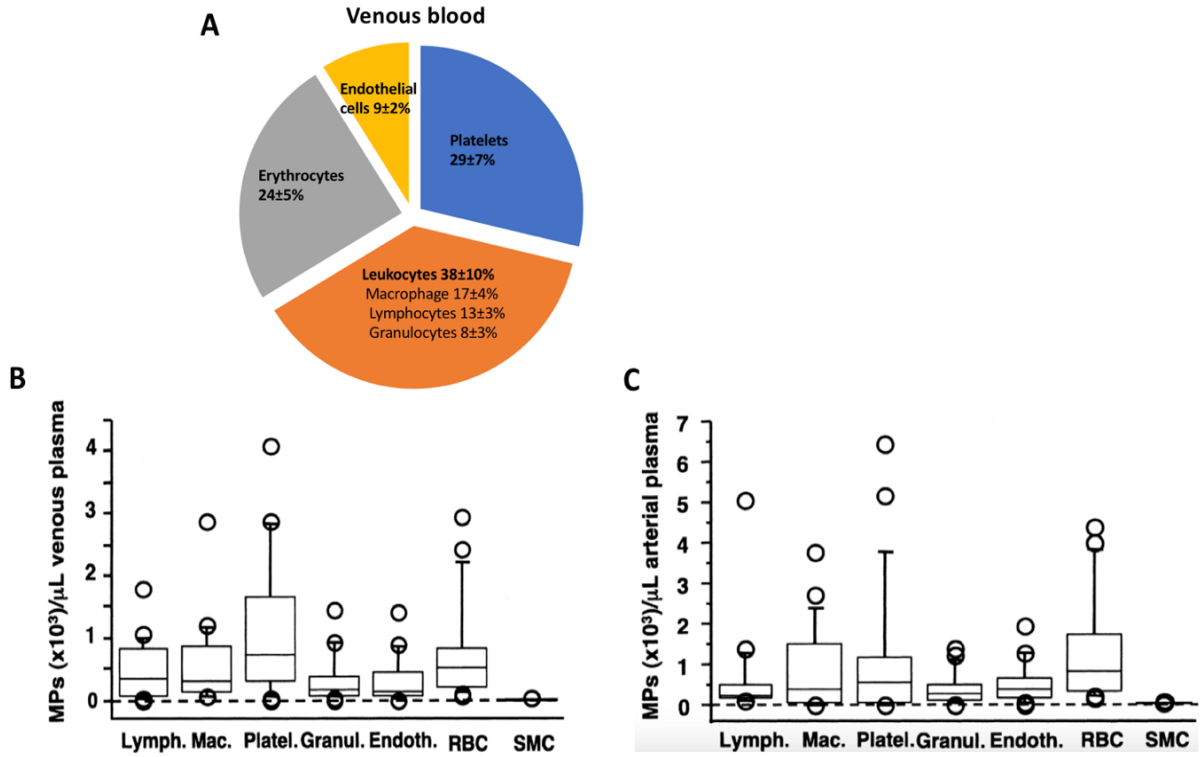


Figure 17 : Origine cellulaire des microparticules circulantes dans le sang périphérique et artériel de patients coronaires. (Leroyer, Isobe et al. 2007)

Répartition des microvésicules (MV) et origines cellulaires (A), le plasma veineux (B) et le plasma artériel (C). Endoth. : origine des cellules endothéliales ; Granul. : origine granulocytaire; Lymphe. : origine lymphocytaire; Mac. : origine des macrophages; Platel. : origine plaquettaire; RBC :origine des globules rouges; SMC : origine des cellules musculaires lisses

III.3.2.3 MVs et diabète (DT2)

Le développement de vasculopathies au cours du DT2 est un processus multifactoriel, qui est associé à la dysfonction endothéliale (Figure 18). Au niveau expérimental, les concentrations élevées de glucose induisent la sénescence endothéliale prématurée (Khemais S, thèse de science, 2 octobre 2017) avec la production de ROS via les NADPH oxydases et de manière dépendante de la PKC (Jansen, Yang et al. 2013). Les concentrations élevées du glucose augmentent également l'apoptose des CE insulaires. De plus, le glucose, en favorisant l'expression endothéliale de molécules d'adhésion (Marfella, Esposito et al. 2000) et en augmentant l'apoptose endothéliale (Zhu, Wen et al. 2015), contribuerait au recrutement plaquettaire et à un état pro-coagulant.

Ainsi, le diabète et la résistance à l'insuline favorisent une dysfonction endothéliale susceptible de limiter la protection vasculaire contre l'athérothrombose (Hadi and Suwaidi 2007). Chez les patients diabétiques, le découplage d'eNOS induit par la destruction des cavéoles endothéliales en réponse au peroxynitrite (Cassuto, Dou et al. 2014), favorise une mauvaise vasodilatation endothéliale-dépendante des artérioles coronaires des patients diabétiques confirmé par la mesure de la FMD (Flow-mediated dilation method). Les ROS contribuent aussi au dysfonctionnement des cellules β en réponse aux cytokines inflammatoires et aux réactions auto-immunes du DT1. Dans le DT2, l'excès de ROS réduit la production d'insuline en activant les voies apoptotiques des cellules β (Evans, Goldfine et al. 2002). En effet, la brève exposition des îlots pancréatiques au stress oxydant réduit *in vitro* la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De plus, les ROS entraînent une inactivation mitochondriale et perturbent la transduction des signaux qui couplent normalement le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline (Maechler, Jornot et al. 1999) (Figure 18).

III.3.2.3.1 Microvésicules marqueurs circulant du DT2

Des niveaux élevés de MVs endothéliales seraient prédictifs de la présence d'un dysfonctionnement des CE chez les patients atteints de DT2 (Koga, Sugiyama et al. 2005). Chez les souris diabétiques, les taux de MV circulantes totales, endothéliales et plaquettaires sont significativement élevés comparées au témoin. Les souris mâles diabétiques traitées pendant 2 semaines avec la pioglitazone, un composé antidiabétique, présentent un gain de poids corporel, une glycémie diminuée, une augmentation des taux plasmatiques d'adiponectine et une diminution des taux plasmatiques d'insuline concomitante à la diminution des MVs. Dans un modèle de diabète induit par la streptozotocine, les taux de MV circulantes totales, dérivées des plaquettes augmentent la détection d'un diabète complètement établi (Muller 2012).

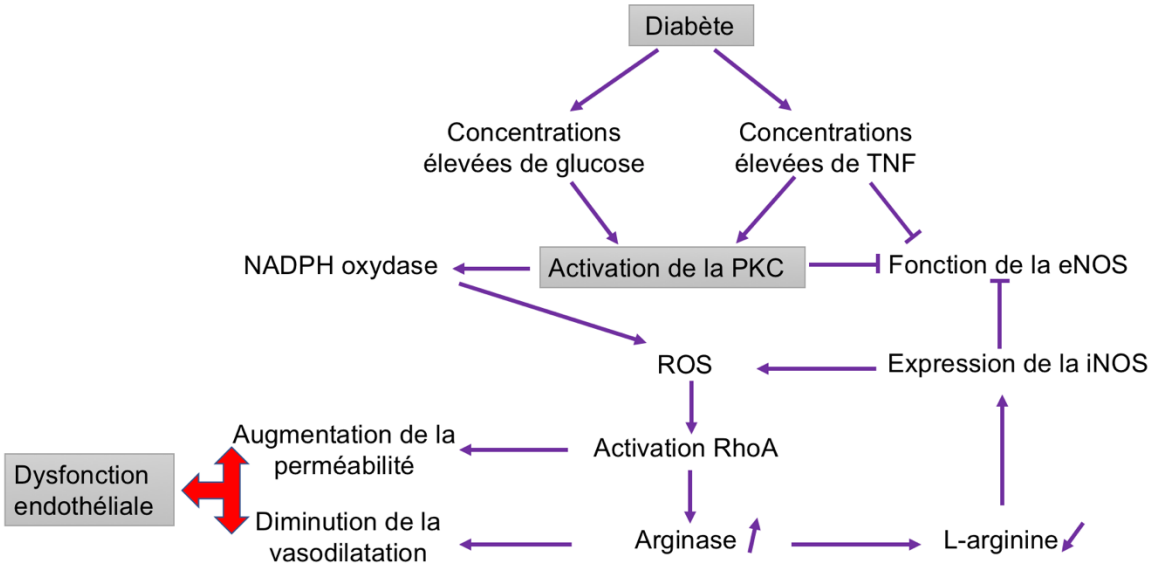


Figure 18 : Mécanismes conduisant à une dysfonction endothéliale dans le diabète.

Les MVs d'origine endothéliale ont été associées à la sévérité de la maladie diabétique chez la femme obèse et chez les patients traités par glitazone (Esposito, Maiorino et al. 2011). D'autre données sur la réponse pro-inflammatoire et pro-coagulantes des cellules de cordon ombilical de parturientes diabétiques stimulées par le TNFα indiquent une protection par le liraglutide, un analogue de GLP-1, avec une réduction de la libération des MV endothéliales et de l'activation de MAPKinase et NF-κB (Di Tomo, Lanuti et al. 2017). Ces données pré-cliniques ainsi que celles de notre laboratoire (Gleizes, Kreutter et al. 2016) suggérent que les analogues du GLP-1 outre leur fonction régulatrice de la glycémie post-prandiale auraient une fonction vaso-protectrice propre. Cette hypothèse est confirmée par l'observation d'un meilleur devenir cardiovasculaire chez les patients DT2 traités pat Liraglutide dans l'étude LEADER-2 (Verma, Bhatt et al. 2018). Cependant, aucune confirmation d'une modification du profil des MVs circulantes, de leur origine endothéliale ou de leurs propriétés n'est pour l'instant établi.

Quelques études sur le rôle potentiel des MVs plaquettaires dans les complications diabétiques ont été rapporté (Nomura, Shouzu et al. 2000, Nomura, Kanazawa et al. 2003, Ogata, Imaizumi et al. 2005) et, chez les DT2, une augmentation significative de la quantité circulante de MVs totales, plaquettaires et monocytaires (Kurtzman, Zhang et al. 2013). De plus, la présence d'un taux élevé de MVs porteuses de FT signe un risque cardiovasculaire chez les patients DT2 (Santilli, Marchisio et al. 2016).

Cependant, des différences dans le profil de MVs en fonction du type de diabète ont été trouvées. Sabatier et ses collaborateurs (Sabatier, Darmon et al. 2002) ont rapportés que dans le DT1, le potentiel procoagulant des MVs, tel que mesuré par un dosage de la prothrombinase, était élevé et corrélé avec le degré de contrôle glycémique estimé par HbA1c. Contrairement au DT1, ils ont constaté que même si le nombre total de MV était élevé dans le DT2, il n'y avait pas d'augmentation concomitante de leur activité procoagulante, ce qui suggère que l'activité procoagulante est associée au déséquilibres glycémiques, probablement en raison d'une activation ou d'une sénescence cellulaire supérieure.

Les taux circulants de MV plaquettaires et de MV monocytaires sont corrélés avec les complications diabétiques microvasculaires de type néphropathie, rétinopathie et neuropathie (Ogata, Imaizumi et al. 2005, Ogata, Nomura et al. 2006) (Omoto, Nomura et al. 2002) et l'étendue des complications vasculaires d'athérogènese (Tan, Tayebjee et al. 2005). Des données suggèrent que les MV monocytaires seraient un biomarqueur utile de la progression de la rétinopathie diabétique (Nomura, Inami et al. 2007) (Zhang, Chen et al. 2018). Enfin, les taux circulants de MV $CD31^+$ émises par les CE apoptotiques sont significativement augmentés chez

les patients DT2 atteints d'athérosclérose asymptomatique par rapport aux volontaires sains, alors que les MV de CE activées porteuses de $CD62E^+$ circulent en concentration réduite (Berezin, Kremzer et al. 2016), suggérant un dommage endothélial associé au DT2.

Fait intéressant, chez les patients DT2, les traitement vaso-protecteurs sont associés à des concentrations de MV endothéliales, plaquettaires et monocytaires réduites. Chez les patients atteints de DT2 hypertendus, le Losartan, un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II, inhibe la production de MV monocytaires $CD14^+$ (Nomura, Shouzu et al. 2004), tandis que le Valsartan réduit également les concentrations de MV endothéliales CD62E, concomitamment à la diminution de l'hypoadiponectinémie. Ces résultats ont suggéré que l'inhibition du système rénine-angiotensine réduit l'effet délétère des MVs monocytaires et endothéliales (Nomura, Shouzu et al. 2006) au cours du traitement de l'athérothrombose du diabétique.

De la même manière, l'administration de 100 mg d'aspirine pendant 10 jours à 43 patients diabétiques réduit significativement les taux circulants des MVs dérivées des érythrocytes, des monocytes activés et des CML, suggérant une contribution de la paroi au stress initiateur de la libération des MVs. Cette étude par cytométrie en flux avec des écarts à la moyenne importants, suggère des taux de MV plaquettaires et monocytaires importants dans le DT1(Chiva-Blanch, Suades et al. 2016).

Ainsi, les MVs seraient un marqueur circulant potentiel de la maladie vasculaire athérosclérotique symptomatique dans le DT2. Pour les établir comme un outil utile de stratification du risque thrombotiques du DT2, des études prospectives longitudinales sont nécessaires. En effet, les cohortes actuelles sont peu homogènes et de taille trop restreinte, pour établir des seuils de stratification identifiant la sévérité de la maladie.

Bien que les connaissances sur les microvésicules dans le développement des troubles cliniques ne soient pas encore très détaillées, car les relations potentielles ou causales entre la dissémination des microvésicules, la maladie et la thérapeutique restent à consolider, il ne fait aucun doute que les microvésicules sont de bons marqueurs pour l'identification et l'évaluation de la gravité de l'atteinte vasculaire afin de mieux définir les stratégies prophylactiques et thérapeutiques et pour une meilleure caractérisation pronostique des patients à risque.

Il n'existe actuellement aucun élément permettant de prévoir la survenue d'un événement cardiovasculaire chez un individu donné. Cela en fait donc un des enjeux majeurs de la recherche et de la médecine actuelle dans le cadre de la définition d'un facteur systémique et non invasif pour la prise en charge et la définition de nouvelles cibles cellulaires.

Chapitre VI

Microvésicules effecteurs cellulaires du compartiment vasculaire

IV. Microvésicules effecteurs cellulaires du compartiment vasculaire

Les MVs ne sont pas seulement des marqueurs pronostiques de la maladie ou de la sévérité de l'atteinte organique utiles pour la stratification des patients ou le monitoring de leur traitement mais aussi des effecteurs cellulaires qui transfèrent leurs contenus en molécules actives à des cellules naïves proches, ou à distance lorsqu'elles sont déversées dans la circulation. Bien qu'elles aient été étudiées le plus souvent pour leurs propriétés délétères, les MVs sont également des navettes potentielles de modulateurs solubles, présents dans le plasma endogènes ou pharmacologiques et ayant une affinité pour l'un de leurs composants protéiques ou lipidiques. Ceci doit être pris en considération lorsque l'on choisit la méthode d'analyse des MVs, afin d'éviter tout masquage artéfactuel.

Les propriétés effectrices des MVs ont longtemps été étudiées dans des modèles expérimentaux de pathologies associées aux désordres thrombotiques. Les recherches sur l'immunothrombose et l'inflammation stérile (Chen and Nunez 2010) ont orienté l'étude des MVs effectrices vers l'endothélium inflammatoire tandis que quelques équipes ce sont intéressées à la communication intercellulaire dans les tissus pariétaux (athéro-thrombose), hépatiques ou pancréatiques.

IV.1 MVs effecteurs de la dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale induite par les MVs se caractérise par un déséquilibre rédox avec une production de NO vasoprotecteur faible et au contraire une production d'espèces réactives de l'oxygène augmentée (ROS). Dans certains cas les MVs seront pro-inflammatoires dans d'autres pro-sénescentes. Les études ont souvent porté sur des systèmes de communication intercellulaire simples (une origine cellulaire de MV, un stress générateur unique) et une cellule endothéliale cible. Ces modèles permettent de confirmer les hypothèses cliniques par l'application de MVs circulantes isolées de patients dans différentes conditions pathologiques. Cependant, les voies de signalisation et les acteurs moléculaires ou leur régulation varient selon le territoire endothélial ou la lignée explorée (cellules de la veine ombilicale HUVEC ou Eahy.926, cellules artérielles de coronaires humaines ou porcines, de micro-vaisseaux).

Ainsi, les MVs de lymphocytes T4 apoptotiques de cellules humaines (CEM) diminuent la production de NO et augmentent le stress oxydant dans la lignée endothéliale humaine Eahy.926, favorisent l'expression de la cavéoline-1 et diminuent l'activité de la eNOS, de manière indépendante de la PI3K et des MAP kinases ERK (Mostefai, Agouni et al. 2008).

Les MVs circulantes isolées du plasma de patients DT2 (Martin, Tesse et al. 2004) (Ishida, Taguchi et al. 2016), en infarctus du myocarde (Boulanger, Scoazec et al. 2001), avec syndrome métabolique (Agouni, Lagrue-Lak-Hal et al. 2008), maladie cardiaque valvulaire (Fu, Hu et al. 2015), et subissant une intervention coronarienne percutanée (Ye, Shan et al. 2017) altèrent la fonction endothéliale et régulent l'expression de la eNOS.

Une première étude des MVs de patients en syndrome métabolique indiquait leur impact sur la vasorelaxation endothéliale-dépendante, 24h après injection chez la souris. Dans les cellules humaines Eahy.926, les mêmes MVs induisaient à une inhibition de la eNOs et une surexpression de NOX-4 avec une perte de production de NO qui ne semblait pas dépendante des MV plaquettaires (Agouni, Lagrue-Lak-Hal et al. 2008).

Dans le cadre du syndrome métabolique, et de la résistance à l'insuline, une de ses composantes, C Martinez et son équipe a montré que la réponse UPR (unfolded protein response), était impliquée dans les effets endothéliaux délétères des MVs. La réponse UPR est caractérisée par un engorgement du réticulum endoplasmique par des protéines immatures. Les MVs lymphocytaires apoptotiques et de patients atteints de syndrome métabolique induisent une surexpression des protéines de la réponse UPR par les cellules endothéliales primaires d'aorte humaine (HAEc) et altèrent la relaxation vasoendothéliale d'aorte de souris Swiss. Les données indiquent que les sources subcellulaires de ROS induites par les MVs seraient mobilisées de manière séquentielle : La production cytoplasmique de ROS se produirait dès les 4 premières heures en amont du stress du réticulum endoplasmique, elle-même suivie de la production tardive des ROS mitochondriales 24h plus tard. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou de SiRNA indique que la sphingomyelinase neutre, déjà impliquée dans le contrôle UPR et la production de ROS via p47 dans les cellules épithéliales pigmentaires ou dans les poumons, serait activée dans les premières heures de réponse aux MVs de cellules T apoptotiques ou de patients atteints de syndrome métabolique, avant l'activation de la NADPH oxydase (Safiedeen, Rodriguez-Gomez et al. 2017). Ces données soulignent l'impact des MVs qui perturberaient l'homéostasie lipidique des membranes des cellules cibles, notamment en tant que substrat des sphingomyelinases, une observation rapportée aussi dans les cellules macrophagiques après inhibition des sphingomyelinases acides, source de céramides apoptotiques (Huber, Jungel et al. 2007).

L'impact central et spécifique des MVs endothéliales sur le tonus vasculaire est confirmé de façon élégante dans l'insuffisance rénale chronique grâce à une suspension de MVs circulantes des patients présentant une rigidité de l'artère brachiale attestée par la technique de

vasodilation dépendante du flux. La suspension enrichie en MVs d'origine endothéliale par immunodéplétion des MVs érythrocytaires et plaquettaires altérait la vasorelaxation endothéliale-dépendante d'anneaux aortiques de rat de manière spécifique et importante (Amabile, Guerin et al. 2005).

En conclusion, dans le syndrome métabolique, les MVs lymphocytaires et/ou endothéliales contribueraient donc au contrôle et à l'homéostasie du tonus vasculaire redox-sensible. Horn et ses collaborateurs ont rapporté que les MVs transportent une NO synthase fonctionnellement active capable de produire du NO dans les MVs, et que les quantités de NO dans les MVs de patients atteints de maladie cardiovasculaires sont inférieures à celles de témoins sains alors que la quantité de ROS reste similaire (Horn, Cortese-Krott et al. 2012). Du fait que les concentrations de MVs circulantes sont supérieures chez les patients, l'éventuel effet protecteur du NO microvésiculaire serait insuffisant car peu disponible.

D'autres études rapportent un effet bénéfique des MVs sur la dysfonction endothéliale. Ainsi, les MVs de cellules endothéliales primaires de coronaires humaines (HPAEC) induites en apoptose par privation de sérum ont des propriétés angiogéniques en délivrant le miRNA (miR)-126 aux cellules endothéliales dans un modèle murin de lésion focale endothéliale de la carotide et *in vitro* (scratch test). Cet adressage se traduit par la surexpression de la cible de miR-126, SPRED-1, un régulateur négatif de la croissance endothéliale. De façon très interessante, miR-126 est faiblement exporté dans les MVs de HPAEC cultivées à forte concentration de glucose et son contenu est très abaissé dans les MVs circulantes des patients atteints de diabète, en accord avec les premières observation d'une atteinte endothéliale chez les patients diabétiques. Cette étude pose indirectement la question des contributions respectives des MVs de cellules endothéliales progénitrices et des cellules matures dans la régénération locale du tissu endothélial (Jansen, Yang et al. 2013)

Le fait que des MVs d'individus sains ou émises dans des conditions basales n'ont aucun effet sur la fonction endothéliale mesurée dans des anneaux aortiques, tandis que les MVs de cellules HUVEC générées *in vitro* en réponse au TNF-α exercent une protection endothéliale contre les acides gras libres palmitate via la signalisation eNOS / Akt en réduisant le stress oxydant, confirme les rôles homéostatiques des MVs et du microenvironnement sur la cellule endothéliale (Mahmoud, Wilkinson et al. 2017).

Ainsi, les MVs ont des propriétés effectrices différentes selon la situation physiopathologique et l'environnement de la cellule émettrice. La contribution des différentes

lignées cellulaires au pool de MVs circulantes varie selon les stimuli pathologiques et se traduira par un profil phénotypique et une activité biologique différente.

Ces dernières décades, les propriétés effectrices des MVs circulantes ont été confirmées dans la réponse hémostatique, l'inflammation, la fonction vasculaire et l'angiogenèse (Morel, Toti et al. 2004, Boulanger, Amabile et al. 2006), indiquant leur participation à des boucles de régulation de la réponse tissulaire et vasculaire.

IV.1.1 MVs et inflammation vasculaire

IV.1.1.1 MVs effecteurs pro-inflammatoires

Dans le contexte vasculaire, l'action pro-inflammatoire MVs a été principalement étudiée sur la réponse endothéliale, qui contribue à la dysfonction du greffon et à la progression de l'athérosclérose. Il faut noter que les MVs endothéliales sont aussi des effecteurs inflammatoires. Ainsi, les cytokines comme le TNF-α favorisent l'émission de MVs pro-inflammatoires par les cellules endothéliales d'aorte humaines, de manière dépendante des MAP-kinases p38, tandis que p38 n'est pas nécessaire au déclenchement de la réponse inflammatoire induite par les MVs dans les cellules endothéliales naives (Curtis, Wilkinson et al. 2009).

Les MVs circulantes contribuent aux réponses inflammatoires par divers mécanismes (Diamant, Tushuizen et al. 2004) (Lynch and Ludlam 2007) (Nomura, Ozaki et al. 2008) (Ridger, Boulanger et al. 2017), notamment en induisant des voies redox-sensibles. Des expériences d'injection de MVs circulantes de patients septiques chez les souris ont ainsi démontré l'effet systémique des MVs qui entraînent la sur-expression d'iNOS, de COX-2 et de NF-κB dans le cœur et les poumons (Mastronardi, Mostefai et al. 2011). Des résultats similaires ont été retrouvés avec les MVs de rats septiques (Boisrame-Helms, Delabranche et al. 2014) dont l'effet pro-inflammatoire était modulable pharmacologiquement. L'effet inflammatoire de MVs de lymphocytes T apoptotiques a été aussi décrit chez les souris, avec une surexpression d'iNOS, de COX-2 et une activation de NF-κB dans le tissu aortique, tandis que les MVs de lymphocytes isolés de patients diabétiques induisaient *ex-vivo* l'hyporéactivité d'anneaux aortiques (Tesse, Martinez et al. 2005)

Les propriétés effectrices des MVs sont regroupées ci-dessous, selon leur origine cellulaire :

Les MVs de plaquettes humaines transportent environ 30 % de l'acide arachidonique (AA) plaquettaire après stimulation. Dans les HUVECs, les MVs plaquettaires induisent de manière dose-dépendante et dans les 6 heures, une augmentation de l'expression de la COX-2

inductible qui est associée à la synthèse de PGI2, ces mêmes MVs n'induisent l'expression de la COX-1 (Barry, Pratico et al. 1997). Les MVs n'interagissent pas avec les récepteurs du thromboxane mais fournissent de l'AA qui est métabolisé dans les 12 heures suivant l'interaction avec les cellules HUVEC (Barry, Kazanietz et al. 1999). Si les MVs plaquettaires ne contiennent pas de sPLA2, elles favorisent probablement son recrutement à la membrane de la cellule cible induisant ainsi la production d'AA et d'acide lysophosphatidique intracellulaire, un puissant médiateur pro-inflammatoire et un agoniste plaquettaire amplifiant alors la réponse endothéliale à l'activation plaquettaire (Lynch and Ludlam 2007).

Les MVs plaquettaires induisent la libération de cytokines pro-inflammatoires endothéliales telles que IL-6 ou IL-8 et l'expression des molécules d'adhésions ICAM-1 (Barry, Pratico et al. 1998), VCAM-1 et la E-selectine (Nomura, Tandon et al. 2001). Libérées en condition de flux élevé, elles faciliteraient aussi le recrutement monocytaire en interagissant avec l'endothélium par un mécanisme de « rolling » et en déposant à sa surface la chimiokine RANTES/CCL5 qu'elles transportent (Mause, von Hundelshausen et al. 2005) et ainsi la production d'IL-8, d'IL-1β, et de TNF-α décrite dans la lignée monocytaire THP-1 (Nomura, Tandon et al. 2001). La capacité des MV plaquettaires à former des agrégats avec les neutrophiles et à les activer a été rapportée très tôt (Jy, Mao et al. 1995). Ces interactions amplifient la libération de MVs de neutrophiles, favorisant un profil endothélial inflammatoire avec l'expression et la sécrétion d'IL-6, IL-8, IL-1β, MCP-1 observée dans les cellules endothéliales primaires mais aussi l'expression du FT, conduisant à une activité pro-inflammatoire et pro-coagulante dépendante de la voie de JNK1 (Mesri and Altieri 1999).

Les MV émises par les monocytes constituent une voie importante de sécrétion de l'IL-1β, démontrée initialement en réponse à la fixation de fortes concentrations d'ATP sur le récepteur P2X7 (MacKenzie, Wilson et al. 2001), mais aussi décrite à stress de cisaillement élevé. Dans ce dernier cas, l'IL-1β convoyée par les MV monocytaires est capable de se lier à son récepteur (IL-1R) et d'initier l'inflammation (Nomura, Tandon et al. 2001), suggérant que les MVs induites par un fort cisaillement sont susceptibles de favoriser la croissance de la plaque d'athérome et l'inflammation vasculaire. Cette hypothèse est partiellement confirmée par le fait que chez de souris obèses et résistantes à l'insuline les taux de MVs d'origine endothéliale, plaquettaires et leucocytaires sont élevés et induisent *in vitro* l'expression de VCAM-1 et la production de ROS par les CE cardiaques de rat (Heinrich, Andersen et al. 2015).

Dans la plaque d'athérothrombose, une proportion de MVs portent la métalloprotéases ADAM17 (TACE), et contribuerait à l'inflammation en favorisant la sécrétion de TNF et l'expression de TNF-R et de l'EPCR endothéliaux (Canault, Leroyer et al. 2007).

IV.1.1.2 MVs effecteurs anti-inflammatoires

Quelques études rapportent les propriétés anti-inflammatoire des MVs dont certains semblent impliquer l'annexine -1, une lipocortine anti-inflammatoire.

Ainsi, les MVs de neutrophiles et granulocytes ayant interagit avec des cellules endothéliales (HUVEC) sont riches en annexine 1. Ces MVs inhibent l'interaction des polynucléaires avec les HUVEC *in vitro* et *in vivo*, suggérant un effet anti-athérothrombotique potentiel (Dalli, Norling et al. 2008). Il a également été rapporté que les MV endothéliales sont cytoprotectrices et anti-inflammatoires. Ainsi, les CE humaines exposées à la protéine C activée (aPC) libèrent des MV endothéliales qui portent l'EPCR, le récepteur spécifique de l'aPC, et lient la protéine C activée. Le complexe à la surface des MVs limite l'inflammation et augmente la survie cellulaire, faisant entrevoir un effet autocrine protecteur des MV endothéliales en présence de concentrations plasmatiques suffisantes d'aPC (Perez-Casal, Downey et al. 2009), effet notamment démontré dans un modèle de choc septique chez le rat (Boisrame-Helms, Delabranche et al. 2014).

De même, Kreutter et collaborateurs ont démontré que les MV endothéliales de coronaires de porc générées en réponse à un traitement par aPC agissent comme des effecteurs paracrines cytoprotecteurs de la cellule β via le récepteur de l'annexine-1, alors que l'aPC n'a pas d'effet propre sur ces cellules (Kreutter, Kassem et al. 2017).

Les MVs dérivées de cellules immunitaires de la réponse innée ont également été impliquées dans la résolution de l'inflammation. Gaffi et collaborateurs ont proposé que la résolution de la réponse inflammatoire des macrophages humains soit accélérée par les MVs de neutrophiles. En effet, les MVs de neutrophiles émises en réponse au fMLP ou au C5a ont une activité antiinflammatoire sur les macrophages humains traités par zymosan. Elle est rapide et agit à un niveau post transcriptionnel avec une augmentation de la sécrétion du TGFß1, un inhibiteur de l'activation macrophagique, et l'inhibition de la sécrétion d'IL-8 et de TNFα, plus tardive. De plus, les MVs sont rapidement phagocytées et l'inhibition de la Pser par annexine-5 ne bloque qu'une partie de l'action des MVs (Gasser and Schifferli 2004).

Enfin, les MVs endothéliales coronaires humaines ont également des propriétés cytoprotectrices autocrines. Elles réduisent la surexpression endothéliale de ICAM-1 induite par le TNF-α (et pas de VCAM-1) par transfert de miARN-222 aux CE, ce qui limite l'adhésion des

monocytes (THP-1) à l'endothélium inflammatoire. De manière intéressante, les auteurs décrivent que les MVs endothéliales cultivées à concentration de glucose élevée ont des propriétés antiinflammatoires moindres et un contenu en miR22 abaissé, tout comme les MVs de patients coronariens (Jansen, Yang et al. 2015).

Un autre mécanisme protecteur contre les réactions inflammatoires est la reconnaissance des épitopes oxydés principalement le malondialdehyde (MDA) exposé par une proportion de MVs circulantes chez les patients coronariens et chez les sujets sains. Tsiantoulas et collaborateurs ont montré que les IgM circulantes dirigées contre les oxLDL reconnaissent le MDA à la surface des MVs suggérant un mécanisme potentiel de cytoprotection (Tsiantoulas, Perkmann et al. 2015).

IV.1.2 MVs, coagulation et thrombus

Les microvésicules sont des modulateurs de la réponse hémostatique, généralement procoagulantes du fait de l'expression du FT et de l'exposition de la Pser, mais elles peuvent aussi convoyer des molécules anticoagulantes comme la thrombomoduline (Satta, Freyssinet et al. 1997) ou le récepteur de l'EPCR, et même l'annexine-5 plasmatique (Boulanger, Loyer et al. 2017).

IV.1.2.1 MVs effecteur pro-coagulant

Une des caractéristiques principales des MVs est leur fort pouvoir pro-coagulant, dépendant d'une part de la PSer, phospholipide anionique qui catalyse l'assemblage des complexes de la coagulation et lorsqu'elles exposent le facteur tissulaire (FT). Les facteur VII, IX et X, et la prothrombine circulants se focalisent à la surface de la Pser exposée par les cellules stimulées grâce à leur domaine « GLA » riche en acides gamma-carboxyglutamique (Morel, Toti et al. 2006), tandis que la synthèse du facteur tissulaire (FT) qui est l'initiateur cellulaire de la coagulation, est induite dans les cellules endothéliales, neutrophiliques et monocytaires dans les 6h post-stimulation et se traduit par l'émission de MVs qui l'exposent en plus de la Pser (Giesen, Rauch et al. 1999) (Mackman 2006). Ainsi, en réponse à la stimulation par le TNFα, le LPS ou les oxLDL, les cellules endothéliales veineuses HUVEC émettent des MVs-FT^{+} (Combes, Simon et al. 1999) (Nomura, Takahashi et al. 2004) capables de raccourcir le temps de coagulation d'un plasma normal mais pas d'un plasma déficient en FVII, ce qui confirme le rôle procoagulant du FT dans ces MVs (Jy, Jimenez et al. 2005).

Les MVs peuvent initier et propager la coagulation (Diamant, Tushuizen et al. 2004, Boulanger, Amabile et al. 2006, Nomura, Ozaki et al. 2008). Il existe d'ailleurs une corrélation

entre l'expression du FT à la surface des MVs et leur thrombogénicité (Biro, Sturk-Maquelin et al. 2003) et les études réalisées chez la souris montrent que les MVs-FT$^+$ s'incorporent dans le thrombus en croissance (Owens, Passam et al. 2012). *In vitro*, la fusion des MV exposant le FT et des plaquettes activées, entraîne le transfert du FT dans les membranes plaquettaires, favorisant ainsi une initiation et une propagation plus efficaces de la coagulation, notamment dans le thrombus en formation (Del Conde, Shrimpton et al. 2005). Cependant, seul 10 % des MVs de concentrés plaquettaires portent du FT, suggérant un rôle mineur du FT des MVs plaquettaires chez les donneurs sains, d'autant que l'activité du FT n'est détectable qu'après inhibition de l'inhibiteur du FT (TFPI), indiquant un contrôle efficace des MVs-FT$^+$ en absence de terrain thrombotique (Keuren, Magdeleyns et al. 2006).

Les MVs dérivés de monocytes contribuent également à l'activation des plaquettes et au développement du thrombus, à travers le recrutement de cellules et l'accumulation du FT. Cette accumulation du FT dans le thrombus dépend de l'interaction de la PSGL-1 exprimée par les MVs avec la P-selectine plaquettaire et endothéliale (Furie and Furie 2004) (Falati, Liu et al. 2003, Hrachovinova, Cambien et al. 2003) (Losche 2005). Les MVs d'origine leucocytaire (neutrophiles et monocytes) sont aussi capables de transférer leur FT sur la membrane des plaquettes environnantes (Giesen, Rauch et al. 1999). L'ensemble de ces données a conduit au concept de *blood-born TF*, correspondant à l'ensemble des MVs-FT$^+$ circulantes qui convoient un FT très actif car à proximité de la Pser, connue pour potentialiser son activité, et suceptibles de s'incorporer au thrombus. Ainsi, dans un modèle murin de thrombus artériel utilisant des souris modifiées génétiquement et n'exprimant que faiblement le FT, l'accumulation des plaquettes dans le thrombus visualisée dans les 5 premières minutes après blessure endothéliale au LASER est réduite, et associée à une faible concentration de FT dans le thrombus. La transplantation de cellules souches hématopoiétiques de phénotype sauvage restaure la présence du FT mais pas la taille du thrombus, suggérant que le *blood-born TF* et le FT de la paroi endothéliale lésée sont tous les deux contributeurs de la formation du thrombus (Chou, Mackman et al. 2004).

IV.1.2.2 MVs effecteurs anti-coagulants

La présence de protéines inhibant la coagulation à la surface des MVs, telles que l'inhibiteur de la voie du FT (TFPI), la protéine C ou la thrombomoduline, suggère leur contribution au contrôle de la formation de thrombus et de sa résolution (Perez-Casal, Downey et al. 2005, Steppich, Mattisek et al. 2005).

De plus, les MVs des CE et des leucocytes portent à leurs surfaces des activateurs du plasminogène de type urokinase et son récepteur (uPA /uPAR) qui catalysent la transformation du plasminogène en plasmine. Ainsi, ces MVs pro-fibrinolytiques contribuent à l'activité fibrinolytique du plasma et sont capables de passer à travers la maille du caillot ou du thrombus pour le résorber et également réorganiser la matrice extracellulaire lors de la cicatrisation du tissu. (Lacroix, Plawinski et al. 2012).

D'autres mécanismes contribuant à la régulation des propriétés procoagulantes des MVs reposent sur l'équilibre entre les cytokines inflammatoires comme TNF-α et anti-inflammatoires, telles que IL-10. Ainsi, la génération de thrombine plasmatique est diminuée en présence d'IL-10. En effet, l'IL10 synthétisée par les macrophages participe, via la fixation sur son récepteur alpha, au rétrocontrôle de l'expression du FT et de la libération de MVs-FT^+ (Poitevin, Cochery-Nouvellon et al. 2007).

IV.2 MVs et réponse inflammatoire dans les tissus

Dans un modèle d'atteinte pulmonaire aigüe chez le rat, l'effet pro-inflammatoire propre des MV endothéliales était associé à une dysfonction endothéliale, une lésion pulmonaire aiguë, une augmentation des taux des cytokines pro-inflammatoires systémiques et alvéolaires (IL-1β et TNF-α), une infiltration neutrophilique dans l'espace périvasculaire et des lésions histologiques (Densmore, Signorino et al. 2006, Buesing, Densmore et al. 2011). Neri et ses collaborateurs ont montré que les MVs monocytaires stimulent la production d'IL-8 et de MCP-1 en activant la voie de NF-κB (Wang, Williams et al. 2011) et PPAR-gamma dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (Neri, Armani et al. 2011). Les résultats du laboratoire ont également montré que les MVs leucocytaires sont libérées par le poumon ischémié dans un modèle de poumon de rat perfusé ventilé (Olland, Reeb et al. 2016).

IV.3 MVs, vieillissement et sénescence

IV.3.1 Vieillissement érythrocytaire et plaquettaire

En transfusion, la préservation des propriétés des cellules est conditionnée à leur durée de vie et aux conditions de stockage, qui varient selon le type cellulaire. Dans les suspensions de globules rouges, la perte de l'intégrité de la membrane plasmique se traduit par une libération progressive de MVs. Zecher et ses collègues ont supposé une action directe et délétère de ces MVs chez les transfusés.

Dans un modèle de transfusion murin, les MVs d'érythrocytes vieux de 18 jours aggravaient l'inflammation systémique induite par le LPS, attestée par la séquestration leucocytaire dans les poumons et la leucopénie périphérique. Cet effet est indirect et passerait par l'activation de manière thrombine-dépendante de la voie du complément, se traduisant par des taux circulants d'IL-6, et du MCP-1 augmentés (Zecher, Cumpelik et al. 2014). Parce que les souris déficientes en C5aR sont protégées et que l'injection de vésicules synthétiques porteuses de Pser réduit l'activation du complément chez les souris transfusées, les MVs érytrocytaires seraient de possibles agents proinflammatoires dans d'autres pathologies favorisant le vieillissement accéléré des érythrocytes comme la drépanocytose.

Une confirmation du rôle probable de ces MVs dans l'activation à bas grade de la voie du complément a été apportée en clinique humaine chez les patients atteints d'arthrite rhumatoide dont les MVs circulantes portent différentes molécules de la cascade du complément (C1q, C4, and/or C3) et sont retrouvées à des taux très élevés dans le liquide synovial de manière corrélée à l'activation du complément. (Biro, Nieuwland et al. 2007). De plus, la libération de MV par les plaquettes sénescentes dépend de la libération du cytochrome c et de l'activation subséquente de la caspase 3 et de la Rho kinase I (Dasgupta, Argaiz et al. 2010).

IV.3.1 MVs et Sénescence endothéliale

La sénescence caractérisée par l'arrêt du cycle cellulaire a été rapportée dans de nombreux types cellulaires tels que les kératinocytes (Rheinwald and Green 1975), les mélanocytes (Bandyopadhyay, Timchenko et al. 2001), les cellules endothéliales (Thornton, Mueller et al. 1983), les lymphocytes (Effros and Walford 1984), et même des cellules souches (Oh, Lee et al. 2014). Elle est accompagnée d'un ensemble spécifique de changements dans la fonction cellulaire, la morphologie et l'expression des gènes (Erusalimsky 2009). La sénescence liée à l'âge et au nombre de réplications cellulaires est appelée la sénescence réplicative et est caractérisée par le raccourcissement des télomères, tandis que d'autres stimuli indépendants de la longueur des télomères induisent une sénescence prématurée (Chen, Bartholomew et al. 1998). En physiologie, la sénescence est un processus de contrôle notamment de la tumorigénèse par la suppression tumorale, de la cicatrisation et de la protection contre la fibrose tissulaire.

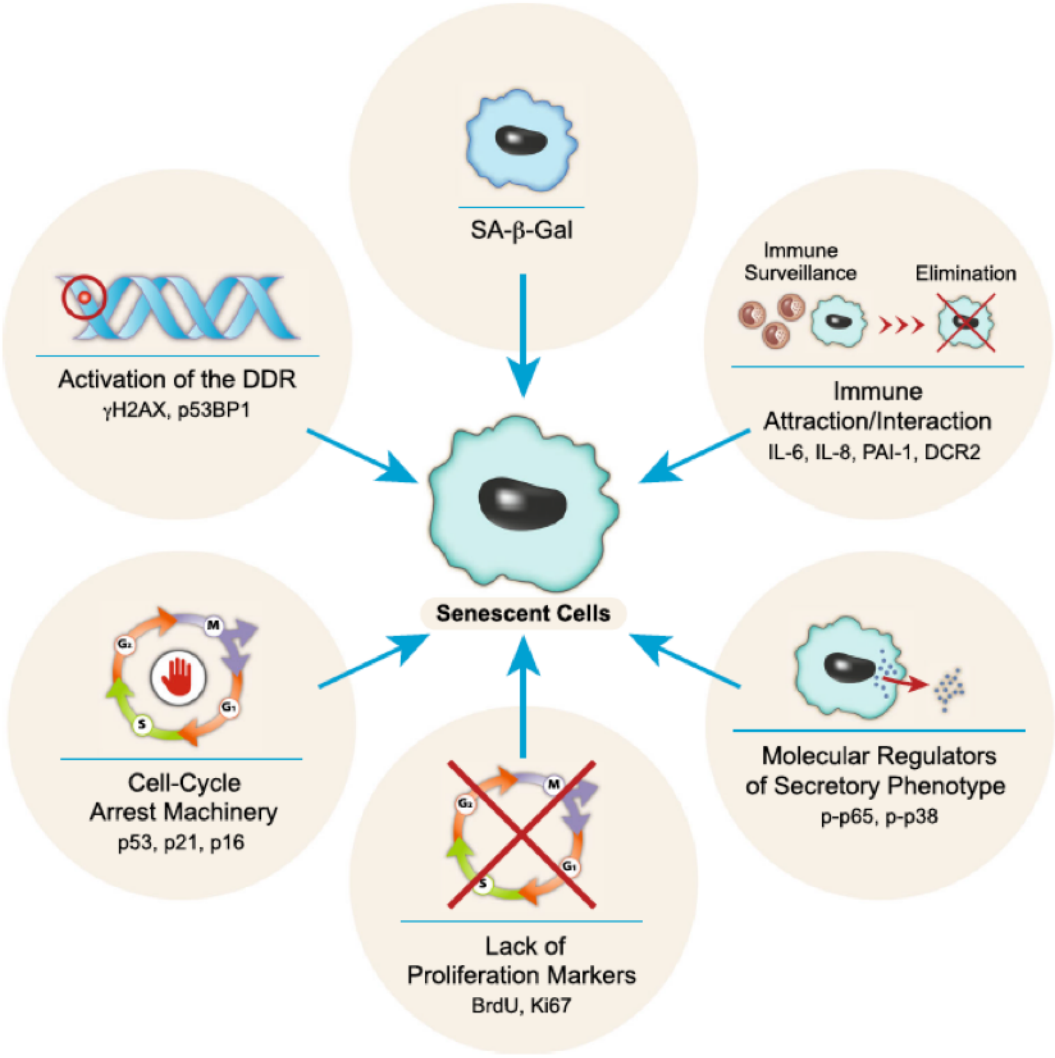


Figure 19 : Caractéristiques des cellules sénescentes. (Burton and Krizhanovsky 2014)

L'utilisation de plusieurs marqueurs moléculaires qui représentent différentes caractéristiques de la sénescence cellulaire est nécessaire pour identifier les cellules sénescentes. Les marqueurs sont divisés en catégories selon leur fonction. Une combinaison de marqueurs représentant différentes catégories pourrait augmenter la validité de l'identification.

La sénescence cellulaire a été impliquée dans le développement de pathologies vasculaires, en particulier l'athérosclérose. Les cellules endothéliales sénescentes qui expriment le marqueur Senescence-Associated β galactosidase (SA-β-gal) sont présentes dans les plaques avancées des artères coronaires humaines et de l'aorte (Vasile, Tomita et al. 2001, Minamino, Miyauchi et al. 2002) et dans les aortes de rats diabétiques (Chen, Brodsky et al. 2002). Ces cellules endothéliales sont dysfonctionnelles, fortement athérothrombogénique avec un contrôle de la vasotonicité altéré et un phénotype procoagulant et proinflammatoire.

De manière intéressante, la dysfonction des cellules β pancréatiques sénescentes conduit à une libération réduite d'insuline au cours du diabète lié à l'âge (Sone and Kagawa 2005), (Figure 19).

Initialement, Brodsky et ses collaborateurs, ont montré que le développement d'une vasculopathie accélérée chez les rats diabétiques Zucker, était associé à une multiplication par 6 du nombre de CE sénescentes, à une augmentation des taux de MVs circulantes, et à une diminution de la vasorelaxation et la production du NO (Brodsky, Gealekman et al. 2004), tandis que l'administration préalable d'un piégeur de peroxynitrite (« ebselen ») limitait le nombre de MVs circulantes, prévenait la sénescence prématurée et l'améliorait la vasculopathie (Brodsky, Gealekman et al. 2004). Au laboratoire, les propriétés pro-sénescentes des MVs émises par des cellules endothéliales sénescentes ou des leucocytes ont été mises en évidence par l'induction d'une sénescence prématurée des cellules d'artères coronaires de porc avec dysfonction endothéliale et surexpression du facteur tissulaire (cf ci-dessous et thèse de Ali El Habhab, 8 février 2018). Burger a montré dans un modèle murin que le traitement des CE primaires d'aorte par les MV endothéliales de cellules sénescentes ou par l'H_2O_2 induisait une sénescence prématurée, par l'intermédiaire de la NADPH oxydase associée à l'accumulation de ROS mitochondriales (Burger, Kwart et al. 2012).

En outre, le glucose à concentration élevée stimule la génération des MVs endothéliales prosénescentes (Turner M. 2016), (thèse de Sonia Khemaïs, 04 octobre 2018) tandis qu'une concentration élevée de glucose dans le milieu de culture des CEs potentialise l'effet pro-sénescent des MVs leucocytaires (thèse de Raed Altamimy, 18 mai 2018).

Abbas et ses collaborateurs ont montré que les MVs des CE de coronaires de porc sénescentes sont pro-inflammatoires, pro-sénescentes et favorisent un phénotype thrombogénique. De plus, ils ont identifié le rôle du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale autocrine induite par des MVs du plasma des patients atteints de syndrome coronarien aigu. Ces MVs induisent la sénescence endothéliale prématurée de cellules

endothéliales jeunes associée à l'accumulation de ROS et à une augmentation de l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase (Abbas, Jesel et al. 2017).

La période ischémique au cours de l'athérothrombose ou en transplantation d'îlot est probablement à l'origine de la sénescence endothéliale vasculaire, favorisant à son tour le recrutement des cellules inflammatoires et la génération des MVs endothéliales pro-sénescentes mais aussi leucocytaires pro-inflammatoires qu'elles soient issues de la plaque ou de l'ilot.

Les mécanismes exacts de la sénescence induite par les MVs de la plaque ou au cours de la transplantation d'ilots pancréatiques restent encore un sujet à explorer et à étayer. Néanmoins, les données de Abbas et de Burger suggèrent une possible modulation de la sénescence endothéliale induite par les MVs circulantes en ciblant la mitochondrie comme source de ROS, un préconditionnement avec des concentrations faibles de la cyclosporine A (CsA) qui agit comme un inhibiteur puissant de l'ouverture des pores mitochondriaux (mPTP) associée à la sénescence serait utile pour limiter les dommages vasculaires de l'ischémie reperfusion. En effet, *in vitro* la CsA limite à faible concentration les ROS et la sénescence endothéliale. Ces résultats suggèrent aussi que de faibles doses de CsA peuvent avoir un effet bénéfique dans les pathologies vasculaires lorsque la sénescence est exacerbée et contribuer les fonctions vasculaires de l'endothélium (Abbas, Jesel et al. 2017). Cette hypothése n'est pas confirmé dans l'étude CIRCUS évaluant l'effet bénéfique de le CsA au cours de la revascularisation post infarctus (Cung, Morel et al. 2015). En effet, la présence d'angiotensine II favorise la libération de MVs endothéliales de manière dépendante de la NADPH oxydase des Rho kinases et des rafts qui induisent la sénescence endothéliale (Burger, Kwart et al. 2012).

En conclusion, les MVs contribuent à l'homéostasie de la réponse vasculaire en modulant les réponses pro-inflammatoires, pro-coagulantes et pro-sénescentes des cellules circulantes et de l'endothélium. Dans des situations physiopathologiques, la génération accrue et prolongée de MVs nocives favoriserait un déséquilibre du contrôle de la fonction vasculaire.

Chapitre V

Les microvésicules tissulaires

V. Les microvésicules tissulaires

Des lésions tissulaires peuvent survenir à la suite d'une réponse inflammatoire, d'une ischémie ou de perturbations métaboliques. Les données de la littérature suggérent que le stress oxydant induit par l'hypoxie, la coagulation, l'inflammation et l'angiogenèse est impliqué dans la réponse physiopathologique aux lésions vasculaires liée aux maladies hypoxiques primaire (infarctus) ou secondaire à une vaso-occlusion athérothrombotique, ou liées aux transplantations d'organes ou de cellules.

En tant que médiateurs de la communication intercellulaire, les MVs interagissent localement en exacerbant et aggravant les lésions tissulaires mais parfois également en participant à la réparation tissulaire. Des concentrations élevées de MVs circulantes sont trouvées dans plusieurs maladies hypoxiques circulatoires reflètant le degré des lésions tissulaires .

Très peu de données sont disponibles sur les concentrations de MVs dans les tissus. Les plus fréquentes sont relatives à la plaque d'athérome en tant que tissu vasculaire pathologique

V.1 Les MVs du tissu athéro-thrombotique

Les MVs sont des effecteurs athéro-thrombotiques qui induisent la dysfonction endothéliale, la formation de lésion initiale favorisant les réactions inflammatoires, la participation au dépôt lipidique à la néovascularisation, la calcification et la progression de la plaque instable et la thrombose. En effet, il faut noter que les macrophages, neutrophiles et CE sont des pourvoyeurs important de FT en condition inflammatoire.

V.1.1 Les microvésicules intra-plaque

Des MVs ont été identifiées à l'intérieur des plaques d'athéromes par microscopie électronique (Kockx 1998) mais aussi isolées et caractérisées à partir de plaques carotidiennes humaines par cytométrie de flux (Leroyer, Isobe et al. 2007), mais aussi par leur activité prothrombinase et tenase, cette dernière évaluant le FT actif (Mallat, Hugel et al. 1999) (Tedgui and Mallat 2001). Les concentrations élevées de MVs dans la plaque résulteraient de la perte d'activité phagocytaire des macrophages qui entrent en apoptose ou se transforment en cellules spumeuses (Tabas 2005). En effet, les MVs de monocytes (THP-1) traitées par cholestérol non estérifié contiennent des anions superoxydes et peroxyde et interagissent avec les CE par le biais du récepteurs LOX-1 chez la souris (Liu and Williams 2012).

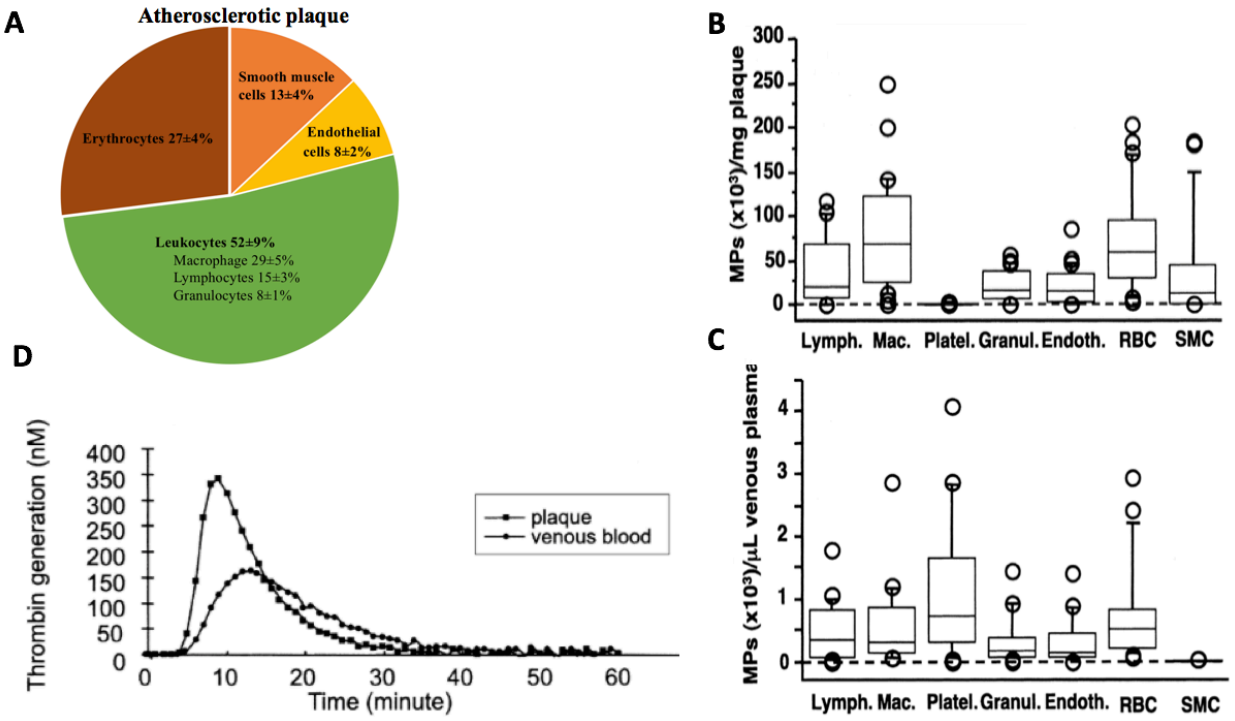


Figure 20 : Caractérisation des Microvésicules intra-plaque par cytométrie en flux. D'après (Leroyer, Isobe et al. 2007).

Diagramme de la répartition des origines cellulaires des MVs de la plaque (A), concentration et origine cellulaire des MVs dans la plaque (B) et le plasma veineux chez les mêmes patients (C), (D) la cinétique de génération de thrombine dans un plasma sain supplémenté en MVs de plaque ou de sang veineux des patients. Endoth. : endothéliale ; Granul. : granulocytaire ; Lymph. : lymphocytaire ; Mac. : macrophages ; Platel. : plaquettaire ; RBC : érythrocytaire ; SMC : cellules musculaires lisses.

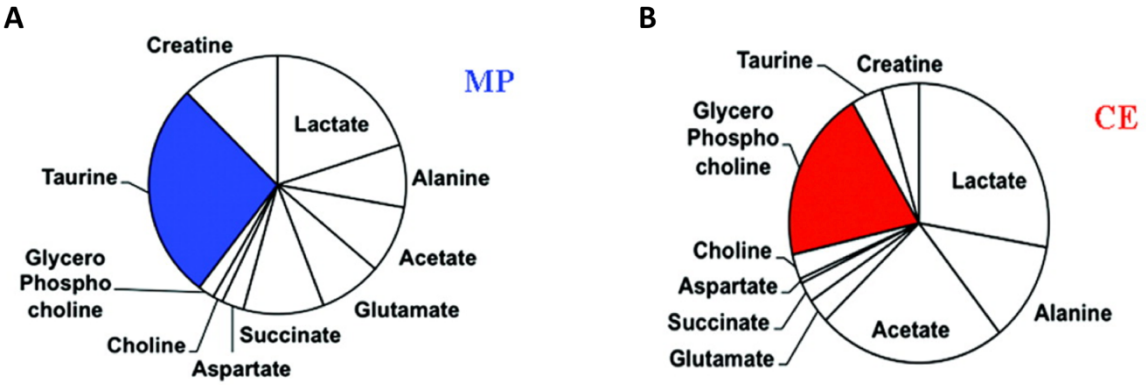


Figure 21 : Composition des principaux métabolites des MVs de la plaque et des cellules endothéliales en culture par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton. D'après (Mayr, Grainger et al. 2009).

La mesure par cytométrie de flux indique que les MVs procoagulantes (annexin-5^{+}) sont plus abondantes dans les lésions que dans le plasma (323 ± 63 MV AV+/ µg de plaque vs. 1196 ± 267 / µl de PPP) soit environ 200 fois plus, sachant que le poids de 1 µl de plasma à été estimé par les auteurs à 1mg. Par ailleurs, l'origine cellulaire des MVs constituait un profil spécifique avec des MVs dérivées de SMC mais pas de plaquettes (Leroyer, Isobe et al. 2007) (Figure 20). La majorité des MVs de plaque était d'origine leucocytaire (52 %) majoritairement macrophagique, reflétant l'inflammation locale (Leroyer, Rautou et al. 2008). De manière intéressante l'étude fonctionnelle par Mallat et ses collaborateurs confirment que l'activité procoagulante est très supérieure dans le tissu inta-plaque comparativement au tissu sain sous-jacent (MV AV^{+} : 29,5 ± 3,7 *vs.* 1,3 ± 0,4 nM PSer ; MV FT^{+} : 8,3 ± 4,3 *vs.* 0,9 ± 0,9 nM PSer) (Mallat, Hugel et al. 1999). De plus, la cinétique de génération de thrombine dans un plasma sain supplémenté en MVs de plaque est plus précoce que celle du sang veineux et conduit à la production d'une quantité de thrombine supérieure de 30% (Leroyer, Isobe et al. 2007) (Figure 20D).

L'analyse protéomique des MVs de plaques carotidiennes humaines a confirmé que les protéines de la membrane des MVs sont caractéristiques des leucocytes notamment les molécules d'HLA de classe I et II mais aussi des CML et d'érythrocytes (Mayr, Grainger et al. 2009). Le contenu des MVs en récepteur B2 de la bradykinine et les deux sous-unités du récepteur RAGE révèle la contribution des macrophages aux lésions tissulaires dans des contextes hypoxiques (Xu, Toure et al. 2010). La présence de la protéine CD40 ligand indique une possible activation lymphocytaire médié par les MVs au sein même de la plaque (Leroyer, Rautou et al. 2008).

De manière frappante, la taurine, acide libre majoritaire des neutrophiles humains, (Stapleton, Redmond et al. 1998) qui prévient la lyse des neutrophiles / macrophages activés en piégeant les radicaux libres produits par la myéloperoxydase, (Hellstrand, Asea et al. 1994) est enrichie dans les MVs dérivées de la plaque comparativement aux échantillons de CE, en accord avec le concept du stress oxydant amplifié par la diapédèse leucocytaire. Enfin, si les concentrations élevées de lactate, le produit final de la glycolyse anaérobie sont cohérentes avec la présence de nombreux enzymes glycolytiques dans les MVs de plaque (Figure 21), la persistance de leur activité reste à démontrer dans la microvésicule.

L'application réussie de méthodes immunomic a révélé que presque tous les MVs contenant des Ig G (93 ± 7%) étaient des CD14^{+} ce qui indique une origine macrophagique. De plus, des Ig étaient présentes dans le surnageant des extraits de plaque déplété des MV, et cela même après filtration à travers un filtre de 0,1um. Ceci indique que les Ig existent dans les MVs

dérivées de macrophages et aussi sous forme de dépôts libres dans les lésions athérosclérotiques humaines (Mayr, Grainger et al. 2009).

V.1.2 Microvésicules dans la chronologie de l'athérosclérose :

L'identification de la contribution des MVs à chaque étape du développement de la pathologie été établie à partir de différentes études *in vivo,* et *in vitro* à partir de MV générées de cellules cultivées ou de MV isolées du sang ou des tissus humains ou d'animaux. Les MVs joueraient un rôle dans les quatre paramètres clés amorçant la formation des plaques : perte de la vasodilatation, augmentation de l'apoptose cellulaire, augmentation du profil pro-inflammatoire et de la perméabilité.

Les MVs endothéliales et leucocytaires sont généralement un acteur de la dysfonction vasculaire, en inhibant notamment la production de NO par l'endothélium soit par production de radicaux libres, surexpression de cavéoline-1, ou encore par diminution de l'expression de la eNOS ou de sa phosphorylation. De plus elles favorisent la contraction des CML (Figure 26, étape 1).

L'effet pro-apoptotique et pro-inflammatoire des MVs endothéliales a un effet autocrine sur la perte endothéliale par apoptose, ainsi que l'expression de molécules d'adhésion par les CE et les contre ligands leucocytaires correspondants.
D'autre données suggèrent une contribution de multiple lignées cellulaires circulantes sur la perméabilité vasculaire qui augmente avec la concentration plasmatique des MVs (Curtis, Wilkinson et al. 2009).

Après l'étape de recrutement leucocytaire et de diapédèse, l'accumulation de la forme oxydée des LDL dans l'intima, favorise l'accumulation des MVs principalement générées par les monocytes-macrophages en réponse aux LDL qui à leur tour favorisent la surexpression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E et P-sélectine) par les CE soit par transfert, soit par synthèse et la sécrétion de cytokines pro- inflammatoires amplifiant le recrutement des monocytes et des lymphocytes T.

Les MVs favoriseraient l'apoptose des macrophages (Huber, Jungel et al. 2007) par transfert de caspase-3. En outre, Distler et ses collaborateurs, montrent que les MVs de lymphocytes T (cellules de jurkat) induisent l'apoptose des macrophages de manière dose-dépendante avec une activité de la caspase 3 multipliée par 9 (Distler, Huber et al. 2005). Un autre cercle vicieux est alors activé : les macrophages apoptotiques libèrent davantage de MVs aux effets paracrines sur les cellules voisines (Figure 26, étape 2), macrophages ou lymphocytes dans les lésions athérosclérotiques (Leroyer, Rautou et al. 2008).

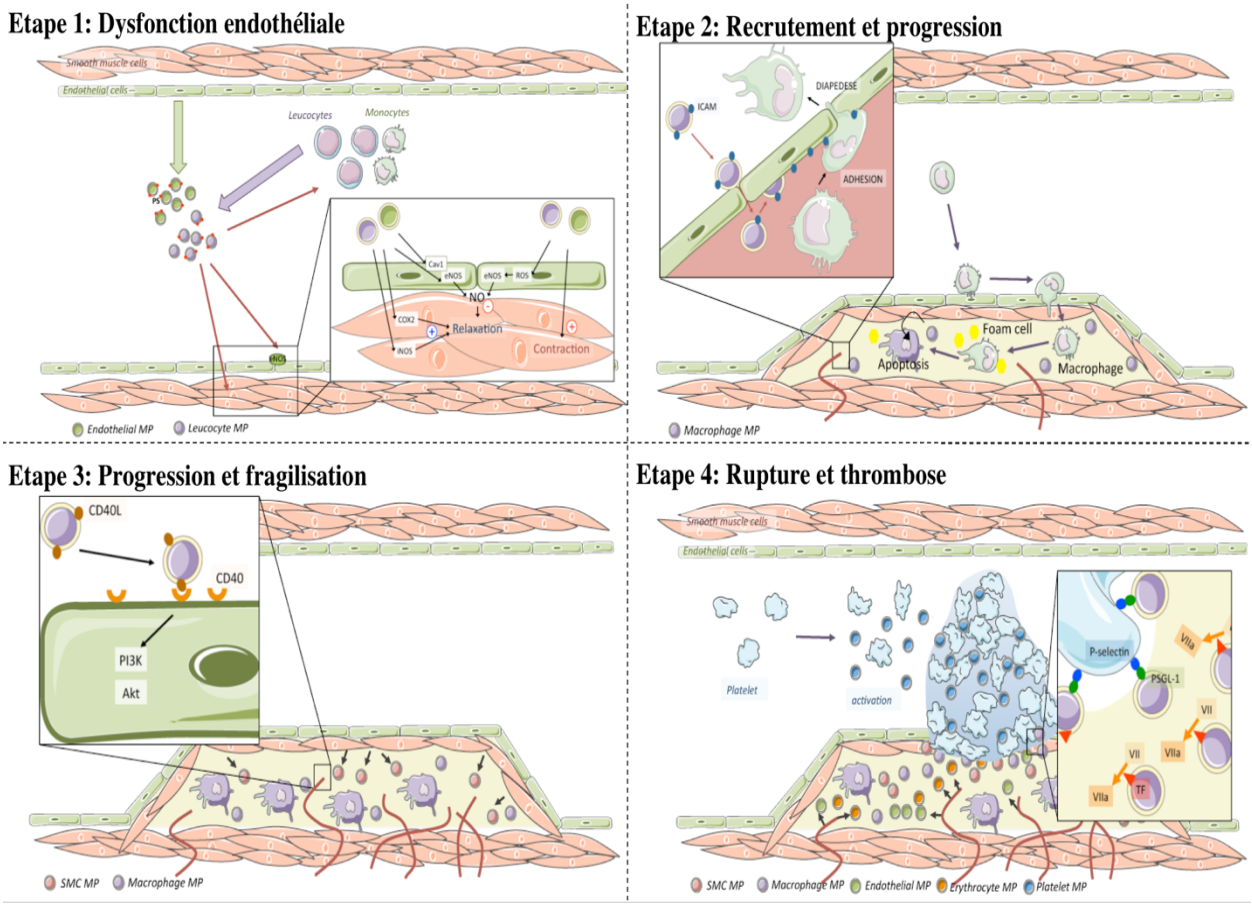


Figure 22 : Microvésicules dans la chronologie de l'athérosclérose. Adaptés de (Rautou, Vion et al. 2011).

En effet, les MVs de la plaque sont des acteurs pro-inflammatoires tissulaires, comme le confirment leurs effets prolifératifs dose-dépendants sur les lymphocytes T $CD4^+$ (Mayr, Grainger et al. 2009), qui consécutivement activent les lymphocytes B avec sécrétion d'Ig dirigées contre les antigènes de la plaque (Mayr, Grainger et al. 2009).

Bien que ceci n'ait jamais été clairement démontré, les MVs de plaques favoriseraient la migration des CML (Leroyer, Isobe et al. 2007), tandis que les MVs circulantes orientaient la prolifération et la mort cellulaire des CML.

L'effet des MVs de plaque sur le passage du profil contractile au profil sécrétoire des CML reste à explorer ainsi que les acteurs moléculaires. Une analyse tissulaire de l'expression du facteur ADP-ribosylation 6 (ARF6), impliqué dans le trafic membranaire et la formation de MVs, a montré que l'expression de l'ARF6 était 1,3 fois plus élevée dans les zones prédisposées à l'athérosclérose de l'aorte humaine que dans les zones de résistantes. La concentration en MVs de la matrice extracellulaire et l'expression de l'ARF6 par les CML de l'intima était corrélée (Bobryshev, Killingsworth et al. 2013).

Dans une troisième étape, les MVs de plaque stimulent l'angiogenèse intra-plaque et contribuent à la formation de vasa vasorum intra-plaque, ainsi qu'à de fréquentes hémorragies intra-plaques. Il a été montré que les MVs de plaque induisent l'angiogenèse *in vivo* grâce à leur capacité à lier le CD40 endothélial (Leroyer, Rautou et al. 2008). De plus, cette néo-vascularisation ne peut se faire que si la matrice extracellulaire est dégradée autorisant l'insertion de nouvelles CE (Figure 26, étape 3). La plupart des MV-$CD40L^+$ (93%) sont d'origine macrophagique dans la plaque humaine (Leroyer, Rautou et al. 2008). La vulnérabilité de la plaque est également augmentée par les MVs inta-plaque portant des protéases actives comme TACE/ADAM17 ou MMP2 et 9 (Canault, Leroyer et al. 2007) (Leroyer, Rautou et al. 2008), ce qui augmente la libération de TNFα et leurs substrats enzymatiques tels que le recepteur-1 du TNFα, et le récepteur de la protéine C endothéliale au sein de la plaque (Canault, Leroyer et al. 2007), renforçant ainsi son caractère pro-inflammatoire. Les MVs des CE, des CML et des macrophages semblent recrutées sur le site de la calcification de la plaque (Reynolds, Joannides et al. 2004, New, Goettsch et al. 2013, Buendia, Montes de Oca et al. 2015) et contribueraient à son instabilité (Badimon, Suades et al. 2017).

Les MVs de plaque ont un profil pro-thrombotique bien supérieur à celui des MVs circulantes et initient la formation du thrombus lorsque la plaque se rompt, favorisant l'interaction entre les MVs intra-plaque, et MV plaquettaires libérées dans ce contexte par les plaquettes activées et les leucocytes (Figure 26, étape 4). L'importance de l'érosion endothéliale

et des MVs dans la desquamation de l'endothélium qui expose le tissu sous-jacent également thrombogéne reste à explorer.

