

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

*ÉCOLE DOCTORALE 414-Sciences de la vie et de la santé*  
*INSERM UMR 1260 : Nanomédecine Régénérative*

## THÈSE

Présentée par :

**Ali El HABHAB**

Soutenue le : *08 février 2018*

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

Discipline/ Spécialité : **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

<p><b>Rôle des microparticules leucocytaires dans l'induction d'une sénescence endothéliale accélérée : Implication pour la greffe d'îlots pancréatiques</b></p>
--

**THÈSE dirigées par :**

**Mme Laurence KESSLER**  
**Mme Florence TOTI**

Professeur, Université de Strasbourg  
Professeur, Université de Strasbourg

**Rapporteurs externes :**

**M. Pierre-Yves BENHAMOU**  
**M. Eduardo ANGLES-CANO**

Professeur, Université de Grenoble  
Professeur, Université de Paris

---

**Examinateur interne :**

**Mme. Fanny MONNEAUX**

Docteur, Chargé de recherches, Université de Strasbourg

**Examinateur externe :**

**M. François Dupuis**

Docteur, Maître de conférences, Université de Lorraine

« Success is no accident. It is hard work, perseverance, learning, studying, sacrifice and most of all, love of what you are doing or learning to do »

Pele.

## Remerciements

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

*Je remercie également ma directrice de thèse Professeur Laurence 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 trois années.*

*Je tiens tout particulièrement à exprimer mon immense gratitude à ma co-directrice de thèse Professeur Florence TOTI pour son encadrement, 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 par 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 toi cette thèse n'aurait jamais pu être menée à bien. MERCI CHEF !!!*

*Je suis également très reconnaissant au 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 travailler avec vous et de vous avoir comme collaborateurs. Un grand merci à Cyril et Brigitte pour le partage scientifique. Merci également à ceux et celles que j'ai croisé(e)s sur ma route au cours de ces trois années. Vous m'as donné des conseils qui m'ont été très utiles tout au long de ma thèse. Ce travail a été réalisé de manière à ce que les personnes soient entourées durant ces trois années. Je voudrais particulièrement remercier mes collègues, Mohamad, Malak, Guillaume, Lamia, Hassan, Fatiha, Eugénia et tous les autres collègues scientifiques qui m'ont encouragé. Merci de me garder motivé tout au long des difficultés de ma thèse. C'est un réel privilège d'avoir une famille aussi grande et aimante. Une pensée pour Guillaume également, avec tes éternelles blagues et ton sens de l'humour!*

*Un grand MERCI à mes amis, particulièrement à Mohamad KASSEM, Malak ABBAS et Lamia AMOURA pour le soutien, l'amour et le plaisir. Mes amis fidèles, Hassan, Hadi, Hussein et Rida merci pour votre présence et votre amitié revigorante !*

*Enfin, je ne serai pas là sans mes parents qui m'ont toujours aidé et m'ont permis de pouvoir arriver aussi loin. Alors merci beaucoup Papa, Maman, de m'avoir permis de suivre ma voie, de m'avoir encouragé et d'avoir cru en moi. Merci Merci Merci à mes soeurs.... Je vous aime!!!*

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

Merci

Ali El HABHAB

# Table des matières

Remerciements .....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations .....	xi
<b>I La greffe d'îlots pancréatiques : une thérapie cellulaire pour le traitement du diabète de type 1 .....</b>	<b>2</b>
I.1 Le diabète de type 1 : une maladie auto-immune .....	2
I.1.a Epidémiologie du diabète de type 1 .....	2
I.1.b Les causes moléculaires et cellulaires du DT1 .....	2
I.1.c L'îlot pancréatique : unité fonctionnelle pour la sécrétion d'insuline .....	4
I.2 Traitements du DT1 .....	7
I.3 La transplantation d'îlots pancréatiques .....	8
I.3.a L'état de la transplantation d'îlots pancréatiques aujourd'hui.....	8
I.3.b Procédure de la transplantation d'îlots pancréatiques à visée thérapeutique.....	9
I.3.c Contraintes et limites de la transplantation d'îlots pancréatiques.....	11
<b>II Impact de l'ischémie-reperfusion en transplantation.....</b>	<b>17</b>
II.1 Concept de l'inflammation stérile et immunité innée.....	17
II.1.a Libération et reconnaissance des DAMPs après transplantation .....	17
II.1.b IR et implication des cellules immunitaires innées.....	18
II.2 La réaction IBMIR: une forme particulière d'IR dans la greffe d'îlots .....	22
II.2.a Description macroscopique.....	22
II.2.b Acteurs de l'IBMIR .....	24
II.2.c Conditions favorisant l'IBMIR .....	29
II.2.d Stratégies de contrôle de l'IBMIR .....	30
II.3 Impact de l'IR sur la fonction du greffon à long terme .....	32
II.3.a IR et dysfonction du greffon.....	32
II.3.b Les nouvelles stratégies immunologiques du contrôle du rejet .....	33
<b>III L'endothélium : structure importante pour la survie et la fonction des îlots .....</b>	<b>38</b>
III.1 Définition et structure générale de l'endothélium .....	38
III.2 La structure et la fonction de l'endothélium des îlots.....	38
III.2.a Morphologie et vascularisation des îlots.....	41
III.2.b La structure des micro-vaisseaux de l'îlot .....	41



III.2.c	Impact des cellules endothéliales sur la survie et la fonction des îlots .....	42
III.3	Les fonctions de l'endothélium.....	42
III.3.a	Le monoxyde d'azote.....	44
III.3.b	L'Angiotensine II : un élément clé de la fonction et de la survie des ECs .....	44
III.3.c	Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	47
III.3.d	L'endothélium : le site de la coagulation.....	47
III.4	La dysfonction endothéliale.....	48
III.4.a	Ischémie-reperfusion et dysfonction endothéliale .....	48
III.4.b	Stress oxydant et dysfonction endothéliale.....	49
III.4.c	Inflammation et dysfonction endothéliale .....	50
III.4.d	Diabète, stress oxydant et dysfonction endothéliale .....	51
III.4.e	Vieillessement et dysfonction endothéliale .....	53
<b>IV</b>	<b>La sénescence cellulaire.....</b>	<b>56</b>
IV.1	Définition de la sénescence cellulaire.....	56
IV.2	Les caractéristiques de la sénescence .....	58
IV.2.a	Arrêt du cycle cellulaire.....	58
IV.2.b	Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ -gal).....	58
IV.2.c	Foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF).....	58
IV.2.d	Le stress oxydant.....	58
IV.2.e	Résistance à l'apoptose.....	60
IV.2.f	Autophagie.....	60
IV.2.g	Machinerie moléculaire de la sénescence cellulaire .....	60
IV.2.h	Médiateurs solubles de la sénescence .....	63
IV.3	Sénescence endothéliale et dysfonction de l'endothélium.....	63
IV.4	Sénescence et diabète.....	64
IV.5	Surveillance de sénescence au cours de vieillissement .....	66
IV.6	Immunosénescence en transplantation: impact de l'âge du receveur et du donneur	67
<b>V</b>	<b>Les microparticules : effecteurs cellulaires du dommage vasculaire et tissulaire ....</b>	<b>70</b>
V.1	Pertinence physiopathologique des microparticules.....	70
V.2	Caractéristiques des MPs .....	70
V.3	Mécanismes de formation des microparticules.....	71
V.3.a	La membrane plasmique.....	71
V.3.b	Les transporteurs de phospholipides et la rupture d'asymétrie membranaire...	73
V.3.c	Inducteurs de la rupture de l'asymétrie membranaire.....	75

V.4	Remodelage membranaire et vésiculation .....	75
V.4.a	Dégradation du cytosquelette.....	75
V.4.b	Les rafts.....	77
V.5	Clairance des microparticules .....	77
V.6	Isolement et dosage des microparticules.....	79
V.7	Les microparticules : Marqueurs pathogènes dans les désordres cardio-vasculaires.....	81
V.7.a	Microparticules, coagulation et thrombose.....	81
V.7.b	Microparticules, inflammation et dysfonction endothéliale .....	84
V.7.c	Microparticules et stress oxydant.....	85
V.7.d	Microparticules et diabète.....	86
V.7.e	Microparticules et sénescence.....	86
V.8	Les microparticules : biomarqueurs en transplantation .....	87
V.8.a	La transplantation d'îlots pancréatiques .....	88
V.8.b	La transplantation cardiaque.....	90
V.8.c	La transplantation pulmonaire .....	90
V.8.d	La transplantation rénale.....	90
V.8.e	La transplantation de cellules souches mésenchymateuses .....	91
<b>V</b>	<b>Hypothèse et objectifs.....</b>	<b>93</b>
Article 1 .....		100
Article 2.....		145
<b>VI</b>	<b>Discussion générale .....</b>	<b>163</b>
<b>VII</b>	<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>171</b>
<b>VIII</b>	<b>Bibliographie .....</b>	<b>173</b>
<b>IX</b>	<b>Production scientifique et communication orales .....</b>	<b>192</b>
<b>X</b>	<b>Annexe.....</b>	<b>194</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. Les différentes méthodes de mesure de MPs.....	96
---	----

## Liste des figures

Figure 1. L'incidence et la prévalence de DT1 chez les enfants dans le monde. ....	3
Figure 2. La pathogenèse de DT1 [14]. ....	5
Figure 3. L'organisation des îlots humaines [13]. ....	6
Figure 4. Illustration schématique de l'ensemble depuis l'isolement des îlots jusqu'à la transplantation intra-portale [27]. ....	10
Figure 5. Les facteurs affectant les résultats de la transplantation d'îlots pancréatiques. ....	12
Figure 6. Initiation et maintien de l'inflammation stérile après la transplantation [41]. ....	19
Figure 7. Les différentes étapes de l'IBMIR [56]. ....	23
Figure 8. Les différentes voies d'activation de la cascade du complément. ....	27
Figure 9. Différentes approches immunologiques tentées pour améliorer la fonction des îlots [121]. ....	34
Figure 10. Représentation schématique de la structure des vaisseaux sanguins et ses composants. ....	39
Figure 11. Les différentes fonctions métaboliques et de synthèse des cellules endothéliales. ....	40
Figure 12. Schéma des voies possibles de communication cellulaire entre les ECs intra-insulaires et les cellules $\beta$ . ....	43
Figure 13. Les médiateurs biochimiques de la vasoconstriction et de la dilatation libérés par l'endothélium (Adapté d'après [159]) ....	45
Figure 14. Schéma des différentes voies et fonctions cibles du système rénine angiotensine local (RAS) ....	46
Figure 15. Cibles vasculaires de TNF- $\alpha$ dans la dysfonction endothéliale en physiopathologie [205]. ....	52
Figure 16. Recrutement des leucocytes vers le site d'inflammation [206]. ....	52
Figure 17. Les causes et les conséquences biologiques de la sénescence cellulaire [218]. ....	57
Figure 18. Caractéristiques des cellules sénescents [218]. ....	59
Figure 19. Le rôle de pRB dans la régulation du cycle cellulaire [243]. ....	62
Figure 20. Cellules sénescents et complications de diabète [252]. ....	65
Figure 21. Immunosénescence et les changements associés aux cellules du système immunitaire [265]. ....	68
Figure 22. Représentation schématique de molécules bioactives véhiculées par les MPs et les effets biologiques associés [290]. ....	72
Figure 23. La fonction des transporteurs de phospholipides [292]. ....	74

Figure 24. Les mécanismes membranaires responsables de la libération des MPs [289].	76
Figure 25. Remaniement du cytosquelette et formation des MPs lors du stress [316].	78
Figure 26. Les mécanismes impliqués dans la clairance des MPs circulantes [321].	80
Figure 27. Isolement des exosomes et des MPs.	82
Figure 28. Variations du C-peptide, du besoin d'insuline et de taux de microparticules circulantes lors de la transplantation d'îlots [360, 361].	89

## **Liste des articles en annexes**

**Annexe 1** : Senescence of Pancreas in Middle-Aged Rats with Normal Vascular Function

**Annexe 2** : Endothelial Microparticles release after activated Protein C protect Beta cells through EPCR/PAR1 and Annexin A1/FPR2 pathways

## Liste des abréviations

ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
Ach	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	<i>Protein kinase B</i>
ALT	Alanine Aminotransférase
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	<i>AMP Activated Protein Kinase</i>
Ang	<i>Angiotensin</i>
APC	Cellule présentatrice d'antigènes
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASAT	Aminotransférase
AT- 2R	Récepteur 2 de l'angiotensine
AT-1R	Récepteur 1 de l'angiotensine
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BM-MSCs	<i>Bone Marrow – Mesenchymal Stem Cells</i>
C5aIP	<i>C5a inhibitory peptide</i>
CCR5	<i>C-C chemokine receptor type 5</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinases</i>
cGMP	Guanosine monophosphate 3', 5' cyclique
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COX	Cyclooxygénase
CPIN	Cellules porcines d'îlots néonataux
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
CXCL1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAMPS	<i>Damage associated molecular patterns</i>
DCs	Cellules dendritiques
DDR	<i>DNA Damage Response</i>
Del-1	<i>Developmental Endothelial Locus -1</i>
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
ECs	Cellule Endothéliale
EDCF	<i>Endothelium derived vasocontracting factors</i>
EDHF	<i>Endothelium derived hyperpolarizing factor</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric oxide synthase</i>
EPCR	<i>Endothelial protein C receptor</i>
ET	<i>Endothelin</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
GCs	Guanylyl Cyclase soluble
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>Hydrogen Peroxide</i>
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>

HIRA	<i>Histone cell cycle regulation defective</i>
HLA-DQ2	<i>Human Leukocyte Antigens DQ class II</i>
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigens DR</i>
HMGB1	<i>High-mobility group box-1</i>
HP1	<i>Heterochromatin Protein 1</i>
HUVEC	<i>Human umbilical veins endothelial cells</i>
IBMIR	<i>Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction</i>
ICAM-1	<i>InterCellular Adhesion Molecule-1</i>
IG	<i>Immunoglobulin</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IL-1	<i>Interleukin 1</i>
IL-2	<i>Interleukin 2</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-8	<i>Interleukin 8</i>
INF $\gamma$	<i>Interféron <math>\gamma</math></i>
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IR	<i>Ischémie reperfusion</i>
KO	<i>Knock out</i>
LB	<i>Lymphocytes B</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function associated antigen 1</i>
LMV	<i>Leukocyte Microvesicle</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LT	<i>Lymphocytes T</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MiRNA	<i>Micro-RNA</i>
Mmp	<i>Matrix Metalloproteases</i>
MPs	<i>Microparticles</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NAC	<i>N-acetyl-L-cystéine</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NET	<i>Neutrophil Extracellular traps</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	<i>Monoxyde d'azote</i>
NOD	<i>Non-Obese Diabetic</i>
NOS	<i>NO synthase</i>
NOX-4	<i>NADPH oxidase 4</i>
O <sub>2</sub> $\bullet^-$	<i>Superoxyde</i>
OH $\bullet^-$	<i>Ion hydroxyle</i>
OIS	<i>Oncogene-induced senescence</i>
ONOO $\cdot^-$	<i>Peroxydinitrite</i>
PAF	<i>Facteur d'activation plaquettaire</i>
PAI-1	<i>Plasmingon Activor Inhibitor 1</i>
PAR	<i>Protease activated receptor</i>
PECAM	<i>Platelets Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PGI	<i>Prostacyclin</i>
PGIS	<i>Prostacyclin synthase</i>
PhChol	<i>Phosphatidycholine</i>
PhEth	<i>Phosphotidylethanolamine</i>



PhSer	Phosphatidylserine
PI	Propidium Iodide
PI3	<i>Kinase phosphoinositide 3-kinase</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PKG	<i>Protein kinase G</i>
PLA <sub>2</sub>	<i>Phospholipase A<sub>2</sub></i>
PMV	<i>Platelet Microvesicle</i>
PPR	<i>Pattern recognition receptors</i>
pRb	<i>Retinoblastoma Protein</i>
PSGL-1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>
RAS	Système rénine-angiotensine
Rb	Rétinoblastome
RGD	Arg-Gly-Asp
RLRs	Retinoic acid inducible gene I-like receptors
ROCK-1	<i>Rho-Kinase-1</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
S <sup>1177</sup>	serine 1177
SAHF	<i>Senescence-Associated Heterochromatic Foci</i>
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
SA-β-Gal	<i>Senescence Associated β-galactosidase</i>
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
S-endo	<i>Endothelial Selectin</i>
SKCa	<i>Small conductance Calcium – dependent potassium Channels</i>
SOD	<i>Superoxyde dismutase</i>
T regs	<i>Regulatory T cells</i>
TF	<i>Tissue Factor</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
Th	<i>T helper</i>
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
TNF-α	facteur tumoral de nécrose-α
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEC	<i>Vascular Endothelial Cells</i>
VEGF R2	<i>Vascular Endothelial Growth Factors Receptor 2</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-A	<i>Vascular endothelial Growth Factor-A</i>
VSMCs	<i>Vascular Smooth Muscle cells</i>
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>

# *Chapitre I*

---

# I La greffe d'îlots pancréatiques : une thérapie cellulaire pour le traitement du diabète de type 1

## I.1 Le diabète de type 1 : une maladie auto-immune

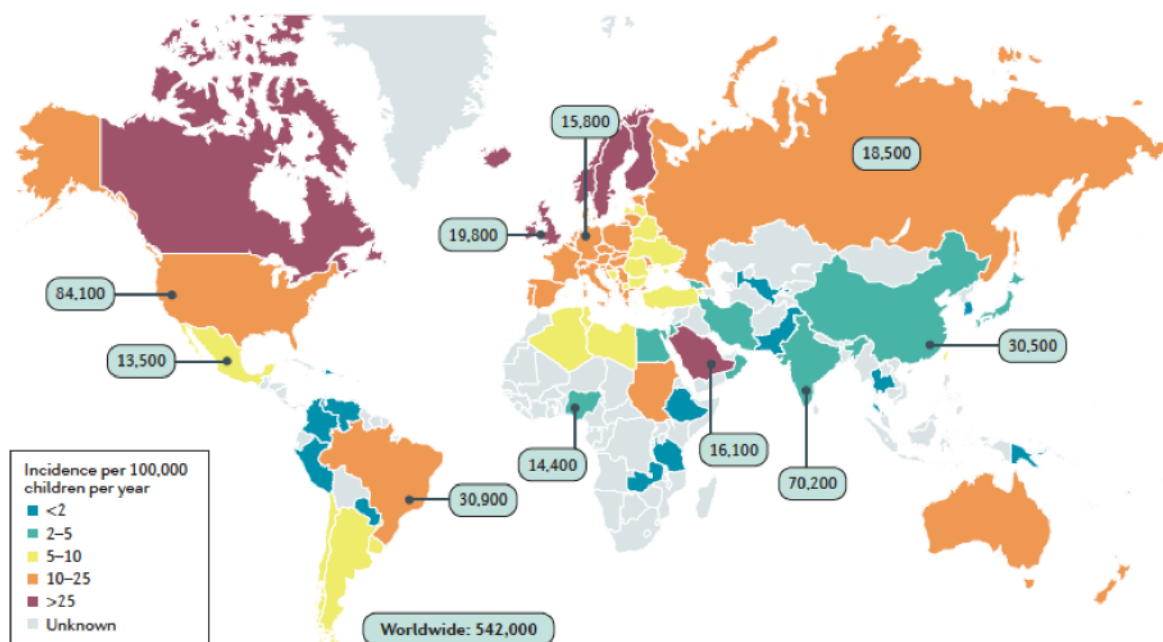
### I.1.a Epidémiologie du diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) représente 10 à 15 % de tous les cas de diabète et son incidence augmente dans le monde entier (International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas, 2015). En effet, il touche principalement les enfants de moins de 15 ans et plus de 500 000 enfants vivent avec cette maladie à l'échelle mondiale (**Figure 1**). Près de 90 000 enfants sont diagnostiqués chaque année [1]. Le taux d'incidence varie considérablement entre les pays. 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 [2]. 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.

### I.1.b Les causes moléculaires et cellulaires du DT1

Le DT1 est une maladie auto-immune déclenchée par des facteurs environnementaux (infections virales, toxines, nutriments alimentaires ou allergies) chez des individus génétiquement prédisposés. Ce processus chronique conduit à la destruction sélective des cellules bêta ( $\beta$ ) sécrétrices d'insuline dans les îlots pancréatiques. Plusieurs gènes responsables ont été identifiés avec des loci dispersés situés sur 40 sites distincts. Le premier ensemble de gènes associés au DT1 a été identifié sur le chromosome 6. Il s'agit du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 2 (HLA-DQ2), qui est impliqué dans la tolérance immunitaire [3]. En plus de la prédisposition génétique, le DT1 peut également être déclenché par des conditions environnementales prédisposant l'attaque auto-immune médiée par les lymphocytes T contre les cellules  $\beta$  [4].

Les lymphocytes T (LT), acteurs clés de l'immunité cellulaire, jouent également un rôle central dans la destruction auto-immune des cellules  $\beta$  [5]. L'apparition de DT1 nécessite deux types de lymphocytes T : les LT CD4+ et les LT CD8+. L'activation des LT est déclenchée par le recrutement des cellules dendritiques par les antigènes de cellules  $\beta$ .



**Figure 1. L'incidence et la prévalence de DT1 chez les enfants dans le monde.**

**(IDF diabetes atlas, 2015)**

(International Diabetes Federation (<http://www.diabetesatlas.org/across-the-globe.html>))

Deux voies de destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques médiées par ces cellules présentatrices d'antigènes (APC) sont possibles : i) par contact direct via un processus cytotoxique, ou ii) indirectement par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de perforine ou de granzyme B [6]. Parmi les antigènes exprimés par la cellule  $\beta$ , l'insuline est reconnue par les LT auto-immuns [7]. Les LT CD4+ de type T helper (Th1, Th2 et Th17) et les cellules T régulatrices (Tregs) sont impliqués différemment dans la pathogenèse de DT1 et répondent à des interleukines différentes afin d'assurer le maintien de la tolérance immunitaire et de limiter la réponse excessive du système immunitaire.

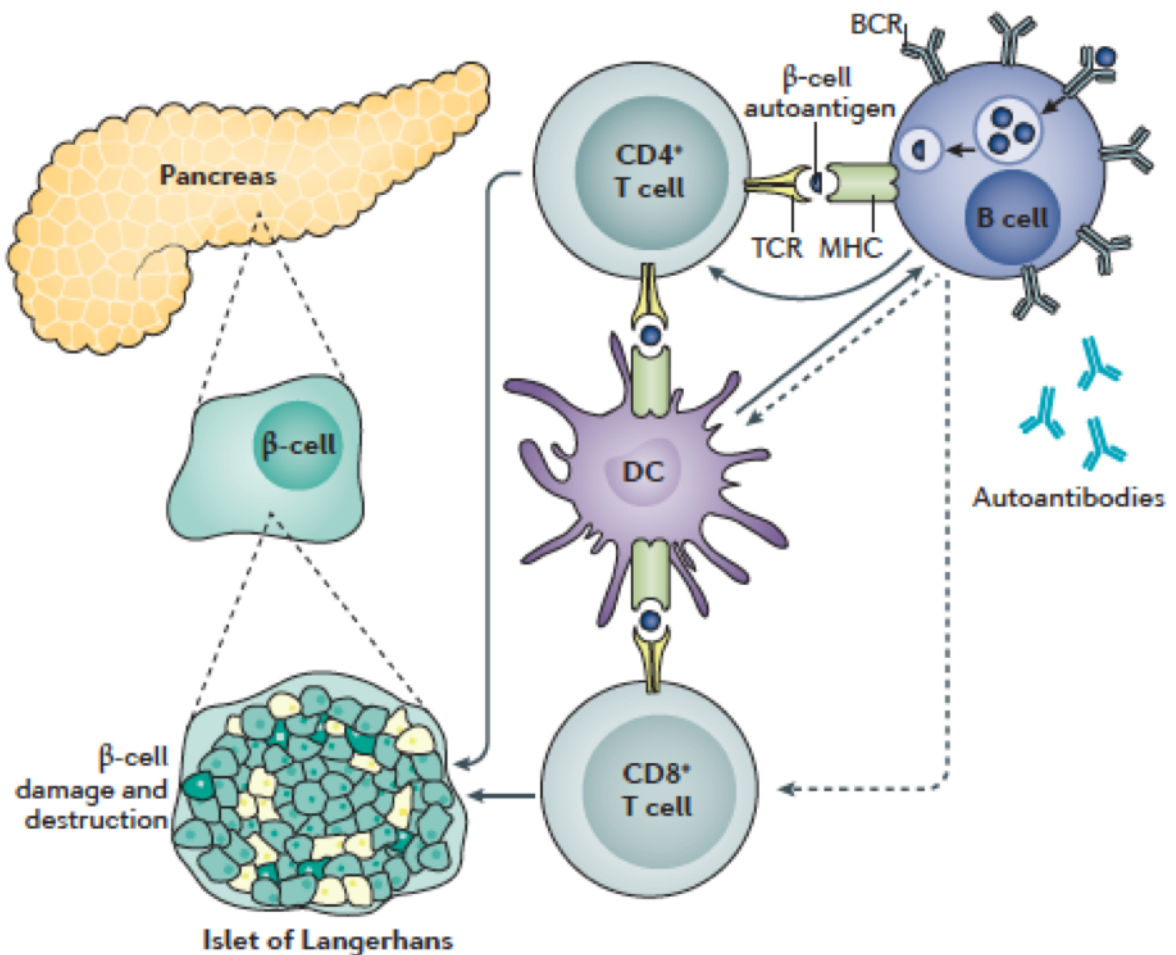
Les lymphocytes B (LB) ne sont pas directement liés à la destruction des cellules  $\beta$  mais plutôt à la progression de la maladie en favorisant l'auto-immunité. Les LB favorisent la différenciation des LT CD8+ en LT cytotoxiques (CTL) et fournissent des signaux de survie aux LT CD8+ pour maintenir des niveaux élevés de CTL agressifs [8]. En effet, ils stimulent la production d'auto-anticorps dont la présentation génère une auto-réaction de LT et la maintenance des LT CD4+ mémoires (**Figure 2**).

### I.1.c L'îlot pancréatique : unité fonctionnelle pour la sécrétion d'insuline

La partie endocrine représente 1% à 3% du volume pancréatique total, constitué environ de 1-3 millions d'îlots de Langerhans [9]. La partie exocrine représente donc 97-99% du volume pancréatique et est constituée de canaux et de cellules acineuses sécrétant le suc pancréatique contenant les enzymes protéolytiques comme la trypsine, la chymotrypsine et la lipase.

Les îlots pancréatiques ou îlots de Langerhans se forment par agglomération des cellules endocrines et sont dispersés entre les structures acinaires et ductales du pancréas exocrine. Le diamètre des îlots est d'environ 150-200  $\mu\text{m}$ . Les îlots sont très vascularisés et reçoivent environ 15% des ressources sanguines du pancréas ce qui en fait un dispositif de détection des éléments nutritifs [10]. De plus, la sécrétion d'insuline dans le flux sanguin est facilitée par la présence d'un endothélium fenestré et donc perméable [11].

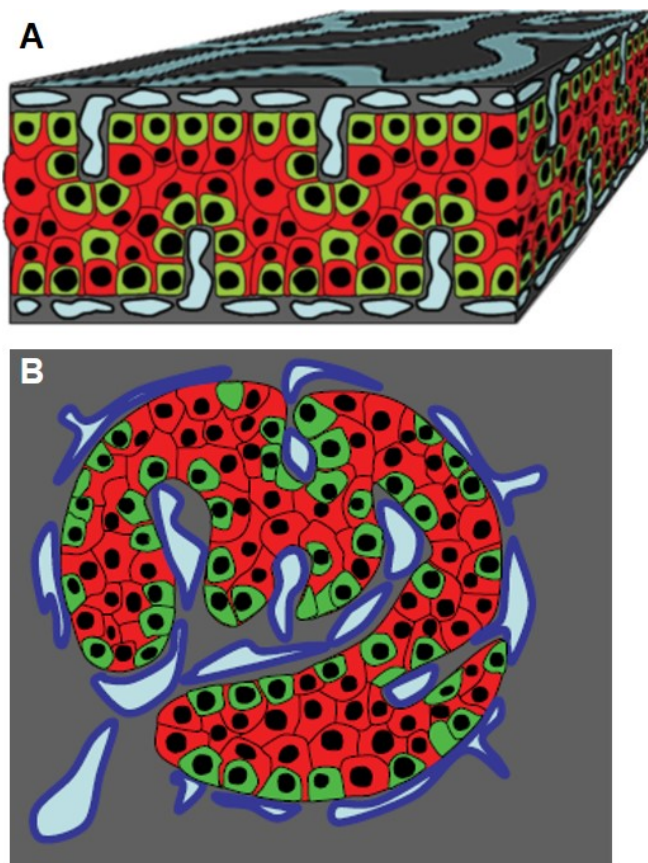
Chez l'homme, les îlots sont formés de plusieurs types cellulaires principaux: les cellules  $\beta$ , les plus nombreuses, qui produisent de l'insuline ; les cellules  $\alpha$  qui sécrètent du glucagon, hormone hyperglycémiant ; les cellules  $\delta$  qui produisent la somatostatine et les cellules PP qui sécrètent du polypeptide pancréatique qui joue un rôle dans l'appétit et dans la régulation des sécrétions endocrines et exocrines [12]. Les îlots pancréatiques sont organisés en une plaque tri-laminaire où une couche de cellules  $\beta$  est mise en sandwich entre deux couches enrichies en cellules  $\alpha$ . De plus, cette structure d'îlots a un motif plié où les vaisseaux circulent le long de ses deux côtés (**Figure 3**) [13].



**Figure 2. La pathogenèse de DT1 [14].**

*Le DT1 est une maladie auto-immune. Les LB activés interagissent avec les LT 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  $\beta$ . De plus, l'exposition des LB aux auto-antigènes des cellules  $\beta$  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.*



**Figure 3. L'organisation des îlots humaines [13].**

*A : les cellules  $\alpha$  (vert) et les cellules  $\beta$  (rouge) sont organisées en une plaque épaisse avec des vaisseaux (bleu) sur chaque des faces. Le repliement de la plaque permet la formation d'une structure tridimensionnelle vascularisée en son centre et à sa périphérie. Les cellules  $\alpha$  se trouvent regroupées en surface de la plaque, en contact direct avec les vaisseaux. Les cellules  $\beta$ , d'autre part, constituent la partie centrale de la plaque. Les cellules  $\beta$  assurent la sécrétion endocrine en développant des extensions cytoplasmiques qui se déroulent entre les cellules  $\alpha$  pour atteindre les vaisseaux en surface externe et interne de l'îlot. B : forme l'îlot par pliage de la plaque avec des vaisseaux adjacents.*

## **I.2 Traitements du DT1**

Le DT1 est la conséquence de la destruction complète des cellules  $\beta$ , entraînant à terme une carence en insuline absolue. Le traitement visera donc à remplacer la sécrétion d'insuline déficiente et cela dès le début de l'apparition clinique de la maladie. La sécrétion insulinaire physiologique est permanente au cours de la journée, avec des pics sécrétoires très prononcés survenant après les repas et une sécrétion beaucoup plus faible à distance de ceux-ci.

L'objectif du traitement est de s'approcher de la normoglycémie (proche de 1g/l avant les repas et inférieure à 1,40g/l en post prandial), afin de prévenir les complications aiguës et chroniques de la maladie pour assurer un bon confort de vie.

Certains chercheurs ont émis l'hypothèse qu'il serait possible de prévenir le DT1 au stade précoce de l'auto-immunité latente avant la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques [15]. L'immunothérapie qui consiste à restaurer la tolérance immunitaire vis-à-vis de cellules  $\beta$  ou de limiter la réaction immunitaire.

Pour atteindre ces objectifs, plusieurs types de traitements ont été développés : 1) L'insulinothérapie qui repose sur l'injection exogène d'insuline effectuée par le patient, sous forme de multi-injections ou de pompes à insuline. Ce traitement permet un contrôle de la glycémie chez la plupart des patients mais ne permet pas de supprimer les complications dégénératives associées au DT1. 2) La thérapie substitutive repose sur la mise en place d'un pancréas artificiel associant des systèmes d'analyses sanguines continues de la glycémie et des systèmes d'administration automatique d'insuline. 3) La transplantation de pancréas est un traitement curatif pour les patients atteints de DT1. Cette transplantation constitue la technique de référence dans la greffe des tissus insulino-sécrétant, mais la morbi-mortalité liée à l'intervention chirurgicale et le manque d'organes constituent les obstacles majeurs de cette approche.

Le développement et l'existence de nouvelles sources de tissus insulino-sécréteurs qui peuvent fournir suffisamment des cellules  $\beta$ -like, comme la maturation et la différenciation de cellules souches pluripotentes induites ou embryonnaires, la xéno greffe d'îlots pancréatiques et la greffe d'îlots encapsulés. Cependant l'utilisation des cellules souches embryonnaires posent des problèmes éthiques. Toutefois, à l'heure actuelle, il est impossible de différencier des cellules souches pluripotentes induites en cellules  $\beta$  fonctionnelles. De plus, la possibilité de ces cellules de développer des tumeurs n'est pas écartée. Par contre, l'obstacle majeur de la xéno greffe est le rejet xénogénique et qui nécessite un traitement lourd par immunosuppresseur.