V.2 Les MVs du tissu hépatique et la vascularisation du foie

Si on peut considérer la formation de plaque athérothrombotique comme un remodelage pathologique du vaisseau, le remodelage du tissu hépatique au cours de la greffe d'îlots incluant l'implantation du greffon et sa reconnexion à la circulation systémique est un événement complexe faisant intervenir vascularisation du tissu et structure même de l'arrangement cellulaire hépatique. Le recrutement leucocytaire est certainement modulé par les taux sanguins dans la veine porte d'immunosuppresseurs considérablement plus élevés que dans la circulation systémique (Marzorati, Melzi et al. 2014). L'insulino-indépendance chez les receveurs par la restauration d'une sécrétion physiologique portale endogène de l'insuline, témoigne d'une revascularisation efficace de l'îlot. Toutefois, la tension en oxygène est plus faible dans le foie que celle des vaisseaux intra-insulaires pancréatiques et étant donné que la revascularisation des îlots transplantés dans le foie n'est pas immédiate, des lésions d'ischémie-reperfusion (IR) et une réaction inflammatoire précoce connue sous le nom d'IBMIR (Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction) sont susceptibles de modifier les contributions des MVs et leurs origines.

Les cellules du foie sont fortement impliquées dans la coagulopathie et l'inflammation intravasculaire intense caractérisant l'IBMIR. L'IR provoque le stress oxydant des CE sinusoïdales (SCE), conduisant au recrutement et à l'activation des cellules de Kupffer, les cellules macrophagiques du foie, des plaquettes et des troubles de la microcirculation.

Dans la phase précoce dés les 2 premières heures, les dommages hépatiques sont causés par ce stress oxydant. La phase tardive (6-24 h) est caractérisée par le recrutement hépatique des leucocytes et des macrophages. Ils adhèrent à des SEC exprimant des molécules d'adhésion (E-sélectine, P-sélectine, ICAM-1, VCAM-1) et sécrètent des chimiokines (IL-6, IL-8, IL-1β, TNFα et IFNγ) en réponse à l'hypoxie et au stress oxydant. Des agrégats plaquettaires adhèrent aux SCE lésées dès les 20 premières minutes de reperfusion post-ischémique, favorisé par le recrutement des cellulaires inflammatoires ce qui conduit à une altération microcirculatoire et un remodelage hépatique résultant (Teoh, Ajamieh et al. 2014).

L'augmentation transitoire de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) est observée pour la moitié des receveurs transplantés d'îlots avec un pic à 7 jours post-transplantation (Rafael, Ryan et al. 2003), témoignant d'une agression des cellules du tissu hépatocytaire. A distance, la stéatose hépatique, c'est à dire accumulation des

triglycérides dans les hépatocytes, est la conséquence tissulaire la plus fréquemment décelée chez les patients greffés îlots (20 % des patients greffés). Histologiquement, contrairement à l'IBMIR, la stéatose est majoritairement macrovasculaire et un infiltrat lymphocytaire peut s'y associer (Eckhard, Lommel et al. 2004). Cette lipotoxicité est en relation avec un dysfonctionnement des cellules béta et est prévenue par la leptine, qui limite la lipogenèse hépatique et améliore significativement la fonction des îlots greffés (Lee, Ravazzola et al. 2007).

Chez l'homme, la caractérisation histologique du remodelage tissulaire induit par une potentielle ischémie post-greffe est limitée par le manque d'information des biopsies hépatiques, les îlots étant embolisés dans l'ensemble du foie. En dehors des phénomènes de stéatose hépatocytaire, les données histologiques sur le retentissement hépatocytaire de la greffe d'ilots sont ainsi parcellaires chez l'homme et peu d'études existent dans les modèles de greffe chez le grand animal. Dans ce contexte, le remodelage du tissu hépatique et ses conséquences systémiques doivent donc être envisagés comme alternative aux biopsies afin d'identifier par un marqueur circulant les dommages tissulaires et vasculaires.

Les MVs circulantes apparaissent comme des traceurs de la perte cellulaire et sont de possibles marqueurs des remaniements tissulaires secondaires à la greffe intrahépatique des ilots. Aucune donnée n'existe sur la libération de MVs spécifiques des cellules du foie après greffe d'ilots. En clinique, peu d'études se sont d'ailleurs intéressées aux conséquences d'un remodelage hépatique sur la genèse de MVs.

V.2.1 Intérêt des MVs comme marqueur d'un remodelage hépatique

Dans un modèle *in vitro* d'IR hépatique utilisant des CE sinusoïdales soumises à des cycles d'hypoxie-ré-oxygénation, un gonflement excessif des membranes plasmiques survient dès les 20 premières minutes (Teoh, Ito et al. 2007), ce qui conduit à penser que les MV endothéliales seraient libérées précocement.

Dans un modèle murin d'IR hépatique par occlusion des lobes latéraux et médians gauches du foie pendant 90 min, le même groupe a démontré que les MVs sont libérées de façon dépendante du temps après la reperfusion post-ischémique pour atteindre un pic à 24h de reperfusion (Teoh, Ajamieh et al. 2014). Dans la circulation, 15 à 30 min après la reperfusion post-ischémique les MVs sont porteuses de marqueurs de CE sinusoïdales, de plaquettes, de lymphocytes T NK et de $CD8^+$. À 2 heures, le contenu des MVs est enrichi en ces protéines, avec une augmentation spectaculaire du récepteur spécifique des hépatocytes (ASGPR) ainsi qu'en F2-isoprostanes, ce qui indique une oxydation des lipides membranaires. Après 4 heures,

les MVs contenaient des marqueurs de macrophages. L'injection la Diannexine, un dipeptide de haute affinité pour la PSer, réduit la libération de MVs et empêche l'IR (Teoh, Ajamieh et al. 2014) .

D'autres modèles d'étude du remodelage hépatique permettent d'évaluer ses mécanismes cellulaires et les vésicules produites. Les agents inducteurs de nécrose hépatocytaire favorisent la libération de VE dans le plasma, certaines d'un diamètre compatible avec des MVs. La concentration de ces VE est en effet corrélée aux taux plasmatiques d'ARNm circulants d'origine hépatocytaire et reflétait alors l'étendue du dommage tissulaires hépatocytaire (Wetmore, Brees et al. 2010).

En clinique, les MVs sont connues comme indicateurs de la sévérité de la maladie du foie (Lemoinne, Thabut et al. 2014) (Maji, Matsuda et al. 2017). Ainsi, les MVs tissulaires ne restent pas au site de leur émission, dans le tissu d'origine, mais circulent également dans le sang (Mause and Weber 2010).

Brodsky (Brodsky, Facciuto et al. 2008) a suivi la cinétique de libération des MVs sanguines chez 5 patients soumis à une hépatectomie partielle, un autre modèle de remodelage tissulaire hépatique. La résection était réalisée pour métastase ou traumatisme hépatique. Les taux de MVs circulantes sont élevés dès le premier jour post-opératoire, par rapport à des sujets contrôles non opérés. Cette augmentation persiste deux semaines après la résection hépatique. Le phénotypage des MVs montre que les MVs d'origine hépatocytaires ($HepPar^+$) ne circulent pas à des concentrations supérieures contrairement aux MVs endothéliales ($CD31^+$), ce qui suggère l'importance des modifications endothéliales et un remodelage vasculaire intense au cours de la régénération hépatique.

La cirrhose est un autre exemple de remodelage hépatique chronique caractérisé par des nodules de régénération et des remaniements matriciels. La cirrhose post hépatite C s'accompagne d'une augmentation des taux de MVs circulantes lymphocytaires T ($CD4^+$, $CD8^+$), et la présence de MVs-$CD8^+$ plutôt que des MVs-$CD4^+$ a été corrélée à la progression de la fibrose hépatique et à l'activation fibrolytique des cellules stellaires hépatiques par transfert de l'inducteur de métalloprotéinase CD147 (Kornek, Popov et al. 2011), suggérant que les MVs lymphocytaires seraient un outil de diagnostic et une cible thérapeutique pour atténuer l'inflammation hépatique et la fibrose au cours de la cirrhose. De plus, les MVs leucocytaires circulantes sont des marqueurs des stades de la sévérité de la fibrose et seraient impliquées dans la genèse de l'hypertension portale associée à la cirrhose en compromettant les réponses vasoconstrictrices et en diminuant la pression artérielle systémique (Rautou, Bresson et al. 2012).

Le rôle de MVs hépatocytaires émises lors de réponses immunitaires précoces induites par des médicaments (Maji, Matsuda et al. 2017) reposerait sur leur capacité à induire l'activation et à l'infiltration hépatocytaire des macrophages via l'interaction CD40-CD40L et l'activation concomitante de la caspase-3. En outre, des taux plasmatiques supérieurs de MVs enrichis en CD40L sont mesurés dans l'hépatite alcoolique (Sukriti, Maras et al. 2018).

La comparaison entre atteinte hépatique aiguë (HA) et chronique (HC) indique que les MVs dérivées des cellules souches hématopoïétiques (CSH), ($CD39^+$) circulantes seraient discriminantes des HA (5 patients), tandis que les MVs ($CD39^+$ $CD133^+$) caractériseraient les HC (5 patients) et la décompensation hépatique par rapport aux témoins sains (Schmelzle, Splith et al. 2013). De plus, les concentrations plasmatiques de VCAM-1 et de l'IL-8 solubles significativement plus élevées chez les patients HA et HC comparativement aux témoins, confirment un indicateur discriminant de la dysfonction hépatique.

Le sang veineux hépatique représente le microenvironnement du foie et les MVs circulantes constituent une signature de la lésion cellulaire intra-hépatique. Chez 101 patients atteints d'hépatite alcoolique sévère, l'une des formes les plus graves des stéatoses hépatiques caractérisée par des lésions tissulaires, Sukriti et ses collaborateurs ont identifié que les concentrations circulantes de MVs sont indicateurs de la sévérité de la maladie et différencient les non-répondeurs au traitement stéroïdien. Des taux supérieurs de MVs dérivées des lymphocytes T ($CD3^+$, $CD4^+$), macrophages ($CD68^+$, $CD11b^+$), cellules souches hématopoïétiques ($CD45^+$, $CD34^+$) et des hépatocytes ($ASGPR^+$) sont mesurées chez les non-répondeurs à J0, tandis que les concentrations en MVs de neutrophiles et de cellules NK sont similaires dans les deux groupes. Ainsi, les taux plasmatiques périphériques des MVs $CD34^+$ et $ASGPR^+$ auraient 94% de prévisibilité comme marqueurs non invasif de la non-réactivité à la corticothérapie associée à une mortalité à 1 mois, supérieure au delà des valeurs circulantes de 25 MVs-$CD34^+$ et 4,4 MVs-$ASGPR^+$ laissant la perspective d'une possible stratification des patients pour la prise en charge. Les niveaux de MVs étaient comparables entre le sang périphérique et le sang de la veine hépatique et corrélés avec les indices de gravité histologique hépatique (Sukriti, Maras et al. 2018).

V.2.2 MVs et la regénération tissulaire

La néovascularisation rapide de la greffe d'îlots dans le foie reste un objectif hautement souhaitable à atteindre afin d'empêcher une perte substantielle de la masse cellulaire ß

fonctionnelle. L'endothélium étant majoritairement quiescent, ce processus ne sera activé que dans des conditions pathologiques.

Witek et ses collaborateurs ont montré que les concentrations de MVs portant le morphogène Sonin Hedgehog (Shh) sont élevées dans la bile de rats après une ligature du canal biliaire, un type de lésion hépatique qui s'accompagne d'un remodelage vasculaire hépatique rapide et des tissus extrahépatiques. Ces MVs-Shh^+ émises par les cholongiocytes et les cellules stellaires s'accumulent dans le foie fibrotique et régulent la vasculogenèse et l'angiogenèse en modifiant l'expression de gène dans les CE sinusoïdales (Witek, Yang et al. 2009). Ces données élargissent le rôle connu des MVs-Shh^+ dans la revascularisation (Agouni, Mostefai et al. 2007) à la réparation des tissus adultes blessés dans les formes progressives de remodelage hépatiques chroniques susceptibles d'entraîner une hypertension portale.

Les VEs dérivées de culture de cellules souches hépatiques humaines contribueraient à la régénération hépatique dans un modèle d'hépatectomie chez le rat en favorisant la prolifération des hépatocytes résidants par transfert d'ARNm démontré par RT-PCR et à l'aide de l'ARNm rapporteur AGO2 (Herrera, Fonsato et al. 2010). Cependant, l'effet *stricto sensu* des MVs et non d'une combinaison MVs et exosomes reste à démontrer. En effet, la délivrance d'ARNm par ces VEs de cellules souches hépatocytaires humaines a été rapportée comme bénéfique par ses effets anti-tumoraux chez la souris SCID via CD29 une molécule aussi associée aux exosomes des cellules hépatocytaires cancéreuses.

Un parallèle peut être fait entre les propriétés pro fibrinolytique des MVs et la voie d'activation de l'HGF (*hepatocyte growth factor*), facteur mitogénique de structure proche de la plasmine, produit par clivage d'un précurseur « Single Chain HGF » réalisé notamment par les activateurs du plasminogène (uPA and tPA). Au cours de la régénération hépatique, l'activité de l'uPA augmente dans les minutes suivant l'hépatectomie partielle, libérant de grandes quantités d'HGF au niveau de la matrice qui sera secondairement sécrété par les CE sinusoïdales (Adamek, Zalewska-Ziob et al. 2017).

Le rôle de telles MVs in situ lors d'une régénération hépatique n'est pas connu. De plus, l'association entre un taux élevé circulant d'anticorps anti-tPA et une diminution de la survie du greffon cardiaque, souligne l'intérêt de tels marqueurs du remodelage de la matrice extracellulaire dans le monitoring du greffon et de la gravité de son atteinte (Warshofsky, Dominguez et al. 2001) (cf.chapitre IV-1.2.2.).

Chapitre VI

Intérêt des Microvésicules pour le suivi thérapeutique

VI. Intérêt des microvésicules pour le suivi thérapeutique

Parce que les concentrations de MV circulantes peuvent être corrélées à sévérité de la maladie (hypertension artérielle pulmonaire, choc septique,…), l'étude de leur variation en réponse aux traitements pharmacologiques ou d'autres non médicamenteux telle la transplantation d'organe est indispensable pour établir un monitoring. Ainsi, une réduction de la génération des MVs totales ou spécifiques indiquerait l'efficacité du traitement ou serait utile pour la stratification des patients.

VI.1 Transplantation et thérapie cellulaire

I.1.1 MVs en transplantation d'organes

Dans les organes fortement vascularisés, il est probable que l'atteinte tissulaire se traduise par un déversement de MVs tissulaires dans la circulation systémique. Actuellement, des preuves de l'intérêt d'un monitoring post-greffe par des MVs circulantes en tant que biomarqueur de l'état fonctionnel des organes transplantés s'accumulent dans la littérature. L'origine cellulaire de la MV étudiée varie selon l'organe. Néanmoins des taux élevés de MVs porteuses de FT sont souvent décrits, ce qui ne préjuge pas de leur origine mais indique une élévation de l'état pro-coagulant.

Malgré l'amélioration des procédures de prélèvement et de greffe ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires sous-jacents des lésions d'ischémie-reperfusion et l'efficacité des médicaments immunosuppresseurs, il existe toujours un manque de marqueur précoce des lésions de greffe.

VI.1.1.1 Marqueurs circulants en transplantation rénale

Les MV circulent en concentration élevée dans des pathologies rénales et chez les sujets hémodialysés (Faure, Dou et al. 2006) (Amabile, Guerin et al. 2005). Chez 52 patients insuffisants rénaux hémodialysés, le taux élevé de MV circulantes totales (An V^+), de MV endothéliales, plaquettaires ($CD41^+$), leucocytaires ($CD45^+$), granulocytaires ($CD66^+$) et érythrocytaires ($CD235a^+$) ainsi que leur activité pro-coagulantes (MV FT^+) témoigne de l'amplitude du dommage vasculaire. Il se normalise après transplantation rénale pour rejoindre les valeurs basales retrouvées chez les témoins sains avec des cinétiques différentes selon leurs origines cellulaires. Ainsi, dans cette étude, un des effets bénéfiques de la

transplantation rénale seraient cardiovasculaire par le biais de MV circulantes procoagulantes réduites (Al-Massarani, Vacher-Coponat et al. 2009) limitant la réponse athérothrombotique.

De plus, les taux de CE circulantes, de MV endothéliales et de VCAM-1 soluble traduisant une atteinte endothéliale importante sont significativement plus élevés chez les insuffisants rénaux en attente de greffe, comparativement aux sujets sains et diminuent progressivement dans l'année post-transplantation, indépendamment du traitement immunosuppresseur. Cependant, les valeurs de CE circulantes et de VCAM-1 restent plus élevées que celles des témoins sains, contrairement aux MV endothéliales devenues comparables (Al-Massarani, Vacher-Coponat et al. 2008).

Une explication possible serait la forte réduction des agents systémiques nocifs pour l'endothelium tels que les toxines urémiques, la surcharge hémodynamique, le déséquilibre électrolytique et les niveaux d'oxydation, alors que les effets mécaniques de la dialyse, qui favorisent la génération de MVs circulantes (Daniel, Fakhouri et al. 2006).
En outre, Qamri et ses collaborateurs ont confirmé par cytométrie en flux l'atteinte endothéliale dans une cohorte plus élargie de 231 transplantés rénaux dont 14 en transplantation combinés rein / pancréas et 60 donneurs sains, une réduction significative des taux circulants de MV endothéliales 2 mois post-transplantation.

En transplantation rénale, les biopsies sont informatives du dysfonctionnement de l'allogreffe repérée par coloration de la molécule du complément C4d. Chez les patients ayant un rejet cellulaire aigu prouvé par biopsie, la concentration de MV endothéliales circulantes associées au rejet était élevée, alors qu'il est inchangé dans les autres cas de dysfonctionnement (Qamri, Pelletier et al. 2014).

VI.1.1.2 Marqueurs circulants en transplantation cardiaque

Chez les patients transplantés cardiaques, les taux de MV endothéliales ($CD31^+$, $PECAM^+$) post-transplantation sont significativement plus élevés que chez les témoins sains, et les MV endothéliales ($CD62E^+$, $E\text{-selectine}^+$) semblent être un facteur prédictif indépendant du rejet aigu de l'allogreffe. En effet, le ratio des MV endothéliales ($E\text{-sélectine}^+$/ $PECAM^+$) serait indicateur pertinent du degré d'activation (rapport élevé) ou d'apoptose cellulaire (rapport faible). Des ratios significativement plus faibles sont observés chez les patients transplantés comparativement aux insuffisants cardiaques et témoins sains. Le ratio de MV endothéliales chez les patients après la greffe cardiaque suggère l'augmentation de l'activité

apoptotique (Garcia, Chirinos et al. 2005). Ainsi, l'évaluation phénotypique des MV endothéliales fournit des informations pertinentes sur la nature de la lésion endothéliale.

De plus, dans un groupe de 64 patients transplantés cardiaques dont 23 en rejet aigu et 41 sans épisode de rejet, Morel et ses collaborateurs ont défini un phénotype microvésiculaire signant l'activation endothéliale et une apoptose vasculaire au cour du rejet. L'augmentation des MVs pro-coagulantes porteuses du FT^+, Fas^+ et $CD62E^+$ ainsi que le ratio MV $CD62E^+$/ MV $CD31^+$ pendant le rejet d'allogreffe est spécifique, alors que les MV $CD31^+$ ont des taux similaires, suggérant une activation des CE lors du rejet aigu de l'allogreffe (Morel, Ohlmann et al. 2008).

La vasculopathie d'allogreffe cardiaque (CAV) est le déterminant le plus important de la survie de l'allogreffe cardiaque et une cause majeure de décès après la transplantation cardiaque. Singh et ses collaborateurs ont trouvé les niveaux de MV endothéliales $CD144^+/CD42a^-$ significativement élevés chez les patients transplantés cardiaques et de valeur supérieure chez les patients transplantés cardiaques avec CAV indiquant que les MV endothéliales $CD144^+/CD42a^-$ sont discriminantes de la sévérité de l'atteinte chez les patients transplantés cardiaques (Singh, Van Craeyveld et al. 2012).

VI.1.1.3 MVs cellulaires et circulantes en transplantation et lésion pulmonaire

La transplantation pulmonaire est le seul traitement de survie pour les maladies respiratoires au stade terminal telles que la mucoviscidose (Yusen, Edwards et al. 2014). Les MVs se sont révélés être des marqueurs de remodelage pathologique des tissus pulmonaires à long terme comme dans l'hypertension pulmonaire, les patients présentant les concentrations plasmatiques les plus élevées en MV endothéliales $CD105^+$ (endogline) et MV-FT^+ était ceux qui ne pouvaient pas compléter le test de marche de 6 minutes (Bakouboula, Morel et al. 2008). De même, des MV endothéliales et lymphocytaires plasmatiques ont été rapportées dans l'emphysème sévère et leur concentration était corrélée à la sévérité de remodelage du parenchyme pulmonaire (Evans, Tuvim et al. 2010). Fait intéressant, les MVs favorisent les échanges cellulaires dans le compartiment aérien. Ainsi, les MVs isolées de l'expectoration de patients atteints de mucoviscidose sont principalement d'origine granulocytaires et provoquent l'inflammation des poumons de souris saines après instillation (Porro, Lepore et al. 2010) (Porro, Di Gioia et al. 2013). De même, dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë, des MV-FT^+ isolées à partir de l'épanchement pleural et injectées chez une souris saine

provoquent des lésions pulmonaires typiques du syndrome (Bastarache, Fremont et al. 2009) (Buesing, Densmore et al. 2011).

Notre équipe a montré que les MVs alvéolaires sont un marqueur de la lésion ischémique dans des modèles expérimentaux de reperfusion ventilation pulmonaire *ex-vivo* chez le rat, avec une augmentation précoce significative des taux de MVs circulantes d'origine épithéliale alvéolaire, leucocytaire et endothéliale après un temps d'ischémie froide de 20h comparativement à 1 h d'ischémie chaude avant la reperfusion pulmonaire. Les MVs du compartiment aérien (lavage broncho-alvéolaire) ou de la circulation pulmonaire apparaissent donc comme un marqueur des lésions d'ischémie-reperfusion pulmonaire initiale et prédictif de l'apparition d'une dysfonction aigue du greffon (Olland, Reeb et al. 2016).

VI.1.1.4 MVs cellulaires et circulantes en transplantation hépatique

Brodsky et ses collaborateurs ont constaté que les taux de MVs circulantes endothéliales $CD144^+$ et hépatiques $HepPar^+$ étaient significativement élevés chez tous les patients le 1^{er} jour après la chirurgie, qu'il s'agisse de transplantation hépatique ou d'hépatectomie partielle, jusqu'au $7^{éme}$ jour et à la fin de la $2^{éme}$ semaine chez les patients ayant subi une transplantation hépatique. Chez certains patients transplantés du foie présentant des résultats cliniques complexes, les taux de MVs circulantes changent de façon dynamique et sont en corrélation avec l'état physiopathologique (Brodsky, Facciuto et al. 2008). Dans des récents travaux examinant des biomarqueurs protéiques pour la détection et la prédiction du rejet aigu, les MVs endothéliales $CD31^+$ et dérivées des cellules T (cytotoxiques) $CD8^+$ et $CD4^+$ (auxiliaires) étaient en effet associés aux épisodes de rejet aigu. Cependant ces données nécessitent une confirmation car les MVs étaient isolées à partir de sérum, c'est à dire après activation in-vitro des cellules sanguines prélevées et aussi des enzymes de la coagulation et protéases circulantes (Morgul, Splith et al. 2018).

VI.1.2 MVs en thérapie cellulaire

VI.1.2.1 Marqueurs circulants en transplantation des cellules souches

Chez des patients ayant reçu une allogreffe de cellules souches, le taux de MV endothéliales serait un élément diagnostique pour différentier le rejet du greffon contre l'hôte (GVHD) des autres complications post-greffe (Pihusch, Rank et al. 2006). L'équipe de Nomura a confirmé l'augmentation des taux de MV endothéliales dans les trois premières

semaines post-greffe, suggérant la possibilité que FasL et les MV endothéliales comme marqueur discriminant du GVHD (Nomura, Ishii et al. 2008).

De plus, De Rop et ses collaborateurs ont montré la pertinence diagnostique des MV porteuses du FT pour une meilleure stratification du risque. Les données de 60 patients suivis pendant en moyenne 3 ans montrent une survie globale à 1 an plus courte chez ceux avec des concentrations de MV FT^+ supérieures avant le conditionnement pré-greffe (De Rop, Stadler et al. 2011), suggérant que les MV FT^+ sont des biomarqueurs utiles pour la stratification du risque en allogreffe. De plus, comparativement aux taux de pré-transplantation, les MV PSGL-1^+ diminuent significativement en période de périgreffe et de suivi correspondant aux points « pendant la transfusion de la globuline antithymocyte (ATG), pré-SCT, et un jour post- transplantation ». Seules les valeurs de MV PSGL-1^+, à 30 et à 60 minutes après la fin de la transplantation étaient significativement plus élevées que dans la plupart des autres points de suivi et également au moment de l'échec de la transplantation défini par un nombre de neutrophiles > 500/µL. Ces résultat suggèrent que les MV PSGL-1^+ seraient un marqueur indépendant pour la stratification de la rechute et éventuellement de la progression de la maladie puisque les MV leucocytaires et plaquettaires restaient stables (Trummer, De Rop et al. 2011).

VI.1.2.2 Marqueurs circulants en transplantation d'îlots pancréatiques

Dans une étude cas clinique, notre laboratoire a mis en évidence chez 3 patients DT1 transplantés d'îlots, un pic de MVs circulantes totales détectable le mois précédent la chute du C-peptide et la remontée des besoins en insuline, indiquant un intérêt potentiel pour la détection non invasive et précoce de la perte de fonction des îlots greffés. Du fait du petit nombre de patients, le laboratoire a suivi de manière prospective et longitudinale les patients. Les MVs totales ont été dosées avant et post-greffe (après période de stabilisation), ainsi qu'avant, pendant et après rejet et traitement de celui-ci.

Dans cette greffe, les biopsies étant non informatives, un marqueur précoce et non invasif d'une dysfonction du greffon serait utile. Notre équipe a étudié les variations de C-peptide, de MVs et du besoin en insuline chez des patients greffé d'îlots (Toti, Bayle et al. 2011) (Figure 23).

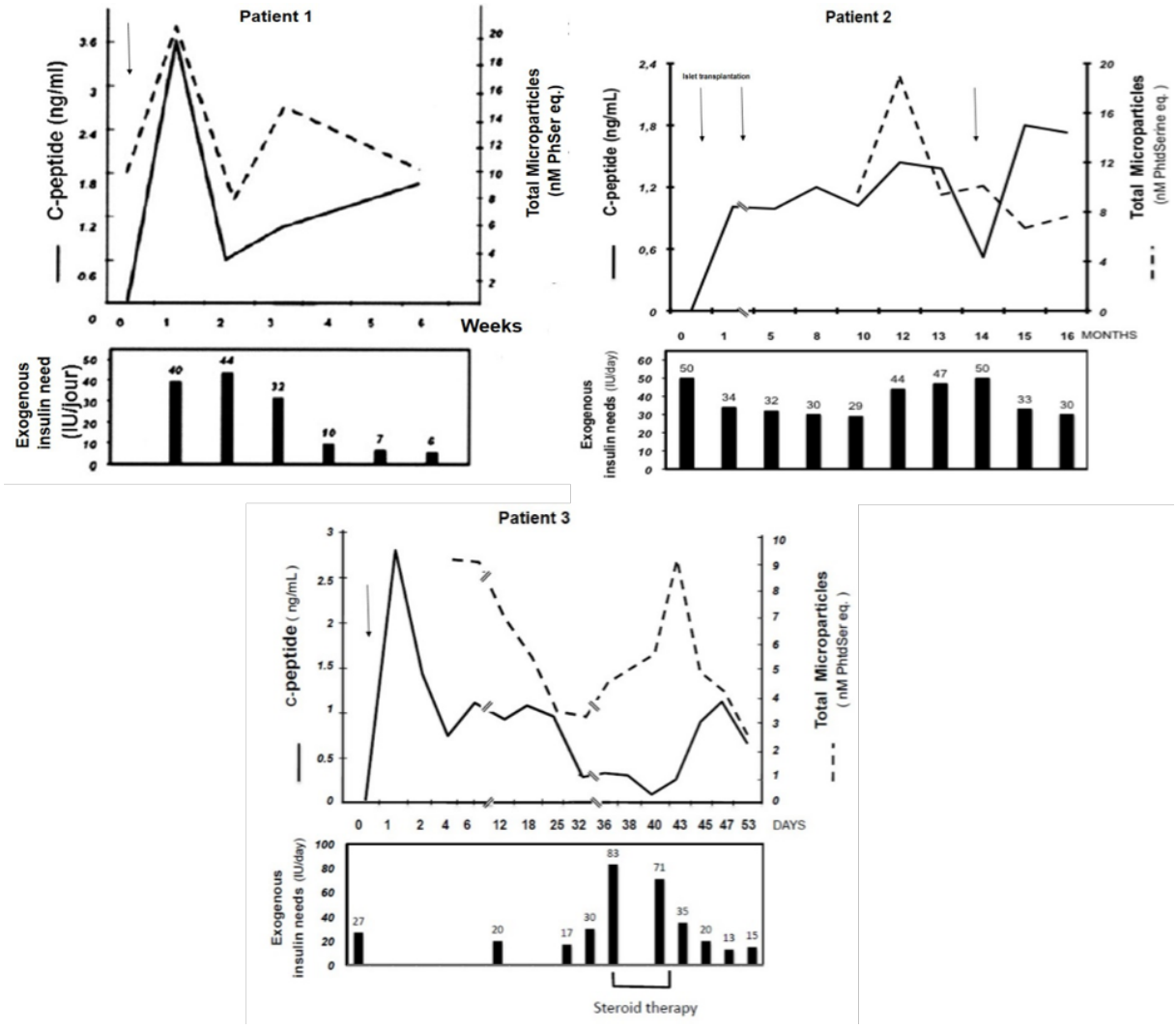


Figure 23 : Variations du C-peptide, du besoin d'insuline et de taux de MVs circulantes lors de la transplantation d'îlots. (Toti, Bayle et al. 2011) (Moreau, Toti et al. 2012).

Le C-peptide (lignes pointillées), les MVs (ligne continue) et les besoins en insuline exogène (panneau du bas) ont été mesurés dans trois patients transplantés d'îlots pancréatiques : patient 1 dans les 6 semaines post-transplantation, patient 2 dans les 12 mois post-transplantation, patient 3 présentant un dysfonctionnement du greffon et un C-peptide restauré après traitement stéroïdien. Les flèches représentent l'injection d'îlots.

Dans le cas du patient 1, l'injection d'îlots pancréatiques est immédiatement suivie d'une augmentation simultanée du C-peptide plasmatique et du taux de MVs totales, témoignant de la fonctionnalité des îlots greffés et d'un remodelage membranaire intense au cours de la première semaine post- greffe, et qui pourrait affecter la fonction et la survie du greffon. En effet, l'augmentation des MVs circulantes porteuses de FT était associée à un résultat négatif de la transplantation d'îlots (Johansson, Lukinius et al. 2005).

Dans le cas du patient 2 (Figure 23), la transplantation d'îlots restaure la sécrétion endogène du C-peptide stabilisée après 6 semaines. Puis, lors d'un possible rejet, MVs et C-peptide varient de manière opposée. En effet, une chute du C-peptide est associée à une remontée des besoins en insuline, tandis qu'un pic de MVs circulantes précoce suggère une valeur prédictive d'une dysfonction et éventuellement témoignerait de l'apoptose intra-insulaire. Une nouvelle injection d'îlots (cas du patient 2) (Toti, Bayle et al. 2011) ou un bolus de stéroïdes cas du patient 3 en probable rejet cellulaire (Moreau, Toti et al. 2012) ramènent alors les concentrations de MVs et de C-peptide à leurs valeurs basales et témoignant de la restauration des fonctions du greffon.

Les données, obtenues par la seule mesure des MVs totales sans identification de leur origine cellulaire sont très encourageantes. Bien qu'elles n'identifient pas la cause de la perte de fonction, elles indiquent que les MVs ont un intérêt pronostique de rejet aigu, comme une signature, soit du dommage vasculaire, soit de la perte de la masse insulaire.

Ces résultats démontrent que les MV pro-coagulantes sont détectables dans le sang périphérique veineux des patients transplantés d'organes solides et de cellules, et que les niveaux des MVs évoluent et changent de façon dynamique après la transplantation et sont en corrélation avec les résultats cliniques. L'évaluation phénotypique des MV circulantes peut fournir des données informatives sur les mécanismes conduisant à l'apoptose ou l'activation cellulaire dans la greffe. Les niveaux de MV les plus élevés sont associés à une perte de fonction secondaire à un rejet chronique sévère, soutenant l'idée que la surveillance de MV serait utile pour le monitoring du rejet de la transplantation et qu'elles seraient un biomarqueur à la fois sensible, spécifique pour éviter l'échantillonnage invasifs des tissus greffés pour le diagnostic du rejet et des lésions tissulaires.

VI.1.2.2.1 La greffe d'îlots pancréatiques : un traitement du DT1

VI.1.2.2.1.a Le diabète de type 1 : maladie auto-immune

a) Epidemiologie

Le diabète de type 1 (DT1) également connu sous le nom de diabète juvénile ou diabète insulinodépendant est une maladie chronique auto-immune. Sa cause initiale reste débattue mais aboutit à la destruction des cellules β des îlots de Langerhans (Korsgren, Molin et al. 2012) responsables de la production d'insuline, entraînant une hyperglycémie. Le début de la maladie est bimodal avec 2 pics à l'âge de 4-6 ans et 10- 14 ans, sans prédominance de sexe. A ce jour, il est estimé que plus de 500 000 enfants sont porteurs de cette pathologie dans le monde et 90 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année (Diaz-Valencia, Bougneres et al. 2015).

Bien que le DT1 ne représente que 5 à 10% des cas de diabète, 11 à 22 millions de personnes sont affectées dans le monde (International Diabetes Federation. Diabetes atlas, 2015). L'incidence du DT1 est en hausse dans le monde entier (Mayer-Davis, Lawrence et al. 2017). De plus, d'après l'étude EuroDiab, le nombre de nouveaux cas de diabète en Europe est estimé à 15 000 en 2005 et à 24 400 en 2020. Ces données suggèrent que la prévalence du DT1 en Europe chez les enfants de moins de 15 ans passera de 94 000 en 2005 à 160 000 en 2020 (Patterson, Dahlquist et al. 2009). En France, il y a actuellement environ 180 000 à 200 000 diabétiques de type 1 avec 4 000 nouveaux cas par an (Etat de santé en France, rapport 2017). La prévalence du DT1 augmente de façon importante chez les enfants de moins de 5 ans et sera doublée d'ici 2020.

b) Physiopathologie, causes moléculaires et cellulaires du DT1

En 1986, Eisenbarth propose un modèle de l'histoire naturelle du diabète (Eisenbarth 1986), qui décrit l'évolution de la pathologie sur plusieurs années depuis la présence de gènes de prédisposition jusqu'à l'apparition du diabète cliniquement symptomatique (hyperglycémie, cétose et maigreur chez un individu de moins de 35 ans) au vu d'une destruction de 80% à 90% des cellules β des îlots (Figure 24).

Ce modèle décrit l'évolution lente de la pathologie impliquant l'action combinée de 3 mécanismes : des facteurs génétiques prédisposant, des facteurs environnementaux déclenchant et la réponse auto-immune.

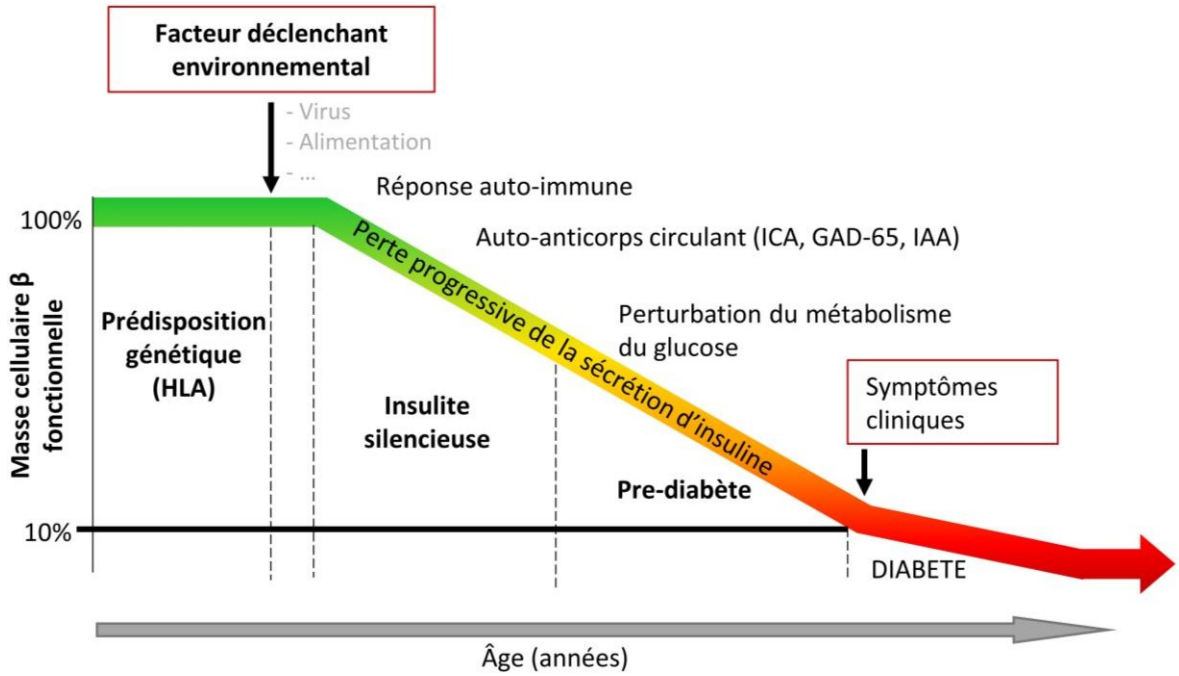


Figure 24 : Histoire naturelle du diabète de type 1. D'après (Eisenbarth 1986)

Description des différents stades de développement de la pathologie inspirée du modèle classique proposé en 1986 par George Eisenbarth

Parmi les facteurs environnementaux, on observe une recrudescence du DT1 à l'automne et au printemps, certains virus peuvent en effet favoriser l'apparition du DT1 chez des personnes génétiquement prédisposées (Principi, Berioli et al. 2017). Les facteurs alimentaires auraient eux aussi un rôle, le surpoids contribue à la résistance à l'insuline qui entraîne l'augmentation de l'apoptose des cellules ß ce qui les rend antigéniques (Islam, Srinivasan et al. 2014).

L'apparition de diabète auto-immun en association avec des mutations génétiques affectant des gènes clés ayant une fonction immunitaire est une preuve supplémentaire de la contribution des facteurs génétiques à l'étiologie du DT1(Yang and Chan 2016).

Les gènes de susceptibilité HLA sur le chromosome 6p21 confèrent à eux seul la majeure partie du risque génétique, connue depuis plus de 40 ans (Cudworth and Woodrow 1974). Les haplotypes hétérozygotes les plus à risque sont ceux codant pour l'HLA Classe II avec "Haplotype DR4-DQ8", et "Haplotype DR3-DQ2" (Redondo, Steck et al. 2018). Jusqu'à 90% des personnes atteintes de DT1 sont porteuses de DR4-DQ8 ou de DR3-DQ2. La combinaison

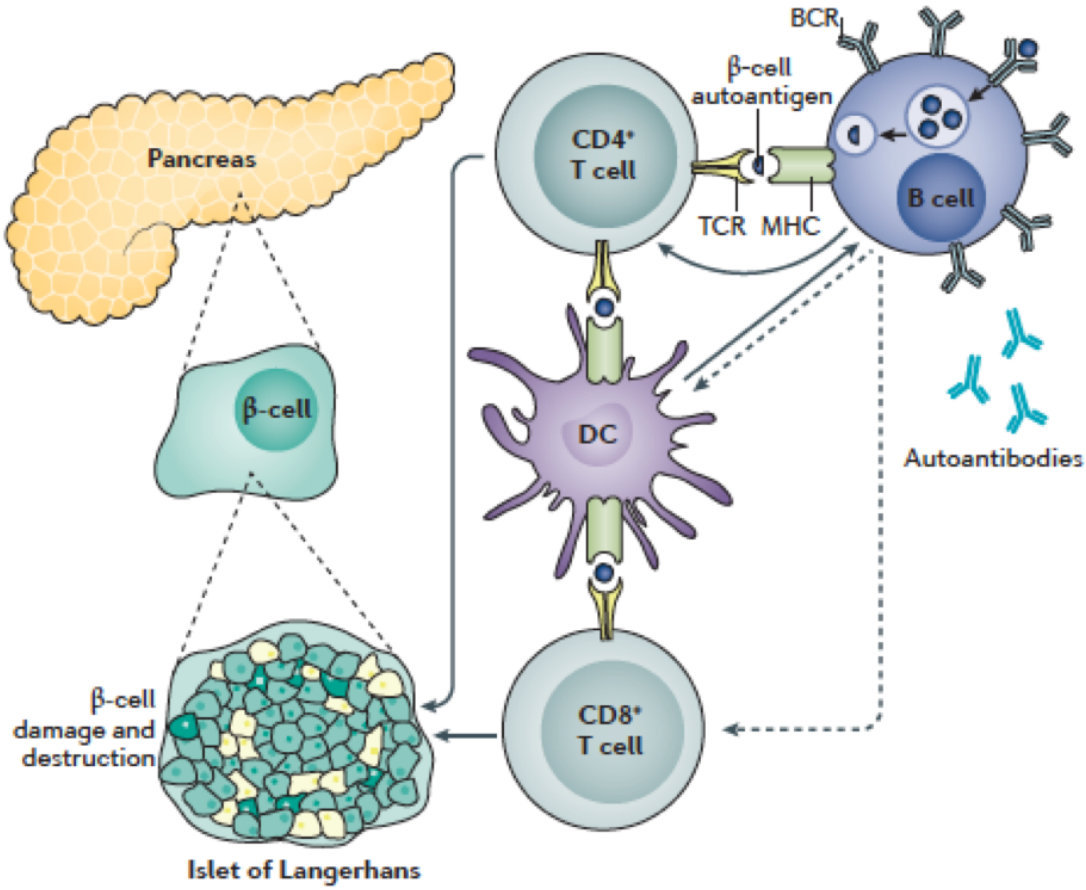


Figure 25 : La pathogenèse de DT1. D'après (Katsarou, Gudbjornsdottir et al. 2017)

Le DT1 est une maladie auto-immune. Les L B activés interagissent avec les L T CD4$^+$, les LT CD8$^+$, ainsi que les cellules dendritiques (DCs). La présentation de l'antigène par les lymphocytes B et les DCs stimule l'activation des LT spécifiques des cellules ß. De plus, l'exposition des LB aux auto-antigènes des cellules β conduit à la production d'auto-anticorps ciblant les îlots. Les flèches pointillées indiquent les interactions potentielles entre les LB et les LT CD8$^+$; et entre les LB et les DCs. BCR : récepteur des LB ; TCR : récepteur des LT.

de ces 2 haplotypes dans le génotype DR4-DQ8 / DR3-DQ2 confère le plus haut risque de DT1 chez les enfants (Ilonen, Kiviniemi et al. 2016).

Cette réaction auto-immune peut se dérouler sur plusieurs années avant l'apparition du diabète symptomatique et peut être dépistée avant apparition des symptômes par des dosages sanguins d'auto-anticorps circulants [auto-anticorps anti-insuline, IAA; Isoforme de 65 kDa et de l'acide glutamique décarboxylase, GAD65; Fragment de 40 kDa provenant de la partie intracellulaire d'une protéine de type tyrosine phosphatase (gène PTPRN), appelée IA-2ic ou ICA512ic; et la famille des protéines de transport du zinc, ZnT8] a été reconnue précédant et accompagnant l'élévation des valeurs glycémiques dans le DT1 (Abreu and Roep 2013).

L'immunité cellulaire (dont lymphocytes T-CD8) joue un rôle déterminant dans la destruction des cellules β dont témoigne leur présence au sein de l'insulite qui caractérise le début de la maladie (Unger, Velthuis et al. 2011). Cette insulite est liée en majorité à une infiltration, après activation par un auto-antigène des cellules β, par des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques, des macrophages et des lymphocytes auxiliaires $CD4^+$ responsables de l'activation d'une cascade de voies immunologiques (Gomez-Tourino, Arif et al. 2016).
Le DT1 est également associé à la production d'anticorps par les lymphocytes B (LB). Ces anticorps n'ont pas eux-mêmes de rôle pathogène mais sont plutôt liés à la progression de la maladie en favorisant l'auto-immunité (Vermeulen, Weets et al. 2011).
Les LB favorisent la différenciation des LT $CD8^+$ en LT cytotoxiques (CTL) et fournissent des signaux de survie aux LT $CD8^+$ pour maintenir des niveaux élevés de CTL agressifs (Brodie, Wallberg et al. 2008) et des LT $CD4^+$ mémoires (Figure 25).

VI.1.2.2.1.b Approches thérapeutiques du DT1

Depuis la découverte de l'insuline en 1921, L'insulinothérapie exogène, qui demeure la stratégie thérapeutique de référence chez le DT1, est la première biothérapie mise à disposition depuis 1978 en faisant appel à des insulines recombinantes. Il est maintenant bien démontré qu'un bon équilibre glycémique (HbA1C <7% soit une glycémie moyenne inférieure à 1,50g/l) permet de prévenir l'apparition de complications sévères de micro-angiopathies, rétinopathies, glomérulopathies et neuropathies (Thompson, Meloche et al. 2011).

Les schémas d'insulinothérapie actuellement proposés visent à reproduire la sécrétion physiologique et permanente durant la journée, c'est-à-dire une sécrétion basale à laquelle s'ajoutent des pics sécrétoires adaptés aux besoins à l'occasion des repas. Ces objectifs ne

sont pas complétement atteint pour les patients DT1 dont le pronostic vital est engagé en raison d'une instabilité majeure et irréductible de leur diabète. Ces patients présentent une grave détérioration de leurs qualités de vies, malgré la mise en œuvre des moyens actuellement les plus aboutis de l'insulinothérapie :

1- Insulinothérapie intensive par multi-injection ou par pompe, sous couvert d'une éducation thérapeutique adaptée (Hanaire, Lassmann-Vague et al. 2008).

2- Un pancréas artificiel associant des systèmes de moniteurs continus de la glycémie et des systèmes d'administration automatique d'insuline par une pompe intégrant un algorithme permettant la régulation de la glycémie du patient par administration autonome et régulée d'insuline (Breton, Farret et al. 2012, Ly, Weinzimer et al. 2017) . Dans la plupart des études, l'utilisation de ces systèmes a été associée à une diminution du risque d'hypoglycémies sévères (Garg, Zisser et al. 2006) et notamment nocturnes (Ly, Keenan et al. 2016). Certains patients présentent une grande variabilité glycémique non maîtrisable, malgré l'affinement des algorithmes, ces systèmes sont peu fiables au repas et l'activité physique.

Enfin, la tolérance humaine vis-à-vis de ces dispositifs pourrait constituer un frein pour de nombreux patients. Riveline et ses collaborateurs ont conduit une étude Capteur en France en 2010, 257 patients ont été screenés mais 197 patients ont passé la phase de faisabilité (abandon du système après quelques jours) (Riveline, Schaepelynck et al. 2012).

La délivrance d'insuline sous-cutanée exogène se heurte à la variabilité du mode d'administration sous- cutanés d'insuline. Les pompes et les capteurs sous-cutanés optimisés ne permettent pas une administration physiologique d'insuline avec une libération suffisamment dynamique. De plus, l'inclusion de systèmes de glucagon contre-régulateurs manque encore de précision que seule la greffe de tissu pancréatique endocrine pourrait fournir.

3- La greffe de tissu pancréatique endocrine a été proposée pour pallier cette situation. La première modalité, sur un plan historique, est la greffe de pancréas. Dans sa configuration de greffe de pancréas isolé, en dehors de toute greffe de rein associée, cette pratique demeure très peu usitée par les diabétologues en raison du ratio bénéfice-risque et des complications chirurgicales très importantes (Choi, Jung et al. 2017). La seconde modalité, la greffe d'îlots pancréatiques, est née sous de meilleurs auspices dans le milieu diabétologique avec l'espoir d'une égale efficacité dans un contexte de moindre mortalité.

Une autre situation clinique est celle de patients DT1 présentant une insuffisance rénale terminale faisant envisager une thérapeutique de suppléance rénale. Le consensus international est d'envisager en première intention une double greffe rein-pancréas. Il existe

néanmoins des situations où ce geste est récusé, soit en raison de comorbidités le contre-indiquant, soit en raison du choix du patient, de l'accessibilité régionale de la technique. Il existe enfin des situations où à l'issue d'une double greffe rein-pancréas, seul le greffon rénal a pu être maintenu viable. Dans ces cas, une greffe d'îlots différée par rapport à la greffe rénale est volontiers proposée. Elle offre la perspective d'un contrôle métabolique meilleur, bénéfique pour le pronostic de survie du greffon rénal et d'une amélioration de la qualité de vie, tout en conservant l'immunosuppression justifiée par le greffon rénal, sans majoration de celle-ci sauf en période d'induction.

A cette occasion, des recommandations fondées sur des preuves ont été proposées visant à définir la place respective de la transplantation d'îlots et du pancréas dans le traitement des patients atteint de DT1 en fonction de leurs situations médicales spécifiques (Anne Wojtusciszyn and group 2018).

Les résultats comparatifs des transplantations de l'organe pancréatique et des îlots ont été abordés. Ces résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

	Pancréas	***Ilots***
1er cas rapporté	1966 (Minneapolis)	1974 (Minneapolis)
Nombre de cas rapportés en 2012	environ 30 000	environ 1 600
Absence d'insulinothérapie		
à 1 an	85%	80%
à 5 ans	70%	30-50%
à 10 ans	36%	20-25% (70% C peptide+)
Survie du patient Tx combiné rein		
à 5 ans	90%	92%
à 10 ans	67%	92%
Complications	Chirurgie lourde (fréquente-sévère)	Technique mini invasive (rare)
	Thromboses	Hémorragie
	Pancréatites	Thrombose portale
	Péritonites	
Mortalité	4%	0%
Nombre de donneurs	1	1-4

Tableau 4 : Récapitulatif des résultats de transplantations pancréatiques et d'îlots.
Adaptés de (Papas, Karatzas et al. 2013) (Anne Wojtusciszyn and group 2018).

Survie du patient et du greffon (exprimée en indépendance à l'insuline) après transplantation de pancréas entre 2005 et 2014 (Gruessner and Gruessner 2016) et depuis 2003 pour la transplantation d'îlots (Vantyghem MC 2017).

VI.1.2.2.1.c Procédure de la transplantation d'îlots pancréatiques

La transplantation d'îlots de Langerhans consiste à transplanter un tissu endocrine permettant la restauration de la fonction insulinosécrétrice chez le patient DT1. Elle consiste à greffer aux patients diabétiques insulinopéniques des îlots de Langerhans, unités anatomiques comprenant les cellules sécrétrices d'insuline. Cette procédure peut être actuellement proposée à des patients diabétiques de type 1 présentant un diabète instable avec survenue d'hypoglycémies sévères fréquentes et invalidantes ou à des patients diabétiques de type 1 greffés rénaux déjà sous traitement immunosuppresseur (Lablanche, Borot et al. 2015).

Concernant la technique, un pancréas sain est prélevé chirurgicalement dans le cadre d'un prélèvement multi-organes chez un donneur cadavérique en état de mort encéphalique (Hubert, Arnalsteen et al. 2005). Le pancréas est disséqué afin d'éliminer les tissus non pancréatiques tels qu'une partie du duodénum et du tissu graisseux. Idéalement, le prélèvement doit préserver la capsule pancréatique et être prélevé avant tout organe abdominal afin de minimiser le temps d'ischémie et les dommages possibles du tissu pancréatique.

Le pancréas est alors transporté sur glace sur le site de production de la préparation des îlots. Certaines équipes utilisent pour le transport la technique « Two Layer », consistant à conserver le pancréas à l'interface entre du liquide de conservation et du perfluorocarbone enrichi en oxygène. Ceci permet d'améliorer la conservation du pancréas (Hering, Matsumoto et al. 2002), avec une partie de la rate pour le cross match lymphocytaire (recherche des anticorps anti-HLA).

L'organe est ensuite perfusé avec une collagénase Serva NB1 (contient de la collagénase de type I et II) via la canulation du canal de Wirsung puis est placé dans une chambre de digestion, la chambre de Ricordi, contenant des billes métalliques. Ces deux étapes permettent la digestion enzymatique et mécanique du pancréas.

Le digestat est récolté et les îlots sont ensuite isolés par purification par centrifugation selon un gradient de densité. Elle repose sur la différence de densité des îlots (~1.059 g/ml) et la densité du tissu exocrine (entre 1.059-1.074 g/ml) en utilisant un gradient de densité de Ficoll (Ricordi, Lacy et al. 1988).Le rendement d'isolement des îlots est de 300 000 à 400 000 îlots par pancréas soit 50 % des îlots totaux du pancréas. Les îlots sont resuspendus dans du milieu de culture (150 ml de sérum physiologique avec 19,6 % d'albumine humaine).

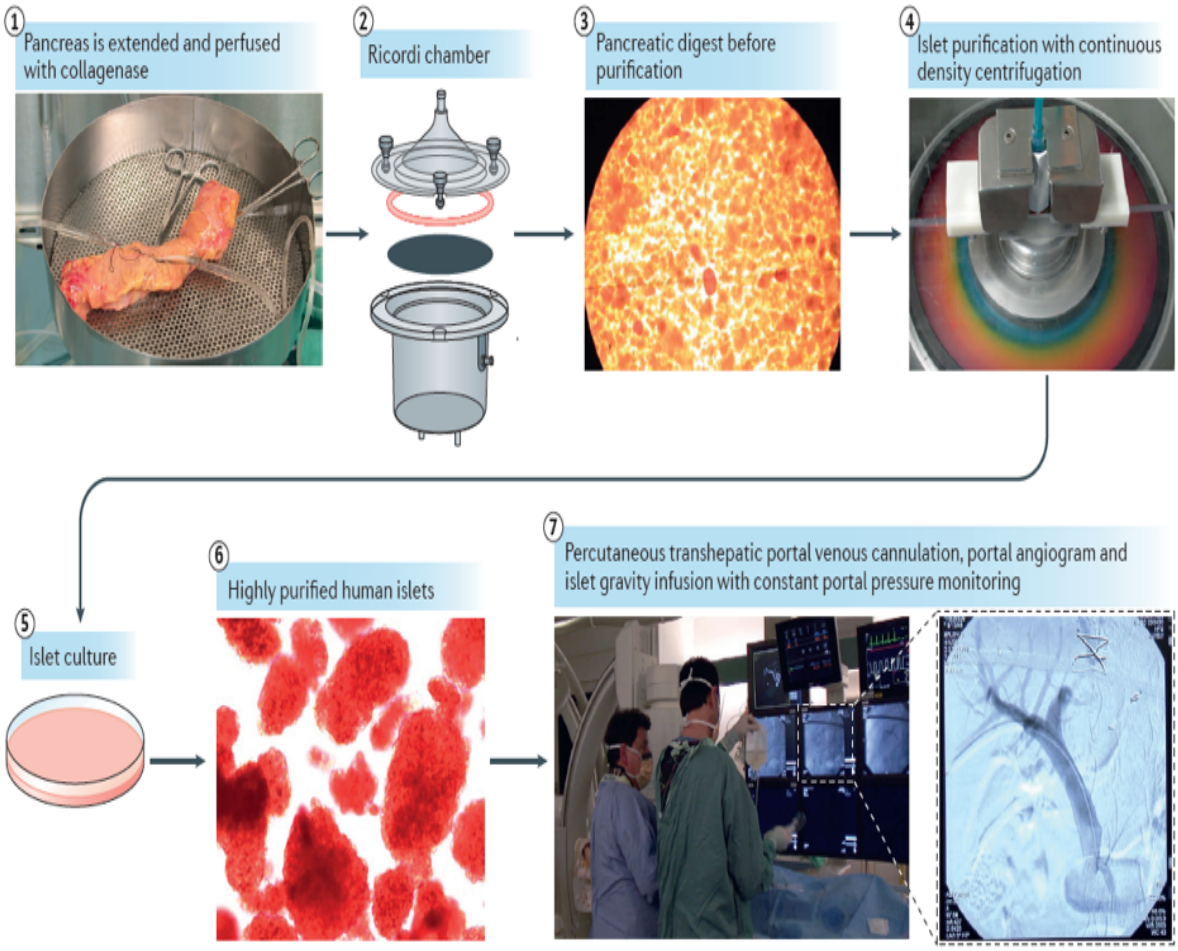


Figure 26 : Illustration schématique de l'ensemble depuis l'isolement des îlots jusqu'à la transplantation intra-portale. D'après (Shapiro, Pokrywczynska et al. 2017)

(1) Le pancréas humain est distendu et perfusé avec une enzyme de collagénase par le biais de canules placées dans le canal pancréatique. (2) Schéma de la chambre de Ricordi. (3) Digestion pancréatique avant purification (îlots colorés en rouge avec du colorant dithizone, tissu exocrine majoritairement impur, grossissement × 40). (4) Système d'aphérèse cellulaire COBE 2991 avec gradients osmotiques continus de biochromie (les bandes colorées artificiellement illustrent les gradients). (5) Phase de culture d'îlots pour améliorer la pureté, la viabilité et la qualité du greffon. (6) îlots humains hautement purifiés (rouge dithizone coloré, grossissement × 200) prêts pour la libération clinique. (7) Canulation veineuse transhépatique percutanée, angiographie portale et perfusion gravitaire des îlots avec surveillance constante de la pression portale.

Une injection intravasculaire chez le receveur par cathétérisme de la veine porte ou mini laparotomie conduit à l'implantation des îlots dans les capillaires sinusoïdes (Qi, Barbaro et al. 2009) (Figure 26). Le patient reçoit en moyenne entre 10 000 et 13 000 îlots équivalents/ kg de poids corporel.

Ainsi, la transplantation d'îlots est une technique de thérapie cellulaire confortable pour le patient car l'intervention se fait sous anesthésie locale et ne dure que très peu de temps.

VI.1.2.2.1.d Exploration de la fonction des îlots après transplantation

L'évaluation de la masse d'îlots est basée sur des indices de fonction statiques faciles à utiliser en pratique clinique courante ou des tests de stimulation à l'insuline plus difficiles à mettre en œuvre mais plus précis. Ces tests, principalement utilisés dans le cadre de recherche, évaluent la masse fonctionnelle des îlots greffés à l'aide d'un stimulus sécrétoire. On distingue les stimuli glucidiques, évalué par un repas nutritif liquide standardisé contenant une quantité raisonnable de glucides (~ 50 g) (MMTT : Mixed Meal Tolerance Test) (Faradji, Monroy et al. 2007) ou les sécrétagogues d'insuline non-glucidique tel que l'arginine ou le glucagon, qui sont administrés par injection intraveineuse (Robertson, Bogachus et al. 2015). La sécrétion d'insuline est alors exprimée par l'AIR (Acute Insulin Response) qui résulte de la différence entre la moyenne des insulinémies stimulées et l'insulinémie basale (Hirsch, Odorico et al. 2012).

Score composite

Le premier indice de fonction du greffon en pratique clinique a été développé et proposé en 2005, l'équipe de Ryan a défini le β score dans une publication parue dans Diabetes Care (Ryan, Paty et al. 2005). Ce score associe un score intermédiaire entre 0 et 2 à chacun des 4 indicateurs suivants :

- HbA1c
- C peptide basal (ou stimulé)
- Dose quotidienne d'insuline (U/kg) ou prise d'antidiabétiques oraux
- Glycémie à jeun

La somme des scores est comprise entre 0 (dysfonction du greffon) et 8 (excellente fonction de greffe).

Voici le détail du calcul :

Critères	Score de 2	Score de 1	Score de 0
Glycémie à jeun	≤ 100 mg/dl ≤ 5.5 mM	101 à 125 mg/dl] 5.5 ; 7 [mM	≥126 mg/dl ≥ 7 mM
HbA1c (%)	≤ 6,1	6,2 à 6,9	≥7
Dose quotidienne d'insuline (U/kg) ou ADO	0	0,01 à 0,24 et/ou ADO	≥0,25
C peptide stimulé (ng/mL)	≥ 1	0,3 à 1	< 0,3 Score global = 0

A l'heure actuelle, il s'agit du score de référence pour évaluer l'efficacité et le suivi longitudinal de la greffe d'îlots pancréatiques au niveau international.

Ce score a été modifié pour **un score BETA-2** lorsque le C-peptide sanguin stimulé n'était pas disponible (Forbes, Oram et al. 2016). Ce nouveau score basé sur un seul échantillon de sang à jeun, il estime que la fonction du greffon est une variable continue et montre une plus grande discrimination de l'intolérance au glucose et de l'indépendance insulinique après la transplantation. Des études examinant son utilité pour suivre le fonctionnement à long terme du greffon sont nécessaires.

Cependant, le score β n'intègre pas l'incidence des événements hypoglycémiques. Rickels et ses collaborateurs ont définis en 2017 dans un atelier IPITA / EPITA, une classification dite Igls de la fonction des cellules β greffées prenant en compte les événements hypoglycémiques sévères. **Le Score Igls** identifie quatre états différents du greffon (optimal - bon - marginal - échec) définis selon quatre indicateurs (HbA1c, C-peptide, événements hypoglycémiques sévères, besoins en insuline ou antidiabétiques) (Rickels, Stock et al. 2018). Ces auteurs ont suggéré de s'appuyer sur le groupe d'étude international de l'hypoglycémie fournissant un consensus supplémentaire sur les définitions de l'hypoglycémie pour les essais cliniques et de prendre en compte les événements de niveau 2 (taux de glucose < 3 mM ou 54 mg / dl) ou niveau 3 (déficience cognitive sévère nécessitant une assistance externe pour la récupération) par la mesure continue du glucose (CGM) (EPITA 2017).

VI.1.2.2.1.e Efficacité de la stratégie

La transplantation d'îlots est reconnue comme une procédure « de routine » pour certains patients dans plusieurs pays : Canada, Royaume-Uni, Belgique et Suisse par exemple. En France, la greffe d'îlots est encore pratiquée uniquement dans le cadre d'essais cliniques, mais

des progrès considérables ont été obtenus en transplantation d'îlots aux cours des dernières années.

Depuis 2000, l'essai international d'Edmonton et ses résultats encourageants à long terme rapportent une avancée majeure à partir d'une série de 7 patients tous devenus insulinodépendants à 1 an d'une transplantation d'îlots (Shapiro, Lakey et al. 2000). Ce succès à fait naître de grands espoirs reproduits ultérieurement par plus d'une quarantaine de centres de recherche d'Amérique du Nord, Europe, Australie et Asia, Le taux de succès estimé grâce au rapport annuel du CITR (Collaborative Islet Transplant Registry) de 2016 dresse un bilan des activités relatives à la transplantation d'îlots allogéniques entre 1999 et 2014, rapportant 1584 allogreffes chez 819 receveurs des injections d'îlots seuls (ITA) tandis que 343 allogreffes chez 192 avaient déjà reçu une transplantation rénale et appelés receveurs îlots-rein (IAK). En associant toutes les données, les résultats de la prévalence d'insulino-indépendance chez les 1011 receveurs d'îlots était de 50% la première année post dernière injections d'ilots (CIRT 2016 Dec).

Ainsi, depuis l'essai international d'Edmonton et ses résultats encourageants à long terme, le nombre de greffes d'îlots dans le monde n'a cessé de croître et les résultats de s'améliorer. Le taux de succès estimé grâce au registre CITR rapportant 412 allogreffes chez 257 receveurs entre 1999 et 2010 a montré une amélioration croissante des résultats métaboliques au cours des années : 27 % des patients transplantés entre 1999 et 2002 étaient insulino-indépendants 3 ans après leur transplantation alors qu'ils étaient 37 % entre 2003 et 2006 et 44 % entre 2007 et 2010 (Barton, Rickels et al. 2012).

Ce progrès est dû à l'utilisation des immunosuppresseurs plus ciblés, des substances anti-cytokiniques comme l'anti-TNF alpha à la phase initiale de la greffe et à l'amélioration des protocoles d'isolement d'îlots et de leur rendement (Vantyghem, Kerr-Conte et al. 2009).
Si l'on considère que le premier objectif de la greffe d'îlots est d'améliorer l'équilibre glycémique des patients diabétiques afin d'en diminuer les complications, la greffe d'îlots est un succès. Cette technique a en effet fait la preuve de son intérêt en termes d'amélioration de la qualité de vie (Benhamou, Milliat-Guittard et al. 2009), une réduction de la variabilité glycémique (Kessler, Passemard et al. 2002) et de diminution du risque d'hypoglycémie sévères chez 90% des patients greffés à 5 ans (Barton, Rickels et al. 2012). En effet la disparition des hypoglycémies est observée avec une fonction partielle du greffon, et une fonction optimale du greffon permettant la normalisation de l'équilibre glycémique (Vantyghem, Raverdy et al. 2012) . Ainsi, lorsque la fonction du greffon est bonne, la greffe

d'îlots allogénique permet de restaurer une sécrétion d'insuline endogène et régule ainsi un équilibre glycémique quasi physiologique.

Des données similaires ont été rapportées chez les patients urémiques bénéficiant d'une greffe d'îlots, soit simultanée soit différée après greffe de rein. Les données d'une étude prospective du groupe GRAGIL (Groupe Rhin-Rhône-Alpes-Genève pour la transplantation des îlots de Langerhans). Sur 44 patients ayant reçu une transplantation d'îlots (24 patients transplantés d'îlots seule [ITA] et 20 patients transplantés îlot après rein [IAK]), à 1 ; 4 et 5 ans après la greffe d'îlots, un taux d'HbA1c < 7% en absence d'hypoglycémie sévère était observée respectivement chez 83%, 67% et 58% des receveurs de l'ITA et 80%, 70% et 60% des receveurs de greffe d'IAK. Une amélioration métabolique de la fonction des ilots greffés chez 91% des patients à 12 mois post greffe et chez 75%, 74% ont gardé une greffe d'îlots fonctionnelle 48 et 60 mois post-greffe représenter par un β score ≥ 3. 75 % ont présenté une indépendance à l'insuline pendant toute la période de suivi, avec une durée médiane de 19.25 mois (Lablanche, Borot et al. 2015). En 2016, le Clinical islet transplantation consortium (CITC) reporte les résultats de leur étude clinique de phase 3 muticentrique, à bras unique démontrant l'efficacité de la transplantation d'îlots pour prévenir les hypoglycémies sévères chez 48 patients DT1 (Hering, Clarke et al. 2016). Dans cette étude, 365 jours après la greffe d'îlots, 87,5 % des patients présentaient un bon équilibre glycémique (HbA1C < 7%) sans évènements hypoglycémiques sévères recensés et 52,1% était insulino-indépendants. 94% des receveurs avaient un C-peptide supérieur à 0,3 ng/ml témoignant de la fonctionnalité du greffon. A 730 jours, 42% des receveurs étaient encore insulino-indépendants. En mars 2018, le CITC a montré à partir de la même cohorte de patients, le bénéfice de la transplantation d'îlots sur l'amélioration de la qualité de vie des patients (Foster, Bridges et al. 2018). A partir de quatre questionnaires (Diabetes Distress Scale (DDS), Hypoglycemic Fear Survey (HFS), Short Form 36 Health Survey (SF-36), the EuroQoL 5 Dimensions (EQ-5D)), soumis aux patients avant transplantation puis régulièrement au cours de l'année suivant la transplantation, ils ont mis en évidence une amélioration statistique et croissante de la qualité de vie des patients.

La première étude clinique randomisée, en groupe parallèle TRIMECO, a permis d'évaluer l'efficacité de la transplantation d'îlots par rapport à un protocole d'insulinothérapie intensive (Lablanche, Vantyghem et al. 2018). 84% des patients greffés d'îlots présentaient un HbA1c < 7% sans évènements hypoglycémiques sévères durant les 6 mois qui ont suivi la greffe. En revanche, aucun patient sous insulinothérapie intensive n'a atteint ces valeurs

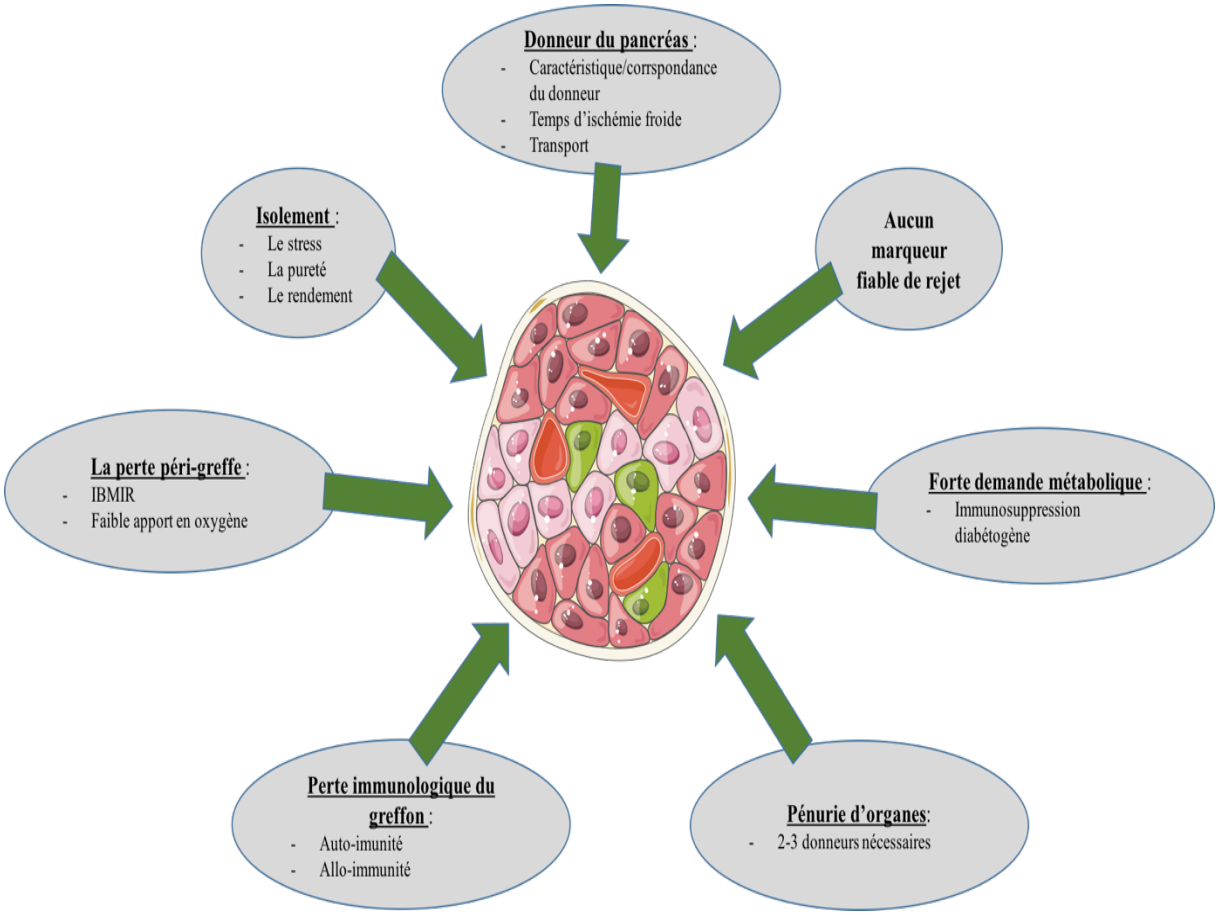


Figure 27: Les facteurs affectant les résultats de la transplantation d'îlots pancréatiques.

d'Hb1Ac sans hypoglycémie sévère. A 6 mois, 44 % des patients transplantés étaient insulino-indépendants. La qualité de vie des patients, évaluée par questionnaire, était significativement améliorée chez les patients transplantés par rapport aux patients sous insulinothérapie intensive.

L'ensemble de ces données indiquent un intérêt majeur pour l'allo-transplantation d'îlots en tant que thérapie prouvée et prometteuse pour la prise en charge des formes les plus sévères de DT1.

VI.1.2.2.1.f Les limites de la transplantation d'îlots pancréatiques

La greffe d'îlots pancréatiques présente des limites rencontrées aux différentes phases de la greffe :

- En pré-greffe : la source restreinte et la variabilité des organes, ainsi que le processus d'isolement, le rendement et la qualité des îlots greffés apparaissent comme des contraintes

- En péri-greffe, l'hypoxie des cellules béta et l'apparition d'une intense réaction inflammatoire (IBMIR, instant blood-mediated inflammatory reaction) (Olsson, Olerud et al. 2011, Kanak and Takita 2014) représentent des conditions de stress cellulaire majeur. À ces difficultés s'ajoutent, l'impact du site d'implantation et de la revascularisation des îlots sur la leurs fonctions.

- Enfin, les épisodes de rejets et la dysfonction chronique du greffon en absence de marqueurs précoces de la perte des îlots sont au premier plan des contraintes post-greffe (Figure 27).

i. Pénurie des dons

Dans la procédure de transplantation intra-portale, les îlots s'implantent dans les sinusoïdes hépatiques. Si les nombreux progrès de cette voie d'administration permettent aujourd'hui à la majorité des receveurs d'interrompre leur traitement par insuline la première année post-transplantation, le taux d'insulinodépendance n'est plus que de l'ordre de 60% à 3 ans et 20% à 5 ans dans de nombreuses équipes. La perte cellulaire est donc majeure.

Le rendement limité et hautement variable d'un isolement à l'autre reste donc un obstacle majeur (Hubert, Strecker et al. 2008)Dans de nombreux cas, le regroupement de plusieurs donneurs en état de mort encéphalique dont le nombre est limité, est nécessaire pour obtenir un nombre suffisant d'îlots (10 000 IEQ/kg) (Croon, Karlsson et al. 2003). D'autre part, le coût d'une telle thérapie est très élevé : une transplantation d'îlots en France ou en Suisse et le

suivi post greffe à un an sont estimés à 78 000 € par patient (Lablanche, David-Tchouda et al. 2017).

En tant que tel, il est impératif que des recherches intensives continuent à identifier des sources alternatives et rentables de cellules productrices d'insuline, telles que les îlots porcins (Ulrichs, Hamelmann et al. 1999) et les cellules souches différenciées en cellule beta sécrétrices (cellules souches mésenchymateuses, cellules souches embryonnaires, cellules souches pluripotentes induites) (Bruns, Schultze et al. 2013).

Ces sources de cellules alternatives pourraient répondre à la problématique du nombre d'organes transplantables disponibles et aux problématiques de coût. Cependant, cette stratégie sera soumise à des contraintes réglementaires. L'utilisation de sources alternatives de cellules nécessitera notamment leur confinement dans un site de transplantation permettant leur surveillance et leur retrait en cas de besoin (Baidal, Ricordi et al. 2017).

ii. Hypoxie revascularisation des îlots

Comme rappelé précédemment, les îlots sont richement vascularisés à l'état physiologique. Ils concentrent 10 à 20% du flux sanguin total du pancréas alors qu'ils ne représentent que 1% de la masse pancréatique totale (Menger, Vajkoczy et al. 1994) . Les cellules bêta présentent une vulnérabilité élective à l'apoptose induite par l'ischémie déclenchée par les processus d'isolement, de préparation et de réimplantation des îlots (Lablanche, Cottet-Rousselle et al. 2015). La survie et la fonction des îlots reposent en grande partie sur la rapidité et la qualité de leur revascularisation. Toutefois, après reperfusion, bien que dans la transplantation par voie portale, les îlots s'implantent dans un organe richement vascularisé, les cellules localisées dans la partie centrale de l'îlot et plus précisément des cellules β sont insuffisamment oxygénées, et fréquemment sujettes à l'hypoxie (Suszynski and Avgoustiniatos 2016).

En raison de cette faible revascularisation, les îlots sont soumis à une hypoxie persistante durant une durée minimale d'un mois (Carlsson 2011), une évaluation par incorporation de pimonidazole a ainsi montré que 70% des îlots sont hypoxiques le lendemain de la greffe. Le pimonidazole permet de créer des liaisons covalentes avec les cellules hypoxiques sous 10 mm de Hg. Cette faible revascularisation semble s'améliorer avec le temps avec une diminution de l'incorporation du pimonidazole à 3 mois et un taux d'apoptose alors équivalent au pancréas natif (Olsson, Olerud et al. 2011).

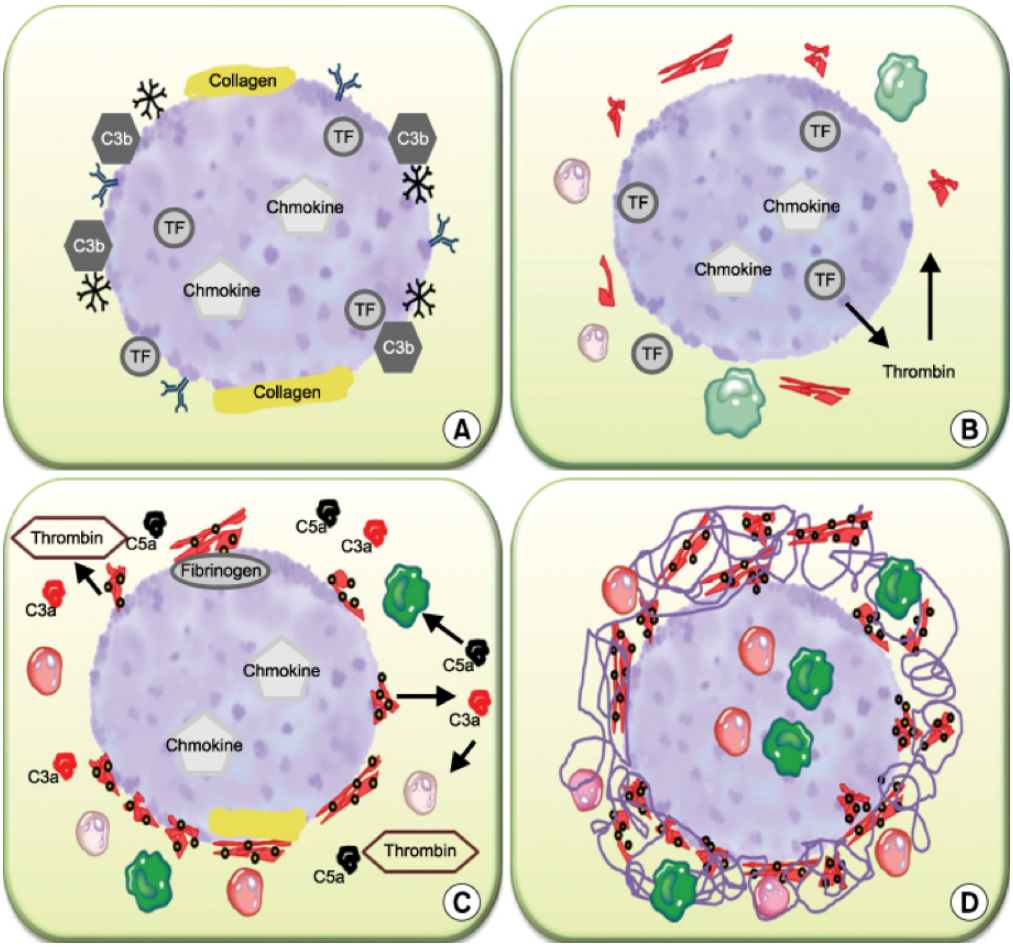


Figure 28 : Les différentes étapes de l'IBMIR. D'après (Nilsson, Ekdahl et al. 2011)

(A) Lorsque les îlots sont exposés au sang, le facteur tissulaire s'expose à la surface des îlots et induit l'activation du système de complément. Cela conduit alors au dépôt de C3b / iC3b sur la surface. (B) Ces derniers processus activent le système de coagulation, qui est suivi du clivage de la prothrombine en thrombine. La thrombine génère ensuite de la fibrine et active les plaquettes. (C) L'activation des plaquettes augmente l'affinité des intégrines GPIIb-IIIa et a2b1 pour la fibrine et le collagène, respectivement. Les plaquettes activées se lient à la fibrine et au collagène sur la surface des îlots. (D) Amplifiées par les plaquettes, la thrombine génère plus de fibrine en créant une capsule contenant des plaquettes, des neutrophiles et des monocytes entourant les îlots. Les facteurs chimiotactiques (p. Ex., C5a et IL-8) qui ont été libérés à la suite d'IBMIR ou libérés directement des îlots (p. Ex. MCP-1, IL-8, etc.) exercent leur action sur les neutrophiles et les monocytes qui infiltrent les îlots en grand nombre après 30 minutes.

Les îlots tentent de favoriser leur revascularisation en sécrétant des médiateurs régulant l'angiogenèse et notamment le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et l'angiopoïétine-1, qui permettent d'accélérer la revascularisation par recrutement des CE du receveur au site de transplantation (Vasir, Reitz et al. 2000). Cependant, la mise en culture des îlots avant transplantation diminue la proportion des CE intra-insulaires du donneur. Molnar et ces collaborateurs ont montré que la transplantation d'îlots immédiatement après l'isolement améliore la revascularisation en réduisant l'hypoxie (Molnar, Essand et al. 2013).

Le phénomène de néo-vascularisation du greffon, différée et imparfaite est à l'origine de phénomène d'ischémie-reperfusion et d'hypoxie chronique impactant la viabilité du greffon à long terme (Lau and Carlsson 2009).

iii. L'IBMIR : une réaction inflammatoire

Le processus inflammatoire est un mécanisme complexe de défense et d'adaptation physiologique faisant intervenir le système immunitaire inné et adaptatif et des médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines et les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

La réponse inflammatoire est une des causes de détérioration précoce des îlots au cours de la transplantation. Durant l'ensemble des étapes de prélèvement jusqu'à l'implantation chez le receveur, les îlots sont soumis à un enchaînement de réponses inflammatoires délétères pour leur viabilité et leur fonctionnalité. Les premiers dommages liés à une inflammation ont lieu avant le prélèvement chez le donneur au cours de l'inflammation médiée par l'état de mort cérébrale (Contreras, Eckstein et al. 2003). Celle-ci induit une « tempête cytokinique » avec une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes.

La procédure d'isolement est elle-même génératrice d'un stress inflammatoire chronique sur le pancréas (Negi, Jetha et al. 2012). Au cours de la transplantation, les îlots sont exposés à un mécanisme complexe : l'instant blood-mediated inflammatory reaction» (IBMIR) (Kanak and Takita 2014) (Figure 28).

Cette réaction est déclenchée lors du contact direct entre les îlots et le sang portal via la sécrétion de FT (Johansson, Lukinius et al. 2005) et des cytokines par les îlots qui vont activer plusieurs composantes de l'IBMIR :

- Activation de la cascade de la coagulation par la formation des complexes thrombine/ anti-thrombine et la génération de caillots de fibrine (Naziruddin, Iwahashi et al. 2014).

- Activation du système du complément contribuant au recrutement des leucocytes polynucléaires (PNN), l'augmentation de molécules d'adhésion de l'endothélium et des plaquettes, la génération de ROS et de cytokines pro-inflammatoires
- Sécrétion de chimiokines par les îlots telles que : le monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), la chemokine C-X-C motif ligand 8 (CXCL8), et la chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2) (Tan and Zhou 2005).
- L'infiltration des leucocytes et des macrophages qui libérent des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-1β, TNFα et IFNγ) initie l'apoptose des cellules des îlots

Une fois les îlots implantés, l'exposition inflammatoire se poursuit, les macrophages, les cellules de Kuppfer et les neutrophiles résidents des îlots sécrètent de l'IL-1β, altérant ainsi la sécrétion d'insuline et induisant l'apoptose des cellules d'îlots par plusieurs mécanismes moléculaires : l'activation des voies majeures de régulation des mécanismes pro-apoptotiques : nuclear factor-kappa B (NF-κB) (Burke, Stadler et al. 2015) et Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) (Moore, Naamane et al. 2011).

Enfin les différentes sources de stress durant la transplantation et l'ensemble de ces actions cellulaires conduisent à l'émission des MVs pro-coagulantes de tissu et de cellule vasculaire contribuant à l'exacerbation de l'inflammation.

iv. L'immunosuppression

L'immunosuppression est un traitement indispensable pour prévenir les rejets immunologiques d'allogreffes chez les patients DT1 transplantés d'îlots de Langerhans. Les premiers protocoles d'immunosuppression incluaient de l'azathioprine, de la ciclosporine et des corticoïdes diabétogénes et toxiques pour les îlots (Drachenberg, Klassen et al. 1999). En 2000, l'équipe d'Edmonton a été la première à décrire un taux de succès remarquable à 1 an en utilisant un cocktail d'immunosuppresseurs excluant les corticoïdes, et la déplétion des lymphocytes T par l'intermédiaire de l'IL-2 avec comme traitement d'induction par le daclizumab ou le basiliximab (anticorps des récepteur d'IL-2) et une immunosuppression d'entretien en combinant de forte dose de Sirolimus (cible la protéine mTOR qui inhibe la réponse à l'IL-2) et de faible dose de Tacrolimus (inhibiteur de la calcineurine bloquant la production de l'IL-2) (Shapiro, Lakey et al. 2000). Ce protocole a largement contribué à développer cette thérapeutique puisque ces agents d'induction ont été bien tolérés et ont des effets indésirables minimes. Cependant la nécessité de mettre en route une immunosuppression plus puissante a été proposée par différentes équipes.

La thymoglobuline (également connue sous le nom de globuline antithymocyte de lapin ou ATG) a été promue par Hering et ses collègues en association avec l'étanercept (inhibiteur de TNFα) (Bellin, Kandaswamy et al. 2008). Depuis lors, le même groupe a signalé que le traitement initial de déplétion des lymphocytes T avait un effet positif considérable sur l'indépendance à long terme de l'insuline, quel que soit le choix de l'immunosuppression d'entretien (Bellin, Barton et al. 2012).

Le groupe d'Edmonton a favorisé la déplétion en lymphocytes T avec l'alemtuzumab (un anticorps anti-CD52) sur la base de son activité, de sa tolérabilité, de son effet durable et de son coût. Ce groupe a constaté que l'induction de l'alemtuzumab et de l'étanercept associée au tacrolimus d'entretien et au mycophénolate mofétil (Inhibiteur de l'Inosine monophosphate déshydrogénase : une enzyme qui intervient dans la fabrication d'un des constituants de l'ADN : la guanine dont les lymphocytes T et B dépendent davantage) était bien tolérée et associée à un taux d'indépendance d'insuline beaucoup plus élevé après transplantation d'îlots à cinq ans que l'anticorps utilisé dans la série initiale du protocole (Senior, Kin et al. 2012).

Cependant, ces traitements immunosuppresseurs sont pourvoyeur d'effets indésirables tels que : la toxicité rénale pour le tacrolimus (Bechstein 2000) . De plus, le tacrolimus inhibe la sécrétion d'insuline par les îlots humains et est diabétogène (Rangel 2014) . Les thérapies anti-rejet alternatives sont malheureusement moins puissantes que le tacrolimus et ont également leurs propres effets indésirables (Chatenoud 2008).

La nécessité de recourir au traitement antirejet constitue un obstacle majeur à l'extension de la transplantation d'îlots à l'ensemble des patients DT1. Une nouvelle approche d'encapsulation d'îlots est en cours de développement. Cette approche réduit le besoin d'un traitement immunosuppresseur en protégeant les îlots des attaques immunitaires et maintient la fonction du greffon en permettant le passage des nutriments nécessaires et de l'oxygène (Skrzypek, Nibbelink et al. 2018) .

VI.1.2.2.1.g Contraintes majeures en greffe d'îlot : l'absence de marqueur précoce de la perte d'îlots fonctionnels

Les résultats cliniques à long terme de la transplantation d'îlots sont entravés par le rejet et la récurrence de l'auto-immunité, qui peut concourir à la perte de la masse fonctionnelle des îlots après la transplantation. Une stratégie de surveillance spécifique et précise, mesurable et reproductible pourrait permettre de détecter et de traiter des événements immunitaires nocifs, ce qui améliorait significativement les résultats de la transplantation d'îlots.

Actuellement, il n'existe pas de marqueur précoce, non invasif, cliniquement fiable de suivi de la dysfonction des îlots pancréatiques greffés, permettant d'identifier la cause de la perte des îlots.

En effet, les tests actuels ne permettent pas de distinguer le dysfonctionnement métabolique des îlots dû à la surcharge métabolique, à la toxicité du médicament ou à l'immunité (rejet ou auto-immunité). Ainsi, le développement de biomarqueurs non invasifs pour la détection précoce et la discrimination entre le dysfonctionnement des îlots, le stress et les événements à médiation immunitaire est grandement nécessaire (Abreu and Roep 2013). Différents marqueurs ont été proposés :

I Marqueurs permettant d'identifier le suivi et la perte précoce de la masse bêta-insulaire

I.a) Approche par imagerie

Par la localisation des îlots dans le foie, le développement de l'imagerie pourrait apporter une solution non invasive, non toxique pour les îlots et de routine au monitoring des îlots. A l'heure actuelle, les techniques d'imagerie par résonnance magnétique (MRI : magnetic resonance imaging) et tomographie par émission de positrons (PET : positron emission tomography) utilisent des îlots marqués avec un traceur paramagnétique avant la perfusion afin d'augmenter le contraste du signal.

Les obstacles majeurs rencontrés par ces techniques sont liés au type de traceur utilisé non spécifique, à leur capture par les îlots, à leur absorption et métabolisme hépatique entrainant un « bruit de fond », limitant ainsi le monitoring à long terme des îlots (Eriksson and Alavi 2012).

I.b) Marqueurs circulants de la fonction du greffon

Les variations des marqueurs sanguins de la fonction du greffon, principalement le C-peptide, ne sont observables que tardivement lorsque que 95% du greffon est détruit (Johansson, Lukinius et al. 2005). Ceci reflète une perte de masse substantielle des îlots, rendant les interventions de sauvetage moins efficaces pour restaurer la compétence fonctionnelle. À noter que la surveillance du C-peptide nécessite une mesure simultanée de la glycémie et doit être interprétée en fonction du contexte (insuffisance rénale).

I.c) Marqueurs cellulaires de la fonction du greffon

Les biomarqueurs cellulaires ont le potentiel de permettre une surveillance avant et après transplantation pour une détection plus précoce et plus fiable des événements nocifs. Les recherches portent sur le développement de marqueurs de suivi de la masse et de la fonction β insulaire.

Plusieurs protéines spécifiques aux îlots telles que la glutamate décarboxylase-65, la doublecortine, la protéine phosphatase 1, la sous-unité régulatrice 1A, l'ubiquitine C-terminale hydrolase-L1 et la protéine HMBG1 (High-mobility group protein B1) ont été proposées comme marqueurs de dommage des îlots, mais ces biomarqueurs ont des demi-vies courtes et une détection peu fiable (Chang, Haque et al. 2016)

Une étude clinique très récente chez des patients recevant une autogreffe d'îlots après pancréatectomie totale a montré une augmentation importante du taux circulant de l'ADN d'insuline non méthylé en peri-transplantation et 24h après la greffe. On ne retrouve pas une telle augmentation dans le groupe pancréatectomies seules (Bellin, Clark et al. 2017).

De manière intéressante, chez 30% des patients, les ratios élevés persistants d'ADN d'insuline non méthylés / ADN total au jour 90 étaient associés aux hyperglycémies (Walters, Luzuriaga et al. 2013). L'ADN d'insuline non méthylé a été documenté comme un biomarqueur hautement corrélé et sélectif de la destruction des cellules bêta. Une étude plus approfondie est justifiée pour déterminer son utilité clinique au tant que marqueur de suivi de la fonction β insulaire.

Plus récemment, les microARN (miARN) qui sont exprimés sélectivement dans les îlots ont été utilisés pour fournir une quantification sensible et précise de l'endommagement des îlots. L'analyse d'échantillons de plasma de patients transplantés d'îlots autologues et allogéniques a démontré l'intérêt du miRNA-375 en tant que biomarqueur spécifique pour évaluer l'endommagement des îlots (Kanak, Takita et al. 2015) (Yoshimatsu, Takita et al. 2016). Ainsi, Roat et ses collaborateurs ont montrés dans un modèle de transplantation des cellules β humaines dans des souris que les miRNA-375 circulants étés associés à la perte précoce des cellules β une semaine avant l'hyperglycémie et qu'ils peuvent être utilisés comme biomarqueurs pour le suivi des greffes d'îlots humains (Roat, Hossain et al. 2017).
De la même manière, la détection de l'ARNm de l'insuline dans le sang est mis en relation avec de la dysfonction du greffon (Ritz-Laser, Oberholzer et al. 2002, Berney, Mamin et al. 2006) mais ne permet pas d'identifier la cause de la perte de fonction.

II Marqueurs identifiant la cause du dyfonctionnement des cellules bêta-insulaire

II.a) Approche par imagerie

La biopsie est la méthode la plus couramment utilisée dans la cadre du suivi et de l'identification de la cause de perte du greffon d'organe. Or dans le cas de la greffe d'îlots, la biopsie hépatique est peu informative et aléatoire du fait de la dispersion des îlots embolisés dans les capillaires vasculaires hépatiques, seulement environ 30% des biopsies à l'aiguille peuvent visualiser les îlots greffés (Toso, Isse et al. 2009).

II.b) Marqueurs circulants d'identification de la cause de la perte de fonction

Les marqueurs de substitution de l'allo et de l'auto-immunité sont utilisés pour évaluer la réponse immunitaire adaptative des receveurs de greffe d'îlots (Lacotte, Berney et al. 2011). La plupart des tests actuels basés sur l'évaluation des anticorps allo et auto-immuns pour une surveillance immunitaire en pratique clinique sont débattus (Tatum, Meneveau et al. 2017).

Bien que les auto-anticorps jouent un rôle dans la pathogenèse initiale de la maladie, la présence de ces autoanticorps avant la transplantation soit peu prédictive de la perte de greffe (Hilbrands, Huurman et al. 2009). L'activation de ces voies auto-immunes après la transplantation est associée à une perte de greffe et à un échec éventuel (Bosi, Braghi et al. 2001). Piemonti et ses collaborateurs ont montré qu'une augmentation statistiquement significative des autoanticorps anti-GAD ou anti-A2 entraînait une augmentation significative du risque d'échec par rapport à ceux sans augmentation avec un risque relatif d'échec de la greffe de 5,3 (Piemonti, Everly et al. 2013). Les auto-anticorps sont considérés au mieux comme un marqueur de l'activité auto-immune, mais non comme un indicateur de lésions auto-immune de la greffe d'îlots. Ils seraient la conséquence d'une réponse cellulaire pathogène favorisant leur expansion (Huurman, Hilbrands et al. 2008).

La surveillance des anticorps anti-HLA est particulièrement importante avant la transplantation d'îlots (Campbell, Salam et al. 2007) et prédicteur négatif du résultat de la transplantation d'îlots. Dans une grande cohorte de 303 receveurs de transplantation d'îlots, la sensibilisation au HLA de classe I était associée à une fonction significativement moins bonne du greffon des îlots par rapport aux patients sans sensibilisation (Naziruddin, Wease et al. 2012). Les augmentations de DSA (allo-anticorps spécifique au donneur) après la transplantation d'îlots sont des marqueurs pronostiques importants, et leur identification pourrait aider à ajuster le niveau d'immunosuppression post-transplantation et potentiellement conduire à une amélioration des résultats de la greffe d'îlots (Piemonti, Everly et al. 2013). En

effet, kessler et ses collaborateurs ont montré une augmenté d'anticorps anti-HLA de classe II au cours des 6 mois précédant la détérioration clinique et une récupération de la fonction des îlots après traitement par Rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20 et des immunoglobulines IV (Kessler, Parissiadis et al. 2009).

Cependant, d'autres rapports ont indiqué que la présence de DSA avant la greffe et le développement de novo DSA après la transplantation n'étaient pas associés à une réduction de la survie du greffon et à une réduction de la fonction du greffon (Chaigne, Geneugelijk et al. 2016). Aucun DSA détecté ne lie la fraction de complément C3d (Pouliquen, Baltzinger et al. 2017), la présence de DSA ne semble pas affecter négativement la survie des greffes d'îlots pancréatiques. Cela pourrait être dû aux caractéristiques spécifiques des IgG limitant leur capacité à activer le complément ou à l'absence de cibles endothéliales allogéniques dans les les îlots pancréatiques.

II.c) Marqueurs cellulaires de l'état du greffon

Dans une étude pilote de 13 patients receveurs d'allogreffes d'îlots humains, l'identification de la réponse immune par dosage de l'ARNm de lymphocytes cytotoxiques circulantes par RT-PCR en temps réel était indicatif et précèdent les signes cliniques de rejet (Han, Xu et al. 2004) . La principale limitation du test est son manque de spécificité pour le dysfonctionnement des îlots, car tout événement immunitaire non apparenté (infection ou inflammation) peut également augmenter ce marqueur. Il a donc été suggéré de combiner ce test avec un marqueur circulant de la cellule bêta-insulaire. Ces approches doivent encore être validées.

Ces résultats montrent le besoin réel d'un biomarqueur spécifique, sensible, mesurable et reproductible pour une détection précoce du dysfonctionnement des îlots. L'identification de la cause de la dysfonction du greffon nécessite le développement de biomarqueur spécifique de l'origine cellulaire de l'agression insulaire (lymphocyte T pour le rejet cellulaire, lymphocyte B pour le rejet humoral) afin d'établir un score biologique permettant de discriminer les causes de la dysfonction du greffon, dans le but d'élaborer des stratégies de traitement visant à améliorer l'efficacité de la greffe.

Hypothèses et objectifs

Les MVs circulantes ont d'abord été caractérisées comme des biomarqueurs de risque primaire et secondaire d'accident thrombotique, parce qu'elles sont pro-coagulantes de part l'exposition de la phosphatidylsérine et éventuellement de facteur tissulaire à leur surface. Elles circulent également à taux élevé dans les pathologies de type inflammatoire ou dégénératif comme le diabète (Morel, Jesel et al. 2011), et se comportent comme des effecteurs pro-inflammatoires du synoviocyte (Messer, Alsaleh et al. 2009), de la cellule sécrétrice d'insuline (Gleizes, Kreutter et al. 2016) (Kreutter, Kassem et al. 2017), de la cellule endothéliale et dans les deux derniers cas induisent l'expression du facteur tissulaire (Abbas, Jesel et al. 2017).

Si l'implication des MVs dans l'homéostasie vasculaire est démontrée par le syndrome hémorragique de Scott (Toti, Satta et al. 1996), très peu de données sont disponibles sur les MVs tissulaires. Quelques publications rapportent les propriétés effectrices de MVs d'origine leucocytaire dans le tissu hépatique (Witek, Yang et al. 2009, Rautou, Vion et al. 2014), d'autres indiquent que les MVs sont également des indicateurs de défaillance d'organe et de la sévérité de la maladie avec une morbi-mortalité associée à la présence des MVs circulantes (Boisrame-Helms, Delabranche et al. 2014) (Bakouboula, Morel et al. 2008).

Dans le sang, les MVs constituent donc un réservoir dynamique qui reflète l'homéostasie vasculaire mais aussi l'atteinte d'un organe ou d'un tissu pathologique comme la plaque d'athérome.

La transplantation est une situation physiopathologique particulière du carrefour de la réponse vasculaire et tissulaire. Les MVs spécifiques de l'organe défaillant éventuellement déversées dans la circulation systémique sont d'éventuels marqueurs de l'homéostasie tissulaire, mais aussi la signature d'une réponse immune et/ou thrombotique associée soit à l'ischémie reperfusion soit au rejet ou à la dysfonction de l'organe qu'il s'agisse du cœur, du rein ou des îlots et cellules souches.

Dans le contexte de la transplantation d'îlots pancréatiques et puisque la biopsie est non informative, la caractérisation de l'origine des MVs circulantes aurait un intérêt pour le monitoring. Ainsi, les données les plus récentes du laboratoire montrent une concentration élevée de MVs circulantes lors de la perte de fonction du greffon, susceptible d'indiquer un éventuel rejet cellulaire puisque les taux de MVs circulant se normalisent après traitement corticoïde chez le patient transplanté (Toti, Bayle et al. 2011, Moreau, Toti et al. 2012).

Très peu de données sur la capacité des tissus à émettre des MVs selon l'état physiopathologique ou les modifications de leurs propriétés effectrices sont disponibles. Pourtant, ces informations seraient utiles pour définir de nouvelles approches thérapeutiques

ciblant les MVs en tant que marqueurs pathogènes d'une atteinte tissulaire susceptible d'accélérer la dysfonction d'organe. Ces approches seraient notamment bénéfiques pour la protection du tissu sain en limitant les propriétés délétères des MVs ou leur libération.

Nous faisons l'hypothèse que les MVs sont à la fois un indicateur de la fonction de l'organe, et des effecteurs cellulaires délétères amplifiant la dysfonction d'organe. De se fait, les différentes propriétés des MVs tissulaires et les interactions entre pools circulant et tissulaire de MV seraient des éléments pour le suivi thérapeutique des patients.

Les deux hypothèses retenues dans le cadre d'un doctorat de recherche clinique et expérimentale sont :

- Les MVs circulantes sont un outil de suivi précoce et non invasif de la dysfonction du greffon en greffe d'îlots pancréatiques et un marqueur prédictif de l'efficacité thérapeutique dans la prévention du développement de la plaque l'athérome.
- Les MVs de la plaque d'athérome et des vaisseaux sont un marqueur du degré de dommage vasculaire physiologique (vieillissement) ou pathologique (athérome) et un outil d'évaluation de l'efficacité thérapeutique de molécules protectrices du tissu vasculaire.

Les objectifs sont :

- L'étude des variations des concentrations des MVs circulantes, qu'elles soient d'origine pancréatique (greffon) ou vasculaire (hôte), la caractérisation de leurs propriétés et l'évaluation de leur valeur pronostique pour le suivi de la perte des cellules β chez les greffés d'îlots en état de rejet. Cette étude pilote a été réalisée chez 19 patients de la cohorte MIPIL établie au service d'endocrinologie de Strasbourg (Pr L. Kessler).
- L'étude comparative des MVs circulantes et accumulées dans les tissus athéromateux de patients présentant une sténose carotidienne asymptomatique et traités par une formulation optimisée d'oméga 3 : EPA : DHA (6 :1) (Vascazen™). Cette étude est réalisée dans la cohorte POMEGA établie dans le service de chirurgie cardio-vasculaire au CHU de Strasbourg (Dr Y. Georg et N. Chakfe).
- L'étude des mécanismes de libération de MVs par les tissus aortiques dans un modèle de rats Wistar âgés et traités par différentes formulations d'acides gras EPA : DHA (6 :1).

Travaux personnels

Partie I

Interét des MVs circulantes pour la détection précoce de la dysfonction du greffon chez les patients diabétiques de type 1 transplantés d'ilots et ulilités pour l'identification de la cause de la perte de fonction du greffon

I. Justification /contexte

La greffe intraportale transhépatique percutanée d'îlots pancréatiques permet de restaurer chez 80 % des patients une sécrétion endogène d'insuline prolongée avec un contrôle métabolique optimal à un an mais seulement 44% de ces patients restent insulino-indépendants trois ans après transplantation (CIRT 2016 Dec). La nécessité de reprendre progressivement le traitement insulinique témoigne de la perte progressive de la capacité fonctionnelle des îlots transplantés. Actuellement, il n'existe pas de marqueur précoce cliniquement fiable de suivi de la masse insulaire ni de rejet des cellules greffées ou du tissu hôte (foie) puisque la biopsie hépatique est peu informative du fait de la dispersion des îlots embolisés dans le réseau vasculaire hépatique (Toso, Isse et al. 2009). De plus, les variations des marqueurs sanguins de la fonction du greffon, comme le C-peptide, ne sont observables que tardivement lorsque que 95% du greffon est détruit (Johansson, Lukinius et al. 2005).

Différents marqueurs circulants de suivi de la masse et de la fonction béta-insulaire ont été proposés. Le dosage de l'ARNm circulants de l'insuline des îlots est corrélé à la dysfonction du greffon mais n'identifie pas la cause de la perte de fonction (Berney, Mamin et al. 2006). Par ailleurs, la réaction allogénique est corrélée à l'ARNm de lymphocytes cytotoxiques mais pas avec la perte de fonction mesurée par le C-peptide (Han, Xu et al. 2004). Ces éléments soulignent le besoin d'un marqueur précoce de dysfonction et de cause de la perte du greffon pour une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents et une prise en charge thérapeutique optimisée.

Les travaux expérimentaux de l'équipe montrent dans un modèle cellulaire mimant la réaction IBMIR que les cellules β soumises au stress oxydant ou inflammatoire ont une capacité réduite de sécrétion d'insuline, parallèlement à une expression et une activité du facteur tissulaire (FT), l'initiateur cellulaire de la coagulation, fortement augmentées (Gleizes, Kreutter et al. 2016). Par ailleurs, la réponse des cellules β s'accompagne du remodelage de la membrane plasmique et de l'émission de microvésicules (MVs) par les cellules β (Gleizes, Constantinescu et al. 2014, Gleizes, Kreutter et al. 2016). Cette observation suggère l'intérêt des MVs de cellules β en tant que biomarqueurs circulants de l'atteinte de la masse insulaire greffée.

Parce que les MVs sont des marqueurs circulants d'atteinte cellulaire, potentiellement pathogènes pro-apoptotiques et pro-inflammatoires et prosénescents (Morel, Morel et al. 2011) (Abbas, Jesel et al. 2017), le profil des MVs circulantes apparait comme un éventuel indicateur

d'une atteinte cellulaire du greffon, qui généralement est exploré par le biais du dommage vasculaire associé à l'ischémie ou à la réaction inflammatoire (Morel, Ohlmann et al. 2008) (Al-Massarani, Vacher-Coponat et al. 2008) (Al-Massarani, Vacher-Coponat et al. 2009) (De Rop, Stadler et al. 2011). La plupart des études font état d'une possible valeur diagnostique d'une issue défavorable de la greffe mesurée par des concentrations circulantes élevées en MV endothéliales ou porteuses de FT. Cependant, les MVs n'ont pas été utilisées pour différencier rejet cellulaire ou humoral.

Dans une étude de cas clinique nous avons montré, chez 3 patients DT1 transplantés d'îlots pancréatiques, un pic de MVs procoagulantes circulantes, détectable le mois précédent la chute du C-peptide et la remontée des besoins en insuline (Toti, Bayle et al. 2011). Chez une autre patiente, la valeur de MVs se normalise après traitement corticoïde avec restauration du C-peptide et diminution des besoins en insuline (Moreau, Toti et al. 2012).

Les données, obtenues par la seule mesure des MVs totales sans identification de leur origine cellulaire sont très encourageantes. Bien qu'elles ne caractérisent pas la cause de la perte de fonction, elles indiquent que les MVs ont un intérêt en tant que marqueurs précoces et non invasifs de la perte du greffon. C'est pourquoi nous avons ensuite cherché à identifier des MVs circulantes originaires de la cellule β et nous sommes orientées vers la protéine membranaire PSA-NCAM. Cette protéine est un multipolymère (n=100) d'acide PolySialique (PSA) de la protéine NCAM (Neural cell adhesion molécule) qui contient des domaines structuraux de type immunoglobuline et fibronectine. Elle est largement exprimée par la surface des cellules β pancréatiques adultes et dans le système nerveux embryonnaire où elle favorise les interactions cellulaires dynamiques (Bonfanti 2006). Notre équipe a démontré par immunomarquage d'îlots de rats la co-localisation de PSA-NCAM avec les cellules β sécrétrices d'insuline (Kassem, Niazi et al. 2017). D'autres travaux ont montré que la co-localisation était caractéristique des cellules β sécrétrices de l'insuline de l'îlot (Karaca, Castel et al. 2009).

II. Objectifs et méthodologie

Le projet MIPIL propose d'évaluer comme critère principal le taux circulant de MV-PSA-NCAM$^+$ pour la détection précoce de la dysfonction du greffon chez les diabétiques greffés d'îlots, en considérant que les MV-PSA-NCAM$^+$ sont la signature circulante de l'atteinte des cellules endocrines. Pour caractériser la cause de la perte du greffon (rejet humoral, cellulaire), la sévérité et l'origine de l'atteinte tissulaire (hépatocytes, cellules pancréatiques), ou vasculaire (endothéliale, leucocytaire), les MVs circulantes porteuses de marqueurs spécifiques des leucocytes et du tissu hépatique sont retenues comme critère secondaire.

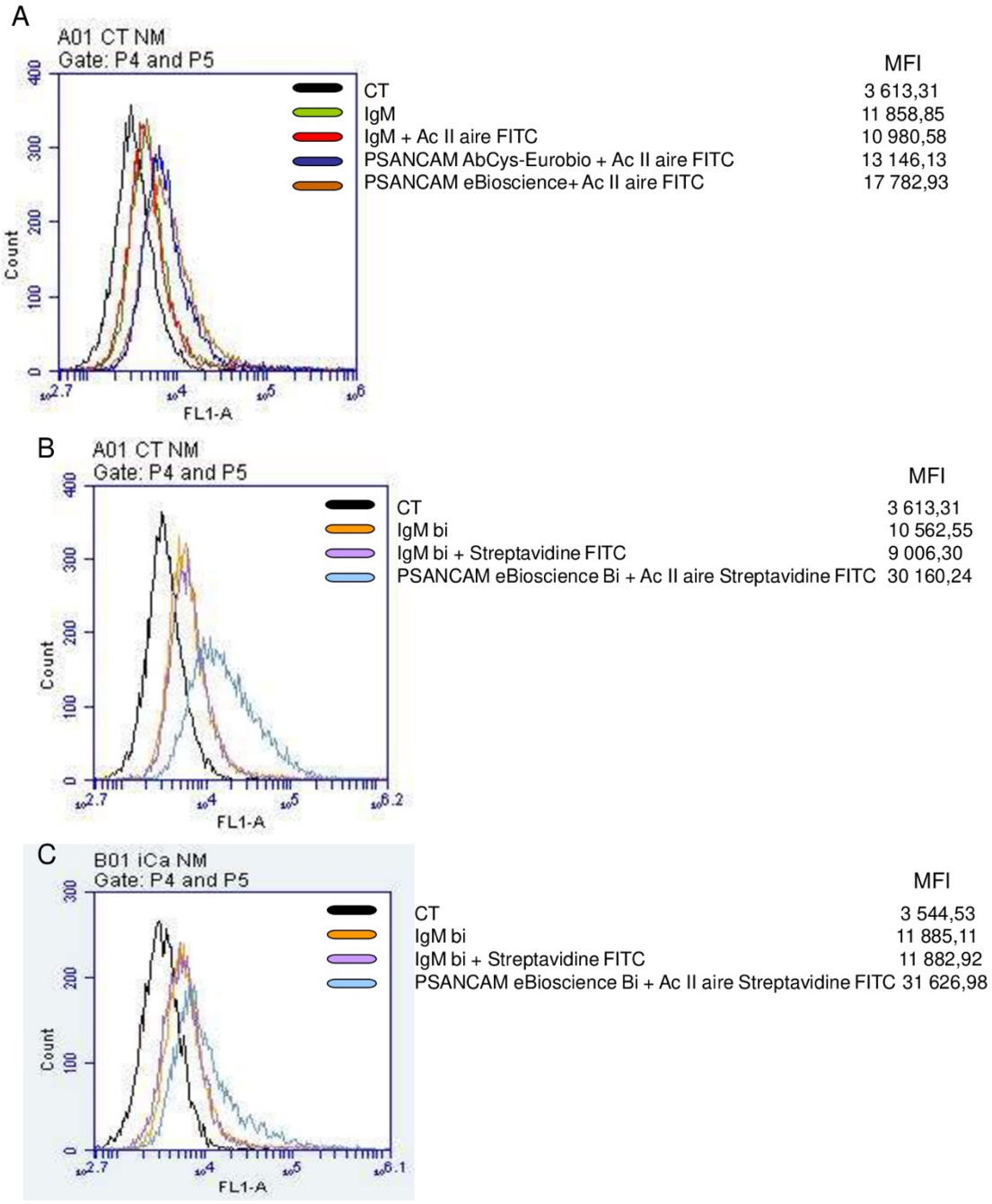


Figure 29 : Sélection des anticorps spécifiques de PSA-NCAM.

A : Cellules RIN m5F non stimulées marquées avec l'IgM anti PSA-NCAM AbCys (AbC0019, concentration protéique nominale : 1-3mg/mL) et eBioscience (14-9118, concentration nominale : 0,5mg/mL). Révélation par l'Ac II aire : Anti mouse IgM (Sigma mu chain specific-FITC, concentration protéique nominale : 1mg/ml)
B : Marquage à l'aide de l'anticorps eBioscience (14-9118 biotinylé au laboratoire, concentration 0,41mg/mL) révélé par la streptavidine FITC (Sigma S3762) de cellules RIN m5F non stimulées ou **C** : stimulées par le ionophore calcique A23189.

CT: cellules non marquées ;IgM : cellules marquées avec l'Ac I aire isotypique contrôle et / ou l'Ac IIaire FITC ; IgM bi : cellules marquées avec l'Ac I aire isotypique contrôle et l'Ac IIaire biotinylé puis Streptavidine FITC

En effet, le but ultime est d'établir un score biologique combinant les caractéristiques pertinentes des MVs pour discriminer chaque cause de la dysfonction du greffon.

Pour identifier les variations des MV-PSA-NCAM$^+$ circulantes, une mise au point d'un dosage ultrasensible a été nécessaire. Une étape préliminaire a consisté à sélectionner les outils moléculaires et à valider la méthode qui ensuite a été adaptée au dosage des MVs d'origine hépatocytaire (cf ci-dessous).

II.1 Sélection des anticorps anti PSA-NCAM

La sélection des anticorps anti PSA-NCAM a été réalisée par cytométrie en flux en comparant les moyennes de florescence obtenues avec l'anticorps primaire, une IgM biotinylée, révélée par la streptavidine fluorescente et une IgM non immune révélée de la même manière (Figure 29). Parce que les MVs sont libérées à partir de cellules stimulées, nous avons vérifié que le décalage de fluorescence entre contrôle isotopique et anticorps spécifique n'était pas significativement modifié après stimulation des cellules β de rat (RIN m5F) par le ionophore calcique A23189.

Un exemple des histogrammes de fluorescence obtenus avec différent anticorps anti PSA-NCAM est représenté ci-dessous. Le marquage est réalisé sur cellules fixées en para-formaldéhyde (PFA) 4% et conservées à 4°C. L'anticorps *anti PSA*-NCAM de eBioscience (Réf. : 14-9118) biotinylé au laboratoire a été retenu pour le dosage ultrasensible.

II.2 Validation de l'anticorps anti PSA-NCAM pour la capture des MVs

Les MVs ont été produites à partir de cellules à insuline RIN m5F stimulées pendant 24H avec par le ionophore calcique A23189 (1 µM), puis lavées par centrifugation 60 min à 12000g et reprise en HBSS sans Ca^{2+} et Mg^{2+} (Lonza, Ref : BE10-547F) (Figure 30).

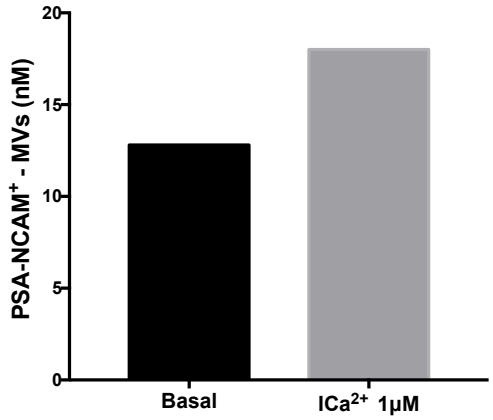


Figure 30: Dosage ultrasensible de MV-PSA-NCAM de cellules RIN m5F.

Basal : MVs de cellules non stimulées ; ICa^{2+} : MVs de cellules stimulées ; une seule production en triplicat.

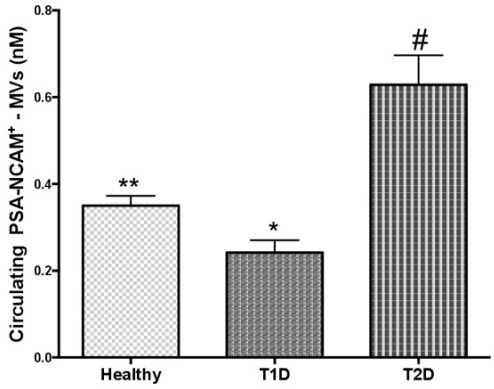
II.3 Validation du dosage des MVs PSA-NCAM+ en plasma

Parce que les MV-PSA-NCAM+ circulent en faible proportion dans le sang, leur détection dans le plasma par dosage ultrasensible, a nécessité l'adaptation des paramètres enzymatiques du dosage prothrombinase, notamment les durées d'incubation. La difficulté réside dans l'obtention d'un bruit de fond minimal, c'est-à-dire une capture faible des MVs par l'IgM isotypique contrôle insolubilisée, comparativement à l'IgM spécifique.

Le dosage ultrasensible actuel mesure des concentrations 10 fois inférieures à celles d'un dosage classique. (Hugel, Zobairi et al. 2004, Lacroix, Judicone et al. 2013)).

Des études préliminaires chez les patients DT1, DT2 et chez des volontaires sains montrent que les MV-PSA-NCAM+ circulent à des taux différents selon le type de diabète, les patients DT1 ayant un taux très inférieur aux DT2 (0,24 ± 0,03 nM *vs*. 0,51± 0,42 nM p<0,0001) et aux volontaires sains (0,24 ± 0,03 nM *vs*. 0,35 ± 0,02 nM, p<0,05) (Figure 31).

Figure 31: Valeurs moyennes des MV-PSA-NCAM+ circulants chez les patients diabétiques de type 1 ou de type 2 et chez les volontaires sains.



Les MV-PSA-NCAM+ ont été mesurées par dosage prothrombinase ultra-sensible après capture sur anti-corps PSA-NCAM.

** p <0,05 (DT1, N = 12 vs. sain, N = 7); # p <0,0001 (DT1, N= 12 vs. DT2, N = 7)*

II.4 Etude pilote MIPIL : Méthodes d'analyse

Dans l'étude pilote MIPIL, le dosage ultrasensible des MVs de cellules β et de cellules hépatocytaires a été appliqué à la recherche d'un biomarqueur de dysfonction du greffon chez 19 patients DT1 greffés d'îlots pancréatiques grâce à des prélèvements veineux réalisés prospectivement avant chaque greffe et 3, 6, 9,12, 24 et 36 mois post-dernière greffe. Le dosage prothrombinase standard (Hugel, Zobairi et al. 2004, Lacroix, Judicone et al. 2013) a été utilisé pour les autres MVs. L'ensemble des mesures a été confronté au β-score (Ryan, Paty et al. 2005).

Dans ce suivi longitudinal chaque patient à fait l'objet de 10-12 mesures pendant en moyenne 48 mois. Pour l'analyse des variations de MVs, les patients ont été affectés à 3 groupes : succès (S) (6≤β-score≤6, n=8), succès partiel (PS) (6>β-score>3, n=8), ou en échec (F) (β-score≤3, n=3) de greffe. Quatre types de valeurs de MVs ont été calculées :

- La valeur moyenne pré-greffe
- La moyenne des valeurs cumulées de chaque suivi longitudinal
- La valeur moyenne de la ligne de base post-greffe en excluant les pics
- La valeur moyenne du pic des MVs précédant la chute du β-score en excluant les valeurs basales

Par ailleurs, le temps entre le pic de MVs et la chute du β-score a été calculé pour chaque origine cellulaire des MVs, dans le but d'identifier une signature tissulaire de la dysfonction du greffon et les éventuelles contributions des cellules de l'immunité à un possible effet stochastique.

III. Article I : Interest of plasma microvesicles to monitor pancreatic islets graft dysfunction: beta cell- and leukocyte-derived microvesicles as specific features in a pilot longitudinal study.

En 2 éme révisions à American Journal of Transplantation

American Journal of Transplantation

Interest of plasma microvesicles to monitor pancreatic islet graft dysfunction: beta cell- and leukocyte-derived microvesicles as specific features in a pilot longitudinal study

Journal:	*American Journal of Transplantation*
Manuscript ID	AJT-O-18-01478.R2
Wiley - Manuscript type:	O - Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Amoura, Lamia; INSERM, UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg; CLINICA Group, Contract research organization Zobairi El-Ghazouani, Fatiha; INSERM, UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg Kassem, Mohamad; INSERM, UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg El Habhab, Ali; INSERM, UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg Kreutter, Guillaume; INSERM, UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg Sahraoui, Salah; CLINICA Group, Contract research organization Bosco, Domenico; Cell Isolation and Transplantation Center, Department of Surgery Jessel, Nadia; INSERM, UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, Faculty of Medicine, University of Strasbourg Berney, Thierry; Geneva University Hospitals, Department of Surgery Benhamou, Pierre-Yves; Department of Endocrinology, Diabetes, and Nutrition,Inserm U1055, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics , Grenoble Alpes University Toti, Florence; INSERM, UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg Kessler, Laurence; INSERM, UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg ; Department of Endocrinology, Diabetes and Nutrition , University Hospital
Keywords - Scope:	translational research / science, basic (laboratory) research / science
Keywords - Discipline:	islet transplantation, endocrinology / diabetology, cellular biology
Keywords - Focus:	biomarker, clinical trial, diabetes: type 1, plasma cells, rejection

SCHOLARONE™
Manuscripts

Article type: Original Article, revised version AJT-O-18-01478

Interest of plasma microvesicles to monitor pancreatic islet graft dysfunction: beta cell- and leukocyte-derived microvesicles as specific features in a pilot longitudinal study

Running title: microvesicles as biomarker in pancreatic islet graft

Lamia Amoura[1,2], Fatiha Zobairi El-Ghazouani,[1] Mohamad Kassem[1], Ali El Habhab[1], Guillaume Kreutter[1], Salah Sahraoui[2], Domenico Bosco[5], Nadia Jessel[1], Thierry Berney[5], Pierre- Yves Benhamou[6], Florence Toti[1*], and Laurence Kessler[1,3,4 *], on behalf of the GRAGIL/ TREPID Network

1. INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, University of Strasbourg, France
2. CLINICA Group, Contract research organization, Algeria
3. Department of Endocrinology, Diabetes and Nutrition, University Hospital of Strasbourg, France
4. Faculty of Medicine, Federation of Translational Medicine (FMTS), Strasbourg, France
5. Department of Surgery, Islet Isolation, and Transplantation, University Hospitals, Geneva, Switzerland
6. Department of Endocrinology, Diabetes, and Nutrition, Grenoble Alpes University, Grenoble, France, Inserm U1055, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics Grenoble, France

***** Equal contribution, last co-authors

Corresponding author:
Laurence Kessler
INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), Strasbourg, France.
Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg; 74 route du Rhin, BP 60024
67401 Illkirch-Graffenstaden, France.
Department of Endocrinology, Diabetes and Nutrition, University Hospital of Strasbourg, France.
1 Place de L'Hôpital, 67091 Strasbourg
E-mail : Laurence.Kessler@chru-strasbourg.fr; kesslerl@unistra.fr; **Tel** : 03 88 11 62 67

Abbreviations

ASGPR: Asialoglycoprotein receptor, ß-cells: beta cells, DSA: Donor Specific Anti HLA antibody, F: Graft Failure, GAD: anti-glutamic acid decarboxylase, HLA-I, HLA-II: human leukocyte antigen class I or II, HV: Healthy volunteers, IA2: anti-tyrosine phosphatase, MVs: microvesicles, Phtdser: phosphatidylserine, PSA-NCAM: Poly Sialic Acid of Neural Cell Adhesion Molecule, PS: Partial Success, S: complete Success, TF: Tissue Factor.

Abstract

Markers of early pancreatic islet graft dysfunction and its causes are lacking. We monitored 19 T1D islet-transplanted patients for up to 36 months following last islet injection. Patients were categorized as Partial (PS) or complete (S) Success, or Graft Failure (F), using the β-score as an indicator of graft function. To identify the immune, pancreatic, and liver contribution to the graft dysfunction, the cell origin and concentration of circulating micro vesicles (MVs) were assessed, including MVs from insulin-secreting ß-cells typified by PSA-NCAM, and data were compared with values of the β-score. Similar ranges of PSA-NCAM$^+$-MVs were found in healthy volunteers and S patients, indicating minimal cell damage. In PS and F, a 2-3 fold elevation in PSA-NCAM$^+$-MVs preceded each β-score drop along with a concomitant rise in insulin needs, suggesting ß-cell damage or altered function. Significant elevation of liver ASGPR$^+$-MVs, endothelial CD105$^+$-MVs, neutrophil CD66b$^+$-MVs, monocyte CD 14$^+$-MVs, and T4 lymphocyte CD4$^+$-MVs occurred before each β-score drop, CD8$^+$-MVs increased only in F, B lymphocyte CD19$^+$-MVs remained undetectable. In conclusion, PSA-NCAM$^+$-MVs are non-invasive early markers of transplant dysfunction, while ASGPR$^+$-MVs signal host tissue remodeling. Leukocyte MVs could identify the cause of graft dysfunction.

Key- words: pancreatic islet transplantation, microvesicles, biomarker

Introduction

DT1 patients with unstable diabetes have severe hypoglycemia and increased mortality risk (1, 2). Islet transplantation improves glycemic control (3), preventing severe hypoglycemia and microangiopathy (4). Despite tailored therapeutics, less than 20% of patients remain insulin-independent 5 years after transplantation, indicating progressive loss of graft function (5, 6).

Monitoring islet-transplanted patients remains challenging. A drop in C-peptide plasma concentration is a late indicator of ß-cell dysfunction, while random islet diffusion hinders informative liver biopsies (7). Furthermore, allo- and auto-immune antibodies, that are key in the diabetes pathogenesis remain poorly informative of the immune response. Their pre-transplantation prognosis value is debated (8, 9), whereas a de novo occurrence could not be associated with Cd3 specificity thereby precluding to a causative effect in graft failure (10). Circulating granzyme and FasL characterizing activated cytotoxic lymphocytes, were reported indicative of ongoing islet transplant rejection (11). Strikingly, blood insulin mRNA (12, 13), miRNA-375 and miR-200c (14, 15), all early markers of ß-cell damage, do not identify the cause of islet dysfunction in allo- or auto-transplanted islet patients.

In a cellular model mimicking Instant Blood Mediated Immune Response (IBMIR), an early cause of islet damage, we demonstrated a redox and inflammatory driven ß-cell response with reduced insulin-secreting ability and up-regulation of procoagulant tissue factor (TF) (16), together with plasma membrane remodeling and ultimate shedding of ß-cell derived microvesicles (MVs) (17).

MVs are submicron plasma membrane vesicles shed from stimulated cells and circulating markers of cellular damage. They cargo characteristic features of the parental cell, correlate with disease severity (18) and are key cellular mediators of tissue remodeling and regeneration

(19, 20). MV are often pathogenic as they convey procoagulant, proapoptotic, pro-inflammatory (21), and pro-senescent properties (22). Because MVs expose procoagulant phosphatidylserine (PhtdSer), and TF when shed from leukocytes or endothelial cells, their circulating concentrations they are associated with hypercoagulability and ischemia reperfusion. Procoagulant MVs of endothelial origin are elevated in the plasma of heart-transplanted patients during the first episode of acute rejection (23). Circulating MVs of endothelial origin or bearing TF are promising tools to monitor the immunosuppression-driven endothelial damage and graft dysfunction after renal transplantation (24, 25), and identify a worsening cardiovascular outcome (26). In recipients of stem cells, circulating TF^{+}-MVs are predictive of worsening outcome (27).

In a pilot study of three islet-transplanted patients, an early peak of procoagulant MVs of unknown cell origin was detected one month before increased insulin needs and decreased plasma C-peptide concentrations, suggesting an early MVs release before graft dysfunction. Furthermore, after new islet transplant, or corticosteroid treatment for suspected cellular rejection (28), MV levels returned to baseline. We hypothesized that circulating MVs of pancreatic origin could be early, non-invasive markers of graft loss and that other shedding cells could characterize the cause of islet dysfunction (28, 29). PSA-$NCAM^{+}$-MVs were chosen to probe MVs from ß-cells in the plasma of transplanted patients. PSA-NCAM is a characteristic feature of adult pancreatic ß-cells (30, 31), also detected during organogenesis, its expression disappearing until adulthood (32).

We realized a 4-year program monitoring of the cell origin of circulating MVs in islet-transplanted patients. Longitudinal variations of PSA-$NCAM^{+}$-MVs were measured in the peripheral blood, before and after islet transplantation, together with circulating MVs of liver,

immune, and vascular origin, to determine whether other identified cell sources of circulating MVs could characterize islet-graft loss of function.

Patients and methods

Study population

Twenty-seven T1D patients, who underwent intraportal transplantation via percutaneous transhepatic procedure at the Strasbourg University Hospital, were successively prospectively enrolled within the GRAGIL consortium between January 2010 and December 2017 (33). Eight patients were excluded from the final analysis because of pos-transplant clinical complications that precluded a complete harvest of the data (Supp Table 1). The 19 included patients underwent retrospective analysis following measurement of circulating MVs in blood samples. Islet recipients received 11,000 IEQ/ kg of body weight in 1-3 infusions, depending on preparations. The original Edmonton steroid-free protocol was common to both the GRAGIL and TRIMECO immunosuppressive regimens used in the cohort (3, 4).

Monitoring of graft function and circulating MVs

Graft function was monitored by means of the β-score, scaling from 0 to 8 (34). Transplantation was considered a success (S, n=8) when the β-score was ≥6, partial success (PS, n=8) when β-score was 3-6, and a failure when ≤3 (F, n=3). Patients were categorized accordingly (Figure1). No modification of the patients' allocation in the S,PS,F subsets was found using either Igls (35) or β-2 scores (36), that both introduce intermediate clinical status (SuppTable 2 of recalculated β-2 and Igls scores), on-line with a recent report correlating β and β-2 scores (36). Circulating MVs were measured during the whole follow-up period, starting from the second month following the last infusion. Three different types of data were generated: (i) mean MV values calculated by cumulating all MV measurements in each subset; (ii) mean baseline MV

values, excluding values measured at the maximum elevation of circulating MVs that preceded β-score decrease; (iii) mean MV maximum elevation value (Ev), excluding baseline values in each subset. Wherever possible, the median time lapse between MV elevation and last islet infusion or the β-score decrease was calculated by referring to the MV peak median.

Blood sampling for MV quantification

Peripheral vein blood samples withdrawn in vacuum tubes containing 129 mM sodium citrate (9:1 volume ratio), were processed within 60 min. Platelet Poor Plasma (PPP) containing circulating MVs was obtained by double centrifugation at 1500 g for 15 min followed by 13000g for 3 min at room temperature, then immediately frozen and stored at -80°C, according to recommendations of the International Society of Thrombosis and Haemostasis.

Venous blood was collected prior to transplant, then monthly after each islet infusion for the first six months, and thereafter every three months during the follow-up period (12-60 months). A total of 10-12 samples/patient were analyzed. PPP were also prepared from 13 healthy volunteers (HV).

MV quantification by prothrombinase enzyme assay and cell origin

Total MV concentration was determined by taking advantage of the MV ubiquitous Phtdser exposure (37). MVs were captured onto insolubilized biotinylated annexin-5, a protein with high affinity for Phtdser, using streptavidin-coated microtitration plates (Roche Diagnostics, Deutschland). After three washings, MVs were measured by prothrombinase assay in which blood clotting factors (FXa, FVa, FII) and calcium concentrations ensure that PhtdSer borne by MVs is the rate-limiting parameter in the generation of soluble thrombin from prothrombin. PPP were incubated with human FXa (106pM, Hyphen Biomed, France), Factor Va (FVa, 250pM, Sekuisu, USA), prothrombin (FII, 3.5µM, Hyphen BioMed, Paris, France), 10 min at

37°C. Thrombin generation was assessed in a multiplate spectrophotometer at 405nm (Versamax, Molecular Devices, Wokingam Berkshire, UK) using a chromogenic thrombin substrate (PNAPEP0216 1.52mM, Cryopep, Montpellier, France). Results were expressed as nanomolar PhtdSer equivalents (nM PhtdSer eq.) by reference to a standard curve established using liposomes of known composition and concentration (37). To determine their cell origin, MVs from PPP were first washed by a double centrifugation step (60 min, 14.000g, 4°C) and concentrated in 500µl before measurement by prothrombinase assay using instead of annexin-5 biotinylated antibodies against T-helper cells (anti-CD4), cytotoxic T-cells (anti-CD8), B-lymphocytes (anti-CD19), monocytes (anti-CD14) (all from Leinco, St Louis, Missouri, USA), activated neutrophils (anti-CD66b; BD Bioscience, New Jersey, USA). The MV concentration was obtained for each cell origin by subtracting the OD values measured using the isotype biotinylated control immunoglobulin (BD Bioscience).

Characterization of MV pancreas and liver origins by ultrasensitive prothrombinase assay

Washed concentrated MV samples were insoluvilized onto biotinylated antibodies against ß-cell (anti-PSA-NCAM IgM, eBioscience San Diego, USA) or hepatocyte cell (anti-ASGPR IgG, BD Bioscience) for 60 min at 37°C. After four washes, human coagulation factors were incubated for 20min at 37°C and generated thrombin measured as above. Isotype biotinylated control immunoglobulins (IgM, eBioscience San Diego; IgG, BD Bioscience) were used to determine the final MV concentration.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard error mean (S.E.M.), and analyzed using GraphPad Prism6® (La Jolla,CA,USA). Statistical analysis between two groups was performed using

Mann–Whitney, Wilcoxon, and ANOVA test. The threshold of significance was set at 5%. Intra-variations of the MV levels were established for each clinical subset. The minimum value of conventional clinical variables reflecting the loss of graft function and the maximum value for circulating MV level, were compared using a unilateral nonparametric Wilcoxon test. We also verified that the maximum MV value occurred before the minimum of each of the other relevant variables.

Results

Patients

No statistical difference in biological values or blood cell count was observed between the three subsets before transplantation except for two parameters: lower HbA1c in the success (S) compared to Partial success (PS) subset (7.1% *vs.* 8.1%), and higher body weight, in PS compared to S and Failure (F) subset (Table1, Supp Table 3). An eventual weigh of baseline HbA1c on P and PS graft fate seems difficult to reconcile with the lower recovery of glycemic control post-transplantation of the latter (Success: from 7.1 to 5.5; PS: 8.1 to 7; Supp Table 2), while insulin needs (U/kg/day) remained similar in both subsets.

Patients had a 56 mean age, 38 years mean diabetes duration and a daily insulin requirement of 0.6 units/kg of body weight at baseline. Islet transplantation followed kidney grafting in 26% of patients in all subsets (5 patients, Table 1). No patient had pre-formed DSA, six showed *de novo* HLA DSA, most events being late with respect to the drop of the β-score. (Supp Tables 4). Nine Patients had pre-transplantation autoantibodies (anti-GAD, anti-IA2) and 10 were positive post-transplantation, occurring as a late event with respect to the β-score drop. *De novo* anti-GAD or -IA2 autoantibodies were detectable in the 3 subsets, in PS and F groups whereas several S patients did not escape conversion, in spite of stable islet function (Supp Tables 5).

Mean values and longitudinal variations of total procoagulant MVs

No significant difference in mean annexin-5^+-MV values was observed between the three subsets. Longitudinal analysis indicated a trend to lower MV values post-transplantation at baseline (S, $p<0.05$; PS or F $p<0.05$; $p<0.1$) and a significant difference between baseline values following transplantation and the elevation peak (Supp Figure 2A, 2B).

Detection of circulating tissue MVs post-transplantation

Regardless of the subset, the median time lapse between the detection of circulating tissue-derived MVs and the β-score drop was shorter (PSA-$NCAM^+$-MVs: 42.5; $ASGPR^+$-MVs: 55.8 days, Table2) compared to vascular cell-derived MVs ($CD105^+$-MVs:78 days; leukocytes >87 days). To better characterize the impact of vascular and tissue stress on circulating MV profiles, variations of the MV cell origin were characterized in each patient subset.

Circulating PSA-$NCAM^+$-MVs and islet-graft function.

MVs shed by ß-cells were measured by ultrasensitive prothrombinase assay to detect low levels of circulating PSA-$NCAM^+$-MVs. Concentrations were significantly different among patient subsets, in correlation with the severity of the islet-graft dysfunction, suggesting that PSA-$NCAM^+$-MVs is a reliable sensor of pancreatic damage or dysfunction (PS: 0.51±0.05 nM; F: 0.56±0.08 nM, compared to S: 0.29±0.02 nM, $p<0.0001$, Figure 2A). In line with this observation, PSA-$NCAM^+$-MVs circulated at lower concentrations in both S and HV subsets (S: 0.29±0.02 nM *vs.* HV: 0.34±0.01 nM).

Longitudinal analysis of circulating PSA-$NCAM^+$-MVs revealed a 2-fold elevation in the PS subset occurring 30-60 days before the β-score drop (Ev: 0.92±0.16 *vs.* baseline: 0.44±0.02 nM, $p<0.0001$), and a 3-fold increase in F patients (Figure 2B, Table 2). Of note, insulin treatment was never completely discontinued in either PS or F subsets.

Conversely, S patients exhibited low PSA-NCAM$^+$-MVs concentrations, with circulating levels remaining stable and similar to values measured in HV (S: 0.31±0.03 nM *vs.* HV: 0.34±0.01 nM, Figure 2).

Variations in hepatocyte-derived MV plasma concentrations

An early release of hepatocyte-derived ASGPR$^+$-MVs, was concomitant with islet infusion in all subsets. Thereafter, the ASGPR$^+$-MVs baseline values significantly decreased below pre-transplantation values. However, in PS or F patients, the β-score drop was preceded by an up to 10-fold rise in circulating ASGPR$^+$-MVs (PS: 0.43±0.08 *vs.* baseline: 0.03±0.01 nM; F: 0.48±0.05 *vs.* baseline: 0.03±0.01 nM, $p<0.0001$, Figure 3A). Conversely, in the S subset, ASGPR$^+$-MVs concentrations remained unchanged.

CD105- bearing endothelial MV plasma concentrations

As reported in other transplantations (26, 27, 38), baseline post-transplantation endothelial CD105$^+$-MVs were reduced in all subsets ($p<0.05$). In PS or F patients a 2-fold elevation occurred 78.9 days before the β-score drop (PS: 0.56±0.08 *vs.* baseline: 0.23±0.04 nM, $p<0.01$; F: 0.54±0.05 *vs.* baseline: 0.17±0.05 nM, $p<0.01$, respectively) (Figure 3B, Table 2).

Leukocyte MV release in the plasma of islet-transplanted patients

In contrast to PSA-NCAM$^+$-MVs, tissue ASGPR$^+$-MVs-MVs, endothelial CD105$^+$-MVs, and leukocyte-derived MVs levels increased in PS or F subsets within the 4 months prior to the β-score drop (Table 2).

Kinetics of the CD4$^+$ T- derived MV release

Concentrations of plasma CD4$^+$-MVs shed from T-helper cells were analyzed as a ratio to the circulating lymphocyte count. CD4$^+$-MVs circulated at lower levels post-transplantation in all subsets (S: PreTx: 0.19±0.02 *vs.* baseline: 0.10±0.02 nmoles/ 10^9lymphocytes, $p<0.05$; PS:

PreTx: 0.57±0.29 *vs.* baseline: 0.24±0.03 nmoles/ 10^9 lymphocytes, $p<0.05$; F: PreTx: 0.41±0.11 *vs.* baseline: 0.18±0.03 nmoles/ 10^9 lymphocytes, $p<0.05$, Figure 4A). In the PS and F subsets, the 2-fold $CD4^+$-MVs elevation occurred with a 147 days mean time lapse before the β-score drop (PS: 0.46±0.04 *vs.* baseline: 0.24±0.03 nmoles/ 10^9 lymphocytes, $p<0.0001$; F: 0.37±0.04 *vs.* baseline: 0.18±0.03 nmoles/ 10^9lymphocytes, $p<0.01$, respectively, Figure 4A). $CD4^+$-MV concentrations remained independent from total lymphocyte counts, and elevations lasted longer than those of other leukocyte-derived MVs (Supp Table 6).