Jusqu'à 10-20% des patients DT1 ne parviennent pas à atteindre un contrôle métabolique stable ou éviter des hypoglycémies mortelles en relation avec une altération concomitante des mécanismes contre-régulateurs.

Dans ce sous-groupe de patients, la thérapie de remplacement des cellules  $\beta$  par transplantation allogénique d'îlots pancréatiques est une option attrayante, moins invasive et plus sûre que la transplantation de pancréas [16]. Cette thérapie alternative peut restaurer le contrôle glycémique chez les patients atteints de DT1 instable [17, 18], améliorant ainsi la qualité de la vie, la prévention des complications diabétiques à long terme et la réduction des effets secondaires liés à l'immunosuppression [19].

### **I.3 La transplantation d'îlots pancréatiques**

L'allogreffe de cellules  $\beta$  permet de greffer l'unité fonctionnelle de la sécrétion d'insuline. Cette thérapie cellulaire comprend deux étapes ; la première, réalisée au laboratoire, consiste à isoler les îlots à partir du pancréas d'un donneur non diabétique en mort cérébrale, à les purifier du tissu exocrine et les mettre en culture. La seconde est réalisée à l'hôpital où les îlots purifiés sont injectés dans la veine porte d'un patient diabétique et viennent s'implanter dans les veinules pré-sinusoïdales du foie.

#### **I.3.a L'état de la transplantation d'îlots pancréatiques aujourd'hui**

Les essais cliniques antérieurs évaluant les traitements de DT1 instable ont démontré la restauration de la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques par l'allogreffe de cellules  $\beta$ . En 2000, l'Université d'Alberta a montré que l'allogreffe de cellules  $\beta$  permettait de restaurer une sécrétion C-peptide, un contrôle glycémique optimisé sans épisode d'hypoglycémie chez 7 sujets DT1. Ces résultats ont été confirmés plus tard par Brennan et ses collaborateurs dans un essai multicentrique où ils ont montré l'efficacité de la transplantation d'îlots à long terme chez 7 sujets DT1 suivis sur 12 ans [20]. Récemment, le groupe franco-suisse GRAGIL (Groupe Rhin-Rhône-Alpes-Genève pour la transplantation d'îlots de Langerhans) a reproduit avec succès les résultats d'efficacité de la transplantation d'îlots à long terme dans une étude prospective sur 44 patients DT1 greffés d'îlots pancréatiques. Les résultats ont montré une amélioration métabolique de la fonction des îlots greffés chez 89 % et 74 % des patients à 1 an et 5 ans respectivement après la greffe, un taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c  $\leq 7\%$  vs 9 % avant la greffe) chez 84 % et 59 % des patients à 1 an et 5 ans respectivement, et une insulino-indépendance chez 75 % des patients sur une moyenne de 20 mois [21]. En 2016, un essai clinique de phase 3 multicentrique, à bras unique de la transplantation d'îlots porté sur 48

patients DT1 a montré un taux d'HbA1c < 7 % chez 87,5 % et 71 % des patients à 1 an et 2 ans respectivement après la greffe comparativement à 9 % avant la greffe, une insulino-indépendance chez 52 % et 42 % des patients à 1 an et 2 ans respectivement [22]. Un seul essai thérapeutique TRIMECO en groupe parallèle, prospectif, multicentrique, contrôlé, randomisé, évaluant et comparant l'efficacité de la stratégie (greffe d'îlots) et de la stratégie (traitement insulinique intensif) à 6 mois a été réalisé et les résultats préliminaires sur 46 patients DT1 (25 patients expérimentaux greffés d'îlots vs 21 patients contrôles) ont été présentés au congrès de la société francophone de diabète 2017. Les résultats montrent, une diminution de taux d'HbA1c à 5,7 % dans le groupe expérimental vs 8,2 % dans le groupe contrôle et une augmentation de 1,5 ng/ml de C-peptide vs 0 avec disparition des hypoglycémies sévères [23]. Ces résultats nous fournissent des preuves importantes pour l'allo-transplantation d'îlots pancréatiques en tant que thérapie prouvée et prometteuse pour le traitement de DT1

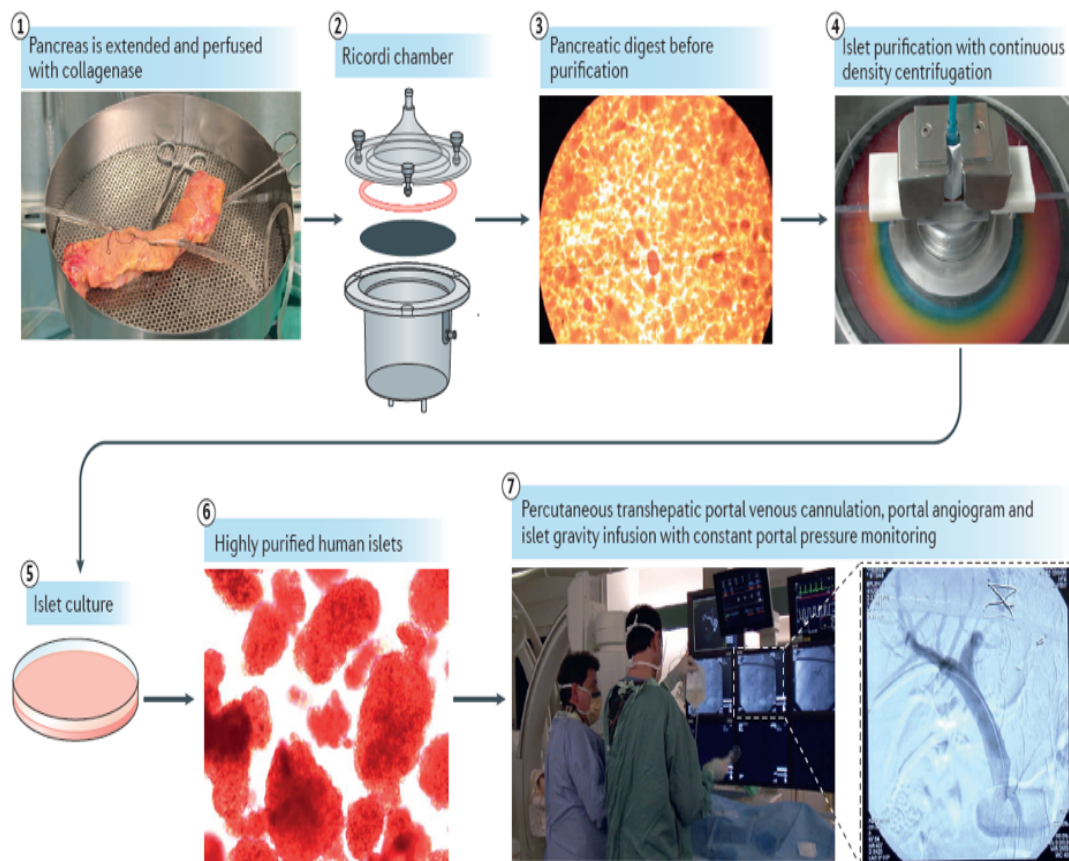
### I.3.b Procédure de la transplantation d'îlots pancréatiques à visée thérapeutique

Le processus d'isolement des îlots vise à préserver leur intégrité architecturale et fonctionnelle pour maintenir un rendement d'isolement et de purification optimal. Le temps d'ischémie chaude doit être limité en raison de l'orage cytokinique lors de la mort cérébrale du donneur, tandis que la durée de l'ischémie froide doit être réduite pour limiter l'étendue de dégât de l'ischémie [24].

Bien que le protocole d'isolement a été légèrement modifié au cours des dernières années, selon l'expérience de différents groupes de transplantation, les étapes fondamentales de la procédure restent les mêmes : isolement du pancréas du donneur décédé et canulation des canaux pancréatiques, perfusion enzymatique, distension et digestion du pancréas, suivie de la purification d'îlots et leur injection par voie intra portale chez le receveur (**Figure 4**) [25].

La première étape du processus est l'isolement du pancréas par dissection d'organe en éliminant la rate, le duodénum et toute la graisse sous-jacente. Idéalement, le pancréas doit être isolé avant tout autre organe abdominal afin de minimiser le temps d'ischémie et les dommages possibles du tissu pancréatique, qui est sensible aux lésions et à l'activation non spécifique des enzymes protéolytiques endogènes. Puis le pancréas est soumis à une digestion enzymatique par la collagénase Serva NB1 (contient de collagénase de type I et II) par injection dans le canal pancréatique principal, entraînant ainsi la désagrégation du tissu pancréatique.

Le pancréas coupé en 8 à 10 morceaux, est transféré dans une chambre Ricordi [26] rempli de solution de collagénase pour la phase de digestion sous agitation mécanique. Lorsque la



**Figure 4. Illustration schématique de l'ensemble depuis l'isolement des îlots jusqu'à la transplantation intra-portale [27].**

digestion enzymatique mécanique est suffisante pour séparer les îlots du tissu exocrine, le processus est arrêté par dilution. La phase de digestion est ensuite suivie d'une phase de purification qui permet de séparer les cellules endocrines des cellules exocrines. Elle repose sur la différence de densité 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 [26]. Le rendement d'isolement des îlots est de 300 000 à 400 000 îlots par pancréas soit 50 % des îlots totaux du pancréas.

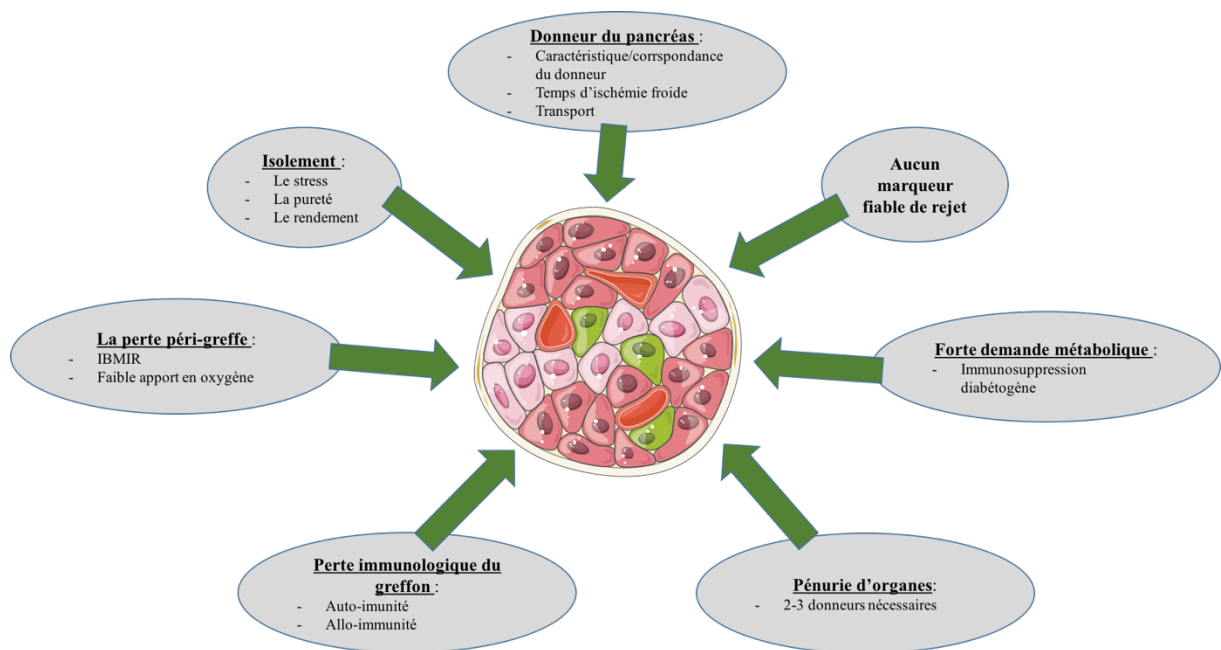
Après l'isolement, les îlots sont immédiatement transplantés sur place ou transportés vers le receveur ou bien encore mis en culture dans le but de maintenir leur fonctionnalité jusqu'au moment de la transplantation. La suspension d'îlots est diluée dans 150 ml de sérum physiologique avec 19,6 % d'albumine humaine, puis conservée à 4°C en poche de transfusion. La greffe d'îlots se produit après micro-embolisation dans le système veineux porte hépatique, avec l'arrêt des îlots au niveau pré-sinusoïdal dans les branches périphériques. Le patient reçoit en moyenne entre 10 000 et 13 000 îlots équivalents/kg de poids corporel.

La transplantation est réalisée par gravité sous contrôle échographique à partir d'un système de poche fermée, contenant les îlots héparinisés. L'héparine est une macromolécule anticoagulante utilisée pour éviter la formation d'un thrombus intra-portal. Elle permet également de neutraliser les substances chimiotactiques pour les macrophages libérés par la lyse cellulaire. L'injection des îlots est effectuée dans la veine porte par cathétérisme trans-hépatique percutané.

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.

### I.3.c Contraintes et limites de la transplantation d'îlots pancréatiques

La greffe d'îlots pancréatiques se heurte à plusieurs obstacles rencontrés aux différentes phases de la greffe : pré-greffe, péri-greffe et post-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 pré-greffe. En péri-greffe, l'apparition d'une intense réaction inflammatoire (IBMIR, cf. chapitre II) qui est responsable de la perte de 50% des îlots transplantés représente une limite majeure de la greffe [28]. De plus, la faible implantation initiale des îlots, le rejet immunitaire, la dysfonction chronique du greffon, la récurrence de l'auto-immunité et l'absence de marqueurs précoces de la perte des îlots s'ajoutent à ces limites (**Figure 5**). Enfin, le rôle du site d'implantation, la revascularisation des îlots et les traitements immunosuppresseurs jouent également un rôle important pour la survie d'un greffon fonctionnel.



**Figure 5. Les facteurs affectant les résultats de la transplantation d'îlots pancréatiques.**

## ❖ Le site d'implantation des îlots

Actuellement, le foie est le seul site de transplantation pour les îlots pancréatiques qui a régulièrement donné lieu à une insulino-indépendance chez les receveurs. Outre le faible risque, opératoire, l'avantage de ce site est la sécrétion physiologique portale endogène rapide de l'insuline dans le foie.

Par contre, la pression en oxygène est plus faible que celle des vaisseaux intra-insulaires pancréatiques. Les îlots pancréatiques nécessitent un apport en oxygène et en nutriments pour leur survie et requièrent un accès aux concentrations en glucose sanguin pour leur fonction endocrinienne [29]. Etant donné que la revascularisation des îlots transplantés n'est pas immédiate, la présence d'une bonne perfusion de l'organe est d'autant plus indispensable.

De nombreux sites d'implantation expérimentaux comme la rate, la capsule rénale et l'omentum ont été étudiés chez le petit animal et pourraient être des sites prometteurs pour la transplantation d'îlots. Cependant, l'application de ces sites expérimentaux en clinique est un grand défi. Par rapport aux injections intra-portales, l'utilisation de la capsule rénale comme site d'implantation nécessite moins d'îlots pour maintenir une glycémie normale chez la souris, mais nécessite une grande quantité d'îlots chez l'homme. Outre le risque invasif opératoire, la capsule rénale a un apport sanguin relativement faible et ne fournit pas un microenvironnement riche en oxygène pour les îlots. Par contre, ce site facilite la prise des biopsies pour le suivi de la fonctionnalité des îlots, ce qui est très difficile au niveau hépatique [29]. Un autre site d'implantation étudié est la rate. Dans un modèle d'autogreffe d'îlots chez le chien, les vaisseaux hépatiques et spléniques ont produit des taux similaires d'insuline pour atteindre une normo-glycémie, nécessitant un nombre d'implantation d'environ 4500 îlots/ kg [30]. Par contre, la rate ne présente aucun avantage particulier par rapport au foie. En effet, le risque d'hémorragie et le recrutement local des lymphocytes au greffon transplanté dans la rate en font un mauvais choix en tant que site d'implantation d'îlots. Par conséquent, la transplantation d'îlots intra-portale reste à ce jour la méthode de choix.

## ❖ La revascularisation des îlots pancréatiques

Après transplantation, les îlots pancréatiques ont besoin d'un accès rapide à l'oxygène, au glucose et à d'autres métabolites. La revascularisation est indispensable pour assurer leur survie et leur fonction. En 2009, Lau et ses collaborateurs ont montré que les îlots humains transplantés par voie intra-portale sont mal revascularisés dans un modèle de souris nues [31]. En effet, dès le septième jour après transplantation, les cellules endothéliales du receveur

forment un réseau vasculaire au voisinage des îlots et s'établissent en formant des vaisseaux fonctionnels après seulement 10 à 14 jours [32]. La revascularisation des îlots nécessitent trois sources de cellules endothéliales (ECs) : 1) les ECs du receveur de greffe, 2) les ECs intra-insulaires du donneur qui constituent 7 à 40 % de l'îlot, et 3) les progéniteurs endothéliaux de la moelle osseuse du receveur [33]. Après transplantation, les îlots produisent des facteurs angiogéniques comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire-A (VEGF-A) et l'angiopoïétine-1, qui permettent d'accélérer la revascularisation par recrutement des ECs du receveur au site de transplantation. Cependant, la mise en culture des îlots avant transplantation diminue la proportion des ECs intra-insulaires du donneur. Molnar et al. ont montré que la transplantation d'îlots immédiatement après l'isolement améliore la revascularisation en réduisant l'hypoxie [34]. Toutefois, après reperfusion, la diffusion limitée en oxygène déclenche la mort des îlots, et plus précisément des cellules  $\beta$  qui sont situées au centre de l'îlot (**Figure 3**). Par contre, Hughes et al. ont montré dans un modèle syngénique que l'hyperoxygénation protège les îlots injectés par voie intra-portale [35].

#### ❖ L'immunosuppression

Afin de prévenir un rejet post-greffe, un traitement immunosuppresseur est administré au patient avant et après la transplantation des îlots. De 1990 à ce jour, les traitements immunosuppresseurs ont connu d'importantes améliorations. Cependant, ces traitements restent agressifs pour les cellules  $\beta$ . Pour un résultat optimal de transplantation, il est donc nécessaire de trouver un équilibre entre efficacité et toxicité.

En 2000, le groupe d'Edmonton a établi un protocole d'immunosuppresseur composé d'une combinaison de forte dose de Sirolimus (cible la protéine mTOR qui inhibe la réponse à l'interleukine-2 (IL-2)), de faible dose de Tacrolimus (inhibiteur de la calcineurine bloquant la production d'IL-2) et de Daclizumab (anticorps de récepteur d'IL-2). Les protocoles récents comprenant une combinaison de Tacrolimus et de mycophénolate mofétil avec une induction de greffe par la thymoglobuline ont permis d'améliorer les résultats de la greffe d'îlots pancréatiques. Cependant, ces traitements immunosuppresseurs sont néfastes pour le maintien à moyen et long terme des îlots transplantés car ils agissent sur la fonctionnalité et la revascularisation des îlots. Le Sirolimus induit l'apoptose des LT et la génération des LT régulateurs, mais il a des effets délétères sur la régénération des cellules  $\beta$ . Nicolauss et ses collaborateurs ont montré que la rapamycine réduit le taux de prolifération des cellules  $\beta$  des îlots de rat transplantés [36]. Par ailleurs, il a été démontré que le Tacrolimus, très utilisé dans la transplantation d'îlots pancréatiques, est toxique pour les cellules  $\beta$ . En effet, Tamura et ses

collaborateurs ont montré que l'administration de 10 mg/kg de tacrolimus chez le rat diminue la fonctionnalité des îlots en inhibant la transcription de l'insuline dans ces îlots [37].

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 [38].

Parmi l'ensemble des obstacles auxquels se heurtent la transplantation d'îlots pancréatiques par injection intra-portale, la réaction inflammatoire précoce appelée Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR) est une forme d'ischémie reperfusion particulière susceptible d'impacter le devenir et la fonction du greffon.



## *Chapitre II*

---

## II Impact de l'ischémie-reperfusion en transplantation

### II.1 Concept de l'inflammation stérile et immunité innée

L'inflammation est un processus important permettant la réparation et la régénération des tissus grâce à l'élimination des cellules mortes et à la libération de facteurs de croissance et des chimiokines induisant la prolifération et l'angiogenèse cellulaire.

Lors d'une transplantation, le prélèvement du greffon, son transport, puis son implantation chez le receveur, provoque des phénomènes inévitables d'ischémie-reperfusion (IR). Cette IR est un état pathologique caractérisé par la restriction initiale du flux sanguin à un organe, suivi de la restauration ultérieure de son perfusion et son ré-oxygénation concomitante. Elle entraîne, au niveau du greffon, un stress cellulaire et un certain niveau de lésion tissulaire qui sont responsables de l'activation du système du complément et de la libération dans l'organisme du receveur des signaux moléculaires de danger DAMPS (damage associated molecular patterns). Ces molécules, en se liant à divers récepteurs PPR (pattern recognition receptors) à la surface des effecteurs cellulaires du système immunitaire inné, initient une réponse inflammatoire stérile [39]. Le concept d'une inflammation stérile a été proposé et s'agit du déclenchement d'une réponse inflammatoire classique non infectieuse en réponse à des stimuli non infectieux : le stress d'IR et les particules irritantes (agrégats protéiques, composés chimiques). Cette réponse inflammatoire peut avoir des effets destructifs sur les tissus environnants et peut même aboutir à une inflammation chronique. Au cours de cette inflammation stérile, certains effecteurs de l'immunité notamment les macrophages et les cellules dendritiques, présentent les antigènes (cellules présentatrices d'antigène ou APC) du greffon libérés par la destruction tissulaire, aux lymphocytes du receveur [40].

#### II.1.a Libération et reconnaissance des DAMPs après transplantation

Les DAMPs proviennent de la fragmentation des protéines extracellulaires, de la nécrose cellulaire qui libère dans le milieu extracellulaire des constituants nucléaires (High Mobility Group Box-1 HMGB-1, acides nucléiques) ou cytoplasmiques (Heat Shock Protein) ou activement sécrétés par les cellules sous l'effet du stress (HMGB-1, protéines de la famille S100). Une fois libérés, les DAMPs activent les cellules immunitaires résidentes du greffon et ses cellules endothéliales. Cette activation immunitaire induit la production des chimiokines qui recrutent les cellules immunitaires du receveur, favorisant l'inflammation et la réponse immunitaire au site du greffon. De plus, L'activation endothéliale entraîne une surexpression des molécules d'adhésions telles que VCAM-1 (vascular cell adhesion protein 1) et LFA-1

(lymphocyte function associated antigen 1), favorisant la fixation des neutrophiles au système vasculaire du greffon [41].

- L'HMGB-1, une protéine nucléaire qui régule la transcription des gènes, est l'une des DAMPs intracellulaires les mieux caractérisées qui induit l'inflammation dans les organes transplantés et affecte le taux de rejet aigu des allogreffes. En effet, les taux de l'HMGB-1 sont augmentés dans les organes endommagés dans un modèle murin des lésions d'IR hépatique et rénale, tandis que son blocage a atténué l'inflammation. Une autre étude a montré que la préservation hypothermique des allogreffes cardiaques augmente l'expression d'HMGB-1 après la transplantation et que les lésions d'IR entraînent son libération [41].

La reconnaissance des DAMPs par les cellules de système immunitaire innée se produit par l'intermédiaire des récepteurs PRR qui peuvent être classés en (1) complexes d'inflammasomes, (2) des TLRs (toll like receptors) et (3) des RLRs (retinoic acid inducible gene I-like receptors).

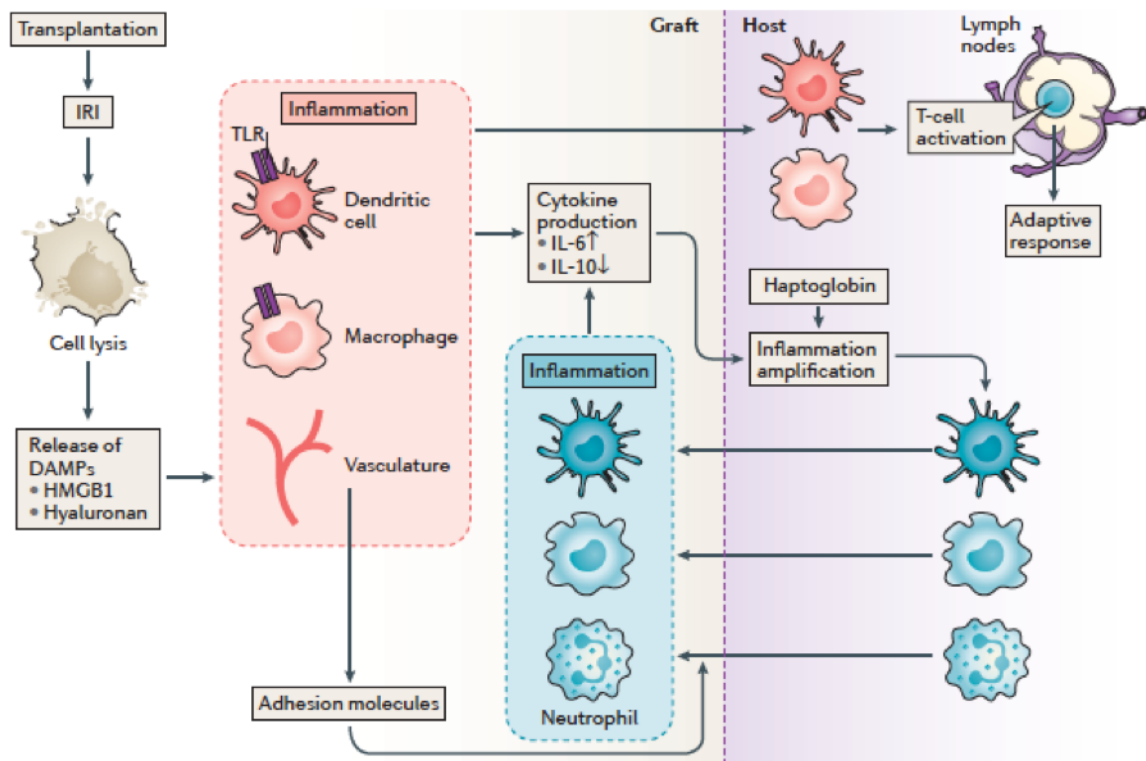
- L'inflammasome, un groupe de complexes protéiques intracellulaires assemblés dans le cytoplasme en réponse à un signal danger des DAMPs, fonctionne comme un échafaudage moléculaire qui recrute et active les précurseurs des caspases en particulier la pro-caspase-1, produisant des cytokine pro-inflammatoires d'interleukines IL-1 $\beta$  et d'IL-18. En effet, dans un modèle murin d'allogreffe cardiaque, IL-1 $\beta$  a été trouvé surexprimé après la transplantation [42].

- Les TLRs, sont les récepteurs des cellules immunitaires innées les mieux caractérisés dans la transplantation d'organes. Le TLR4, un membre de la famille des TLRs, est impliqué dans la reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS, endotoxine présente au niveau des bactéries Gram négatifs) mais reconnaît également des DAMPs comme le HMGB-1. La liaison des DAMPs au TLR4 induit une cascade de signalisation menant à l'activation de facteur de transcription NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B). En effet, Wu et al. ont montré que les souris déficientes de TLR4 offrent une protection contre la dysfonction rénale et l'inflammation dans un modèle d'IR rénale [43]. D'autres études ont montré que le TLR4 est essentiel pour l'induction des lésions d'IR rénales chez les souris.

Au cours de la phase précoce de la reperfusion, les cellules immunitaires innées infiltrer le greffon et contribuent à l'activation pathologique de l'inflammation (**Figure 6**).

## II.1.b IR et implication des cellules immunitaires innées

L'immunité innée permet une réponse rapide de l'hôte contre les pathogènes. Les principales fonctions comprennent l'initiation d'une réaction de défense instantanée contre des



**Figure 6. Initiation et maintien de l'inflammation stérile après la transplantation [41].**

La lésion d'IR induit un degré de lyse des cellules du greffon et une dégradation de la matrice extracellulaire. Ces processus conduisent à la libération des DAMPs, qui activent les cellules immunitaires innées par l'intermédiaire des TLRs. Les cellules constitutives et résidentes du greffon (cellules endothéliales vasculaires, macrophages et cellules dendritiques) sur-expriment des molécules d'adhésion (VCAM-1) et des molécules co-stimulatrices (CD80, ligand exprimées à la surface des APC). Ces cellules sécrètent également des cytokines inflammatoires qui stimulent le recrutement des cellules immunitaires innées (les neutrophiles) au site du greffon et activent les cellules du receveur présentes au site de greffe pour produire des amplificateurs d'inflammation (tels que l'haptoglobine, une protéine plasmatique inductible par l'inflammation). Cette inflammation accrue active en outre les cellules immunitaires infiltrées du greffon et induit leur migration vers les ganglions lymphatiques où ils activent des cellules T en initiant une réponse immunitaire adaptative. Cette réaction inflammatoire stérile déclenchée par l'IR peut finalement conduire au rejet immunitaire du greffon.

corps étrangers, qui sera suivi de l'activation du système immunitaire adaptatif, le recrutement lymphocytaire T incluant la production de cytokines, l'activation du complément et la présentation de l'antigène. L'immunité innée a été impliquée dans la perte précoce du greffon associé aux mécanismes d'IR. Les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques (DCs), les cellules Natural Killer (NK) sont impliquées dans ce processus.

- **Les neutrophiles**

Les neutrophiles sont déterminants dans la réponse du système immunitaire innée car ils sont les premiers à arriver au site d'agression. Depuis leur découverte par Metchnikoff, ils ont été considérés comme responsables des dommages générés par l'inflammation au cours d'infections aiguës. Toutefois, ils sont centraux dans la régulation de la réponse immunitaire. Les neutrophiles produits de la moelle osseuse circulent dans le sang et suivent une cascade de médiateurs pro-inflammatoires, de molécules d'adhésion et de chimiokines pour atteindre le site d'infection [44]. Les neutrophiles sont recrutés et activés par des cytokines libérées par des macrophages activés au site d'une lésion tissulaire ou d'une inflammation [45]. Au site, les neutrophiles, qui sont des phagocytes occasionnels, internalisent les agents pathogènes, qui sont lysés par la présence des espèces réactives de l'oxygène (ROS), de protéines oxydantes comme les myéloperoxydases ou protéolytiques comme l'élastase. L'opsonisation préalable de l'agent pathogène ou la présence de facteurs du complément amplifient la réponse neutrophilique. De plus, les neutrophiles ont la capacité de libérer des pièges extracellulaires des neutrophiles (Neutrophil Extracellular Traps ou NET) qui sont des structures d'ADN porteuses de différentes protéines provenant de l'intérieur des granules. Ces NETs favorisent l'immobilisation et la mort des micro-organismes nocifs, et ils ont été impliqués dans les lésions d'IR cardiaque. En effet, Savchenko et al. ont montré que les souris KO (knock out) incapables de libérer des NETs, ont été protégées des conséquences de l'ischémie [46]. De même, Oklu et al. ont montré que les taux réduits de NETs chez des souris KO de TLR4 ont diminué les dommages consécutifs aux lésions d'IR des membres postérieures [47].

- **Les monocytes/macrophages**

Les monocytes produits de la moelle osseuse sont les plus grands leucocytes. Ils sont libérés dans la circulation sanguine après la maturation et se différencient en macrophages lors de l'infiltration tissulaire [48]. Les monocytes étaient autrefois uniquement caractérisés par une forte expression de CD14, un récepteur de surface qui interagit avec les TLRs dans la reconnaissance des LPS. Les monocytes circulants sont recrutés par chimiotactisme. A leur

arrivée au site d'infection, les monocytes se différencient en macrophages tissulaires ou DCs. Les macrophages existent sous deux formes, M1 et M2. Les macrophages M1, le phénotype "killer", sont les macrophages classiquement activés. Les M1 expriment l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et une multitude de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- $\alpha$  (facteur de nécrose tumorale), IL-1b, IL-6 [49]. Les M2, au contraire, fonctionnent de manière régulatrice, éliminent les débris et favorisent la réparation des tissus. En sécrétant l'IL-10 et le TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta 1), les macrophages M2 contribuent à la régulation de la réponse immunitaire pour empêcher une réaction excessive [50]. Les macrophages internalisent les agents pathogènes, les digèrent et les présentent aux antigènes liés aux protéines du CMH sur leur surface pour l'activation lymphocytaire T. Les macrophages ont été impliqués dans les lésions d'IR. Une étude faite dans un modèle murin d'IR rénale, a montré que la déplétion des macrophages avant l'IR a diminué les lésions tissulaires. En revanche, lorsque ces macrophages ont été déplétés quelques jours après les lésions, les chercheurs ont observés une altération de la prolifération et la réparation tubulaire liées à la déplétion des macrophages M2 [51].

- **Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques, les macrophages, certains lymphocytes B et les cellules épithéliales activées constituent le pool d'APC professionnel.

La fonction primaire de DC est d'internaliser et de présenter des antigènes grâce aux protéines de CMH à leur surface. Bien que les lymphocytes B présentent également l'antigène aux lymphocytes T, les DCs sont centrales pour l'activation des lymphocytes B et T et la régulation de la réponse immunitaire. Les DCs sont les seules cellules connues pour être en mesure d'activer les lymphocytes T naïves au repos [52]. Les DCs des donneurs résidentes dans les tissu d'organes ou celles circulantes du receveur sont capables d'amplifier l'inflammation via l'activation des PRR après une lésion d'IR hépatique [53].