Kinetics of the $CD8^+$ T cell-derived MV release

$CD8^+$-MVs shed from cytotoxic CD8 T-cells increased by 3 folds within the 126 days prior the β-score drop (PS: 0.10±0.03 *vs.* baseline:0.01±0.01 nM, $p<0.0001$; F:0.38±0.04 *vs.* baseline: 0.13±0.04 nM, $p<0.01$, respectively**,** Table2, Supp Table 6). Interestingly, when reported as a ratio of the lymphocyte count, the $CD8^+$-MV elevation was no longer observed in the PS subset, while persisting in the F subset (0.15±0.09 *vs.* baseline: 0.04±0.04 nmoles/ 10^9 lymphocytes, $p<0.05$) (Figure 4B).

Kinetics of neutrophil-derived MV release

Post-transplantation baseline $CD66b^+$-MV was low in all patients (S: 0.3±0.06; PS: 0.1±0.02; F: 0.07±0.03 nmoles/ 10^9 neutrophils). A 2-fold elevation occurred 94.2 days prior the β-score decrease in PS (0.5±0.1 *vs.* baseline: 0.1±0.02 nmoles/ 10^9 neutrophils, $p<0.001$) and F patients (0.35±0.08 *vs.* baseline: 0.07±0.03 nmoles /10^9 neutrophils, $p<0.05$, Figure 5A, Table 2).

Kinetics of monocyte-derived MV release

In both PS and F patients, monocyte $CD14^+$-MV levels were significantly elevated before the β-score decrease and higher in PS (>8 folds) compared to F patients (5-6 folds, Figure 5B)

(0.5±0.07 *vs.* baseline: 0.06±0.02 nmoles/ 10^9 monocytes, $p<0.0001$; 0.23±0.12 *vs.* baseline: 0.04±0.01 nmoles/ 10^9 monocytes, respectively, $p<0.05$, median time lapse: 87.6 days).

B lymphocyte-derived MVs

In all three subsets, $CD19^+$-B cell-derived MVs exhibited no significant variation at any time, in either pre- or post-transplantation mean values, suggesting that no B-lymphocyte damage or major cell activation could be detected (Figure 4C).

Longitudinal overview of MV variations

PSA-$NCAM^+$ and $ASGPR^+$-MVs elevation indicating graft and tissue damage occurred at shortest delay prior to the β-score decrease (42.5, 55.8 days, respectively), was preceded by the endothelial $CD105^+$-MV peak (78.9 days) while MVs characterizing the innate immune response were detected earlier, within 87.6-126 days, when the β-score was still above the threshold of graft dysfunction (Table 2, Figure 6).

Discussion

This study relies on the well-established observation that circulating MVs are the signature of a pathophysiological state and of the severity of graft damage (18, 21). Using the β-score as the international reference evaluating islet graft function and taking advantage of the longitudinal follow-up, we compared Success and Partial subsets MV phenotypes, the Failure subset constituting a reference of worsened outcome with graft dysfunction. We herein demonstrate that (i) circulating PSA-$NCAM^+$-MVs are early indicators of pancreatic islet-graft dysfunction; (ii) variations in liver- and vascular-cell-derived MV levels characterize host and graft tissue remodeling; (iii) leukocyte MVs sense immune responses, altogether holding potential value in the identification of the causes of graft dysfunction.

Plasma PSA-NCAM$^+$-MVs as early indicators of islet dysfunction

In contrast to PS and F patients, PSA-NCAM$^+$-MVs concentrations were low in both S and HV subsets, indicating minimal islet damage and complete ß-cell function recovery after full engraftment. As proof, PSA-NCAM$^+$-MV concentrations in 13 Healthy subjects (HV) were low and similar to values measured in S patients (HV: 0.34±0.01 nM *vs.* S: 0.29±0.02 nM). Given their 2-3 folds increase before β-score drop, circulating PSA-NCAM$^+$-MVs appear biomarkers of ß-cell damage and graft dysfunction with potential prognosis value.

Circulating MVs are surrogate markers of host tissue remodeling post-islet transplantation

IBMIR prompts the early loss of a proportion of islets (39), while allo- and autoimmune responses endanger the function of engrafted ones. We reasoned that identifying the variations in MVs from vascular cells, liver, pancreas tissues would help in deciphering the cellular causes of graft dysfunction. A similar approach using hematopoietic stem-cell CD34$^+$-MVs and hepatocyte ASGPR$^+$-MVs probed the severity of alcoholic hepatitis and predicted steroid therapy resistance (40). Furthermore, CD105$^+$-MVs are the sole characteristic and predictive endothelial markers of acute cardiac transplant rejection (38).

In our study, low baseline post-transplantation liver ASGPR$^+$-MVs and endothelial CD105$^+$-MVs levels were rapidly reached in all subsets, suggesting minimal remodeling in the peri-transplantation period, as reported within the month after kidney transplantation (24), or the next week of uncomplicated liver transplantation (41).

In the S subset, the stable baseline plateau suggests a restored graft function. In PS or F subsets, remote elevation of both ASGPR$^+$-MVs and CD105$^+$-MVs occurred at distance from islet injection and prior to the β-score fall and graft failure. Compared to the PSA-NCAM$^+$-MVs elevation, the time lapse between peak and onset of the β-score drop was longer, suggesting that upstream events caused endothelial damage and liver tissue remodeling, before ß-cell

damage became detectable. Transient and immediate elevation of endothelial VE-cadherin^{+}-MVs and hepatocyte-derived MVs, characterize enhanced vessel permeability and tissue remodeling post liver transplantation (41). Strinckingly, before islet transplantation all patients exhibited higher circulating concentrations of liver- and endothelial-derived MVs, suggesting that vessel and liver damage are common features in brittle T1D (42). Our data bring new evidence that at distance from the islet transplantation, endothelial and hepatocyte cells are prime actors in tissue remodeling, possibly related to the progression of graft dysfunction. Because the endothelium of hepatic sinusoïd vessels is highly susceptible to oxidation, prolonged ischemia at sites of islet embolization may also have contribute to the shedding of noxious endothelial MVs possibly impairing engraftment (43, 44). If so, graft success could be improved by pre-treatments designed to ensure endothelial cyto-protection.

Leukocyte-derived MVs characterize the severity of graft damage or dysfunction

At sites of ischemia-induced damage, interactions between endothelial MVs, platelets, and leukocytes constitute a driving force for the recruitment of neutrophils and monocytes at the surface of the inflamed endothelium (45), resulting in the sustained release of pro-inflammatory MVs and endothelial permeability associated with primary graft dysfunction (46, 47).

In islet transplantation, it remains unclear whether the initial inflammation and innate immune responses further promote acute episodes or are the first step of chronic graft dysfunction. Despite additional islet injections, early and significant islet mass loss can persist, due to recurrent inflammatory episodes also involving the adaptive immune response. In this study, we demonstrate that leukocyte MVs mark islet ischemia reperfusion injury and graft dysfunction. Their prognosis value is strongly suggested by the fact that MV elevations always occurred prior to the β-score decrease and that concentrations in healthy subjects are lower than those of transplanted patients. Furthermore, peaks of neutrophil CD66b^{+}-MVs and CD14^{+}-MVs

characterizing PS and F had occurred at a longer median time lapse to the β-score drop than those of endothelial, liver, and ß-cell origins, suggesting an earlier contribution to graft dysfunction. In addition, $CD14^+$-MVs discriminated partial from complete graft failure. Most likely, MVs from monocytes and neutrophils contribute to early endothelial inflammation, which in turn accelerates the endothelial dysfunction (48).

MV profile and monitoring of humoral or cellular immune responses

Given the exclusive HLA-I or II distribution observed among the S (HLA-II) and F (HLA-I) subsets, it is tempting to speculate that innate immunity remains pivotal in islet-graft dysfunction. Indeed, while CD8 T-cells may contribute to late allo-specific immune islet damage (49), pancreatic islets do not stimulate primarily CD4-independent and CD8-dependent immune responses. Therefore, high levels of $CD8^+$-MVs only detected in F patients would sense ß-cell destruction, their release possibly primed by acute CD4-independent $CD8^+$T cytotoxic injury (50), and the later loss of islet allografts being potentially accelerated by a secondary alloreactive response (49).

Our data support previous hypotheses that cross-reactivity jeopardizes long-term islet allograft survival. Because autoreactive HLA-I-A2 CD8 antibodies destroy ß-cells that highly express insB-18 in T1D patients and although our study was not designed to identify antibodies to insB-18, a worsened outcome perspective to the activation of CD8 associated with the occurrence of HLA-I DSA was evidenced (51).

Strikingly, $CD4^+$-MVs and $CD8^+$-MVs elevations were often concomitant and always preceded the β-score decrease, with stable T lymphocyte count. Since no plasma $CD4^+$-MV elevation or variation in T-cell count was found in the Success subset, it is likely that $CD4^+$-MVs reflect major T-cell activation in partial or complete graft failure, rather than a systemic response.

Although CD4-dependent pathways in the islets are controlled by conventional immunotherapies, they eventually remain active in the host liver (52), thereby explaining hepatic MV shedding and tissue remodeling in the F subset (Figure 4A, Table 2).

In islet-transplanted patients, cellular rejection may be misdiagnosed as humoral response. While confirmation will require detailed leukocyte subset cell counts, no significant variation in $CD19^+$-B cell-derived MVs could be detected in the PS or F subsets, suggesting that B lymphocytes are not prime actors of rejection, on-line with the absence of accelerated graft attrition following anti-HLA DSA conversion in 27 islet graft recipients (10).

Altogether, our findings indicate a specific sequence of cellular activation characterizing cells and tissues involved in the graft loss of function, initiated by leukocyte activation until detectable massive ß-cell damage, the latest event preceding the β-score drop (Table2, Figure 6). Following the first $CD8^+$-MVs and $CD4^+$-MVs rise characterizing acquired immune response to the graft while questioning immunosuppressive therapy escape. At distance from the islet injection, MVs typifying neutrophils and monocyte activation are detected before endothelial and liver MVs elevation, indicating abnormal host liver tissue remodeling, potentially leading to islet loss and suggesting a MV-driven graft damage (Table 2, Figure 6).

In conclusion, circulating MVs of tissue origin appear biomarkers of graft damage, while the leukocyte MVs pattern is a signature of the immune response, likely to promote islet loss. PSA-$NCAM^+$-MVs could prove valuable for the early and non-invasive detection of islet dysfunction before the assessment of ß-cell damage by conventional tools. Combining circulating MVs from the host tissue and immune cells might offer enhanced sensitivity and help to decipher the causes of graft dysfunction and monitor immunotherapy. Whether the individual profile of circulating MVs could prove useful for patients' stratification and monitoring however needs confirmation in larger multicenter longitudinal studies.

Study limitations

In this pilot longitudinal study, the patients number was limited. However, baseline and peak MV values followed small distribution ranges within each clinical subset, indicating that these biomarkers were nonetheless robust. The study was not designed to identify $CD4^+$-MVs originating from Treg cells, and no conclusion can be drawn about the proportion of T4 and Treg cells that eventually shed MVs.

The modified β-2 score, that better stratifies islet function, and the Igls score that takes into account severe hypoglycemia events were not used for stratification. Nevertheless, no modification of the patients' allocation was observed using either scoring. Individual β-2 or β scores variations were closely related (Supp Figure 1, Supp Table 2), transition from S to PS and PS to S occurring at similar time identified by the drop of either β-2 or β scores. Owing to scarce severe hypoglycemia, patients from the S subset were equally distributed in the "optimal" or "good" Igls sub-categories with no significant MV variation.

Acknowledgments

Authors wish to thank Blandine Yver for expert technical assistance in sampling and measuring vascular MV. This work was partly supported by a grant from the French Society of Transplantation and the french National Research Agency ANR Grant COCERP n° ANR-16-CE29-0009-03 and ASDIA France.

Authors' contributions

Study design: LA, FT, LK

Patient recruitment and data collection: LA, FZ, LK, MK, AE, FT

Statistical design, analysis, and interpretation of data: LA

Writing up of the first draft of the paper and rewriting: LA; LK, FT

Editing of the manuscript: LA, FT

Review of the manuscript: LA; LK, FT, DB, NJ, TB, PYB, GK

Approval of the final manuscript: LA, LK, FT

Contributions: FZ, SS, MK

Declaration of interest

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the American Journal of Transplantation.

Figure Legends

Figure 1: **Flow chart of patients enrolled in the study**

Figure 2: Variation ranges and cumulative values of circulating PSA-NCAM$^+$-MVs in transplanted patients with graft success, partial success or failure

(A) Mean of cumulative MV longitudinal values measured on 10-12 separate occasions for each patient in each subset. Data presented as mean of all individual values including elevation and baseline values during the follow-up period (48 months)
(B) MVs were measured within one month prior to transplantation (PreTx), at maximum elevation (Ev) and baseline (Bsl) following last islet infusion (10-12 samples/ each patient)

S: Success; PS: Partial Graft Success; F: Graft Failure; HV: healthy volunteers
# p <0.0001(PS *vs.* S); *** p <0.0001 (F *vs.* S); p=ns (HV *vs.* S)
*$ p <0.0001 (Ev vs. Bsl; PS); **p <0.01(Ev vs. Bsl; F)*

Figure 3: Circulating hepatic and endothelial cell-derived MVs in transplanted patients with graft success, partial success or failure. MVs were measured within one month prior to transplantation (PreTx) at maximum elevation (Ev) and baseline (Bsl) following last islet infusion (10-12 samples/patient)

S*: Success; PS: partial graft success; F: graft failure*

(A) ASGPR$^+$-MVs: *# p <0.0001 (Ev vs. Bsl; PS); $ p <0.0001(Ev vs. Bsl; F)*
(B) CD105$^+$-MVs: *** p <0.01 (Ev vs. Bsl; PS); **p <0.01(Ev vs. Bsl; F)*

Figure 4: Circulating T-helper, Cytotoxic-T, and ß-cell derived MVs in transplanted patients with graft success, partial success or failure. MVs were measured within one month prior to transplantation (PreTx) at maximum elevation (Ev) and baseline (Bsl) following last

islet infusion (10-12 samples/patient). MV values were reported for the total count of circulating lymphocytes for each sample

S*: Success; PS: partial graft success; F: graft failure*

(A) $CD4^+$-MVs: *# p <0.0001 (Ev vs. Bsl; PS); **p <0.01(Ev, vs. Bsl; F)*
(B) $CD8^+$-MVs: *p=ns (Ev vs. Bsl; PS); ***p <0.001(Ev vs. Bsl; F)*
(C) $CD19^+$-MVs *p=ns (Ev vs. Bsl; PS); p=ns (Ev vs. Bsl; F)*

Figure 5: Circulating neutrophil- and monocyte -derived MVs in transplanted patients with graft success, partial success or failure. MVs were measured within one month prior to transplantation (PreTx) at maximum elevation (Ev) and baseline (Bsl) following last islet infusion (10-12 samples/patient).
S: Success; PS: partial graft success; F: graft failure

(A) $CD66b^+$ -MVs *values were reported for the number of circulating neutrophils for each sample. *** p <0.001 (Ev vs. Bsl; PS); **p <0.01(Ev vs. Bsl; F)*
(B) $CD14^+$*-MV values were reported for the number of circulating monocytes for each sample. # p <0.0001 (Ev vs. Bsl; PS); *p <0.05 (Ev vs. Bsl; F)*

Figure 6: Sequence of circulating MVs release during islet transplantation, with respect to their cell origin.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article. Supporting information includes the following sections:

- Pre-transplantation demographic values and biological characteristics of the 8 excluded patients.
- Patients' allocation according to the β-score, and comparison with β-2 and Igls scores
- Design of the sampling schedule with respect to islet infusion and induction of immunosuppression
- Blood sampling for MV quantification
- MV quantification by prothrombinase assay and characterization of their cell origin
- Characterization of MV graft and liver origin by ultrasensitive prothrombinase assay
- Supplemental Figures 1-2 and supplemental Tables 1-6

Supplemental Figures 1-2

- **Supplemental Figure 1: Correlation between β and β-2 scores within the cohort.**

  The correlation value was determined from 323 paired values measured on separated monitoring occasions and for each subset namely, Success (6-8), Partial Success (4-5) and Failure (0-3).

- **Supplemental Figure 2:**

  Cumulative values and variation range of circulating AV^{+}-MVs in transplanted patients with success, partial graft success or failure.

(A) Mean of cumulative MVs longitudinal values measured 10-12 separate times/patient in each subset. Data is presented as means of all individual values including elevation and baseline values during the follow-up period (48 months)

(B) MVs were measured within one month prior to transplantation (PreTx) at maximum elevation (Ev) and baseline (Bsl) following last islet infusion (10-12 samples/patient).

S: Success; PS: Partial Graft Success; F: Graft Failure; HV: healthy volunteers

p= *ns (PS vs. S) or (F vs. S)*

*** p <0.01 (Ev vs. Bsl; PS) or (Ev vs. Bsl; F)*

Supplemental Tables 1-6 :

- **Supplemental Table 1: Pre-transplantation demographic values and biological characteristics of the 8 excluded patients.**

  Values are expressed as median and interquartile range (IQR). Routine blood tests were performed using standard clinical procedures. *Tx: Transplantation.*

- **Supplemental Table 2: Patients allocation according to β, β-2, and Igls scores.**

  β-2 and Igls scores are calculated at each monitoring time, over the entire follow-up period. Recorded severe hypoglycemic events were summed for the first two years following the drop of the β-score in accordance with Igls scoring. The number of patients with hypoglycemic events was 5 and 2 in the PS and F subsets, respectively.

- **Supplemental Table 3: Pre-transplantation biological characteristics of islet transplanted.**

  Values are expressed as median and interquartile range (IQR). Routine blood tests were performed using standard clinical procedures.

- **Supplemental Table 4: Characteristics of humoral alloimmune responses after islet grafting.**

  HLA-I conversion was recorded as a number of events with mean highest DSA fluorescence intensity. The median delay following the last islet injection is indicated

with respect to the drop of the β-score. The apparition of de novo antibodies occurred either before the drop of the β-score (positive values) or after the drop of the β-score (negative values). DSA conversion appeared in 3 patients of the PS subset and in 1 patient of the F subset.
Among the eight patients categorized as graft success, two had HLA-II DSA. One individual exhibited DSA within the 18 months post-transplantation, followed by another occurring 4 years later. The second patient exhibited DSA one-month post-last infusion, which remained stable during the whole follow-up period. Of the eight PS patients, three exhibited one single HLA-I DSA: one patient 41.2 months after first infusion and 32 months after the β-score decrease, another patient 2 months after last injection, followed by the β-score decrease 45 days later, and the last patient had a 3-month long DSA from the 11th day after the first islet injection, while the β-score value remained 6 before dropping 6 months after the second injection.
Of the three patients categorized in the F subset, only one individual exhibited HLA-I DSA, at 150 months and 165 months following islet injection, and at 6 and 8 years after the β-score decrease, respectively.
DSA: donor-specific anti-HLA antibody; MFI: mean fluorescence intensity

- **Supplemental Table 5: Characterization of autoantibodies pre and post islet transplantation.**

  Autoantibodies levels were recorded before and after transplantation. Post-transplantation values were considered positive either as increment of initial baseline and /or as *de novo* occurrence.
  Incremented and de novo *a*ntibodies were detected either before the drop of the β-score (positive values) or after the drop of the β-score (negative values).

  GAD (anti-glutamic acid decarboxylase) auto-antibodies (normal range: < 1 kU/L), IA2 (anti-tyrosine phosphatase) auto-antibodies (normal range: < 1 kU/L). Tx: Transplantation.

- **Supplemental Table 6: Variations of lymphocyte count and circulating $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$-MVs in transplanted patients pre- and post-last islet infusion.**

  Total lymphocytes and MVs were measured within one month prior to transplantation (PreTx), at maximum elevation (Ev), and at baseline (Bsl) following last islet infusion (10-12 samples/patient). Values are expressed as mean ± standard error mean (S.E.M.).

References

1. Tanenberg RJ, Newton CA, Drake AJ. Confirmation of hypoglycemia in the "dead-in-bed" syndrome, as captured by a retrospective continuous glucose monitoring system. Endocr Pract 2010;16(2):244-248.

2. McCoy RG, Van Houten HK, Ziegenfuss JY, Shah ND, Wermers RA, Smith SA. Increased mortality of patients with diabetes reporting severe hypoglycemia. Diabetes care 2012;35(9):1897-1901.

3. Lablanche S, Borot S, Wojtusciszyn A, Bayle F, Tetaz R, Badet L et al. Five-Year Metabolic, Functional, and Safety Results of Patients With Type 1 Diabetes Transplanted With Allogenic Islets Within the Swiss-French GRAGIL Network. Diabetes care 2015;38(9):1714-1722.

4. Lablanche S, Vantyghem MC, Kessler L, Wojtusciszyn A, Borot S, Thivolet C et al. Islet transplantation versus insulin therapy in patients with type 1 diabetes with severe hypoglycaemia or poorly controlled glycaemia after kidney transplantation (TRIMECO): a multicentre, randomised controlled trial. The lancet Diabetes & endocrinology 2018;6(7):527-537.

5. CIRT CtAR. The CITR Coordinating Center and Investigators. Available from: https://citregistry.org/system/files/9AR_Report.pdf. 2016 Dec.

6. Benomar K, Chetboun M, Espiard S, Jannin A, Le Mapihan K, Gmyr V et al. Purity of islet preparations and 5-year metabolic outcome of allogenic islet transplantation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2018;18(4):945-951.

7. Toso C, Isse K, Demetris AJ, Dinyari P, Koh A, Imes S et al. Histologic graft assessment after clinical islet transplantation. Transplantation 2009;88(11):1286-1293.

8. Hilbrands R, Huurman VA, Gillard P, Velthuis JH, De Waele M, Mathieu C et al. Differences in baseline lymphocyte counts and autoreactivity are associated with differences in outcome of islet cell transplantation in type 1 diabetic patients. Diabetes 2009;58(10):2267-2276.

9. Piemonti L, Everly MJ, Maffi P, Scavini M, Poli F, Nano R et al. Alloantibody and autoantibody monitoring predicts islet transplantation outcome in human type 1 diabetes. Diabetes 2013;62(5):1656-1664.

10. Pouliquen E, Baltzinger P, Lemle A, Chen CC, Parissiadis A, Borot S et al. Anti-Donor HLA Antibody Response After Pancreatic Islet Grafting: Characteristics, Risk Factors, and Impact on Graft Function. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2017;17(2):462-473.

11. Han D, Xu X, Baidal D, Leith J, Ricordi C, Alejandro R et al. 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):2281-2290.

12. Ritz-Laser B, Oberholzer J, Toso C, Brulhart MC, Zakrzewska K, Ris F et al. Molecular detection of circulating beta-cells after islet transplantation. Diabetes 2002;51(3):557-561.

13. Berney T, Mamin A, James Shapiro AM, Ritz-Laser B, Brulhart MC, Toso C et al. Detection of insulin mRNA in the peripheral blood after human islet transplantion predicts deterioration of metabolic control. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2006;6(7):1704-1711.

14. Kanak MA, Takita M, Shahbazov R, Lawrence MC, Chung WY, Dennison AR et al. Evaluation of MicroRNA375 as a Novel Biomarker for Graft Damage in Clinical Islet Transplantation. Transplantation 2015;99(8):1568-1573.

15. Yoshimatsu G, Takita M, Kanak MA, Haque WZ, Chang C, Saravanan PB et al. MiR-375 and miR-200c as predictive biomarkers of islet isolation and transplantation in total pancreatectomy with islet autotransplantation. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2016;23(9):585-594.

16. Gleizes C, Constantinescu A, Abbas M, Bouhadja H, Zobairi F, Kessler L et al. Liraglutide protects Rin-m5f beta cells by reducing procoagulant tissue factor activity and apoptosis prompted by microparticles under conditions mimicking Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction. Transpl Int 2014;27(7):733-740.

17. Gleizes C, Kreutter G, Abbas M, Kassem M, Constantinescu AA, Boisrame-Helms J et al. beta cell membrane remodelling and procoagulant events occur in inflammation-driven insulin impairment: a GLP-1 receptor dependent and independent control. J Cell Mol Med 2016;20(2):231-242.

18. Bakouboula B, Morel O, Faller AL, Freyssinet JM, Toti F. Significance of membrane microparticles in solid graft and cellular transplantation. Front Biosci (Landmark Ed) 2011;16:2499-2514.

19. Kornek M, Lynch M, Mehta SH, Lai M, Exley M, Afdhal NH et al. Circulating microparticles as disease-specific biomarkers of severity of inflammation in patients with hepatitis C or nonalcoholic steatohepatitis. Gastroenterology 2012;143(2):448-458.

20. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. Clin Sci (Lond) 2013;124(7):423-441.

21. Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, Badimon L, Blanc-Brude O, Bochaton-Piallat ML et al. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. Thrombosis and haemostasis 2017;117(7):1296-1316.

22. Abbas M, Jesel L, Auger C, Amoura L, Messas N, Manin G et al. Endothelial Microparticles From Acute Coronary Syndrome Patients Induce Premature Coronary Artery

Endothelial Cell Aging and Thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-Mediated Activation of MAPKs and PI3-Kinase Pathways. Circulation 2017;135(3):280-296.

23. Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A et al. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. Am J Respir Crit Care Med 2008;177(5):536-543.

24. Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, Widemann A, Arnaud L, Loundou A et al. Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2008;8(11):2360-2367.

25. Qamri Z, Pelletier R, Foster J, Kumar S, Momani H, Ware K et al. Early posttransplant changes in circulating endothelial microparticles in patients with kidney transplantation. Transpl Immunol 2014;31(2):60-64.

26. Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, Arnaud L, Loundou A, Robert S et al. Kidney transplantation decreases the level and procoagulant activity of circulating microparticles. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2009;9(3):550-557.

27. De Rop C, Stadler M, Buchholz S, Eisert R, Ganser A, Trummer A. Evaluation of tissue factor bearing microparticles as biomarkers in allogeneic stem-cell transplantation. Transplantation 2011;92(3):351-358.

28. Moreau F, Toti F, Bayle F, Berney T, Egelhofer H, Chastre M et al. Rescue of a pancreatic islet graft after steroid therapy. Transplantation 2012;93(3):e10-11.

29. Toti F, Bayle F, Berney T, Egelhofer H, Richard MJ, Greget M et al. Studies of circulating microparticle release in peripheral blood after pancreatic islet transplantation. Transplant Proc 2011;43(9):3241-3245.

30. Karaca M, Castel J, Tourrel-Cuzin C, Brun M, Geant A, Dubois M et al. Exploring functional beta-cell heterogeneity in vivo using PSA-NCAM as a specific marker. PloS one 2009;4(5):e5555.

31. Bonfanti L. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. Prog Neurobiol 2006;80(3):129-164.

32. Galuska CE, Lutteke T, Galuska SP. Is Polysialylated NCAM Not Only a Regulator during Brain Development But also during the Formation of Other Organs? Biology 2017;6(2).

33. Shapiro AM, Pokrywczynska M, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. Nature reviews Endocrinology 2017;13(5):268-277.

34. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Lakey JR, Bigam D, Shapiro AM. Beta-score: an assessment of beta-cell function after islet transplantation. Diabetes care 2005;28(2):343-347.

35. Rickels MR, Stock PG, de Koning EJP, Piemonti L, Pratschke J, Alejandro R et al. Defining Outcomes for beta-cell Replacement Therapy in the Treatment of Diabetes: A Consensus Report on the Igls Criteria From the IPITA/EPITA Opinion Leaders Workshop. Transplantation 2018;102(9):1479-1486.

36. Forbes S, Oram RA, Smith A, Lam A, Olateju T, Imes S et al. Validation of the BETA-2 Score: An Improved Tool to Estimate Beta Cell Function After Clinical Islet Transplantation Using a Single Fasting Blood Sample. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2016;16(9):2704-2713.

37. Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM. Measuring circulating cell-derived microparticles. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 2004;2(10):1846-1847.

38. Morel O, Ohlmann P, Epailly E, Bakouboula B, Zobairi F, Jesel L et al. Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection. J Heart Lung Transplant 2008;27(1):38-45.

39. Barshes NR, Wyllie S, Goss JA. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. J Leukoc Biol 2005;77(5):587-597.

40. Sukriti S, Maras JS, Bihari C, Das S, Vyas AK. Microvesicles in hepatic and peripheral vein can predict nonresponse to corticosteroid therapy in severe alcoholic hepatitis. 2018;47(8):1151-1161.

41. Brodsky SV, Facciuto ME, Heydt D, Chen J, Islam HK, Kajstura M et al. Dynamics of circulating microparticles in liver transplant patients. J Gastrointestin Liver Dis 2008;17(3):261-268.

42. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. Diabetes 2002;51(9):2840-2845.

43. Jaeschke H, Woolbright BL. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. Transplant Rev (Orlando) 2012;26(2):103-114.

44. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. J Gastroenterol Hepatol 2003;18(8):891-902.

45. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. Crit Care Med 2005;33(11):2540-2546.

46. Porro C, Di Gioia S, Trotta T, Lepore S, Panaro MA, Battaglino A et al. Pro-inflammatory effect of cystic fibrosis sputum microparticles in the murine lung. J Cyst Fibros 2013;12(6):721-728.

47. Carter YM, Gelman AE, Kreisel D. Pathogenesis, management, and consequences of primary graft dysfunction. Semin Thorac Cardiovasc Surg 2008;20(2):165-172.

48. Curtis AM, Wilkinson PF, Gui M, Gales TL, Hu E, Edelberg JM. p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 2009;7(4):701-709.

49. Lunsford KE, Jayanshankar K, Eiring AM, Horne PH, Koester MA, Gao D et al. Alloreactive (CD4-Independent) CD8+ T cells jeopardize long-term survival of intrahepatic islet allografts. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2008;8(6):1113-1128.

50. Lunsford KE, Horne PH, Koester MA, Eiring AM, Walker JP, Dziema HL et al. Activation and maturation of alloreactive CD4-independent, CD8 cytolytic T cells. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2006;6(10):2268-2281.

51. Pinkse GG, Tysma OH, Bergen CA, Kester MG, Ossendorp F, van Veelen PA et al. Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102(51):18425-18430.

52. Lunsford KE, Gao D, Eiring AM, Wang Y, Frankel WL, Bumgardner GL. Evidence for tissue-directed immune responses: analysis of CD4- and CD8-dependent alloimmunity. Transplantation 2004;78(8):1125-1133.

Tables and Figures

Table 1: Pre-transplantation demographic values and biological characteristics of islet transplanted patients and healthy volunteers.

Variables	Transplanted T1D	Success	Partial Success	Failure	HV
N	19	8	8	3	13
M/F(n)	10/9	6/2	5/3	2/1	3/10
Age (years)	56 (29-74)	58 (44-74)	61 (29-68)	57(43-63)	40 (29-61)
Weight (kg)	62 (49-77)	60 (55-74)*	71 (63-77)#	55 (49-60)	62 (50-95)
Diabetes duration (years)	38 (14-44)	25 (14-36)	34 (15-44)	26 (20-32)	-
HbA1c (%)	7.5 (5.9-9.6)	7.1 (5.2-8.1)*	8.1(7.2 -8.7)	7.5 (8.1-7.1)	-
Glucose fasting level (mg/dl)	160 (57-241)	110 (57-234)	119 (62-195)	180 (138-241)	-
Creatinin (µmol/l)	65.2 (48-119.8)	88.5 (56-110)	84 (58-119.8)	52 (48-56)	-
Insulin needs (IU/kg/d)	0.6 (0.3-1.05)	0.5 (0.42-1.05)	0.48 (0.3-0.87)	0.76 (0.56-0.8)	-
Islet Tx alone (n)	14 (74)	6 (75)	6 (75)	2 (67)	-
Islet after kidney Tx (n, %)	5 (26)	2 (25)	2 (25)	1 (33)	-
Graft follow-up (months)	48 (12-60)	59 (45-60)	60 (30-60)	60 (12-60)	-
Graft ummunogenicity					
HLA mismatches	Negative	Negative	Negative	Negative	-
Autoantibodies (n patients)					
Anti GAD	7	2	3	2	-
Anti IA2	2	1	1	0	-
Immunosuppression					
Depleting induction (n, %)					
Rituximab/ Daclizumab	5 (26)	2 (25)	2 (25)	1 (33)	-
Tymoglobulin	14 (74)	6 (75)	6 (75)	2 (67)	-
Maintenance regimen (n, %)					
CNI + Sirolimus	5 (26)	6 (75)	6 (75)	2 (67)	-
CNI + MMF	14 (74)	2 (25)	2 (25)	1 (33)	-

Values are expressed as median and interquartile range (IQR). Routine blood tests, as well as pancreatic and kidney function tests, were performed using standard clinical methods.

**: p <0.05 (S vs. PS); #: p <0.01 (PS vs. F).*
CNI: calcineurin inhibitor: HV: healthy volunteers; MMF: mycophenolate mofetil; HLA: human leukocyte antigen; HbA1c: glycated hemoglobin; M/F: male/female; Tx: transplantation; GAD: anti- glutamic acid decarboxylase; IA2: anti-tyrosine phosphatase

Table 2: Time delay between the initial microvesicle (MV) elevation and the subsequent β-score decrease for partial graft success and failure subsets.

MVs	Days to drop of the β-score median (range)
Insulin secreting β-cells PSA-NCAM$^+$-MVs	42.5 (29 - 150)
liver cells ASGPR$^+$-MVs	55.8 (31.8 - 118.8)
Endothelial cells CD105$^+$-MVs	78.9 (60 - 216)
Monocyte/macrophages CD14$^+$-MVs	87.6 (70.2 - 102)
Neutrophils CD66b$^+$-MVs	94.2 (66 - 102)
T 8 lymphocytes CD8$^+$-MVs	126 (70.2 - 266.4)
T 4 lymphocytes CD4$^+$-MVs	147 (37.8 - 196.2)
Procoagulant MVs Annexin V$^+$-MVs	86.1 (30 - 145.8)

Values are expressed as days (median and interquartile range, IQR).
Annexin V$^+$: Procoagulant MVs; PSA-NCAM$^+$-MVs: beta cell-derived MVs; CD66b$^+$-MVs: neutrophil; CD14$^+$-MVs: monocyte cell-derived MVs; CD4$^+$-MVs: T helper and CD8$^+$-MVs cytotoxic T: cell-derived MVs; ASGPR$^+$-MVs: hepatic MVs; CD105$^+$ -MVs: endothelial cell-derived MVs.

Figure 1:

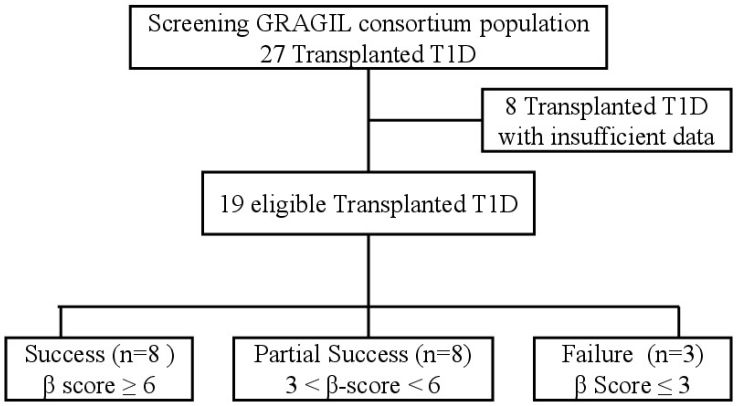

Screening GRAGIL consortium population
27 Transplanted T1D
8 Transplanted T1D
with insufficient data
19 eligible Transplanted T1D
Success (n=8)
β score ≥ 6
Partial Success (n=8)
3 < β-score < 6
Failure (n=3)
β Score ≤ 3

Figure 2:

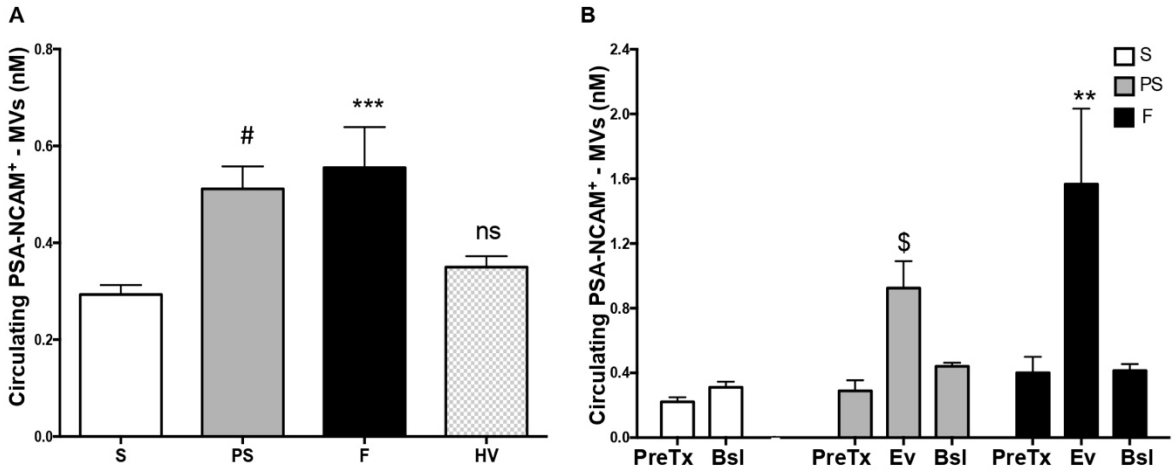

A
Circulating PSA-NCAM+ - MVs (nM)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
#
***
ns
S
PS
F
HV
B
Circulating PSA-NCAM+ - MVs (nM)
0.0
0.4
0.8
1.2
1.6
2.0
2.4
$
**
S
PS
F
PreTx
Bsl
PreTx
Ev
Bsl
PreTx
Ev
Bsl

Figure 3:

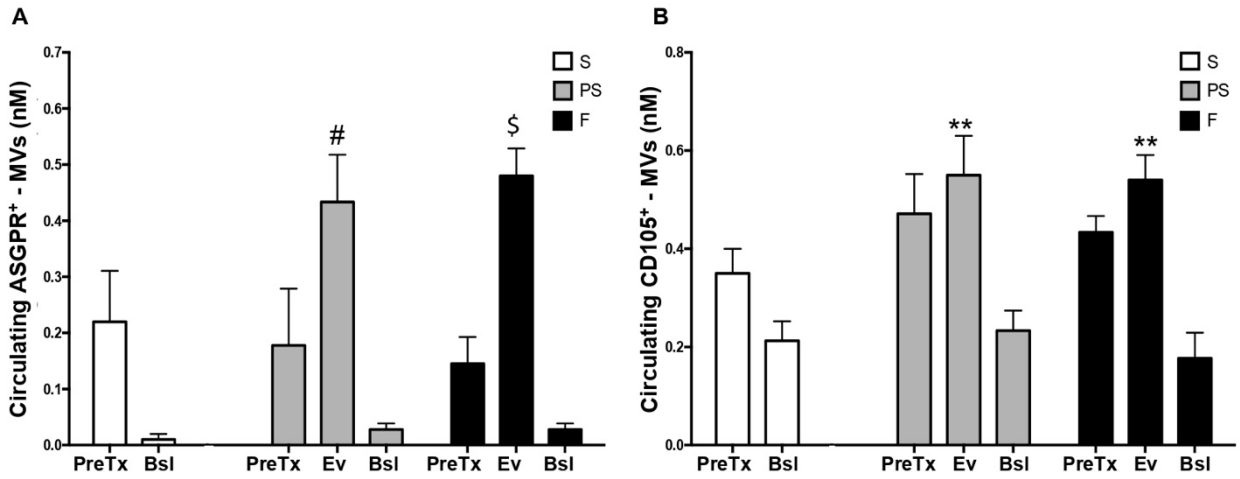

A
Circulating ASGPR+ - MVs (nM)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
S
PS
F
#
$
PreTx
Bsl
PreTx
Ev
Bsl
PreTx
Ev
Bsl
B
Circulating CD105+ - MVs (nM)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
S
PS
F
**
**
PreTx
Bsl
PreTx
Ev
Bsl
PreTx
Ev
Bsl

Figure 4:

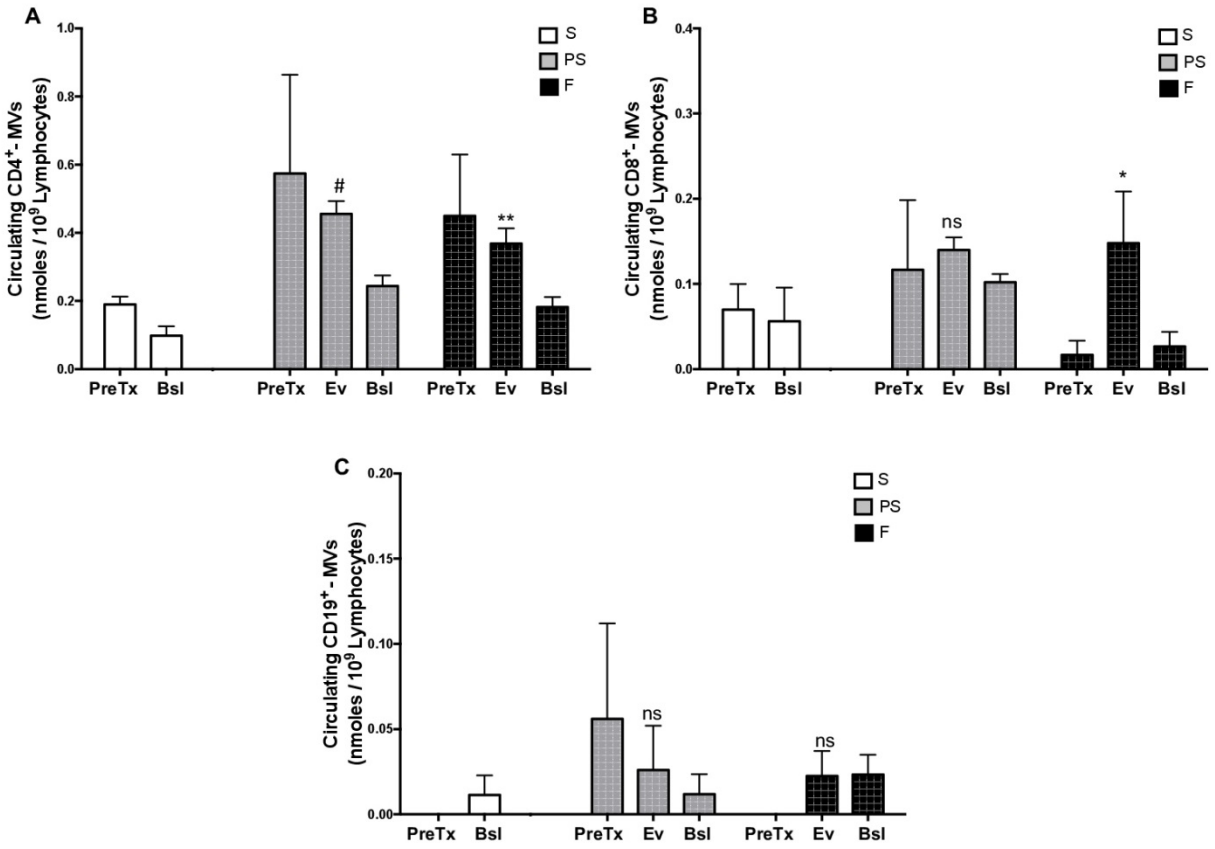

A
Circulating CD4+- MVs (nmoles / 10^9 Lymphocytes)
S
PS
F
#
**
PreTx
Bsl
PreTx
Ev
Bsl
PreTx
Ev
Bsl
B
Circulating CD8+- MVs (nmoles / 10^9 Lymphocytes)
ns
*
C
Circulating CD19+- MVs (nmoles / 10^9 Lymphocytes)
ns
ns

Figure 5:

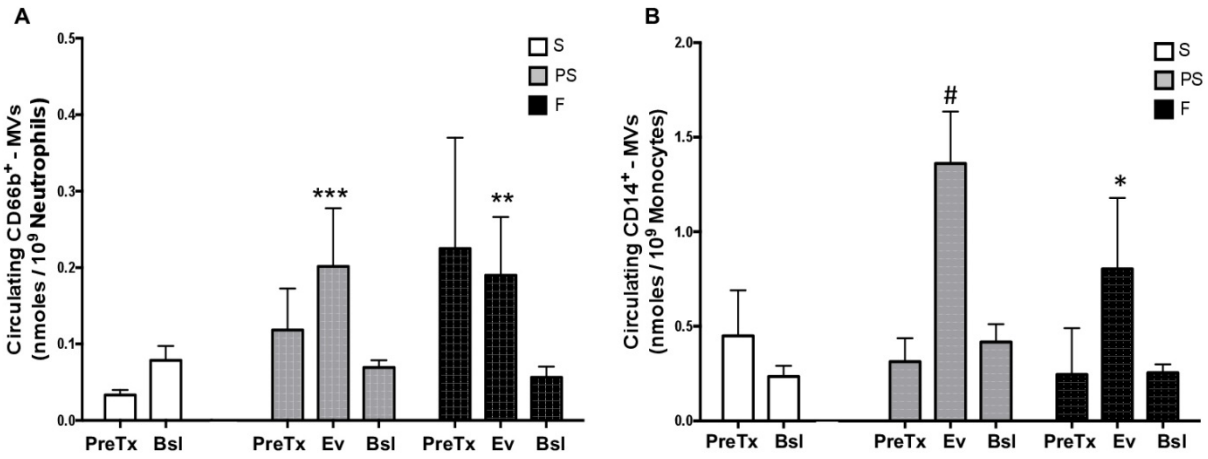
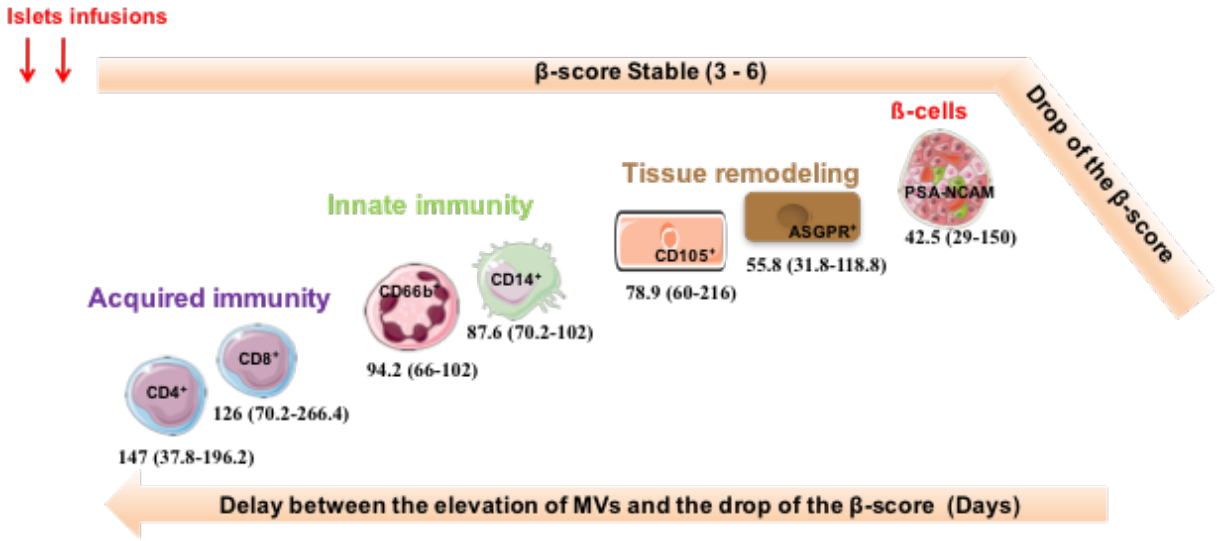

A
Circulating CD66b+ - MVs
(nmoles / 10^9 Neutrophils)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
S
PS
F
***
**
PreTx
Bsl
PreTx
Ev
Bsl
PreTx
Ev
Bsl
B
Circulating CD14+ - MVs
(nmoles / 10^9 Monocytes)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
S
PS
F
#
*
PreTx
Bsl
PreTx
Ev
Bsl
PreTx
Ev
Bsl

Figure 6:


Islets infusions
β-score Stable (3 - 6)
Drop of the β-score
ß-cells
PSA-NCAM
42.5 (29-150)
Tissue remodeling
CD105+
ASGPR+
55.8 (31.8-118.8)
78.9 (60-216)
Innate immunity
CD66b+
CD14+
87.6 (70.2-102)
94.2 (66-102)
Acquired immunity
CD8+
CD4+
126 (70.2-266.4)
147 (37.8-196.2)
Delay between the elevation of MVs and the drop of the β-score (Days)

Revised version AJT-O-18-01478

Supporting information

Supplemental Methods and Data

Pre-transplantation demographic values and biological characteristics of the 8 excluded patients.

No patients were excluded on the basis of their biological or clinical characteristics at baseline pre-transplantation. The pre-transplantation demographic values and biological characteristics of the 8 excluded patients are listed in the table below, showing the similarity between their baseline values and those from the 19 non-excluded patients (Supp Table 1).

The eight patients were excluded from the final analysis because of post-transplant clinical complications that precluded a complete harvest of the data, lacking data we therefore considered « missing »: The post-transplantation follow-up period of the excluded patients was shorter than the 48 months determined in the study design to assess the prognosis value of MVs and the patients' complications are known to alter the levels or circulating MVs. During the follow up period, one patient died from a malignant tumor of excreto-billiary origin and chronic renal disease stage 5, two cystic fibrosis patients received a combined lung-islet transplant, changing their transplantation status with respect to the study design, 2 combined renal islet recipients with hemorragic complications and islet loss after first infusion could not be retransplanted owing to renal acute renal rejection, one was diagnosed a breast cancer, another Basedow disease, and finally one had cardiovascular issues necessitating angioplasty and stent implantation.

Patients' allocation according to the β-score, and comparison with β-2 and Igls scores

Our pilot study, was designed to allocate islets transplanted DT1 patients to three clinical subsets corresponding to their overall clinical status, namely success, or partial or complete failure of the graft. To ensure that the beta score was not a bias to the allocation, we examined

whether the use of the Igls (1) or β-2 (2) scores, that both introduce intermediate clinical status as compared to the β-score, would modify the patients' distribution among the 3 subsets. As shown in the Supplemental Table 2, now added to the manuscript, there was no modification of the patients' allocation using either score. This observation is on-line with the recent report (2), demonstrating that the β-2 score, as a continuous variable, and the β-score, as a discontinuous variable, are highly correlated ($r= 0.99$, $p < 0.01$).

The recalculated β-2 score values of the cohort spanned three β-2 score brackets. Patients from the partial success subset (β-score between 3 and 6) had a median β-2 score value of 15, one of the lowest value able to detect glucose intolerance and insulin independence, according to Forbes and coworkers. At the opposite, patients with a β-score between 6 and 8 (graft success) showed a β-2 score median value of 25, considered by Forbes and coworkers to characterize a full graft function (2) Altogether, the correlation value between β-2 and β scores was (0.9 $p < 0.0001$) determined from 323 paired values measured on separated monitoring occasions and for each subset (Supp Figure 1 and Supp Table 2).

Design of the sampling schedule with respect to islet infusion and induction of immunosuppression

Islet recipients received 11,000 islet equivalents per kg body weight in 1-3 infusions, depending on the number of IEQ available per preparation. The original Edmonton steroid-free protocol was common to both the GRAGIL (3) and TRIMECO immunosuppressive regimens used in this cohort (3, 4). Two different regimen of immunosuppressive induction steps, depending on the patients' status were applied in our cohort: In 14 of the 19 patients, induction was performed using Thymoglobulin, having a half-life of 22 days and a negligible therapeutic effect after 3 months approximatively.

In the 5 islets and kidney transplanted patients, induction was performed by a combination of Rituximab and Daclizumab, that has a half-life of 3 days and an approximate negligible therapeutic effect after 12 days. Of note the induction of the immunosuppressive regimen was performed only once at the first islet infusion and kidney transplantation was always performed before islet injection (1 to 3 years before).

Of note, the first MVs measurements were performed only 2 months after the last islet infusion in all patients, in order to avoid a major artefactual release of MVs consecutive to the transplantation procedure (injection of donor cells and MVs), or an incidence of the immunosuppressive induction. In our cohort, the first assessment of MVs was performed with a time delay post first islet injection that was at distance from the induction procedure with median values of 10.6 months [4.6-18.3], 9 months [5.4-18.2] subset, 10.4 months [11.8-17.8] in the Success, Partial Success, and Failure subsets respectively.

Blood sampling for MV quantification

Peripheral vein blood samples withdrawn in vacuum tubes containing 129mM sodium citrate (9:1 volume ratio), were processed within 60 min. Platelet Poor Plasma (PPP) containing circulating MVs was obtained by double centrifugation at 1500g for 15 min followed by 13000g for 3 min at room temperature, then immediately frozen and stored at -80°C, according to recommendations of the International Society of Thrombosis and Haemostasis.

MV quantification by prothrombinase assay and characterization of their cell origin

Total MV concentration was determined by taking advantage of the MV ubiquitous phosphatidylserine exposure using biotinylated annexin-5, a protein with high affinity for phosphatidylserine (Phtdser), insolubilized onto streptavidin-coated microtitration plates (Roche Diagnostics, Deutschland). To circumvent any possible interference from trace amounts of prothrombinase enzymes, PPP were thawed and incubated prior to measurement for 10 min at room temperature with 5µM d-phenylalanyl-proly-arginyl chloromethyl ketone and 5µM 1.5

dansylglutamylglycylarginyl chloromethyl ketone (PPACK, Dns- GGACK, Merck, Darmstadt, Germany), two irreversible inhibitors of thrombin and Factor Xa (FXa), respectively at room temperature. Captured MVs were measured by prothrombinase assay (5). In this assay, blood clotting factors (FXa, FVa, FII) and calcium concentrations are determined to ensure that PhtdSer borne by MVs is the rate-limiting parameter in the generation of soluble thrombin from prothrombin. Recalcified PPP (100µl) were further incubated within the microtitration plate for 1h at 37 °C. After three washings using Tris buffer saline containing 1mM Cacl2 and 0.05% Tween (TTBS-Ca), purified human coagulation factors were incubated at 71pM FXa (Hyphen Biomed, France), 167pM FVa (Sekuisu, USA) and 1.2µM prothrombin (Hyphen-BioMed, Paris, France) in 2mM CaCl2 in TBS for 10 min at 37°C. Thrombin generation was assessed by the cleavage of a specific chromogenic thrombin substrate (PNAPEP0216 0.38 mM final concentration, Cryopep, Montpellier, France) using a microplate spectrophotometric reader set to kinetic mode, at 405nm (Versamax, Molecular Devices, Wokingam Berkshire, UK).

Results were expressed as nanomolar PhtdSer equivalents (nM PhtdSer eq.) by reference to a standard curve spanning 0.1-30 nM PhtdSer and established using liposomes of known composition (33% w/w PhtdSer and 67% w/w PhtdChol) and concentration (5).

To determine MV cell origin, PPP were incubated onto specific biotinylated antibodies instead of annexin-5 (1µg protein/well) and directed against T-helper cells (anti-CD4), cytotoxic T-cells (anti-CD8), B lymphocytes (anti-CD19), monocytes (anti-CD14) (all from Leinco, St Louis, Missouri, USA), activated neutrophils (anti-CD66b; BD Bioscience, San Jose, USA) and endothelial cells (anti-CD105; R&D Systems, Minnesota, USA). The MV concentration was obtained for each cell origin by subtracting the OD values measured using the isotype biotinylated control immunoglobulin (BD Bioscience, San Jose and USA).

Characterization of MV graft and liver origin by ultrasensitive prothrombinase assay

MVs were washed and concentrated in 500µl 140mM NaCl 10mM Hepes buffer, using a double centrifugation step (14000g, 1h, 4°C), and further insolubilized by incubation for 60 min at 37°C onto biotinylated antibodies to ß-cell (anti-PSA-NCAM, eBioscience, San Diego, USA) or hepatocyte cell (anti-ASGPR, BD Bioscience, San Jose, USA). After 3 washings in TTBS-Ca, purified human coagulation factors, namely 71pM FXa (Hyphen Biomed, France), 167pM FVa (Sekuisu, USA), 1.2µM prothrombin (Hyphen BioMed, Paris, France) were incubated at 37 °C in 2mM $CaCl_2$ in TBS for 20 min at 37°C before addition of PNAPEP0216. Isotype biotinylated control immunoglobulins (IgM, eBioscience, San Diego, USA; IgG, BD Bioscience, San Jose, USA) were used to determine the final MV concentration. Results were expressed as nanomolar PhtdSer equivalents (nM PhtdSer eq.) by reference to a standard curve spanning 0.09-5 nM PhtdSer and established using liposomes of known composition (33% w/w PhtdSer and 67% w/w PhtdChol) and concentration (5).

References

1. Rickels MR, Stock PG, de Koning EJP, Piemonti L, Pratschke J, Alejandro R et al. Defining Outcomes for beta-cell Replacement Therapy in the Treatment of Diabetes: A Consensus Report on the Igls Criteria From the IPITA/EPITA Opinion Leaders Workshop. Transplantation 2018;102(9):1479-1486.

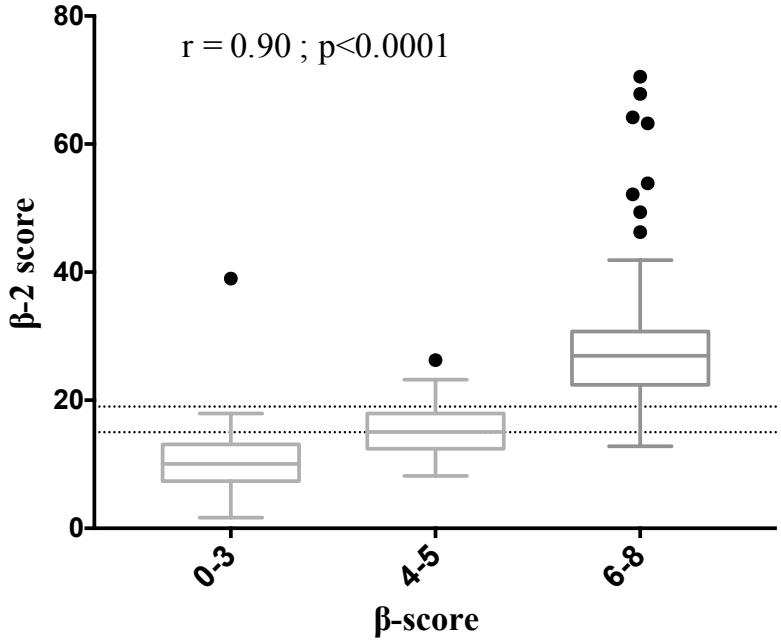
2. Forbes S, Oram RA, Smith A, Lam A, Olateju T, Imes S et al. Validation of the BETA-2 Score: An Improved Tool to Estimate Beta Cell Function After Clinical Islet Transplantation Using a Single Fasting Blood Sample. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2016;16(9):2704-2713.

3. Lablanche S, Borot S, Wojtusciszyn A, Bayle F, Tetaz R, Badet L et al. Five-Year Metabolic, Functional, and Safety Results of Patients With Type 1 Diabetes Transplanted With Allogenic Islets Within the Swiss-French GRAGIL Network. Diabetes care 2015;38(9):1714-1722.

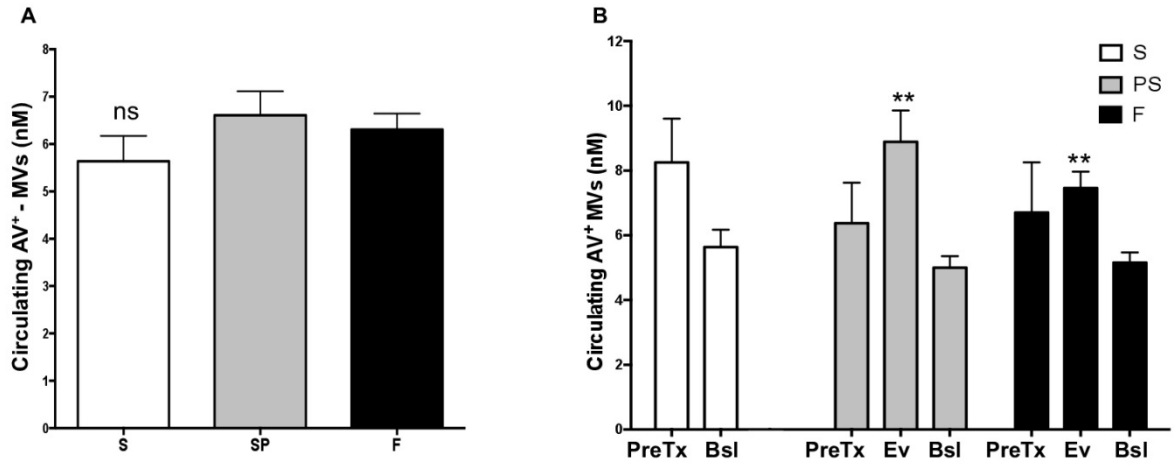
4. Lablanche S, Vantyghem MC, Kessler L, Wojtusciszyn A, Borot S, Thivolet C et al. Islet transplantation versus insulin therapy in patients with type 1 diabetes with severe hypoglycaemia or poorly controlled glycaemia after kidney transplantation (TRIMECO): a multicentre, randomised controlled trial. Lancet Diabetes Endocrinol 2018;6(7):527-537.

5. Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM. Measuring circulating cell-derived microparticles. J Thromb Haemost 2004;2(10):1846-1847.

Supplemental Tables and Figures



Supplemental Figure 1: Correlation between β and β-2 scores within the cohort.
The correlation value was determined from 323 paired values measured on separated monitoring occasions and for each subset namely, Success (6-8), Partial Success (4-5) and Failure (0-3).



Supplemental Figure 2: Cumulative values and variation range of circulating AV^+-MVs in transplanted patients with success, partial graft success or failure.

(A) Mean of cumulative MVs longitudinal values measured 10-12 separate times/patient in each subset. Data is presented as means of all individual values including elevation and baseline values during the follow-up period (48 months).
(B) MVs were measured within one month prior to transplantation (PreTx) at maximum elevation (Ev) and baseline (Bsl) following last islet infusion (10-12 samples/patient).

S: Success; PS: Partial Graft Success; F: Graft Failure; HV: healthy volunteers
p= *ns (PS vs. S) or (F vs. S)*
** *p <0.01 (Ev vs. Bsl; PS) or (Ev vs. Bsl; F)*

Supplemental Table 1: Pre-transplantation demographic values and biological characteristics of the 8 excluded patients.

Variables	Transplanted T1D	Excluded subjects	*P*
N	19	8	-
M/F(n)	10/9	5/3	-
Age (years)	56 (29-74)	56.5 (30-70)	0.55
Weight (kg)	62 (49-77)	58.15 (50-78)	0.78
Diabetes duration (years)	38 (14-44)	27 (17-44)	0.32
HbA1c (%)	7.5 (5.9-9.6)	8.5 (6.1-10.5)	0.01
Glucose fasting level (mg/dl)	160 (57-241)	180 (67-274)	0.11
Creatinin (µmol/l)	65.2 (48-119.8)	99.6 (56-157)	0.06
Insulin needs (IU/kg/d)	0.6 (0.3-1.05)	0.69 (0.44-1.09)	0.15
Islet Tx alone (n)	14 (74)	3 (37.5)	-
Islet after kidney Tx (n, %)	5 (26)	3 (37.5)	-
Islet after lung Tx (n, %)	-	2 (25)	-

Values are expressed as median and interquartile range (IQR). Routine blood tests were performed using standard clinical procedures. *Tx: Transplantation*

Supplemental Table 2: Patients allocation according to β, β-2, and Igls scores.

	β-score	β-2 score	Igls-score
Patients 1 to 8	**Success**	**Superior graft function**	**Optimal & good**
Score	6 - 8	27.54 (20.27 - 70.51)	NA
HbA1c (%)	5.5 (4.1 - 6.8)		6.5 ≤ HbA1c < 7
Severe hypoglycemia (Events/year)	None		None
Insulin requirement (IU/kg/d)	0 (0 - 0.09)		No (Optimal)/ <50% Baseline (Good)
C-peptide	2.1 (1 - 3.3)		> Baseline
Patients 9 to 16	**Partial Success**	**Partial graft function**	**Marginal**
Score	4 - 5	15.46 (10 - 26.26)	NA
HbA1c (%)	7 (6.1 - 8.6)		≥ 7.0
Severe hypoglycemia (Events/year)	0.5 (0 - 1)		< Baseline
Insulin requirement (IU/kg/d)	0.24 (0.10 - 0.42)		≥ 50% Baseline
C-peptide	1.4 (0.62 - 2.5)		> Baseline
Patients 17,18,19	**Failure :**	**Poor graft function**	**Failure**
Score	0 - 3	9.59 (1.68 - 16.97)	NA
HbA1c (%)	8.1 (6.3 - 9.6)		Baseline
Severe hypoglycemia (Events/year)	0.5 (0 - 2)		Baseline
Insulin requirement (IU/kg/d)	0.40 (0.25 - 0.73)		Baseline
C-peptide	0.16 (0.1 - 0.45)		Baseline

β-2 and Igls scores are calculated at each monitoring time, over the entire follow-up period. Recorded severe hypoglycemic events were summed for the first two years following the drop of the β-score in accordance with Igls scoring. The number of patients with hypoglycemic events was 5 and 2 in the PS and F subsets, respectively.

Supplemental Table 3: Pre-transplantation biological characteristics of islet transplanted.

Variables	Transplanted T1D	Success	Partial Success	Failure
N	19	8	8	3
Hemoglobin (g/l)	14.5 (9.8-15.6)	13.5 (11.5-13.5)	13.6 (12.5-15.4)	14.7 (13.9-15.6)
Total leukocytes count (10^9/L)	6.79 (4.06-10.24)	6.79 (4.5-6.79)	5.7 (5.5-5.6)	7.1 (4.06-10.24)
Neutrophils (10^9/L)	3.82 (2.46-13.58)	4.78 (3.3-13.58)	3.23 (2.46-4.8)	4.16 (2.7-5.71)
Lymphocytes (10^9/L)	1.57 (0.22-3.51)	0.83 (0.22-2.14)	2.37 (1.15-2.37)	2.04 (1.1-3.51)
Monocytes (10^9/L)	0.42 (0.2-0.81)	0.31 (0.23-0.62)	0.42 (0.41-0.44)	0.4 (0.2-0.81)
Eosinophils (10^9/L)	0.12 (0.02-0.95)	0.11 (0.02-0.65)	0.14 (0.1-0.31)	0.4 (0.1-0.95)
Basophils (10^9/L)	0.05 (0.01-0.09)	0.03 (0.01-0.09)	0.06 (0.02-0.06)	0.07 (0.01-0.08)
Platelets count (10^9/L)	255 (171-533)	209 (171-533)	324 (190-361)	242 (192-350)

Values are expressed as median and interquartile range (IQR). Routine blood tests were performed using standard clinical procedures.

Supplemental Table 4: Characteristics of humoral alloimmune responses after islet grafting.

	Success	Partial Success	Failure
Recipients with de novo DSA (patients) / Total recipients	(2)/8	(3)/8	(1)/3
DSA specificity of all events (n)			
HLA I	-	4	2
HLA II	3	-	-
Intensity of the highest DSA			
MFI sum	2942 ± 644	4001 ± 1806	3137 ± 358
Delay of de novo DSA appearance months (Median)			
Post-injections	18.1 (1.36 - 64.64)	1.83 (0.03 - 41.2)	165.16 (149.79 - 165.16)
Drop of the β- score	-	-32.83 ; +3.50	- 72.87 ; -88.27

HLA-I conversion was recorded as a number of events with mean highest DSA fluorescence intensity. The median delay following the last islet injection is indicated with respect to the drop of the β-score. The apparition of de novo antibodies occurred either before the drop of the β-score (positive values) or after the drop of the β-score (negative values). DSA conversion appeared in 3 patients of the PS subset and in 1 patient of the F subset.
Among the eight patients categorized as graft success, two had HLA-II DSA. One individual exhibited DSA within the 18 months post-transplantation, followed by another occurring 4 years later. The second patient exhibited DSA one-month post-last infusion, which remained stable during the whole follow-up period. Of the eight PS patients, three exhibited one single HLA-I DSA: one patient 41.2 months after first infusion and 32 months after the β-score decrease, another patient 2 months after last injection, followed by the β-score decrease 45 days later, and the last patient had a 3-month long DSA from the 11th day after the first islet injection, while the β-score value remained 6 before dropping 6 months after the second injection.
Of the three patients categorized in the F subset, only one individual exhibited HLA-I DSA, at 150 months and 165 months following islet injection, and at 6 and 8 years after the β-score decrease, respectively.

DSA: donor-specific anti-HLA antibody; MFI: mean fluorescence intensity

Supplemental Table 5: Characterization of autoantibodies pre and post islet transplantation.

	Success	Partial Success	Failure
Pre-Tx autoantibodies (patients) / Total recipients			
Anti GAD	(2)/8	(3)/8	(2)/3
Anti IA2	(1)/8	(1)/8	(0)/3
Increment of initial autoantibodies Post-Tx (patients) /Total recipients ; Months to β-score drop [duration]			
Anti GAD	(1)/2 ; 0	(1)/3 ; -34.3 [-41.3 to -16.9]	(0)/3
Anti IA2	0	(1)/1 ; -60	(0)/3
De novo autoantibodies PostTx (patients) / Total recipients ; Months to β-score drop			
Anti GAD	(2)/6 ; 0	(1)/5 ; -60	0
Anti IA2	(2)/7 ; 0	(1)/7 ; -60	(1)/3 ; -60 ; +15.6

Autoantibodies levels were recorded before and after transplantation. Post-transplantation values were considered positive either as increment of initial baseline and /or as *de novo* occurrence.
Incremented and de novo *a*ntibodies were detected either before the drop of the β-score (positive values) or after the drop of the β-score (negative values).

GAD (anti- glutamic acid decarboxylase) auto- antibodies (normal range: < 1 kU/L), IA2 (anti-tyrosine phosphatase) auto- antibodies (normal range: < 1 kU/L). Tx: Transplantation.

Supplemental Table 6: Variations of lymphocyte count and circulating $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$-MVs in transplanted patients pre- and post-last islet infusion.

	Success		Partial Success			Failure		
	PreTx	Bsl	PreTx	Ev	Bsl	PreTx	Ev	Bsl
Total Lymphocyte count (10^9/L)	2.01 ± 0.08	0.77 ± 0.25	2.03 ± 0.31	1.16 ± 0.17	0.91 ± 0.05	2.56 ± 0.49	1.03 ± 0.08	0.97 ± 0.04
$CD4^+$-MVs (nM)	0.27 ± 0.03	0.15 ± 0.05	0.35 ± 0.09	0.39 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.36 ± 0.08	0.54 ± 0.02	0.24 ± 0.05
$CD8^+$-MVs (nM)	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.04	0.07 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.38 ± 0.04	0.10 ± 0.04
$CD19^+$-MVs (nM)	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.03	0.06 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.02

Total lymphocytes and MVs were measured within one month prior to transplantation (PreTx), at maximum elevation (Ev), and at baseline (Bsl) following last islet infusion (10-12 samples/patient). Values are expressed as mean ± standard error mean (S.E.M.).

IV. Limites et perspectives de l'étude pilote MIPIL

L'analyse statistique de l'étude longitudinale réalisée par le professeur Meyer (Laboratoire de biostatistique et informatique médicale, Université de Strasbourg) en utilisant un modèle de survie (fonctionnalité ou non du greffon) avec variables dépendantes du temps (valeur de MV-PSA-NCAM$^+$) à l'aide du logiciel R (package Permalgo), a permis de calculer avec le test statistique de Monte Carlo qu'une cohorte de 40 patients est nécessaire afin de valider la valeur prédictive des MV-PSA-NCAM$^+$ comme biomarqueurs précoces et non invasifs du rejet de greffe d'îlots intraportale avec une puissance de 92% (Tableau 5).

Tableau 5: Nombre de patients nécessaires pour valider les MV-PSA-NCAM$^+$ en tant que marqueur du dysfonctionnement du greffon des îlots.

	Cohort				
Number of measurements	**25**	**30**	**35**	**40**	**50**
6	0.7386	0.805	0.8588	0.8972	0.954
8	0.7496	0.8245	0.8772	0.9104	0.9586
10	0.7564	0.8289	0.8813	0.9192	0.9611
12	0.7602	0.8335	0.8873	0.9216	0.9659

Génération de données aléatoires (package PermAlgo du logiciel R) censurée dans un modèle de survie avec des variables dépendantes du temps.

L'étude MIPIL a permis de déterminer la faisabilité de scores ou de seuils pathologiques de MVs circulantes caractérisant le rejet humoral, cellulaire, ou la dysfonction totale du greffon. Les seuils peuvent être statistiquement validés dans une étude ancillaire de la cohorte multicentrique STABILOT. Cette étude nationale multicentrique contrôlée, ouverte, randomisée compare l'efficacité métabolique de la transplantation d'îlots au traitement diabétologique optimisé chez des patients DT1 transplantés ou en attente de greffe : 30 patients randomisés pour la greffe d'îlots immédiate *vs*. différée (traitement diabétologique optimisé) + 10 greffes d'îlots immédiates. (cf article)

La perspective d'une caractérisation d'un profil cellulaire signant les différents processus d'activation susceptibles de contribuer à la dysfonction du greffon devrait faciliter le monitoring des patients et orienter les recherches sur les causes aigues et les mécanismes chroniques d'altérations cellulaires et vasculaires à l'origine de la perte de fonction des îlots greffés de manière à identifier de nouvelles cibles pour la protection du greffon au long-cours et son pré-conditionnement cytoprotecteur.

Partie II

Approche méthodologique pour l'étude des MVs tissulaires chez l'homme et le rat

I. Contexte

Si les MVs circulantes sont des marqueurs d'atteinte vasculaire et de dommage tissulaire en transplantation, peu d'études comparent la composition des MVs circulantes et tissulaires, notamment en raison des difficultés d'isolement des MVs tissulaires. Mon travail a consisté à optimiser l'isolement des MVs des plaques athéromateuses et de tissus aortique, à caractériser les MVs et certaines de leurs propriétés d'effecteur endothélial.

I. 1 MVs intra plaque chez les patients présentant une sténose carotidienne opérable.

I.1.1 Rationnel de l'étude POMEGA

Parce qu'une plaque carotidienne vulnérable est une cause d'accident vasculaire cérébral (AVC) et de morbi-mortalité importante, sa stabilisation constitue un objectif thérapeutique. Outre la prise en charge pharmacologique associant statine (hypolipémiant), inhibiteur de l'enzyme de conversion (antihypertenseurs) et antiagrégants plaquettaires, l'endartériectomie carotidienne est le traitement chirurgical du patient asymptomatique avec sténose > à 70%.

Un complément du traitement médicamenteux usuel serait la consommation d'acides polyinsaturés à chaînes longues n-3 (oméga 3) reconnue pour avoir un effet bénéfique sur les maladies cardiovasculaires. En effet, la consommation d'huiles de poisson permet de réduire dans des modèles animaux le développement de la maladie athéromateuse (Shimokawa, Aarhus et al. 1988, Degirolamo, Kelley et al. 2010). Chez les patients non traités par les statines, l'administration d'oméga 3 diminuait le risque secondaire de survenue d'un infarctus du myocarde ou d'événements cardiovasculaires (Harris, Tintle et al. 2018).
La diversité des formulations d'oméga 3 peut expliquer l'hétérogénéité des résultats des essais cliniques et en particulier le rapport EPA : DHA. Ainsi, le bénéfice d'Omacor® EPA : DHA (1,2 :1) 1 g par jour, est reconnu par une AMM dans le traitement post-infarctus en prévention d'athérothrombose secondaire, et de 2 g à 4 g en cas d'hypertriglycéridémie.

La formulation optimisée en oméga 3 du laboratoire Pivotal Therapeutics (Vascazen™ ; EPA :DHA 6:1) est associée à une amélioration du profil lipidique avec une baisse significative de 48% des triglycérides, une augmentation de 9% des HDL sans répercussion sur le niveau des LDL ni de la CRPus (Etude REVEAL) sur 655 patients hypertriglycéridémiques traités 4g par jour pendant 8 semaines (Shaikh, Yantha et al. 2014). De manières intéressante, dans une première étude pilote du laboratoire sur143 patients

atteints de maladies cardiovasculaires, Vascazen™ (4g par jour) réverse rapidement le déficit en oméga 3 (48,9% des patients à 2 semaines, 82,2% à 4 semaines et de 84,4% à 6 semaines), ce qui lui a permis d'obtenir le statut de « Medical Food ». Dans l'étude REVEAL, le déficit a été confirmé comme indépendant de l'âge, du sexe et du profil triglycéridique à l'aide du test Omega-Score™ qui mesure 39 acides gras sanguins. Chez 89 % des 655 patients l'Omega-Score™ indique une valeur moyenne de EPA+DHA+DPA (acide docosapentaenoique) de 3,4% ± 1,3 alors que sa valeur moyenne chez les patients à haut risque cardiovasculaire varie entre 2,1% et 4,3%. Comparativement, un Omega-Score™ entre 6,1% et 10,2% correspond à un risque faible de mortalité cardiovasculaire, de 5,2% à 6,1% pour un risque modéré et de 4,3% à 5,2% un risque important (Albert, Campos et al. 2002).

I.1.1.1 Mécanismes protecteurs des oméga 3

Les oméga 3 auraient une action favorable sur le profil lipidique en diminuant la concentration de triglycérides mais aussi la réponse pro-inflammatoire, les troubles du rythme, l'agrégation plaquettaire, et l'athérogenése. Sur le plan cellulaire, ils améliorent la dysfonction endothéliale, un événement précoce du développement de la plaque (Kromhout, Yasuda et al. 2012), et de la dégradation du tonus vasculaire. En effet, les oméga 3 induisent la formation du NO par activation PI3-kinase/Akt dependante de la eNOS favorisant ainsi la vasorelaxation endothélium-dépendante d'artère coronaire de porcs, avec une relaxation supérieurs en présence d'EPA : DHA (6 :1) comparativement à EPA : DHA (1:1)(proche de celle de l'Omacor®) (Zgheel, Alhosin et al. 2014).

I.1.1.2 Intérêt des oméga 3 pour la modulation des MVs intra-plaque

Parce que dans des modèles murins et chez l'homme les MVs apparaissent comme une cible pharmacologique pour limiter l'évolution pathologique des tissus (cf. chapitre MVs tissulaires), les oméga 3 sont des candidats potentiels de la modulation de la biogenèse intra-plaque des MVs en agissant sur la composition des membranes cellulaires et des voies de signalisation lipides-dépendantes.

En effet, dans un modèle murin combinant athérosclérose et stéatose hépatique non alcoolique, une réduction d'environ 50 % de la concentration tissulaire des MVs du sinus aortique a été observée en réponse à un traitement court par un fénofibrate (Baron, Leroyer et al. 2011). Dans un modèle d'IR myocardique aigue chez le rat, un bolus d'oméga-3 intraveineux (0,2 g / kg de poids corporel) EPA : DHA (6 :1), administré après une ischémie de 30 min avant reperfusion diminuait significativement les taux circulants de MVs

endothéliales $CD54^+$ signature d'atteinte endothéliale (9,1 ± 2,5 *vs.* 4,8 ± 2,0 nM Eq PhtdSer, P <0.05) (Burban, Meyer et al. 2016). Ces données soulignent que le dommage vasculaire responsable de la libération des MVs dans la lumière ou dans la paroi des vaisseaux est accessible à la modulation pharmacologique et notamment à l'oméga 3.

L'étude POMEGA permettra de confirmer cette hypothèse par la confrontation des mesures des MVs circulantes et intra-plaque, et la caractérisation de leurs origines cellulaires. Une des retombées cliniques potentielles sont l'accès à un outil de suivi de l'évolution de la vulnérabilité de la plaque et l'établissement d'un nouveau score de risque incluant la cause cellulaire de son évolution. Par ailleurs, l'étude déterminera l'effet des oméga 3 sur les paramètres pro-inflammatoires, prothrombotiques et proapoptotiques de la plaque et les médiateurs cellulaires favorisant la rupture de plaque (protéases et protéolyse péricellulaire).

I.1.2 Caractérisation de la cohorte de patients (étude POMEGA)

L'étude randomisée monocentrique évaluera l'impact d'une supplémentation par une formulation optimisée et riche en oméga 3 EPA : DHA (6 :1) (Vascazen™ ; 4 g/jour pendant) sur la composition des plaques d'athérome après 6 semaines de traitement chez 96 des patients avec sténose > à 70% asymptomatique, en sus du traitement usuel et juste avant l'endartériectomie carotidienne.

I.1.2.1 Objectifs de l'essai

L'objectif principal de l'étude POMEGA est de démontrer une diminution de 40 % de la concentration moyenne de MVs totales intraplaques après 6 semaines de traitement par Vascazen™.

Les objectifs secondaires sont d'évaluer dans la plaque l'effet d'un traitement par Vascazen™ sur : les concentrations des MVs intraplaque d'origine endothéliale (MVs CD105+/$CD31^+$), leucocytaire (MVs $CD11a^+$), érythrocytaire (MVs $CD235^+$), macrophagique (MVs $CD68^+$) et plaquettaire (MVs $GBIb^+$), l'activité pro-oxydante, pro-coagulante, pro-angiogénique et protéolytique, les marqueurs de la réponse inflammatoire et de la sénescence, ainsi que l'imprégnation en oméga 3. Ces valeurs seront confrontées aux valeurs circulantes pour établir un éventuel potentiel diagnostique.

I.1.2.2 Population étudiée

Critères d'inclusion

- Hommes et femmes entre 30 et 85 ans
- Sujets affiliés à un régime de sécurité sociale

- Sujets ayant signé un consentement éclairé
- Sujets ayant été informés des résultats de la visite médicale préalable
- Indication d'une endartériectomie carotidienne pour sténoses asymptomatiques de plus de 70%
- Femmes en âge de procréer (test de grossesse négatif), contraception efficace durant toute la durée de l'étude

Critères de non inclusion

- Impossibilité de donner au sujet des informations éclairées (sujet en situation d'urgence, difficultés de compréhension du sujet, …)
- Patient traité par Omacor®
- Patient sous anticoagulant oraux (AVK, apixaban, dabigatran, rivaroxaban)
- Consommation quotidienne d'huile de poisson (complément alimentaire à base d'huile de poisson (oméga 3))
- Resténose carotidienne
- Grossesse (test de grossesse positif) et allaitement
- Hypersensibilité au poisson
- Sujet sous sauvegarde de justice ou sous tutelle ou curatelle

Le recrutement actuel de la cohorte POMEGA 45 patients sur 96 prévus est inférieur aux prévisions initiales et ne permettra pas d'analyser les résultats dans le cadre de cette thèse. Toutefois, à titre comparatif nous avons initié la caractérisation du contenu protéique et cellulaire de la plaque par Western Blot et immunohistochimie chez des patients avec des sténoses carotidiennes non traités par Vascazen™ afin de disposer de données de références et de valider le protocole d'extraction des MVs intra-plaque chez l'homme (Schéma, figure 34).

I.2 MVs aortiques chez les rats traités par EPA : DHA (6 :1)

L'étude des effets pharmacologiques des EPA : DHA (6 :1) sur la composition des MVs des parois aortiques offre l'avantage de conditions contrôlées pour l'optimisation du protocole d'extraction des MVs, indépendamment du recrutement des patients et de possibles facteurs confondants retrouvés chez l'homme et susceptible de limiter l'évaluation de la modulation pharmacologique. Bien qu'il n'y ait pas de modèle de rat athérothrombotique, cette espèce à été préférée au modèle ApoE KO murin pour des raisons évidentes de masse tissulaire nécessaire à la mise au point du protocole d'extraction utilisant de nombreuses mesures de MVs dans les étapes préliminaires.

Pour mimer la dysfonction vasculaire du patient ayant une sténose carotidienne, l'étude a été réalisée chez des rats Wistar âgés (20 mois, 900g) comparés à des rats jeunes (12 semaines, 380g). Les MVs ont été extraites de la crosse aortique (flux oscillatoire et zone de sénéscence endothéliale), et l'aorte abdominale (flux lamimaire).

L'effet des EPA : DHA (6 :1) à été examiné dans différentes zones du territoire vasculaire, formulations et durées de traitement par gavage. Il a été comparé aux oméga 6 apportés par l'huile de maïs et au placébo (H_2O). Pour confirmer un effet spécifique des oméga 3 sur l'activabilité des cellules de la paroi aortique, des anneaux aortiques ont aussi été stimulés *ex-vivo* par un stress oxydant (H_2O_2) ou un par un influx calcique (A23187), afin d'estimer la capacité maximale de génération de MVs aortiques.

L'effet des EPA : DHA (6 :1) sur les propriétés pro-sénescentes des MVs aortiques a été examiné après 48 heures d'incubation sur des CE primaires.

Résultats

II.1 : Approche méthodologique pour l'étude des MVs tissulaires chez l'homme

- **Validation d'un nouveau protocole d'isolement des MVs à partir de la plaque d'athérosclérose humaine au cours de l'endartériectomie carotidienne.**

- **Caractérisation de la plaque d'athérome chez les patients avec sténose carotidienne : MVs, marqueurs thrombotiques et d'instabilité.**

II.1.1 Validation d'un nouveau protocole d'isolement des MVs à partir de la plaque d'athérosclérose humaine chez les patients avec sténose carotidienne

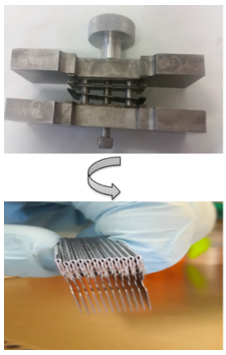
La mise au point du protocole de découpage de la plaque d'athérosclérose humaine a été la première étape de mon travail, puisque les données de la littérature ne s'accordent pas sur un protocole standardisé, adapté au recueil optimisé des MVs conservant leurs propriétés de bio-marqueurs et d'effecteurs.

Après avoir donné leurs consentements éclairés les 17 patients ont été inclus dans le protocole. La répartition des sexes (H/F) était de (5/10) avec une médiane d'âge de 72 ans (59 - 87 ans) et la médiane de poids de plaque carotidienne était de 1030 mg (230 - 1480 mg).

II.1.1.1 Outils de la phase pré-analytique

Différentes méthodes de la littérature ont été proposées combinant la digestion enzymatique (collagénase, d'élastase et d'inhibiteur de trypsine) et découpage mécanique de la plaque (Rosenfeld, Khoo et al. 1991). Leur inconvénient principal est l'utilisation d'enzymes susceptibles de générer des MVs artéfactuelles et dont les traces résiduelles après lavage sont capables d'activer les CE. Cette méthode peut conduire à un défaut de caractérisation des MVs exposant des antigènes sensible à la protéolyse et à une interprétation faussée des capacités effectrices des MVs et de leur modulation pharmacologique.

La digestion mécanique à l'aide d'un mixeur électrique le Polytron® E1600 conçue pour le déchiquetage des matériaux fibreux a été écartée, elle induit la rupture cellulaire qui pourrait nuire à la pureté des MVs en générant des débris et des vésicules en provenance de compartiments intracellulaires.



Par ailleurs, l'utilisation d'un vibratome s'est révélée décevante en raison de la nature du tissu lipidique de la plaque empêchant le découpage (consistance molle), de plus cette technique nécessite la fixation du tissu frais sur un socle à l'aide de colle acrylique dont les effets les MVs est inconnu.

Nous avons adapté le concept d'un découpage par succession de lames de rasoirs fixes et espacées de 1mm, quand a utilisé par le Pr. Nelly Boehm du laboratoire (Institue d'Histologie, Université de Strasbourg). Ce dispositif permet de sectionnement sans congélation ou enrobage, la viabilité cellulaire étant maintenue dans des conditions strictes de températures, stérilités et durée de la phase pré-analytique du tissu frais. La reproductibilité du découpage est assurée par l'espacement et le nombre de lames standardisés. Elle est supérieure à celle du découpage par ciseaux qui est expérimentateur dépendant.

II.1.1.2 Validation de la méthode de découpage de la plaque

La méthode retenue (dispositif à lames de rassoir et tissu frais) à été comparée à 2 autres traitements pré-analytiques des l'échantillons.

- Inclusion de la plaque fraiche en OCT, congélation et découpage au cryostat en sections de 150 µm.
- Congélation en azote liquide de la plaque fraiche et broyage mécanique.

Dans tous les cas, la plaque humaine est préalablement immergée en HBSS stérile (solution tamponnée saline de Hank) sans calcium et sans magnésium, dans l'heure qui suit la chirurgie.

Après rinçages par passage successifs de la plaque dans des bains de HBSS pour éliminer les érythrocytes et cellules circulantes ayant adhéré puis séchage, la plaque est pesée et scindée au niveau du core lipidique en 3 fragments.

Dans cette approche comparative, les fragments de plaques ont été immergés, quelque soit la méthode dans le milieu d'extraction pendant 60 min (DMEM stérile contenant 100 UI streptomycine + 100UI penicilline + 250 µg/ml fungizone) sur une roue à tube d'hématologie pérmétant une agitation douce avec retournement (17 rpm). Après une première centrifugation (800g, 15min à 20°C) pour éliminer les fragments du tissu athérosclérotique, le surnageant contenant les MVs a été soumis à 2 centrifugations (13000g, 5min à 20°C) successives nécessaires à l'élimination des cellules et des débris cellulaires résiduels par sédimentation. Le dernier surnageant de centrifugation riche en MVs est alors centrifugé à haute vitesse (14000g, 90min à 4°C) afin d'obtenir un culot concentré en MVs de plaque (Schéma, figure 34).

Les résultats ont montré une différence statistiquement significative de rendement d'isolement des MVs mesurées par dosage fonctionnel prothrombinase après capture sur Annexin-5 (Hugel, Zobairi et al. 2004). L'impact du traitement pré-analytique sur l'efficacité de l'extraction est estimé à partir des valeurs mesurées dans le surnageant de la dernière centrifugation et dans le culot correspondant obtenus dans des volumes standardisés.

Les quantités de MVs isolées à partir de plaque fraiche découpé avec les lames de rasoirs sont le double de celles isolés à partir du broyat plaque congelée (109,0 ± 5,775 *vs.* 52,85 ± 0,9991 ; P< 0.0001 ; N=6). Les MVs de plaque incluses en OCT étaient indétectables (0,5333 ± 0,4842 N=6). Il est probable que la congélation et/ou l'inclusion en OCT a favorisé la lyse cellulaire et la génération de débris. Cette hypothèse à été confirmée par l'observation sous microscope de nombreux débris dans les surnageants de 2^{éme} centrifugations (13000g, 5min à 20°C) (Figures 32).

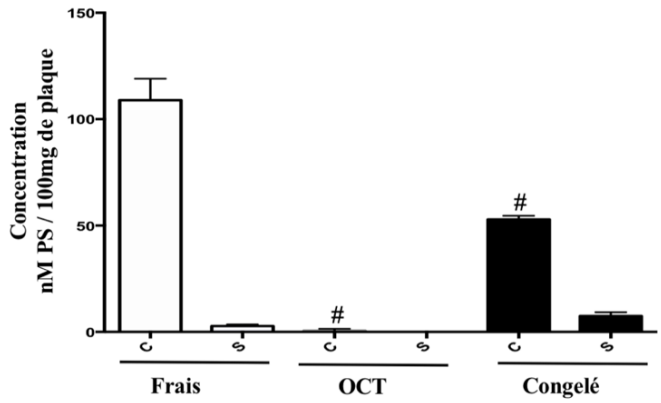


Figure 32 : Quantité de MVs isolées selon la phase pré-analytique.

Les concentrations sont mesurées dans les suspensions finales réalisées dans des milieu et volume identiques. Les valeurs sont rapportées à 100 mg de plaque initiale.

 # : (OCT, congelé) vs. Frais p<0.0001, C : Culot, S : Surnageant.

II.1.1.3 Optimisation du rendement de purification des MVs

Le premier paramètre d'optimisation est le temps d'extraction des MVs. Le deuxième concerne le degrés d'enrichissement par centrifugations qui sont aussi des causes de perte de propriétés des MVs au cours du temps et des remises en suspension successives (oxydation les lipides et activations des enzymes résiduelles).

Pour réduire le temps de phase pré-analytique l'élimination de la première centrifugation (800g, 15min à 20°C) a été évaluée puisque la décantation par pipetage était réalisable du fait de la taille importante des fragments (1 mm d'épaisseurs). Cette option est infructueuse puisque même 90 min d'incubation dans le milieu d'extraction ne suffissent pas pour obtenir les quantités obtenues en présence de cette centrifugation (Figure 33).

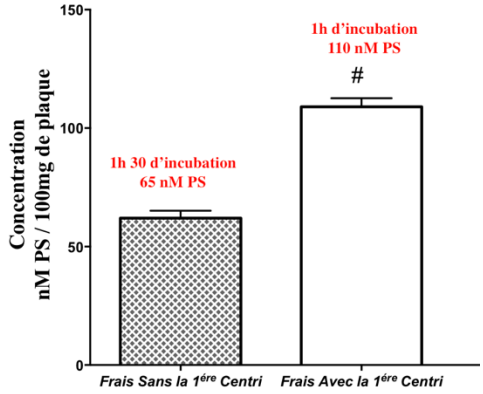


Figure 33 : Impact de la première centrifugation sur le rendement d'extraction des MVs isolées de plaques découpées par lames de rasoirs.

Les concentrations sont mesurées dans les suspensions finales réalisées dans des milieu et volume identiques. Les valeurs sont rapportées à 100 mg de plaque initiale.

 # : Avec vs. Sans la première étape de centrifugation ; p<0.0001

La plupart des données de la littérature, sur l'isolement des MVs par centrifugation différentielle sont méthodologiquement disparates et concernent principalement les MVs circulantes. Si les vitesses et durées ont beaucoup varié avant les recommandations des sociétés savantes alors qu'elles déterminent la la capacité de sédimentation qui s'évalue par le produit (g x min), aucune des méthodes préconisées n'est accompagnée de données sur l'efficacité de l'enrichissement du culot en MVs : 13000g, 30 min (Pfister 2004),

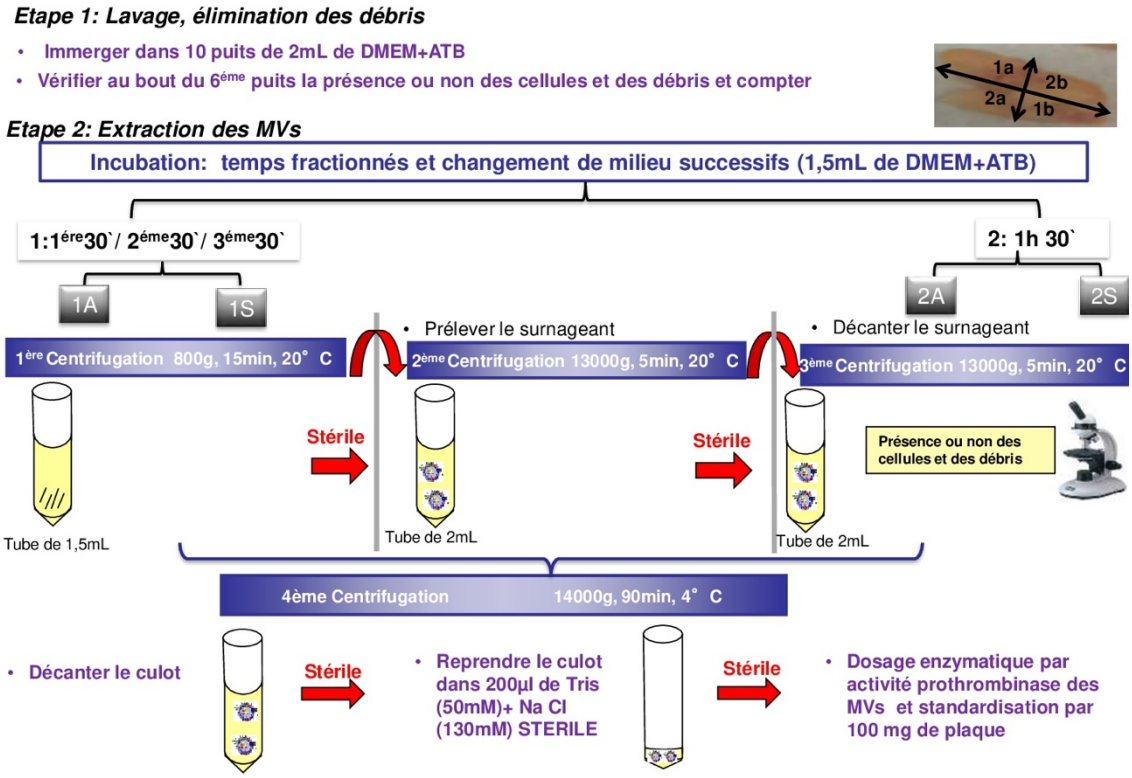


Figure 34 : Optimisation des temps d'incubation pour l'extraction des MVs.

F-1A : Incubation fractionnée 3 fois 30 min puis mesure après protocole standard d'isolement (4 centrifugations). F-2A : Incubation non fractionnée 90 min puis mesure après protocole standard d'isolement (4 centrifugations). F-1S : Incubation fractionnée 3 fois 30 min puis mesure en omettant la 1^{ére} centrifugation du protocole standard d'isolement (3 centrifugations). F-2S : Incubation non fractionnée 90 min puis mesure en omettant la 1^{ére} centrifugation du protocole standard d'isolement (3 centrifugations).

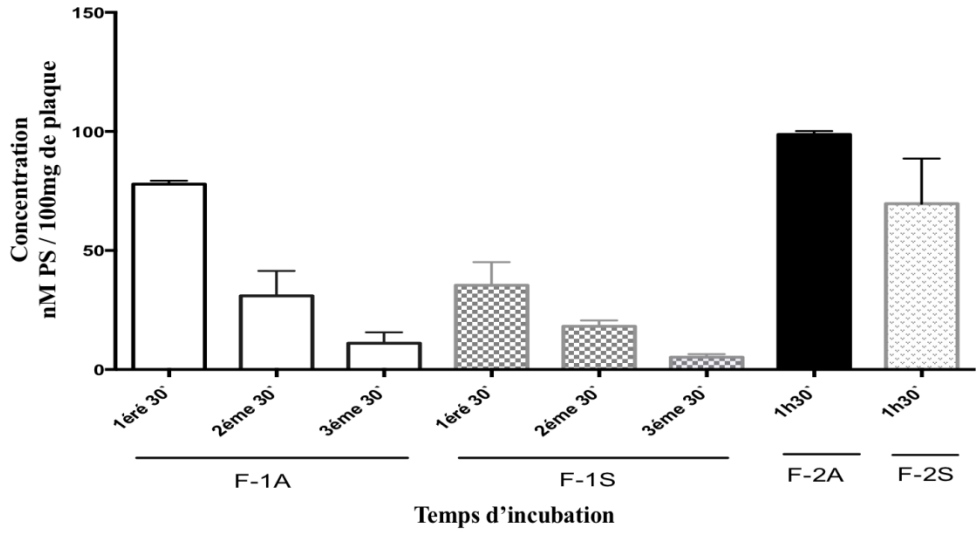


Figure 35 : Cinétique de libération des MVs par la plaque dans les 90 premières minutes d'incubation dans le milieu d'extraction.

17500g 30 min (Vanwijk, Svedas et al. 2002) ou encore 22000g,60 min (Biro, Sturk-Maquelin et al. 2003). Seule Leroyer et ses collaborateurs ont estimé un rendement de purification d'environ 50% des MVs de la plaque (Leroyer, Isobe et al. 2007).

Pour étudier l'impact de la durée d'incubation dans le milieu d'extraction sur le rendement de purification des MVs, le temps d'incubation standard de 90 min à été fractionné en 3 fois 30 min avec changement du milieu d'extraction après chaque incubation de 30 min. Les MVs ont été isolées par les 4 centrifugations successives selon le protocole standard (Schéma, figure 34). Les résultats montrent que la majorité des MVs sont extraites dés les 30 premières min d'incubation, et que chaque incubation ultérieure des fragments tissulaires se traduit par la récolte d'environ 45% supplémentaires. Ces données indiquent une cinétique rapide de libération des MVs de plaque. De plus, la somme des valeurs de MVs extraites en 3 fois 30 min est sensiblement identique à celle obtenue par une incubation unique de 90 min (76,7 + 21,9 + l5 = 113,6 *vs.* 100,5), suggérant un faible degré de recapture par le tissu au cours de cette incubation (Figure 35). Par ailleurs, la suppression de la première centrifugation (800g, 15 min, 20°C) du protocole d'isolement standard (Figure 35 ; F1S) ne modifie pas la cinétique de libération des MVs de la plaque, confirmant qu'il s'agit d'un processus strictement dépendant du traitement pré-analytique du tissu (découpage, milieu d'extraction, température, temps incubation et rapport poids / volume).

Nous avons vérifié l'impact d'une incubation supplémentaire de 30 min sur le rendement d'extraction des MVs de la plaque. Les résultats montrent que cette incubation se traduit par l'extraction de seulement 5% de MVs supplémentaires, estimés négligeables au vu du temps total de préparation (2h30`) susceptible d'altérer les propriétés des MVs sans bénéfice quantitatif important. Par ailleurs, les pertes de MVs dans le surnageant sont négligeables quelque soit la durée totale d'incubation (1,5%-2%) (Figure 36).

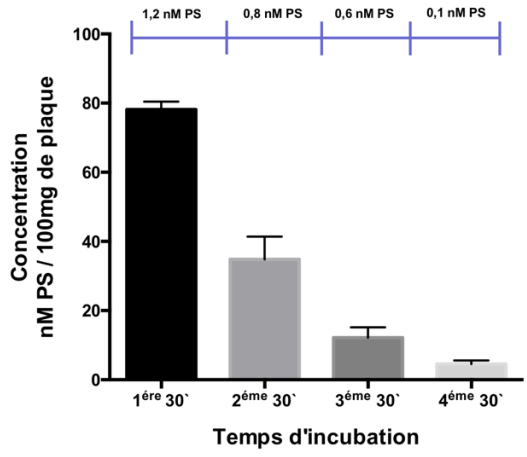


Figure 36 : Impact de la durée d'incubation sur le rendement de purification des MVs de la plaque.

Les valeurs au dessus du trait bleu sont celles des MVs résiduelles dans le dernier surnageant du protocole.

En conclusion, le protocole optimisé d'isolement de MVs de plaques fraîches a un rendement de purification de 95% à partir de 100 mg de tissu et les MVs purifiées sont indemnes de débris.

La méthode est fondée sur :

- **Une procédure standardisée et extemporanée de découpage sans congélation ni inclusion. C'est une méthode douce ne générant que peu de stress susceptible d'induire une émission de MVs artéfactuelles (Figure 37).**
- **Une extraction par immersion des fragments (100mg) dans 1,5mL de DMEM+ATB sous une rotation douce sur roue.**
- **Un isolement par 4 centrifugations différentielles standardisées.**

Le protocole permet de plus l'étude de la cinétique de libération des MVs par les tissus, c'est à dire de leurs capacités à libérer des MVs. Nous avons exploité l'extraction fractionnée (3 fois 30 min) pour étudier l'impact des oméga 3 sur cette capacité. (cf. MVs d'aorte de rats traités par oméga 3 EPA : DHA 6 :1).

La robustesse de ce protocole à été confirmée dans les travaux publiés par Abbas et ses collaborateurs comparants les contenus en MVs de plaques d'athéromes de 8 sujets coronariens et celui d'artères mammaires de sujets subissant un pontage coronarien. En effet ces artères sont connues pour être refractaires aux stimuli athéro-thrombogénique. Les résultats montrent une absence de libération de MVs par l'artère mammaire, comparativement à la libération massive par la plaque. Les données confirment la puissance méthodologique du protocole qui (i) permet l'exploration d'une large gamme des MVs tissulaires importantes pour les études pharmacologiques et (ii) ne génère pas de MVs artéfactuelles à partir de tissus faiblement émetteur.

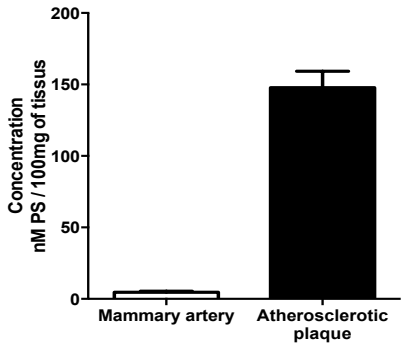


Figure 37 : Mesure des MVs tissulaires d'artères mammaires et de plaques d'athéromes humaines. (Abbas, Jesel et al. 2017).

(# < 0,0001)

II.1.2 Caractérisation de la plaque d'athérome chez les patients avec sténose carotidienne non traités par oméga 3 : MVs, marqueurs thrombotiques et d'instabilité

II.1.2.1 Matériels et méthodes

Patients

Patients en sténose carotidienne supérieure à 70% non traités par oméga 3 (service de chirurgie vasculaire de l'hôpital universitaire de Strasbourg, NHC). (cf. IIA. page 168).

Caractérisations des microvésicules de la plaque d'athérosclérose humaine

Les concentrations en MVs procoagulantes ont été mesurées dans la suspension finale après capture sur Annexine-V ou Ac spécifique par dosage fonctionnel prothrombinase (Hugel, Zobairi et al. 2004) (cf. publication de la section 1). La caractérisation de l'origine cellulaire des MVs a été réalisée en capturant les MVs sur des anticorps biotinylés dirigés contre les antigènes (CDs) des divers types cellulaires avant la quantification par dosage prothrombinase: anti-CD31 biotine (Ref :MHCD3115-4 Invitrogen USA), anti-CD105 Biotine (Ref : MAB10972 R&D systems USA), des antigènes communs des cellules endothéliales ; anti-CD11a biotine pour l'antigène commun des leucocytes (Ref : C172 Leinco technologies St Louis USA), anti-CD206 pour la population des macrophages (Ref : 555953 BD Bioscience USA), anti-CD235 pout les érythocytaires (Ref : BAM12281 Human Glycophorine A biotinylated de R&D systems US) et les anti-GBIb qui caractérise les plaquettes provenant de chez François Lanza (Etablissement Français de Sang Strasbourg France). La concentration de MVs a été obtenue pour chaque origine cellulaire en soustrayant les valeurs de DO mesurées en utilisant l'istotype contrôle biotinylée Ig G1 (Ref : I128 Leinco technologies St Louis USA).

Contenu protéique des plaques carotidiennes humaines

Le degré d'expression des protéines qui reflètent l'activité pro-coagulante, pro-angiogénique, protéolytique et les marqueurs de la sénescence ou d'apoptose ainsi que la réponse inflammatoire ont étés étudiés dans les lysats de plaque par Western blot.

Le tissus athérosclérotique congelé a été broyé puis les protéines ont été extraites dans un tampon de lysé spécifique (composition en mM : Tris/HCl 20 [pH 7,5], NaCl 150, Na_3VO_4 1, pyrophosphate de sodium 10, NaF 20, acide okadaïque 0,01, Triton X-100 à 1%. (Euromedex, Souffelweyershem, France), un comprimé d'inhibiteur de protéase (complete- Roche). Les protéines (30 µg/ échantillon) ont été séparées selon leur taille par électrophoprése sur gel de

sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide à 8% ou 12% à 100V pendant 2h puis transférées sur membranes de polyvinylidène difluorure (GE healthcare, Vélizy Villacoublay, France) à 100 V pendant 2 h. Les sites de liaison non spécifiques ont été saturés à l'aide d'une solution de blocage à température ambiante avec un tampon TBS (Euromedex) (Solution saline tamponnée au Tris contenant 0,1% de Tween 20 et 3% d'albumine sérique bovine) pendant 1h, les membranes sont ensuite incubées pendant une nuit à 4° C avec un tampon de blocage contenant l'anticorps primaire reconnaissant les protéine humaines et produits chez différents hôtes : FT, monoclonal de souris (1 : 1000, Sekisui Diagnostics, Sekisui Virotech GbmH, Rüsselsheim, Allemagne) ; eNOS, polyclonal de lapin (dilué à 1:1.000, Abcam :ab75639, UK) ; CD31, monoclonal de souris (dilué à 1:1.000, Abcam :ab 9498, UK) ; p16, monoclonal de lapin (dilué à 1:1.000, Abcam :ab51243, UK) ; p21, polyclonal de lapin (dilué à 1:1.000, Abcam :ab 7960, UK) ; p53 (acetyl K381), polyclonal de lapin (dilué 1:1000; Abcam :ab 61241, UK) ; COX-1, monoclonal de souris (dilué1:1000, Cell Signaling Technology,Danvers, MA) ; COX-2, monoclonal de souris (1:500, BD Biosciences, France) ; ICAM1, monoclonal de lapin (dilué à 1:2.000, Abcam :ab 53013, UK) ; VCAM1, monoclonal de lapin (dilué à 1:2.000, Abcam :ab134047, UK) ; MMP2, monoclonal de souris (dilué à 1:1.000, Abcam :ab 86607, UK) ; MMP9, polyclonal de lapin (dilué à 1:1.000, Abcam :ab 38898, UK) ; VEGF, monoclonal de souris (dilué à 1:1.000, Abcam :ab 1316, UK) ; VEGF-R2, polyclonal de lapin (dilué à 1:1.000, Abcam :ab 39256, UK) ; AgII-R1, polyclonal de lapin (dilué à 1:1000, Abcam :ab 124505, UK) ; ACE, polyclonal de lapin (dilué à 1:500, Abbiotec 250450) ; β-tubulin, monoclonal de souris (dilution 1: 8000, Sigma-Aldrich) ; β-actine (dilution 1: 20000, Sigma-Aldrich). Après plusieurs lavages, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires correspondant conjugués à la peroxydase, à température ambiante pendant 60 min (dilution 1 : 5000 d'immunoglobuline G anti-lapin et anti-souris ; Cell Signaling Technology). Des marqueurs pré-colorés (Invitrogen, France) ont été utilisés pour la détermination de la masse moléculaire. Les bandes immunoréactives ont été détectées par chimioluminescence améliorée et leur densité a été analysée à l'aide du système d'acquisition ImageQuant et du logiciel d'analyse (LAS4000 et ImageQuant TL 8.1, Amersham, Royaume-Uni). Les données sont exprimées sous forme de rapport à la protéine de maintenance β-tubuline ou β-actine.

Analyses histologique et morphologique

Les fragments de plaque carotidiennes fixés 72h en Paraformaldehyde (PFA 4%) subiront un protocole de décalcification 24h avec un mélange de Hristensen (acide formique-formiate de

Na) et des déshydratations successives des bains d'alcool (70%, 95% et 100%) puis dans du toluéne avant d'être inclus en bloc de paraffine. Des sections de 5µm ont été colorées à l'hématoxyline-éosine et au trichrome de Gomori. Quatre sections ont été prélevées sur chaque échantillon tous les 100 µm.

Détermination immunohistochimique

Des sections de blocs paraffinés ont été soumises à une restauration d'antigène par micro-ondes dans un tampon citrate de sodium 10 mM (pH 6,0). Après, incubation avec l'anticorps primaire reconnaissant les protéine humaines et produits chez différents hôtes : FT, monoclonal de souris (dilué à 1 : 500, Sekisui Diagnostics, Sekisui Virotech GbmH, Rüsselsheim, Allemagne) et anti-CD68, monoclonal de souris (dilué à 1 : 500, Abcam : ab201340, UK). Après 18h, les antigènes ont été révélés par fixation d'anticorps secondaires anti-Ig G de souris couplé à la Peroxydase (2h) puis révélés par addition de substrat chromogéne (30 min) (Kit VECTASTAIN Elite ABC (Standard), Californie, USA ; kit de révélation VECTOR VIP Peroxydase (HRP), Californie, USA). Les coupes ont été réalisées avec un milieu de montage (Dako S3023, Carpinteria, USA) avant analyse microscopique.

II.1.2.2 Résultats

La plaque d'athérosclérose est un tissu pathologique très riche en MVs procoagulantes d'origines leucocytaire et endothéliale

La concentration des MVs procoagulantes totales (AV^+) libérées en 90 min et par 100 mg de plaque est 250 fois supérieure à celle circulant chez le sujet sain (147,7 ± 11,53 nM *vs.* 6,614 ± 0,37 nM) indiquant l'importance du recrutement des cellules émettrices des MVs et soulignant la focalisation de ces effecteurs thrombogénes dans la paroi carotidienne.

En ce qui concerne l'origine cellulaire, la majorité des MVs présentes dans la plaque dérivent des leucocytes (24,42 ± 12,24 nM) et des cellules endothéliales (33,33 ± 7,8 nM), et sont largement supérieures aux concentrations circulantes (Figure 38).

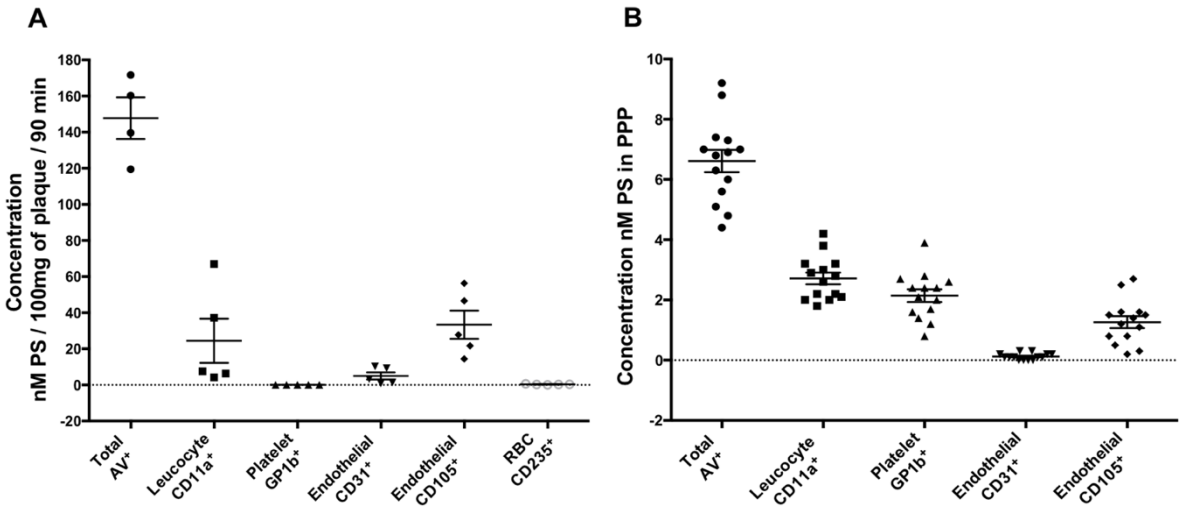


Figure 38 : Caractérisation des MVs de la plaque d'athérome chez les patients avec sténose carotidienne non traités par oméga 3.

A : la plaque carotidienne N=5
B : plasma pauvre en plaquettes (PPP) de sujet sains N=12-14

Au contraire de la description de MVs érythrocytaires intra-plaque par Leroyer (Leroyer, Isobe et al. 2007), nous ne les avons pas détecté. Ceci suggère que la combinaison de notre traitement pré-analytique de la plaque et du nouveau protocole d'isolement limite la contamination érythrocytaire susceptible d'augmenter le bruit de fond.

En revanche, l'absence de MVs dérivées de plaquettes est retrouvée aussi bien par Leroyer que par nous, alors que les laboratoires ont utilisé des anti-corps ciblant différents sites antigéniques plaquettaires. Ces données peuvent surprendre puisque les MVs plaquettaires circulantes sont majoritaires dans la maladie athérothrombotique et en concentration élevée. Néanmoins, de nombreuses MVs plaquettaires sont incluse dans le thrombus en croissance au cour de phase aigue de l'infarctus et sont recrutées aussi dans les agrégats endothéliaux leuco-plaquettaires plasmatiques (Boulanger, Loyer et al. 2017). Parce que les MVs plaquettaires « roulent » sur l'endothélium et déposent RANTES pro-inflammatoire favorisant la diapédèse et le recrutement des macrophages (Mause, von Hundelshausen et al. 2005), on pourrait envisager que ces MVs sont préférentiellement phagocytées par les macrophages.

Plaque carotidienne et marqueurs d'instabilité

En comparant par Western blot le contenu protéique des plaques de 8 patients avec celui des artères mammaires connues pour être peu sensibles au stress vasculaire, on remarque une

forte élévation en facteurs pro-oxydant particulièrement la Cox inductible (d'un facteur 2000), pro-angiogénique (VEGR2 : x 100), protéolytique (MMP2 : x100 ; MMP9 : x5), alors que le eNOS vasoprotectrices chute de 50%, tout comme le marqueur endothélial basolatéral CD31 (Figure 40), suggérant plutôt une abrasion cellulaire qu'une activation endothéliale puisque les concentration de MVs $CD31^+$ étaient très faibles (Figure 38).

Plaque carotidienne et marqueurs d'athérothrombose

Les Western blot révèlent un profil endothélial pro-inflammatoire avec la surexpression de VCAM et ICAM (x100 ou x 5 respectivement vs. Artères mammaires). De plus le FT, AT1R et l'enzyme de conversion de l'enzyme de l'AngII sont surexprimés fortement d'un facteur 3 à 5 indiquant un potentiel pro-coagulant et vasoconstricteur. Ce profil est très évocateur d'une dysfonction endothéliale, d'autant plus qu'il est également associé à la senescence endothéliale. Cette hypothèse est soutenue par la surexpression des protéines p53, p21, p16 impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 41).

L'analyse des plaques par immunohistochimie a confirmé après coloration au trichrome de Masson, une accumulation du cholestérol dans la zone nécrosée de la plaque tandis que la périphérie est fortement fibrosée avec un contenu en collagène important. En accord avec les résultats du laboratoire (Mallat, Hugel et al. 1999), le marquage CD68 montre une accumulation macrophagique dans le cœur lipidique avec un marquage FT partiellement superposé (Figure 39).

Ces données sont proches de celle publiées précédemment par le laboratoire montrant une forte activité FT dans le coeur lipidique et une apoptose centrale principalement illustrée par une grande concentration de MVs et une forte activité prothrombinase centrale (Mallat, Hugel et al. 1999).

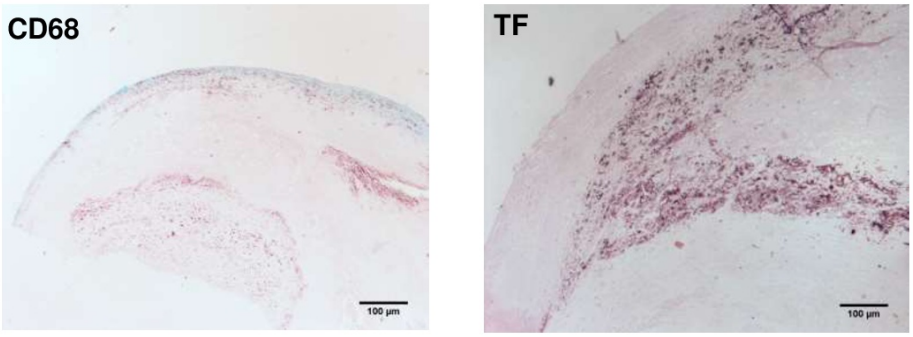


Figure 39 : Analyse immunohistochimique de la plaque carotidienne.

CD68 : marqueur macrophagique ; TF : facteur tissulaire

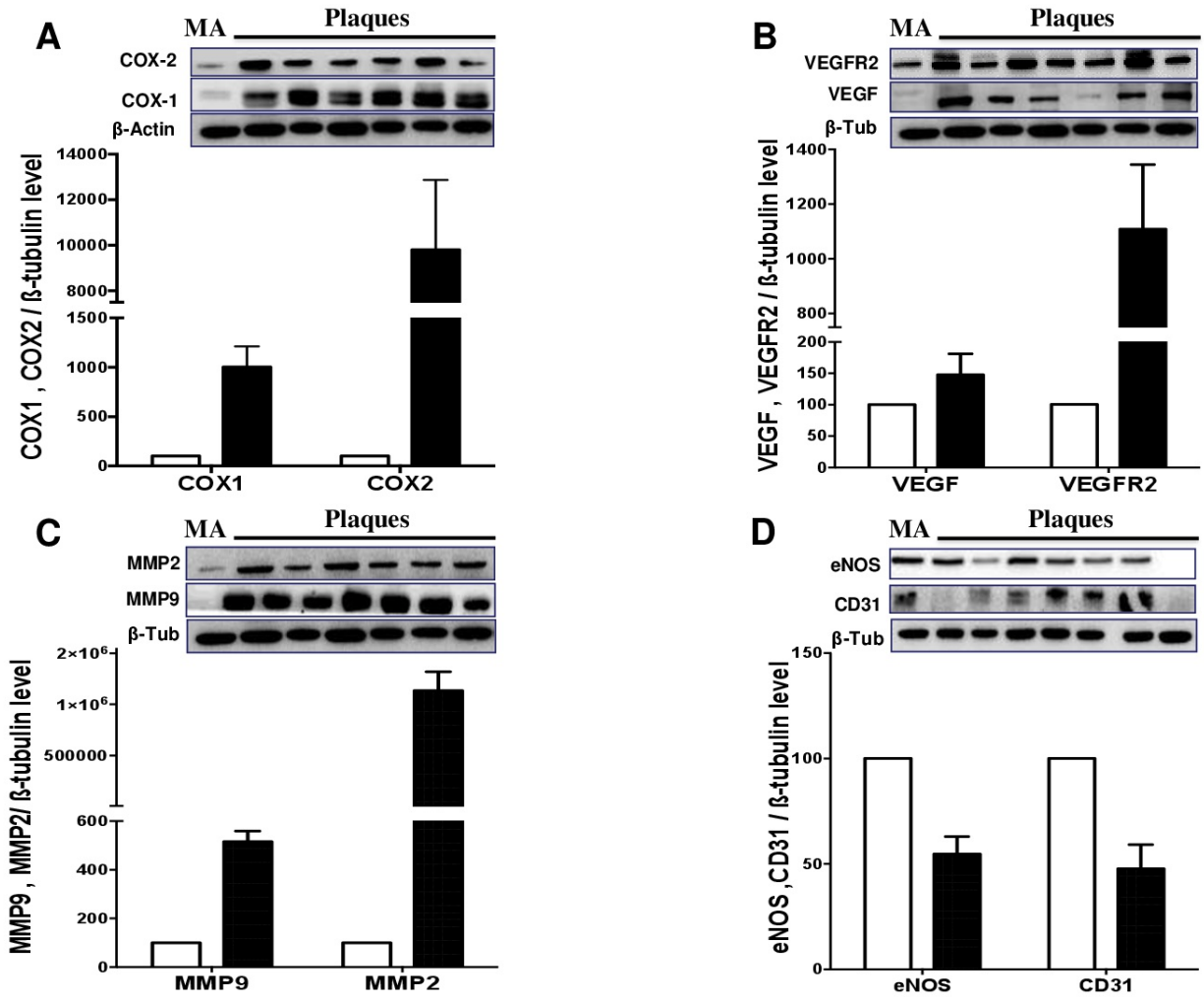


Figure 40 : Caractérisation comparative des marqueurs d'instabilité dans la plaque carotidienne et l'artère mammaire.

Caractérisation par western blot des lysats tissulaires (30 ug / échantillons) d'artère mammaire (barre blanche) et plaque carotidienne (barre noire). Les graphes représentent les valeurs cumulées de N=7 patients avec sténose carotidienne non traités par oméga 3 et N= 3 donneurs différents d'artères mammaires. Les valeurs mesurées dans les plaques sont rapportées à 100% représentant la moyenne des valeurs mesurées dans les artères mammaires. MA : d'artères mammaires
Significativité par le test de Student p<0,0001 plaque vs. artères mammaires

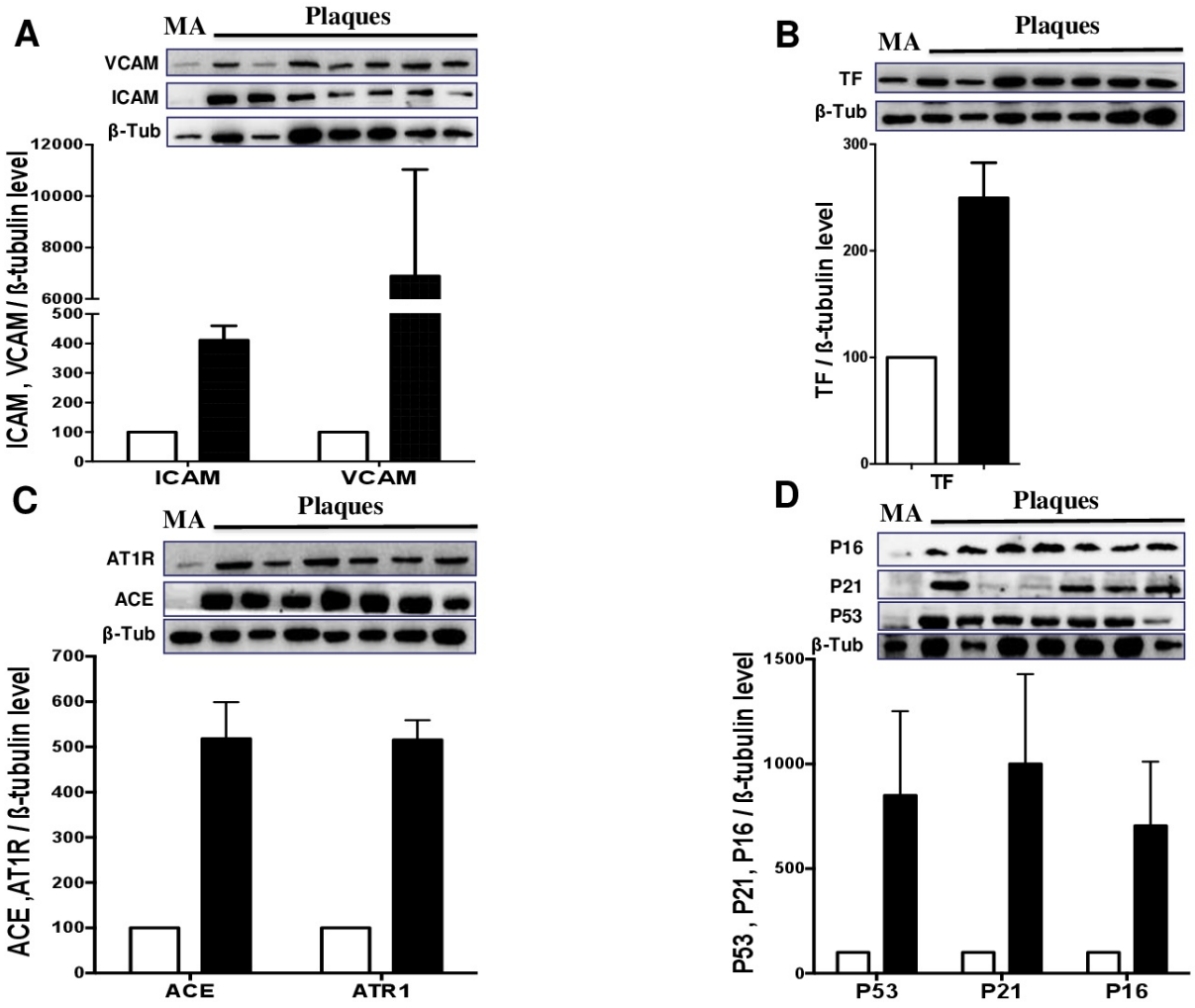


Figure 41 : Caractérisation comparative des marqueurs d'athérothrombose et de senescence dans la plaque carotidienne et l'artère mammaire.

Caractérisation par western blot des lysats tissulaires (30 ug / échantillons) d'artère mammaire (barre blanche) et plaque carotidienne (barre noire). Les graphes représentent les valeurs cumulées de N=7 patients avec sténose carotidienne non traités par oméga 3 et N= 3 donneurs différents d'artères mammaires. Les valeurs mesurées dans les plaques sont rapportées à 100% représentant la moyenne des valeurs mesurées dans les artères mammaires. MA : d'artères mammaires
Significativité par le test de Student p<0,0001 plaque vs. artères mammaires

L'approche méthodologique pour l'isolement optimisé de MVs tissulaires à partir de plaques d'athérothrombose humaines est suffisamment robuste pour l'identification d'un profil de MVs caractéristique de la plaque corroborée par celui du contenu protéique athérothrombogéne de la plaque.

La différence importante des valeurs mesurées entre artères mammaires et plaques carotidiennes souligne la faisabilité d'une étude des modulations pharmacologiques du développement de la plaque.

Résultats

II.2 : Approche méthodologique pour l'étude des MVs tissulaires chez le rat

- **Validation du protocole d'isolement des MVs à partir des aortes de rat jeune.**

- **Impact des EPA : DHA (6 :1) sur l'émission des MVs par différents segments vasculaires dans un protocole d'étude optimisé.**

- **Impact de la formulation en oméga sur l'émission de MVs aortiques par les rats jeunes**

- **Article en préparation: Microvesicles of the aortic wall sense vasoprotection by VascazenTM in aged rats**

II.2.1 Validation du protocole d'isolement des MVs à partir des aortes de rat jeune

Le protocole d'extraction douce des MVs mis au point dans les plaques d'athéromes humaines a été transposé à l'extraction aortique. Une étude préliminaire de la cinétique de libération des MVs par des anneaux d'aorte de taille standardisée a été réalisée chez des rats jeunes de 12 semaines. Les aortes thoraciques ont été soigneusement nettoyées de la graisse adhérente et du tissu conjonctif, et le sang restant a été rincé avec du HBSS sans calcium ni magnésium. Les tissus ont été lavés par du milieu DMEM supplémenté avec des antibiotiques (streptomycine 100 UI + 100 UI de pénicilline) plus 250 µg / ml de fungizone à température ambiante avant d'être pesés. Les tissus aortiques frais ont ensuite été sectionnés à l'aide d'un dispositif contenant une succession de lames de rasoir fixes (1 mm), incubés dans du milieu DMEM stérile additionné d'antibiotiques sur un dispositif de rotation douce (17 rpm / min) à température ambiante pendant (90 min, 4h et 8h), puis centrifugation (800g, 15min à 20°C) pour éliminer les tissus aortiques, le surnageant contenant les MVs a été soumis à 2 centrifugations successives (13000 g, 5 min, 20 °C) pour éliminer des cellules et des débris cellulaires résiduels. Le dernier surnageant riche en MVs centrifugé à haute vitesse (14000g, 90 min, 4°C) permet d'obtenir un culot concentré de MVs lavées. Les MV ont été remises en suspension dans 200 µl de tampon Tris (50 mM) + NaCl (130 mM) et conservées pendant moins d'un mois à 4 ° C en conditions stériles.

Les résultats ont montré une différence significative du degrés d'émission des MVs après 90 min comparativement à 4h (43,99 ± 5,771 *vs*. 19,84 ± 5,364, P< 0,05 ; N=3) et 8h d'incubation (43,99 ± 5,771 *vs*. 6,820 ± 3,120 nmoles PhtdSer /100 mg d'aorte, P< 0,01 ; N=3 (Figure 42).

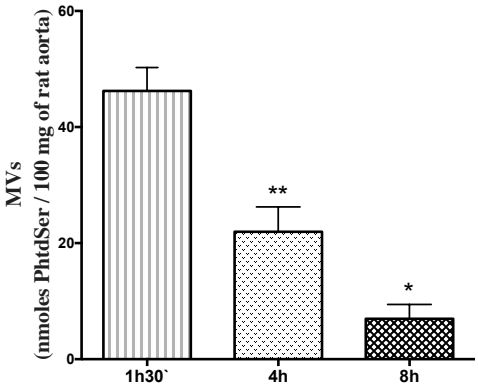


Figure 42 : Cinétique de la libération de MV de l'aorte thoracique de jeunes rats.

Les MV ont été collectées dans 1 ml de milieu d'extraction contenant 1 cm d'aorte coupée en 10 sections de 1 mm et incubées pendant 90 minutes, 4 heures e 8 heures sous rotation douce puis mesurées par dosage de prothrombinase. Les données sont exprimées en nmoles de PhtdSer eq. / 100 mg
***: P <0,01 (90 min vs. 4 h); *: P <0,05 (4h vs. 8h).*

Dans ces conditions, le temps d'extraction retenu pour le protocole optimisé est de 1h30 min. Le rendement de purification est de 99% pour 100 mg de tissu aortique. Le

protocole d'extraction a aussi été confirmé dans l'étude de la modulation pharmacologique des MVs tissulaires (voir ci-dessous et publication).

II.2.2 Impact des EPA : DHA (6 :1) sur l'émission des MVs par différents segments vasculaires dans un protocole d'étude optimisé.

De jeunes rats Wistar mâles (âgés de 12 semaines, 400 à 450 g, Janvier-labs, Le Genest-St-Isle, France) ont été logés dans une pièce à température contrôlée (22 ° C) et maintenus à un cycle lumière / obscurité de 12 h (allumé à 07h00) avec accès libre à la nourriture et à l'eau. Les rats ont été répartis au hasard en deux groupes, ils ont reçu quotidiennement par gavage 500 mg / kg de l'EPA : DHA (6 : 1) (Oméga 3) ou de l'eau pendant 7 jours. L'aorte thoracique et la crosse aortique de chaque groupe ont été nettoyées et incubé pendant 90 min. Les MVs tissulaires ont été isolées en suivant le protocole optimisé décrit et mesurées selon la technique développée au laboratoire (Hugel, Zobairi et al. 2004).

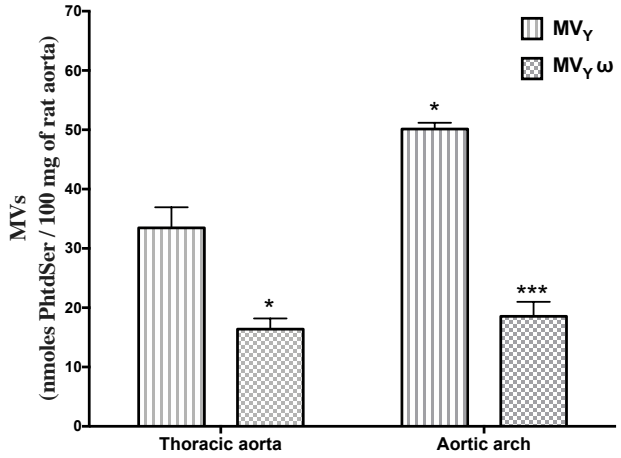


Figure 43 : Les fragments de la crosse aortique des jeunes rats libèrent des quantités supérieures à celles de l'aorte thoracique et les apports d'EPA: DHA (6: 1) réduisent la libération de MV.

Les MV ont été collectées dans une suspension de 1 ml de milieu d'extraction contenant 1 cm d'aorte coupée en 10 sections de 1 mm et incubées 90 minutes sous rotation modérée et mesurées par dosage prothrombinase. EPA: DHA a été administré 7 jours avant l'extraction de MV Les données sont exprimées en nmoles de PhtdSer eq. / 100 mg. MVY: crosse aortique, MVY: aorte thoracique
**: P <0,01 (crosse aortique MV_Y vs. aorte thoracique MV_Y); ***: P <0,001 (crosse aortique $MV_Y\omega$ vs. crosse aortique MV_Y).*

Les résultats ont montré que la crosse aortique de rats jeunes libère des quantités supérieures comparativement à l'aorte thoracique (33,47 ± 3,4 *vs.* 45,80 ± 1,19 nmoles PhtdSer / 100 mg d'aorte de rat ; P <0,05). L'ingestion d'EPA : DHA (6 : 1) a diminué significativement de 50% les MV totales circulantes de l'aorte thoracique et de 65% de la crosse aortique (16,87 ±

1,59, P <0,05 et 18,07 ± 2,74 nmoles PhtdSer / 100 mg, P <0,001; respectivement) (Figure 43). Ces données sont en cohérence avec l'observation au laboratoire que la crosse aortique est une zone de fragilité endothéliale avec sénescence prématuré (thése de M.Kassem, 20 janvier 2017).

Les EPA : DHA (6 : 1) seraient plus efficaces dans les zones vasculaires à risque.

II.2.3 Impact de la formulation en oméga sur l'émission de MVs aortiques par les rats jeunes

Les données de la littérature et du laboratoire indiquent que les EPA : DHA (6 :1) induisent la formation du NO par activation de la eNOS favorisant ainsi la vasorelaxation endothélium-dépendante d'artère coronaire de porcs, avec une relaxation supérieure en présence d'EPA : DHA (6 :1) comparativement à EPA : DHA (1 :1) (proche de celle de l'Omacor®) (Zgheel, Alhosin et al. 2014). Nous avons étudié l'effet pharmacocinétique d'une imprégnation par les acides gras omégas 6 (l'huile de maïs) et différente formulation d'oméga 3 (EPA : DHA) de manière à pouvoir comparer les tissus d'individus traités ou non après challenge des tissus *ex-vivo* avec L-NAME ; un inhibiteur de la eNOS ; 300 µM).

Pour évaluer les propriétés vasoprotectrices des EPA : DHA (6 : 1), j'ai étudié la capacité du tissu aortique à émettre des MVs à l'état basal, en absence de tout stimulus extérieur, ou en présence de stress oxydant (300 µM de H_2O_2) et en présence de l'ionophore calcique A23187 (10^{-6}M), pour mimer les conditions d'une activation cellulaire drastique dans le tissu par la génération d'espèces réactives de l'oxygène ou par influx calcique.

Les aortes de rats jeunes de 12 semaines contrôles (n=5) gavés ou non par l'huile de maïs, l'Omega 3 EPA : DHA (1 :1) ou (6 :1) pendant une semaine ou 4 jours ont été prélevées. L'incubation des tissus aortiques avec le tampon d'extraction est réalisée pendant 90 min. Pour évaluer les rendements de chaque étape du processus d'extraction, les surnageants ont subi 4 centrifugations successives (Figure 44).

Les données montrent que la stimulation du tissu aortique par 300 µM de H_2O_2 ou 10^{-6}M de ICa^{+2} ou 300 µM de L-Na double l'émission des MVs par rapport au taux d'émission en condition basale : (basal : 48,33 ± 10,33 *vs*. H_2O_2 :100,7 ± 13,82 ; *vs*. ICa^{+2} : 84,5 ± 8,34 ; *vs*. L-Na : 110,7 ± 18,82 nmoles PhtdSer / 100 mg d'aorte de rat ; P< 0,01, N=5), suggérant qu'une réserve tissulaire de MVs est disponible et indiquant une capacité du vaisseau à répondre aux stress oxydant et calcique par l'émission rapide de MVs procoagulantes

potentiellement délétères. De plus l'absence de NO induite par inhibition direct de la eNOs à l'aide du L-NAME conduit à des valeurs similaires des MVs totale à l'état basal chez le rat non traité. Ces données suggèrent également qu'une des actions vasoprotectrices des EPA : DHA (6 :1) serait de limiter la libération des MVs procoagulantes. Les quantités extraites des rats traités 7 jours sont similaires à celles obtenues chez les rats jeunes traités après 4 jours (15,00 ± 4,42 *vs*. 20,80 ± 6,84 nmoles PhtdSer / 100 mg d'aorte de rat ; N=5, P=0,525), suggérant une imprégnation précoce par EPA : DHA (6 :1), même en cas de traitement drastique par L-NA qui favorise une forte émission de MVs.

L'ensemble des résultats indique une supériorité du EPA : DHA (6 :1) comparativement au EPA : DHA (1 :1) même chez des rats jeunes. Ces données sont précisées et confirmées dans l'étude des rats âgés (Voir publication).