- **Les cellules Natural Killer (NK)**

Les cellules NK partagent la même lignée que les lymphocytes T et B, mais font partie du système immunitaire inné. Les cellules NK sont essentielles pour la réponse immunitaire innée, et reconnaissent les cellules infectées ou cancéreuses, même en l'absence d'anticorps ou de CMH exprimés sur la surface de ces cellules [54]. Outre leurs fonctions cytotoxiques, les cellules NK sécrètent une grande variété de cytokines, en particulier l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ). Le rôle des cellules NK dans les lésions d'IR n'a pas été bien caractérisé. Une étude réalisée

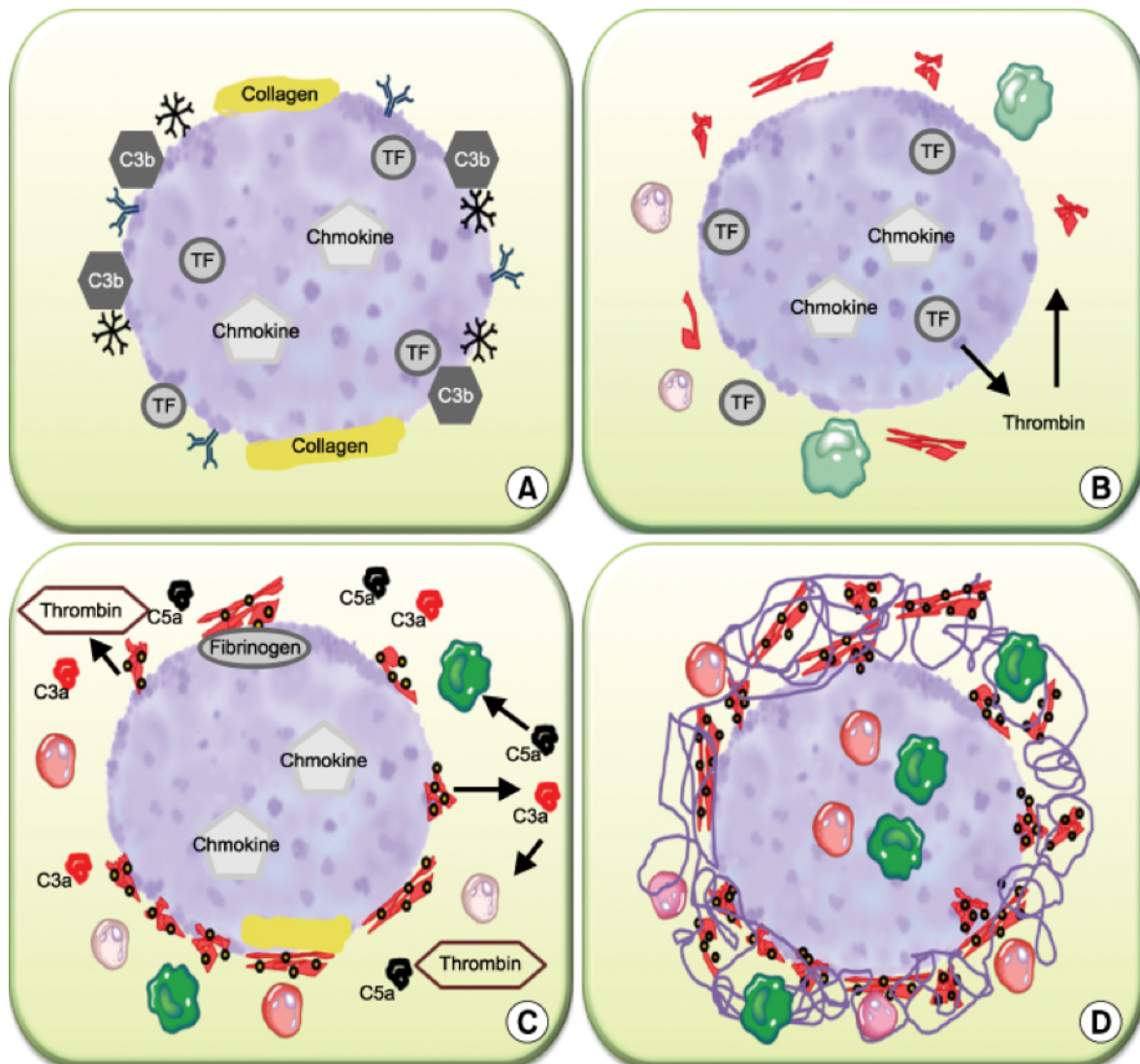
par Kim et ses collaborateurs dans un modèle d'IR rénale, ont montré que les cellules NK ont été recruté par la production de la chimiokine CCR5 par la cellule épithéliale tubulaire après activation de TLR2 par les DAMPs [55].

## **II.2 La réaction IBMIR: une forme particulière d'IR dans la greffe d'îlots**

L'une des premières causes de la destruction des îlots pancréatiques transplantés est la forme particulière d'IR appelée IBMIR (instant blood mediated inflammatory reaction). Cette réaction inflammatoire précoce se déclenche lors du contact des îlots pancréatiques avec le sang portal. Bennet et ses collaborateurs ont été les premiers à proposer que lorsque les îlots fraîchement isolés entrent en contact direct avec le sang, l'activation de la réaction immunitaire innée est déclenchée [28]. L'IBMIR combine une réponse inflammatoire et une activation de la coagulation. Les deux réponses s'entretiennent et impliquent l'activation du complément, la sécrétion de chimiokines qui favorisent le recrutement des cellules immunitaires innées et la libération des cytokines pro-inflammatoires conduisant à la destruction des îlots [56]. Les îlots ainsi que les APC résidentes sécrètent des cytokines et des chimiokines. L'infiltration des leucocytes et des macrophages initie la destruction des cellules des îlots (**Figure 7**).

### **II.2.a Description macroscopique**

L'IBMIR est la cause principale de l'altération précoce des îlots au cours d'une xéno greffe, d'une allogreffe ou d'une autogreffe. Après 15 minutes de perfusion, les îlots transplantés sont piégés dans des caillots avec une forte consommation des plaquettes et après une heure, la plupart des îlots sont infiltrés par de nombreux leucocytes [57]. Le marquage des îlots et leur suivi par imagerie a permis de mettre en évidence une perte de 25 % des îlots immédiatement après la greffe [58]. En clinique, l'IBMIR a été observé chez des patients soumis à une pancréatectomie totale suivie d'une autogreffe d'îlots suggérant que ce n'est pas la réponse immune qui est le déclencheur. Trois heures après la perfusion des îlots, ont été observés une augmentation de concentration des marqueurs de coagulation comme le complexe thrombine-antithrombine (TAT), des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 et IL-8 [59]. On peut également noter que le facteur tissulaire (TF), initiateur cellulaire de la coagulation, est exposé à la surface des îlots transplantés [60]. Une autre étude chez l'homme a détecté l'augmentation transitoire de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) observée dans la moitié des receveurs transplantés d'îlots avec un pic observé après 7 jours de la transplantation [61], témoignant d'une agression des cellules hépatocytaires.



**Figure 7. Les différentes étapes de l'IBMIR [56]**

(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 à la déposition 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 α2β1 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.



## II.2.b Acteurs de l'IBMIR

### II.2.b.i La sécrétion des cytokines et des chimiokines

Lors de l'IBMIR, l'activation majeure de l'inflammation se traduit par des concentrations circulantes de médiateurs de l'inflammation. Un panel de cytokines secrété conduit au recrutement et à l'activation de cellules inflammatoires. La thrombine activée favorise l'expression membranaire des facteurs d'adhésion tels que la P-sélectine par les cellules endothéliales intra-insulaires et portales, favorisant ainsi le recrutement puis l'agrégation plaquettaire. Les cellules endothéliales sécrètent également l'IL-6 et l'IL-8 pro-inflammatoires, qui favorisent le recrutement des neutrophiles et des macrophages vers le site d'inflammation. Les monocytes / macrophages sécrètent IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8, amplifient ainsi la réponse inflammatoire. En raison de l'hypoxie et du stress induit par l'isolement, les îlots eux-mêmes favorisent cette inflammation en induisant non seulement l'expression du TF, mais aussi en exprimant d'autres signaux pro-inflammatoires, tels que le HMGB1, IFN $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  induced protein (IP)-10, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP)-1, et le TNF- $\alpha$  [62].

Les macrophages, les cellules Kuppfer (cellules macrophagiques de foie) et les neutrophiles résidentes des îlots sécrètent l'IL-1 $\beta$ , qui altère la sécrétion d'insuline et induit l'apoptose des cellules d'îlots. L'IL-1 $\beta$  active la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B et induit l'expression de plusieurs autres médiateurs inflammatoires [63].

En plus de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, les îlots expriment des chimiokines, dont CXCL10 (IP-10), CXCL8 (IL-8) et CCL2 (MCP-1) sont les plus importants [64]. L'IP-10 est largement reconnue comme une chimiokine qui recrute les leucocytes vers le site d'inflammation. D'autre part, l'IL-8 et le MCP-1 sont connus pour recruter des neutrophiles et des macrophages, respectivement. Une étude a démontré que la fonction de l'allogreffe d'îlots est prolongée sous un traitement d'anticorps anti-CXCL10 [65]. L'activation plaquettaire joue un rôle essentiel dans l'amplification de la réaction inflammatoire en libérant des médiateurs inflammatoires d'un part et en activant le système du complément d'autre part.

### II.2.b.ii Le TF : initiateur cellulaire de la coagulation et médiateur central de l'IBMIR

Le TF joue un rôle essentiel et important dans le déclenchement des mécanismes pro-thrombotiques de la réaction d'IBMIR. Le TF est une glycoprotéine transmembranaire de 47 kDa et un membre de la superfamille de cytokines de classe II [66]. Il fonctionne à la fois comme un récepteur, avec un signal de transduction entraînant l'induction de gènes impliqués

dans l'inflammation, l'apoptose, le développement embryonnaire et la migration cellulaire, et il est le ligand du facteur VII /VIIa favorisant l'autoactivation [67]. Il est exprimé de manière constitutive par de nombreux tissus extravasculaires, en particulier des tissus péri-vasculaires, et de manière inductible par l'endothélium en réponse à des stimuli inflammatoires, par les monocytes et par les plaquettes [68]. Il a été détecté sur des microparticules (MPs) circulantes d'origine neutrophiliques et il est également le stimulus principal dans la formation de thrombus artériel après la rupture de la plaque d'athérome [69]. Dans les conditions de l'IBMIR, le TF est fortement exprimé à la surface des cellules  $\beta$  stimulées [70] mais aussi il a été détecté dans l'environnement des îlots sous forme active dans des MPs émises libérés par les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  de l'îlot [60].

En effet, Moberg et ses collaborateurs ont pu montrer une corrélation entre le contenu en TF des îlots et l'intensité de l'IBMIR dans un modèle tubing loop d'îlots humains isolés. De plus, Johansson et ses collaborateurs ont montré une corrélation négative entre la formation de complexe TAT/FVIIa-AT circulant et l'abaissement de la concentration de C-peptide circulant à 7 jours après la greffe [60]. Ces données montrent l'effet délétère de TF sur le succès de la transplantation d'îlots et mettent en évidence la diminution de la production d'insuline par les îlots lors de l'activation forte de l'IBMIR.

### II.2.b.iii Activation de la coagulation et des plaquettes

Le modèle actuellement accepté de coagulation souligne l'importance centrale du TF en tant que principal initiateur cellulaire de la coagulation. Le TF permet: (i) l'activation des facteurs X et IX, (ii) l'activation séquentielle avec une phase initiale, une phase d'amplification et une phase de propagation [71] et nécessite l'implication des éléments cellulaires, à savoir, les plaquettes activées fournissant une surface phospholipidique chargée négativement sur laquelle des réactions se produisent à proximité immédiate de la zone de dommage [72], mais aussi les cellules endothéliales et les cellules leucocytaires dont les neutrophiles, dans lesquelles l'expression du TF est inductible en réponse aux cytokines. Après la formation du premier complexe facteur VIIa/TF, les zymogènes circulants des facteurs de la coagulation, ancrés à la surface cellulaire s'organisent en complexes enzymatiques successifs dont le produit de la réaction est l'enzyme du complexe en aval.

Il y a une décennie et demie la première incompatibilité non immune entre les îlots et le sang a été démontré pour la première fois dans un système in vitro, en utilisant des « tubing loop » composés des tubes héparinisés comme modèle de vaisseau sanguin. Dans ce modèle, les îlots injectés étaient piégés dans les caillots formés immédiatement après leur contact avec le sang.

Ce modèle a mis en évidence le rôle dominant de la coagulation dans la perte des îlots [73]. Ceci a été confirmé chez le porc avec la survenue de thrombose et la présence d'îlots nécrotiques dans les biopsies du foie 2 jours après transplantation intra-portale des îlots [74]. Les résidus de collagène éventuellement présents dans la suspension d'îlots ou à leur voisinage, présentent une surface chargée négativement susceptible de favoriser l'activation du facteur XII. D'autre part, le TF exprimé sur les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  [70] et qui a également été détecté dans le tissu exocrine qui contamine les préparations d'îlots initie la coagulation par la liaison du facteur VIIa [60].

L'activation plaquettaire s'établit par plusieurs mécanismes non exclusifs : (1) la liaison aux résidus de collagène exposés par les îlots par l'intermédiaire du facteur soluble von Willebrand (vWf) plasmatique qui possède des domaines d'affinité pour le collagène. Les plaquettes ont une affinité importante pour le vWf qu'elles lient par l'intermédiaire de la glycoprotéine Gp1b. (2) Un autre mécanisme d'interaction directe avec le collagène se fait par l'intermédiaire de la glycoprotéine GpVI [75].

#### II.2.b.iv Activation du système du complément

Le système du complément qui fait partie intégrale de l'immunité innée, comprend plus de 30 protéines circulantes distinctes de la cascade du complément : la voie lectine ou effectrice, la voie classique et la voie alternative [76]. Les facteurs du complément sont des convertases qui agissent par protéolyse ménagée. La dernière convertase C3b initie la phase effectrice par la formation du complexe d'attaque membranaire (**Figure 8**).

Des études réalisées *in vitro* montrent qu'après contact d'îlots humains avec le sang, aucun dépôt d'anticorps n'est détecté à leur surface. Ces données suggèrent que l'activation du complément ne se fait pas au cours de l'IBMIR par la voie classique c'est à dire après fixation des anticorps par un antigène membranaire. L'activation massive du complément au cours de l'IBMIR serait donc produite par la voie alterne. L'implication de la voie lectine reste peu explorée.

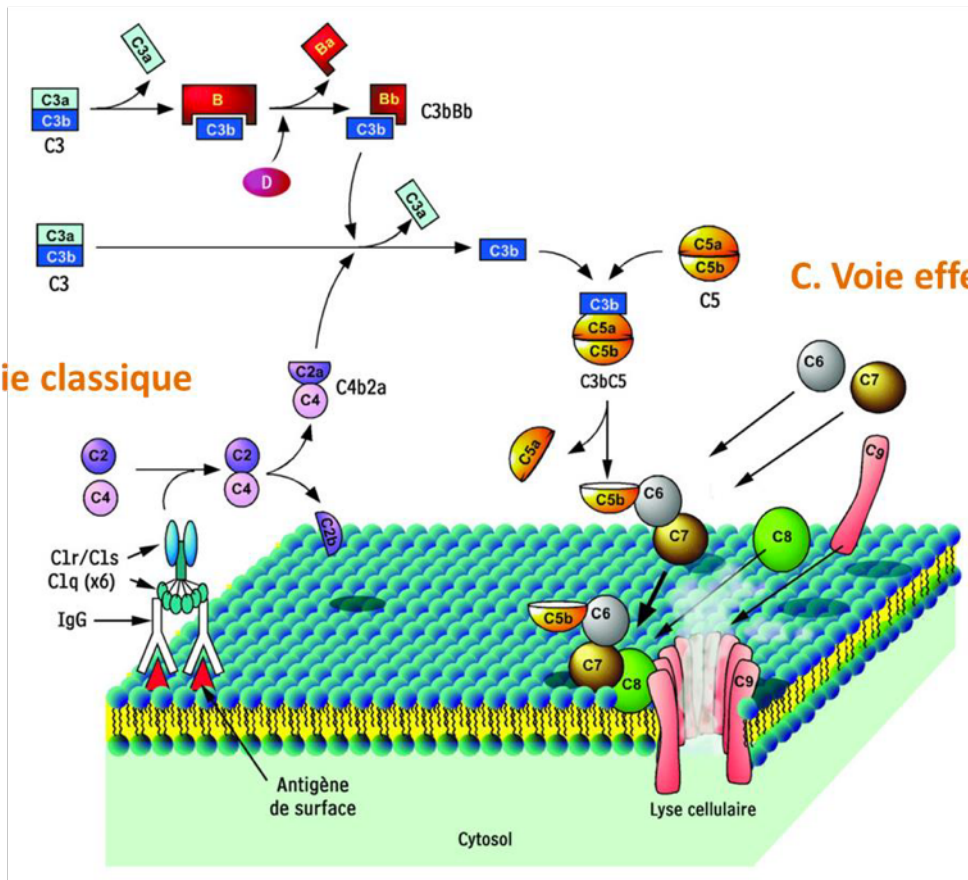
Sur le plan moléculaire, l'activation des protéines du complément C3a et C5a conduit au recrutement et à l'accumulation de leucocytes, à l'expression de molécules d'adhésion induite à la membrane de l'endothélium. Ensuite, les plaquettes favorisent la production des ROS et des cytokines [77].

D'autres études ont mis en évidence que l'accumulation d'IgG, d'IgM et de protéines de complément C3, C4 et C9 à la surface des îlots humains immédiatement après le contact avec le sang ABO compatible indique que l'activation de la voie classique du complément est aussi

## B. Voie alterne

## A. Voie classique

## C. Voie effectrice



**Figure 8. Les différentes voies d'activation de la cascade du complément.**

(D'après Roselyne l'Italien, 2008 ; monde.ccdmd.gc.ca)

La cascade de l'activation du complément résulte de l'activation de 3 voies différentes : (1) par la voie classique, le complexe C1 active, par sa fixation aux immunoglobulines, les complexes C2 et C4 et les clivent pour former le complexe C4b2a appelé C3 convertase. Cette dernière clive C3 en C3a et C3b. (2) Dans la voie alterne, activée par différents germes, C3 est clivé en C3a et C3b soluble capable de fixer le facteur B. Le facteur D clive le facteur B en Bb et Ba et forme la convertase alterne (C3bBb). (3) La voie effectrice est activée par la fixation des fragments C3b à la membrane conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire par clivage de C5 en C5a et C5b. Cette dernière forme alors le complexe C5b678. La liaison du facteur C9 au complexe entraîne son changement de configuration et son insertion dans la membrane plasmique grâce à l'exposition d'une région hydrophobe, formant un canal qui perméabilise et altère la fonction de la cellule.

mobilisée [77]. Ainsi, Le donneur et le receveur des îlots sont toujours adaptés au groupe sanguin ABO, mais la compatibilité pour le CMH est difficile, en particulier quand les donneurs sont multiples.

#### II.2.b.v Auto-immunité, complément et IBMIR

Le succès de l'allogreffe d'îlots est inversement corrélé avec la présence d'anticorps dirigés contre le CMH étranger préexistants à la greffe [78]. Cependant, chez les patients DT1, les auto-anticorps se lient aux cellules  $\beta$  des îlots et sont capables de fixer le complément humain [79]. Ainsi, les patients présentant des taux élevés d'auto-anticorps avant la transplantation n'atteignent pas une normo-glycémie post-transplantation [80]. L'activation du complément est démontrée par l'augmentation de la concentration circulante des protéines du complément chez les patients transplantés d'îlots pancréatiques [56].

#### II.2.b.vi IBMIR et cellules de l'immunité innée

La réponse immune innée s'installe dans l'heure suivant l'injection des îlots. L'activation des plaquettes et l'activation du complément sont suivies d'une infiltration des îlots par les neutrophiles et les macrophages. Les lymphocytes B et T ne sont pas visibles à ce stade.

Les neutrophiles sont impliqués dans la réaction précoce IBMIR. En effet, l'activation des plaquettes induit l'exposition à leur surface de la P-sélectine, qui se lie au PSLG-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) neutrophilique [81]. En outre, l'activation des cellules endothéliales portales favorise la production du PAF (facteur d'activation plaquettaire), qui est un facteur chimiotactique puissant des neutrophiles [82].

Les macrophages jouent un rôle essentiel dans l'IBMIR et conduisent à la destruction des îlots pancréatiques. Le stress d'isolement et d'hypoxie favorise la production et la sécrétion des MCP-1 par les îlots humains et porcins [83]. Le MCP-1 est un puissant chimio-attracteur pour les macrophages. Des études ont montré l'accumulation de macrophages à la surface des capsules contenant des cellules d'îlots néonatales porcines [84]. De plus, les TLRs sont également des signaux importants pour l'activation des macrophages dans les xéno greffes d'îlots de porc. Une surexpression de TLRs a été observée sur les macrophages exposés aux îlots porcins, amplifiant ainsi l'inflammation et la destruction d'îlots [85]. Dans le modèle d'allogreffe d'îlots de rat, l'inactivation des cellules de Kupffer (cellules macrophagiques du foie) par le Clodronate, conduit à leur déplétion à long terme, ce qui permet de prolonger de manière significative la survie des allogreffes d'îlots [86].

Dans la xénotransplantation de porcs à humains, les cellules NK du receveur favorisent la lyse des cellules cibles lymphoïdes porcines mais pas celle des cellules porcines d'îlots néonataux (CPIN). Cette étude suggère que les CPIN pourraient être une source intéressante pour la xénotransplantation d'îlots en contournant l'immunité innée médiée par les cellules NK [87]. L'utilisation d'un anticorps monoclonal contre CXCR3, qui est un récepteur exprimé par les NK et cible les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11, prolonge la survie des allogreffes d'îlots ou cardiaques, suggérant que les cellules NK peuvent être impliquées dans le rejet d'allogreffe d'îlots [88]. En effet, le recrutement des DCs du donneur dans les organes lymphoïdes du receveur est favorisé par les chimiokines du receveur [89]. Des études ont prouvé que l'expression de CCR7 sur les DCs contribue au recrutement de DC du receveur au site du greffon, et l'inactivation de CCR7 conduit à un défaut de migration de DCs et prolonge la survie des greffes d'îlot [90].

## II.2.c Conditions favorisant l'IBMIR

### II.2.c.i Les conditions liées au donneur et au prélèvement

#### ❖ L'orage cytokinique du pancréas du donneur

Lors de la mort cérébrale, les cellules immunitaires sont mobilisées et des médiateurs inflammatoires sont produits dans le pancréas du donneur, entraînant l'apoptose des cellules  $\beta$ . En effet, plusieurs rapports ont documenté des mauvais résultats de la transplantation associés par l'élévation systémique des cytokines inflammatoires, connue sous le nom d'«orage de cytokines», et est due en partie aux changements hémodynamiques et métaboliques qui surviennent après la mort cérébrale du donneur [91]. Une étude dans un modèle de rat en mort cérébrale a montré que l'injection du sodium sivelestat, un inhibiteur de l'élastase sécrété par les neutrophiles, augmente le rendement de purification des îlots, et protège la fonction des îlots [92]. Ces données confirment l'importance des cellules de l'immunité innée du donneur sur la qualité du greffon.

#### ❖ L'ischémie, début de l'hypoxie insulaire

Les îlots sont soumis à des conditions hypoxiques dès le début de l'ischémie jusqu'à la revascularisation du greffon. Une étude chez l'homme a montré qu'un temps d'ischémie froide supérieure à 8 heures entraîne un rendement d'isolement faible et une diminution de la fonction des îlots [93]. Ces données sont en accord avec les mécanismes moléculaires de la réponse hypoxique. En effet, chez le rat, l'hypoxie active la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, induit la

transcription d'iNOS et augmente l'expression du MCP-1, entraînant l'apoptose des îlots pancréatiques encapsulés mis en culture [94].

#### II.2.c.ii Les conditions liées au receveur

##### ❖ L'hypoxie intra-portale

Comme toute transplantation d'organes, les îlots subissent des lésions par IR. Ainsi, lorsque des îlots isolés sont infusés dans la circulation sanguine, plusieurs produits cytotoxiques sont produits en raison du métabolisme de l'oxygène, qui est catalysé par la xanthine oxydase [95]. L'activation de cette enzyme entraîne la formation de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène, qui peut interagir avec des radicaux de fer et de cuivre libres pour produire des ROS cytotoxiques [96]. Les ROS peuvent induire la mort cellulaire en endommageant et en dégradant les protéines, les lipides et les acides nucléiques et en activant les voies inflammatoires du NF- $\kappa$ B. Les cellules  $\beta$  des îlots sont plus vulnérables aux attaques par les ROS en raison de leur faible expression d'antioxydants, y compris la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase [97]. En effet, l'augmentation de l'expression d'antioxydants cellulaires et le traitement avec des antioxydants exogènes sont capables de protéger les îlots dans un modèle de culture [98].

#### II.2.d Stratégies de contrôle de l'IBMIR

Les approches expérimentales et cliniques utilisées pour limiter la réaction IBMIR ciblent l'inflammation, la coagulation et la cascade de complément.

##### II.2.d.i Contrôle de l'inflammation

L'utilisation de l'anti-TNF- $\alpha$  Etanercept fait actuellement partie du traitement de post-greffe d'îlots pancréatiques. Les essais cliniques qui lui sont associés ont permis de passer d'environ de 40% à 60% le nombre de patients insulino-indépendants à 5 ans [99]. Des études expérimentales ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur à l'IL-1 $\beta$  (IL-1Ra) améliore la greffe d'îlots injectés sous la capsule rénale chez les souris. Une autre étude, chez la souris, a mis en évidence que l'association de l'IL-1Ra avec l'Etanercept a amélioré le succès du greffe des îlots sous la capsule rénale, par rapport à l'Etanercept seul [100].

La recrutement et l'infiltration des macrophages dans les îlots en réponse aux cytokines et aux chimiokines altèrent la structure et la fonction des îlots. En effet, l'utilisation d'AOP-RANTES, un inhibiteur du récepteur à la chimiokine CCR5 diminue *in vitro* la migration des macrophages ainsi que la sécrétion de cytokines [101]. De plus, une étude a montré que l'utilisation de l'alpha

1-antitrypsine, un inhibiteur de la sérine protéase, améliore le succès de la greffe d'îlots en réduisant la réponse immunitaire innée par répression des voies de signalisation associées à la production de cytokines et de molécules pro-inflammatoires dans un modèle murin de greffe syngénique [102]. Dans une autre étude, l'utilisation de withaferin A, un composé anti-inflammatoire et un puissant inhibiteur de NF- $\kappa$ B, améliore de manière significative la survie du greffon dans un modèle syngénique de transplantation d'îlots chez les souris [103].

#### II.2.d.ii Contrôle de la coagulation

Dans la procédure standard, les îlots sont injectés avec un milieu hépariné, pour limiter à la fois la réaction IBMIR mais aussi pour limiter le risque de thrombose lié à la transplantation. En effet, l'héparine, un inhibiteur naturel des sérines protéases impliqués dans la coagulation, empêche l'activation des enzymes de la coagulation. Elle réduit également l'activité chimiotactique des îlots et donc la migration macrophagique [101].

Ainsi, l'utilisation d'îlots frais, qui expriment moins de TF que les cellules d'îlots cultivées, diminue les effets néfastes d'IBMIR et augmente la fonctionnalité du greffon [104].

De plus, une étude a montré que l'utilisation de Mélagatran, un inhibiteur spécifique de la thrombine, a inhibé non seulement la cascade de la coagulation, mais aussi la consommation plaquettaire et l'infiltration des leucocytes et par contre augmente la survie des îlots humains isolés [105]. Une autre étude a montré que l'utilisation de la protéine C activée, un anticoagulant, a également bloqué l'IBMIR dans un modèle de transplantation d'îlots chez les souris, en réduisant la libération de plusieurs cytokines inflammatoires [81].

Enfin, le prétraitement des îlots par le nicotinamide bloque la cascade de coagulation en empêchant l'expression de TF par les îlots et en améliorant le rendement de purification des îlots pendant la procédure d'isolement [106]. De plus, le nicotinamide inhibe la chimiotactique des monocytes en bloquant la sécrétion de MCP-1 [107].

#### II.2.d.iii Contrôle du système de complément

La cascade du complément peut être inhibée de façon locale ou générale. Afin de limiter les effets secondaires du blocage systémique, des îlots modifiés génétiquement ont été développés dans les modèles expérimentaux, qui peuvent inhiber le complément localement [108].

Différents inhibiteurs dirigés contre le récepteur 1 du complément ont été mis en évidence comme le C5aIP (C5a inhibitory peptid), le sCR1 et le TP10. En effet, l'utilisation de C5aIP a permis d'améliorer l'efficacité de la greffe en atténuant le cross-talk entre le système du



complément et la coagulation [109]. De plus, Bennet et ses collaborateurs ont pu prévenir la destruction précoce des cellules des îlots en ajoutant le sCR1 à l'héparine [109].

Une étude a montré l'utilisation de dextran sulfate qui module l'activation du complément afin de limiter l'IBMIR. Ce dernier inhibe le composant C1 du complément [110]. De plus, Le dextran sulfate module également l'activité des cellules dendritiques et la migration des granulocytes [111].

## **II.3 Impact de l'IR sur la fonction du greffon à long terme**

### **II.3.a IR et dysfonction du greffon**

L'ischémie/ reperfusion induit une réponse immunitaire adaptative qui implique les lymphocytes T. Les mécanismes par lesquels les LT spécifiques d'antigènes sont activés au cours de l'inflammation stérile ne sont pas bien étudiés. Des études ont démontré que les lésions d'IR induisaient une infiltration à long terme du greffon par des lymphocytes [112]. Dans une étude intéressante, Chalasani et al. ont comparé le devenir de greffons cardiaques allogéniques chez des souris nues et reconstituées avec des lymphocytes activés transférés immédiatement (greffon avec lésions d'IR fraîches) ou à distance (lésions cicatrisées) de la transplantation. Les chercheurs ont observé que seule la reconstitution immédiate était suivie du rejet aigu des greffons [113]. Ces résultats montrent que la réponse inflammatoire stérile du système immunitaire inné aux lésions d'IR déclenche une réponse adaptative en favorisant le homing des lymphocytes effecteurs dans le greffon.

Une autre étude a montré la localisation des LT dans la zone limite de l'infarctus cérébral après 24 heures d'IR cérébrale et s'accumulent jusqu'à le 14ème jour après reperfusion. D'autres études sur des souris nues ont montré un rôle déterminant délétère des LT dans l'IR rénale et cardiaque.

De plus, l'activation des cellules T se traduit également par des changements immunologiques et morphologiques à long terme après les lésions d'IR rénale. Six semaines après l'ischémie rénale murine, une altération morphologique a été associée à l'accumulation *in vitro* des neutrophiles et des LT CD4 + [114].

Plusieurs études indiquent que les LT CD8+ et les LT CD4+ participent au rejet de l'allogreffe des îlot. En effet, Diamond et al. ont montré que les LT CD8+ sont essentielles à la destruction finale des allogreffes d'îlots dans les animaux immuno-spécifiques [115].

### II.3.b Les nouvelles stratégies immunologiques du contrôle du rejet

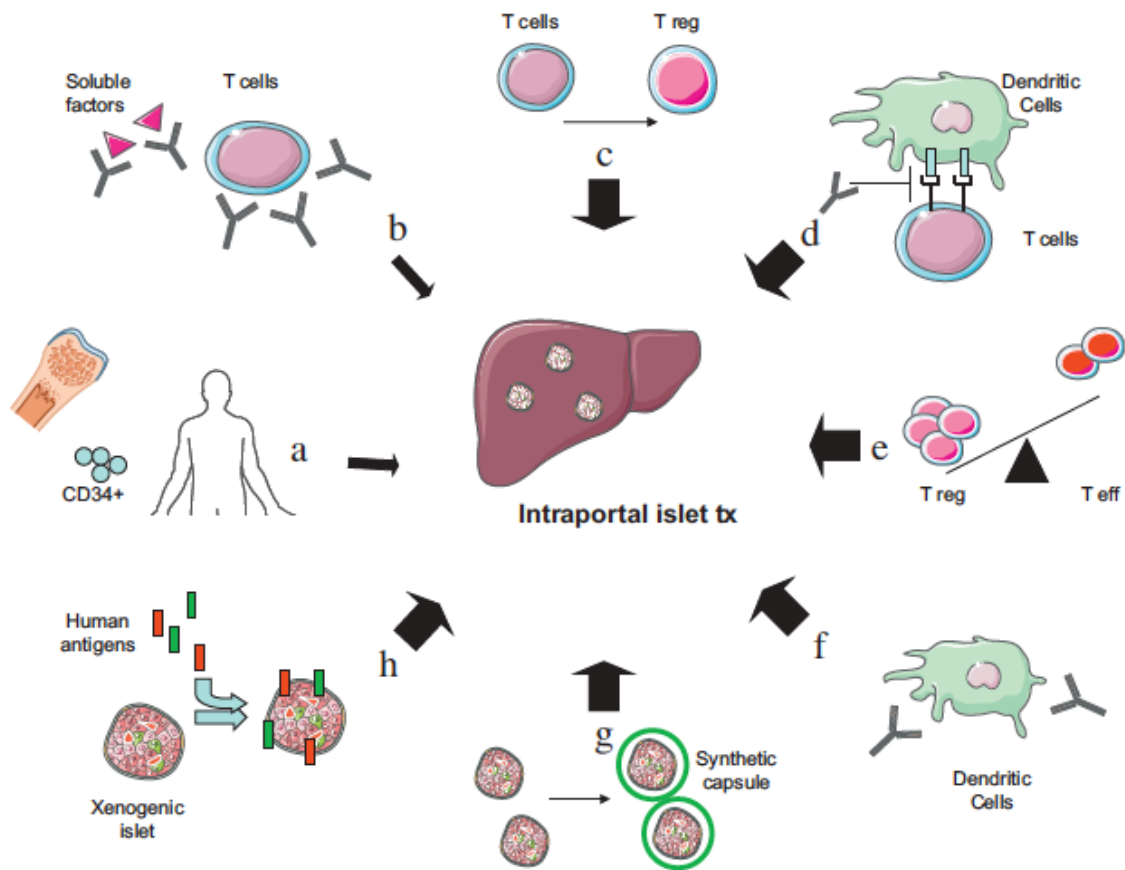
La perte de la fonction des îlots et les effets secondaires liés à l'immunosuppression chronique limitent le succès de la greffe d'îlots. Par conséquent, de nouveaux protocoles immuno-régulateurs ont été mis au point, comme alternative à l'immunosuppression. Plusieurs approches ont été testées dans des modèles précliniques, et certains ont été soumis à une évaluation clinique (**Figure 9**).