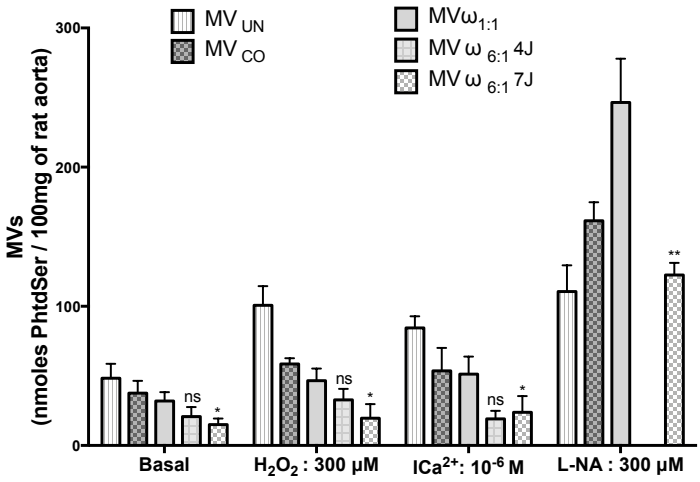


Figure 44 : Impact de la formulation en EPA : DHA sur l'émission de MVs.
Les MV ont été collectées dans une suspension de 1 ml de milieu d'extraction contenant 1 cm d'aorte coupée du récipient coupé en 10 sections de 1 mm et incubées 90 minutes sous rotation modérée et mesurées par dosage prothrombinase.
MV_{UN}: rats non traités; MV_{CO}: MV de rats recevant de l'huile de maïs pendant 7 jours; MV ω 1: 1: MV de rats recevant l'EPA: DHA 1: 1 pendant 7 jours ; MV ω 6: 1 : MV de rats recevant l'EPA: DHA 6: 1 pendant 4 et 7 jours
H_2O_2 : milieu d'extraction contenant 300 µM de H_2O_2 ; ICa^{2+} : milieu d'extraction contenant 1 µM d'ionophore A23187 ; L-NA: milieu d'extraction contenant 300 µM de L-NAME.
**: P <0,05 (MV ω 6 : 1 7J vs. MV ω 1 : 1) ; P = ns (MV ω 6 : 1 4J vs. MV ω 6 : 1 7J).*

Quatre jours d'ingestion de l'EPA DHA (6 : 1) supprime la libération de MVs d'aorte thoracique en situation basale chez les rats jeunes et réduit le degré d'émission des MVs après stimulation maximale des tissus par H_2O_2, l'ionophore calcique ou par le L-NA.

II.2.4 Article en préparation :

Microvesicles of the aortic wall sense vasoprotection by Vascazen™ in aged rats

Microvesicles of the aortic wall sense vasoprotection by Vascazen™ in aged rats

Lamia Amoura[1,2], Muhammad A. Farooq[1], Raed Altamimy[1], Sonia Khemais-Benkhiat[1], Abdul W. Qureshi[1], Shinhee Park[1], Zahid R. Niazi[1], Fatiha Zobairi[1], Cyril Auger[1], Valérie B. Schini-Kerth[1], Florence Toti[1]

1. INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), University of Strasbourg, French.
2. CLINICA Groupe, Contract research organization, Algeria

Corresponding author:

TOTI Florence
INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), Strasbourg, France.
Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg
74 route du Rhin, BP 60024
67401 Illkirch-Graffenstaden, France
E-mail: toti@unistra.fr

Introduction

In cardiovascular diseases and during physiological ageing, the endothelial dysfunction is characterized by a decreased formation of vasoprotective factors (NO, EDH) and an increased formation of vasoconstricting factors (EDCFs, COX) (Vanhoutte and Tang 2008), resulting in an imbalance towards the accelerated development of vascular pathologies. Endothelial dysfunction is associated with the up-regulation of procoagulant tissue factor od adhesion molecules, and enhanced chemokine secretion, oxidative stress favoring platelet and leukocyte adherence, and vascular smooth muscle cell proliferation.

In various animal models, endothelial dysfunction is observed before the onset of vascular remodeling, suggesting that it is an early event in the initiation and development of cardiovascular diseases. Endothelial senescence is a possible cause of early endothelial dysfunction in vascular territories submitted to abnormal shear stress like vessel branches or the coronary arche, suggesting that early pharmacological control would limit or delay the atherothrombotic process. However, an early sensor of the pathological switch of the endothelium that would enable a non-invasive assessment of endothelial target therapies is still lacking.

MVs are plasma membrane vesicles bearing procoagulant activities and circulating biomarkers of vascular injury and inflammation in cardiovascular diseases including acute myocardial infarction, diabetes, atherothrombosis, hypertension and metabolic syndrome. Indeed, elevated levels of MVs mainly of leucocyte and endothelial origin have been detected in the carotid atherosclerotic plaque (Leroyer, Isobe et al. 2007) and frequently correlated with the severity of pathology (Mallat, Benamer et al. 2000) (Sabatier, Darmon et al. 2002) (Rautou, Vion et al. 2011).

N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-Omega-3 have been documented as protective, reducing coronary heart disease incidence and its complications, by decreasing atherosclerosis,

thrombosis processes, and arrhythmia. Omega-3 intake reduces mortality by 20% to 45% and morbidity (myocardial infarction, arrhythmia) in adult patient with cardiovascular disease (Marchioli and Levantesi 2013). Consistent with this hypothesis, there is an inverse relationship between the Omega-3 index and the rate of telomere attrition, a marker of cellular aging (Farzaneh-Far, Lin et al. 2010). Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic (DHA) indeed enhance vasodilatation and antithrombotic effects (Boisrame-Helms, Toti et al. 2015). In a rat model of myocardial ischemia reperfusion, an intravenous bolus of Omega-3 EPA: DHA (6:1) administered before myocardial reperfusion significantly decreased circulating total and $CD54^{+}$ endothelial MVs and reduced vascular failure and shock (Burban, Meyer et al. 2016), thereby confirming the endothelial wound as pivotal and MVs thrombogenic markers.

By contrast, the effect of Omega-3 EPA: DHA (6:1) on tissular MVs in ageing related endothelial dysfunction have not been thoroughly studied, while ageing is a risk factor of cardiovascular diseases.

In the present investigation, we examined the efficiency of a new formulation of Omega-3 EPA: DHA (6:1) to limit the release of procoagulant MVs from the vessel in young or old rat aortas and examined wether there sites at higher flow disturbance might be specifically protected.

Materials and Methods

Preparation of Omega-3 PUFAs products

Purified EPA and DHA were provided by Pivotal Therapeutics, Inc (Woodbridge, ON, Canada).

The EPA: DHA 6:1 ratio mixture was prepared and adjusted to the relative purity of both the EPA and the DHA solutions under nitrogen flux to avoid oxidation of the omega-3 PUFAs. The formulation is then aliquoted in amber glass vials under nitrogen and stored at 4°C until use.

Animals

Male Wistar rats (20 months-old) (Janvier-labs, Le Genest-St-Isle, France) were housed in a temperature controlled (22°C) room and maintained on a standard 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 am) with free access to food and water. Rats were randomly divided into three groups of eight rats each. Rats received daily by gavage 500 mg/kg of either EPA: DHA 6:1 (Omega-3), corn oil (control), or water for 2 weeks. Young male Wistar rats (12 weeks-old) were used as control. Experiments conformed to the Guide of Care and the Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996) and were authorized by the French Ministry of Higher Education and Research and by the local ethic committee (Comité d'éthique en Matière d'expérimentation animale de Strasbourg, authorization 03799.01). All animal experiments were done in a registered animal yard within the Faculty of Pharmacy (Authorization number E-67-218-26).

Isolation of MVs from aorta of rats

The soft MVs extraction procedure from aorta was established in young rats (12 weeks). Freshly harvested aorta (1,5cm length) were cut in standardized length fragments (1mm) using 10 razor blades device and incubated for 90 min using rotating wheel (17 rpm) at 22°C in 1 ml sterile DMEM buffer containing antibiotics. After centrifugation (800 g, 15 min at 20°C) to eliminate the aortic tissue fragments, the supernatant containing the MVs was subjected to 2 successive centrifugations (13000 g, 5 min, 20°C) to remove residual cells and debris. The supernatant enriched in MVs was then centrifuged at high speed (14000g, 90 min, 4°C) to obtain a concentrated pellet of washed MVs. Under these conditions, the purification yield is 99% per 100 mg of aortic tissue, independently of fatty acid impregnation.

Isolation of MVs from the abdominal fragments of the aorta and assessment of shedding potency

Aortas harvested from each rat subset were carefully cleaned of adhering fat and connective tissue, and the remaining blood flushed with cold HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)

without calcium and magnesium. Vessels were washed at room temperature by 10 successive baths in DMEM supplemented with 100 UI streptomycine, 100UI penicillin, 250 µg/ml fungizone before being weighed.

Fresh aortic fragments (1 cm length) were then sectioned using a device made of a succession of ten fixed razor blades (1mm) then incubated in supplemented DMEM (see above). Shedding potency of aorta was measured at baseline state or after stimulation by oxidative stress (300 µM H_2O_2) or calcium ionophore A23187 (10^{-4} M; Sigma) at room temperature for 1h30 min. MVs extraction was performed as described above using a rolling device (17 rpm). After centrifugation at 800 g, 20°C for 15 min to discard cell debris and a further double centrifugation step at 13000 g, 20°C for 5min, MVs were pelleted from the supernatant by centrifugation at 13 000 g and 4 °C for 90 min, resuspended in 200µl sterile Tris buffer containing 130 mM Na Cl. The suspension was kept for less than one month at 4°C.

Four different MVs suspensions were prepared from old untreated rats (MV_{UN}), from Omega-3 treated old-rats (MVω), corn oil-treated rats (MV_{CO}) and from young-rats (MV_Y).

MVs measurement was performed by prothrombinase assay after capture onto Annexin-5 as previously described using microplate spectrophotometric reader set in kinetic mode, at 405 nm. This capture-based assay allows extensive washing of captured MVs, taking advantage of the high affinity of Annexin-5 for phosphatidylserine (PhtdSer) exposed at MVs surface and ensures that MVs are procoagulant. MVs concentration was referred to as Phtdser equivalent, by reference to a standard curve made with synthetic vesicles of known amounts of PhtdSer (Hugel, Zobairi et al. 2004). Routine MVs measurement were also performed on the basis of their protein content assessed by Coomassie protein assay.

Coronary Artery primary Endothelial Cells (ECs) isolation and MVs treatment

Pig hearts were collected from the local slaughterhouse (COPVIAL, Holtzheim, France) and

endothelial cells (ECs) were isolated from the left circumflex coronary arteries as described previously (Brodsky, Gealekman et al. 2004). Briefly, left circumflex coronary arteries were excised from fresh hearts, cleaned of adhesive conjunctive tissues and the remaining blood flushed with cold phosphate-buffered saline (PBS) without calcium. ECs were further isolated by filling the artery with MCDB131 medium (Life Technologies SAS, St Aubin, France) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, 250 mg/ml fungizone, and 1 mM L-glutamine (all from Lonza, St Quentin en Yvelines, France) and containing 1 mg/ml type I collagenase (Worthington, Serlabo Technologies, Entraigues sur la Sorgue, France) for 15 min at 37°C. ECs were collected in the effluent after circular massages of the arteries and a final medium flush. Collected ECs were centrifuged at 400 g after and pelleted cells suspended in complete MCDB131 medium supplemented with 15% fetal calf serum. ECs from three different arteries were seeded in a T25 flask and expanded at 37°C in a 5% CO2 humidified atmosphere. ECs adhering to the bottom of the flask were selected by removing the medium containing non-adherent cells after 5-6 h incubation in complete MCDB131 medium and further grown for 48-72 hours (passage 0). ECs at passage 1 (P1 ECs) were seeded at 75%-80% confluence in multi-well plates and were pre-incubated with MV_{UN} or MVω at 10 nM PhtdSer eq. (final concentration) for 48h. In all cases, the culture medium was changed every 24 h.

Fluorescence detection of senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) activity

Senescence-associated β-galactosidase activity (SA-β-gal) in ECs was measured by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), using a membrane-permeable fluorogenic substrate C12FDG (5 dodecanoylaminofluorescein Di-β-D-galactopyranoside, Invitrogen, Life Technologies SAS) that remains with the cell after lysis (Khemais-Benkhiat, Idris-Khodja et al. 2016), of its galactosyl residues by the β-galactosidase. Briefly, ECs were pre-treated with chloroquine (300 μM) for 1 h to raise the pH of the internal lysosomes to approximately 6. C12FDG (33 μM) was then added for 1 h. At the end of the incubation period,

ECs were washed with ice-cold PBS, the following trypsinization and analyzed immediately using a flow cytometer (FACScan, BD Biosciences, San Jose, CA). Data were acquired and analyzed using the CellQuest software (Becton Dickinson). Light scatter parameters were set to eliminate dead cells and subcellular debris. The green C12-fluorescein signal was measured and SA-β-gal activity was estimated using the median fluorescence intensity (MFI) of the population. Autofluorescence was assessed in unlabelled cells to C12FDG, was negligible.

Determination of oxidative stress in the aorta tissue

Rings (4–5 mm in length) of the abdominal aorta fragment not cleaned of connective tissue were flushed with PBS without calcium to remove remaining blood, embedded in OCT compound (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, France) and frozen in a nitrogen bath for cryostat sections. The redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidium (DHE, 2.5 μM) was applied onto 25 μm unfixed cryosections of abdominal aorta for 30 min at 37°C in a light protected humidified chamber. Section were then washed three times, mounted in (Dako, Les Ulis, France) and cover-slipped. The level of fluorescence in each section was assessed under a confocal laser-scanning microscope (Leica SP2 UV DM IRBE; leica, Heidelberg, Germany) with a 20X magnification lens. Quantification of fluorescence levels was performed using the ImageJ software (version 1.49p for Windows, US National Institutes of Health, Bethesda). For each condition, cumulative data were calculated as the mean of measurements performed on 6 sections and represented experimental data sets performed on separate occasions.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± standard error mean (S.E.M.) and analyzed using GraphPad Prism5® (Prism5 Graphpad Company, La Jolla, CA, USA). Statistical analysis between two groups was carried out using one-way ANOVA test followed by the Tukey's multiple comparisons test. A P value <0.05 was considered significant. Experiments were conducted in at least in three separate experiments.

Results

The potency of the aorta tissue to release procoagulant MVs is reduced by Omega-3 intake

The ability of the aortic tissue to release MVs at baseline was measured in the absence of any external stimuli. Maximal MVs release was achieved in the presence of oxidative stress (300 µM H_2O_2) and or A23187 calcium ionophore (10^{-4} M), two agents known as drastic inducers of cell activation within tissue involving ROS generation and calcium influx.

Data show that whatever the treatment of the rats, stimulation of the aortic tissue by 300 µM of H_2O_2 or 10^{-4} M of ICa^{+2} triples the emission of the MVs compared to the emission rate under basal conditions: (basal vs. H_2O_2: 86.67 ± 8.822 vs. 339.3 ± 52.93 nmoles MV / 100 mg of aorta) (basal vs. ICa^{+2}: 86.67 ± 8.822 vs. 252.5 ± 43.73 nmoles MV / 100 mg of aorta; P <0.001, N = 6) (Figure 1). They also suggest an enhanced vessel ability to shed procoagulant MVs in reponse to oxidative and calcium stress, MVs bering released within 90 min.

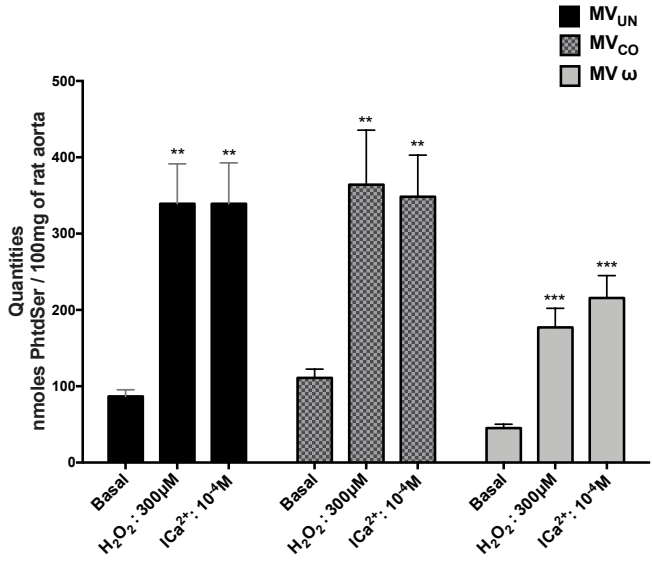


Figure 1: Impact of EPA: DHA (6: 1) intake on MVs release from the thoracic aorta abdominal fragment in old rats.

***: P <0.01 MV_{UN} and MV_{CO} (basal vs. H_2O_2 or ICa^{+});*
****: P <0.001 MVω (basal vs. H_2O_2 or ICa^{2+}).*
MV_{UN} : MVs suspensions prepared from old untreated rats; MVω : MVs suspensions prepared from Omega-3 treated old-rats and MV_{CO} from corn oil-treated old-rats.

EPA: DHA (6: 1) reduced significantly the MV release from the aorta in old rats to a level that was similar to that of young untreated rats. MVω: 45.28 ± 5.067, *vs.* MV_{UN}: 86.67 ± 8.822, *vs.* MV_{CO}: 111.1 ± 5.067 nmoles MV / 100 mg of aorta; N = 6, P <0.001. *vs.* MV_Y: 44.21 ± 3.186 nmoles MV / 100 mg of aorta (Figure 2).

After challenging the aortic tissue by H_2O_2 or ICa^{+2} to release the whole MVs content, the 50% reduction in vascular MV measured at baseline was still observed H_2O_2 (MVω: 177.2 ± 25.08 *vs.* MV_{UN}: 339.3 ± 52.19 nmoles MV / 100 mg of aorta) and ICa^{+2} (MVω: 215.7 ± 19.23*vs.* MV_{UN} : 339.2 ± 35.04 nmoles MV / 100 mg of aorta) (Figure 2).

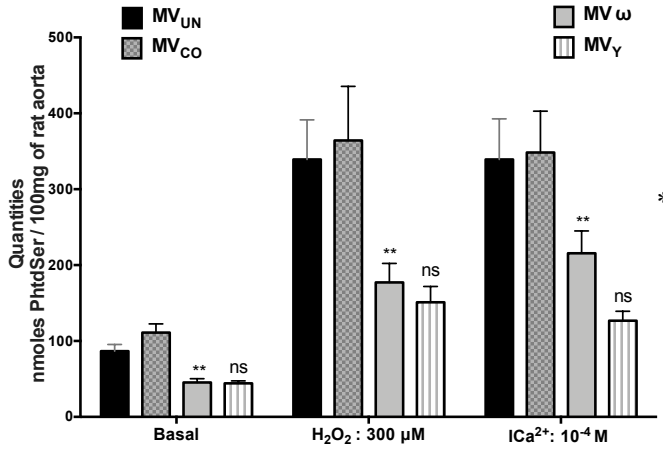


Figure 2: EPA: DHA (6: 1) decreased procoagulant MVs generation.

***: P <0.01 (MVω vs. MV_{UN} or vs. MV_{CO}); P = ns (MVω vs. MV_Y). MV_{UN} : MVs suspensions prepared from old untreated rats; MVω : MVs suspensions prepared from Omega-3 treated old-rats ; MV_{CO} : MVs suspensions prepared from corn oil-treated rats and MV_Y from young-rats.*

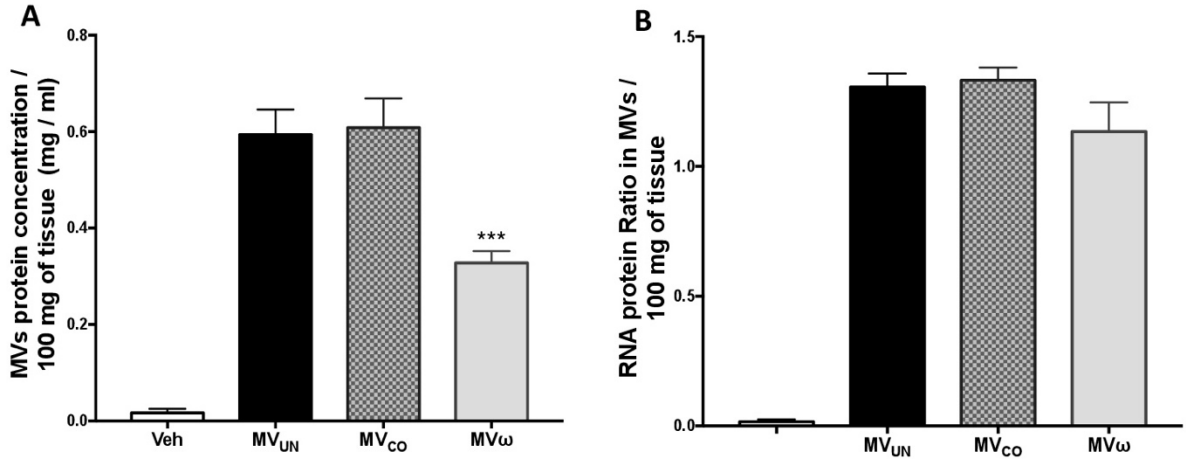


Figure 3: EPA: DHA (6: 1) decreased protein from MVs aortic tissue with any modification in ARN.

A: quantities of protein in aortic MVs

B: RNA protein ratio in aortic MVs

****: P <0.001 (MVω vs. MV_{UN} or vs. MV_{CO}); Veh: vehicles*

Reduced pro-senescent activity of aorta MVs in EPA: DHA (6: 1) treated rats

The impact of Omega-3 on the noxious properties of aorta MVs were examined. In-a MV-induced premature endothelial senescence cross-talk model, using porcine coronary artery endothelial cells (Abbas, Jesel et al. 2017). Measurement of Senescence-Associated beta galactosidase activity indicated that EPA: DHA (6: 1) intake reduces significantly the pro-senescent properties of the old rats aortic MVs (MV_{UN}: 16,20 ± 0.877 *vs.* MVω :11.84 ± 0.70 fluorescence A.U; N = 3, P <0.05) (Figure 4).

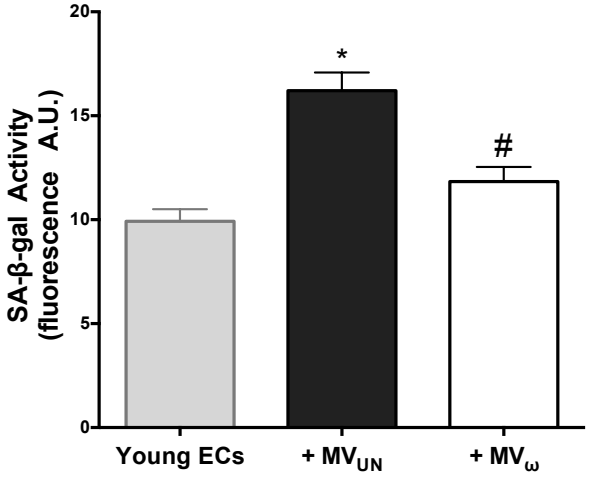


Figure 4: EPA: DHA (6: 1) prevent MV-induced endothelial senescence.

**: P <0.05 (MV_{UN} vs. young EC); # P <0.05 (MVω vs. MV_{UN})*
MV_{UN} : MVs suspensions prepared from old untreated rats and MVω from Omega-3 treated old-rats. EC: young porcine coronary artery endothelial cells.

EPA: DHA (6: 1) intake reduces oxidative stress in the aorta of old rats

As endothelial dysfunction is associated with vascular oxidative stress, we measured the levels of ROS in the vascular wall of the aorta using the redox sensitive fluorescent probe dihydroethidium (DHE). In old rats an intense florescence throughout the vascular wall was observed, which was significantly prevented by the EPA: DHA (6:1) intake to a level that was

similar to that detected in young rats, thereby confirming that all cells from the vascular wall might have been protected by the intake (Figure 5).

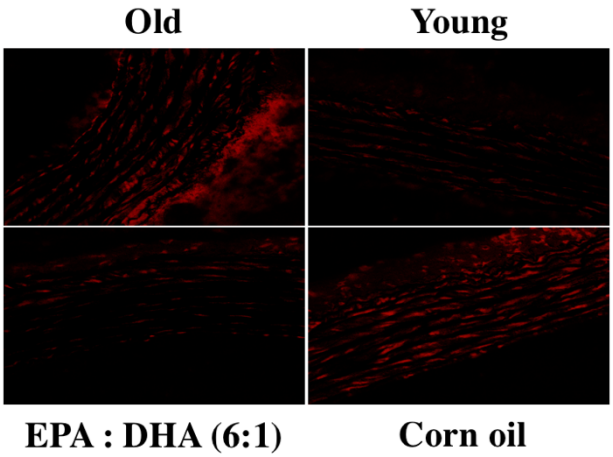


Figure 5: ROS generation in the abdominal fragment of the thoracic aorta.

Young, Old: aorta from untreated rats. Corn oil, EPA: DHA (6:1): aorta from old treated rats.

Discussion

Endothelial dysfunction is associated with the up-regulation of procoagulant tissue factor and adhesion molecules, and with enhanced chemokine secretion, oxidative stress, all favoring platelet and leukocyte adherence and vascular smooth muscle cell proliferation. Such conditions trigger MV production in atherosclerotic plaques of human carotid arteries (Leroyer, Isobe et al. 2007).

In the present study, we have shown that the aorta wall constitutes a reservoir of procoagulant MVs that are released at low concentration at least from the thoracic fragment. Indeed, preliminary data in young rats had shown that MV release from the aortic arch is doubled as compared to the thoracic fragment with values reaching two thirds of those detected in old rats thoracic fragments.

It is therefore tempting to speculate that premature endothelial senescence at sites of flow disturbance or ageing-induced endothelial dysfunction may have paracrine impact on the vessel wall. Whether the enhanced release of aortic MVs identified in old rats is the consequence of redox-sensitive cellular mechanisms remains to be clarified. Furthermore, the extent of the aortic MV release upon stimulation by H_2O_2 or calcium ionophore is most probably depends on the endothelial potency for MV clearance as well as enhanced permeability, all eventually combined to paracrine stimulation of the muscle cells possibly leading to apoptosis and the generation of tissue MVs. However, since apoptosis is low in the aortic sinus of ApoE-KI mice developing atherothrombosis and fatty liver disease (Baron, Leroyer et al. 2011) senescence appears more likely the trisser of Omega-3. Indeed, our data also indicate that aortic MVs from old rats induce premature endothelial senescence in vitro. Furthermore, senescence ECs are known to release higher concentration of MVs (Abbas, Jesel et al. 2017), and data from the team also indicate that aortic arch are associated with the up-regulation of senescent markers (Mohamed KHASSEM thesis 2017).

MVs in the plaques of these mice are likely the result of the inflammation associated with lesion development. Our data demonstrate that stimulation of the aorta by oxidative stress or calcium influx leads to a drastic release of MVs reaching higher levels in old vessels (old: 339.3 ± 52.93 *vs.* young: 100.7 ± 13.82 nmoles MV / 100 mg of aorta). Thus the aortic tissue damage, as demonstrated by ROS elevated content in old rats could contribute to the constitution of a tissue reservoir of noxious MVs.

Previous studies have established that the beneficial effect of EPA: DHA (6:1) on the Ang II-induced endothelial dysfunction is best explained by their antioxidant properties. Indeed, the EPA: DHA (6:1) treatment involves the blunting of the overexpression of eNOS, of the decreased expression of proteins involved in the EDH component, and of the increased

expression of COX-1 and COX-2 involved in the endothelium-dependent contractile responses and is best explained by the prevention of the NADPH oxidase-derived oxidative stress and the overexpression of the vascular AT1R (Niazi, Silva et al. 2017).

To the best of our knowledge this is the first report of a modulation of procoagulants MVs release from tissues by Omega-3 intake but also of their prosenescent action on ECs.

A better characterization action of the cell origin of the aortic MVs and the molecular actors targeted by Omega-3 remain to be characterized. Thus, MVs might be considered as specific biomarkers, and may also be useful to predict drug efficacy in preclinical and early clinical development. Data obtained by measuring aortic MV need to be confronted the to variation of MV circulating in the plasma and the Omega Score to determine wether EPA: DHA (6:1) intake modified the steady state of MVs within the vasculature.

References

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

Baron, M., A. S. Leroyer, Z. Majd, F. Lalloyer, E. Vallez, K. Bantubungi, G. Chinetti-Gbaguidi, P. Delerive, C. M. Boulanger, B. Staels and A. Tailleux (2011). "PPARalpha activation differently affects microparticle content in atherosclerotic lesions and liver of a mouse model of atherosclerosis and NASH." Atherosclerosis **218**(1): 69-76.

Boisrame-Helms, J., F. Toti, M. Hasselmann and F. Meziani (2015). "Lipid emulsions for parenteral nutrition in critical illness." Prog Lipid Res **60**: 1-16.

Brodsky, S. V., O. Gealekman, J. Chen, F. Zhang, N. Togashi, M. Crabtree, S. S. Gross, A. Nasjletti and M. S. Goligorsky (2004). "Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen." Circ Res **94**(3): 377-384.

Burban, M., G. Meyer, A. Olland, F. Severac, B. Yver, F. Toti, V. Schini-Kerth, F. Meziani and J. Boisrame-Helms (2016). "An Intravenous Bolus of Epa: Dha 6: 1 Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion-Induced Shock." Shock **46**(5): 549-556.

Farzaneh-Far, R., J. Lin, E. S. Epel, W. S. Harris, E. H. Blackburn and M. A. Whooley (2010). "Association of marine omega-3 fatty acid levels with telomeric aging in patients with coronary heart disease." Jama **303**(3): 250-257.

Hugel, B., F. Zobairi and J. M. Freyssinet (2004). "Measuring circulating cell-derived microparticles." J Thromb Haemost **2**(10): 1846-1847.

Khemais-Benkhiat, S., N. Idris-Khodja, T. P. Ribeiro, G. C. Silva, M. Abbas, M. Kheloufi, J. O. Lee, F. Toti, C. Auger and V. B. Schini-Kerth (2016). "The Redox-sensitive Induction of the Local Angiotensin System Promotes Both Premature and Replicative Endothelial Senescence: Preventive Effect of a Standardized Crataegus Extract." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **71**(12): 1581-1590.

Leroyer, A. S., H. Isobe, G. Leseche, Y. Castier, M. Wassef, Z. Mallat, B. R. Binder, A. Tedgui and C. M. Boulanger (2007). "Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques." J Am Coll Cardiol **49**(7): 772-777.

Mallat, Z., H. Benamer, B. Hugel, J. Benessiano, P. G. Steg, J. M. Freyssinet and A. Tedgui (2000). "Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes." Circulation **101**(8): 841-843.

Marchioli, R. and G. Levantesi (2013). "n-3 PUFAs in cardiovascular disease." Int J Cardiol **170**(2 Suppl 1): S33-38.

Niazi, Z. R., G. C. Silva, T. P. Ribeiro, A. J. Leon-Gonzalez, M. Kassem, A. Mirajkar, A. Alvi, M. Abbas, F. Zgheel, V. B. Schini-Kerth and C. Auger (2017). "EPA:DHA 6:1 prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase- and COX-derived oxidative stress." Hypertens Res **40**(12): 966-975.

Rautou, P. E., A. C. Vion, N. Amabile, G. Chironi, A. Simon, A. Tedgui and C. M. Boulanger (2011). "Microparticles, vascular function, and atherothrombosis." Circ Res **109**(5): 593-606.
Sabatier, F., P. Darmon, B. Hugel, V. Combes, M. Sanmarco, J. G. Velut, D. Arnoux, P.

Charpiot, J. M. Freyssinet, C. Oliver, J. Sampol and F. Dignat-George (2002). "Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles." Diabetes **51**(9): 2840-2845.

Vanhoutte, P. M. and E. H. Tang (2008). "Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad!" J Physiol **586**(22): 5295-5304.

Zgheel, F., M. Alhosin, S. Rashid, M. Burban, C. Auger and V. B. Schini-Kerth (2014). "Redox-sensitive induction of Src/PI3-kinase/Akt and MAPKs pathways activate eNOS in response to EPA:DHA 6:1." PLoS One **9**(8): e105102.

Discussion et perspectives

Les MVs circulantes, biomarqueurs non invasifs, ont fait la démonstration de leur utilité pour la stratification du risque athérothrombotique et comme marqueur de dysfonction du greffon. En effet, l'identification de l'origine cellulaire des MVs et leur quantification dans les fluides et les tissus sont susceptibles d'orienter chercheurs et cliniciens vers de nouvelles cibles pharmacologiques et de nouvelles procédures de prise en charge. Les MVs sont des biomarqueurs reconnus de la sévérité des atteintes organiques et vasculaires mais aussi de possibles effecteurs thérapeutiques, qu'ils soient des transporteurs endogènes de molécules bénéfiques ou bien transformés en dispositifs d'administrations de médicaments.

Deux aspects de l'impact de l'ischémie vasculaire sur les MVs circulantes et tissulaires sont abordés dans ce travail : le stress de l'ischémie reperfusion dans la greffe d'îlot pancréatique qui touche des vaisseaux hépatiques secondaires et l'ischémie coronaire.

Valeurs diagnostiques et pronostiques potentielles des MVs

Les données décrites tout le long de ce manuscrit sont prometteuses parce qu'elles montrent à la fois la faisabilité d'une stratification basée sur la valeur pronostique des MVs circulantes, combinées ou non avec d'autre indicateurs biologiques, et d'un ciblage thérapeutique des MVs tissulaires. Cette perspective est particulièrement cruciale dans le cadre de la transplantation où la détection précoce et une stratification fine amélioreront la prise en charge des patients et la protection du greffon face à une marge d'immunosuppression étroite. En effet, l'agression vasculaire répétée par échappement et résurgence de la réponse innée est peu explorée. De même, la détection précoce d'une vulnérabilité athérothrombotique par le biais des profils protéolytiques de MVs circulantes serait un outil pour l'initiation d'un traitement vasculoprotecteur. Grace à l'estimation de l'étendue des lésions tissulaires de la plaque ou du greffon et à la confrontation avec le profil de MVs circulantes, il est possible d'espérer de nouvelles procédures thérapeutiques pharmacologiques ciblant les mécanismes de vieillissement et agression vasculaires.

Un autre intérêt de notre étude est la définition de profils microvésiculaires caractéristiques d'un processus pathologique et l'identification des acteurs cellulaires et de leur séquence d'activation. Dans le cadre des pathologies où l'accès au tissu pathologique est difficile, l'utilisation d'un biomarqueur non invasif est économiquement viable comparativement aux biopsies. Un nombre important de molécules circulantes ont été associées aux accidents de rejet de greffe (C-peptide, Hb1Ac, ARNm de lymphocytes cytotoxique) et aux accidents vasculaires cérébraux ischémiques (hsCRP), sans qu'aucun consensus n'établisse leur utilité, dans la gestion quotidienne du risque vasculaire.

Effectivement, du fait de leur spectre de génération très large, elles sont susceptibles de refléter des facteurs confondants. Enfin, leur utilité préventive est souvent faible car détectée trop tardivement pour la prise en charge du patient. Même la combinaison de certains marqueurs biologiques (métalloprotéinase matricielle 9, peptide natriurétique de type B, D-dimères, protéine S100B…) n'a jusqu'à maintenant pas fourni d'information diagnostique et pronostique supplémentaire suffisamment utiles et pertinentes.

Une seule étude prospective dans laquelle 488 patients japonais présentant différents facteurs de risque cardiovasculaire a combiné score biologique et MVs. Les patients ont été suivis pendant une durée moyenne de 36 mois. L'ajout de MV endothéliales ($CD144^+$) au score de risque de Framingham a amélioré la classification du risque et est apparu comme un prédicteur significatif et indépendant des futurs événements cardiovasculaires dans cette population à risque élevée (Nozaki, Sugiyama et al. 2009). Ces résultats sont prometteurs et soulignent que davantage d'études prospectives sont nécessaires pour préciser la valeur pronostique des MVs chez les individus à haut risque de complication vasculaire pour lesquels un marqueur précoce et non invasif de stratification de risque et d'efficacité thérapeutique n'existe pas. Néanmoins, le manque d'études longitudinales d'ampleur résulte en partie du fait que les MVs à valeur pronostique circule à faible concentration, que peu de marqueurs tissulaires sont validés et que la phase préanalytique reste cruciale pour la fiabilité des mesures.

Apport des MVs pour le monitoring de la greffe d'îlots

Nos données valident le concept que les MVs spécifiques d'un organe défaillant sont déversées dans la circulation systémique et apparaissent comme d'éventuels marqueurs de la rupture de l'homéostasie tissulaire.

Dans la première partie de ce travail, grâce à la mise au point d'un dosage ultrasensible pour la détection des MVs circulantes d'origine pancréatique, l'étude pilote prospective d'un marqueur de cellule beta, PSA-NCAM a montré que les MVs -PSA-$NCAM^+$ sont un marqueur diagnostique d'une dysfonction des ilots greffés avec une valeur prédictive précoce, les variations étant indépendantes des données cliniques ou biologiques.

Très peu de données sont actuellement disponibles sur le plan clinique pour comprendre les mécanismes cellulaires caractérisant la réponse de l'îlot en situation de rejet humoral et cellulaire. En particulier, la cinétique de l'altération cellulaire, le type cellulaire et le type même de stress restent difficiles à identifier compte-tenu de la nature pluricellulaire de l'îlot, et de l'étiologie multifactorielle complexe du DT1. La pertinence de la corrélation des marqueurs de lésion tissulaire témoignant du dommage tissulaire subi avec l'identification des

MVs de cellules circulantes conforte la possibilité d'une identification chez les patients avec facteurs de risque conventionnels de la cause de la perte cellulaire pour une prise en charge thérapeutique adaptée au type de rejet (Articles I). En outre, ces marqueurs d'activation cellulaire sont des outils potentiels pour la définition de scores ou de seuils pathologiques caractérisant le rejet cellulaire avant la survenu de la dysfonction totale du greffon.

Dans l'étude MIPIL, l'examen du profil des MVs chez les patients en succès total ou en dysfonction partielle ou complète du greffon est fortement suggestif d'une valeur prédictive augmentée grâce à la combinaison des marqueurs. Cependant, d'un point de vue pratique, la proximité relative des points temporels de mesure des biomarqueurs est l'élément critique pour établir la prédiction d'un dysfonctionnement et sa cause. Sur la base des caractéristiques structurelles et fonctionnelles spécifiques des MVs (voir « MVs comme biomarqueurs, diabète de type II et syndrome métabolique »), il semble raisonnable, bien que spéculatif que la valeur prédictive des MVs soit supérieure à celle des mRNA circulants comme par exemple le mRNA de l'insuline parce qu'ils sont libérés plus tardivement et souvent à la phase la plus aigüe de la dysfonction (Berney, Mamin et al. 2006). En effet, les MVs sont un marqueur de la sévérité de la maladie et témoignent ainsi de la progression et de l'issue de la pathologie.

En greffe d'îlots, les informations sur les mécanismes de perte progressive de la fonction du greffon sont cruciales pour le développement d'approches pharmacologiques capables d'améliorer la viabilité des îlots, et par conséquent de prolonger l'efficacité de la greffe avec une meilleure prise en charge thérapeutique et préventive.

L'évaluation de la dysfonction vasculaire reste délicate et limitée aux pathologies le plus souvent athérothrombotique car le clinicien manque d'outils rapides, non invasifs et sensibles applicables à différentes situations physiopathologiques associées à l'ischémie-reperfusion ou à la dysfonction endothéliale qui sont limitées à des régions vasculaires à risque.

Les caractéristiques suivantes plaident en faveur du potentiel des MVs comme source prometteuse de nouveaux biomarqueurs: (1) les MVs sont identifiables et isolables sur la base de propriétés intrinsèques et bien définies, telles que la teneur en phosphatidylsérine ; (2) les MVs sont spécifiques d'une ligné cellulaire avec une composition membranaire et cytoplasmique spécifique ; (3) les profils des MVs caractérisent dépendent le microenvironnement des cellules émettrices; (4) les MVs sont des témoins initiaux du stress car libérées précocement dans les premières heures d'une réponse cellulaire et évoluent avec la progression de la maladie; (5) le dosage des MVs est peu-invasif puisqu'elles sont détectables dans de nombreux fluides corporels; (6) les MVs sont transposables au modèles

animaux de manière ubiquiste car leur émission n'est pas limitée à un type de cellule ou à une espèce; et (7) les MVs agissent comme des vecteurs puisqu'ils transportent et protègent des messages biologiques, c'est-à-dire des ARNm, des microARN, des protéines et des phospholipides, qui sont normalement confinés aux cellules ou dans tissus.

Importance des MV leucocytaires dans le dysfonctionnement du greffon et pour la détection de la vulnérabilité de la plaque

Si les MV endothéliales sont reconnues comme des marqueurs de la dysfonction vasculaire en transplantation d'organe ou dans les maladies cardiovasculaires ce travail renforce le concept du rôle des leucocytes dans l'atteinte vasculaire et organique.

La réaction inflammatoire est associée à l'ischémie-reperfusion mais aussi à l'athérothrombose. Les données de la littérature montraient déjà une proportion de MV leucocytaires détectées par cytométrie en flux très importante (52%) (Leroyer, Isobe et al. 2007). Dans l'étude POMEGA, nous avons montré un enrichissement supérieur en MV leucocytaires dans la plaque des patients non traités par rapport aux concentrations circulantes chez les sujets sains. En accord avec cette observation, les MV leucocytaires de plaque ont été impliquées dans la réaction inflammatoire locale et thrombotique de la lésion par l'expression de la protéase d'ADAM17/TACE (Canault, Leroyer et al. 2007).

L'étude MIPIL indique que le profil de MVs dérivées de leucocytes peut être considéré comme un outil d'identification de la cause d'un dysfonctionnement de la masse insulaire et de la gravité de la lésion. La valeur pronostique est fortement suggérée par le fait que l'élévation de la MV dans le plasma des patients a toujours été détectée avant la chute du score clinique (β Score).

Prises ensemble, nos données suggèrent que l'endothélium du vaisseau de l'hôte ou du greffon serait ciblé par des MVs leucocytaires libérées notamment dans le contexte de l'IBMIR péri-greffe puis progressivement, avec les difficultés de contrôle des traitements immunosuppresseurs, l'altération endothéliale serait amplifiée par la libération secondaire de MVs endothéliales elles-mêmes pro-coagulantes et pro-sénescentes.

En effet, d'autres donnés du laboratoire montrent que les MV leucocytaires splénocytaires du rat induisent une sénescence endothéliale prématurée via l'activation des voies MAPKinases et PI3-kinase, un stress oxydant, une réponse inflammatoire et un phénotype thrombogénique (thèse de Ali Al-habhab, 08 février 2018).

Parce que l'altération de la fonction des cellules endothéliales prématurément ou avec l'âge pourrait altérer la réussite de la greffe, des concentrations élevées de MVs leucocytaires circulantes susceptibles de témoigner de l'activation des

leucocytes recrutés dans le tissu par diapédèse seraient indicatives d'un risque supérieur de dysfonction endothéliale. Les proportions de ces deux pools cellulaires de MV serait alors la signature d'une réponse immune et/ou thrombotique, associée soit à l'ischémie-reperfusion soit au rejet ou à la dysfonction de l'organe qu'il s'agisse du cœur, du rein ou des îlots et cellules souches (Morel, Ohlmann et al. 2008) (Al-Massarani, Vacher-Coponat et al. 2009) (De Rop, Stadler et al. 2011).

Une étude approfondie des sous-populations des MV leucocytaires et de leurs interactions avec l'endothélium inflammatoire apporterait de nouvelles informations sur de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les MVs en tant que marqueurs pathogènes d'une atteinte tissulaire susceptible d'accélérer la dysfonction d'organe.

MVs de la paroi vasculaire et leur modulation pharmacologique

La résolution de l'inflammation vasculaire est un facteur important de récupération fonctionnelle. Des médiateurs lipidiques pro-résolvants, les résolvines, les protectines et les maresines dérivées d'acides gras polyinsaturés oméga-3 orchestrent les processus cellulaires clés conduisant à la résolution de l'inflammation aigue et la régénération tissulaire (Conte, Desai et al. 2018). Ces métabolites induisent différentes réponses et protègent les organes notamment de la réponse immunitaire innée par les neutrophiles. Ils sont donc des molécules candidates pour de nouvelles approches thérapeutiques qui, par définition, ne sont pas immunosuppressives, mais plutôt immuno-résolutives favorisant un retour à l'homéostasie de la réponse immunitaire (Serhan and Levy 2018). De plus, les résolvines sont aussi impliquées dans l'homéostasie vasculaire. Ainsi, la résolvine D2 dérivée de l'DHA stimule la libération de prostacycline et de NO vasoprotecteur à partir de l'endothélium vasculaire (Spite, Norling et al. 2009), et la résolvine E1 dérivée de l'EPA régule l'activation plaquettaire (Fredman, Van Dyke et al. 2010) (Figure 45).

Dans un modèle de péritonite murin, la biosynthèse locale et temporelle de médiateurs lipidiques pro-résolvants ou de protéines anti-inflammatoires est reflétée par le contenu des MVs leucocytaires dont l'émission dans des exsudats est contemporaine du recrutement neutrophilique, précédant les monocytes (Norling, Spite et al. 2011). De plus, les MVs sont enrichies en analogues de la résolvine D1 ou de la lipoxine A4 qui protègent contre l'inflammation (Norling, Spite et al. 2011). En condition de faible flux laminaire (1 dyne/ cm^2), la résolvine D1 limite le recrutement des neutrophiles humains sur les HUVEC via le récepteur FPR2 / ALX de l'annexin 1, de la lipoxine A4 et de la GPR32 (Norling, Dalli et al. 2012).

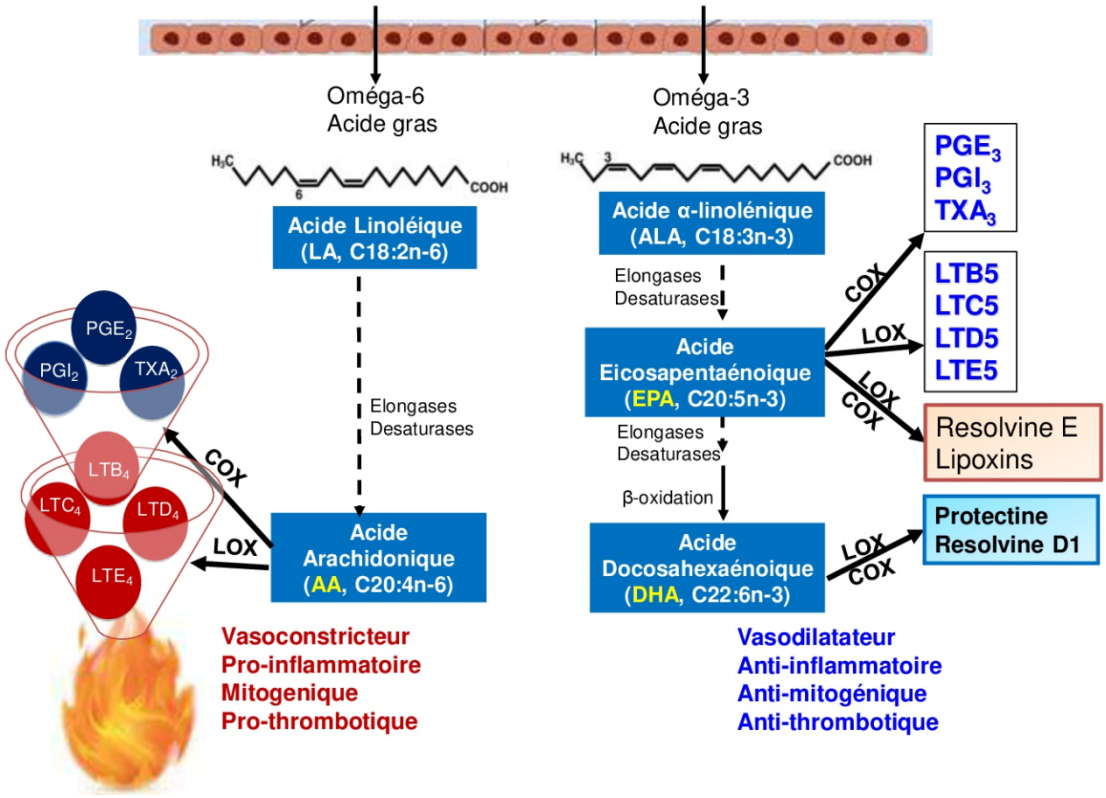


Figure 45 : Acides gras poly-insaturés et production des Eicosanoïdes. Adapté de (Balanza-Martinez, Fries et al. 2011)

Les principaux acides gras oméga 3 EPA et DHA sont les précurseurs des eicosanoïdes et des résolvines comme les prostaglandines de série 3 (PGE3, PGD3, PGF3), le thromboxane de série 3 (TXA3) et les leucotriènes de série 5 (LTA5, LTB5, LTD5,). Comparativement aux oméga 6, les métabolites des oméga 3 ont des effets anti-inflammatoires et vasodilatateurs, antiagrégants et contribuent ainsi à la protection des artères et du cœur. COX : cyclo oxygénase ; LOX : lipo oxygénase.

De même, les MVs de neutrophiles dans un modèle murin de sepsis, sont enrichies en alpha 2 macroglobuline et potentialisent son action ant-inflammatoire dans les exsudats avec une sécrétion accrue de résolvines (Dalli, Norling et al. 2014).

Outre les effets cytoplasmiques des résolvines, des effets directs de l'EPA : DHA sur la fluidité membranaire ont été explorés dans notre laboratoire car ils contrebalançaient les mécanismes à l'origine de l'émission des MVs. L'analyse de l'émission des MVs tissulaires indique un effet réducteur de la quantité des MVs émises par l'aorte de rat âgés. Par ailleurs, le stress oxydant intra-aortique est réduit et les propriétés pro-sénescentes des MVs sur la cellule endothéliale sont abaissées (Article II). À l'appui de cette observation, l'absorption des EPA : DHA (6 :1) a limité la dysfonction endothéliale liée au vieillissement chez le rat évaluée par la réactivité vasculaire du mésentère secondaire. L'effet bénéfique implique une amélioration à la fois des relaxations médiées par le NO et l'EDH, ainsi qu'une réduction de la réponse contractile dépendante de l'endothélium très probablement par limitation du stress oxydant (Muhammad A. Farooq 2017).
Prise ensemble, ces données suggèrent que les EPA : DHA (6 :1) préviennent l'augmentation des taux circulants et tissulaires de MVs prosénescentes libérées avec l'âge. Cependant, ces données restent à préciser par l'étude des MVs circulantes dans le plasma et par l'évaluation de leur clairance.

La génération ou la construction de MVs biomimétiques convoyeurs de médiateurs lipidiques pro-résolutifs serait une approche pharmacologique de la modulation de la signalisation cellulaire induite par les MVs pro-inflammatoire dans les réponses pathologiques aigues ou chroniquement élevées (Norling, Spite et al. 2011).

Pour compléter les connaissances actuelles les mécanismes membranaires d'émission des MVs ciblés par EPA : DHA (6 :1) restent à explorer. Plusieurs transporteurs de lipides comme les floppases TMEM16F ou ARF6 peuvent être étudiés par modulation pharmacologique et leur expression par Western-blot. Leur impact sur les voies de synthèse des résolvines et sur leur exportation dans les MVs devra être évalué dans des modèles de réparation tissulaire mais aussi confronté à la clairance des MVs.

MV pro-sénescentes et ischémie

L'ensemble des données précliniques et cliniques actuelles suggère que l'ischémie au cours de l'athérothrombose et de la transplantation d'îlots, favorise la sénescence et la génération des MVs pro-sénescentes (thèse de M.Kassem, 20 janvier 2017). En ce qui concerne la transplantation d'îlots, la recherche de la sénescence endothéliale intra-insulaire est limitée par le nombre d'îlots disponibles dans les modèles de rat ou murin. L'étude des MVs

prosénescente nécessite une miniaturisation du modèle et l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques.

Dans le cas des vaisseaux de conductance, des cellules endothéliales sénescentes sont détectables aux zones de turbulence de flux et nos données comparant la crosse aortique et l'aorte thoracique de rat montrent que la vulnérabilité du tissu pariétal s'accompagne d'une émission supérieure de MV tissulaires même chez le sujet jeune. De plus, l'effet délétère pro-sénescent des MVs pariétales de rats âgés sur les cellules endothéliales de coronaire (Article II) suggère un effet paracrine entre les MVs tissulaire et les cellules endothéliales susceptible d'être modulé par les EPA : DHA (6 :1).

Les mécanismes exacts de la sénescence induite par les MVs de la plaque ou au cours de la transplantation d'ilots pancréatiques restent encore à explorer et étayer. Néanmoins, les données de Abbas suggèrent une modulation possible de la sénescence endothéliale induite par les MVs circulantes de patients transplantés cardiaque ou atteints de syndrome coronarien grâce au préconditionnement avec des concentrations faibles de la cyclosporine A (CsA). En effet, à faible concentration la CsA est un inhibiteur puissant de l'ouverture des pores mitochondriaux (mPTP) qui limite ainsi la réponse cellulaire et le flipflop ((Bergmeier, Oh-Hora et al. 2009, Leytin, Allen et al. 2009). Ces données suggèrent aussi que de faibles doses de CsA seraient bénéfiques dans les pathologies vasculaires lorsque la sénescence est exacerbée en préservant les fonctions vasculaires de l'endothélium (Abbas, Jesel et al. 2017).

Le pré-conditionnement de l'îlot pourrait améliorer le succès de la greffe en limitant la dysfonction endothéliale liée à l'âge du donneur avant son implantation et/ou en limitant l'impact des MVs ischémiques produites lors de l'isolement des îlots puis au cours du processus d'établissement de la niche du greffon et de sa vascularisation.

Pré-conditionnement du greffon et cytoprotection de l'endothélium et des cellules β

Le pré-conditionnement pharmacologique des îlots pancréatiques a été peu étudié. Cependant, l'aPC (protéine C activée) qui est une protéine anticoagulante et cytoprotectrice ciblant les récepteurs PAR-2 et leur signalisation anti-inflammatoire et anti-apoptotique, est un candidat potentiel. En effet, la préservation de la fonction des îlots transplantés a été montrée chez des souris génétiquement modifiées qui sur-expriment le récepteur à l'aPC (EPCR) (Gock, Lee et al. 2016). De plus, dans un modèle *ex-vivo* de tubing loop, l'aPC limite la réaction IBMIR au contact du sang en protégeant les îlots isolés (Akima, Hawthorne et al. 2009). De plus, des CE coronaires humaines exposées à la protéine C activée (aPC) libèrent des MV endothéliales cytoprotectrices. Elles exposent l'EPCR, le récepteur spécifique de l'aPC, véhiculent et délivrent la protéine C activée aux CE inflammées augmentant la survie cellulaire,

ce qui laisse entrevoir un possible effet autocrine protecteur des MV endothéliales chez les patients traités par aPC (Perez-Casal, Downey et al. 2009). Au laboratoire, Kreutter et ses collaborateurs ont démontré l'effet cytoprotecteur et anti-inflammatoire de MV endothéliales générées par aPC sur la fonction des cellules β. Elles agissent comme des effecteurs paracrines cytoprotecteurs de la cellule β en culture ou dans l'îlot (Kreutter, Kassem et al. 2017).

De même, la thrombomoduline, une autre protéine membranaire exprimée à la surface des cellules endothéliales qui convertit l'activité pro-coagulante de la thrombine en propriété anticoagulante, a récemment été identifiée comme un outil intéressant pour préserver la fonction des îlots chez les souris diabétiques transplantées (Cui, Wilson et al. 2009).

Nos données indiquent que, hormis les dommages aux cellules du donneur détectées par les MV-PSA-NCAM^{+} circulantes qui signent un dysfonctionnement du greffon, le remodelage des tissus hépatiques de l'hôte témoigne également d'un greffon anormal ou d'une implantation défectueuse. Une explication serait que les cellules endothéliales des vaisseaux sinusoïdaux hépatiques sont hautement sensibles aux altérations redox se produisant lors de l'ischémie-reperfusion (Teoh and Farrell 2003) (Jaeschke and Woolbright 2012).

Il faut souligner que l'ensemble des données actuelles sur l'impact endothélial des MVs repose majoritairement sur des modèles de sénescence de cellules endothéliales primaires d'artères coronaires ou de veines ombilicales humaines (HUVECs). L'étude de la communication intercellulaire nécessitent la mise en place de modèles utilisant des cellules endothéliales caractéristiques du territoire vasculaire afin de mieux cerner l'impact systémique et local des MVs circulantes.

La transposition à la situation de l'IBMIR et de la revascularisation des ilots devra être confirmée avec des cellules endothéliales hépatiques. En effet, les CE sinusoïdales ont un profil d'expression antigénique spécifique, avec l'expression inhabituelle de CD4 et CD14 et des récepteurs des immunoglobulines. Par ailleurs, ces CEs ont une absence de CD55 qui protège contre l'activation du compliment, et l'acquisition de l'antigène CD34 se fait dans la phase régénérative lorsque le capillaire sinusoïdal à endothélium fenestré se transforme en vaisseau avec un endothélium continu (Brunt, Gouw et al. 2014) (Poisson, Lemoinne et al. 2017). Nos observations devront donc être étayées dans un nouveau modèle de cross-talk utilisant des MVs de CE sinusoïdales pour l'étude des effets pro-inflammatoire et pro-sénescents autocrines et paracrines sur la cellule béta et les îlots, avant de déterminer les effets cytoporotecteurs des EPA : DHA (6 :1) susceptibles de moduler la réponse endothéliale.

Sénescence endothéliale, MV et instabilité de la glycémie

Si les cellules endothéliales sénescentes SA-β-gal^{+} ont été identifiées dans les aortes de rats diabétiques (Chen, Brodsky et al. 2002), aucune donnée n'est disponible sur les MVs de la paroi aortique. Il serait intéressant de comparer les effets de MVs de vaisseaux hépatiques secondaires et d'aorte des rats diabétiques isolées grâce au protocole mis au point au cours de ce travail, et d'explorer leurs propriétés effectrices pro-inflammatoires et pro-sénescentes sur les CE sinusoïdales. Par ailleurs, la présence de SA-β-galactosidase dans les vaisseaux hépatiques secondaires reste aussi à documenter.

L'instabilité glycémique et les oscillations des réactions redox sensibles de la cellule endothéliale modifient probablement leurs propriétés. Nous n'avons pas évalué les propriétés endothéliales des MVs circulantes chez les patients DT1 transplantés en échec total ou partiel. Cette approche reste plus facilement réalisable dans un modèle de transplantation animal dans lequel chaque pic de MV et son origine cellulaire seraient plus aisément identifiés.

D'après les données in-vitro du laboratoire, il est fort possible que les MVs soient pro sénescentes. En effet, les concentrations élevées de glucose induisent une sénescence des cellules endothéliales de coronaires de porc et stimulent la génération des MV endothéliales (thèse de Sonia Khemaïs, 04 octobre 2018). De plus un taux élevé de glucose potentialise l'effet pro-sénescent des MVs dérivées de leucocytes sur ces CE (Altamimy R 2018). L'ensemble de ces données suggère une synergie entre MV leucocytaires et endothéliales amplifiée par le glucose qui favorise l'expression du FT à la surface endothéliale et des MVs circulantes, elles-mêmes favorisant le recrutement des leucocytes sur l'endothélium inflammatoire et la diapédèse dans la plaque d'athérome.

Conclusion générale

De la MV biomarqueur à la MV effectrice

Ce travail montre l'importance des MVs comme outil de suivi longitudinal des séquences successives d'activation cellulaire dans la progression de l'atteinte vasculaire. En effet, ces biomarqueurs sont la signature circulante d'une atteinte organique et /ou vasculaire témoignant de la progression de la dysfonction cellulaire. Ainsi chez les patients DT1 transplantés d'ilots, la simple caractérisation de l'origine des MVs circulantes a mis en évidence la faisabilité de la recherche des causes de la dysfonction du greffon, puisque ce profil identifie clairement et précocement chaque contribution cellulaire et sa séquence.

Malgré la robustesse et la sensibilité de ces biomarqueurs, l'application clinique en routine nécessite une logistique adaptée pour éviter les faux positifs résultants de l'activation artéfactuelle des cellules sanguines actuellement recueillies conjointement aux MVs circulantes dans le tube de prélèvement. Outre les conditions de prélèvements des échantillons sanguins très strictes pour limiter l'activation cellulaires au site de la piqure veineuse, il n'existe pas de tube de prélèvement susceptible de séparer immédiatement les MVs des cellules. La phase pré-analytique reste donc une contrainte déterminante puisque la première centrifugation doit être réalisée dans les premières 90 minutes, ce qui nécessite une plateforme d'analyse biologique proche.

Parce que les propriétés des MVs, circulantes et locales, peuvent être différentes, les futures études devront s'attacher à établir les relations entre ces deux pools pour mieux cerner les différents mécanismes d'ischémie selon le territoire vasculaire concerné. Plusieurs caractéristiques restent à élucider : (1) la cinétique d'émission des MVs et de recapture par les tissus (2) l'évolution des propriétés des MVs avec la progression du stress vasculaire et tissulaire, incluant la caractérisation de leur contenu en métabolites et molécules actives et (3) l'impact des MV sur la résolution du stress cellulaire.

Une vision plus dynamique des interactions entre MVs et cellules devrait orienter vers de nouvelles stratégies pour protéger le greffon d'îlots et prévenir les accidents vasculaires. En transplantation d'îlots, l'approche pharmacologique s'appliquerait en préconditionnement du greffon ou en péri-transplantation. Elle viserait soit à limiter l'activation cellulaire, soit à réduire la libération de vésicules délétères aux profit de vésicules protectrices synthétiques ou naturelles et convoyeuses de cytoprotecteurs. Les travaux décrits sur la modulation de l'émission des MVs de la paroi aortique indiquent la faisabilité d'une reprogrammation pharmacologique des MV à visée thérapeutique (Figure 46).

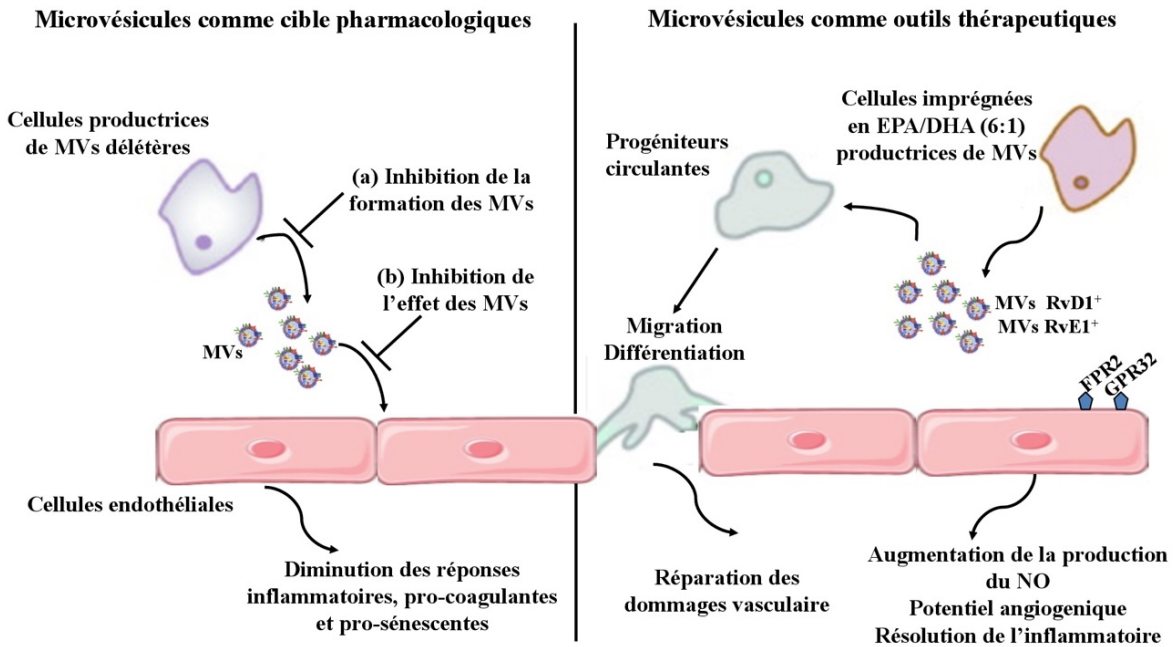


Figure 46 : Schéma récapitulatif des propriétés des MVs dans le contexte de leur libération par le tissu dans la circulation.

Dans le cadre de ce travail, les MVs sont produites par les cellules de l'organe (îlots ou paroi vasculaire) et interagissent avec les cellules endothéliales ou circulantes. Les propriétés délétères de MVs peuvent être limitées par l'inhibition de l'activation cellulaire ou de l'interaction avec les cellules endothéliales (panneau de gauche). La production de MVs thérapeutiques interagissant avec l'endothélium peut être obtenue par traitement pharmacologique modifiant les réponses cellulaires mais aussi les propriétés des membranes plasmiques et des MVs, ainsi que le contenu des MVs en molécules protectrices cytoplasmiques (ici les résolvines) ou circulantes (panneau de droite). Un des modes d'action des MVs bénéfiques serait leur capacité à établir une niche pour les cellules souches circulantes et régénérer le tissu.

Références

Références

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

Abdel-Monem, H., S. K. Dasgupta, A. Le, A. Prakasam and P. Thiagarajan (2010). "Phagocytosis of platelet microvesicles and beta2- glycoprotein I." Thromb Haemost **104**(2): 335-341.

Abdullah, N. M., M. Kachman, A. Walker, A. E. Hawley, S. K. Wrobleski, D. D. Myers, J. R. Strahler, P. C. Andrews, G. C. Michailidis, E. Ramacciotti, P. K. Henke and T. W. Wakefield (2009). "Microparticle surface protein are associated with experimental venous thrombosis: a preliminary study." Clin Appl Thromb Hemost **15**(2): 201-208.

Abreu, J. R. and B. O. Roep (2013). "Immune monitoring of islet and pancreas transplant recipients." Curr Diab Rep **13**(5): 704-712.

Adamek, B., M. Zalewska-Ziob, J. K. Strzelczyk, J. Kasperczyk, K. Wolkowska-Pokrywa, G. Spausta, E. Hudziec, A. Wiczkowski, E. Swietochowska, M. Kukla and Z. Ostrowska (2017). "Hepatocyte growth factor and epidermal growth factor activity during later stages of rat liver regeneration upon interferon alpha-2b influence." Clin Exp Hepatol **3**(1): 9-15.

Agouni, A., A. H. Lagrue-Lak-Hal, P. H. Ducluzeau, H. A. Mostefai, C. Draunet-Busson, G. Leftheriotis, C. Heymes, M. C. Martinez and R. Andriantsitohaina (2008). "Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome." Am J Pathol **173**(4): 1210-1219.

Agouni, A., H. A. Mostefai, C. Porro, N. Carusio, J. Favre, V. Richard, D. Henrion, M. C. Martinez and R. Andriantsitohaina (2007). "Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release." Faseb j **21**(11): 2735-2741.

Akima, S., W. J. Hawthorne, E. Favaloro, A. Patel, K. Blyth, Y. Mudaliar, J. R. Chapman and P. J. O'Connell (2009). "Tirofiban and activated protein C synergistically inhibit the Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR) from allogeneic islet cells exposure to human blood." Am J Transplant **9**(7): 1533-1540.

Al Faraj, A., F. Gazeau, C. Wilhelm, C. Devue, C. L. Guerin, C. Pechoux, V. Paradis, O. Clement, C. M. Boulanger and P. E. Rautou (2012). "Endothelial cell-derived microparticles loaded with iron oxide nanoparticles: feasibility of MR imaging monitoring in mice." Radiology **263**(1): 169-178.

Al-Massarani, G., H. Vacher-Coponat, P. Paul, L. Arnaud, A. Loundou, S. Robert, V. Moal, Y. Berland, F. Dignat-George and L. Camoin-Jau (2009). "Kidney transplantation decreases the level and procoagulant activity of circulating microparticles." Am J Transplant **9**(3): 550-557.

Al-Massarani, G., H. Vacher-Coponat, P. Paul, A. Widemann, L. Arnaud, A. Loundou, S. Robert, Y. Berland, F. Dignat-George and L. Camoin-Jau (2008). "Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation." Am J Transplant **8**(11): 2360-2367.

Albert, C. M., H. Campos, M. J. Stampfer, P. M. Ridker, J. E. Manson, W. C. Willett and J. Ma (2002). "Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death." N Engl J Med **346**(15): 1113-1118.

Albrecht, C., J. H. McVey, J. I. Elliott, A. Sardini, I. Kasza, A. D. Mumford, R. P. Naoumova, E. G. Tuddenham, K. Szabo and C. F. Higgins (2005). "A novel missense mutation in ABCA1 results in altered

protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome." Blood **106**(2): 542-549.

Altamimy R, Q. A., Amoura L, El Habhab A, Itawi H, Kassem M, Khemais S, Pollet B, Zobairi F, Auger C, Schini-Kerth V, Toti F. (2018). "High glucose potentiates the pro-senescent effect of leukocyte-derived MPs in isolated ECs and in the vessel wall: Impact on endothelial-dependent control of the vascular tone." PLOs one April 2018.

Amabile, N., S. Cheng, J. M. Renard, M. G. Larson, A. Ghorbani, E. McCabe, G. Griffin, C. Guerin, J. E. Ho, S. Y. Shaw, K. S. Cohen, R. S. Vasan, A. Tedgui, C. M. Boulanger and T. J. Wang (2014). "Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study." Eur Heart J **35**(42): 2972-2979.

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

Amabile, N., A. P. Guerin, A. Tedgui, C. M. Boulanger and G. M. London (2012). "Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study." Nephrol Dial Transplant **27**(5): 1873-1880.

Amabile, N., C. Heiss, V. Chang, F. S. Angeli, L. Damon, E. J. Rame, D. McGlothlin, W. Grossman, T. De Marco and Y. Yeghiazarians (2009). "Increased CD62e(+) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients." J Heart Lung Transplant **28**(10): 1081-1086.