#### II.3.b.i Les cellules souches hématopoïétiques

L'utilisation de cellules souches hématopoïétiques (cellules CD34+) a été proposée pour la transplantation d'îlots pour leur potentiel d'induction du chimérisme, lorsqu'elle est utilisée de manière allogénique avec les receveurs et pour leurs propriétés immunosuppressives. Le chimérisme est le fait que des cellules génétiquement différentes cohabitent dans un même organisme. Le taux de chimérisme est nécessaire pour protéger les greffons entre les modèles ; notamment, un chimérisme mixte de plus de 30% était nécessaire pour induire la tolérance dans la transplantation d'îlots chez les souris NOD (Non-obese diabetic) [116]. Plusieurs efforts ont été faits pour faciliter la greffe de la moelle osseuse tout en maintenant une faible toxicité. Les molécules de déplétion des lymphocytes T et de blocage de co-stimulation, en protégeant les cellules de moelle osseuse transférées du rejet, sont efficaces pour promouvoir un niveau élevé de chimérisme et permettre une fonction à long terme des îlots allogéniques chez les souris NOD [117]. En outre, il a été démontré que les cellules souches hématopoïétiques possèdent de puissantes propriétés immunosuppressives et peuvent en théorie protéger la greffe d'îlots pancréatiques des lymphocytes T cytotoxiques du receveur, et prolongeant ainsi la survie du greffon [118]. Sur la base de ces évidences, l'utilisation de cellules souches hématopoïétiques pour induire une tolérance vis-à-vis de la transplantation d'îlots et potentiellement pour le DT1 [119] représente un outil intéressant.

#### II.3.b.ii Ciblage des cellules dendritiques

Les DCs sont les principaux acteurs dans le contexte du rejet, au moins pour l'activation des lymphocytes T naïfs. Les DCs de donneurs et de receveurs ont été bien caractérisés pour leur capacité à activer la réponse immunitaire adaptative par la présentation directe et indirecte d'alloantigènes [120]. Le ciblage des DCs de donneurs dans la transplantation d'îlots est absolument non-invasif et les résultats obtenus avec la déplétion des DCs des îlots de donneurs semblent intéressants [89]. Des études plus pertinentes sur le plan clinique sont requises.



**Figure 9. Différentes approches immunologiques tentées pour améliorer la fonction des îlots [121].**

(a) Cellules CD34<sup>+</sup> du donneur et perfusion d'îlots. (b) L'utilisation de nouveaux anticorps monoclonaux pour cibler des lymphocytes T spécifiques du donneur ou des facteurs solubles. (c) l'induction des Tregs. (d) Ciblage des voies de co-stimulation pour inhiber l'interaction des DCs et des lymphocytes T. (e) basculer l'équilibre entre les cellules régulatrices et effectrices. (f) Ciblage des DCs du donneur. (g) Encapsulation synthétique de l'îlot. (h) Génération d'animaux humanisés avec introduction d'antigènes immunitaires stratégiques importants des cellules des îlots.

### II.3.b.iii Les anticorps spécifiques anti-CD3

L'utilisation de l'anti-CD3 a été démontré son efficacité pour induire une tolérance dans certains modèles non auto-immuns de transplantation d'allogreffe [122], pour reverser l'auto-immunité chez les souris NOD [123] et pour ralentir la progression vers le diabète permanent chez les humains atteints de diabète récent [124]. Cependant, bien que le traitement avec un anti-CD3 soit efficace dans des modèles non auto-immuns, il n'a pas montré son efficacité à long terme pour la greffe d'îlots allogéniques chez des souris NOD diabétique. Une nouvelle version humanisée non mitogénique d'OKT3 (anti-CD3), qui ne favorise pas la libération de cytokines, a montré des résultats prometteurs [125].

### II.3.b.iv Ciblage des récepteurs d'IL-8

Une autre voie importante qui a été ciblée avec succès dans la transplantation d'îlots est l'axe IL-8/CXCR1-CXCR2 [126]. Il a été démontré que l'IL-8 était impliquée dans les événements inflammatoires post-transplantation. Le blocage de ses 2 récepteurs (CXCR1 et CXCR2) a amélioré la survie des îlots transplantés. Piemonti et ses collaborateurs ont publié les résultats d'une étude clinique basée sur l'utilisation de l'inhibiteur CXCR1/2 nommé Reparixin [126]. Ils ont observé une amélioration du contrôle glycémique, une diminution des besoins en insuline et des niveaux plus élevés de C-peptide chez les sujets traités par la reparixine par rapport au groupe témoin non traité. Ces résultats suggèrent que le ciblage de la signalisation d'IL-8 pourrait être une option importante pour améliorer les résultats de transplantation d'îlots.

### II.3.b.v L'induction de LT régulateurs (LTregs)

Les LTregs sont essentiels pour le maintien de l'homéostasie du système immunitaire, en empêchant l'activation des cellules auto-réactives. Plusieurs cellules présentent des caractéristiques de régulation, mais l'intérêt a porté sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/ CD25<sup>+</sup>/ Foxp3<sup>+</sup> et les CD4<sup>+</sup>/ CD25<sup>+</sup>-IL10<sup>+</sup> [127]. Les Tregs ont été utilisées pour l'induction de tolérance en transplantation [128]. Certains protocoles sont conçus pour provoquer une expansion spécifique et directe du compartiment Tregs. La combinaison de la rapamycine et de l'IL-10, dont les études ont démontré que l'expansion sélective des Tregs dans des modèles in vitro et dans des modèles de diabète ou de transplantation, est particulièrement intéressante [129]. Cependant, à ce jour, ces résultats ont été confinés à un contexte non auto-immun. Dans un certain nombre de publications, la stabilité de l'expression de Foxp3 par les Tregs a été un argument de discussion dans le contexte de l'auto-immunité et de l'inflammation. La co-

expression de CD49b et LAG-3 a été récemment décrite pour identifier les Tregs murins et humains de type 1 [130], et ces nouveaux marqueurs peuvent fournir de nouvelles perspectives dans la caractérisation des fonctions de Tregs.

La réponse inflammatoire ou IBMIR s'est révélée d'être une cause majeure de l'échec de la greffe d'îlots pancréatiques à la fois dans des modèles animaux expérimentaux et dans des études cliniques. L'implication de ces réactions inflammatoires et du système immunitaire inné initialement et adaptatif secondairement affectent la survie du greffon mais surtout entraînent un dommage aux cellules endothéliales intra-insulaire, et également aussi aux cellules endothéliales portales du site d'implantation hépatique. La survie du greffon est dépendante de plusieurs facteurs importants parmi eux la revascularisation post-transplantation des îlots pancréatiques. Les cellules endothéliales contribuent au phénomène de revascularisation d'où leur importance dans ce mécanisme. En plus, l'utilisation de certains médicaments immunosuppresseurs exercent un effet inhibiteur sur la revascularisation des îlots pancréatiques isolés [131] et donc sur le succès de l'allo-transplantation des îlots.

Toutes ces données soulignent l'importance de l'endothélium en tant qu'acteur nécessaire et cible thérapeutique, en particulier dans la transplantation d'îlots. Nous devons donc mieux comprendre l'endothélium vasculaire et celui des îlots et sa signalisation ainsi que son rôle dans la physiologie et la pathologie des îlots afin d'optimiser le succès de la greffe d'îlots.

## *Chapitre III*

---

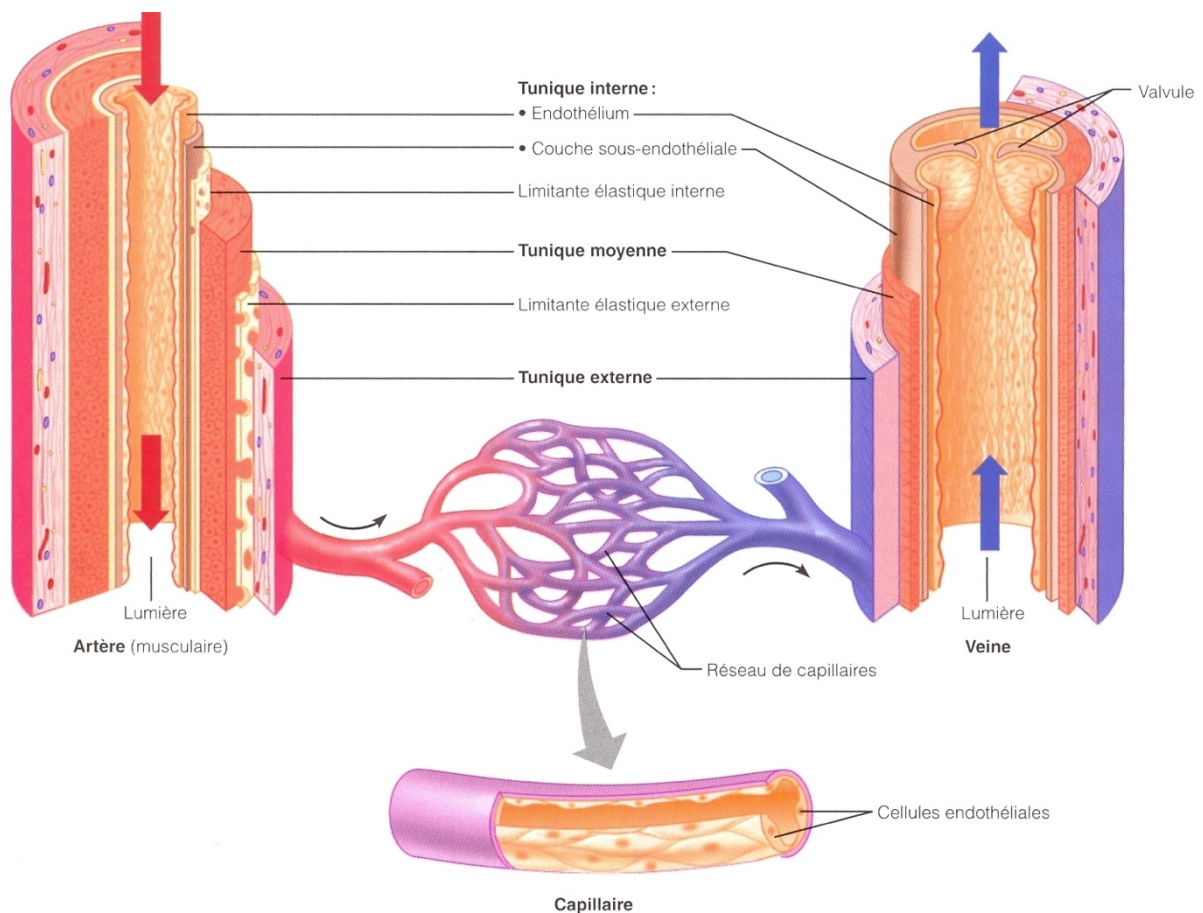
## III L'endothélium : structure importante pour la survie et la fonction des îlots

### III.1 Définition et structure générale de l'endothélium

En 1865, l'embryologue Wilhelm Hirsch a utilisé le mot endothélium pour la première fois pour définir la couche cellulaire couvrant la lumière du système vasculaire et les cavités internes du corps (**Figure 10**) [132, 133]. Il constitue un territoire spatialement dispersé qui s'étend dans tout le corps humain. L'endothélium forme une paroi semi-perméable constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (ECs) [134] qui sont en contact direct avec le sang et forment une barrière sélective entre la lumière du vaisseau et les tissus environnants. Les ECs contiennent des systèmes de transport multiples pour les acides aminés et le glucose [135]. Les ECs sont structurellement hétérogènes, et sont classées en trois types : 1) l'endothélium continu qui se trouve dans la plupart des artères, des veines et des capillaires du cerveau, de la peau, des poumons, du cœur et des muscles. Les ECs sont jointives et maintenues par des jonctions étroites à la membrane basale continue. 2) L'endothélium fenestré est aussi relié à une membrane basale continue mais est caractérisé par l'existence de pores trans-cellulaires de 50 à 60 nm de largeur. 3) L'endothélium discontinu qui est associé à une membrane basale mal structurée, est caractérisé par de grandes fenestrations de 100 à 200 nm de largeur. Ce type d'endothélium se trouve en grande partie dans le foie, la rate et la moelle osseuse [136]. Les ECs assurent à la fois des fonctions métaboliques et de synthèse, indispensables à l'homéostasie vasculaire [145]. Elles expriment ou sécrètent de produits matriciels, des facteurs anticoagulants ou anti-thrombotiques, des activateurs de la fibrinolyse, des facteurs de croissance comme le facteur de croissance de l'insuline, des médiateurs inflammatoires et qui sont impliquées dans le contrôle de tonus vasculaire par le biais de médiateurs solubles ou de l'expression de différents récepteurs d'agents vasoconstricteurs ou dilatateurs (**Figure 11**) [137]. Les ECs sont également une surface d'interaction avec les cellules sanguines circulantes. Ainsi, elles favorisent le rolling des leucocytes et des plaquettes par l'expression de molécules d'adhésion comme VCAM-1, PECAM, ou la PSL-G-1 [138], notamment en conditions inflammatoires.

### III.2 La structure et la fonction de l'endothélium des îlots

Les ECs des îlots pancréatiques ont un rôle essentiel surtout dans les premiers stades de développement par leurs signaux paracrines qui induisent une expression de l'insuline dans l'endoderme [139].



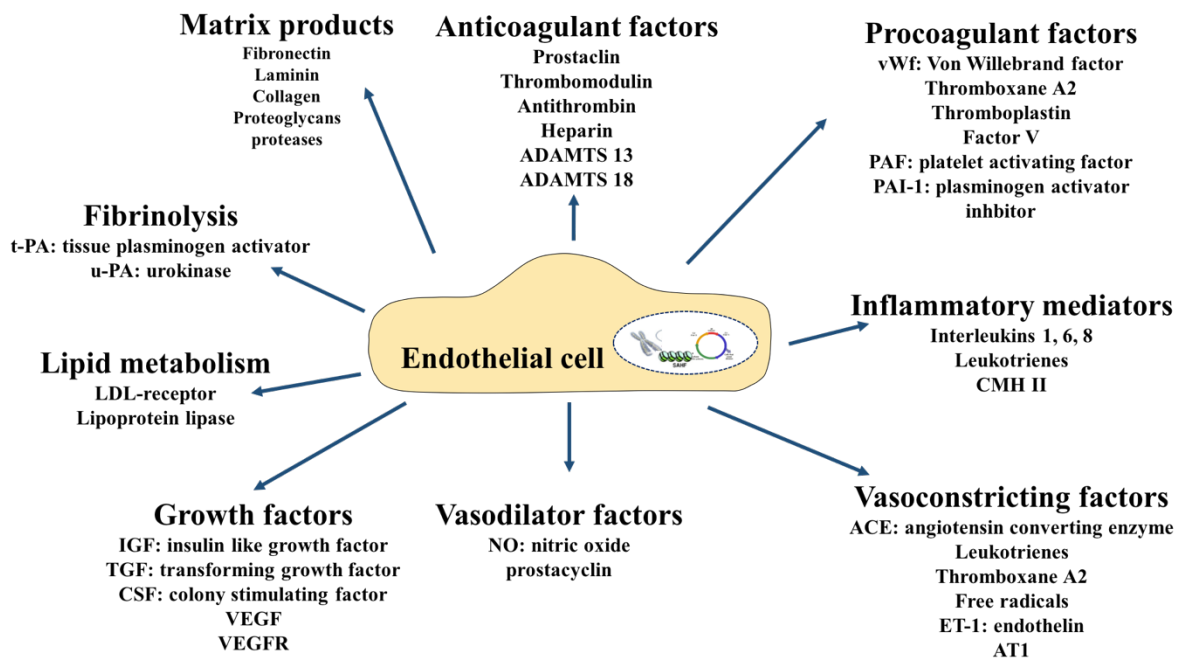
**Figure 10. Représentation schématique de la structure des vaisseaux sanguins et ses composants.**

(Adapté d'après Wayne W. La Morte, MD, PhD, MPH, Boston University School of Public Health)

*L'endothélium est la couche cellulaire bordant la lumière des vaisseaux. La paroi des vaisseaux sanguins est constituée de trois couches contenant les cellules musculaires lisses et de l'élastine, qui sont l'intima, le média et l'adventice.*

*L'intima (ou la tunique interne) est une couche monocellulaire maintenue par les tissus conjonctifs et la lame élastique intérieure. Le média (ou la tunique moyenn)e est la couche médiane musculaire des artères et des veines, composés de cellules musculaires lisses, de tissu conjonctif élastique. Elle est séparée de l'adventice par la lame élastique externe et constitue la couche la plus épaisse dans les artères. Le rôle principal du média est la régulation du tonus vasculaire en contrôlant la vasoconstriction et la vasodilatation. L'adventice (ou la tunique externe) est la couche la plus épaisse dans les veines et la couche la plus externe des vaisseaux sanguins. Elle est constituée de collagène, d'élastine, de fibroblastes, de macrophages, des terminaisons nerveuses et de vasa vasorum, qui sont de petits vaisseaux sanguins qui assurent la vascularisation de la paroi des artères et des veines.*





**Figure 11. Les différentes fonctions métaboliques et de synthèse des cellules endothéliales.**

L'endothélium des îlots agit également sur les fonctions des cellules  $\beta$  adultes et produit un certain nombre de facteurs de croissance ainsi que des substances angiogéniques [140]. La vascularisation des îlots est cruciale dans l'homéostasie du glucose sanguin. En outre, les ECs d'îlots maintiennent les cellules  $\beta$  pancréatiques à une pression en oxygène importante qui est essentielle à leur fonctionnement [141].

### III.2.a Morphologie et vascularisation des îlots

Les îlots pancréatiques sont fortement vascularisés et reçoivent 10% de l'écoulement sanguin pancréatique alors qu'ils ne représentent que 1-3% de la masse tissulaire [140]. Les îlots contiennent des capillaires fenestrés, qui constituent 8% à 10% du volume des îlots, et sont organisés en un réseau, apparaissant ainsi sous forme de lobules sur la représentation de l'îlot en coupe dans la figure 3. Le nombre de fenestrations est environ 10 fois plus élevé que dans les capillaires pancréatiques exocrines. Les petits îlots (<100  $\mu\text{m}$ ) sont incorporés dans les lits micro-capillaires du pancréas exocrine, tandis que les îlots plus gros sont alimentés jusqu'à trois artérioles. La vascularisation est cruciale pour le développement du pancréas endocrine, et est dépendante en grande partie du facteur de croissance VEGF chez l'adulte [142]. Cette vascularisation est importante pour l'homéostasie du glucose car elle assure (i) un approvisionnement en oxygène nécessaire aux besoins des cellules  $\beta$ , (ii) un relargage des hormones sécrétées dans la circulation et permet (iii) une régulation du fonctionnement des îlots et donc un contrôle de la glycémie par la sécrétion des différentes hormones pancréatiques [143].

### III.2.b La structure des micro-vaisseaux de l'îlot

Les îlots pancréatiques de Langerhans contiennent trois types de micro-vaisseaux : (i) La majorité des îlots ont trois artérioles afférentes. Ces artérioles contiennent une couche de cellules musculaires lisses vasculaires (VMSC) qui réagissent aux hormones et aux substances vaso-actives sécrétées localement par l'endothélium ; (ii) Les capillaires d'îlots sont cinq fois plus denses que ceux des tissus exocrines du pancréas. La structure des capillaires est constituée d'un tube de EC unique entouré d'une membrane basale. Cela explique le fait que les capillaires ne possèdent pas de propriétés régulatrices en matière de flux sanguin et (iii) Les veines qui drainent les îlots, et dont l'anatomie est différente selon les espèces et selon la taille des îlots. Le drainage veineux forme 1 à 4 veines plus grandes qui sont reliées aux veines lobulaires et enfin à la veine porte [144].

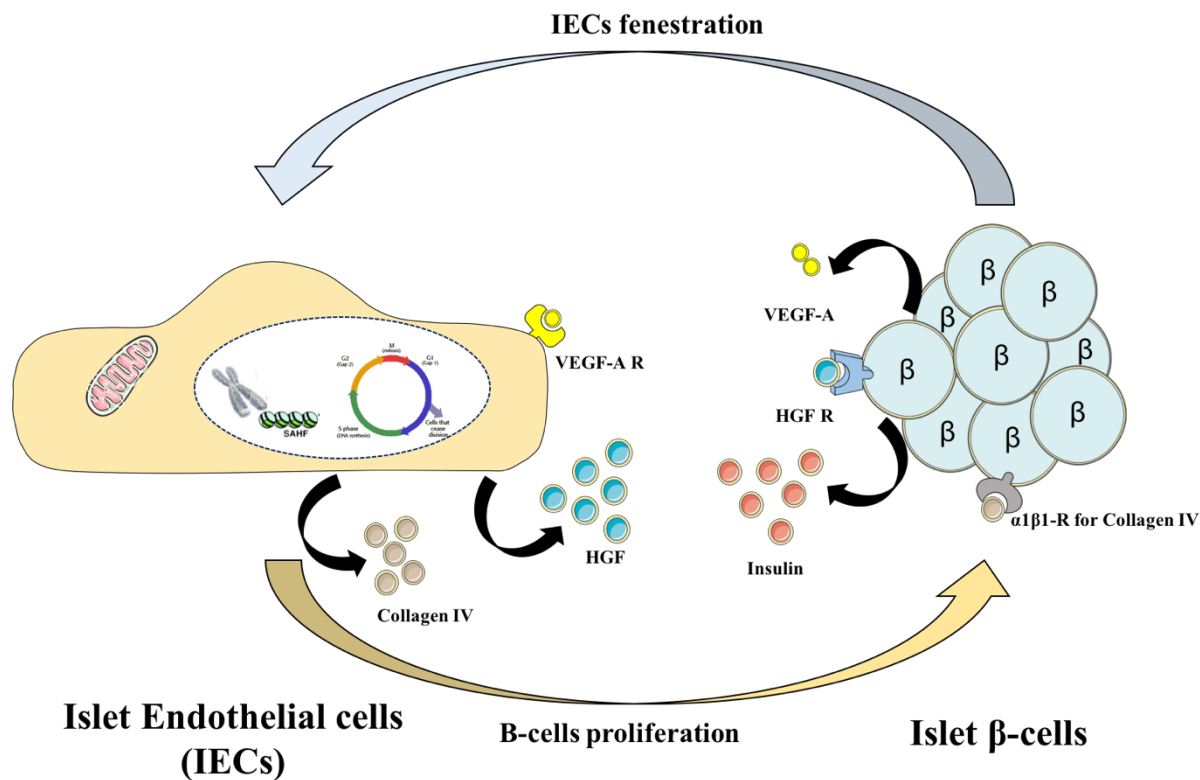
Chez l'homme, une structure appelée système insulino-acinar portal est formée lorsque les capillaires d'îlots conduisent le sang aux capillaires entourant les acini en raison de leur emplacement prédominant dans les lobules. À l'inverse, chez les souris, une autre structure appelée système insulo-veineux est formée lorsque le sang veineux influencé par l'emplacement inter lobulaire des îlots est recueilli par les veines inter lobulaires [145].

### III.2.c Impact des cellules endothéliales sur la survie et la fonction des îlots

Les ECs intra-insulaires ont de nombreuses fonctions métaboliques et de barrière. Elles expriment le CD31 et le facteur vWF, forment des jonctions serrées, internalisent les LDL (low density lipoprotein) acétylées et répondent à la stimulation inflammatoire par l'expression de la E-sélectine et la P-sélectine [146]. Chez les humains, les ECs intra-insulaires sont les seuls types de cellules micro-vasculaires exprimant des taux élevés d'inhibiteur de protéinase  $\alpha$ -1 aux jonctions cellulaires [146], ce qui semble les maintenir dans un état non prolifératif. Dans les capillaires et les artérioles, elles sécrètent des molécules telles que le monoxyde d'azote (NO), qui contribue à la régulation de la masse de cellules  $\beta$  dans les îlots en agissant sur les protéines impliqués dans l'exocytose de l'insuline [147], d'endothéline-1 (ET-1) et d'autres médiateurs qui affectent les VSMC [144]. En plus de son rôle dans l'oxygénation et l'apport des nutriments aux cellules endocrines, l'endothélium d'îlots participe principalement au passage rapide trans-endothélial de l'insuline sécrétée dans la circulation facilitant le contrôle rapide de la glycémie [139]. Cette fonction est prouvée par des études réalisées sur des souris avec invalidation sélective du VEGF-A pancréatique. Elle provoque une perte des fenestrations endothéliales et une altération du taux de glycémie [139]. En outre, les cellules endothéliales d'îlots stimulent également la prolifération des cellules  $\beta$  par la sécrétion du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) en réponse à l'insuline et au VEGF-A sécrétées par l'îlot [148]. Une autre étude de Kaido et collaborateurs a suggéré que l'endothélium d'îlot pourrait sécréter le collagène IV, ce qui potentialise la sécrétion d'insuline via l'interaction avec son récepteur, l'intégrine  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 exprimé par cellule  $\beta$  [149] (**Figure 12**).

### III.3 Les fonctions de l'endothélium

Les réponses inadaptées des ECs ont été impliquées dans de nombreuses maladies. Elles peuvent être le résultat d'une lésion, d'un dysfonctionnement ou d'une activation [135]. L'endothélium joue un rôle principal dans la modulation du tonus vasculaire. La régulation du tonus est contrôlée par la sécrétion de stimuli biomécaniques et chimiques afin de maintenir l'équilibre du statut contractile des VSMC. Il sécrète sélectivement de nombreux médiateurs



**Figure 12. Schéma des voies possibles de communication cellulaire entre les ECs intra-insulaires et les cellules  $\beta$**

*Les cellules  $\beta$  sécrètent l'insuline et le VEGF-A qui est responsable de la fenestration de la EC et de la vascularisation élevée du pancréas endocrine. Le VEGF-A et l'insuline sécrétés stimulent la libération du HGF par les EC qui, à leur tour, stimulent la prolifération des cellules  $\beta$ . En outre, l'endothélium d'îlot pourrait sécréter le collagène IV, qui potentialise ensuite la sécrétion d'insuline via l'interaction avec son récepteur, l'intégrine  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 sur la cellule  $\beta$ .*

vasodilatateurs et vasoconstricteurs [150] (**Figure 13**). En outre, il joue un rôle dans le contrôle de la cascade de la coagulation, la formation de caillots de sang, la perméabilité, le trafic de leucocytes, l'angiogenèse et l'immunité [136]. Parmi ces nombreux médiateurs, le monoxyde d'azote, l'angiotensine II et les ROS sont des acteurs majeurs des réponses physiologiques et pathologiques dépendantes de l'endothélium.

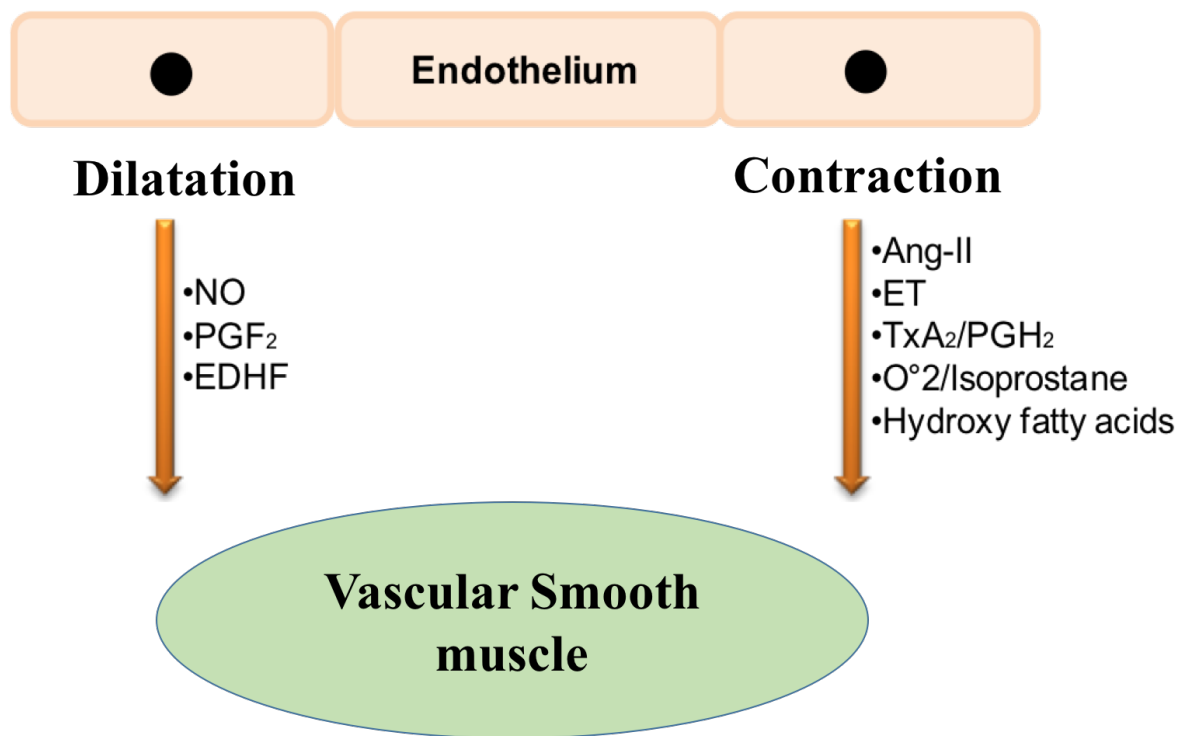
### III.3.a Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule cellulaire essentielle de la signalisation impliquée dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques [151]. C'est le principal vasodilatateur physiologique sécrété par l'endothélium avec une courte demi-vie de quelques secondes dans le sang, en particulier dans les artères [152]. Le NO est produit par la NO synthase endothéliale (eNOS) à partir de l'acide aminé cationique L-arginine. L'enzyme eNOS est activée par le calcium intracellulaire en réponse à des modifications de la distension mécanique (contrainte de cisaillement) causées par le flux sanguin sur la paroi vasculaire ou via des processus médiés par les récepteurs [153]. Directement après sa libération, le NO endothélial active la guanylate cyclase soluble (GCs) dans les cellules musculaires lisses, en convertissant le GTP en cGMP. Ce processus par le biais de kinases, réduit la phosphorylation des chaînes légères de la myosine, nécessaire à la contraction [135].

En plus de son rôle vasoprotecteur, le NO inhibe l'agrégation plaquettaire, l'adhésion leucocytaire et a des effets anti-apoptotiques et anti thrombotiques [151].

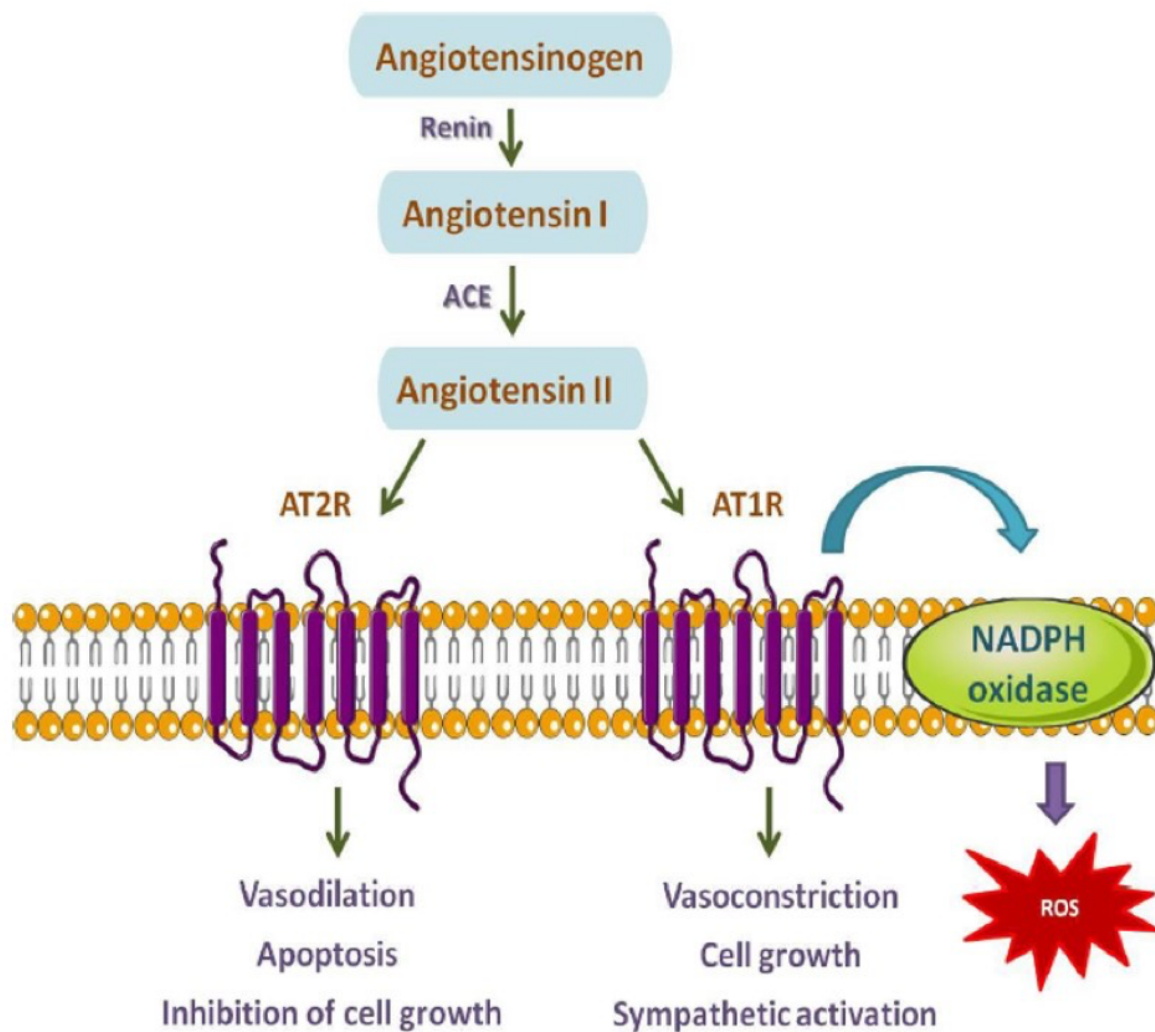
### III.3.b L'Angiotensine II : un élément clé de la fonction et de la survie des ECs

L'octapeptide Angiotensine II (Ang II) est une hormone vasoconstrictrice puissante du système rénine-angiotensine (RAS) qui est formée suite à la conversion d'Ang I en Ang II par l'enzyme de conversion d'Angiotensine I (ACE). L'Ang II est une hormone multifonctionnelle : en plus de sa capacité à provoquer une vasoconstriction, l'Ang II est impliqué dans des fonctions physiologiques importantes comme la croissance, la sécrétion d'hormone et les activités neuronales [154]. Le RAS est impliqué dans différentes pathologies vasculaires telles que l'hypertrophie ventriculaire gauche, le remodelage post-infarctus [154], l'hypertension [155] et dans des pathologies métaboliques telle la résistance à l'insuline [156]. Dans la paroi vasculaire, l'Ang II est également connue pour être un stimulant puissant pour la production de ROS par l'activation de la NADPH oxydase [157]. L'effet de l'Ang II est médié par deux récepteurs transmembranaires distincts couplés à la protéine G, les récepteurs de type 1 (AT1R) et de type 2 (AT2R) (**Figure 14**) [158].



**Figure 13. Les médiateurs biochimiques de la vasoconstriction et de la dilatation libérés par l'endothélium (Adapté d'après [159])**

*NO, monoxyde d'azote; PGI<sub>2</sub>, prostacycline; EDHF, facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium; Ang-II, angiotensine II; ET, endothéline; TxA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandine H<sub>2</sub>; O<sub>2</sub><sup>-</sup> anion superoxide .*



**Figure 14. Schéma des différentes voies et fonctions cibles du système rénine angiotensine local (RAS)**

*ACE = enzyme de conversion de l'angiotensine I; AT1R= récepteur de type 1 de l'angiotensine II; AT2R= récepteur de type 2 de l'angiotensine II. L'Ang II stimule la NADPH oxydase, via le récepteur AT1, en conduisant à la génération de ROS.*

Le récepteur AT1 exprimé dans tous les organes est impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules vasculaires [160]. À l'inverse, AT2 est fortement exprimé dans le cœur fœtal, le poumon et le foie, et serait impliqué dans la transduction de diverses voies anti-apoptotiques ou de survie [161], encore débattues.

### III.3.c Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS sont des espèces chimiquement réactives contenant de l'oxygène et produites par son métabolisme. Les ROS sont des médiateurs dans la signalisation cellulaire [162]. Ainsi, l'endothélium normal produit une certaine quantité de ROS qui agissent comme des signaux redox physiologiques [152]. Les ROS sont générés aux sites d'inflammation et aux lésions, et à de faibles concentrations ont une fonction de signalisation, participant à la régulation d'activités cellulaires importantes telles la croissance cellulaire et les réponses d'adaptation cellulaire. Cependant, la surproduction de ROS est observée dans différents contextes pathologiques tels que l'hypertension, le diabète, les maladies inflammatoires aiguës et chroniques et le vieillissement [163].

Parmi les ROS, le radical hydroxyle (OH), réagit près du site de sa formation en raison de sa forte réactivité. D'autres espèces sont moins réactives telles le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène [163].

La chaîne de transport d'électrons mitochondriaux est comme une source importante de ROS dans les cellules endothéliales dans des conditions physiologiques ou pathologiques [164]. Ainsi, les ROS, en particulier les anions superoxyde, potentialisent les réponses contractiles par la réduction de la biodisponibilité du NO, entraînant une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium [165]. En outre, les ROS peuvent nuire aux relaxations dépendantes de l'endothélium médiées par le facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF), par la réduction de l'activité des canaux de potassium dépendants du calcium (SKCa et IKCa) [166] et par la modification du passage d'EDHF des ECs aux cellules musculaires lisses à travers les jonctions myo-endothéliales [167]. De nombreuses études de réactivité vasculaire ont démontré les effets bénéfiques de traitements antioxydants sur la fonction endothéliale [168].

### III.3.d L'endothélium : le site de la coagulation

L'endothélium constitue une surface hémocompatible qui devient le site des réactions coagulantes lorsqu'une brèche vasculaire ou une inflammation importante favorise (i) l'expression du facteur tissulaire, initiateur cellulaire de la coagulation, l'expression de phosphatidylsérine favorisant l'assemblage des complexes de la coagulation et (ii) la



surexpression des molécules d'adhésions pour le recrutement des plaquettes et les leucocytes [135].

L'endothélium est aussi la surface d'interaction pour les réactions qui limitent la coagulation avec l'assemblage du complexe de la protéine C activée, et la mise en place de la fibrinolyse [138].

### **III.4 La dysfonction endothéliale**

Le terme « dysfonction endothéliale » inclut toutes les anomalies structurelles et fonctionnelles de l'endothélium dans des conditions pathologiques. En réponse à une grande variété de stimuli, l'endothélium subit des altérations phénotypiques, conduisant à une altération de la vasodilatation de l'endothélium, et favorisant un état thrombogène avec l'activation plaquettaire, la formation de thrombus, l'augmentation de la perméabilité, l'adhésion des leucocytes et la migration des monocytes dans la paroi vasculaire [169].

La dysfonction endothéliale est observée au stade précoce de la plupart des maladies cardiovasculaires [170] et est associée à l'hypertension, le diabète, l'athérosclérose, les cardiopathies ischémiques et les maladies rénales chroniques. Il a été démontré que la gravité de la dysfonction endothéliale a une valeur pronostique pour les événements pathologiques cardiovasculaires et sa détection clinique précoce peut devenir un point critique dans la prévention de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires. Parce que la production de ROS est centrale dans la dysfonction endothéliale [171], le stress oxydant a été proposé comme une cible pharmacologique dans les maladies cardiovasculaires.

L'ischémie-reperfusion provoque des altérations endothéliales, qui sont particulièrement étudiées en transplantation en raison de leur impact sur les atteintes vasculaires impliquées dans le devenir à long terme du greffon transplanté. A ce stade, l'endothélium perd ses propriétés régulatrices, qui se traduisent par des modifications des protéines impliquées dans la synthèse du monoxyde d'azote et par la réduction de la production du NO [172]. Cette perturbation entraîne l'expression de molécules d'adhésion pro-inflammatoires et pro-thrombotiques. Au moment de la reperfusion, la libération des radicaux libres endommage le tissu.

#### **III.4.a Ischémie-reperfusion et dysfonction endothéliale**

L'ischémie-reperfusion (IR) induit une dysfonction endothéliale vasculaire par de multiples mécanismes incluant la cytotoxicité causée par le changement de pH, le stress oxydant résultant de la surproduction de ROS, l'inhibition de l'eNOS et l'activation de la coagulation et du système du complément [173]. Des études menées ces dernières années ont fourni de nouvelles

informations sur les mécanismes moléculaires de la lésion d'IR endothéliale, telles que la modulation des canaux ioniques et des protéines de jonctions. Le rôle de la cytotoxicité induite par l'acidose dans la lésion endothéliale ischémique a été mis en évidence par l'activation induite par l'acidose ischémique des caspases, à savoir la caspase-12 et la caspase-3, dans les cellules endothéliales des artères coronaires [174].

Les ROS sont abondamment générés par l'endothélium vasculaire et les cellules inflammatoires durant l'IR par une réduction incomplète de l'O<sub>2</sub> dans laquelle la xanthine oxydase, la NADPH oxydase et la cyclooxygénase sont impliquées [175]. Pendant la période ischémique, l'hypoxie vasculaire provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire. Des études utilisant des cellules endothéliales en culture exposées à l'hypoxie (par exemple 2% d'oxygène pendant 24 h) ont montré une perméabilité accrue causée par des taux faibles d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) [176]. De même, les souris exposées à l'hypoxie (8% d'oxygène pendant 4-8 h) ont présenté une augmentation de l'œdème pulmonaire, et des taux élevés de cytokines [177].

#### III.4.b Stress oxydant et dysfonction endothéliale

A concentrations élevées, les ROS sont responsables des dommages cellulaires. Le stress oxydant est responsable d'une augmentation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire et de la promotion de l'adhésion des leucocytes, couplée à des altérations de la transduction du signal endothélial et des facteurs de transcription régulés par le signal redox [178, 179]. Le stress oxydant est un élément clé de la pathogenèse de l'athérosclérose. En effet, les ROS produites par les ECs, les cellules musculaires lisses ou les macrophages favorisent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL). L'internalisation des LDL oxydés par les monocytes/macrophages infiltrés dans la paroi artérielle conduit à la formation des cellules spumeuses (foam cell), caractéristiques des plaques d'athérome. De plus, les LDL oxydés activent les leucocytes qui sécrètent des cytokines proinflammatoires (IL-18, IFN- $\gamma$ ) contribuant à la progression des plaques athéromateuses [180].

La NADPH oxydase est la principale source de ROS dans la paroi vasculaire pathologique. C'est une enzyme capable de transférer les électrons à travers la membrane plasmique afin de réduire l'oxygène en anion superoxyde et de générer d'autres ROS en aval. Une étude réalisée par Guzik et al. a montré l'augmentation de l'expression de sous-unités de NADPH oxydase dans les artères mammaires internes de patients atteints de maladies coronariennes et de diabète [181]. Dans des conditions d'ischémie extrême prolongée, la production de ROS augmente dans

les HUVECs et cette réponse peut être récapitulée dans les HUVEC après 90 minutes d'ischémie suivie de réoxygénation [182].

La susceptibilité des cellules vasculaires au stress oxydant est fonction des systèmes de défense antioxydants qui sont capables de s'adapter au degré du stress pour maintenir l'équilibre redox [183]. Ce système de défense comprend des enzymes telles que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase, des molécules non enzymatiques incluant l'albumine, la bilirubine et le glutathion [184]. Une méta-analyse d'étude de cohorte incluant près de 400 000 patients a rapporté qu'un apport élevé en vitamines antioxydantes (vitamine C et E) a été associé à un taux plus faible de cardiopathie coronarienne [185].

### III.4.c Inflammation et dysfonction endothéliale

L'état inflammatoire contribue à la progression de maladies chroniques telles que l'athérosclérose [186], la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux systémique [187]. L'inflammation est associée au stress oxydant, principalement du fait du découplage de l'eNOS [188]. Une relation étroite entre l'inflammation et la dysfonction endothéliale existe [189]. L'inflammation chronique au cours du diabète, de l'hypertension et de l'obésité favorisent la dysfonction endothéliale.

L'activation de la cellule endothéliale par l'IR favorise la micro-thrombose intravasculaire, la réduction du flux sanguin et l'activation des cellules inflammatoires. L'expression des molécules d'adhésion E-sélectine, P-sélectine et ICAM sur la surface des cellules endothéliales activées favorisent le recrutement des neutrophiles, les principales cellules effectrices de l'inflammation pendant l'IR [190]. Dans un modèle *in vivo* d'infarctus cardiaque, l'injection d'anti-P-sélectine avant la reperfusion, réduit d'environ 50% la taille de l'infarctus [191]. De plus, *in vitro*, le traitement par anti-P-sélectine a préservé la réponse endothéliale à l'acétylcholine [192] et a montré une diminution de la liaison des neutrophiles aux cellules endothéliales *ex vivo*.

Le NF- $\kappa$ B joue un rôle clé dans l'activation des cellules endothéliales induite par l'IR. La phosphorylation de la tyrosine de I $\kappa$ B induite par le stress oxydant entraîne la dissociation de cette protéine inhibitrice de NF- $\kappa$ B, entraînant la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et l'activation subséquente de la transcription des gènes pro-inflammatoires, procoagulants et vasoactifs exprimés dans les cellules endothéliales, qui initie et propage la lésion d'IR [193].

Diverses cytokines inflammatoires sont impliquées dans ce processus dont le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 sont les plus pertinents. Le TNF- $\alpha$ , principalement sécrété par les macrophages, pourrait être considéré comme la principale cytokine impliquée dans l'inflammation et la dysfonction

endothéliale [189]. Les concentrations de TNF- $\alpha$  circulants sont élevées dans diverses conditions pathologiques liées à un dysfonctionnement endothélial, y compris la résistance à l'insuline [194] et dans la coronaropathie (**Figure 15**). Dans les sites vasculaires exprimant un endothélium inflammatoire et un stress oxydant élevé, de nombreuses molécules d'adhésion sont induites et surexprimées à la surface endothéliale favorisant le recrutement leucocytaire et le rolling des plaquettes par le biais d'interactions avec les contreligands (**Figure 16**).

Le recrutement de ces cellules activées favorise la libération des chimiokines et la diapédèse. Ainsi les leucocytes tissulaires renforcent la réponse inflammatoire et la dysfonction endothéliale [195].

#### III.4.d Diabète, stress oxydant et dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est liée aux diabètes soit de type 1 ou de type 2 [196], avec des atteintes micro-vasculaires et macro-vasculaires [197]. Au niveau expérimental, les concentrations élevées de glucose induisent la sénescence endothéliale prématurée (Khemais S, thèse de science, 2 octobre 2017).

L'hyperglycémie favorise la production de ROS en activant les NADPH oxydases de manière dépendante de la PKC [198]. Le découplage d'eNOS induit par le peroxy-nitrite [199], favorise une mauvaise vasodilatation des artérioles coronaires des patients diabétiques mesurée par FMD (Flow-mediated dilation method) ce qui confirme la dysfonction endothéliale. Dans le diabète de type 1, les ROS contribuent aussi au dysfonctionnement des cellules  $\beta$  en réponse aux cytokines inflammatoires et aux réactions auto-immunes. Dans le diabète de type 2, l'excès de ROS réduit la production d'insuline en activant les voies apoptotiques des cellules  $\beta$  [200]. Par conséquent, in vitro, la brève exposition des îlots pancréatiques au stress oxydant réduit 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 [201]. Les concentrations élevées du glucose augmentent également l'apoptose des cellules endothéliales insulaires en provoquant une expression importante d'iNOS et de NO, ce qui entraîne une augmentation des taux de ROS [202]. De plus, le glucose élevé, en favorisant l'expression endothéliale de molécules d'adhésion [202] et en augmentant l'apoptose endothéliale [203], contribuerait au recrutement plaquettaire et à un état pro-coagulant.

De nombreuses études ont également montré que le diabète et la résistance à l'insuline provoquent une dysfonction endothéliale susceptible de limiter la protection contre l'athérombose [204].

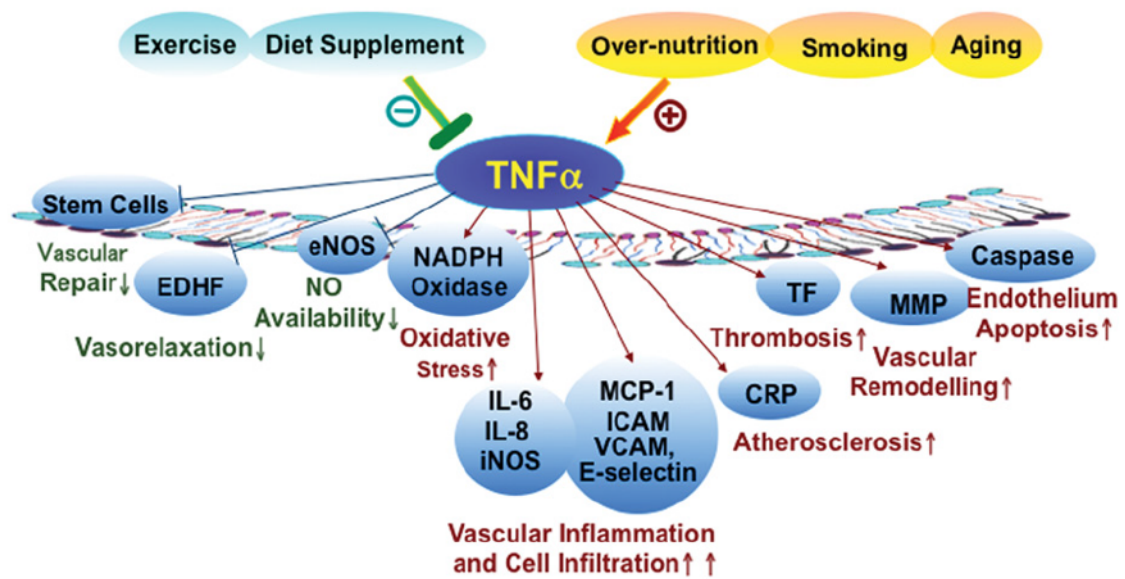


Figure 15. Cibles vasculaires de TNF- $\alpha$  dans la dysfonction endothéliale en physiopathologie [205].

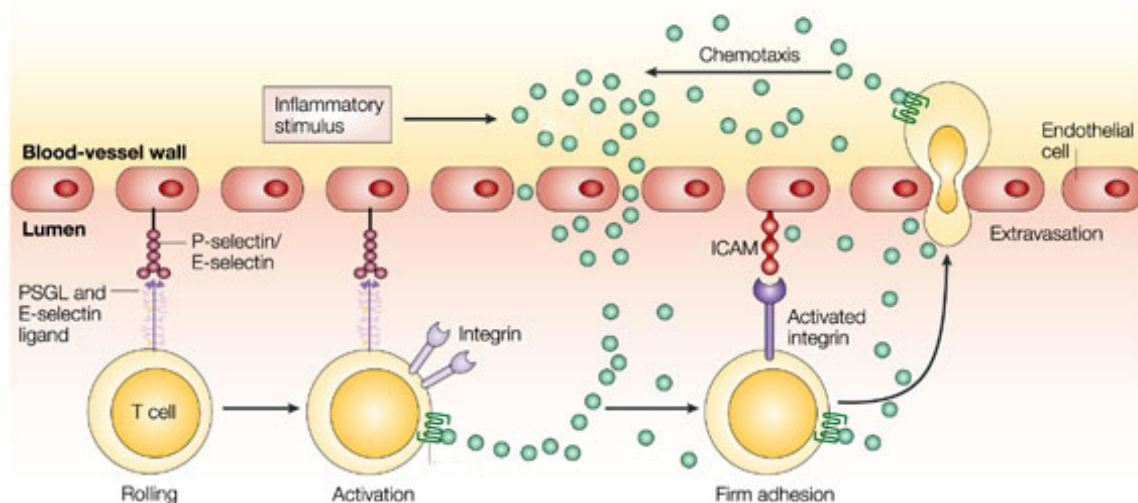


Figure 16. Recrutement des leucocytes vers le site d'inflammation [206].

En outre, dans le diabète, l'équilibre entre les facteurs de relaxation et de contraction dérivés de l'endothélium est modifié. Cela contribue aussi à la dysfonction endothéliale qui à son tour, accélère la pathogenèse de la maladie vasculaire [207].

L'impact du vieillissement, de l'hypertension et d'autres facteurs peut aggraver le dysfonctionnement endothélial. Sabatier et ses collaborateurs ont montré que les microparticules endothéliales circulantes et pro-coagulantes augmentent chez les patients diabétiques confirmant une atteinte endothéliale importante [208].

#### III.4.e Vieillessement et dysfonction endothéliale

Le vieillissement s'accompagne de modifications structurelles et fonctionnelles de la vascularisation conduisant à une dysfonction endothéliale [209] et les cellules musculaires lisses et les couches intima sont affectées [210]. La diminution de la lumière du vaisseau liée à la dysfonction endothéliale s'accompagne de modifications structurelles telles que l'augmentation de l'épaisseur de la couche de la media, du contenu des parois en collagène et du nombre de cellules musculaires lisses. Les modifications fonctionnelles contribuent au déséquilibre entre les facteurs endothéliaux relaxants et contractants [210]. Le vieillissement des cellules endothéliales est caractérisé par une diminution de la synthèse du NO [211]. Dans une étude réalisée chez des rats âgés, la perte de phosphorylation d'eNOS dépendante de voie PI3K / Akt semble être un mécanisme essentiel expliquant la diminution de la production du NO vasoprotecteur [212]. Une dysfonction endothéliale liée au vieillissement a été observée dans plusieurs types d'artères telles que l'aorte et l'artère mésentérique du rat et l'artère brachiale chez l'homme [213].

Les travaux expérimentaux ont mis en évidence que l'Ang II en stimulant le récepteur AT1 conduit à la sénescence cellulaire via la signalisation du système rénine angiotensine et l'activation de la voie p53 / p21 [214].

En transplantation d'îlots pancréatiques, Les cellules endothéliales du receveur sont cruciales pour le processus de revascularisation, éventuellement par le biais des microparticules libérés par les progéniteurs endothéliaux [215]. Comme la revascularisation des îlots est essentielle à sa fonction et à sa survie, la limitation de la dysfonction endothéliale de l'îlot ou de l'hôte semble être une étape cruciale pour un meilleur résultat de la transplantation d'îlots afin d'éviter un vieillissement prématuré du greffon. Au cours de l'isolement des îlots pancréatiques, le stress mécanique et enzymatique entraîne une altération de l'endothélium des îlots. En outre, la réaction inflammatoire IBMIR déclenchée en péri-transplantation affecte les îlots de donneur

et les cellules endothéliales hépatiques du receveur. Ceci pose la question d'une éventuelle dysfonction endothéliale accélérée du greffon.

## *Chapitre IV*

---



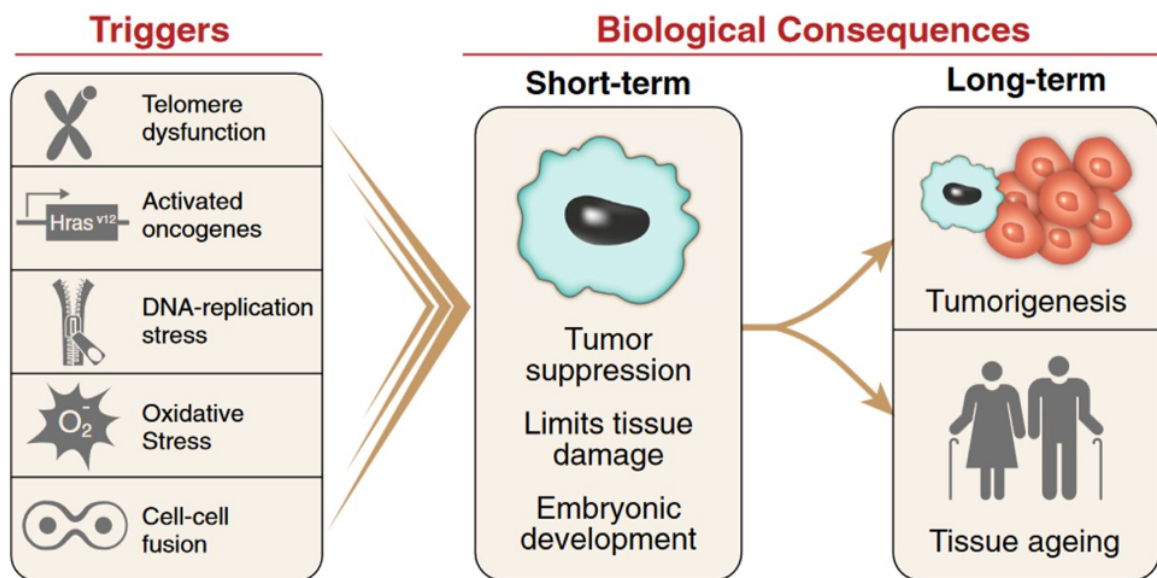
## IV La sénescence cellulaire

### IV.1 Définition de la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire a initialement été observée in vitro par L. Hayflick. Il a remarqué que les fibroblastes en culture cessaient de proliférer après 50 à 70 divisions cellulaires [216]. Cette limite était considérée comme la marque d'un vieillissement cellulaire qui déterminait la durée de la culture. Les cellules sénescents sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire, ne sont plus capables de proliférer en réponse aux facteurs mitogéniques mais conservent certaines capacités métaboliques [217]. Au niveau de l'organisme, les cellules sénescents sont reconnues par les cellules de l'immunité.

La sénescence cellulaire est induite par différents stimuli (**Figure 17**), qui partagent tous des voies similaires pour initier et maintenir le programme de sénescence. Elle est déclenchée par un raccourcissement des télomères (sénescence répllicative) ou par d'autres stimuli indépendants de la longueur des télomères (sénescence prématurée). En outre, l'activation d'un oncogène comme « RAS » induit également la sénescence cellulaire dans un processus appelé sénescence induite par l'oncogène. Ce phénomène ultérieur est provoqué par l'induction de dommages à l'ADN et est associé à des taux élevés de ROS [218]. D'autres études ont suggéré que la sénescence pourrait être induite par l'activation de voies ERK (Extracellular signal-regulated kinases) qui favorisent la dégradation des protéines nécessaires à la progression du cycle cellulaire [219].

Les cellules sénescents ont trois caractéristiques principales associées à leurs effets nocifs [218]. Tout d'abord, un mécanisme efficace de suppression de tumeur qui limite la prolifération cellulaire, ce qui à son tour retarde l'accumulation de mutations. En effet, la sénescence est étroitement régulée par un ensemble de suppresseurs de tumeurs comme p53, p21, p16, pRb [220]. De plus, les cellules de sénescence jouent un rôle essentiel en limitant la fibrose tissulaire dans les pathologies non cancéreuses. La deuxième caractéristique de la sénescence est la dysfonction cellulaire, qui entraîne une dysfonction tissulaire, soit en altérant la structure ou la fonction des tissus, favorisant ainsi les maladies. En effet, les cellules  $\beta$  pancréatiques sénescents conduisent à une libération réduite d'insuline au cours du diabète lié à l'âge [221]. La troisième caractéristique importante est la sécrétion de facteurs solubles comme les cytokines, les facteurs de croissance et les protéases qui affectent le microenvironnement des cellules sénescents.



**Figure 17. Les causes et les conséquences biologiques de la sénescence cellulaire [218].**

*La sénescence cellulaire peut être induite par divers déclencheurs, y compris, mais sans s'y limiter, le dysfonctionnement des télomères, l'activation de l'oncogène, les ROS et la fusion cellule-cellule. La présence à court terme de cellules sénescents joue un rôle bénéfique dans la suppression des tumeurs, la cicatrisation des plaies et le développement embryonnaire. Cependant, la persistance à long terme des cellules sénescents dans les tissus peut favoriser la tumorigenèse et le développement de maladies liées à l'âge.*

## IV.2 Les caractéristiques de la sénescence

### IV.2.a Arrêt du cycle cellulaire

L'arrêt du cycle cellulaire est un élément indispensable mais non suffisant pour l'identification de la sénescence cellulaire [222]. Plusieurs études ont montré que les cellules sénescents sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire, et d'autres ont rapportés les moyens de reverser l'arrêt du cycle cellulaire par l'inactivation de la voie p53. Certaines interleukines abolissent l'arrêt du cycle cellulaire. [223]. Les p16 et p21 sont des médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire et de la sénescence en aval de p53 (**Figure 18**).

### IV.2.b Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ -gal)

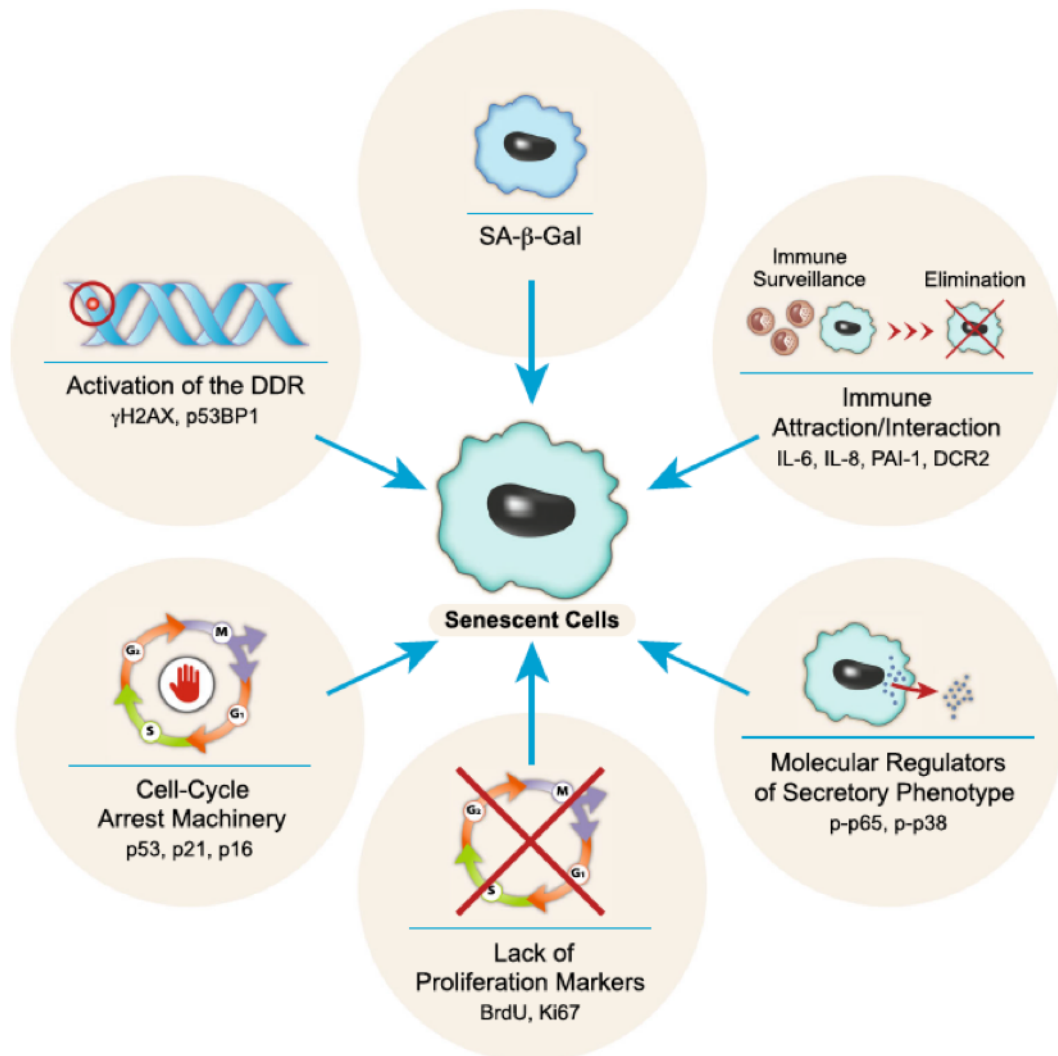
En 1995, l'équipe de Campisi a identifié, la  $\beta$ -galactosidase, codée par le gène GLB1 dont l'activité est détectable, *in vitro* et *in vivo*, à pH 6 dans les lysosomes des cellules sénescents [224]. L'augmentation de cette activité enzymatique, est due à l'expansion du compartiment lysosomal pendant la sénescence. Cependant, cette augmentation n'est pas entièrement spécifique de la sénescence car elle est également détectable après un retrait de sérum ou une culture prolongée [225].