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

Anne Wojtusciszyn, J. B., Laure Esposito, Lionel Badet, Fanny Buron, Mikael Chetboun, Laurence Kessler, Emmanuel Morelon, Thierry Berney, François Pattou, Pierre-Yves Benhamou, Marie-Christine Vantyghem and a. T. group (2018). "INDICATIONS for ISLET OR PANCREAS TRANSPLANTATION
." in submission

Arteaga, R. B., J. A. Chirinos, A. O. Soriano, W. Jy, L. Horstman, J. J. Jimenez, A. Mendez, A. Ferreira, E. de Marchena and Y. S. Ahn (2006). "Endothelial microparticles and platelet and leukocyte activation in patients with the metabolic syndrome." Am J Cardiol **98**(1): 70-74.

Atai, N. A., L. Balaj, H. van Veen, X. O. Breakefield, P. A. Jarzyna, C. J. Van Noorden, J. Skog and C. A. Maguire (2013). "Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells." J Neurooncol **115**(3): 343-351.

Augustine, D., L. V. Ayers, E. Lima, L. Newton, A. J. Lewandowski, E. F. Davis, B. Ferry and P. Leeson (2014). "Dynamic release and clearance of circulating microparticles during cardiac stress." Circ Res **114**(1): 109-113.

Badimon, L., R. Suades, G. Arderiu, E. Pena, G. Chiva-Blanch and T. Padro (2017). "Microvesicles in Atherosclerosis and Angiogenesis: From Bench to Bedside and Reverse." Front Cardiovasc Med **4**: 77.

Baidal, D. A., C. Ricordi, D. M. Berman, A. Alvarez, N. Padilla, G. Ciancio, E. Linetsky, A. Pileggi and R. Alejandro (2017). "Bioengineering of an Intraabdominal Endocrine Pancreas." N Engl J Med **376**(19): 1887-1889.

Baj-Krzyworzeka, M., J. Baran, K. Weglarczyk, R. Szatanek, A. Szaflarska, M. Siedlar and M. Zembala (2010). "Tumour-derived microvesicles (TMV) mimic the effect of tumour cells on monocyte subpopulations." Anticancer Res **30**(9): 3515-3519.

Bakouboula, B., O. Morel, A. Faure, F. Zobairi, L. Jesel, A. Trinh, M. Zupan, M. Canuet, L. Grunebaum, A. Brunette, D. Desprez, F. Chabot, E. Weitzenblum, J. M. Freyssinet, A. Chaouat and F. Toti (2008). "Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **177**(5): 536-543.

Balanza-Martinez, V., G. R. Fries, G. D. Colpo, P. P. Silveira, A. K. Portella, R. Tabares-Seisdedos and F. Kapczinski (2011). "Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder." Expert Rev Neurother **11**(7): 1029-1047.

Bandyopadhyay, D., N. Timchenko, T. Suwa, P. J. Hornsby, J. Campisi and E. E. Medrano (2001). "The human melanocyte: a model system to study the complexity of cellular aging and transformation in non-fibroblastic cells." Exp Gerontol **36**(8): 1265-1275.

Banfi, C., M. Brioschi, R. Wait, S. Begum, E. Gianazza, A. Pirillo, L. Mussoni and E. Tremoli (2005). "Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles." Proteomics **5**(17): 4443-4455.

Baron, M., C. M. Boulanger, B. Staels and A. Tailleux (2012). "Cell-derived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation?" J Cell Mol Med **16**(7): 1365-1376.

Baron, M., A. S. Leroyer, Z. Majd, F. Lalloyer, E. Vallez, K. Bantubungi, G. Chinetti-Gbaguidi, P. Delerive, C. M. Boulanger, B. Staels and A. Tailleux (2011). "PPARalpha activation differently affects microparticle content in atherosclerotic lesions and liver of a mouse model of atherosclerosis and NASH." Atherosclerosis **218**(1): 69-76.

Barry, O. P., M. G. Kazanietz, D. Pratico and G. A. FitzGerald (1999). "Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway." J Biol Chem **274**(11): 7545-7556.

Barry, O. P., D. Pratico, J. A. Lawson and G. A. FitzGerald (1997). "Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles." J Clin Invest **99**(9): 2118-2127.

Barry, O. P., D. Pratico, R. C. Savani and G. A. FitzGerald (1998). "Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles." J Clin Invest **102**(1): 136-144.

Barton, F. B., M. R. Rickels, R. Alejandro, B. J. Hering, S. Wease, B. Naziruddin, J. Oberholzer, J. S. Odorico, M. R. Garfinkel, M. Levy, F. Pattou, T. Berney, A. Secchi, S. Messinger, P. A. Senior, P. Maffi, A. Posselt, P. G. Stock, D. B. Kaufman, X. Luo, F. Kandeel, E. Cagliero, N. A. Turgeon, P. Witkowski, A. Naji, P. J. O'Connell, C. Greenbaum, Y. C. Kudva, K. L. Brayman, M. J. Aull, C. Larsen, T. W. Kay, L. A. Fernandez, M. C. Vantyghem, M. Bellin and A. M. Shapiro (2012). "Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010." Diabetes Care **35**(7): 1436-1445.

Bastarache, J. A., R. D. Fremont, J. A. Kropski, F. R. Bossert and L. B. Ware (2009). "Procoagulant alveolar microparticles in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(6): L1035-1041.

Bechstein, W. O. (2000). "Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management." Transpl Int **13**(5): 313-326.

Bellin, M. D., F. B. Barton, A. Heitman, J. V. Harmon, R. Kandaswamy, A. N. Balamurugan, D. E. Sutherland, R. Alejandro and B. J. Hering (2012). "Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes." Am J Transplant **12**(6): 1576-1583.

Bellin, M. D., P. Clark, S. Usmani-Brown and T. B. Dunn (2017). "Unmethylated Insulin DNA Is Elevated After Total Pancreatectomy With Islet Autotransplantation: Assessment of a Novel Beta Cell Marker." **17**(4): 1112-1118.

Bellin, M. D., R. Kandaswamy, J. Parkey, H. J. Zhang, B. Liu, S. H. Ihm, J. D. Ansite, J. Witson, P. Bansal-Pakala, A. N. Balamurugan, K. K. Papas, D. E. Sutherland, A. Moran and B. J. Hering (2008). "Prolonged insulin independence after islet allotransplants in recipients with type 1 diabetes." Am J Transplant **8**(11): 2463-2470.

Benhamou, P. Y., L. Milliat-Guittard, A. Wojtusciszyn, L. Kessler, C. Toso, R. Baertschiger, I. Debaty, L. Badet, A. Penfornis, C. Thivolet, E. Renard, F. Bayle, P. Morel, E. Morelon, C. Colin and T. Berney (2009). "Quality of life after islet transplantation: data from the GRAGIL 1 and 2 trials." Diabet Med **26**(6): 617-621.

Berezin, A. E., A. Kremzer, T. Berezina and Y. Martovitskaya (2016). "The signature of circulating microparticles in heart failure patients with metabolic syndrome." J Circ Biomark **5**: 1849454416663659.

Berezin, A. E., A. A. Kremzer, T. A. Berezina and Y. V. Martovitskaya (2016). "The pattern of circulating microparticles in patients with diabetes mellitus with asymptomatic atherosclerosis." Acta Clin Belg **71**(1): 38-45.

Bergmeier, W., M. Oh-Hora, C. A. McCarl, R. C. Roden, P. F. Bray and S. Feske (2009). "R93W mutation in Orai1 causes impaired calcium influx in platelets." Blood **113**(3): 675-678.

Berney, T., A. Mamin, A. M. James Shapiro, B. Ritz-Laser, M. C. Brulhart, C. Toso, S. Demuylder-Mischler, M. Armanet, R. Baertschiger, A. Wojtusciszyn, P. Y. Benhamou, D. Bosco, P. Morel and J. Philippe (2006). "Detection of insulin mRNA in the peripheral blood after human islet transplantion predicts deterioration of metabolic control." Am J Transplant **6**(7): 1704-1711.

Bernimoulin, M., E. K. Waters, M. Foy, B. M. Steele, M. Sullivan, H. Falet, M. T. Walsh, N. Barteneva, J. G. Geng, J. H. Hartwig, P. B. Maguire and D. D. Wagner (2009). "Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles." J Thromb Haemost **7**(6): 1019-1028.

Bevers, E. M. and P. L. Williamson (2010). "Phospholipid scramblase: an update." FEBS Lett **584**(13): 2724-2730.

Bevilacqua, M., E. Butcher, B. Furie, B. Furie, M. Gallatin, M. Gimbrone, J. Harlan, K. Kishimoto, L. Lasky, R. McEver and et al. (1991). "Selectins: a family of adhesion receptors." Cell **67**(2): 233.

Beyer, C. and D. S. Pisetsky (2010). "The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases." Nat Rev Rheumatol **6**(1): 21-29.

Biro, E., R. Nieuwland, P. P. Tak, L. M. Pronk, M. C. Schaap, A. Sturk and C. E. Hack (2007). "Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals." Ann Rheum Dis **66**(8): 1085-1092.

Biro, E., K. N. Sturk-Maquelin, G. M. Vogel, D. G. Meuleman, M. J. Smit, C. E. Hack, A. Sturk and R. Nieuwland (2003). "Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner." J Thromb Haemost **1**(12): 2561-2568.

Bishop, A. L. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J **348 Pt 2**: 241-255.

Bobrie, A. and C. Thery (2013). "Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal?" Biochem Soc Trans **41**(1): 263-267.

Bobryshev, Y. V., M. C. Killingsworth and A. N. Orekhov (2013). "Increased shedding of microvesicles from intimal smooth muscle cells in athero-prone areas of the human aorta: implications for understanding of the predisease stage." Pathobiology **80**(1): 24-31.

Boisrame-Helms, J., X. Delabranche, S. E. Degirmenci, F. Zobairi, A. Berger, G. Meyer, M. Burban, H. A. Mostefai, B. Levy, F. Toti and F. Meziani (2014). "Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats." Thromb Haemost **111**(1): 154-164.

Bonauer, A., R. A. Boon and S. Dimmeler (2010). "Vascular microRNAs." Curr Drug Targets **11**(8): 943-949.

Bonfanti, L. (2006). "PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis." Prog Neurobiol **80**(3): 129-164.

Bosi, E., S. Braghi, P. Maffi, M. Scirpoli, F. Bertuzzi, G. Pozza, A. Secchi and E. Bonifacio (2001). "Autoantibody response to islet transplantation in type 1 diabetes." Diabetes **50**(11): 2464-2471.

Boulanger, C. M., N. Amabile and A. Tedgui (2006). "Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease." Hypertension **48**(2): 180-186.

Boulanger, C. M., X. Loyer, P. E. Rautou and N. Amabile (2017). "Extracellular vesicles in coronary artery disease." Nat Rev Cardiol **14**(5): 259-272.

Boulanger, C. M., A. Scoazec, T. Ebrahimian, P. Henry, E. Mathieu, A. Tedgui and Z. Mallat (2001). "Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction." Circulation **104**(22): 2649-2652.

Bourdillon, M. C., R. N. Poston, C. Covacho, E. Chignier, G. Bricca and J. L. McGregor (2000). "ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE(-/-)/ICAM-1(-/-)) fed a fat or a chow diet." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(12): 2630-2635.

Breton, M., A. Farret, D. Bruttomesso, S. Anderson, L. Magni, S. Patek, C. Dalla Man, J. Place, S. Demartini, S. Del Favero, C. Toffanin, C. Hughes-Karvetski, E. Dassau, H. Zisser, F. J. Doyle, 3rd, G. De Nicolao, A. Avogaro, C. Cobelli, E. Renard and B. Kovatchev (2012). "Fully integrated artificial pancreas in type 1 diabetes: modular closed-loop glucose control maintains near normoglycemia." Diabetes **61**(9): 2230-2237.

Brodie, G. M., M. Wallberg, P. Santamaria, F. S. Wong and E. A. Green (2008). "B-cells promote intra-islet CD8+ cytotoxic T-cell survival to enhance type 1 diabetes." Diabetes **57**(4): 909-917.

Brodsky, S. V., M. E. Facciuto, D. Heydt, J. Chen, H. K. Islam, M. Kajstura, G. Ramaswamy and M. Aguero-Rosenfeld (2008). "Dynamics of circulating microparticles in liver transplant patients." J Gastrointestin Liver Dis **17**(3): 261-268.

Brodsky, S. V., O. Gealekman, J. Chen, F. Zhang, N. Togashi, M. Crabtree, S. S. Gross, A. Nasjletti and M. S. Goligorsky (2004). "Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen." Circ Res **94**(3): 377-384.

Bruns, H., D. Schultze and P. Schemmer (2013). "Alternatives to islet transplantation: future cell sources of beta-like cells." Clin Transplant **27 Suppl 25**: 30-33.

Brunt, E. M., A. S. Gouw, S. G. Hubscher, D. G. Tiniakos, P. Bedossa, A. D. Burt, F. Callea, A. D. Clouston, H. P. Dienes, Z. D. Goodman, E. A. Roberts, T. Roskams, L. Terracciano, M. S. Torbenson and I. R. Wanless (2014). "Pathology of the liver sinusoids." Histopathology **64**(7): 907-920.

Buendia, P., A. Montes de Oca, J. A. Madueno, A. Merino, A. Martin-Malo, P. Aljama, R. Ramirez, M. Rodriguez and J. Carracedo (2015). "Endothelial microparticles mediate inflammation-induced vascular calcification." Faseb j **29**(1): 173-181.

Buesing, K. L., J. C. Densmore, S. Kaul, K. A. Pritchard, Jr., J. A. Jarzembowski, D. M. Gourlay and K. T. Oldham (2011). "Endothelial microparticles induce inflammation in acute lung injury." J Surg Res **166**(1): 32-39.

Burban, M., G. Meyer, A. Olland, F. Severac, B. Yver, F. Toti, V. Schini-Kerth, F. Meziani and J. Boisrame-Helms (2016). "An Intravenous Bolus of Epa: Dha 6: 1 Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion-Induced Shock." Shock **46**(5): 549-556.

Burger, D., D. G. Kwart, A. C. Montezano, N. C. Read, C. R. Kennedy, C. S. Thompson and R. M. Touyz (2012). "Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence." J Am Heart Assoc **1**(3): e001842.

Burger, D., S. Schock, C. S. Thompson, A. C. Montezano, A. M. Hakim and R. M. Touyz (2013). "Microparticles: biomarkers and beyond." Clin Sci (Lond) **124**(7): 423-441.

Burke, S. J., K. Stadler, D. Lu, E. Gleason, A. Han, D. R. Donohoe, R. C. Rogers, G. E. Hermann, M. D. Karlstad and J. J. Collier (2015). "IL-1beta reciprocally regulates chemokine and insulin secretion in pancreatic beta-cells via NF-kappaB." Am J Physiol Endocrinol Metab **309**(8): E715-726.

Burnier, L., P. Fontana, B. R. Kwak and A. Angelillo-Scherrer (2009). "Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine." Thromb Haemost **101**(3): 439-451.

Burton, D. G. and V. Krizhanovsky (2014). "Physiological and pathological consequences of cellular senescence." Cell Mol Life Sci **71**(22): 4373-4386.

Calo, A., D. Reguera, G. Oncins, M. A. Persuy, G. Sanz, S. Lobasso, A. Corcelli, E. Pajot-Augy and G. Gomila (2014). "Force measurements on natural membrane nanovesicles reveal a composition-independent, high Young's modulus." Nanoscale **6**(4): 2275-2285.

Campbell, P. M., A. Salam, E. A. Ryan, P. Senior, B. W. Paty, D. Bigam, T. McCready, A. Halpin, S. Imes, F. Al Saif, J. R. Lakey and A. M. Shapiro (2007). "Pretransplant HLA antibodies are associated with reduced graft survival after clinical islet transplantation." Am J Transplant **7**(5): 1242-1248.

Camussi, G., M. C. Deregibus and C. Tetta (2010). "Paracrine/endocrine mechanism of stem cells on kidney repair: role of microvesicle-mediated transfer of genetic information." Curr Opin Nephrol Hypertens **19**(1): 7-12.

Canault, M., A. S. Leroyer, F. Peiretti, G. Leseche, A. Tedgui, B. Bonardo, M. C. Alessi, C. M. Boulanger and G. Nalbone (2007). "Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1." Am J Pathol **171**(5): 1713-1723.

Carlsson, P. O. (2011). "Influence of microenvironment on engraftment of transplanted beta-cells." Ups J Med Sci **116**(1): 1-7.

Cassuto, J., H. Dou, I. Czikora, A. Szabo, V. S. Patel, V. Kamath, E. Belin de Chantemele, A. Feher, M. J. Romero and Z. Bagi (2014). "Peroxynitrite disrupts endothelial caveolae leading to eNOS uncoupling and diminished flow-mediated dilation in coronary arterioles of diabetic patients." Diabetes **63**(4): 1381-1393.

Chaigne, B., K. Geneugelijk, B. Bedat, M. A. Ahmed, G. Honger, S. De Seigneux, S. Demuylder-Mischler, T. Berney, E. Spierings, S. Ferrari-Lacraz and J. Villard (2016). "Immunogenicity of Anti-HLA Antibodies in Pancreas and Islet Transplantation." Cell Transplant **25**(11): 2041-2050.

Chang, C. A., W. Z. Haque, G. Yoshimatsu, P. S. Balajii, M. C. Lawrence and B. Naziruddin (2016). "Monitoring of beta cell replacement outcomes." Panminerva Med **58**(1): 59-71.

Chang, E. and C. B. Harley (1995). "Telomere length and replicative aging in human vascular tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11190-11194.

Chang, M. K., C. Bergmark, A. Laurila, S. Horkko, K. H. Han, P. Friedman, E. A. Dennis and J. L. Witztum (1999). "Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6353-6358.

Chaput, N. and C. Thery (2011). "Exosomes: immune properties and potential clinical implementations." Semin Immunopathol **33**(5): 419-440.

Chargaff, E. and R. West (1946). "The biological significance of the thromboplastic protein of blood." J Biol Chem **166**(1): 189-197.

Chatenoud, L. (2008). "Chemical immunosuppression in islet transplantation--friend or foe?" N Engl J Med **358**(11): 1192-1193.

Chatzizisis, Y. S., A. U. Coskun, M. Jonas, E. R. Edelman, C. L. Feldman and P. H. Stone (2007). "Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior." J Am Coll Cardiol **49**(25): 2379-2393.

Chen, G. Y. and G. Nunez (2010). "Sterile inflammation: sensing and reacting to damage." Nat Rev Immunol **10**(12): 826-837.

Chen, J., S. V. Brodsky, D. M. Goligorsky, D. J. Hampel, H. Li, S. S. Gross and M. S. Goligorsky (2002). "Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells." Circ Res **90**(12): 1290-1298.

Chen, Q. M., J. C. Bartholomew, J. Campisi, M. Acosta, J. D. Reagan and B. N. Ames (1998). "Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication." Biochem J **332 (Pt 1)**: 43-50.

Chirinos, J. A., G. A. Heresi, H. Velasquez, W. Jy, J. J. Jimenez, E. Ahn, L. L. Horstman, A. O. Soriano, J. P. Zambrano and Y. S. Ahn (2005). "Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism." J Am Coll Cardiol **45**(9): 1467-1471.

Chironi, G., A. Simon, B. Hugel, M. Del Pino, J. Gariepy, J. M. Freyssinet and A. Tedgui (2006). "Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2775-2780.

Chironi, G. N., C. M. Boulanger, A. Simon, F. Dignat-George, J. M. Freyssinet and A. Tedgui (2009). "Endothelial microparticles in diseases." Cell Tissue Res **335**(1): 143-151.

Chiu, J. J., P. L. Lee, C. N. Chen, C. I. Lee, S. F. Chang, L. J. Chen, S. C. Lien, Y. C. Ko, S. Usami and S. Chien (2004). "Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor-[alpha] in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(1): 73-79.

Chiu, J. J., D. L. Wang, S. Chien, R. Skalak and S. Usami (1998). "Effects of disturbed flow on endothelial cells." J Biomech Eng **120**(1): 2-8.

Chiva-Blanch, G., V. Bratseth, V. Ritschel, G. O. Andersen, S. Halvorsen, J. Eritsland, H. Arnesen, L. Badimon and I. Seljeflot (2017). "Monocyte-derived circulating microparticles (CD14(+), CD14(+)/CD11b(+) and CD14(+)/CD142(+)) are related to long-term prognosis for cardiovascular mortality in STEMI patients." Int J Cardiol **227**: 876-881.

Chiva-Blanch, G., J. Crespo, R. Suades, G. Arderiu, T. Padro, G. Vilahur, J. Cubedo, D. Corella, J. Salas-Salvado, F. Aros, M. A. Martinez-Gonzalez, E. Ros, M. Fito, R. Estruch and L. Badimon (2016). "CD142+/CD61+, CD146+ and CD45+ microparticles predict cardiovascular events in high risk patients following a Mediterranean diet supplemented with nuts." Thromb Haemost **116**(1): 103-114.

Chiva-Blanch, G., R. Suades, T. Padro, G. Vilahur, E. Pena, J. Ybarra, J. M. Pou and L. Badimon (2016). "Microparticle Shedding by Erythrocytes, Monocytes and Vascular Smooth Muscular Cells Is Reduced by Aspirin in Diabetic Patients." Rev Esp Cardiol (Engl Ed) **69**(7): 672-680.

Choi, J. Y., J. H. Jung, S. Shin, Y. H. Kim and D. J. Han (2017). "Association between the pancreas transplantation and survival of patients with diabetes: A single center experience." PLoS One **12**(11): e0186827.

Chou, J., N. Mackman, G. Merrill-Skoloff, B. Pedersen, B. C. Furie and B. Furie (2004). "Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation." Blood **104**(10): 3190-3197.

Christianson, H. C., K. J. Svensson, T. H. van Kuppevelt, J. P. Li and M. Belting (2013). "Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(43): 17380-17385.

CIRT, C. t. A. R. (2016 Dec). "The CITR Coordinating Center and Investigators. Available from: https://citregistry.org/system/files/9AR_Report.pdf." Available from: https://citregistry.org/system/files/9AR_Report.pdf
.

Cocucci, E., G. Racchetti and J. Meldolesi (2009). "Shedding microvesicles: artefacts no more." Trends Cell Biol **19**(2): 43-51.

Coleman, B. M., E. Hanssen, V. A. Lawson and A. F. Hill (2012). "Prion-infected cells regulate the release of exosomes with distinct ultrastructural features." Faseb j **26**(10): 4160-4173.

Coleman, J. A., F. Quazi and R. S. Molday (2013). "Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport." Biochim Biophys Acta **1831**(3): 555-574.

Collins, R. G., R. Velji, N. V. Guevara, M. J. Hicks, L. Chan and A. L. Beaudet (2000). "P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." J Exp Med **191**(1): 189-194.

Colombo, M., C. Moita, G. van Niel, J. Kowal, J. Vigneron, P. Benaroch, N. Manel, L. F. Moita, C. Thery and G. Raposo (2013). "Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles." J Cell Sci **126**(Pt 24): 5553-5565.

Combes, V., A. C. Simon, G. E. Grau, D. Arnoux, L. Camoin, F. Sabatier, M. Mutin, M. Sanmarco, J. Sampol and F. Dignat-George (1999). "In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant." J Clin Invest **104**(1): 93-102.

Conen, D., K. M. Rexrode, M. A. Creager, P. M. Ridker and A. D. Pradhan (2009). "Metabolic syndrome, inflammation, and risk of symptomatic peripheral artery disease in women: a prospective study." Circulation **120**(12): 1041-1047.

Conte, M. S., T. A. Desai, B. Wu, M. Schaller and E. Werlin (2018). "Pro-resolving lipid mediators in vascular disease." J Clin Invest **128**(9): 3727-3735.

Contreras, J. L., C. Eckstein, C. A. Smyth, M. T. Sellers, M. Vilatoba, G. Bilbao, F. G. Rahemtulla, C. J. Young, J. A. Thompson, I. H. Chaudry and D. E. Eckhoff (2003). "Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats." Diabetes **52**(12): 2935-2942.

Criqui, M. H., J. O. Denenberg, J. H. Ix, R. L. McClelland, C. L. Wassel, D. E. Rifkin, J. J. Carr, M. J. Budoff and M. A. Allison (2014). "Calcium density of coronary artery plaque and risk of incident cardiovascular events." Jama **311**(3): 271-278.

Croon, A. C., R. Karlsson, C. Bergstrom, E. Bjorklund, C. Moller, L. Tyden and A. Tibell (2003). "Lack of donors limits the use of islet transplantation as treatment for diabetes." Transplant Proc **35**(2): 764.

Cudworth, A. G. and J. C. Woodrow (1974). "Letter: HL-A antigens and diabetes mellitus." Lancet **2**(7889): 1153.

Cui, W., J. T. Wilson, J. Wen, J. Angsana, Z. Qu, C. A. Haller and E. L. Chaikof (2009). "Thrombomodulin improves early outcomes after intraportal islet transplantation." Am J Transplant **9**(6): 1308-1316.

Cung, T. T., O. Morel, G. Cayla, G. Rioufol, D. Garcia-Dorado, D. Angoulvant, E. Bonnefoy-Cudraz, P. Guerin, M. Elbaz, N. Delarche, P. Coste, G. Vanzetto, M. Metge, J. F. Aupetit, B. Jouve, P. Motreff, C. Tron, J. N. Labeque, P. G. Steg, Y. Cottin, G. Range, J. Clerc, M. J. Claeys, P. Coussement, F. Prunier, F. Moulin, O. Roth, L. Belle, P. Dubois, P. Barragan, M. Gilard, C. Piot, P. Colin, F. De Poli, M. C. Morice, O. Ider, J. L. Dubois-Rande, T. Unterseeh, H. Le Breton, T. Beard, D. Blanchard, G. Grollier, V. Malquarti, P. Staat, A. Sudre, E. Elmer, M. J. Hansson, C. Bergerot, I. Boussaha, C. Jossan, G. Derumeaux, N. Mewton and M. Ovize (2015). "Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction." N Engl J Med **373**(11): 1021-1031.

Curtis, A. M., P. F. Wilkinson, M. Gui, T. L. Gales, E. Hu and J. M. Edelberg (2009). "p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles." J Thromb Haemost **7**(4): 701-709.

Daleke, D. L. (2003). "Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry." J Lipid Res **44**(2): 233-242.

Dalli, J., L. V. Norling, T. Montero-Melendez, D. Federici Canova, H. Lashin, A. M. Pavlov, G. B. Sukhorukov, C. J. Hinds and M. Perretti (2014). "Microparticle alpha-2-macroglobulin enhances pro-resolving responses and promotes survival in sepsis." EMBO Mol Med **6**(1): 27-42.

Dalli, J., L. V. Norling, D. Renshaw, D. Cooper, K. Y. Leung and M. Perretti (2008). "Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles." Blood **112**(6): 2512-2519.

Daniel, L., F. Fakhouri, D. Joly, L. Mouthon, P. Nusbaum, J. P. Grunfeld, J. Schifferli, L. Guillevin, P. Lesavre and L. Halbwachs-Mecarelli (2006). "Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis." Kidney Int **69**(8): 1416-1423.

Dasgupta, S. K., H. Abdel-Monem, P. Niravath, A. Le, R. V. Bellera, K. Langlois, S. Nagata, R. E. Rumbaut and P. Thiagarajan (2009). "Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles." Blood **113**(6): 1332-1339.

Dasgupta, S. K., E. R. Argaiz, J. E. Mercado, H. O. Maul, J. Garza, A. B. Enriquez, H. Abdel-Monem, A. Prakasam, M. Andreeff and P. Thiagarajan (2010). "Platelet senescence and phosphatidylserine exposure." Transfusion **50**(10): 2167-2175.

Dasgupta, S. K., A. Le, T. Chavakis, R. E. Rumbaut and P. Thiagarajan (2012). "Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium." Circulation **125**(13): 1664-1672.

De Rop, C., M. Stadler, S. Buchholz, R. Eisert, A. Ganser and A. Trummer (2011). "Evaluation of tissue factor bearing microparticles as biomarkers in allogeneic stem-cell transplantation." Transplantation **92**(3): 351-358.

Degirolamo, C., K. L. Kelley, M. D. Wilson and L. L. Rudel (2010). "Dietary n-3 LCPUFA from fish oil but not alpha-linolenic acid-derived LCPUFA confers atheroprotection in mice." J Lipid Res **51**(7): 1897-1905.

Del Conde, I., C. N. Shrimpton, P. Thiagarajan and J. A. Lopez (2005). "Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation." Blood **106**(5): 1604-1611.

Deng, F., S. Wang and L. Zhang (2017). "Endothelial microparticles act as novel diagnostic and therapeutic biomarkers of circulatory hypoxia-related diseases: a literature review." J Cell Mol Med **21**(9): 1698-1710.

Densmore, J. C., P. R. Signorino, J. Ou, O. A. Hatoum, J. J. Rowe, Y. Shi, S. Kaul, D. W. Jones, R. E. Sabina, K. A. Pritchard, Jr., K. S. Guice and K. T. Oldham (2006). "Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury." Shock **26**(5): 464-471.

DePaola, N., M. A. Gimbrone, Jr., P. F. Davies and C. F. Dewey, Jr. (1992). "Vascular endothelium responds to fluid shear stress gradients." Arterioscler Thromb **12**(11): 1254-1257.

Deregibus, M. C., V. Cantaluppi, R. Calogero, M. Lo Iacono, C. Tetta, L. Biancone, S. Bruno, B. Bussolati and G. Camussi (2007). "Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA." Blood **110**(7): 2440-2448.

DeStefano, J. G., A. Williams, A. Wnorowski, N. Yimam, P. C. Searson and A. D. Wong (2017). "Real-time quantification of endothelial response to shear stress and vascular modulators." Integr Biol (Camb) **9**(4): 362-374.

Devitt, A., O. D. Moffatt, C. Raykundalia, J. D. Capra, D. L. Simmons and C. D. Gregory (1998). "Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells." Nature **392**(6675): 505-509.

Dewey, C. F., Jr., S. R. Bussolari, M. A. Gimbrone, Jr. and P. F. Davies (1981). "The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress." J Biomech Eng **103**(3): 177-185.

Di Tomo, P., P. Lanuti, N. Di Pietro, M. P. A. Baldassarre, M. Marchisio, A. Pandolfi, A. Consoli and G. Formoso (2017). "Liraglutide mitigates TNF-alpha induced pro-atherogenic changes and microvesicle release in HUVEC from diabetic women." Diabetes Metab Res Rev **33**(8).

Diamant, M., R. Nieuwland, R. F. Pablo, A. Sturk, J. W. Smit and J. K. Radder (2002). "Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus." Circulation **106**(19): 2442-2447.

Diamant, M., M. E. Tushuizen, A. Sturk and R. Nieuwland (2004). "Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?" Eur J Clin Invest **34**(6): 392-401.

Diaz-Valencia, P. A., P. Bougneres and A. J. Valleron (2015). "Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review." BMC Public Health **15**: 255.

Dignat-George, F. and C. M. Boulanger (2011). "The many faces of endothelial microparticles." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(1): 27-33.

Distler, J. H., L. C. Huber, A. J. Hueber, C. F. Reich, 3rd, S. Gay, O. Distler and D. S. Pisetsky (2005). "The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages." Apoptosis **10**(4): 731-741.

Dive, C., C. D. Gregory, D. J. Phipps, D. L. Evans, A. E. Milner and A. H. Wyllie (1992). "Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry." Biochim Biophys Acta **1133**(3): 275-285.

Doran, A. C., N. Meller and C. A. McNamara (2008). "Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(5): 812-819.

Drachenberg, C. B., D. K. Klassen, M. R. Weir, A. Wiland, J. C. Fink, S. T. Bartlett, C. B. Cangro, S. Blahut and J. C. Papadimitriou (1999). "Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation." Transplantation **68**(3): 396-402.

Dragovic, R. A., C. Gardiner, A. S. Brooks, D. S. Tannetta, D. J. Ferguson, P. Hole, B. Carr, C. W. Redman, A. L. Harris, P. J. Dobson, P. Harrison and I. L. Sargent (2011). "Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis." Nanomedicine **7**(6): 780-788.

Duncan, B. B., M. I. Schmidt, J. S. Pankow, C. M. Ballantyne, D. Couper, A. Vigo, R. Hoogeveen, A. R. Folsom and G. Heiss (2003). "Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study." Diabetes **52**(7): 1799-1805.

Eckhard, M., D. Lommel, N. Hackstein, D. Winter, A. Ziegler, W. Rau, M. Choschzick, R. G. Bretzel and M. D. Brendel (2004). "Disseminated periportal fatty degeneration after allogeneic intraportal islet transplantation in a patient with type 1 diabetes mellitus: a case report." Transplant Proc **36**(4): 1111-1116.

Effros, R. B. and R. L. Walford (1984). "T cell cultures and the Hayflick limit." Hum Immunol **9**(1): 49-65.

Eisenbarth, G. S. (1986). "Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease." N Engl J Med **314**(21): 1360-1368.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

EPITA, E. (2017). "Glucose Concentrations of Less Than 3.0 mmol/L (54 mg/dL) Should Be Reported in Clinical Trials: A Joint Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." Diabetes Care **40**(1): 155-157.

Eriksson, O. and A. Alavi (2012). "Imaging the islet graft by positron emission tomography." Eur J Nucl Med Mol Imaging **39**(3): 533-542.

Erusalimsky, J. D. (2009). "Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology." J Appl Physiol (1985) **106**(1): 326-332.

Escola, J. M., M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J. M. Griffith, O. Yoshie and H. J. Geuze (1998). "Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes." J Biol Chem **273**(32): 20121-20127.

Escrevente, C., S. Keller, P. Altevogt and J. Costa (2011). "Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells." BMC Cancer **11**: 108.

Esposito, K., M. Ciotola, B. Schisano, R. Gualdiero, L. Sardelli, L. Misso, G. Giannetti and D. Giugliano (2006). "Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women." J Clin Endocrinol Metab **91**(9): 3676-3679.

Esposito, K., M. I. Maiorino, C. Di Palo, M. Gicchino, M. Petrizzo, G. Bellastella, F. Saccomanno and D. Giugliano (2011). "Effects of pioglitazone versus metformin on circulating endothelial microparticles and progenitor cells in patients with newly diagnosed type 2 diabetes--a randomized controlled trial." Diabetes Obes Metab **13**(5): 439-445.

Evans, J. L., I. D. Goldfine, B. A. Maddux and G. M. Grodsky (2002). "Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes." Endocr Rev **23**(5): 599-622.

Evans, S. E., M. J. Tuvim, J. Zhang, D. T. Larson, C. D. Garcia, S. Martinez-Pro, K. R. Coombes and B. F. Dickey (2010). "Host lung gene expression patterns predict infectious etiology in a mouse model of pneumonia." Respir Res **11**: 101.

Fadok, V. A., D. L. Bratton, S. C. Frasch, M. L. Warner and P. M. Henson (1998). "The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes." Cell Death Differ **5**(7): 551-562.

Fadok, V. A., D. L. Bratton, D. M. Rose, A. Pearson, R. A. Ezekewitz and P. M. Henson (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." Nature **405**(6782): 85-90.

Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton and P. M. Henson (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol **148**(7): 2207-2216.

Falati, S., Q. Liu, P. Gross, G. Merrill-Skoloff, J. Chou, E. Vandendries, A. Celi, K. Croce, B. C. Furie and B. Furie (2003). "Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin." J Exp Med **197**(11): 1585-1598.

Faradji, R. N., K. Monroy, S. Messinger, A. Pileggi, T. Froud, D. A. Baidal, P. E. Cure, C. Ricordi, L. Luzi and R. Alejandro (2007). "Simple measures to monitor beta-cell mass and assess islet graft dysfunction." Am J Transplant **7**(2): 303-308.

Faure, V., L. Dou, F. Sabatier, C. Cerini, J. Sampol, Y. Berland, P. Brunet and F. Dignat-George (2006). "Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure." J Thromb Haemost **4**(3): 566-573.

Flaumenhaft, R., J. R. Dilks, J. Richardson, E. Alden, S. R. Patel-Hett, E. Battinelli, G. L. Klement, M. Sola-Visner and J. E. Italiano, Jr. (2009). "Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles." Blood **113**(5): 1112-1121.

Folmer, D. E., R. P. Elferink and C. C. Paulusma (2009). "P4 ATPases - lipid flippases and their role in disease." Biochim Biophys Acta **1791**(7): 628-635.

Fontana, V., W. Jy, E. R. Ahn, P. Dudkiewicz, L. L. Horstman, R. Duncan and Y. S. Ahn (2008). "Increased procoagulant cell-derived microparticles (C-MP) in splenectomized patients with ITP." Thromb Res **122**(5): 599-603.

Forbes, S., R. A. Oram, A. Smith, A. Lam, T. Olateju, S. Imes, A. J. Malcolm, A. M. Shapiro and P. A. Senior (2016). "Validation of the BETA-2 Score: An Improved Tool to Estimate Beta Cell Function After Clinical Islet Transplantation Using a Single Fasting Blood Sample." Am J Transplant **16**(9): 2704-2713.

Forrester, S. J., D. S. Kikuchi, M. S. Hernandes, Q. Xu and K. K. Griendling (2018). "Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling." Circ Res **122**(6): 877-902.

Foster, E. D., N. D. Bridges, I. D. Feurer, T. L. Eggerman, L. G. Hunsicker and R. Alejandro (2018). "Improved Health-Related Quality of Life in a Phase 3 Islet Transplantation Trial in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia." **41**(5): 1001-1008.

Fredman, G., T. E. Van Dyke and C. N. Serhan (2010). "Resolvin E1 regulates adenosine diphosphate activation of human platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(10): 2005-2013.

Freyssinet, J. M. (2003). "Cellular microparticles: what are they bad or good for?" J Thromb Haemost **1**(7): 1655-1662.

Freyssinet, J. M. and F. Toti (2010). "Membrane microparticle determination: at least seeing what's being sized!" J Thromb Haemost **8**(2): 311-314.

Fu, L., X. X. Hu, Z. B. Lin, F. J. Chang, Z. J. Ou, Z. P. Wang and J. S. Ou (2015). "Circulating microparticles from patients with valvular heart disease and cardiac surgery inhibit endothelium-dependent vasodilation." J Thorac Cardiovasc Surg **150**(3): 666-672.

Fujii, T., A. Sakata, S. Nishimura, K. Eto and S. Nagata (2015). "TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(41): 12800-12805.

Fulop, T., D. Tessier and A. Carpentier (2006). "The metabolic syndrome." Pathol Biol (Paris) **54**(7): 375-386.

Furie, B. and B. C. Furie (2004). "Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation." Trends Mol Med **10**(4): 171-178.

Garcia, S., J. Chirinos, J. Jimenez, F. Del Carpio Munoz, M. Canoniero, W. Jy, J. Jimenez, L. Horstman and Y. Ahn (2005). "Phenotypic assessment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: switch from cell activation to apoptosis." J Heart Lung Transplant **24**(12): 2184-2189.

Gardiner, C., D. Di Vizio, S. Sahoo, C. Thery, K. W. Witwer, M. Wauben and A. F. Hill (2016). "Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey." J Extracell Vesicles **5**: 32945.

Garg, S., H. Zisser, S. Schwartz, T. Bailey, R. Kaplan, S. Ellis and L. Jovanovic (2006). "Improvement in glycemic excursions with a transcutaneous, real-time continuous glucose sensor: a randomized controlled trial." Diabetes Care **29**(1): 44-50.

Gasser, O. and J. A. Schifferli (2004). "Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis." Blood **104**(8): 2543-2548.

Giesen, P. L., U. Rauch, B. Bohrmann, D. Kling, M. Roque, J. T. Fallon, J. J. Badimon, J. Himber, M. A. Riederer and Y. Nemerson (1999). "Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2311-2315.

Gilio, K., R. van Kruchten, A. Braun, A. Berna-Erro, M. A. Feijge, D. Stegner, P. E. van der Meijden, M. J. Kuijpers, D. Varga-Szabo, J. W. Heemskerk and B. Nieswandt (2010). "Roles of platelet STIM1 and Orai1 in glycoprotein VI- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation." J Biol Chem **285**(31): 23629-23638.

Gleizes, C., A. Constantinescu, M. Abbas, H. Bouhadja, F. Zobairi, L. Kessler and F. Toti (2014). "Liraglutide protects Rin-m5f beta cells by reducing procoagulant tissue factor activity and apoptosis prompted by microparticles under conditions mimicking Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction." Transpl Int **27**(7): 733-740.

Gleizes, C., G. Kreutter, M. Abbas, M. Kassem, A. A. Constantinescu, J. Boisrame-Helms, B. Yver, F. Toti and L. Kessler (2016). "beta cell membrane remodelling and procoagulant events occur in inflammation-driven insulin impairment: a GLP-1 receptor dependent and independent control." J Cell Mol Med **20**(2): 231-242.

Gock, H., K. F. Lee, L. Murray-Segal, T. B. Mysore, A. J. d'Apice, E. J. Salvaris and P. J. Cowan (2016). "Human Endothelial Protein C Receptor Overexpression Protects Intraportal Islet Grafts in Mice." Transplant Proc **48**(6): 2200-2207.

Gomez-Tourino, I., S. Arif, M. Eichmann and M. Peakman (2016). "T cells in type 1 diabetes: Instructors, regulators and effectors: A comprehensive review." J Autoimmun **66**: 7-16.

Gonzalez, L. J., E. Gibbons, R. W. Bailey, J. Fairbourn, T. Nguyen, S. K. Smith, K. B. Best, J. Nelson, A. M. Judd and J. D. Bell (2009). "The influence of membrane physical properties on microvesicle release in human erythrocytes." PMC Biophys **2**(1): 7.

Greenberg, M. E., M. Sun, R. Zhang, M. Febbraio, R. Silverstein and S. L. Hazen (2006). "Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells." J Exp Med **203**(12): 2613-2625.

Gruessner, A. C. and R. W. Gruessner (2016). "Pancreas Transplantation of US and Non-US Cases from 2005 to 2014 as Reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR)." Rev Diabet Stud **13**(1): 35-58.

Gustafson, D., S. Veitch and J. E. Fish (2017). "Extracellular Vesicles as Protagonists of Diabetic Cardiovascular Pathology." Front Cardiovasc Med **4**: 71.

Hadi, H. A. and J. A. Suwaidi (2007). "Endothelial dysfunction in diabetes mellitus." Vasc Health Risk Manag **3**(6): 853-876.

Hamon, Y., C. Broccardo, O. Chambenoit, M. F. Luciani, F. Toti, S. Chaslin, J. M. Freyssinet, P. F. Devaux, J. McNeish, D. Marguet and G. Chimini (2000). "ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine." Nat Cell Biol **2**(7): 399-406.

Han, D., X. Xu, D. Baidal, J. Leith, C. Ricordi, R. Alejandro and N. S. Kenyon (2004). "Assessment of cytotoxic lymphocyte gene expression in the peripheral blood of human islet allograft recipients: elevation precedes clinical evidence of rejection." Diabetes **53**(9): 2281-2290.

Hanaire, H., V. Lassmann-Vague, N. Jeandidier, E. Renard, N. Tubiana-Rufi, A. Vambergue, D. Raccah, M. Pinget and B. Guerci (2008). "Treatment of diabetes mellitus using an external insulin pump: the state of the art." Diabetes Metab **34**(4 Pt 2): 401-423.

Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-1695.

Harris, W. S., N. L. Tintle, M. R. Etherton and R. S. Vasan (2018). "Erythrocyte long-chain omega-3 fatty acid levels are inversely associated with mortality and with incident cardiovascular disease: The Framingham Heart Study." J Clin Lipidol **12**(3): 718-727.e716.

Hedrick, C. C. (2015). "Lymphocytes in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **35**(2): 253-257.

Heilbronn, L. K. and L. V. Campbell (2008). "Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity." Curr Pharm Des **14**(12): 1225-1230.

Heinrich, L. F., D. K. Andersen, M. E. Cleasby and C. Lawson (2015). "Long-term high fat feeding of rats results in increased numbers of circulating microvesicles with pro-inflammatory effects on endothelial cells." Br J Nutr **113**(11): 1704-1711.

Heiss, C., N. Amabile, A. C. Lee, W. M. Real, S. F. Schick, D. Lao, M. L. Wong, S. Jahn, F. S. Angeli, P. Minasi, M. L. Springer, S. K. Hammond, S. A. Glantz, W. Grossman, J. R. Balmes and Y. Yeghiazarians (2008). "Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production." J Am Coll Cardiol **51**(18): 1760-1771.

Helal, O., C. Defoort, S. Robert, C. Marin, N. Lesavre, J. Lopez-Miranda, U. Riserus, S. Basu, J. Lovegrove, J. McMonagle, H. M. Roche, F. Dignat-George and D. Lairon (2011). "Increased levels of microparticles originating from endothelial cells, platelets and erythrocytes in subjects with metabolic syndrome: relationship with oxidative stress." Nutr Metab Cardiovasc Dis **21**(9): 665-671.

Hellstrand, K., A. Asea, C. Dahlgren and S. Hermodsson (1994). "Histaminergic regulation of NK cells. Role of monocyte-derived reactive oxygen metabolites." J Immunol **153**(11): 4940-4947.

Helming, L. and S. Gordon (2007). "The molecular basis of macrophage fusion." Immunobiology **212**(9-10): 785-793.

Heneghan, H. M., N. Miller and M. J. Kerin (2010). "Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome." Obes Rev **11**(5): 354-361.

Hering, B. J., W. R. Clarke, N. D. Bridges, T. L. Eggerman, R. Alejandro, M. D. Bellin, K. Chaloner, C. W. Czarniecki, J. S. Goldstein, L. G. Hunsicker, D. B. Kaufman, O. Korsgren, C. P. Larsen, X. Luo, J. F. Markmann, A. Naji, J. Oberholzer, A. M. Posselt, M. R. Rickels, C. Ricordi, M. A. Robien, P. A. Senior, A. M. Shapiro, P. G. Stock and N. A. Turgeon (2016). "Phase 3 Trial of Transplantation of Human Islets in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia." Diabetes Care **39**(7): 1230-1240.

Hering, B. J., I. Matsumoto, T. Sawada, M. Nakano, T. Sakai, R. Kandaswamy and D. E. Sutherland (2002). "Impact of two-layer pancreas preservation on islet isolation and transplantation." Transplantation **74**(12): 1813-1816.

Herranz, B., S. Marquez, B. Guijarro, E. Aracil, C. Aicart-Ramos, I. Rodriguez-Crespo, I. Serrano, M. Rodriguez-Puyol, C. Zaragoza and M. Saura (2012). "Integrin-linked kinase regulates vasomotor function by preventing endothelial nitric oxide synthase uncoupling: role in atherosclerosis." Circ Res **110**(3): 439-449.

Herrera, M. B., V. Fonsato, S. Gatti, M. C. Deregibus, A. Sordi, D. Cantarella, R. Calogero, B. Bussolati, C. Tetta and G. Camussi (2010). "Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats." J Cell Mol Med **14**(6b): 1605-1618.

Hilbrands, R., V. A. Huurman, P. Gillard, J. H. Velthuis, M. De Waele, C. Mathieu, L. Kaufman, M. Pipeleers-Marichal, Z. Ling, B. Movahedi, D. Jacobs-Tulleneers-Thevissen, D. Monbaliu, D. Ysebaert, F. K. Gorus, B. O. Roep, D. G. Pipeleers and B. Keymeulen (2009). "Differences in baseline lymphocyte counts and autoreactivity are associated with differences in outcome of islet cell transplantation in type 1 diabetic patients." Diabetes **58**(10): 2267-2276.

Hirsch, D., J. Odorico, J. S. Danobeitia, R. Alejandro, M. R. Rickels, M. Hanson, N. Radke, D. Baidal, D. Hullett, A. Naji, C. Ricordi, D. Kaufman and L. Fernandez (2012). "Early metabolic markers that anticipate loss of insulin independence in type 1 diabetic islet allograft recipients." Am J Transplant **12**(5): 1275-1289.

Holvoet, P., S. B. Kritchevsky, R. P. Tracy, A. Mertens, S. M. Rubin, J. Butler, B. Goodpaster and T. B. Harris (2004). "The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort." Diabetes **53**(4): 1068-1073.

Holvoet, P., D. H. Lee, M. Steffes, M. Gross and D. R. Jacobs, Jr. (2008). "Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome." Jama **299**(19): 2287-2293.

Horn, P., M. M. Cortese-Krott, N. Amabile, C. Hundsdorfer, K. D. Kroncke, M. Kelm and C. Heiss (2012). "Circulating microparticles carry a functional endothelial nitric oxide synthase that is decreased in patients with endothelial dysfunction." J Am Heart Assoc **2**(1): e003764.

Horstman, L. L., W. Jy, J. J. Jimenez, C. Bidot and Y. S. Ahn (2004). "New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles." Keio J Med **53**(4): 210-230.

Hrachovinova, I., B. Cambien, A. Hafezi-Moghadam, J. Kappelmayer, R. T. Camphausen, A. Widom, L. Xia, H. H. Kazazian, Jr., R. G. Schaub, R. P. McEver and D. D. Wagner (2003). "Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A." Nat Med **9**(8): 1020-1025.

Hristov, M., W. Erl, S. Linder and P. C. Weber (2004). "Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro." Blood **104**(9): 2761-2766.

Hu, S. S., H. G. Zhang, Q. J. Zhang and R. J. Xiu (2015). "CD51+ endothelial microparticles as a biomarker of endothelial dysfunction in obese patients with hypertension." Endocrine **49**(1): 283-285.

Huber, L. C., A. Jungel, J. H. Distler, F. Moritz, R. E. Gay, B. A. Michel, D. S. Pisetsky, S. Gay and O. Distler (2007). "The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles." Apoptosis **12**(2): 363-374.

Hubert, T., L. Arnalsteen, T. Jany, E. Prieur, F. Triponez, B. Nunes, M. C. Vantyghem, V. Gmyr, J. Kerr-Conte, C. Proye and F. Pattou (2005). "[Technique of pancreatic procurement for pancreatic islet isolation]." Ann Chir **130**(6-7): 384-390.

Hubert, T., G. Strecker, V. Gmyr, L. Arnalsteen, D. Garrigue, R. Ezzouaoui, R. Caiazzo, G. Dezfoulian, B. Averland, B. Vandewalle, M. C. Vantyghem, J. Kerr-Conte and F. Pattou (2008). "Acute insulin response to arginine in deceased donors predicts the outcome of human islet isolation." Am J Transplant **8**(4): 872-876.

Hugel, B., M. C. Martinez, C. Kunzelmann and J. M. Freyssinet (2005). "Membrane microparticles: two sides of the coin." Physiology (Bethesda) **20**: 22-27.

Hugel, B., F. Zobairi and J. M. Freyssinet (2004). "Measuring circulating cell-derived microparticles." J Thromb Haemost **2**(10): 1846-1847.

Hurley, J. H., E. Boura, L. A. Carlson and B. Rozycki (2010). "Membrane budding." Cell **143**(6): 875-887.

Huurman, V. A., R. Hilbrands, G. G. Pinkse, P. Gillard, G. Duinkerken, P. van de Linde, P. M. van der Meer-Prins, M. F. Versteeg-van der Voort Maarschalk, K. Verbeeck, B. Z. Alizadeh, C. Mathieu, F. K. Gorus, D. L. Roelen, F. H. Claas, B. Keymeulen, D. G. Pipeleers and B. O. Roep (2008). "Cellular islet autoimmunity associates with clinical outcome of islet cell transplantation." PLoS One **3**(6): e2435.

Ibrahim, S. F. and G. van den Engh (2007). "Flow cytometry and cell sorting." Adv Biochem Eng Biotechnol **106**: 19-39.

Ilonen, J., M. Kiviniemi, J. Lempainen, O. Simell, J. Toppari, R. Veijola and M. Knip (2016). "Genetic susceptibility to type 1 diabetes in childhood - estimation of HLA class II associated disease risk and class II effect in various phases of islet autoimmunity." Pediatr Diabetes **17 Suppl 22**: 8-16.

Ishida, K., K. Taguchi, M. Hida, S. Watanabe, K. Kawano, T. Matsumoto, Y. Hattori and T. Kobayashi (2016). "Circulating microparticles from diabetic rats impair endothelial function and regulate endothelial protein expression." Acta Physiol (Oxf) **216**(2): 211-220.

Islam, S. T., S. Srinivasan and M. E. Craig (2014). "Environmental determinants of type 1 diabetes: a role for overweight and insulin resistance." J Paediatr Child Health **50**(11): 874-879.

Jaeschke, H. and B. L. Woolbright (2012). "Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species." Transplant Rev (Orlando) **26**(2): 103-114.

Jansen, F., X. Yang, K. Baumann, D. Przybilla, T. Schmitz, A. Flender, K. Paul, A. Alhusseiny, G. Nickenig and N. Werner (2015). "Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism." J Cell Mol Med **19**(9): 2202-2214.

Jansen, F., X. Yang, B. S. Franklin, M. Hoelscher, T. Schmitz, J. Bedorf, G. Nickenig and N. Werner (2013). "High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation." Cardiovasc Res **98**(1): 94-106.

Jansen, F., X. Yang, M. Hoelscher, A. Cattelan, T. Schmitz, S. Proebsting, D. Wenzel, S. Vosen, B. S. Franklin, B. K. Fleischmann, G. Nickenig and N. Werner (2013). "Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles." Circulation **128**(18): 2026-2038.

Jansen, F., X. Yang, F. F. Hoyer, K. Paul, N. Heiermann, M. U. Becher, N. Abu Hussein, M. Kebschull, J. Bedorf, B. S. Franklin, E. Latz, G. Nickenig and N. Werner (2012). "Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(8): 1925-1935.

Jansen, F., X. Yang, S. Proebsting, M. Hoelscher, D. Przybilla, K. Baumann, T. Schmitz, A. Dolf, E. Endl, B. S. Franklin, J. M. Sinning, M. Vasa-Nicotera, G. Nickenig and N. Werner (2014). "MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease." J Am Heart Assoc **3**(6): e001249.

Jimenez, J. J., W. Jy, L. M. Mauro, C. Soderland, L. L. Horstman and Y. S. Ahn (2003). "Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis." Thromb Res **109**(4): 175-180.

Johansson, H., A. Lukinius, L. Moberg, T. Lundgren, C. Berne, A. Foss, M. Felldin, R. Kallen, K. Salmela, A. Tibell, G. Tufveson, K. N. Ekdahl, G. Elgue, O. Korsgren and B. Nilsson (2005). "Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation." Diabetes **54**(6): 1755-1762.

Johnson, A. M., J. P. Roach, A. Hu, S. M. Stamatovic, M. R. Zochowski, R. F. Keep and A. V. Andjelkovic (2018). "Connexin 43 gap junctions contribute to brain endothelial barrier hyperpermeability in familial cerebral cavernous malformations type III by modulating tight junction structure." Faseb j **32**(5): 2615-2629.

Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr and C. Turbide (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." J Biol Chem **262**(19): 9412-9420.

Jy, W., L. L. Horstman, J. J. Jimenez, Y. S. Ahn, E. Biro, R. Nieuwland, A. Sturk, F. Dignat-George, F. Sabatier, L. Camoin-Jau, J. Sampol, B. Hugel, F. Zobairi, J. M. Freyssinet, S. Nomura, A. S. Shet, N. S. Key and R. P. Hebbel (2004). "Measuring circulating cell-derived microparticles." J Thromb Haemost **2**(10): 1842-1851.

Jy, W., J. J. Jimenez, L. M. Mauro, L. L. Horstman, P. Cheng, E. R. Ahn, C. J. Bidot and Y. S. Ahn (2005). "Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation." J Thromb Haemost **3**(6): 1301-1308.

Jy, W., W. W. Mao, L. Horstman, J. Tao and Y. S. Ahn (1995). "Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro." Blood Cells Mol Dis **21**(3): 217-231; discussion 231a.

Kalra, H., G. P. Drummen and S. Mathivanan (2016). "Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing." Int J Mol Sci **17**(2): 170.

Kalra, H., R. J. Simpson, H. Ji, E. Aikawa, P. Altevogt, P. Askenase, V. C. Bond, F. E. Borras, X. Breakefield, V. Budnik, E. Buzas, G. Camussi, A. Clayton, E. Cocucci, J. M. Falcon-Perez, S. Gabrielsson, Y. S. Gho, D. Gupta, H. C. Harsha, A. Hendrix, A. F. Hill, J. M. Inal, G. Jenster, E. M. Kramer-Albers, S. K. Lim, A. Llorente, J. Lotvall, A. Marcilla, L. Mincheva-Nilsson, I. Nazarenko, R. Nieuwland, E. N. Nolte-'t Hoen, A. Pandey, T. Patel, M. G. Piper, S. Pluchino, T. S. Prasad, L. Rajendran, G. Raposo, M. Record, G. E. Reid, F. Sanchez-Madrid, R. M. Schiffelers, P. Siljander, A. Stensballe, W. Stoorvogel, D. Taylor, C. Thery, H. Valadi, B. W. van Balkom, J. Vazquez, M. Vidal, M. H. Wauben, M. Yanez-Mo, M. Zoeller and S. Mathivanan (2012). "Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation." PLoS Biol **10**(12): e1001450.

Kanak, M. A. and M. Takita (2014). "Inflammatory response in islet transplantation." **2014**: 451035.

Kanak, M. A., M. Takita, R. Shahbazov, M. C. Lawrence, W. Y. Chung, A. R. Dennison, M. F. Levy and B. Naziruddin (2015). "Evaluation of MicroRNA375 as a Novel Biomarker for Graft Damage in Clinical Islet Transplantation." Transplantation **99**(8): 1568-1573.

Karaca, M., J. Castel, C. Tourrel-Cuzin, M. Brun, A. Geant, M. Dubois, S. Catesson, M. Rodriguez, S. Luquet, P. Cattan, B. Lockhart, J. Lang, A. Ktorza, C. Magnan and C. Kargar (2009). "Exploring functional beta-cell heterogeneity in vivo using PSA-NCAM as a specific marker." PLoS One **4**(5): e5555.

Kassem, M., Z. R. Niazi, M. Abbas, A. El Habhab, G. Kreutter, S. Khemais-Benkhiat, C. Auger, M. C. Antal, V. B. Schini-Kerth, F. Toti and L. Kessler (2017). "Senescence of Pancreas in Middle-Aged Rats with Normal Vascular Function." Ann Transplant **22**: 177-186.

Katsarou, A., S. Gudbjornsdottir, A. Rawshani, D. Dabelea, E. Bonifacio, B. J. Anderson, L. M. Jacobsen, D. A. Schatz and A. Lernmark (2017). "Type 1 diabetes mellitus." Nat Rev Dis Primers **3**: 17016.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.

Kessler, L., A. Parissiadis, F. Bayle, F. Moreau, M. Pinget, N. Froelich, J. P. Cazenave, T. Berney, P. Y. Benhamou and D. Hanau (2009). "Evidence for humoral rejection of a pancreatic islet graft and rescue with rituximab and IV immunoglobulin therapy." Am J Transplant **9**(8): 1961-1966.

Kessler, L., R. Passemard, J. Oberholzer, P. Y. Benhamou, P. Bucher, C. Toso, P. Meyer, A. Penfornis, L. Badet, P. Wolf, C. Colin, P. Morel and M. Pinget (2002). "Reduction of blood glucose variability in type 1 diabetic patients treated by pancreatic islet transplantation: interest of continuous glucose monitoring." Diabetes Care **25**(12): 2256-2262.

Keuren, J. F., E. J. Magdeleyns, J. W. Govers-Riemslag, T. Lindhout and J. Curvers (2006). "Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation." Br J Haematol **134**(3): 307-313.

Kim, D. K., B. Kang, O. Y. Kim, D. S. Choi, J. Lee, S. R. Kim, G. Go, Y. J. Yoon, J. H. Kim, S. C. Jang, K. S. Park, E. J. Choi, K. P. Kim, D. M. Desiderio, Y. K. Kim, J. Lotvall, D. Hwang and Y. S. Gho (2013). "EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles." J Extracell Vesicles **2**.

Kim, J. Y., T. Kelesidis and O. O. Yang (2017). "Detection of Donor-Derived Microparticles in the Peripheral Blood of a Hand Transplant Recipient During Rejection." Transplant Direct **3**(3): e131.

Kockx, M. M. (1998). "Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(10): 1519-1522.

Koga, H., S. Sugiyama, K. Kugiyama, H. Fukushima, K. Watanabe, T. Sakamoto, M. Yoshimura, H. Jinnouchi and H. Ogawa (2006). "Elevated levels of remnant lipoproteins are associated with plasma platelet microparticles in patients with type-2 diabetes mellitus without obstructive coronary artery disease." Eur Heart J **27**(7): 817-823.

Koga, H., S. Sugiyama, K. Kugiyama, K. Watanabe, H. Fukushima, T. Tanaka, T. Sakamoto, M. Yoshimura, H. Jinnouchi and H. Ogawa (2005). "Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **45**(10): 1622-1630.

Kolodgie, F. D., J. Narula, N. Haider and R. Virmani (2001). "Apoptosis in atherosclerosis. Does it contribute to plaque instability?" Cardiol Clin **19**(1): 127-139, ix.

Kornek, M., Y. Popov, T. A. Libermann, N. H. Afdhal and D. Schuppan (2011). "Human T cell microparticles circulate in blood of hepatitis patients and induce fibrolytic activation of hepatic stellate cells." Hepatology **53**(1): 230-242.

Korsgren, S., Y. Molin, K. Salmela, T. Lundgren, A. Melhus and O. Korsgren (2012). "On the etiology of type 1 diabetes: a new animal model signifying a decisive role for bacteria eliciting an adverse innate immunity response." Am J Pathol **181**(5): 1735-1748.

Kreutter, G., M. Kassem, A. El Habhab, P. Baltzinger, M. Abbas, J. Boisrame-Helms, L. Amoura, J. Peluso, B. Yver, Z. Fatiha, G. Ubeaud-Sequier, L. Kessler and F. Toti (2017). "Endothelial microparticles released by activated protein C protect beta cells through EPCR/PAR1 and annexin A1/FPR2 pathways in islets." J Cell Mol Med.

Kreutter, G., M. Kassem, A. El Habhab, P. Baltzinger, M. Abbas, J. Boisrame-Helms, L. Amoura, J. Peluso, B. Yver, Z. Fatiha, G. Ubeaud-Sequier, L. Kessler and F. Toti (2017). "Endothelial microparticles released by activated protein C protect beta cells through EPCR/PAR1 and annexin A1/FPR2 pathways in islets." J Cell Mol Med **21**(11): 2759-2772.

Kromhout, D., S. Yasuda, J. M. Geleijnse and H. Shimokawa (2012). "Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work?" Eur Heart J **33**(4): 436-443.

Krueger, L. A., M. R. Barnard, A. L. Frelinger, 3rd, M. I. Furman and A. D. Michelson (2002). "Immunophenotypic analysis of platelets." Curr Protoc Cytom **Chapter 6**: Unit 6.10.

Kunzelmann-Marche, C., J. M. Freyssinet and M. C. Martinez (2002). "Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity. Role of transient receptor potential channels and ERK pathway." J Biol Chem **277**(22): 19876-19881.

Kurtzman, N., L. Zhang, B. French, R. Jonas, A. Bantly, W. T. Rogers, J. S. Moore, M. R. Rickels and E. R. Mohler, 3rd (2013). "Personalized cytomic assessment of vascular health: Evaluation of the vascular health profile in diabetes mellitus." Cytometry B Clin Cytom **84**(4): 255-266.

Lablanche, S., S. Borot, A. Wojtusciszyn, F. Bayle, R. Tetaz, L. Badet, C. Thivolet, E. Morelon, L. Frimat, A. Penfornis, L. Kessler, C. Brault, C. Colin, I. Tauveron, D. Bosco, T. Berney and P. Y. Benhamou (2015). "Five-Year Metabolic, Functional, and Safety Results of Patients With Type 1 Diabetes Transplanted With Allogenic Islets Within the Swiss-French GRAGIL Network." Diabetes Care **38**(9): 1714-1722.

Lablanche, S., C. Cottet-Rousselle, L. Argaud, C. Laporte, F. Lamarche, M. J. Richard, T. Berney, P. Y. Benhamou and E. Fontaine (2015). "Respective effects of oxygen and energy substrate deprivation on beta cell viability." Biochim Biophys Acta **1847**(6-7): 629-639.

Lablanche, S., S. David-Tchouda, J. Margier, E. Schir, A. Wojtusciszyn, S. Borot, L. Kessler, E. Morelon, C. Thivolet, F. Pattou, M. C. Vantyghem, T. Berney and P. Y. Benhamou (2017). "Randomised, prospective, medico-economic nationwide French study of islet transplantation in patients with severely unstable type 1 diabetes: the STABILOT study protocol." BMJ Open **7**(2): e013434.

Lablanche, S., M. C. Vantyghem, L. Kessler, A. Wojtusciszyn, S. Borot, C. Thivolet, S. Girerd, D. Bosco, J. L. Bosson, C. Colin, R. Tetaz, S. Logerot, J. Kerr-Conte, E. Renard, A. Penfornis, E. Morelon, F. Buron, K. Skaare, G. Grguric, C. Camillo-Brault, H. Egelhofer, K. Benomar, L. Badet, T. Berney, F. Pattou and P. Y. Benhamou (2018). "Islet transplantation versus insulin therapy in patients with type 1 diabetes with severe hypoglycaemia or poorly controlled glycaemia after kidney transplantation (TRIMECO): a multicentre, randomised controlled trial." Lancet Diabetes Endocrinol **6**(7): 527-537.

Lacotte, S., T. Berney, A. J. Shapiro and C. Toso (2011). "Immune monitoring of pancreatic islet graft: towards a better understanding, detection and treatment of harmful events." Expert Opin Biol Ther **11**(1): 55-66.

Lacroix, R., C. Judicone, M. Mooberry, M. Boucekine, N. S. Key and F. Dignat-George (2013). "Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop." J Thromb Haemost.

Lacroix, R., L. Plawinski, S. Robert, L. Doeuvre, F. Sabatier, S. Martinez de Lizarrondo, A. Mezzapesa, F. Anfosso, A. S. Leroyer, P. Poullin, N. Jourde, M. S. Njock, C. M. Boulanger, E. Angles-Cano and F. Dignat-George (2012). "Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis." Haematologica **97**(12): 1864-1872.

Landmesser, U., B. Hornig and H. Drexler (2004). "Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?" Circulation **109**(21 Suppl 1): Ii27-33.

Lango, H., C. N. Palmer, A. D. Morris, E. Zeggini, A. T. Hattersley, M. I. McCarthy, T. M. Frayling and M. N. Weedon (2008). "Assessing the combined impact of 18 common genetic variants of modest effect sizes on type 2 diabetes risk." Diabetes **57**(11): 3129-3135.

Lau, J. and P. O. Carlsson (2009). "Low revascularization of human islets when experimentally transplanted into the liver." Transplantation **87**(3): 322-325.

Lawson, C., J. M. Vicencio, D. M. Yellon and S. M. Davidson (2016). "Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease." J Endocrinol **228**(2): R57-71.

Lee, Y., M. Ravazzola, B. H. Park, Y. K. Bashmakov, L. Orci and R. H. Unger (2007). "Metabolic mechanisms of failure of intraportally transplanted pancreatic beta-cells in rats: role of lipotoxicity and prevention by leptin." Diabetes **56**(9): 2295-2301.

Lemoinne, S., D. Thabut, C. Housset, R. Moreau, D. Valla, C. M. Boulanger and P. E. Rautou (2014). "The emerging roles of microvesicles in liver diseases." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **11**(6): 350-361.

Leong, H. S., T. J. Podor, B. Manocha and J. D. Lewis (2011). "Validation of flow cytometric detection of platelet microparticles and liposomes by atomic force microscopy." J Thromb Haemost **9**(12): 2466-2476.

Leroyer, A. S., H. Isobe, G. Leseche, Y. Castier, M. Wassef, Z. Mallat, B. R. Binder, A. Tedgui and C. M. Boulanger (2007). "Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques." J Am Coll Cardiol **49**(7): 772-777.

Leroyer, A. S., P. E. Rautou, J. S. Silvestre, Y. Castier, G. Leseche, C. Devue, M. Duriez, R. P. Brandes, E. Lutgens, A. Tedgui and C. M. Boulanger (2008). "CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization." J Am Coll Cardiol **52**(16): 1302-1311.

Ley, K. (2003). "Arrest chemokines." Microcirculation **10**(3-4): 289-295.

Leytin, V., D. J. Allen, A. Mutlu, A. V. Gyulkhandanyan, S. Mykhaylov and J. Freedman (2009). "Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore." Lab Invest **89**(4): 374-384.

Lhermusier, T., H. Chap and B. Payrastre (2011). "Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome." J Thromb Haemost **9**(10): 1883-1891.

Libby, P., P. M. Ridker and G. K. Hansson (2009). "Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice." J Am Coll Cardiol **54**(23): 2129-2138.

Ling, C. and L. Groop (2009). "Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes." Diabetes **58**(12): 2718-2725.

Littlewood, T. D. and M. R. Bennett (2003). "Apoptotic cell death in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **14**(5): 469-475.

Litvack, M. L., M. Post and N. Palaniyar (2011). "IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages." PLoS One **6**(3): e17223.

Liu, M. L., M. P. Reilly, P. Casasanto, S. E. McKenzie and K. J. Williams (2007). "Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(2): 430-435.

Liu, M. L. and K. J. Williams (2012). "Microvesicles: potential markers and mediators of endothelial dysfunction." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **19**(2): 121-127.

Losche, W. (2005). "Platelets and tissue factor." Platelets **16**(6): 313-319.

Loyer, X., A. C. Vion, A. Tedgui and C. M. Boulanger (2014). "Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases." Circ Res **114**(2): 345-353.

Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.

Ly, T. T., D. B. Keenan, A. Roy, J. Han, B. Grosman, M. Cantwell, N. Kurtz, R. von Eyben, P. Clinton, D. M. Wilson and B. A. Buckingham (2016). "Automated Overnight Closed-Loop Control Using a Proportional-Integral-Derivative Algorithm with Insulin Feedback in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes at Diabetes Camp." Diabetes Technol Ther **18**(6): 377-384.