### IV.2.c Foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF)

Dans les cellules normales, la coloration de l'ADN fait apparaître une distribution diffuse et homogène de l'ADN dans le noyau. Dans le cas des cellules sénescents, le marquage fait apparaître des foyers de chromatine condensée appelés senescence associated heterochromatin foci ou SAHF [226]. La formation des SAHF est dépendante de l'activation de la voie p16/Rb et était responsable de la stabilité de la sénescence : une fois formés, la présence de dommages à l'ADN et des inhibiteurs du cycle ne sont plus nécessaires pour maintenir la sénescence [227]. Ces foyers, régulés par le gène du rétinoblastome (Rb) maintiennent l'arrêt du cycle cellulaire pendant la sénescence. Les SAHF sont enrichis en protéines de l'hétérochromatine comme la HP1 (Heterochromatin protein 1) et sont notamment régulés positivement par la protéine HIRA (histone cell cycle regulation defective A).

### IV.2.d Le stress oxydant

Le stress oxydant, causé par les oxydants chimiques, induit un raccourcissement des télomères et accélère le processus de la sénescence, entraînant l'induction de réponses aux dommages à l'ADN [228].



**Figure 18. Caractéristiques des cellules sénescences [218].**

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

Des concentrations élevées de ROS ont été associées à la sénescence répliquative, prématurée et induite par l'oncogène. La majorité de la production de ROS au cours de l'induction de la sénescence est supposée provenir des mitochondries [229]. La génération de ROS mitochondriale est une conséquence de la phosphorylation oxydative, un processus qui produit une énergie potentielle pour les protons à travers la membrane interne mitochondriale [230]. Au contraire, la suppression du stress oxydant préserve la longueur des télomères et prolonge la durée de vie des cellules.

#### IV.2.e Résistance à l'apoptose

Contrairement aux cellules jeunes, les cellules sénescents sont résistantes au processus de l'apoptose. En effet, dans ces cellules, p53 est instable et n'est pas susceptible d'enclencher les voies de signalisation apoptotiques. Des études ont montrés la participation de la caspase-3 et la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans la résistance à l'apoptose des fibroblastes sénescents [231].

Toutefois, les mécanismes spécifiques de résistance des cellules sénescents à l'apoptose ne sont pas clairement identifiés. Des études suggèrent que toutes les cellules sont capables d'activer ces deux processus, et que la réponse serait orientée par l'intensité et la nature du signal intracellulaire. Ainsi, les lymphocytes auront une réponse apoptotique alors que les cellules fibroblastiques et épithéliales activent plutôt la sénescence, soulignant ainsi un lien avec le type cellulaire [232].

#### IV.2.f Autophagie

Le mécanisme de l'autophagie a été décrit par Yoshinori Ohsumi, qui a obtenu le prix Nobel de Physiologie 2016. Tout comme l'apoptose et la sénescence, l'autophagie est un programme génétiquement régulé, très conservé sur le plan évolutif. Elle est caractérisée par la formation de vésicules membranaires cytosoliques appelées auto-phagosomes, qui isolent le contenu cytoplasmique et le livrent aux lysosomes [233]. L'autophagie joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. De façon intéressante, l'autophagie module la viabilité cellulaire dans des conditions de stress, y compris la sénescence cellulaire [234].

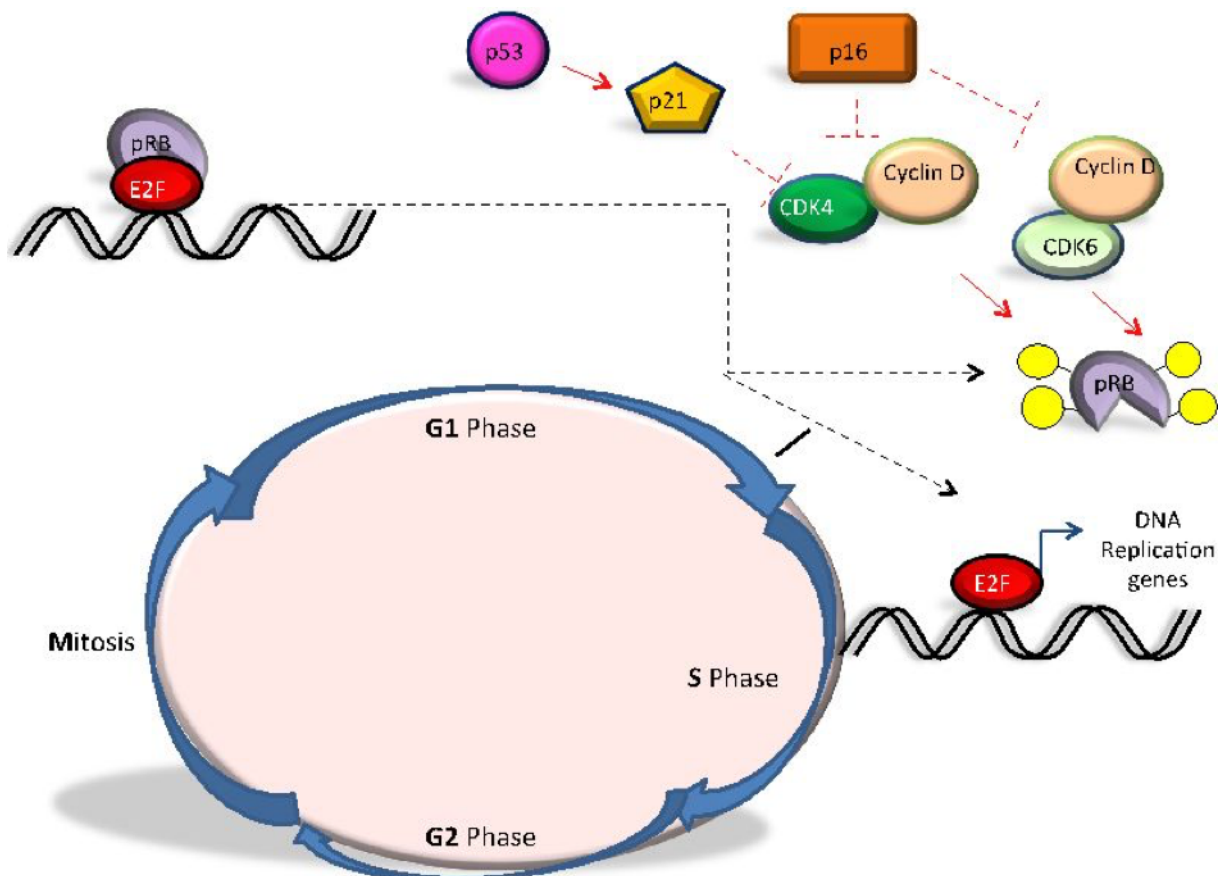
#### IV.2.g Machinerie moléculaire de la sénescence cellulaire

La protéine du rétinoblastome (pRb) et les autres suppresseurs de tumeurs p107, p130 et p53 jouent un rôle clé dans l'initiation de la sénescence cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire. Les pRbs sont régulées par phosphorylation et interaction protéine-protéine [235]. Une série de

kinases dépendantes des cyclines (CDK) sont capables de phosphoryler les pRBs, entraînant une perte de la capacité à se lier et inhiber la fonction des facteurs de transcription de la famille E2F, conduisant ainsi à la transcription génique et à la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. Les CDK sont inactivés par deux types principaux d'inhibiteurs de kinases de cyclines (CDKI) : (1) la famille CIP / KIP composée des membres p21, p27 et p57, inhibe l'activité kinase des cyclines ; et (2) la famille INK4 composée des protéines p16, p15, p18, et p14 (p19 chez la souris), inhibe spécifiquement la liaison de la cycline D aux CDK4 et CDK6 [236] (**Figure 19**). Les cellules en prolifération expriment une faible concentration de CDKI. En réponse à une variété de stimuli oncogéniques responsables de lésions de l'ADN, le degré d'expression des gènes CDKI (p21 et p16) est significativement modifié de manière dépendante et indépendante de p53. L'activation de la voie de p53 inactive à son tour tous les CDK, empêchant la phosphorylation de pRB et conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire [237]. L'activation de la voie p16-RB induit une élévation des concentrations intracellulaires de ROS, déclenchant ainsi l'activation de la PKC qui favorise la production de ROS supplémentaires et un maintien de concentrations élevées dans les cellules sénescentes [238].

#### ❖ La voie de p53/p21

Le p53 est un facteur de transcription tétramérique régulé par des modifications post-transcriptionnelles, et un suppresseur de tumeur important puisque sa mutation est retrouvée dans 50% des cancers humains [239]. Des études ont prouvé que l'activité physiologique de p53 prévient du cancer et protège contre le vieillissement prématuré, alors que son activation incontrôlée et excessive protège encore contre le cancer, mais accélère le vieillissement naturel [239]. p53 est un régulateur essentiel pour les cellules en réponse aux signaux de stress cellulaire comme les dommages à l'ADN, l'activation des oncogènes, l'hypoxie et l'infection virale. En l'absence du stress, l'ubiquitination de p53 favorise sa dégradation par le protéasome [240]. La stimulation de la sénescence en réponse aux dommages de l'ADN est principalement réalisée via l'activation de p53, et de son effecteur en aval p21. La surexpression de p53 et p21 est centrale dans le déclenchement de la sénescence. En effet, des études ont montré que l'inactivation de p53 évite la sénescence des fibroblastes embryonnaires de souris et que les fibroblastes humains dépourvus de p21 ne sont plus capables d'enclencher un arrêt du cycle cellulaire en réponse à une induction de sénescence [241]. En outre, p53 active la voie mTOR en déclenchant l'expression de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK, AMP-activated protein kinase) favorisant le vieillissement des cellules et des tissus [242].



**Figure 19. Le rôle de pRB dans la régulation du cycle cellulaire [243].**

*Modèle simplifié, axé sur l'entrée précoce du cycle cellulaire, illustre que pRb actif hypophosphorylé réprime la transcription médiée par E2F. L'action des CDK, illustrée par les CDK4 et 6 dépendantes de la cycline D, phosphoryle pRb et libère donc E2F pour activer la transcription des gènes de réplication de l'ADN. p16INK4a et p21Waf1, ce dernier activé par p53, inhibent les CDK et retiennent pRb dans son état inhibiteur du cycle cellulaire actif.*

Ainsi, p53 contrôlerait un ensemble de voies étroitement liés qui affectent la sénescence ou réduisent la croissance cellulaire.

#### IV.2.h Médiateurs solubles de la sénescence

Les cellules sénescents sécrètent de nombreux médiateurs à actions autocrines et paracrines, comme les protéases extracellulaires (métalloprotéases matricielles), le PAI-1, le TGF $\beta$ , le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le HGF et le VEGF, les cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6) et les chimiokines (IL-8, MCP-1) [244]. En outre, les cellules qui subissent une sénescence réplivative ou prématurée, présentent des changements profonds dans leur sécrétome, avec l'apparition d'un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (senescence associated secretory phenotype ou SASP) [245], qui favorise et amplifie l'inflammation, notamment endothéliale, et qui joue un rôle majeur dans les maladies liées au vieillissement telles que l'athérosclérose.

### IV.3 Sénescence endothéliale et dysfonction de l'endothélium

Quel que soit l'origine de la sénescence (réplivative ou prématurée), l'endothélium subit des altérations fonctionnelles qui conduisent à un phénotype proinflammatoire, prooxydant et procoagulant, suggérées pour avoir un rôle dans les maladies cardiovasculaires associées au vieillissement, ou associées aux facteurs de risque cardiovasculaires tels que le diabète ou l'hypertension. D'un point de vue morphologique, les cellules sénescents s'aplatissent et leur volume cellulaire augmente, avec un cytoplasme contenant des filaments cytoplasmiques et des vacuoles. Ce phénomène a été expliqué par l'augmentation de la synthèse protéique via l'activation de la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) [246].

Des études chez des rats Zucker obèses et diabétiques ont montré que l'endothélium aortique présente des cellules SA- $\beta$ -gal positives avec une sur-expression de p53, p21 et p16 et un stress oxydant élevé [247]. Plusieurs études ont confirmé que les cellules endothéliales sénescents présentent une dysfonction. L'induction de la sénescence dans des cellules endothéliales primaires en culture est associée à une diminution de l'expression de l'eNOS (endothelial NO synthase) et de la formation de NO, ainsi qu'à une signalisation redox sensible [228]. Une autre étude réalisée par Kim et al. a montré que la sur-expression de p53 dans l'endothélium est associée à une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium dans les anneaux aortiques, avec une réduction de la biodisponibilité du NO [248]. De plus, Abbas et al. ont montré que l'incubation des ECs d'artères coronaires de porc avec de peroxyde d'oxygène



(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) augmente l'activité SA-β-gal et l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire, et a pointé le rôle de stress oxydant dans l'induction de la sénescence [249].

Symétriquement, différentes approches ont montré que la prévention de la sénescence réduit la dysfonction endothéliale. En effet, Yang et al. ont montré que l'extension des télomères, via l'expression du composant catalytique de la télomérase humaine, prolonge la durée de vie des ECs humaines en culture et les protège de la dysfonction endothéliale [250]. De plus, Khemais-Benkhiat et al. ont montré que l'addition d'un antioxydant (N-acétyl cystéine ou NAC) dans le milieu de culture des ECs coronaires primaires de porc, prévient la sénescence répllicative [251].

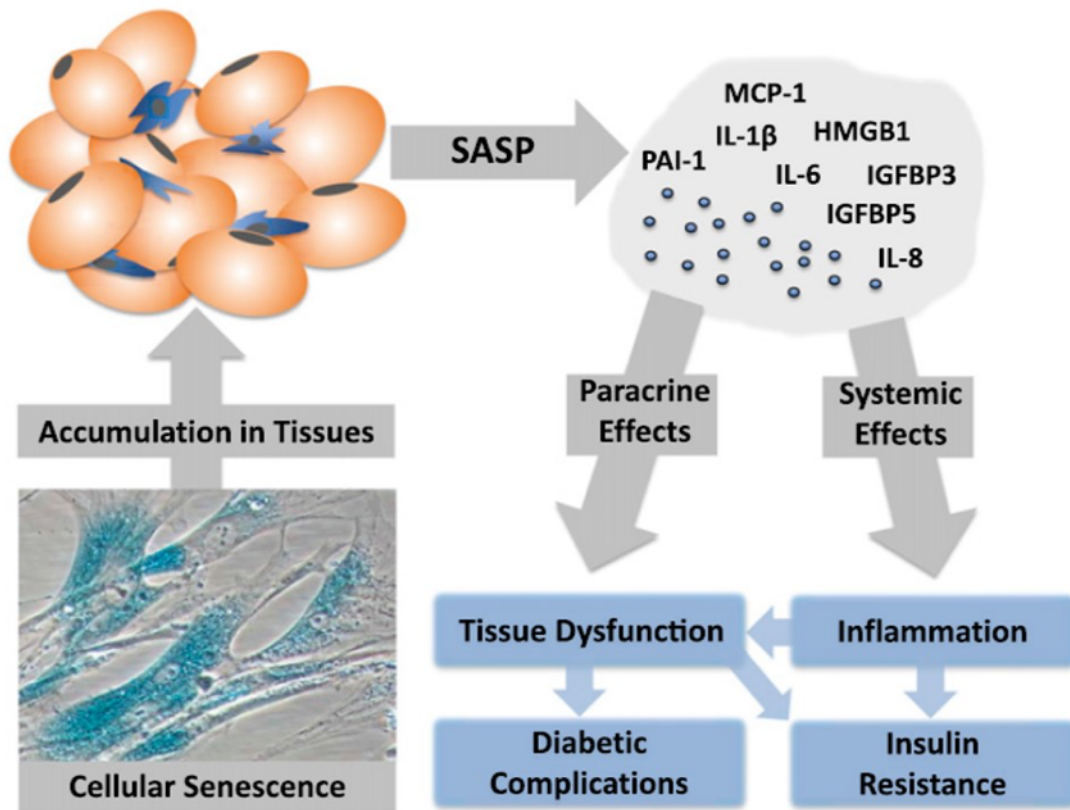
#### **IV.4 Sénescence et diabète**

Le vieillissement s'accompagne de l'accumulation de cellules sénescents, également remarquées dans le diabète et l'obésité (**Figure 20**). Ainsi, l'accumulation de cellules sénescents prématurées, conduisant à un dysfonctionnement tissulaire et cellulaire, est observée dans les modèles animaux de diabète. La perte de capacité proliférative des cellules β avec l'âge, s'accompagne d'une augmentation de la résistance à l'insuline.

Le déséquilibre entre le besoin en insuline et la capacité de réponse de la cellule β favoriserait donc l'hyperglycémie liée à l'âge, suivi de la perte de masse cellulaire β fonctionnelle [252].

De plus, le raccourcissement des télomères des cellules β chez les DT2, peut favoriser l'arrêt du cycle cellulaire.

Dans une étude récente, Tamura et al. ont observé, chez des patients DT2 et âgés, que la longueur des télomères dans les cellules β était plus courte que celle des patients non diabétiques [253]. Ce dysfonctionnement des cellules β provoqué par la sénescence cellulaire peut être évité par un nouveau traitement, les agents sénolytiques. En effet, Zhu et al. ont montré que le Quercetin, un inhibiteur de PI3K, réduit la viabilité et provoque la mort cellulaire des HUVECs sénescents [254]. Lorsque ce traitement est pris au moment du diagnostic du pré-diabète, il peut retarder ou éviter la progression vers un diabète insulino-dépendant accéléré et en partie préserver la fonction des cellules β [252]. L'effecteur de sénescence p16 est exprimé dans les cellules β pancréatiques au cours du vieillissement et limite leur potentiel prolifératif. Helman et al. ont trouvé que l'expression spécifique de p16 dans les cellules β des souris transgéniques améliore la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Chez les souris diabétiques, ceci a conduit à une homéostasie du glucose améliorée, procurant un bénéfice fonctionnel inattendu. L'expression de p16 dans les cellules β a induit les caractéristiques de sénescence, y compris l'élargissement cellulaire, une plus grande absorption de glucose et une activité mitochondriale, favorisant la sécrétion accrue d'insuline [255].



**Figure 20. Cellules sénescents et complications de diabète [252].**

*Les cellules sénescents peuvent jouer un rôle dans la résistance à l'insuline et les complications du diabète. Les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus à travers le corps avec le vieillissement et l'obésité et dans les états pathologiques. La SASP est un groupe diversifié de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de facteurs de croissance libérés par les cellules sénescents, qui peuvent agir à la fois localement et de manière systémique. La SASP peut affecter la fonction des cellules voisines à l'intérieur d'un tissu par des mécanismes paracrines, ce qui contribue à la dysfonction des tissus et aux dommages pouvant entraîner des complications du diabète. En outre, les facteurs SASP peuvent circuler et s'ajouter à un état inflammatoire chronique communément impliqué en tant que contributeur dans le développement de la résistance à l'insuline.*

De plus, Helmer et al. ont trouvé que les îlots d'adultes contiennent des cellules  $\beta$  sénescents exprimant p16 et que la sénescence induite par p16 dans une lignée cellulaire  $\beta$  humaine augmente la sécrétion d'insuline. Ces résultats révèlent un nouveau rôle de p16 et de la sénescence cellulaire dans la promotion de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  et dans la régulation de la maturation des tissus fonctionnels normaux avec l'âge [255].

#### **IV.5 Surveillance de sénescence au cours de vieillissement**

Hayflick et Moorhead ont déjà interprété le phénomène de la sénescence répliquative comme l'un des mécanismes fondamentaux sous-jacents au processus de vieillissement des organismes [256]. En accord avec cela, il a été démontré que les cellules sénescents s'accumulent avec le vieillissement *in vitro* et dans un certain nombre de tissus chez des souris âgées et des peaux humaines âgées [257]. A l'heure actuelle, il est largement admis que les cellules sénescents augmentent avec l'âge dans les tissus des humains, des primates et des rongeurs. En outre, l'accumulation de cellules sénescents a été observée sur des sites de diverses maladies liées à l'âge, y compris les maladies cardiovasculaires [258]. Cette augmentation des cellules sénescents au cours du temps peut être une cause d'accumulation de dommages à l'ADN et / ou l'augmentation d'autres stimuli induisant la sénescence. Une autre possibilité est que l'élimination des cellules sénescents par le système immunitaire est moins efficace avec le vieillissement.

Dans des conditions physiologiques, le système immunitaire est capable d'éliminer les cellules sénescents en facilitant la suppression tumorale et la cicatrisation des plaies. Cependant, les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus avec l'âge. Cette accumulation est due soit (i) au taux élevé de formation de cellules sénescents ou (ii) à l'échec de l'immunosénescence (cf. IV6) ou (iii) à la diminution de la clairance [218]. L'existence à long terme de cellules sénescents dans les tissus a le potentiel de favoriser les maladies liées à l'âge et contribue à expliquer la dysfonction des organes avec le vieillissement [259]. L'élimination des cellules sénescents par le système immunitaire a été bien démontrée dans un modèle de fibrose hépatique et de carcinome hépatique. Les cellules stellaires hépatiques sénescents augmentent l'expression de modulateurs immunitaires codant pour des cytokines ou des récepteurs qui activent la fonction des cellules NK [260]. Ceci suggère que les cellules sénescents ont un programme d'auto-élimination appelé «surveillance de sénescence» qui agit en attirant et activant diverses cellules immunitaires par la sécrétion de cytokines inflammatoires et de chimiokines [260]. Avec le vieillissement, l'élimination efficace des cellules sénescents est probablement réduite en raison de l'immunodéficience liée au vieillissement. Des études ont

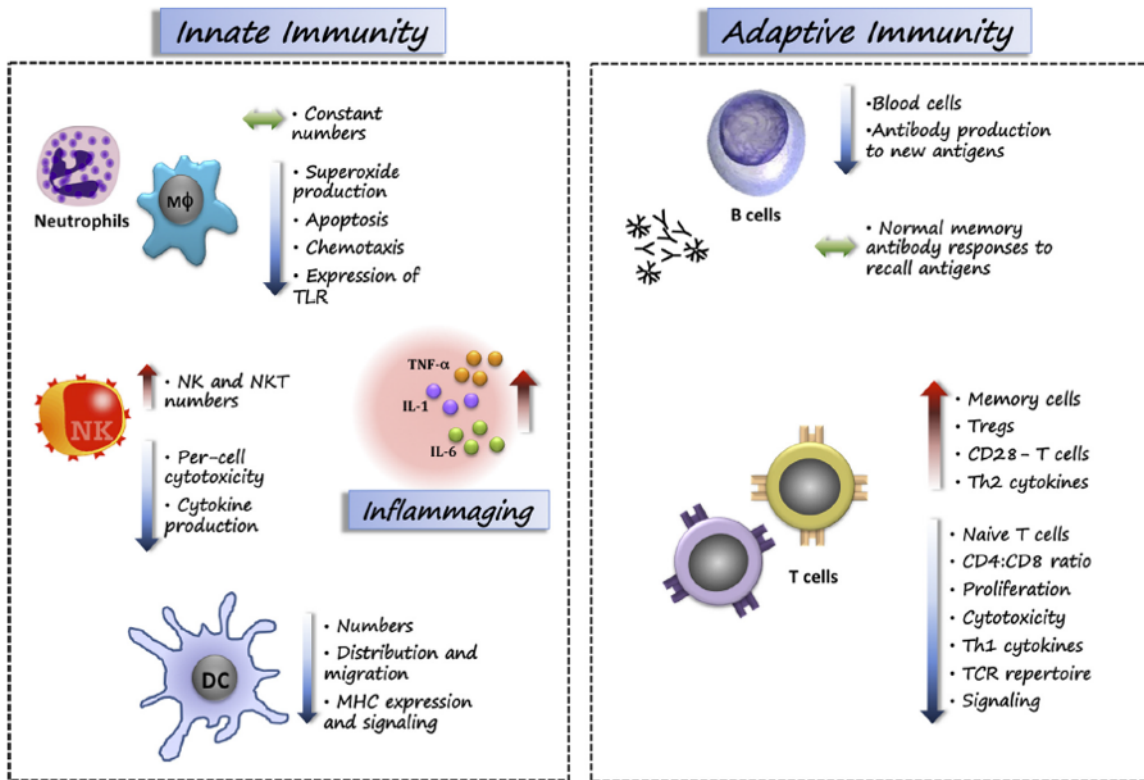
démontré que la fonction des cellules souches hématopoïétiques diminue avec le vieillissement, ce qui entraîne une altération de la lymphopoïèse et une augmentation de la myélopoïèse, entraînant une altération de la fonction immunitaire [261].

#### **IV.6 Immunosénescence en transplantation: impact de l'âge du receveur et du donneur**

Le système immunitaire subit un remodelage complexe et continu avec le vieillissement. L'immunosénescence est le processus de dysfonction progressive du système immunitaire qui augmente la susceptibilité des personnes âgées à l'infection, aux maladies auto-immunes et au cancer, contribuant de manière significative à la morbidité et à la mortalité des personnes âgées. Des études ont montrés une incidence plus élevée de cancer post-transplantation chez des sujets âgés (> 65 ans) que chez des sujets jeunes [262]. Cette immunosénescence entraîne des modifications quantitatives et qualitatives des sous-populations cellulaires spécifiques (**Figure 21**) qui ont un impact majeur sur le rejet et la tolérance du greffon [263]. En effet, Cecka et ses collaborateurs ont montré que l'immunosénescence réduit le rejet chez les sujets âgés comparativement aux sujets de moins de 45 ans après une transplantation rénale (25% vs 50% de rejet) [263].

Ainsi, l'immunosuppression doit être adaptée et optimisée chez ces patients âgés afin de minimiser les effets toxiques de traitements immunosupresseurs.

L'immunosénescence conduit à un déséquilibre du contrôle immunitaire. L'immunosénescence perturbe la prolifération et la capacité de régénération des cellules souches hématopoïétiques et altère la fonctionnalité des cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Ces altérations touchent principalement l'immunité adaptative plus que l'immunité inné. En conséquence, la chimio-taxie, la phagocytose, la cytotoxicité naturelle et l'activité du complément sont relativement bien préservées chez les sujets âgés. Il est important de comprendre les mécanismes ciblés par l'immunosénescence systémique et locale au sein du greffon. La transplantation d'organes de donneurs âgés vers des receveurs âgés est une situation qui ne peut que gagner en fréquence [264].



**Figure 21. Immunosénescence et les changements associés aux cellules du système immunitaire [265].**

Les flèches désignent une diminution, soit une augmentation ou une stabilité des différentes caractéristiques des cellules du système immunitaire.

TLR : toll like receptor ; NK : natural killer ; Th : helper T cell ; TCR : T-cell receptor ; Treg : regulatory T cell

## *Chapitre V*

---

## V Les microparticules : effecteurs cellulaires du dommage vasculaire et tissulaire

### V.1 Pertinence physiopathologique des microparticules

Les microparticules (MPs) sont des fragments submicroniques de membrane plasmique de 0,05 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, libérées dans l'espace extracellulaire par des cellules stimulées ou des cellules apoptotiques après remodelage de leur membrane plasmique [266]. Les MPs expriment sur leur surface un phospholipide anionique, la phosphatidylsérine (PhSer), qui lui confère des propriétés pro-coagulantes car elle constitue une surface catalytique supplémentaire pour l'assemblage et l'activation de la cascade de coagulation sanguine et la génération de thrombine. À l'état physiologique, les MPs circulent à faible concentration dans le sang, tandis qu'en condition physiopathologie, leur concentration est élevée et a été associée des désordres pro-thrombotiques, notamment dans les maladies cardiovasculaires, chroniques ou dégénératives [267]. La quantité de MPs libérées dans la circulation systémique est corrélée avec la sévérité de la maladie [268, 269] et est associée à un état d'hypercoagulabilité, de thrombose ou de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) [270]. Cette observation a été initialement réalisée *in vitro* sur des lignées cellulaires soumises à différentes concentrations d'agonistes cellulaires ou sur des plaquettes lavées [269, 271].

Ainsi, les MPs apparaissent comme de véritables marqueurs du stress cellulaire dans le compartiment vasculaire. Selon les conditions physiopathologiques, l'origine cellulaire des MPs circulantes, leurs propriétés et leur concentration varient (cf. ci-dessous). Il faut également noter que les interactions entre MPs circulantes et paroi cellulaire vont dépendre aussi des conditions rhéologiques (stase, flux perturbé, artériel ou veineux) qui conditionnent les opportunités d'interactions entre MPs et cellules endothéliales cibles.

Il est admis que le stress initiateur de la libération des MPs déterminera la composition des MPs [272], et donc les interactions autocrines ou paracrines des MPs, capables d'agir en effecteurs cellulaires à distance dans l'arbre vasculaire, de manière intra-tissulaire, ou focalisée au site d'une blessure vasculaire.

Très peu de données cliniques ou dans des modèles animaux sont disponibles sur l'importance physiopathologique des MPs tissulaires. Néanmoins dans le contexte de la transplantation ou de la dysfonction d'organe, les MPs tissulaires semblent contribuer au « cross-talk » cellulaire.

### V.2 Caractéristiques des MPs

Les MPs expriment à leur surface des antigènes de surface et des molécules actives caractéristiques de l'origine des cellules et du stress initiateur [273]. Elles contiennent

notamment des protéines cytoplasmiques, comme les cytokines pro-inflammatoires [274], des lipides actifs [275, 276] ou des protéines et récepteurs membranaires, susceptibles de transporter des molécules plasmatiques ou circulantes comme la protéine C activée [277] ou de faciliter le transfert d'une cellule à l'autre comme par exemple le facteur tissulaire (**Figure 22**). Des études ont montré que les MPs contiennent également du matériel génétique notamment du miRNA [278, 279]. Cette observation ouvre la perspective d'une éventuelle utilité pour mieux caractériser les MPs à la fois par leur origine cellulaire et leur contenu en miRNA caractéristique des désordres vasculaires ou de leur évolution [280].

Les MPs sont le reflet de l'homéostasie cellulaire et 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. Un autre paramètre de leur propriété d'effecteur est leur temps de recyclage des protéines de la MP par la cellule cible. Par exemple, après l'incorporation de TF<sup>+</sup>-MPs d'origine tumorale, le recyclage du TF à la surface des cellules endothéliales cibles dépendant des petites protéines G et induit en 4h un phénotype pro-coagulant des cellules endothéliales [281].

Bien que généralement délétères dans le compartiment vasculaire, parce que leur potentiel pro-coagulant est supérieur [282, 283], certaines MPs peuvent être bénéfiques [284].

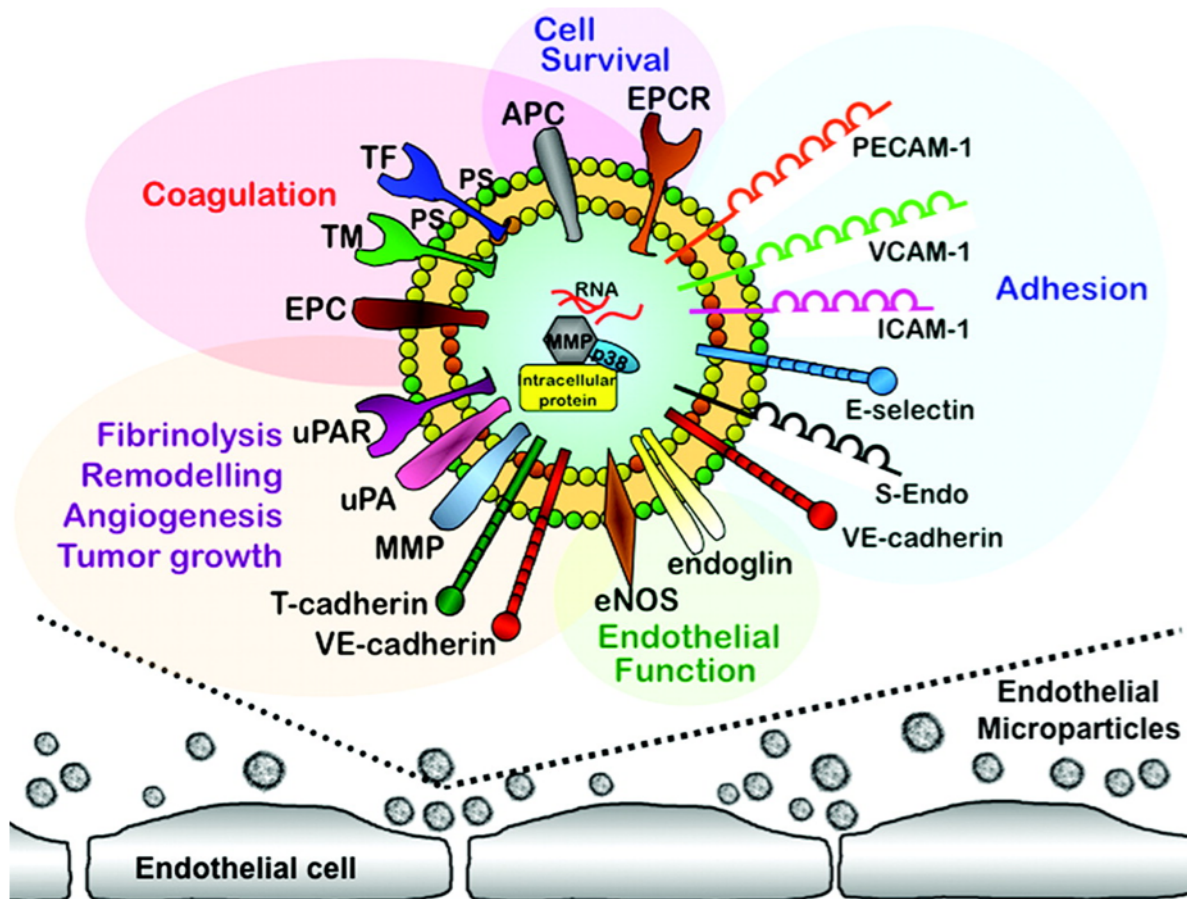
Les MPs également appelées microvésicules, sont à distinguer des autres types des vésicules (30 à 100 nm de diamètre), comme les exosomes, d'origine endosomale et qui sont libérées par exocytose. Les exosomes expriment de petites quantités de PhSer mais sont enrichies en tétraspanine, et leurs marqueurs de surface ainsi que leurs propriétés sont différentes de celles des MPs [285]. Les données de la littérature sur le contenu en miRNA des exosomes sont plus documentées [286]

### **V.3 Mécanismes de formation des microparticules**

#### **V.3.a La membrane plasmique**

La fonction des cellules est maintenue par la fluidité de la membrane plasmique, qui dépend de la composition des lipides et de la température. L'épaisseur locale et la flexibilité de la membrane dépendent de la nature des acides gras, en particulier de leur longueur de chaîne et leur nombre de liaisons insaturées. La bicouche de la membrane plasmique est asymétrique au repos : Les phospholipides anioniques comme la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine (PhSer) sont séquestrés dans le feuillet interne tandis que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont localisées dans le feuillet externe [273, 287].





**Figure 22. Représentation schématique de molécules bioactives véhiculées par les MPs et les effets biologiques associés [288].**

*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 metalloproteinases; *uPA* : urokinase plasminogen activator; *uPAR* : urokinase plasminogen activator receptor; *EPC* : endothelial protein C; *TM* : thrombomodulin.

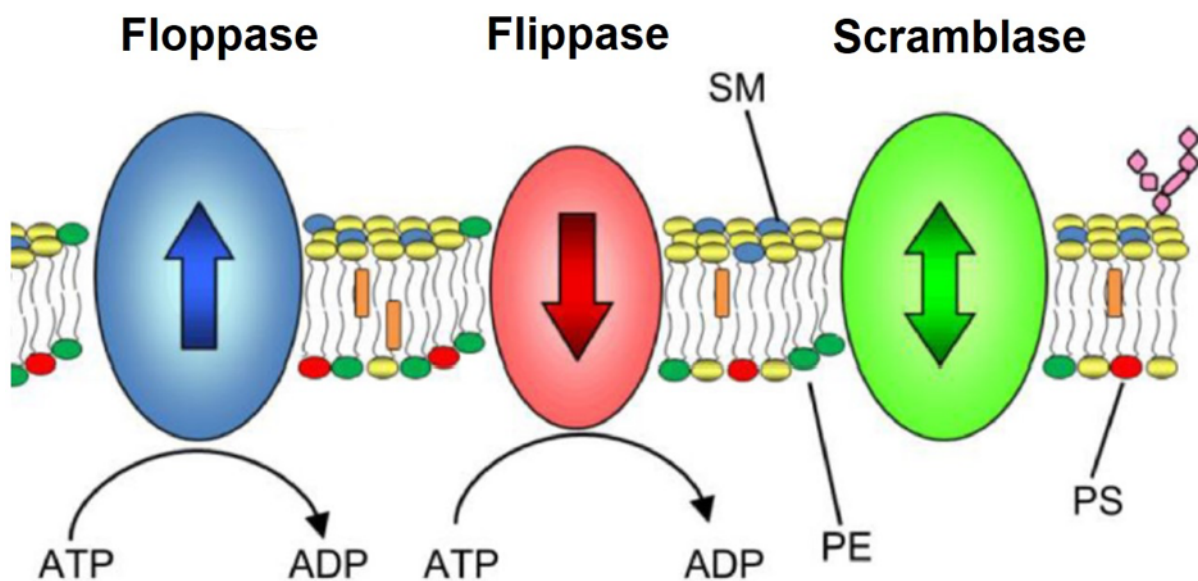
La fluidité de la membrane est assurée par les mouvements latéraux des protéines et des phospholipides au sein de la même monocouche. Tout comme la libération des MPs suite aux remaniements transversaux des phospholipides de la bicouche, ces mouvements latéraux dépendent de la courbure de la membrane et de sa tension. Cette diffusion transversale permet transitoirement une réorganisation particulière de la membrane plasmique en domaines fonctionnels appelés «radeaux lipidiques» (ou raft) qui augmentent la concentration locale de récepteurs spécifiques et de phospholipides et permettent l'initiation de la signalisation intracellulaire [289].

### V.3.b Les transporteurs de phospholipides et la rupture d'asymétrie membranaire

La PhSer est un signal de reconnaissance pour la clairance cellulaire par phagocytose qui doit être étroitement contrôlée [290]. Au repos, l'externalisation de la PhtdSer est rare en raison d'un rapatriement rapide de la PhtdSer vers le feuillet interne tandis qu'à l'inverse un stimulus entraînera rapidement la randomisation de la PhtdSer entre les deux feuillets. Ces mouvements de PhtdSer entre feuillets sont sous le contrôle de trois types de transporteurs : les floppases, les flippases et les scramblases (**Figure 23**).

Les transporteurs ABC (ATP binding cassette) comme ABC A-1 sont des « floppases » occasionnelles [291]. Les P4-ATP sont des flippases et constituent une classe d'ATPases de type P qui utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter les aminophospholipides de la couche externe vers la couche interne des membranes cellulaires [292]. Les scramblases, sont des transporteurs lipidiques non spécifiques, indépendants de l'énergie mais dépendants du calcium. Elles assurent une distribution homogène des lipides nouvellement formés dans le réticulum endoplasmique ou dans la membrane plasmique d'une cellule activée [293]. Dans des conditions de stress et d'influx de calcium, l'activation des scramblases ou des floppases et l'inactivation de la flippase, provoquent une randomisation des phospholipides membranaires entre les deux feuillets et la PhSer exposée sur le feuillet externe confère à la membrane un caractère procoagulant [294]. En résumé l'activité nette flippase est inhibée en réponse à un stimulus et s'accompagne d'une augmentation des concentrations calciques intracellulaires tandis que les activités floppases et scramblases sont elles augmentées (cf. ci-dessous).

Des études récentes ont mises en évidence d'autres types de d'activité floppase. Le TMEM16F, une anoctamine contenant huit domaines transmembranaires, favorise le flip-flop aussi appelé scrambling, de manière calcium-dépendante et qui dépend de l'exposition à long terme au calcium [295]. Les anoctamines sont des canaux cationiques calcium-dépendants identifiés in-silico et dont le membre canonique est l'ANO1 [296] et qui possèdent un domaine spécifique



**Figure 23. La fonction des transporteurs de phospholipides [290].**

*La plupart des transporteurs de type floppases catalysent le transport des lipides, en utilisant l'ATP, du feuillet cytoplasmique de la bicouche vers le côté extracellulaire de la membrane tandis que le transport par les flippases se fait dans la direction opposée. Les scramblases sont des transporteurs indépendants de l'énergie et dépendants du calcium, ce qui assure le mouvement des phospholipides non spécifiques en fonction de leur gradient de concentration.*

*SM : sphingomyéline ; PE (ou PhEth): phosphatidyléthanolamine ; PS (ou PhSer) : phosphatidylsérine.*

pour le scrambling des phospholipides [296, 297]. En effet, Fuji et al ont montré une forte expression de TMEM16F dans les plaquettes activées des souris, tandis que les plaquettes des souris déficientes en TMEM16F présentaient des défauts d'exposition de la PhSer, et de la génération des MPs et des saignements [298]. TMEM16F est peut-être la floppase spécifique de l'externalisation de Phtdser.

Les patients atteints du très rare syndrome de Scott caractérisé dans sa forme homozygote par des hémorragies provoquées présentent en effet des mutations du gène TMEM16F. Elles se traduisent par un défaut d'externalisation de PhtdSer en réponse à l'influx calcique dans les plaquettes, érythrocytes et lymphocytes associé à un déficit dans la vésiculation [299]. Ce syndrome atteste du rôle hémostatique des MPs chez l'homme [300, 301].

### V.3.c Inducteurs de la rupture de l'asymétrie membranaire

Différents types de stimuli ont été décrits comme étant à l'origine de l'activation cellulaire et de la libération des MPs directement ou après une stimulation plus longue, comme la thrombine, les facteurs de croissance, l'hypoxie et les molécules inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Fas, etc..) mais aussi la privation de sérum. Le calcium intracellulaire est fortement augmenté après l'activation ou l'apoptose cellulaire suite à l'ouverture des canaux ioniques ainsi que la libération des stocks intracellulaire du calcium [302]. En outre, l'ouverture des pores mitochondriaux résultant de la dépolarisation de la membrane externe des mitochondries augmente la concentration du calcium intracellulaire, particulièrement dans les conditions d'apoptose ou de forte stimulation.

## V.4 Remodelage membranaire et vésiculation

Cette augmentation de la concentration de calcium intracellulaire conduit finalement à l'inhibition de la flippase et à l'activation de la floppase et de la scramblase [303]. Au cours de l'activation cellulaire, un transport plus rapide du PhSer vers le feuillet externe par rapport au transport inverse qui se produit plus lentement, conduit à une surcharge lipidique de la couche externe, qui se résoudra par la vésiculation (**Figure 24**). Par conséquent, la rupture de l'asymétrie membranaire est une étape prérequis et qui contribue à l'émission des MPs.

### V.4.a Dégradation du cytosquelette

L'intégrité du cytosquelette contribue au maintien de la forme cellulaire et de l'asymétrie membranaire, tandis que sa dégradation facilite le bourgeonnement membranaire dans les cellules stimulées. L'augmentation du calcium intracellulaire est directement liée à une

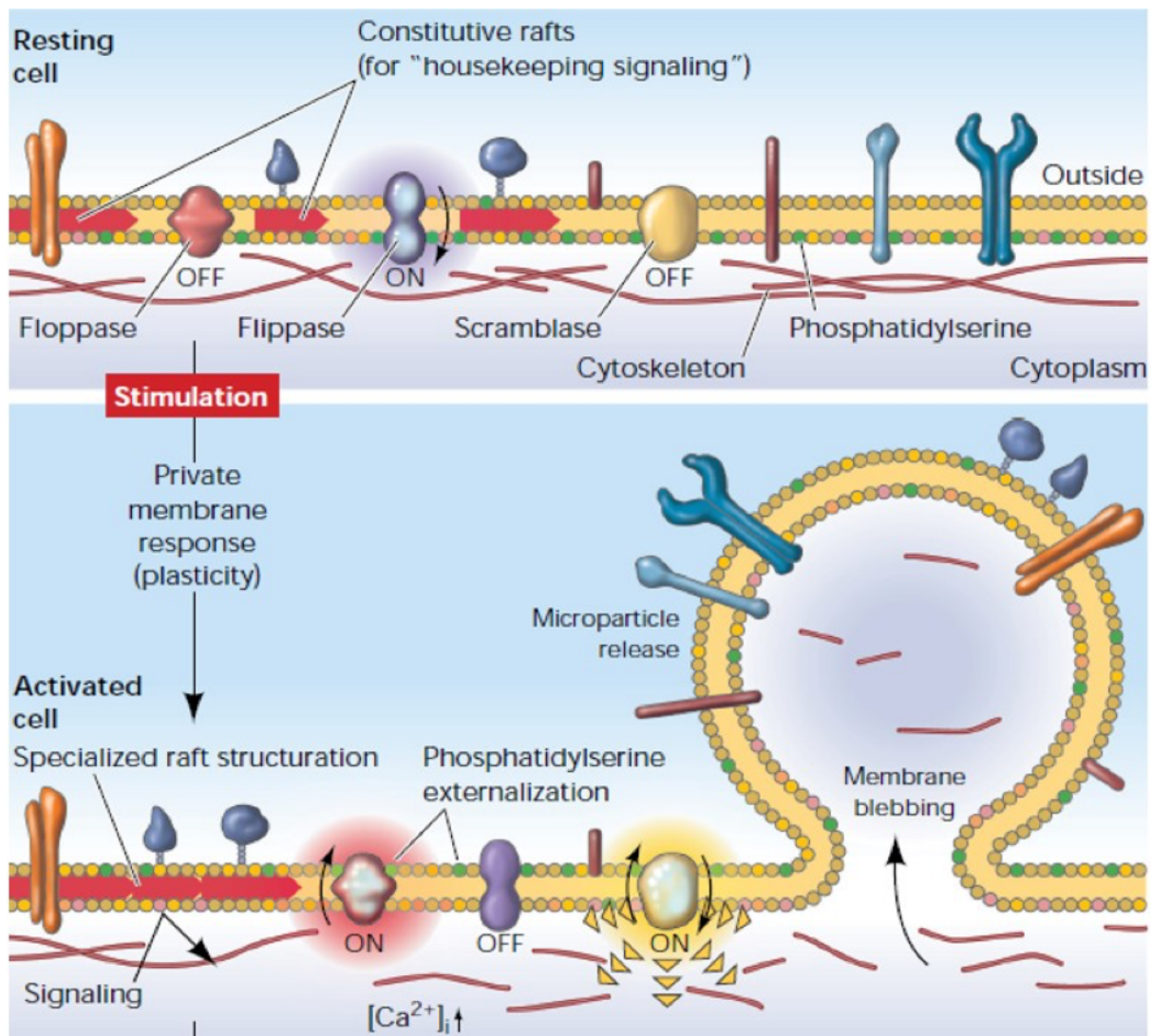


Figure 24. Les mécanismes membranaires responsables de la libération des MPs [287].

activité protéolytique des calpaïnes et des protéases à cystéines calcium-dépendantes comme les calpaïnes et les caspases qui contribuent lysent partiellement le cytosquelette en stimulant la dégradation de la filamine-1, de la gélosine, de la taline et de la myosine [304]. En outre, la caspase-3 activée est un facteur majeur dans la réorganisation du cytosquelette par le clivage de Rho-kinase-1 (ROCK-1) dans les plaquettes et ROCK-2 dans les cellules endothéliales, deux effecteurs des Rho GTPases [305, 306] (**Figure 25**).

#### V.4.b Les rafts

Après l'activation cellulaire, l'association de rafts forme des entités plus grandes et ordonnées [307]. En effet, la structure des rafts a été associée à un rôle biologique spécifique nécessaire au fonctionnement de la cellule, principalement pour assurer le tri des protéines et stabiliser les interactions privilégiées entre les constituants du radeau, en plus de jouer un rôle important dans la transduction du signal [308]. Ces zones constituent des plateformes protéolipidiques où l'activité du récepteur et les voies métaboliques en aval sont modulées, permettant le couplage entre les voies de signalisation extracellulaire et intracellulaire. Les rafts sont fortement impliqués dans l'adhésion cellulaire et les phénomènes de vésiculation. En effet, il a été démontré que la libération de MPs monocytaires, porteuses de facteur tissulaire, se réalisent à partir de rafts enrichis en TF et en glycoprotéine P-sélectine ligand-1 [309].

### V.5 Clairance des microparticules

Les MPs diffusent dans la circulation et échappent à la phagocytose principalement en raison de leur petite taille et la faible possibilité de « clusterisation » des antigènes. La demi-vie des MPs circulantes est difficile à explorer car leur concentration circulante est le résultat d'un équilibre dynamique entre production, capture, activation cellulaire secondaire et clairance. Les données parcellaires indiquent qu'elle varie avec l'espèce, le type cellulaire et le stress à l'origine de leur libération, de quelques minutes à plusieurs heures. Chez les humains, 70% des MPs restent détectables 3 heures après leur injection [310], alors que les MPs sont éliminées en moins de 30 minutes chez la souris [311] et 10 minutes chez le lapin [312]. Des travaux récents d'Augustine et collaborateurs ont montré que suite au stress cardiaque par la dobutamine, les MPs pro-coagulantes, plaquettaires, érythrocytaires et endothéliales sont libérées puis éliminées de la circulation au cours de l'heure suivante [313]. La clairance des MPs est étroitement régulée en fonction de divers facteurs tels que l'expression de la PhSer ou de la lactadhérine à leur surface ou à la surface des phagocytes.



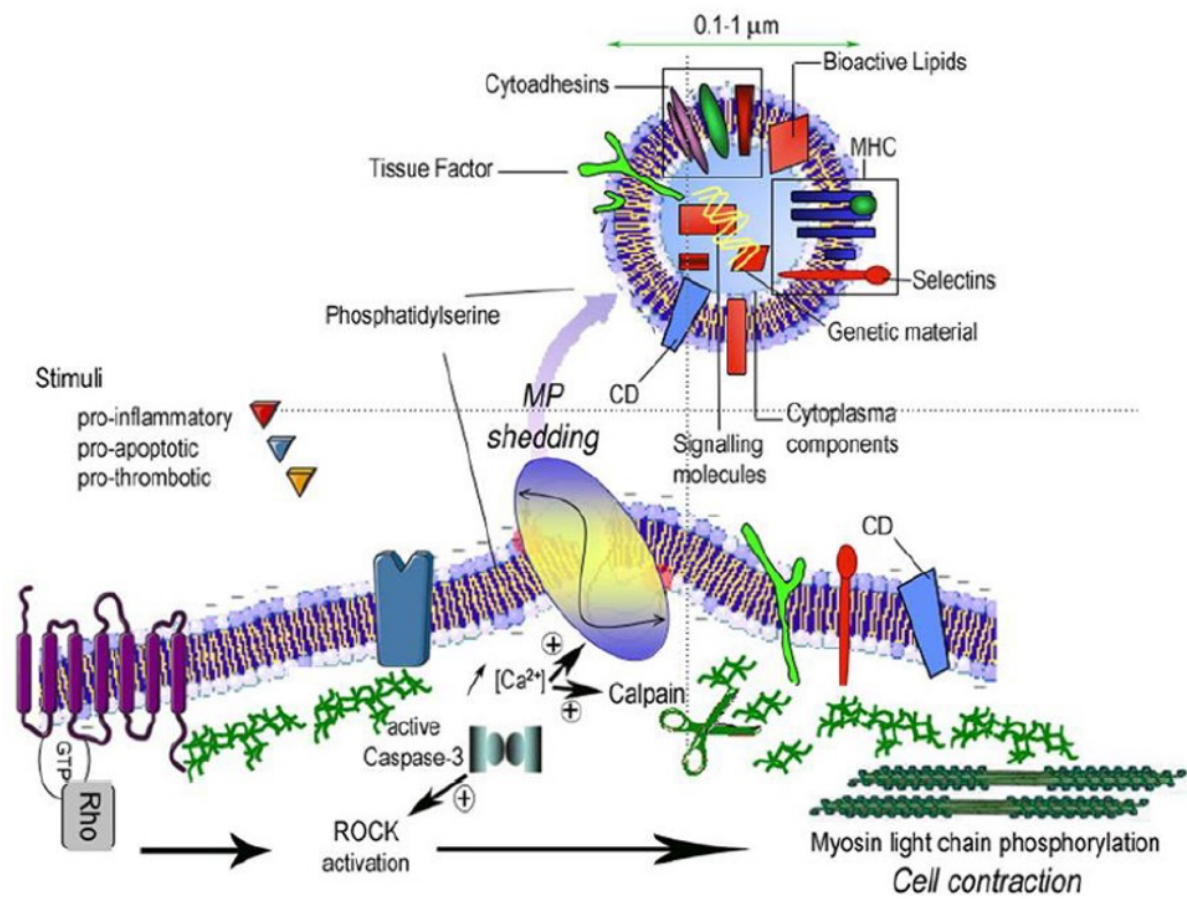


Figure 25. Remaniement du cytosquelette et formation des MPs lors du stress [314].

Dans les plaquettes, l'exposition du PhSer représente probablement un signal pour la clairance, des données expérimentales montrant une fonction adhésive réduite et une clairance améliorée des plaquettes sénescents susceptibles de limiter leur potentiel pro-thrombotique [315].

La lactadhérine est une glycoprotéine avec un domaine de type I discoïde bi-fonctionnel qui se lie au motif tripeptidique PhSer Arg-Gly-Asp (RGD) [316]. Elle est sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques immatures et joue un rôle clé dans l'élimination des MPs par les macrophages spléniques. In vitro, la lactadhérine améliore l'adhésion des MPs aux macrophages, ce qui facilite leur phagocytose [316] (**Figure 26**).

La lactadhérine n'est pas détectable dans le plasma des individus sains et a seulement été mise en évidence à la surface des MPs plaquettaires. La pertinence de la signalisation de la lactadhérine dans la clairance des MPs a été étudiée dans des modèles animaux.

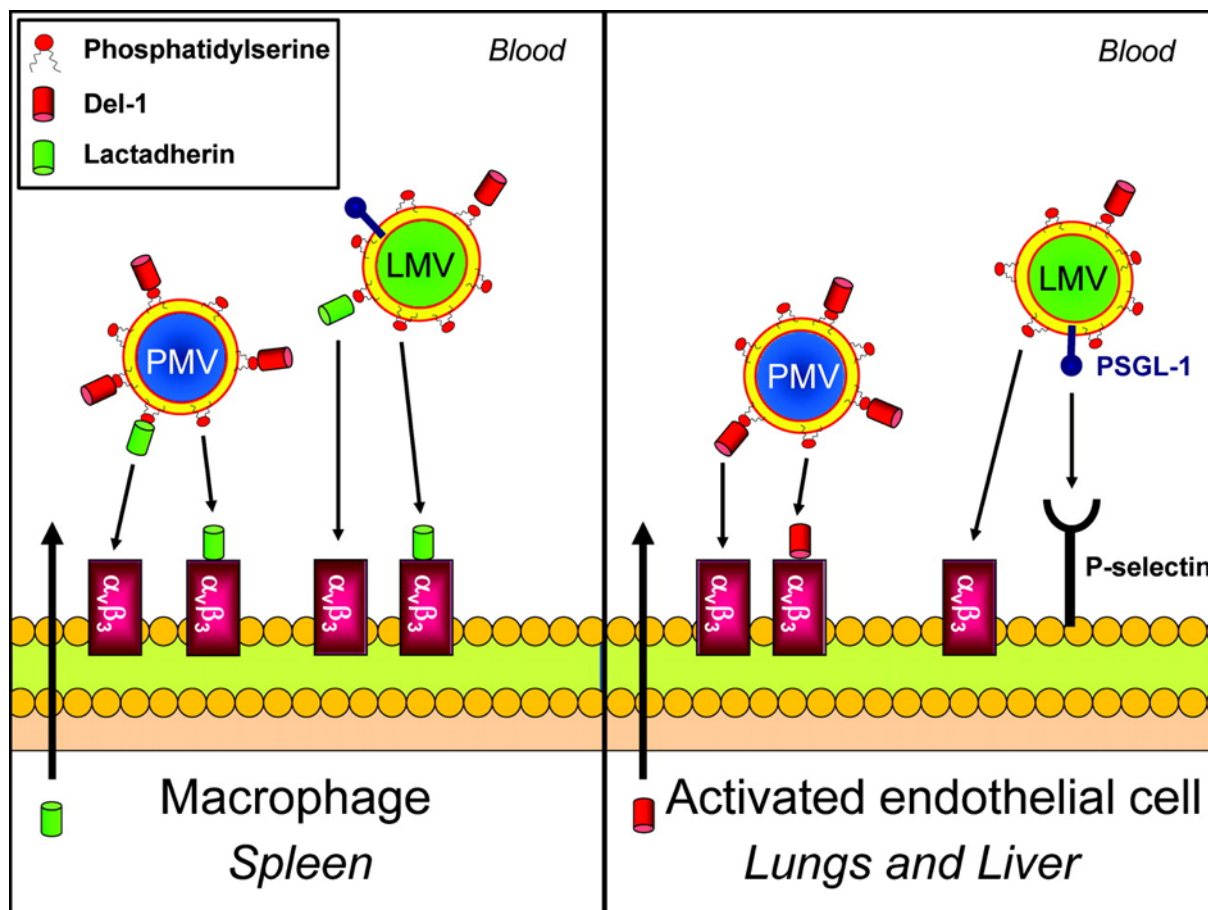
Dasgupta et *al.* ont montré que les souris déficientes pour le gène de la lactadhérine ont un taux plus élevé de MPs circulantes conduisant à un état d'hypercoagulabilité réversible après supplémentation en lactadhérine [316]. En 2012, la même équipe a décrit une nouvelle voie d'élimination des MPs qui impliquerait le glycoprotéin developmental endothelial locus-1 (Del-1) qui est sécrété par l'endothélium [317]. Del-1 possède un domaine de type I discoïde d'un motif RGD, lui permettant d'exercer sa fonction en se liant au PhSer de MPs et à l'intégrine  $\alpha\beta3$ . Del-1 était détectable chez les sujets sains, contrairement à la lactadhérine.

Chez les souris déficientes en Del-1, aucune augmentation des taux de MPs circulantes n'a été détecté par rapport au groupe témoin [317], peut être en raison du fait qu'elle n'est nécessaire qu'en conditions de stress endotoxinique. La clairance des MPs médiée par Del-1 dépend du phénotype des MPs, car elle ne permet pas l'élimination des MPs endothéliales de tous les territoires : Del-1 est seulement exprimé sur l'endothélium de certains tissus comme le cerveau et les poumons mais pas dans la rate et le foie chez la souris. Il faut noter que la liaison de Del-1 ou de l'annexine-5 plasmatiques se lient à la PhtdSer est également une source de sous-évaluation des MPs procoagulantes lorsque celles-ci sont mesurées sans lavage préalable.

## **V.6 Isolement et dosage des microparticules**

La recherche de biomarqueurs précoces d'une dysfonction est importante pour orienter la prise en charge du patient et limiter les conséquences des maladies chroniques. Parce que les MPs sont procoagulantes et sont la signature plasmatique d'une activation cellulaire alors que la cellule n'est plus détectable ou n'est pas accessible, leur potentiel en tant que biomarqueur d'un état thrombotique, de la dysfonction endothéliale et de l'inflammation est largement exploré [318].





**Figure 26. Les mécanismes impliqués dans la clairance des MPs circulantes [319].**

*Les cellules dendritiques et les macrophages sécrètent de la lactadhérine, facilitant ainsi l'interaction et la phagocytose des MPs par les macrophages spléniques. Dans le contexte d'endotoxémie, la voie médiée par Del-1 (developmental endothelial locus-1) favorise la clairance des MPs. Cette voie de clairance est activée après l'augmentation de l'expression d' $\alpha_v\beta_3$  à la surface des cellules endothéliales. Ainsi, Les cellules endothéliales activées expriment des molécules d'adhésion comme la P-sélectine, provoquant ainsi la capture des MPs leucocytaires qui expriment la P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1).*

*(LMV : leukocyte microvesicle; PMV, platelet microvesicle)*

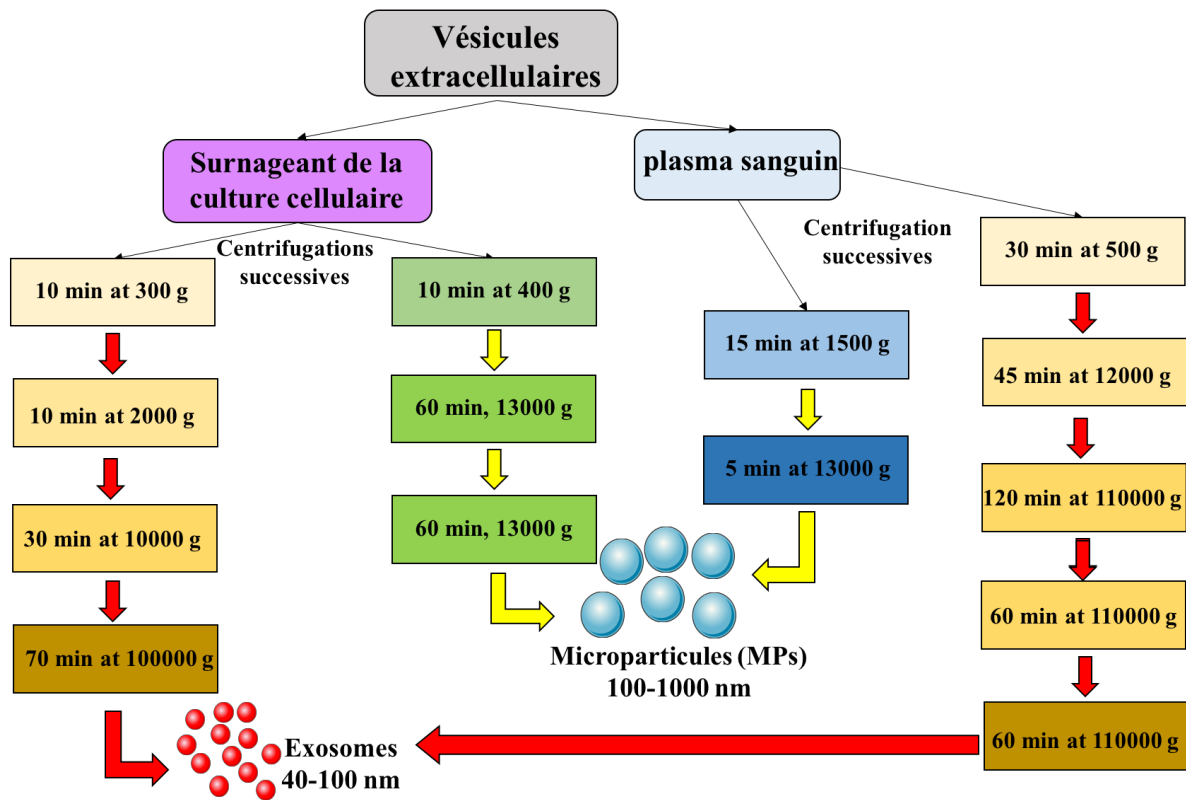
Les MPs circulantes sont isolées à partir du sang, en utilisant une méthode de centrifugation différentielle. Dans les modèles cellulaires, l'isolement peut aussi être réalisé à partir du surnageant et dans les modèles tissulaires après découpage standardisé du tissu et incubation dans un milieu d'extraction.[320] Le plus souvent une étape de centrifugation de vitesse faible est pratiquée pour éliminer les cellules et les débris (**Figure 27**). Dans la littérature, il existe de nombreuses approches utilisées pour la détection et la caractérisation des MPs. La phase pré-analytique est codifiée et remise à jour avec l'émergence de nouvelles techniques de détection par le comité scientifique SSC de biologie vasculaire de l'ISTH [321]. Les méthodes de dosages et de détection sont cruciales pour la définition de seuils de pathogénicité ou de scores biologiques. Les principales méthodes sont la cytométrie de flux et l'utilisation du dosage enzymatique à base de capture des MPs par un anticorps ou par l'annexine-5. Le caractère pro-coagulant est vérifié par la mise en évidence de la PhSer par marquage avec l'annexine-5 ou par dosage pro-thrombinase et par la mesure de l'activité du facteur tissulaire lorsque la MP est émise par une cellule susceptible de l'exprimer.

Toutes les méthodes utilisées présentent des limites, des avantages et des inconvénients, qui sont décrits en détail dans le **tableau 1**. Ces méthodes doivent être choisies en fonction de la source de MPs ou du tissu.