Ly, T. T., S. A. Weinzimer, D. M. Maahs, J. L. Sherr, A. Roy, B. Grosman, M. Cantwell, N. Kurtz, L. Carria, L. Messer, R. von Eyben and B. A. Buckingham (2017). "Automated hybrid closed-loop control with a proportional-integral-derivative based system in adolescents and adults with type 1 diabetes: individualizing settings for optimal performance." Pediatr Diabetes **18**(5): 348-355.

Lynch, S. F. and C. A. Ludlam (2007). "Plasma microparticles and vascular disorders." Br J Haematol **137**(1): 36-48.

MacDonald, R. I. (1993). "Temperature and ionic effects on the interaction of erythroid spectrin with phosphatidylserine membranes." Biochemistry **32**(27): 6957-6964.

MacKenzie, A., H. L. Wilson, E. Kiss-Toth, S. K. Dower, R. A. North and A. Surprenant (2001). "Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding." Immunity **15**(5): 825-835.

Mackman, N. (2006). "Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis." Blood Cells Mol Dis **36**(2): 104-107.

Maechler, P., L. Jornot and C. B. Wollheim (1999). "Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells." J Biol Chem **274**(39): 27905-27913.

Mahmoud, A. M., F. L. Wilkinson, E. M. McCarthy, D. Moreno-Martinez, A. Langford-Smith, M. Romero, J. Duarte and M. Y. Alexander (2017). "Endothelial microparticles prevent lipid-induced endothelial damage via Akt/eNOS signaling and reduced oxidative stress." Faseb j **31**(10): 4636-4648.

Maji, S., A. Matsuda, I. K. Yan, M. Parasramka and T. Patel (2017). "Extracellular vesicles in liver diseases." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **312**(3): G194-g200.

Malek, A. M., S. L. Alper and S. Izumo (1999). "Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis." Jama **282**(21): 2035-2042.

Malek, A. M. and S. Izumo (1994). "Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell." J Hypertens **12**(9): 989-999.

Mallat, Z., B. Hugel, J. Ohan, G. Leseche, J. M. Freyssinet and A. Tedgui (1999). "Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity." Circulation **99**(3): 348-353.

Mallat, Z., G. Steg, B. Hugel, M. L. Tanguy, J. Benessiano, K. Fox, J. P. Collet, P. Henry, O. Dabbous, G. Montalescot, B. Asselin, J. M. Freyssinet and A. Tedgui (2004). "Prognostic value of circulating shed membrane pro-coagulant microparticles in patients with severe acute coronary syndrome. A substudy from the registre of acute coronary events (GRACE)." Circulation **110 (III)**: 575 (abstract 2676).

Manno, S., Y. Takakuwa and N. Mohandas (2002). "Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 1943-1948.

Marfella, R., K. Esposito, R. Giunta, G. Coppola, L. De Angelis, B. Farzati, G. Paolisso and D. Giugliano (2000). "Circulating adhesion molecules in humans: role of hyperglycemia and hyperinsulinemia." Circulation **101**(19): 2247-2251.

Martin, S., A. Tesse, B. Hugel, M. C. Martinez, O. Morel, J. M. Freyssinet and R. Andriantsitohaina (2004). "Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression." Circulation **109**(13): 1653-1659.

Martinez, M. C. and J. M. Freyssinet (2001). "Deciphering the plasma membrane hallmarks of apoptotic cells: phosphatidylserine transverse redistribution and calcium entry." BMC Cell Biol **2**: 20.

Marzorati, S., R. Melzi, A. Citro, E. Cantarelli, A. Mercalli, M. Scavini and L. Piemonti (2014). "Engraftment versus immunosuppression: cost-benefit analysis of immunosuppression after intrahepatic murine islet transplantation." Transplantation **97**(10): 1019-1026.

Mastronardi, M. L., H. A. Mostefai, F. Meziani, M. C. Martinez, P. Asfar and R. Andriantsitohaina (2011). "Circulating microparticles from septic shock patients exert differential tissue expression of enzymes related to inflammation and oxidative stress." Crit Care Med **39**(7): 1739-1748.

Mathivanan, S., J. W. Lim, B. J. Tauro, H. Ji, R. L. Moritz and R. J. Simpson (2010). "Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature." Mol Cell Proteomics **9**(2): 197-208.

Matthews, P. M., I. Rabiner and R. Gunn (2011). "Non-invasive imaging in experimental medicine for drug development." Curr Opin Pharmacol **11**(5): 501-507.

Mause, S. F., P. von Hundelshausen, A. Zernecke, R. R. Koenen and C. Weber (2005). "Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(7): 1512-1518.

Mause, S. F. and C. Weber (2010). "Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange." Circ Res **107**(9): 1047-1057.

Mayer-Davis, E. J., J. M. Lawrence, D. Dabelea, J. Divers, S. Isom, L. Dolan, G. Imperatore, B. Linder, S. Marcovina, D. J. Pettitt, C. Pihoker, S. Saydah and L. Wagenknecht (2017). "Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002-2012." N Engl J Med **376**(15): 1419-1429.

Mayr, M., D. Grainger, U. Mayr, A. S. Leroyer, G. Leseche, A. Sidibe, O. Herbin, X. Yin, A. Gomes, B. Madhu, J. R. Griffiths, Q. Xu, A. Tedgui and C. M. Boulanger (2009). "Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques." Circ Cardiovasc Genet **2**(4): 379-388.

McNally, J. S., M. E. Davis, D. P. Giddens, A. Saha, J. Hwang, S. Dikalov, H. Jo and D. G. Harrison (2003). "Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(6): H2290-2297.

Meers, P. and T. Mealy (1993). "Calcium-dependent annexin V binding to phospholipids: stoichiometry, specificity, and the role of negative charge." Biochemistry **32**(43): 11711-11721.

Menger, M. D., P. Vajkoczy, C. Beger and K. Messmer (1994). "Orientation of microvascular blood flow in pancreatic islet isografts." J Clin Invest **93**(5): 2280-2285.

Mesri, M. and D. C. Altieri (1999). "Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway." J Biol Chem **274**(33): 23111-23118.

Messer, L., G. Alsaleh, J. M. Freyssinet, F. Zobairi, I. Leray, J. E. Gottenberg, J. Sibilia, F. Toti-Orfanoudakis and D. Wachsmann (2009). "Microparticle-induced release of B-lymphocyte regulators by rheumatoid synoviocytes." Arthritis Res Ther **11**(2): R40.

Minamino, T., H. Miyauchi, T. Yoshida, Y. Ishida, H. Yoshida and I. Komuro (2002). "Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction." Circulation **105**(13): 1541-1544.

Minciacchi, V. R., M. R. Freeman and D. Di Vizio (2015). "Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes." Semin Cell Dev Biol **40**: 41-51.

Miyanishi, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura and S. Nagata (2007). "Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor." Nature **450**(7168): 435-439.

Molnar, C., M. Essand, L. Wennberg, C. Berne, E. Larsson, G. Tufveson and O. Korsgren (2013). "Islet engraftment and revascularization in clinical and experimental transplantation." Cell Transplant **22**(2): 243-251.

Moore, F., N. Naamane, M. L. Colli, T. Bouckenooghe, F. Ortis, E. N. Gurzov, M. Igoillo-Esteve, C. Mathieu, G. Bontempi, T. Thykjaer, T. F. Orntoft and D. L. Eizirik (2011). "STAT1 is a master regulator of pancreatic {beta}-cell apoptosis and islet inflammation." J Biol Chem **286**(2): 929-941.

Moreau, F., F. Toti, F. Bayle, T. Berney, H. Egelhofer, M. Chastre, M. J. Richard, M. Greget, D. Masson, F. Zobairi, P. Y. Benhamou and L. Kessler (2012). "Rescue of a pancreatic islet graft after steroid therapy." Transplantation **93**(3): e10-11.

Moreau, F., F. Toti, F. Bayle, T. Berney, H. Egelhofer, M. Chastre, M. J. Richard, M. Greget, D. Masson, F. Zobairi, P. Y. Benhamou and L. Kessler (2012). "Rescue of a Pancreatic Islet Graft After Steroid Therapy." Transplantation **93**(3): e10-e11.

Morel, O., B. Hugel, L. Jesel, Z. Mallat, F. Lanza, M. P. Douchet, M. Zupan, M. Chauvin, J. P. Cazenave, A. Tedgui, J. M. Freyssinet and F. Toti (2004). "Circulating procoagulant microparticles and soluble GPV in myocardial infarction treated by primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. A possible role for GPIIb-IIIa antagonists." J Thromb Haemost **2**(7): 1118-1126.

Morel, O., L. Jesel, J. M. Freyssinet and F. Toti (2011). "Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(1): 15-26.

Morel, O., N. Morel, L. Jesel, J. M. Freyssinet and F. Toti (2011). "Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis." Semin Immunopathol **33**(5): 469-486.

Morel, O., P. Ohlmann, E. Epailly, B. Bakouboula, F. Zobairi, L. Jesel, N. Meyer, M. P. Chenard, J. M. Freyssinet, P. Bareiss, J. P. Mazzucotelli and F. Toti (2008). "Endothelial cell activation contributes to the

release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection." J Heart Lung Transplant **27**(1): 38-45.

Morel, O., B. Pereira, G. Averous, A. Faure, L. Jesel, P. Germain, L. Grunebaum, P. Ohlmann, J. M. Freyssinet, P. Bareiss and F. Toti (2009). "Increased levels of procoagulant tissue factor-bearing microparticles within the occluded coronary artery of patients with ST-segment elevation myocardial infarction: role of endothelial damage and leukocyte activation." Atherosclerosis **204**(2): 636-641.

Morel, O., F. Toti, B. Hugel, B. Bakouboula, L. Camoin-Jau, F. Dignat-George and J. M. Freyssinet (2006). "Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2594-2604.

Morel, O., F. Toti, B. Hugel and J. M. Freyssinet (2004). "Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors." Curr Opin Hematol **11**(3): 156-164.

Morel, O., F. Toti, N. Morel and J. M. Freyssinet (2009). "Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious?" Haematologica **94**(3): 313-317.

Morelli, A. E., A. T. Larregina, W. J. Shufesky, M. L. Sullivan, D. B. Stolz, G. D. Papworth, A. F. Zahorchak, A. J. Logar, Z. Wang, S. C. Watkins, L. D. Falo, Jr. and A. W. Thomson (2004). "Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells." Blood **104**(10): 3257-3266.

Morgul, M. H., K. Splith, C. Leonhardt, N. Raschzok, A. Reutzel-Selke, R. B. Schmuck, A. Andreou, G. Atanasov, C. Benzing, F. Krenzien, H. M. Hau, P. Felgendreff, S. Klunk, J. Pratschke, I. M. Sauer and M. Schmelzle (2018). "The value of microparticles in detecting acute rejection episodes after liver transplantation." Biomarkers **23**(1): 25-32.

Mostefai, H. A., A. Agouni, N. Carusio, M. L. Mastronardi, C. Heymes, D. Henrion, R. Andriantsitohaina and M. C. Martinez (2008). "Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase regulate nitric oxide and reactive oxygen species productions by apoptotic lymphocyte microparticles in endothelial cells." J Immunol **180**(7): 5028-5035.

Mostefai, H. A., F. Meziani, M. L. Mastronardi, A. Agouni, C. Heymes, C. Sargentini, P. Asfar, M. C. Martinez and R. Andriantsitohaina (2008). "Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function." Am J Respir Crit Care Med **178**(11): 1148-1155.

Muhammad A. Farooq, L. A., Sébastien Gaertner, Zahid R. Niazi, Shinhee Park, Abdul W. Qureshi, Min-Ho Oak, Florence Toti, Valérie B. Schini-Kerth, Cyril Auger (2017). "The omega-3 EPA:DHA 6:1 formulation improves ageing-related blunted endothelium-dependent relaxations and increased contractile responses in the mesenteric artery: role of oxidative stress and cyclooxygenases
." the abstract submitted to the ICMAN/IUPHAR

Mulcahy, L. A., R. C. Pink and D. R. Carter (2014). "Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake." J Extracell Vesicles **3**.

Muller, G. (2012). "Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases." Diabetes Metab Syndr Obes **5**: 247-282.

Muralidharan-Chari, V., J. Clancy, C. Plou, M. Romao, P. Chavrier, G. Raposo and C. D'Souza-Schorey (2009). "ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles." Curr Biol **19**(22): 1875-1885.

Nabhan, J. F., R. Hu, R. S. Oh, S. N. Cohen and Q. Lu (2012). "Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(11): 4146-4151.

Nanjundappa, R. H., R. Wang, Y. Xie, C. S. Umeshappa, R. Chibbar, Y. Wei, Q. Liu and J. Xiang (2011). "GP120-specific exosome-targeted T cell-based vaccine capable of stimulating DC- and CD4(+) T-independent CTL responses." Vaccine **29**(19): 3538-3547.

Navab, M., S. S. Imes, S. Y. Hama, G. P. Hough, L. A. Ross, R. W. Bork, A. J. Valente, J. A. Berliner, D. C. Drinkwater, H. Laks and et al. (1991). "Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein." J Clin Invest **88**(6): 2039-2046.

Naziruddin, B., S. Iwahashi, M. A. Kanak, M. Takita, T. Itoh and M. F. Levy (2014). "Evidence for instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical autologous islet transplantation." Am J Transplant **14**(2): 428-437.

Naziruddin, B., S. Wease, D. Stablein, F. B. Barton, T. Berney, M. R. Rickels and R. Alejandro (2012). "HLA class I sensitization in islet transplant recipients: report from the Collaborative Islet Transplant Registry." Cell Transplant **21**(5): 901-908.

Negi, S., A. Jetha, R. Aikin, C. Hasilo, R. Sladek and S. Paraskevas (2012). "Analysis of beta-cell gene expression reveals inflammatory signaling and evidence of dedifferentiation following human islet isolation and culture." PLoS One **7**(1): e30415.

Neri, T., C. Armani, A. Pegoli, C. Cordazzo, Y. Carmazzi, S. Brunelleschi, C. Bardelli, M. C. Breschi, P. Paggiaro and A. Celi (2011). "Role of NF-kappaB and PPAR-gamma in lung inflammation induced by monocyte-derived microparticles." Eur Respir J **37**(6): 1494-1502.

New, S. E., C. Goettsch, M. Aikawa, J. F. Marchini, M. Shibasaki, K. Yabusaki, P. Libby, C. M. Shanahan, K. Croce and E. Aikawa (2013). "Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques." Circ Res **113**(1): 72-77.

Nilsson, B., K. N. Ekdahl and O. Korsgren (2011). "Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment." Curr Opin Organ Transplant **16**(6): 620-626.

Nomura, S., N. Inami, Y. Kimura, S. Omoto, A. Shouzu, M. Nishikawa and T. Iwasaka (2007). "Effect of nifedipine on adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus." J Hum Hypertens **21**(1): 38-44.

Nomura, S., N. Inami, A. Shouzu, F. Urase and Y. Maeda (2009). "Correlation and association between plasma platelet-, monocyte- and endothelial cell-derived microparticles in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus." Platelets **20**(6): 406-414.

Nomura, S., K. Ishii, N. Inami, Y. Kimura, N. Uoshima, H. Ishida, T. Yoshihara, F. Urase, Y. Maeda and K. Hayashi (2008). "Evaluation of angiopoietins and cell-derived microparticles after stem cell transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **14**(7): 766-774.

Nomura, S., S. Kanazawa and S. Fukuhara (2002). "Effects of efonidipine on platelet and monocyte activation markers in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus." J Hum Hypertens **16**(8): 539-547.

Nomura, S., S. Kanazawa and S. Fukuhara (2003). "Effects of eicosapentaenoic acid on platelet activation markers and cell adhesion molecules in hyperlipidemic patients with Type 2 diabetes mellitus." J Diabetes Complications **17**(3): 153-159.

Nomura, S., Y. Ozaki and Y. Ikeda (2008). "Function and role of microparticles in various clinical settings." Thromb Res **123**(1): 8-23.

Nomura, S., A. Shouzu, S. Omoto, M. Nishikawa and S. Fukuhara (2000). "Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes." Clin Exp Immunol **121**(3): 437-443.

Nomura, S., A. Shouzu, S. Omoto, M. Nishikawa, S. Fukuhara and T. Iwasaka (2006). "Effect of valsartan on monocyte/endothelial cell activation markers and adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus." Thromb Res **117**(4): 385-392.

Nomura, S., A. Shouzu, S. Omoto, M. Nishikawa and T. Iwasaka (2004). "Effects of losartan and simvastatin on monocyte-derived microparticles in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus." Clin Appl Thromb Hemost **10**(2): 133-141.

Nomura, S., A. Shouzu, S. Omoto, M. Nishikawa and T. Iwasaka (2005). "Long-term treatment with nifedipine modulates procoagulant marker and C-C chemokine in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus." Thromb Res **115**(4): 277-285.

Nomura, S., N. Takahashi, N. Inami, T. Kajiura, K. Yamada, H. Nakamori and N. Tsuda (2004). "Probucol and ticlopidine: effect on platelet and monocyte activation markers in hyperlipidemic patients with and without type 2 diabetes." Atherosclerosis **174**(2): 329-335.

Nomura, S., N. N. Tandon, T. Nakamura, J. Cone, S. Fukuhara and J. Kambayashi (2001). "High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells." Atherosclerosis **158**(2): 277-287.

Norling, L. V., J. Dalli, R. J. Flower, C. N. Serhan and M. Perretti (2012). "Resolvin D1 limits polymorphonuclear leukocyte recruitment to inflammatory loci: receptor-dependent actions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(8): 1970-1978.

Norling, L. V., M. Spite, R. Yang, R. J. Flower, M. Perretti and C. N. Serhan (2011). "Cutting edge: Humanized nano-proresolving medicines mimic inflammation-resolution and enhance wound healing." J Immunol **186**(10): 5543-5547.

Nozaki, T., S. Sugiyama, H. Koga, K. Sugamura, K. Ohba, Y. Matsuzawa, H. Sumida, K. Matsui, H. Jinnouchi and H. Ogawa (2009). "Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease." J Am Coll Cardiol **54**(7): 601-608.

Nozaki, T., S. Sugiyama, K. Sugamura, K. Ohba, Y. Matsuzawa, M. Konishi, J. Matsubara, E. Akiyama, H. Sumida, K. Matsui, H. Jinnouchi and H. Ogawa (2010). "Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure." Eur J Heart Fail **12**(11): 1223-1228.

Ogata, N., M. Imaizumi, S. Nomura, A. Shozu, M. Arichi, M. Matsuoka and M. Matsumura (2005). "Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy." Diabetes Res Clin Pract **68**(3): 193-201.

Ogata, N., S. Nomura, A. Shouzu, M. Imaizumi, M. Arichi and M. Matsumura (2006). "Elevation of monocyte-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy." Diabetes Res Clin Pract **73**(3): 241-248.

Oh, J., Y. D. Lee and A. J. Wagers (2014). "Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities." Nat Med **20**(8): 870-880.

Olland, A., J. Reeb, A. Leclerq, B. Renaud-Picard, P. E. Falcoz, R. Kessler, V. Schini-Kerth, L. Kessler, F. Toti and G. Massard (2016). "Microparticles: A new insight into lung primary graft dysfunction?" Hum Immunol **77**(11): 1101-1107.

Olsson, R., J. Olerud, U. Pettersson and P. O. Carlsson (2011). "Increased numbers of low-oxygenated pancreatic islets after intraportal islet transplantation." Diabetes **60**(9): 2350-2353.

Omoto, S., S. Nomura, A. Shouzu, M. Nishikawa, S. Fukuhara and T. Iwasaka (2002). "Detection of monocyte-derived microparticles in patients with Type II diabetes mellitus." Diabetologia **45**(4): 550-555.

Owens, A. P., 3rd and N. Mackman (2011). "Microparticles in hemostasis and thrombosis." Circ Res **108**(10): 1284-1297.

Owens, A. P., 3rd, F. H. Passam, S. Antoniak, S. M. Marshall, A. L. McDaniel, L. Rudel, J. C. Williams, B. K. Hubbard, J. A. Dutton, J. Wang, P. S. Tobias, L. K. Curtiss, A. Daugherty, D. Kirchhofer, J. P. Luyendyk, P. M. Moriarty, S. Nagarajan, B. C. Furie, B. Furie, D. G. Johns, R. E. Temel and N. Mackman (2012). "Monocyte tissue factor-dependent activation of coagulation in hypercholesterolemic mice and monkeys is inhibited by simvastatin." J Clin Invest **122**(2): 558-568.

Palfrey, H. C. and A. Waseem (1985). "Protein kinase C in the human erythrocyte. Translocation to the plasma membrane and phosphorylation of bands 4.1 and 4.9 and other membrane proteins." J Biol Chem **260**(29): 16021-16029.

Papas, K. K., T. Karatzas, T. Berney, T. Minor, P. Pappas, F. Pattou, J. Shaw, C. Toso and H. J. Schuurman (2013). "International workshop: islet transplantation without borders enabling islet transplantation in Greece with international collaboration and innovative technology." Clin Transplant **27**(2): E116-125.

Passerini, A. G., D. C. Polacek, C. Shi, N. M. Francesco, E. Manduchi, G. R. Grant, W. F. Pritchard, S. Powell, G. Y. Chang, C. J. Stoeckert, Jr. and P. F. Davies (2004). "Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2482-2487.

Patterson, C. C., G. G. Dahlquist, E. Gyurus, A. Green and G. Soltesz (2009). "Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study." Lancet **373**(9680): 2027-2033.

Perez-Casal, M., C. Downey, B. Cutillas-Moreno, M. Zuzel, K. Fukudome and C. H. Toh (2009). "Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects." Haematologica **94**(3): 387-394.

Perez-Casal, M., C. Downey, K. Fukudome, G. Marx and C. H. Toh (2005). "Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor." Blood **105**(4): 1515-1522.

Pfister, S. L. (2004). "Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery." Hypertension **43**(2): 428-433.

Piemonti, L., M. J. Everly, P. Maffi, M. Scavini, F. Poli, R. Nano, M. Cardillo, R. Melzi, A. Mercalli, V. Sordi, V. Lampasona, A. Espadas de Arias, M. Scalamogna, E. Bosi, E. Bonifacio, A. Secchi and P. I. Terasaki (2013). "Alloantibody and autoantibody monitoring predicts islet transplantation outcome in human type 1 diabetes." Diabetes **62**(5): 1656-1664.

Pihusch, V., A. Rank, R. Steber, M. Pihusch, R. Pihusch, B. Toth, E. Hiller and H. J. Kolb (2006). "Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients." Transplantation **81**(10): 1405-1409.

Plebanek, M. P., R. K. Mutharasan, O. Volpert, A. Matov, J. C. Gatlin and C. S. Thaxton (2015). "Nanoparticle Targeting and Cholesterol Flux Through Scavenger Receptor Type B-1 Inhibits Cellular Exosome Uptake." Sci Rep **5**: 15724.

Poisson, J., S. Lemoinne, C. Boulanger, F. Durand, R. Moreau, D. Valla and P. E. Rautou (2017). "Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases." J Hepatol **66**(1): 212-227.

Poitevin, S., E. Cochery-Nouvellon, A. Dupont and P. Nguyen (2007). "Monocyte IL-10 produced in response to lipopolysaccharide modulates thrombin generation by inhibiting tissue factor expression and release of active tissue factor-bound microparticles." Thromb Haemost **97**(4): 598-607.

Poon, I. K., C. D. Lucas, A. G. Rossi and K. S. Ravichandran (2014). "Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential." Nat Rev Immunol **14**(3): 166-180.

Porro, C., S. Di Gioia, T. Trotta, S. Lepore, M. A. Panaro, A. Battaglino, L. Ratclif, S. Castellani, P. Bufo, M. C. Martinez and M. Conese (2013). "Pro-inflammatory effect of cystic fibrosis sputum microparticles in the murine lung." J Cyst Fibros **12**(6): 721-728.

Porro, C., S. Lepore, T. Trotta, S. Castellani, L. Ratclif, A. Battaglino, S. Di Gioia, M. C. Martinez, M. Conese and A. B. Maffione (2010). "Isolation and characterization of microparticles in sputum from cystic fibrosis patients." Respir Res **11**: 94.

Pouliquen, E., P. Baltzinger, A. Lemle, C. C. Chen, A. Parissiadis, S. Borot, L. Frimat, S. Girerd, T. Berney, S. Lablanche, P. Y. Benhamou, E. Morelon, L. Badet, V. Dubois, L. Kessler and O. Thaunat (2017). "Anti-Donor HLA Antibody Response After Pancreatic Islet Grafting: Characteristics, Risk Factors, and Impact on Graft Function." Am J Transplant **17**(2): 462-473.

Pradhan, A. D., J. E. Manson, N. Rifai, J. E. Buring and P. M. Ridker (2001). "C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus." Jama **286**(3): 327-334.

Pradhan, D., P. Williamson and R. A. Schlegel (1994). "Phosphatidylserine vesicles inhibit phagocytosis of erythrocytes with a symmetric transbilayer distribution of phospholipids." Mol Membr Biol **11**(3): 181-187.

Principi, N., M. G. Berioli, S. Bianchini and S. Esposito (2017). "Type 1 diabetes and viral infections: What is the relationship?" J Clin Virol **96**: 26-31.

Qamri, Z., R. Pelletier, J. Foster, S. Kumar, H. Momani, K. Ware, J. Von Visger, A. Satoskar, T. Nadasdy and S. V. Brodsky (2014). "Early posttransplant changes in circulating endothelial microparticles in patients with kidney transplantation." Transpl Immunol **31**(2): 60-64.

Qi, M., B. Barbaro, S. Wang, Y. Wang, M. Hansen and J. Oberholzer (2009). "Human pancreatic islet isolation: Part I: digestion and collection of pancreatic tissue." J Vis Exp(27).

Rafael, E., E. A. Ryan, B. W. Paty, J. Oberholzer, S. Imes, P. Senior, C. McDonald, J. R. Lakey and A. M. Shapiro (2003). "Changes in liver enzymes after clinical islet transplantation." Transplantation **76**(9): 1280-1284.

Rana, S., S. Yue, D. Stadel and M. Zoller (2012). "Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection." Int J Biochem Cell Biol **44**(9): 1574-1584.

Rand, M. L., H. Wang, K. W. Bang, M. A. Packham and J. Freedman (2006). "Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits." J Thromb Haemost **4**(7): 1621-1623.

Rangel, E. B. (2014). "Tacrolimus in pancreas transplant: a focus on toxicity, diabetogenic effect and drug-drug interactions." Expert Opin Drug Metab Toxicol **10**(11): 1585-1605.

Rank, A., R. Nieuwland, A. Crispin, S. Grutzner, M. Iberer, B. Toth and R. Pihusch (2011). "Clearance of platelet microparticles in vivo." Platelets **22**(2): 111-116.

Ratajczak, J., K. Miekus, M. Kucia, J. Zhang, R. Reca, P. Dvorak and M. Z. Ratajczak (2006). "Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery." Leukemia **20**(5): 847-856.

Rautou, P. E., J. Bresson, Y. Sainte-Marie, A. C. Vion, V. Paradis, J. M. Renard, C. Devue, C. Heymes, P. Letteron, L. Elkrief, D. Lebrec, D. Valla, A. Tedgui, R. Moreau and C. M. Boulanger (2012). "Abnormal plasma microparticles impair vasoconstrictor responses in patients with cirrhosis." Gastroenterology **143**(1): 166-176.e166.

Rautou, P. E., A. C. Vion, N. Amabile, G. Chironi, A. Simon, A. Tedgui and C. M. Boulanger (2011). "Microparticles, vascular function, and atherothrombosis." Circ Res **109**(5): 593-606.

Rautou, P. E., A. C. Vion, J. P. Luyendyk and N. Mackman (2014). "Circulating microparticle tissue factor activity is increased in patients with cirrhosis." Hepatology.

Redondo, M. J., A. K. Steck and A. Pugliese (2018). "Genetics of type 1 diabetes." Pediatr Diabetes **19**(3): 346-353.

Reich, C. F., 3rd and D. S. Pisetsky (2009). "The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis." Exp Cell Res **315**(5): 760-768.

Reynolds, J. L., A. J. Joannides, J. N. Skepper, R. McNair, L. J. Schurgers, D. Proudfoot, W. Jahnen-Dechent, P. L. Weissberg and C. M. Shanahan (2004). "Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD." J Am Soc Nephrol **15**(11): 2857-2867.

Rheinwald, J. G. and H. Green (1975). "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells." Cell **6**(3): 331-343.

Rickels, M. R., P. G. Stock, E. J. P. de Koning, L. Piemonti, J. Pratschke, R. Alejandro, M. D. Bellin, T. Berney, P. Choudhary, P. R. Johnson, R. Kandaswamy, T. W. H. Kay, B. Keymeulen, Y. C. Kudva, E. Latres, R. M. Langer, R. Lehmann, B. Ludwig, J. F. Markmann, M. Marinac, J. S. Odorico, F. Pattou, P. A. Senior, J. A. M. Shaw, M. C. Vantyghem and S. White (2018). "Defining Outcomes for beta-cell Replacement Therapy in the Treatment of Diabetes: A Consensus Report on the Igls Criteria From the IPITA/EPITA Opinion Leaders Workshop." Transplantation **102**(9): 1479-1486.

Ricordi, C., P. E. Lacy, E. H. Finke, B. J. Olack and D. W. Scharp (1988). "Automated method for isolation of human pancreatic islets." Diabetes **37**(4): 413-420.

Ridger, V. C., C. M. Boulanger, A. Angelillo-Scherrer, L. Badimon, O. Blanc-Brude, M. L. Bochaton-Piallat, E. Boilard, E. I. Buzas, A. Caporali, F. Dignat-George, P. C. Evans, R. Lacroix, E. Lutgens, D. F. J. Ketelhuth, R. Nieuwland, F. Toti, J. Tunon, C. Weber and I. E. Hoefer (2017). "Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology." Thromb Haemost **117**(7): 1296-1316.

Ritz-Laser, B., J. Oberholzer, C. Toso, M. C. Brulhart, K. Zakrzewska, F. Ris, P. Bucher, P. Morel and J. Philippe (2002). "Molecular detection of circulating beta-cells after islet transplantation." Diabetes **51**(3): 557-561.

Riveline, J. P., P. Schaepelynck, L. Chaillous, E. Renard, A. Sola-Gazagnes, A. Penfornis, N. Tubiana-Rufi, V. Sulmont, B. Catargi, C. Lukas, R. P. Radermecker, C. Thivolet, F. Moreau, P. Y. Benhamou, B. Guerci, A. M. Leguerrier, L. Millot, C. Sachon, G. Charpentier and H. Hanaire (2012). "Assessment of patient-led or physician-driven continuous glucose monitoring in patients with poorly controlled type 1 diabetes using basal-bolus insulin regimens: a 1-year multicenter study." Diabetes Care **35**(5): 965-971.

Roat, R., M. M. Hossain, J. Christopherson, C. Free, S. Jain, C. Guay, R. Regazzi and Z. Guo (2017). Identification and Characterization of microRNAs Associated With Human beta-Cell Loss in a Mouse Model. Am J Transplant. **17:** 992-1007.

Robert, S., P. Poncelet, R. Lacroix, L. Arnaud, L. Giraudo, A. Hauchard, J. Sampol and F. Dignat-George (2009). "Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies?" J Thromb Haemost **7**(1): 190-197.

Robertson, R. P., L. D. Bogachus, E. Oseid, S. Parazzoli, M. E. Patti, M. R. Rickels, C. Schuetz, T. Dunn, T. Pruett, A. N. Balamurugan, D. E. Sutherland, G. Beilman and M. D. Bellin (2015). "Assessment of beta-cell

mass and alpha- and beta-cell survival and function by arginine stimulation in human autologous islet recipients." Diabetes **64**(2): 565-572.

Rosenfeld, M. E., J. C. Khoo, E. Miller, S. Parthasarathy, W. Palinski and J. L. Witztum (1991). "Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low-density lipoproteins, and contain oxidation-specific lipid-protein adducts." J Clin Invest **87**(1): 90-99.

Ryan, E. A., B. W. Paty, P. A. Senior, J. R. Lakey, D. Bigam and A. M. Shapiro (2005). "Beta-score: an assessment of beta-cell function after islet transplantation." Diabetes Care **28**(2): 343-347.

Sabatier, F., P. Darmon, B. Hugel, V. Combes, M. Sanmarco, J. G. Velut, D. Arnoux, P. Charpiot, J. M. Freyssinet, C. Oliver, J. Sampol and F. Dignat-George (2002). "Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles." Diabetes **51**(9): 2840-2845.

Safiedeen, Z., I. Rodriguez-Gomez, L. Vergori, R. Soleti, D. Vaithilingam, I. Douma, A. Agouni, D. Leiber, S. Dubois, G. Simard, K. Zibara, R. Andriantsitohaina and M. C. Martinez (2017). "Temporal Cross Talk Between Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Regulates Oxidative Stress and Mediates Microparticle-Induced Endothelial Dysfunction." Antioxid Redox Signal **26**(1): 15-27.

Samuel, V. T. and G. I. Shulman (2012). "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links." Cell **148**(5): 852-871.

Santilli, F., M. Marchisio, P. Lanuti, A. Boccatonda, S. Miscia and G. Davi (2016). "Microparticles as new markers of cardiovascular risk in diabetes and beyond." Thromb Haemost **116**(2): 220-234.

Sapet, C., S. Simoncini, B. Loriod, D. Puthier, J. Sampol, C. Nguyen, F. Dignat-George and F. Anfosso (2006). "Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2." Blood **108**(6): 1868-1876.

Sarlon-Bartoli, G., Y. Bennis, R. Lacroix, M. D. Piercecchi-Marti, M. A. Bartoli, L. Arnaud, J. Mancini, A. Boudes, E. Sarlon, B. Thevenin, A. S. Leroyer, C. Squarcioni, P. E. Magnan, F. Dignat-George and F. Sabatier (2013). "Plasmatic level of leukocyte-derived microparticles is associated with unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis." J Am Coll Cardiol **62**(16): 1436-1441.

Satta, N., J. M. Freyssinet and F. Toti (1997). "The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide." Br J Haematol **96**(3): 534-542.

Schlegel, R. A. and P. Williamson (2001). "Phosphatidylserine, a death knell." Cell Death Differ **8**(6): 551-563.

Schmelzle, M., K. Splith, L. W. Andersen, M. Kornek, D. Schuppan, C. Jones-Bamman, M. Nowak, V. Toxavidis, S. D. Salhanick, L. Han, J. Schulte am Esch, S. Jonas, M. W. Donnino and S. C. Robson (2013). "Increased plasma levels of microparticles expressing CD39 and CD133 in acute liver injury." Transplantation **95**(1): 63-69.

Schrijvers, D. M., G. R. De Meyer, M. M. Kockx, A. G. Herman and W. Martinet (2005). "Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(6): 1256-1261.

Schulze, M. B., C. Weikert, T. Pischon, M. M. Bergmann, H. Al-Hasani, E. Schleicher, A. Fritsche, H. U. Haring, H. Boeing and H. G. Joost (2009). "Use of multiple metabolic and genetic markers to improve the prediction of type 2 diabetes: the EPIC-Potsdam Study." Diabetes Care **32**(11): 2116-2119.

Sebbagh, M., C. Renvoize, J. Hamelin, N. Riche, J. Bertoglio and J. Breard (2001). "Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing." Nat Cell Biol **3**(4): 346-352.

Sedding, D. G., E. C. Boyle, J. A. F. Demandt, J. C. Sluimer, J. Dutzmann, A. Haverich and J. Bauersachs (2018). "Vasa Vasorum Angiogenesis: Key Player in the Initiation and Progression of Atherosclerosis and Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Disease." Front Immunol **9**: 706.

Seeleang, K. (2011). "Genetic disparities in the development of type 2 diabetes among African Americans." J Am Acad Nurse Pract **23**(9): 473-478.

Segawa, K., S. Kurata, Y. Yanagihashi, T. R. Brummelkamp, F. Matsuda and S. Nagata (2014). "Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure." Science **344**(6188): 1164-1168.

Senior, P. A., T. Kin, J. Shapiro and A. Koh (2012). "Islet Transplantation at the University of Alberta: Status Update and Review of Progress over the Last Decade." Canadian Journal of Diabetes **36**(1): 32-37.

Serhan, C. N. and B. D. Levy (2018). "Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators." J Clin Invest **128**(7): 2657-2669.

Shah, M. D., A. L. Bergeron, J. F. Dong and J. A. Lopez (2008). "Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications." Platelets **19**(5): 365-372.

Shaikh, N. A., J. Yantha, S. Shaikh, W. Rowe, M. Laidlaw, C. Cockerline, A. Ali, B. Holub and G. Jackowski (2014). "Efficacy of a unique omega-3 formulation on the correction of nutritional deficiency and its effects on cardiovascular disease risk factors in a randomized controlled VASCAZEN((R)) REVEAL Trial." Mol Cell Biochem **396**(1-2): 9-22.

Shapiro, A. M., J. R. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbutt, E. Toth, G. L. Warnock, N. M. Kneteman and R. V. Rajotte (2000). "Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen." N Engl J Med **343**(4): 230-238.

Shapiro, A. M., M. Pokrywczynska and C. Ricordi (2017). "Clinical pancreatic islet transplantation." Nat Rev Endocrinol **13**(5): 268-277.

Shimokawa, H., L. L. Aarhus and P. M. Vanhoutte (1988). "Dietary omega 3 polyunsaturated fatty acids augment endothelium-dependent relaxation to bradykinin in coronary microvessels of the pig." Br J Pharmacol **95**(4): 1191-1196.

Silverstein, R. L. (2009). "Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36." Cleve Clin J Med **76 Suppl 2**: S27-30.

Simak, J. and M. P. Gelderman (2006). "Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers." Transfus Med Rev **20**(1): 1-26.

Simons, K. and R. Ehehalt (2002). "Cholesterol, lipid rafts, and disease." J Clin Invest **110**(5): 597-603.

Simpson, R. J., H. Kalra and S. Mathivanan (2012). "ExoCarta as a resource for exosomal research." J Extracell Vesicles **1**.

Singh, N., E. Van Craeyveld, M. Tjwa, A. Ciarka, J. Emmerechts, W. Droogne, S. C. Gordts, V. Carlier, F. Jacobs, S. Fieuws, J. Vanhaecke, J. Van Cleemput and B. De Geest (2012). "Circulating apoptotic endothelial cells and apoptotic endothelial microparticles independently predict the presence of cardiac allograft vasculopathy." J Am Coll Cardiol **60**(4): 324-331.

Sinning, J. M., J. Losch, K. Walenta, M. Bohm, G. Nickenig and N. Werner (2011). "Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes." Eur Heart J **32**(16): 2034-2041.

Sitia, S., L. Tomasoni, F. Atzeni, G. Ambrosio, C. Cordiano, A. Catapano, S. Tramontana, F. Perticone, P. Naccarato, P. Camici, E. Picano, L. Cortigiani, M. Bevilacqua, L. Milazzo, D. Cusi, C. Barlassina, P. Sarzi-Puttini and M. Turiel (2010). "From endothelial dysfunction to atherosclerosis." Autoimmun Rev **9**(12): 830-834.

Skrzypek, K., M. G. Nibbelink, L. P. Karbaat, M. Karperien, A. van Apeldoorn and D. Stamatialis (2018). "An important step towards a prevascularized islet macroencapsulation device-effect of micropatterned membranes on development of endothelial cell network." J Mater Sci Mater Med **29**(7): 91.

Sone, H. and Y. Kagawa (2005). "Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice." Diabetologia **48**(1): 58-67.

Sonnino, S. and A. Prinetti (2013). "Membrane domains and the "lipid raft" concept." Curr Med Chem **20**(1): 4-21.

Spite, M., L. V. Norling, L. Summers, R. Yang, D. Cooper, N. A. Petasis, R. J. Flower, M. Perretti and C. N. Serhan (2009). "Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis." Nature **461**(7268): 1287-1291.

Stapleton, P. P., H. P. Redmond and D. J. Bouchier-Hayes (1998). "Myeloperoxidase (MPO) may mediate neutrophil adherence to the endothelium through upregulation of CD11B expression--an effect downregulated by taurine." Adv Exp Med Biol **442**: 183-192.

Stefanadis, C., C. K. Antoniou, D. Tsiachris and P. Pietri (2017). "Coronary Atherosclerotic Vulnerable Plaque: Current Perspectives." J Am Heart Assoc **6**(3).

Stein, J. M. and J. P. Luzio (1991). "Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles." Biochem J **274 (Pt 2)**: 381-386.

Steppich, B., C. Mattisek, D. Sobczyk, A. Kastrati, A. Schomig and I. Ott (2005). "Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction." Thromb Haemost **93**(1): 35-39.

Suades, R., T. Padro, J. Crespo, I. Ramaiola, V. Martin-Yuste, M. Sabate, J. Sans-Rosello, A. Sionis and L. Badimon (2016). "Circulating microparticle signature in coronary and peripheral blood of ST elevation myocardial infarction patients in relation to pain-to-PCI elapsed time." Int J Cardiol **202**: 378-387.

Sukriti, S., J. S. Maras, C. Bihari, S. Das and A. K. Vyas (2018). "Microvesicles in hepatic and peripheral vein can predict nonresponse to corticosteroid therapy in severe alcoholic hepatitis." **47**(8): 1151-1161.

Suszynski, T. M. and E. S. Avgoustiniatos (2016). "Oxygenation of the Intraportally Transplanted Pancreatic Islet." **2016**: 7625947.

Suzuki, J., M. Umeda, P. J. Sims and S. Nagata (2010). "Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F." Nature **468**(7325): 834-838.

Svensson, K. J., H. C. Christianson, A. Wittrup, E. Bourseau-Guilmain, E. Lindqvist, L. M. Svensson, M. Morgelin and M. Belting (2013). "Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1." J Biol Chem **288**(24): 17713-17724.

Swirski, F. K., M. J. Pittet, M. F. Kircher, E. Aikawa, F. A. Jaffer, P. Libby and R. Weissleder (2006). "Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(27): 10340-10345.

Szatanek, R., M. Baj-Krzyworzeka, J. Zimoch, M. Lekka, M. Siedlar and J. Baran (2017). "The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization." Int J Mol Sci **18**(6).

Tabas, I. (2005). "Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(11): 2255-2264.

Tan, J. and G. Zhou (2005). "Chemokine receptors and transplantation." Cell Mol Immunol **2**(5): 343-349.

Tan, K. T., M. H. Tayebjee, H. S. Lim and G. Y. Lip (2005). "Clinically apparent atherosclerotic disease in diabetes is associated with an increase in platelet microparticle levels." Diabet Med **22**(12): 1657-1662.

Tatum, J. A., M. O. Meneveau and K. L. Brayman (2017). "Single-donor islet transplantation in type 1 diabetes: patient selection and special considerations." Diabetes Metab Syndr Obes **10**: 73-78.

Taylor, R. C., S. P. Cullen and S. J. Martin (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 231-241.

Tedgui, A. and Z. Mallat (2001). "Apoptosis as a determinant of atherothrombosis." Thromb Haemost **86**(1): 420-426.

Teoh, N. C., H. Ajamieh, H. J. Wong, K. Croft, T. Mori, A. C. Allison and G. C. Farrell (2014). "Microparticles mediate hepatic ischemia-reperfusion injury and are the targets of Diannexin (ASP8597)." PLoS One **9**(9): e104376.

Teoh, N. C. and G. C. Farrell (2003). "Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection." J Gastroenterol Hepatol **18**(8): 891-902.

Teoh, N. C., Y. Ito, J. Field, N. W. Bethea, D. Amr, M. K. McCuskey, R. S. McCuskey, G. C. Farrell and A. C. Allison (2007). "Diannexin, a novel annexin V homodimer, provides prolonged protection against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice." Gastroenterology **133**(2): 632-646.

Tesse, A., M. C. Martinez, B. Hugel, K. Chalupsky, C. D. Muller, F. Meziani, D. Mitolo-Chieppa, J. M. Freyssinet and R. Andriantsitohaina (2005). "Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(12): 2522-2527.

Thery, C., L. Zitvogel and S. Amigorena (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." Nat Rev Immunol **2**(8): 569-579.

Thompson, D. M., M. Meloche, Z. Ao, B. Paty, P. Keown, R. J. Shapiro, S. Ho, D. Worsley, M. Fung, G. Meneilly, I. Begg, M. Al Mehthel, J. Kondi, C. Harris, B. Fensom, S. E. Kozak, S. O. Tong, M. Trinh and G. L. Warnock (2011). "Reduced progression of diabetic microvascular complications with islet cell transplantation compared with intensive medical therapy." Transplantation **91**(3): 373-378.

Thornton, S. C., S. N. Mueller and E. M. Levine (1983). "Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation." Science **222**(4624): 623-625.

Torr, E. E., D. H. Gardner, L. Thomas, D. M. Goodall, A. Bielemeier, R. Willetts, H. R. Griffiths, L. J. Marshall and A. Devitt (2012). "Apoptotic cell-derived ICAM-3 promotes both macrophage chemoattraction to and tethering of apoptotic cells." Cell Death Differ **19**(4): 671-679.

Toso, C., K. Isse, A. J. Demetris, P. Dinyari, A. Koh, S. Imes, T. Kin, J. Emamaullee, P. Senior and A. M. Shapiro (2009). "Histologic graft assessment after clinical islet transplantation." Transplantation **88**(11): 1286-1293.

Toti, F., F. Bayle, T. Berney, H. Egelhofer, M. J. Richard, M. Greget, D. Masson, F. Zobairi, P. Y. Benhamou and L. Kessler (2011). "Studies of circulating microparticle release in peripheral blood after pancreatic islet transplantation." Transplant Proc **43**(9): 3241-3245.

Toti, F., N. Satta, E. Fressinaud, D. Meyer and J. M. Freyssinet (1996). "Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder." Blood **87**(4): 1409-1415.

Toti, F., N. Satta, E. Fressinaud, D. Meyer and J. M. Freyssinet (1996). "Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder." Blood **87**(4): 1409-1415.

Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger and M. Simons (2008). "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes." Science **319**(5867): 1244-1247.

Trummer, A., C. De Rop, M. Stadler, A. Ganser and S. Buchholz (2011). "P-selectin glycoprotein ligand-1 positive microparticles in allogeneic stem cell transplantation of hematologic malignancies." Exp Hematol **39**(11): 1047-1055.

Tsiantoulas, D., T. Perkmann, T. Afonyushkin, A. Mangold, T. A. Prohaska, N. Papac-Milicevic, V. Millischer, C. Bartel, S. Horkko, C. M. Boulanger, S. Tsimikas, M. B. Fischer, J. L. Witztum, I. M. Lang and C. J. Binder (2015). "Circulating microparticles carry oxidation-specific epitopes and are recognized by natural IgM antibodies." J Lipid Res **56**(2): 440-448.

Tual-Chalot, S., D. Leonetti, R. Andriantsitohaina and M. C. Martinez (2011). "Microvesicles: intercellular vectors of biological messages." Mol Interv **11**(2): 88-94.

Turner M., e. a. (2016). "EFFECT OF HIGH GLUCOSE EXPOSURE ON ENDOTHELIAL MICROPARTICLE FORMATION AND COMPOSITION." **J Hypertens, 2016. 34 Suppl 1 - ISH 2016 Abstract Book: p. e48.**

Tushuizen, M. E., M. Diamant, A. Sturk and R. Nieuwland (2011). "Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(1): 4-9.

Tushuizen, M. E., R. Nieuwland, C. Rustemeijer, B. E. Hensgens, A. Sturk, R. J. Heine and M. Diamant (2007). "Elevated endothelial microparticles following consecutive meals are associated with vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes." Diabetes Care **30**(3): 728-730.

Ulrichs, K., W. Hamelmann, C. Buhler, U. Beutner, T. Meyer, C. Otto, G. Klock and A. Thiede (1999). "[Transplantation of porcine Langerhans islets for therapy of type I diabetes. The way to clinical application]." Zentralbl Chir **124**(7): 628-635.

Unger, W. W., J. Velthuis, J. R. Abreu, S. Laban, E. Quinten, M. G. Kester, S. Reker-Hadrup, A. H. Bakker, G. Duinkerken, A. Mulder, K. L. Franken, R. Hilbrands, B. Keymeulen, M. Peakman, F. Ossendorp, J. W. Drijfhout, T. N. Schumacher and B. O. Roep (2011). "Discovery of low-affinity preproinsulin epitopes and detection of autoreactive CD8 T-cells using combinatorial MHC multimers." J Autoimmun **37**(3): 151-159.

Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee and J. O. Lotvall (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nat Cell Biol **9**(6): 654-659.

Valkonen, S., E. van der Pol, A. Boing, Y. Yuana, M. Yliperttula, R. Nieuwland, S. Laitinen and P. R. Siljander (2017). "Biological reference materials for extracellular vesicle studies." Eur J Pharm Sci **98**: 4-16.

van der Pol, E., F. A. Coumans, A. E. Grootemaat, C. Gardiner, I. L. Sargent, P. Harrison, A. Sturk, T. G. van Leeuwen and R. Nieuwland (2014). "Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing." J Thromb Haemost **12**(7): 1182-1192.

van der Pol, E., A. G. Hoekstra, A. Sturk, C. Otto, T. G. van Leeuwen and R. Nieuwland (2010). "Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes." J Thromb Haemost **8**(12): 2596-2607.

van der Zee, P. M., E. Biro, Y. Ko, R. J. de Winter, C. E. Hack, A. Sturk and R. Nieuwland (2006). "P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction." Clin Chem **52**(4): 657-664.

Van Deun, J., P. Mestdagh, R. Sormunen, V. Cocquyt, K. Vermaelen, J. Vandesompele, M. Bracke, O. De Wever and A. Hendrix (2014). "The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling." J Extracell Vesicles **3**.

Vantyghem MC, C. M., Benomar K, Le Mapihan K, Caiazzo R, Kerr-Conte J, Pattou F. (2017). "Impact of primary graft function on long-term (10 years) outcome of islet transplantation " EASD meeting oral communication Lisbon September 2017

Vantyghem, M. C., J. Kerr-Conte, L. Arnalsteen, G. Sergent, F. Defrance, V. Gmyr, N. Declerck, V. Raverdy, B. Vandewalle, P. Pigny, C. Noel and F. Pattou (2009). "Primary graft function, metabolic control, and graft survival after islet transplantation." Diabetes Care **32**(8): 1473-1478.

Vantyghem, M. C., V. Raverdy, A. S. Balavoine, F. Defrance, R. Caiazzo, L. Arnalsteen, V. Gmyr, M. Hazzan, C. Noel, J. Kerr-Conte and F. Pattou (2012). "Continuous glucose monitoring after islet transplantation in type 1 diabetes: an excellent graft function (beta-score greater than 7) Is required to abrogate hyperglycemia, whereas a minimal function is necessary to suppress severe hypoglycemia (beta-score greater than 3)." J Clin Endocrinol Metab **97**(11): E2078-2083.

Vanwijk, M. J., E. Svedas, K. Boer, R. Nieuwland, E. Vanbavel and K. R. Kublickiene (2002). "Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women." Am J Obstet Gynecol **187**(6): 1686-1693.

Varga-Szabo, D., A. Braun and B. Nieswandt (2009). "Calcium signaling in platelets." J Thromb Haemost **7**(7): 1057-1066.

Vasile, E., Y. Tomita, L. F. Brown, O. Kocher and H. F. Dvorak (2001). "Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis." Faseb j **15**(2): 458-466.

Vasir, B., P. Reitz, G. Xu, A. Sharma, S. Bonner-Weir and G. C. Weir (2000). "Effects of diabetes and hypoxia on gene markers of angiogenesis (HGF, cMET, uPA and uPAR, TGF-alpha, TGF-beta, bFGF and Vimentin) in cultured and transplanted rat islets." Diabetologia **43**(6): 763-772.

Vasquez-Vivar, J., B. Kalyanaraman, P. Martasek, N. Hogg, B. S. Masters, H. Karoui, P. Tordo and K. A. Pritchard, Jr. (1998). "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9220-9225.

Verma, S., D. L. Bhatt, S. C. Bain, J. B. Buse, J. F. E. Mann, S. P. Marso, M. A. Nauck, N. R. Poulter, R. E. Pratley, B. Zinman, M. M. Michelsen, T. Monk Fries, S. Rasmussen, L. A. Leiter and L. P. C. o. b. o. t. L. T. Investigators (2018). "Effect of Liraglutide on Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Polyvascular Disease: Results of the LEADER Trial." Circulation **137**(20): 2179-2183.

Vermeulen, I., I. Weets, M. Asanghanwa, J. Ruige, L. Van Gaal, C. Mathieu, B. Keymeulen, V. Lampasona, J. M. Wenzlau, J. C. Hutton, D. G. Pipeleers and F. K. Gorus (2011). "Contribution of antibodies against IA-2beta and zinc transporter 8 to classification of diabetes diagnosed under 40 years of age." Diabetes Care **34**(8): 1760-1765.

Viikari, J. S., O. T. Raitakari and O. Simell (2002). "Nutritional influences on lipids and future atherosclerosis beginning prenatally and during childhood." Curr Opin Lipidol **13**(1): 11-18.

Vogel, R., F. A. Coumans, R. G. Maltesen, A. N. Boing, K. E. Bonnington, M. L. Broekman, M. F. Broom, E. I. Buzas, G. Christiansen, N. Hajji, S. R. Kristensen, M. J. Kuehn, S. M. Lund, S. L. Maas, R. Nieuwland, X. Osteikoetxea, R. Schnoor, B. J. Scicluna, M. Shambrook, J. de Vrij, S. I. Mann, A. F. Hill and S. Pedersen (2016). "A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing." J Extracell Vesicles **5**: 31242.

Vyalov, S., B. L. Langille and A. I. Gotlieb (1996). "Decreased blood flow rate disrupts endothelial repair in vivo." Am J Pathol **149**(6): 2107-2118.

Walsh, K., R. C. Smith and H. S. Kim (2000). "Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture." Circ Res **87**(3): 184-188.

Walsh, K. B., B. Campos, K. Hart, C. Thakar and O. Adeoye (2017). "M2 Monocyte Microparticles Are Increased in Intracerebral Hemorrhage." J Stroke Cerebrovasc Dis **26**(10): 2369-2375.

Walters, S. N., J. Luzuriaga, J. Y. Chan, S. T. Grey and D. R. Laybutt (2013). "Influence of chronic hyperglycemia on the loss of the unfolded protein response in transplanted islets." J Mol Endocrinol **51**(2): 225-232.

Wang, J. G., J. C. Williams, B. K. Davis, K. Jacobson, C. M. Doerschuk, J. P. Ting and N. Mackman (2011). "Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1beta-dependent manner." Blood **118**(8): 2366-2374.

Wang, S., M. Zhang, B. Liang, J. Xu, Z. Xie, C. Liu, B. Viollet, D. Yan and M. H. Zou (2010). "AMPKalpha2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes." Circ Res **106**(6): 1117-1128.

Warshofsky, M. K., M. Dominguez, M. S. Eisenberg, H. S. Wasserman, R. Sciacca, W. Wang, A. D. Simon, J. H. Morse, A. Schwartz, E. Angles-Cano and L. E. Rabbani (2001). "Elevated plasma tissue plasminogen activator and anti-THP-1 antibodies are independently associated with decreased graft survival in cardiac transplant recipients." Am J Cardiol **88**(1): 30-34.

Weber, C., K. S. Weber, C. Klier, S. Gu, R. Wank, R. Horuk and P. J. Nelson (2001). "Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells." Blood **97**(4): 1144-1146.

Werner, N., S. Wassmann, P. Ahlers, S. Kosiol and G. Nickenig (2006). "Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(1): 112-116.

Wetmore, B. A., D. J. Brees, R. Singh, P. B. Watkins, M. E. Andersen, J. Loy and R. S. Thomas (2010). "Quantitative analyses and transcriptomic profiling of circulating messenger RNAs as biomarkers of rat liver injury." Hepatology **51**(6): 2127-2139.

Whitlock, J. M. and H. C. Hartzell (2017). "Anoctamins/TMEM16 Proteins: Chloride Channels Flirting with Lipids and Extracellular Vesicles." Annu Rev Physiol **79**: 119-143.

Widlansky, M. E., N. Gokce, J. F. Keaney, Jr. and J. A. Vita (2003). "The clinical implications of endothelial dysfunction." J Am Coll Cardiol **42**(7): 1149-1160.

Willekens, F. L., J. M. Werre, J. K. Kruijt, B. Roerdinkholder-Stoelwinder, Y. A. Groenen-Dopp, A. G. van den Bos, G. J. Bosman and T. J. van Berkel (2005). "Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors." Blood **105**(5): 2141-2145.

Williamson, P., M. S. Halleck, J. Malowitz, S. Ng, X. Fan, S. Krahling, A. T. Remaley and R. A. Schlegel (2007). "Transbilayer phospholipid movements in ABCA1-deficient cells." PLoS One **2**(8): e729.

Wilson, P. W., R. B. D'Agostino, H. Parise, L. Sullivan and J. B. Meigs (2005). "Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus." Circulation **112**(20): 3066-3072.

Witek, R. P., L. Yang, R. Liu, Y. Jung, A. Omenetti, W. K. Syn, S. S. Choi, Y. Cheong, C. M. Fearing, K. M. Agboola, W. Chen and A. M. Diehl (2009). "Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells." Gastroenterology **136**(1): 320-330.e322.

Witek, R. P., L. Yang, R. Liu, Y. Jung, A. Omenetti, W. K. Syn, S. S. Choi, Y. Cheong, C. M. Fearing, K. M. Agboola, W. Chen and A. M. Diehl (2009). "Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells." Gastroenterology **136**(1): 320-330 e322.

Wolf, P. (1967). "The nature and significance of platelet products in human plasma." Br J Haematol **13**(3): 269-288.

Wolfs, J. L., P. Comfurius, J. T. Rasmussen, J. F. Keuren, T. Lindhout, R. F. Zwaal and E. M. Bevers (2005). "Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction." Cell Mol Life Sci **62**(13): 1514-1525.

Xing, R., A. M. Moerman, Y. Ridwan, M. J. Daemen, A. F. W. van der Steen, F. J. H. Gijsen and K. van der Heiden (2018). "Temporal and spatial changes in wall shear stress during atherosclerotic plaque progression in mice." R Soc Open Sci **5**(3): 171447.

Xu, Y., F. Toure, W. Qu, L. Lin, F. Song, X. Shen, R. Rosario, J. Garcia, A. M. Schmidt and S. F. Yan (2010). "Advanced glycation end product (AGE)-receptor for AGE (RAGE) signaling and up-regulation of Egr-1 in hypoxic macrophages." J Biol Chem **285**(30): 23233-23240.

Yang, G., R. Lucas, R. Caldwell, L. Yao, M. J. Romero and R. W. Caldwell (2010). "Novel mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes." J Cardiovasc Dis Res **1**(2): 59-63.

Yang, H., A. Kim, T. David, D. Palmer, T. Jin, J. Tien, F. Huang, T. Cheng, S. R. Coughlin, Y. N. Jan and L. Y. Jan (2012). "TMEM16F forms a Ca2+-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation." Cell **151**(1): 111-122.

Yang, Y. and L. Chan (2016). "Monogenic Diabetes: What It Teaches Us on the Common Forms of Type 1 and Type 2 Diabetes." Endocr Rev **37**(3): 190-222.

Yano, Y., E. Shiba, J. Kambayashi, M. Sakon, T. Kawasaki, K. Fujitani, J. Kang and T. Mori (1993). "The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist induced microparticle formation from the platelet plasma membrane." Thromb Res **71**(5): 385-396.

Ye, S., X. F. Shan, W. Q. Han, Q. R. Zhang, J. Gao, A. P. Jin, Y. Wang, C. F. Sun and S. L. Zhang (2017). "Microparticles from Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention Impair Vasodilatation by Uncoupling Endothelial Nitric Oxide Synthase." Shock **48**(2): 201-208.

Yin, M., X. Loyer and C. M. Boulanger (2015). "Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis." Eur J Pharmacol **763**(Pt A): 90-103.

Yoshimatsu, G., M. Takita, M. A. Kanak, W. Z. Haque, C. Chang, P. B. Saravanan, M. C. Lawrence, M. F. Levy and B. Naziruddin (2016). "MiR-375 and miR-200c as predictive biomarkers of islet isolation and transplantation in total pancreatectomy with islet autotransplantation." J Hepatobiliary Pancreat Sci **23**(9): 585-594.

Yusen, R. D., L. B. Edwards, A. Y. Kucheryavaya, C. Benden, A. I. Dipchand, F. Dobbels, S. B. Goldfarb, B. J. Levvey, L. H. Lund, B. Meiser and J. Stehlik (2014). "The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation." J Heart Lung Transplant **33**(10): 1009-1024.

Zecher, D., A. Cumpelik and J. A. Schifferli (2014). "Erythrocyte-derived microvesicles amplify systemic inflammation by thrombin-dependent activation of complement." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(2): 313-320.

Zeng, L., A. Zampetaki, A. Margariti, A. E. Pepe, S. Alam, D. Martin, Q. Xiao, W. Wang, Z. G. Jin, G. Cockerill, K. Mori, Y. S. Li, Y. Hu, S. Chien and Q. Xu (2009). "Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(20): 8326-8331.

Zgheel, F., M. Alhosin, S. Rashid, M. Burban, C. Auger and V. B. Schini-Kerth (2014). "Redox-sensitive induction of Src/PI3-kinase/Akt and MAPKs pathways activate eNOS in response to EPA:DHA 6:1." PLoS One **9**(8): e105102.

Zhang, Q. J., M. Goddard, C. Shanahan, L. Shapiro and M. Bennett (2002). "Differential gene expression in vascular smooth muscle cells in primary atherosclerosis and in stent stenosis in humans." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(12): 2030-2036.

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

Zhao, L., X. Wu, Y. Si, Z. Yao, Z. Dong, V. A. Novakovic, L. Guo, D. Tong, H. Chen, Y. Bi, J. Kou, H. Shi, Y. Tian, S. Hu, J. Zhou and J. Shi (2017). "Increased blood cell phosphatidylserine exposure and circulating microparticles contribute to procoagulant activity after carotid artery stenting." J Neurosurg **127**(5): 1041-1054.

Zhou, Q., P. J. Sims and T. Wiedmer (1998). "Expression of proteins controlling transbilayer movement of plasma membrane phospholipids in the B lymphocytes from a patient with Scott syndrome." Blood **92**(5): 1707-1712.

Zhou, Q., J. Zhao, T. Wiedmer and P. J. Sims (2002). "Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1." Blood **99**(11): 4030-4038.

Zhu, M., M. Wen, X. Sun, W. Chen, J. Chen and C. Miao (2015). "Propofol protects against high glucose-induced endothelial apoptosis and dysfunction in human umbilical vein endothelial cells." Anesth Analg **120**(4): 781-789.

Production scientifique

Lamia Amoura, Fatiha Zobairi El-Ghazouani, Mohamad Kassem, Ali El Habhab, Guillaume Kreutter, Salah Sahraoui, Domenico Bosco, Nadia Jessel, Thierry Berney, Pierre-Yves Benhamou, Florence Toti[1*], Laurence Kessler [*], on behalf of the GRAGIL/ TREPID Network. *Interest of plasma microvesicles to monitor pancreatic islets graft dysfunction: beta cell- and leukocyte-derived microvesicles as specific features in a pilot longitudinal study.* Submitted, American Journal of Transplantation (2018).

Lamia Amoura, Muhammad A. Farooq, Raed Altamimy, Sonia Khemais-Benkhiat, Abdul W. Qureshi, Shinhee Park, Zahid R. Niazi, Fatiha Zobairi, Cyril Auger, Valérie B. Schini-Kerth, Florence Toti. *Microvesicles of the aortic wall sense vasoprotection by VascazenTM in aged rats.* Paper in preparation (2018)

Abbas M, Jesel L, Auger C, **Amoura L**, Messas N, Ribeiro T, Silva G, Abou-merhi R, Hamade E, Georg Y, Chakfe N, Ohlmann P, Schini-Kerth VB, Toti F, Morel O. *Endothelial microparticles from acute coronary syndrome patients induce premature coronary artery endothelial cells ageing and thrombogenicity: Role of the Ang II/ATI receptor/NADPH oxidase-mediated activation of MAPKs and PI3-kinase pathways.* Circulation 116.017513, 2016.

Kreutter G, Kassem M, El Habhab A, Baltzinger P, Abbas M, Boirame-Helms J, **Amoura L**, Peluso J, Zobairi F, Ubeauud-Sequier G, Kessler L, Toti F. *Endothelial Microparticles release after activated Protein C protect Beta cells through EPCR/PAR1 and Annexin A1/FPR2 pathways.* Cel Mol Med 10.1111, 2017.

S. Khemais-Benkhiat, N. Idris-Khodja, S. Park, **L. Amoura**, M. Abbas, C Auger, L. Kessler, E. Mayoux, F. Toti, VB. Schini-Kerth. *Redox-sensitive upregulation of SGLT2 expression mediates the high glucose-induced premature endothelial cell senescence and acquisition of pro-atherothrombotic markers via the activation of the local angiotensin system.* Under review, Molecular and Cellular Cardiology.

Ali El Habhab, Raed Altamimy, Malak Abbas, Mohamad Kassem, Guillaume Kreutter, **Lamia Amoura**, Sonia Khemais-Benkhiat, Fatiha Zobairi, Valérie B. Schini-Kerth, Laurence Kessler, Florence Toti. *Significance of immune cell-derived microparticles in ischemia reperfusion: Induction of endothelial senescence and vascular dysfunction.* Under review, American Journal of Transplantation.

Mohamad Kassem, Ali El Habhab, Guillaume Kreutter, **Lamia Amoura**, Philippe Blatzinger, Malak Abbas, Fatiha Zobairi, Valérie Schini-Kerth, Laurence Kessler, Florence Toti. *Impact of Pro-Senescent Endothelial Microparticles on Rat Pancreatic Islet.* Under review, Cell Transplantation.

MA. Farooq, **L Amoura** , S. Gaertner , Z. Niazi, S. Park, AW. Qureshi, MH. Oak, F. Toti, VB. Schini-Kerth, C. Auger. *Oral intake of EPA: DHA 6:1 improves ageing-related blunted endothelium-dependent relaxations and increased contractile responses in the mesenteric artery: role of oxidative stress and cyclooxygenases*. Paper in preparation (2018).

Communications orales internationales

Amoura L., Zobairi F., Blandine Y., Meyer N., Kreutter G., Sahraoui S., Toti F., Kessler L.

Microparticules circulantes de la cellule à insuline comme biomarqueurs précoces de rejet de greffe d'îlots pancréatiques : Intérêt du dosage ultra sensible pour l'identification de la cause de la perte du greffon : Congrès de la Société Francophone de Diabétologie Mars 2017 à LILLE, France

Amoura L., Zobairi F., Blandine Y., Meyer N., Kreutter G., El Habhab A, Sahraoui S., Toti F., Kessler L.

Insulin Secreting Cell–Derived Microparticles as Biomarkers of Early Pancreatic Islet Graft Dysfunction. 77th Scientific Sessions the American Diabetes Association's, 2017, June 9-13 San Diego, California, USA.

Amoura L., Zobairi F., Blandine Y., Meyer N., Kreutter G., El Habhab A, Sahraoui S., Toti F., Kessler L.

Beta cell-derived microparticles as early biomarkers of rejection in islets transplanted patients: toward the identification of the cause of the graft loss? 53rd Annual Meeting of the EASD, European Association For The Study Of Diabetes: 2017 11-15 September, Lisbon, Portugal.

Attribution de bourse de recherche clinique

Une bourse d'un montant de 20.000 euros remise par la Société Francophone de Transplantation pour mon projet de recherche clinique intitulé **« Etude des microparticules circulantes comme biomarqueurs de suivi de la greffe d'îlots pancréatiques : Intérêt du dosage ultrasensible pour l'identification de la perte précoce du greffon ».**

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

Lamia AMOURA

Caractérisation des microvésicules comme biomarqueurs de suivi de la greffe d'îlots pancréatiques et de l'efficacité thérapeutique dans l'athérosclérose en pathologies humaines

Les Microvésicules (MVs) sont des marqueurs circulants de l'activation cellulaire au cours de la dysfonction du greffon et l'athérothrombose. Les MVs de la cellule bêta ou intratissulaires vasculaires, sont peu connues. Le suivi longitudinal de 19 patients transplantés d'îlots pancréatiques par les MV- PSA-NCAM^{+} sanguines témoigne d'une altération précoce du greffon avant l'identification des marqueurs clinique et biologique de la perte du greffon. La cinétique de libération des MVs leucocytaires, endothéliales et hépatiques suggère leur intérêt pour l'identification de la cause de la perte du greffon et pour la surveillance de l'immunosuppression. Après validation d'une méthode d'extraction douce des MVs tissulaires sur des plaques d'athérome, nous avons mesuré l'accumulation de MVs pro-sénescentes dans l'aorte de rats âgés, qui étaient réduite par l'ingestion d'EPA : DHA (6 :1), avec une baisse des propriétés pro-sénescentes identifiée sur les cellules endothéliales d'artères coronaires en culture. Le contrôle des MV nocives par cytoprotecteur du vaisseau réduirait la sénescence endothéliale.

Mots clés : dysfonction vasculaire, sénescence.

Microvesicles (MVs) are circulating markers that reflect cellular activation during graft dysfunction and atherothrombosis. Data on graft tissue MVs or vessel are scarce. The longitudinal follow-up of 19 patients with pancreatic islets transplants showed that circulating MV-PSA-NCAM^{+} typifying the early graft loss of islet graft prior its detection using the clinical and biological markers of graft loss. In addition, the kinetics release of leukocyte, endothelial and hepatic MV suggest their interest in identifying the cause of graft loss and in monitoring of immunosuppression. Using a new tissular MV mild extraction process validated with arteriosclerotic plaques, we evidenced an accumulation of pro-senescent MVs in the aorta of old rats that was significantly reduced by EPA: DHA (6 :1) intake as well as their pro-senescent properties on coronary artery endothelial cell cultures. Altogether, the pharmacological control of the release of noxious MVs using vessel cytoprotectors would limit the consequences of endothelial senescence.

Key words: transplantation, vascular and graft dysfunction, endothelial senescence.