## **V.7 Les microparticules : Marqueurs pathogènes dans les désordres cardio-vasculaires**

### **V.7.a Microparticules, coagulation et thrombose**

La propriété la mieux établie des MPs est leur capacité à promouvoir la coagulation. Les MPs sont élevées dans les troubles d'hypercoagulabilité. Plusieurs études ont montré que la quantité des MPs circulantes, en particulier les MPs plaquettaires et endothéliales et leucocytaires, est liée à la gravité de la maladie. Les propriétés pro-coagulantes des MPs, principalement dues à l'exposition de la PhSer ou du TF, jouent un rôle central dans l'effet pro-thrombotique des MPs. En effet, Owens et al. ont montré dans des études réalisées *in vivo* sur des souris que les MPs porteuses de TF s'incorporent dans le thrombus en croissance [322]. En outre, plusieurs études ont démontré des niveaux élevés de MPs porteuses de TF dans divers troubles thrombotiques, et qui affectent le lit artériel, le lit veineux ou la microcirculation. Dans le compartiment artériel, au sein de la plaque d'athérosclérose, les MPs provenant des macrophages ou des cellules musculaires lisses abritent au moins 90% de l'activité du facteur



**Figure 27. Isolement des exosomes et des MPs.**

*Les exosomes et les MPs ont été isolés par une série de centrifugations successives à partir des vésicules extracellulaires de différents fluides biologiques (surnageant de culture cellulaire et du plasma sanguin).*

Protocole	Méthode de quantification	Avantages	Inconvénients
Cytométrie de flux	Utilisation de sondes de fluorescence et de propriétés de diffusion de la lumière des MPs en suspension	Disponible pour la plupart des installations de recherches, Rapide, Plusieurs antigènes peuvent être analysés dans un seul échantillon, MPs analysées individuellement	Limite de taille et impossibilité de détecter des MPs inférieur à 300-400 nm  L'identification de l'origine cellulaire dépend des anticorps
Elisa	Immunocapture des MP et quantification basée sur la présence d'antigène de surface	Disponible pour la plupart des installations de recherches, Facile, pas de restrictions de taille	Analyse effectuée par lots Aucune détermination de taille possible Quantification sur la base d'un seul antigène
Essais fonctionnels	Activité procoagulante ou prothrombinase des MPs	Disponible pour la plupart des installations de recherches, Fournit une indication de l'activité biologique	Analyse effectuée par lots, pas de détermination de la taille possible, mesure de l'activité procoagulante
Microscopie à force atomique	Numérisation des MPs en utilisant un microscope spécialisé	Détection précise de taille de MPs, Permet la détection de la structure 3D de MPs, Quantification des MPs	Technologie non universelle, la détermination de l'origine des cellules nécessite le développement de surfaces coatés d'anticorps spécialisés, ne conduit pas à de grands nombres d'échantillons
Nanoparticle tracking	Propriétés de diffusion de la lumière des MPs détectées, Capture vidéo du mouvement de MPs	Détection de la taille de MPs, Quantification des MPs	Technologie n'est pas facilement disponible, temps d'analyse longs, coûteux

**Tableau 2. Les différentes méthodes de mesure de MPs [318].**

tissulaire [323] alors qu'elles étaient presque indétectables dans les tissus sains adjacents ou dans l'artère mammaire [324]. Une étude récente a suggéré que les MPs endothéliales circulantes seraient prédictives de l'instabilité de la plaque chez les patients carotidiens [325]. Enfin, les MPs circulantes portant de TF représentent un réservoir de TF actif désigné sous le nom de « blood-borne TF » [326].

Le taux de MPs pro-coagulantes est élevé chez les patients diabétiques atteints de DT2, Cimmino et ses collaborateurs ont observé un taux plus élevé de MPs porteuses de TF corrélé avec l'augmentation de marqueurs d'activation de la coagulation [327]. De plus, l'augmentation de l'activité pro-coagulante des MPs chez les patients DT1 est corrélée avec l'HbA1c, suggérant que le potentiel pro-coagulant des MPs est associé à l'équilibre glycémique, probablement en raison d'une activation ou d'une sénescence cellulaire supérieure [208].

### V.7.b Microparticules, inflammation et dysfonction endothéliale

Divers stimuli pro-inflammatoires provoquent la libération des MPs pro-inflammatoires. Ce processus peut être considéré comme une forme d'inflammation stérile, qui implique la production de médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines et les chimiokines et favorise le recrutement de cellules inflammatoires [40]. Mesri *et al.* ont montré que les MPs leucocytaires favorisent la libération de cytokines inflammatoires, IL-6 et MCP-1, dans le milieu de culture des cellules endothéliales et l'induction de TF via la voie de JNK1 [328]. De plus, il a été rapporté que les MPs lymphocytaires T entraînent la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  par les monocytes [329]. Les MPs monocytaires stimulent la production d'IL-8 et de MCP-1 dans les cellules épithéliales bronchiques humaines [330], et les deux types des MPs monocytaires et endothéliales favorisent la production d'IL-6 et MCP-1 dans les podocytes humains [331]. A l'inverse, une autre étude a montré que les corps apoptotiques endothéliaux produits au cours de l'inflammation dépendent de l'IL-1 $\alpha$  [332].

A cet égard, le traitement par les MPs plaquettaires est associé à une expression accrue de l'ICAM-1 dans les cellules endothéliales cultivées favorisant le recrutement leucocytaire [333]. De plus, les MPs monocytaires activent la voie de NF-kB et augmentent l'expression des molécules d'adhésion [334]. D'autre part, il a été démontré que les MPs endothéliales se lient aux monocytes et favorisent leur migration transendothéliale [335].

Dans un modèle d'atteinte pulmonaire aigüe chez le rat, l'effet pro-inflammatoire propre des MPs endothéliales était associé à une dysfonction endothéliale, une lésion pulmonaire aiguë, une augmentation des taux des cytokines pro-inflammatoires systémiques et alvéolaires (IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ), une infiltration neutrophilique dans l'espace périvasculaire et des lésions

histologiques [336, 337]. De même, l'injection des MPs circulantes de patients septiques chez les souris entraîne l'augmentation de l'expression d'iNOS, de COX-2 et de NF- $\kappa$ B dans le cœur et les poumons, conduisant à la dysfonction vasculaire [338]. Des résultats similaires ont été retrouvés chez le rat septique [339] et étaient modulables pharmacologiquement.

Chez l'homme, la relation entre l'état inflammatoire, la libération de MPs et l'étendue de l'athérosclérose a été mise en évidence par le travail de Gilles Chironi. Dans cette étude réalisée chez des patients asymptomatiques, l'étendue de l'athérome détectée par échographie artérielle a été trouvée liée à des taux élevés de MPs circulantes leucocytaires indépendamment du score de Framingham Risk (utilisé pour estimer le risque cardiovasculaire à 10 ans d'un individu) [340].

### V.7.c Microparticules et stress oxydant

Plusieurs études ont mis en évidence les propriétés des MPs comme effecteurs cellulaires du stress oxydant dans les vaisseaux sanguins. Tual *et al.* ont montré que les MPs circulantes hypoxiques favorisent la dysfonction endothéliale dans l'aorte du rat et dans les artères pulmonaires, en réduisant la production de NO, un régulateur clé de la survie de l'endothélium. De plus, ces MPs présentaient une spécificité tissulaire avec un stress oxydant préférentiellement induit dans les cellules endothéliales pulmonaires [341]. L'action délétère des MPs est confirmée *in vivo* par l'injection chez des souris de MPs circulantes de patients atteints du syndrome métabolique qui réduit la relaxation dépendante de l'endothélium et l'expression d'eNOS et par conséquent la production de NO aussi confirmé dans des cultures de cellules endothéliales [342].

Cheng *et al.*, ont montré *in vitro* que les MPs endothéliales circulantes provoquent une dysfonction endothéliale via l'expression de Nox4 et la production de ROS dans les HUVEC [343]. D'autres études précisent un rôle des MPs lymphocytaires T qui diminuent la production de NO et augmentent le stress oxydant dans les cellules endothéliales via la xanthine oxydase [344]. De la même manière, les MPs lymphocytaires T de patients diabétiques limitent l'expression d'eNOS [345].

Les MPs monocytaires induisent la production endothéliale de ROS, essentiellement de l'anion superoxyde, parallèlement à l'expression rapide du facteur von Willebrand à la surface endothéliale, et à l'induction de TF fonctionnel, via la NADPH oxydase, les mitochondries, la xanthine oxydase et la cyclooxygénase [346, 347].

Brodsky *et al.* a initialement montré que les MPs endothéliales diminuent la production de NO dans des anneaux aortiques de rat et qui était associée à une altération de la fonction endothéliale

[348]. L'ensemble de ces résultats identifie une dysfonction endothéliale médiée par différentes sources de MP. Abbas *et al.* ont identifié le rôle du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale autocrine induite par les MPs sénescentes et susceptibles de circuler dans le plasma des patients atteints de syndrome coronarien aigu. Ces MPs induisent une accumulation de ROS et une augmentation de l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase dans les cellules endothéliales jeunes [249].

#### V.7.d Microparticules et diabète

La dysfonction endothéliale est un mécanisme pathogène central dans le développement des complications vasculaires liées au diabète. Des données originales ont montré que les concentrations de MPs circulantes endothéliales des patients DT2 augmentent au cours des complications thrombotiques et sont porteuses de facteur tissulaire [349]. Ettelaie et ses collaborateurs ont montré que les MPs porteuses de TF, libérées par les cellules mésangiales rénales en réponse au glucose, induisent la formation des capillaires dans les cellules endothéliales dermiques humaines [350]. Ces données suggèrent un rôle des MPs dans le développement d'un profil à risque cardiovasculaire dans le diabète [351].

Cependant, les mécanismes potentiels impliqués dans la libération accrue de MPs dans le diabète restent inconnus. Chez les souris diabétiques déficientes pour les récepteurs de la leptine le taux élevé des MPs endothéliales était en corrélation positive avec la concentration sanguine de glucose et avec le volume de l'infarctus après une lésion ischémique cérébrale [352]. Ainsi, des taux élevés des MPs endothéliales ont été associés à des taux accrus de LDL oxydés dans le plasma des patients DT2, suggérant que les LDL oxydés contribuent à la vésiculation de la membrane endothéliale [353].

En conclusion, l'altération vasculaire chez les patients DT1 entraîne un stress tissulaire qui à son tour, stimule la libération de quantités des MPs procoagulantes circulantes qui peuvent participer à la progression des complications du diabète. Ce pool potentiellement pathogène des MPs pourrait être un environnement délétère pour les îlots transplantés chez ces patients et amplifier le stress cytotoxique et ischémique au cours de l'IBMIR.

#### V.7.e Microparticules et sénescence

Récemment, plusieurs études ont suggéré une relation entre la sénescence endothéliale et les MPs. L'équipe de Burger a montré dans un modèle murin que le traitement des cellules endothéliales primaires d'aorte par les MPs ou l' $H_2O_2$  était associé à un phénotype non-proliférant, signifiant que les MPs induisent une sénescence prématurée, qui s'établissait via la

NADPH oxydase et les ROS mitochondriales [354]. Notre laboratoire a montré que les MPs des cellules endothéliales de coronaires de porc sénescents sont pro-inflammatoires, pro-sénescents et favorisent un phénotype thrombogénique. De plus, l'induction de la sénescence endothéliale prématurée était associée à une formation de ROS et un équilibre redox altéré [249]. Une autre étude de Brodsky et al. a montré que le développement d'une vasculopathie accélérée chez les rats diabétiques Zucker, était caractérisé par une augmentation de 6 fois du nombre de cellules endothéliales sénescents, une augmentation des taux de MPs, une diminution de la production de NO et une vasorelaxation [247]. En outre, Turner M et al. ont montré que le glucose élevé stimule la génération des MPs endothéliales [355], en accord avec les résultats de sénescence endothéliale induite par les concentrations de glucose identifiées par S. Khemais (cf chapitre endothélium).

Au cours de la transplantation d'îlots, l'ischémie-reperfusion est probablement à l'origine de la sénescence endothéliale dans l'îlot et à son voisinage, favorisant à son tour le recrutement des cellules inflammatoires et la génération des MPs endothéliales pro-sénescents mais aussi leucocytaires proinflammatoires qu'elles soient issues du donneur ou du receveur.

Les mécanismes exacts de la sénescence induite par les MPs restent encore un sujet de débat et ne sont pas étayés dans le domaine de la transplantation. Néanmoins, certaines MPs pourraient avoir un effet bénéfique post-greffe. Cantaluppi V *et al.* ont montré que des vésicules extracellulaires (MPs et exosomes) de cellules endothéliales progénitrices améliorent la vascularisation de pseudo-îlots constitués de cellules endothéliales et de cellules  $\beta$ . De plus, ces vésicules extracellulaires stimulent la sécrétion d'insuline, la revascularisation des îlots et la survie chez la souris [215]. Dans une étude plus récente, la même équipe a montré que les vésicules extracellulaires des îlots sont incorporées par les cellules endothéliales insulaires, et favorisent la reprogrammation cellulaire vers un phénotype pro-angiogénique et anti-apoptotique, suggérant un rôle dans la conservation de l'intégrité des fonctions endothéliales et cellulaires [356]. Ces données sont en accord avec les résultats de notre laboratoire qui indiquent également que les MPs sont des effecteurs dans la communication entre les cellules des îlots [357].

## **V.8 Les microparticules : biomarqueurs en transplantation**

Dans le domaine de la transplantation, les paragraphes précédents explicitent clairement l'ischémie reperfusion et les dommages vasculaires sont des causes de libération de MPs pro-coagulantes dans le vaisseau. Dans les organes fortement vascularisés, il est probable que l'atteinte tissulaire se traduise aussi par un déversement de MPs dans la circulation systémique.



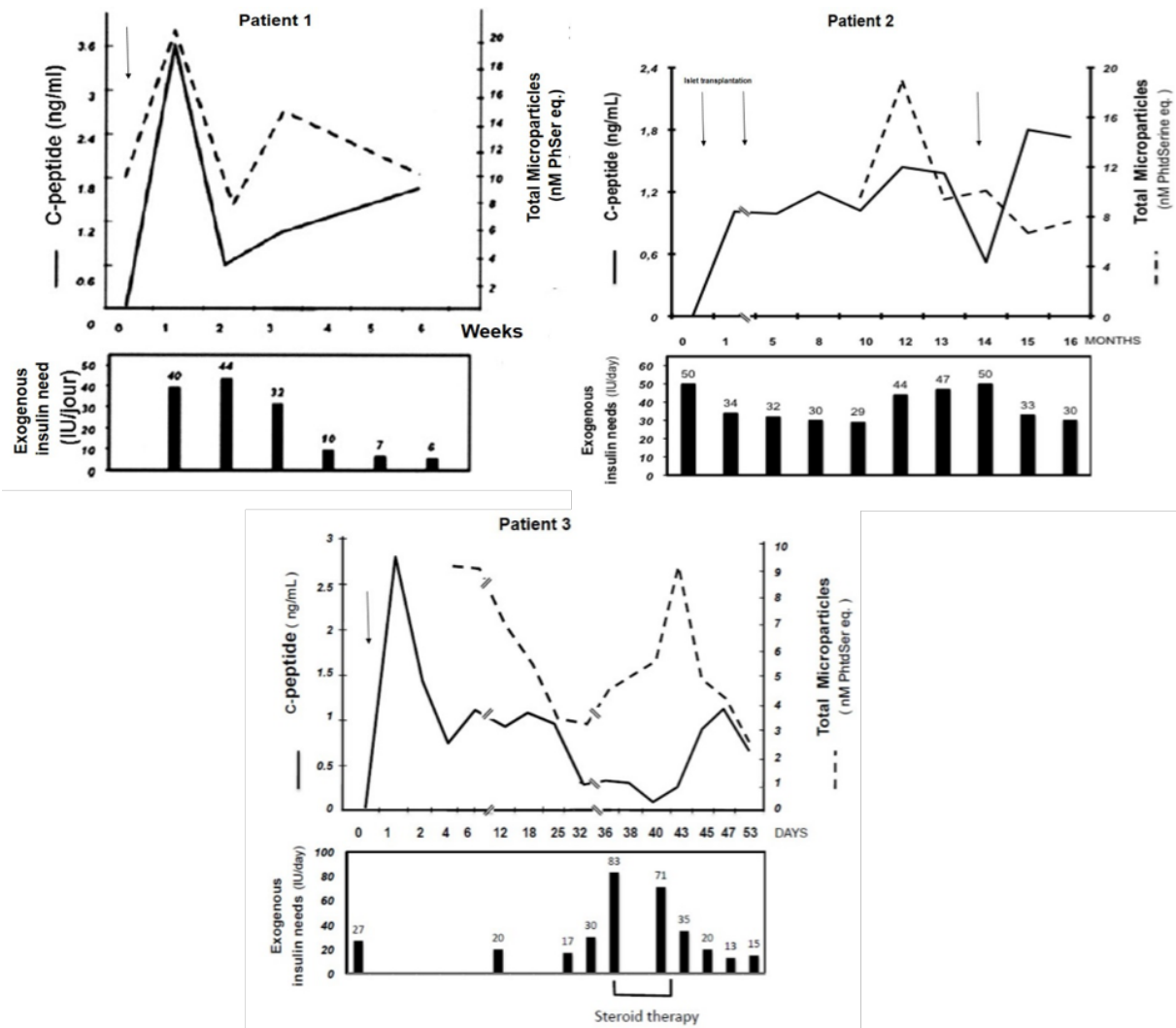
Selon plusieurs études cliniques, ces MPs seraient un outil précieux pour le diagnostic et l'évaluation de la perte précoce de la fonction du greffon [60]. On peut noter que l'origine cellulaire de la MP peut varier selon l'organe. Néanmoins les MPs porteuses de facteur tissulaire sont souvent retrouvées, ce qui ne préjuge pas de leur origine mais indiquent une élévation de l'état thrombogène.

#### V.8.a La transplantation d'îlots pancréatiques

En transplantation d'îlots pancréatiques, le suivi de la greffe a montré que le C-peptide sanguin est significativement réduit lorsque 95% du greffon est détruit, constituant donc un marqueur tardif de la dysfonction des îlots. Une fois transplantés, les îlots pancréatiques sont dispersés dans l'arbre vasculaire hépatique, ce qui rend très difficile l'obtention de biopsies informatives de l'état des îlots greffés.

Les MPs semblent donc intéressantes en tant que marqueur non invasif de l'état du greffon, et en évitant les limites des biopsies. Dans ce cadre, notre laboratoire a étudié chez des patients greffés d'îlots pancréatiques, les modifications du C-peptide, le taux des MPs et le besoin en insuline [358]. Toti et al. ont montré que dans le cas du patient 1, la transplantation d'îlots est immédiatement associée à une augmentation simultanée du C-peptide plasmatique et du nombre total des MPs, révélant la fonctionnalité du greffon et le remodelage intense de la membrane pendant la première semaine post-transplantation (**Figure 28**). Dans le cas du patient 2, la transplantation d'îlots stabilise le taux de C-peptide après 6 semaines. Ensuite, le taux total de MPs et de C-peptide varie d'une façon opposée lors d'un éventuel rejet. En effet, un pic des MPs circulantes totales observé un mois avant la remontée des besoins en insuline et la diminution de C-peptide. La fonction du greffon est restaurée après une deuxième transplantation d'îlots, tandis que le taux de MPs se normalise suggérant qu'elles constituent un biomarqueur pertinent [358].

Ces résultats suggèrent que le pic des MPs pourraient avoir une valeur pronostique de rejet aigu comme une signature soit du dommage vasculaire soit de la perte de la masse insulaire. Des études longitudinales sont en cours au laboratoire pour identifier un profil de MPs caractéristique de la fonctionnalité de l'îlot. Les mesures incluent la recherche des MPs de cellules vasculaires d'origine leucocytaire (monocyte, lymphocytes et neutrophiles), endothéliale, plaquettaire et également la recherche de MPs porteuses de PSA-NCAM un marqueur de la cellule à insuline. Ce dernier dosage a nécessité la mise au point d'une technique ultra-sensible mis au point dans la cohorte des hôpitaux de Strasbourg MIPIL et est maintenant



**Figure 28. Variations du C-peptide, du besoin d'insuline et de taux de microparticules circulantes lors de la transplantation d'îlots [358, 359].**

Le C-peptide (lignes pointillées), les MPs (ligne continue) et le besoin "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.

utilisé pour explorer la cohorte multicentrique STABILOT (Abstract publié de thèse de Lamia Amoura [360] (cf. présentation article 2 et discussion).

### V.8.b La transplantation cardiaque

Une étude réalisée par Morel *et al.* dans un groupe de 64 patients dont 23 en rejet aigu, a montré une augmentation significative des MPs pro-coagulantes porteuses de TF et Fas lors d'un rejet aigu [267]. Ces données suggèrent que le rejet aigu est associé à une apoptose cellulaire via Fas et est caractérisé par une libération importante de MPs. De plus, les chercheurs ont observé une corrélation entre la durée de l'ischémie et la concentration de MPs endothéliales mesurée deux jours post-greffe. Enfin, Garcia *et al.* ont montré que le ratio des MPs endothéliales E-sélectine<sup>+</sup>/MPs et plaquettaires PECAM<sup>+</sup> serait des indicateurs du degré d'activation ou d'apoptose cellulaire [361].

### V.8.c La transplantation pulmonaire

Dans la transplantation pulmonaire, le dysfonction aiguë du greffon survient au moins dans un tiers des cas de décès signalés au cours du premier mois post-opératoire. Malgré le perfectionnement des techniques et procédures de prélèvement et de greffe, les mécanismes cellulaires de lésions d'ischémie-reperfusion au cours de la greffe, il persiste un manque de marqueur précoce. Notre équipe a montré que les MPs alvéolaires sont un marqueur de la lésion ischémique dans des modèles expérimentaux de reperfusion *ex-vivo*. Dans cette étude, les poumons de rats soumis à une reperfusion chaude après une durée plus longue d'ischémie froide produisent des quantités plus élevées des MPs circulantes, alors que les poumons qui ne sont pas soumis à l'ischémie froide ne produisent pas des MPs. Ces données suggèrent que les MPs peuvent être utiles pour évaluer l'étendue des lésions d'ischémie-reperfusion pulmonaire et prédire l'apparition d'une dysfonction aiguë du greffon [362].

### V.8.d La transplantation rénale

Chez les insuffisants rénaux, Al-Massarani et collaborateurs ont mis en évidence une normalisation de la concentration en MP endothéliale au cours de l'année post-greffe, attestant de l'amplitude de l'atteinte endothéliale vasculaire chez ces patients sévères. A un an les taux les plus bas étaient observés chez les patients indemnes d'affection cardiovasculaire [363]. Parallèlement, cette même équipe a rapporté que les immunosuppresseurs avaient des effets différenciés sur le taux de MPs : Le traitement par tacrolimus et mycophénolate mofétil

favoriserait la génération de concentrations supérieures de MPs endothéliales comparativement à celui par cyclosporine/ azatropine [364].

#### V.8.e La transplantation de cellules souches mésenchymateuses

Parce que le facteur tissulaire est associé à l'hypercoagulabilité et l'ischémie reperfusion et qu'il est véhiculé sous forme active par les MPs, de Rop et coll. ont étudié sa pertinence diagnostique dans le devenir de la greffe allogénique de cellules souches chez 60 patients suivis pendant en moyenne 3 ans. Les données montrent une survie abaissée chez les patients ayant les concentrations de TF+-MPs les plus élevées au moment de la greffe [365].

## *Hypothèse et Objectifs*

---

## V Hypothèse et objectifs

Les lésions d'ischémie-reperfusion inhérentes à la transplantation, affectent la qualité du greffon et le succès de la greffe. L'endothélium est central pour la vascularisation du greffon et est une des premières cibles de l'ischémie-reperfusion.

IBMIR qui est une forme particulière d'ischémie-reperfusion déclenchée au cours de la transplantation d'îlots pancréatiques par voie intra-portale et représente une étape déterminante pour la survie des îlots transplantés. Peu d'information sont disponibles sur les mécanismes cellulaires de l'IBMIR susceptibles d'affecter l'endothélium. Néanmoins, deux mécanismes non-exclusifs peuvent être envisagés : (i) le recrutement de cellules leucocytaires favorisant un contexte pro-inflammatoire de l'endothélium intra-insulaire ou hépatique (ii) une sénescence endothéliale entraînant une dysfonction endothéliale dommageable à la prise de greffe et à la revascularisation, que cette sénescence soit liée à la qualité du greffon (âge du donneur) ou accélérée chez le receveur (instabilité glycémique, âge).

Les données de la littérature suggèrent que les microparticules (MPs) sont des marqueurs circulants de la dysfonction endothéliale en transplantation rénale ou cardiaque [267, 363]. De plus, les MPs de cellules endocrines libérées en réponse au stress cytokinique ou inflammatoire sont des effecteurs autocrines pro-coagulants, pro-inflammatoires et pro-apoptotiques *in vitro*. Par ailleurs, le laboratoire a montré que les MPs endothéliales sont susceptibles d'interagir avec les cellules  $\beta$  notamment en condition de stress cytokinique et oxydant [357].

De plus, l'injection des MPs circulantes des patients septiques chez les souris entraîne l'augmentation de l'expression des marqueurs de l'inflammation dans le cœur et les poumons, conduisant à la dysfonction des organes [338]. Enfin, les données *in vivo* et *in vitro*, indiquent que les MPs endothéliales sont des cibles pharmacologiques dont les propriétés varient avec le traitement du receveur (immunosuppresseurs, protéine C activée) [339, 366].

Nous émettons l'hypothèse que les MPs leucocytaires, produites par les cellules recrutées abondamment au voisinage de l'îlot greffé, induisent au cours de l'IBMIR une sénescence endothéliale et que les MPs secondairement émises par la cellule endothéliale sont des acteurs pro-sénescents pour l'îlot pancréatique.

Plusieurs objectifs ont été poursuivis :

- ❖ Identifier d'éventuelles propriétés effectrices des MPs leucocytaires sur la fonction et la survie des principales cellules constitutives de l'îlot : Les cellules endocrines et les

cellules endothéliales

- ❖ Caractériser dans un modèle d'étude ex-vivo la réponse induite par les MPs leucocytaires dans la cellule endothéliale primaire en utilisant la rate comme source de MPs de splénocytes de rat et identifier l'origine cellulaire des MPs responsables et les acteurs moléculaires de la sénescence, de l'apoptose et de la réponse inflammatoire et pro-coagulante.
- ❖ Etudier l'impact des MPs endothéliales pro-sénescentes dans la sénescence accélérée des îlots pancréatiques isolés.

## *Article 1*

---



## Article 1: soumis à American Journal of Transplantation

Significance of immune cell-derived microparticles in ischemia reperfusion: Induction of endothelial senescence and vascular dysfunction. **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.

**Contexte :** L'altération endothéliale est une conséquence principale de l'ischémie reperfusion et un inducteur potentiel de réponses pro-coagulantes et pro-inflammatoires via le recrutement des leucocytes et l'agrégation plaquettaire à la surface de l'endothélium inflammé qui acquière des propriétés pro-coagulantes et potentiellement thrombogéniques.

La lésion d'ischémie-reperfusion (IRI) est une cause majeure et précoce de l'échec de la greffe caractérisé par un stress oxydant et une réponse inflammatoire susceptible de provoquer une dysfonction du greffon péri-opératoire ou à plus long terme si l'agression endothéliale persiste. En effet, l'endothélium est central pour la vascularisation du greffon et sa perfusion.

Un exemple particulièrement explicite est celui de l'IBMIR, une forme particulière d'IR dans la transplantation d'îlots pancréatique responsable de la destruction de plus de 50% des îlots dans les premières heures post-greffe. En péri-opératoire, cette réaction inflammatoire aiguë est accompagnée d'une réponse pro-coagulante locale, d'une infiltration leucocytaire au voisinage des îlots et favorisent la libération des MPs leucocytaires porteuses de TF pro-coagulant et qui sont susceptibles d'interagir avec deux endothéliums fortement fenestrés : l'endothélium hépatique au voisinage du greffon ou celui du capillaire intra-insulaire.

Le laboratoire a montré à partir de prélèvements sanguins de patients diabétiques de type 1 greffés d'îlots que des taux élevés de MPs circulantes pro-coagulantes sont associées à la perte de fonction des îlots greffés [358]. Des travaux sont en cours pour analyser le phénotype de ces MPs pré-greffe et post-greffe. En effet, si les MPs d'origine endothéliale sont des marqueurs pertinents de désordres cardiovasculaires, de l'hypertension artérielle pulmonaire et du rejet de greffe cardiaque [268, 367], la transplantation cellulaire est une situation très différente. En effet, l'ischémie concerne une structure fonctionnelle autonome (l'îlot) et son capillaire intracellulaire, tandis que la reperfusion n'est pas consécutive à une suture de vaisseaux mais à l'angiogenèse connectant l'îlot à la circulation secondaire hépatique [13].

Parce que le vieillissement cellulaire est associé à la sénescence et à la dysfonction cellulaire, et que l'endothélium est central dans l'IRI, nous nous sommes posés la question de l'importance des MPs dans la propagation de la sénescence endothéliale au cours de la transplantation. En effet, le laboratoire a mis en évidence l'action pro-sénescence autocrine des MPs endothéliales libérées par les cellules endothéliales sénescences et susceptibles de circuler chez les patients atteints de syndrome coronarien [249]. De plus, l'équipe a montré *in vitro* que les MPs de cellules endothéliales libérées par action pharmacologique après traitement par la protéine C activée (Xigris), protègent la cellule  $\beta$  sécrétrice d'insuline de l'action autocrine nocive de ses propres MPs émises en réponse au stress oxydant et cytokinique, deux conditions caractéristiques de l'IBMIR qui amplifient la perte de fonction des cellules  $\beta$ , en limitant la sécrétion d'insuline [366].

**Objectifs et méthodologie :** L'objectif de cette étude est d'identifier et caractériser l'effet pro-sénescence sur la cellule endothéliale de MPs des cellules immunitaires, susceptibles de circuler au cours des mécanismes de rejet de transplantation et particulièrement lors de l'IRI.

Nous nous sommes orientés vers un modèle de production de MPs *ex-vivo* à partir de splénocytes de rat, pour nous rapprocher de la réponse multicellulaire physiopathologique et dans la perspective d'une future modulation pharmacologique par des traitements *in vivo*. Les MPs de splénocytes (SMPs) ont été générées dans des conditions mimant la réponse immunitaire innée et adaptative et leurs effets sur la fonction endothéliale à l'échelon cellulaire et vasculaire ont été comparés. Pour cela, la sénescence et la dysfonction endothéliale induites par les SMPs ont été étudiés dans des cultures des cellules endothéliales primaires au passage 1 (P1 ECs) de coronaires de porc et la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium dans des anneaux d'artères coronaires. La spécificité du caractère pro-sénescence a été caractérisée par mesure de l'activité SA beta galactosidase et par l'absence d'effet pro-apoptotique attesté par cytométrie en flux et western blot.

**Résultats principaux :** Nous avons établi que les splénocytes sont des sources de MPs de la réponse innée ou adaptative et montré que les SMP<sub>LPS</sub> et SMP<sub>PMAI</sub> (splénocytes stimulés soit avec lipopolysaccharide (SMP<sub>LPS</sub>) ou avec une combinaison de phorbol méristate acétate et calcium ionophore (SMP<sub>PMAI</sub>)) partagent des propriétés sénescences sur l'endothélium coronarien. Leur action est précoce, dépendante de l'activation des voies MAPKinase, TAK-1 et PI3-kinase, et a été confirmée par inhibition pharmacologique. Nous avons aussi montré que la sénescence endothéliale induite par les SMPs se traduit par une dysfonction endothéliale in

vitro avec : un stress oxydant, une réponse inflammatoire précoce conduisant à un phénotype probablement thrombogénique en raison du système de l'angiotensine locale augmenté, de l'activité pro-coagulante apportée par le TF et la génération secondaire de MPs endothéliales, et de l'expression induite de molécules d'adhésion favorisant le recrutement leucocytaire. Enfin, la dysfonction endothéliale induite par les SMPs a été confirmée par l'étude du tonus vasculaire dans les anneaux d'artères coronaires. Dès 12h de contact avec les SMPs, la relaxation dépendante de l'endothélium était significativement diminuée et le profil d'expression de protéines endothéliales clés dans l'équilibre redox et la réponse inflammatoire (eNOS, COX-2 et VCAM-1) était modifié.

**Perspectives :** Si nos résultats indiquent un effet propre des MPs de la réponse immune pour des concentrations de 10-30 nM, leur potentiel d'amplification de la dysfonction endothéliale en présence de cytokines et de stress oxydant modéré reste à vérifier, car cela a été observé dans d'autres modèles de réponse cellulaire [357], notamment de la cellule sécrétrice d'insuline.

Dans le cadre de l'IBMIR, ces résultats devront être confirmés dans des cultures de cellules endothéliales hépatiques primaires qui sont connues pour être très sensibles au stress oxydant. De manière intéressante, le couplage entre inflammation et sénescence a été proposé par Fintz et collaborateurs dans le cadre de la pancréatite chronique. Ils ont observé que la sénescence répliquative des cellules pancréatiques stellaires, ou prématurée induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, favorisait la production d'IL-6 et que les tissus pancréatiques fortement sénescents montraient une invasion leucocytaire avec la perte d'activité réparatrice des cellules stellaires pancréatiques [368]. Cette observation souligne l'importance de l'étude des MPs leucocytaires susceptibles de propager la réponse sénescence dans les tissus pancréatiques de manière multiple.

Nous n'avons pas identifié une molécule responsable des effets pro-sénescents des SMPs. Par contre, les expérimentations de déplétion immuno-magnétique des neutrophiles dans la suspension de SMP<sub>LPS</sub> indiquent l'importance des MPs d'origine neutrophilique dans l'induction de la sénescence. Ces données sont cohérentes avec le rôle bien établi de la réponse innée dans les réactions d'IRI et dans l'immunothrombose [369]. Ils doivent être complétés pour confirmer la significativité. De plus, pour confirmer la pertinence vision physiopathologique des SMPs, les cellules endothéliales doivent être traitées par des microparticules circulantes de patients en rejet de transplantation ou en situations d'IR. Cette démonstration se heurte à deux prérequis : l'analyse de la cinétique de libération des MPs chez

ces patients et la disponibilité d'échantillons plasmatiques en quantités suffisantes.

Des résultats préliminaires en collaboration avec la plateforme de transcriptomique de l'IGBMC (Christelle THIBAUT-CARPENTIER) ont montré la faisabilité de l'extraction et de l'amplification des miARN des SMPs produites selon notre protocole. En effet, les quantités de miRNA dans les SMPs sont largement suffisantes pour l'analyse individuelle de chaque rat. Il sera poursuivi pour identifier d'éventuels miARN caractéristiques du stress inducteur (cf ci-dessous).

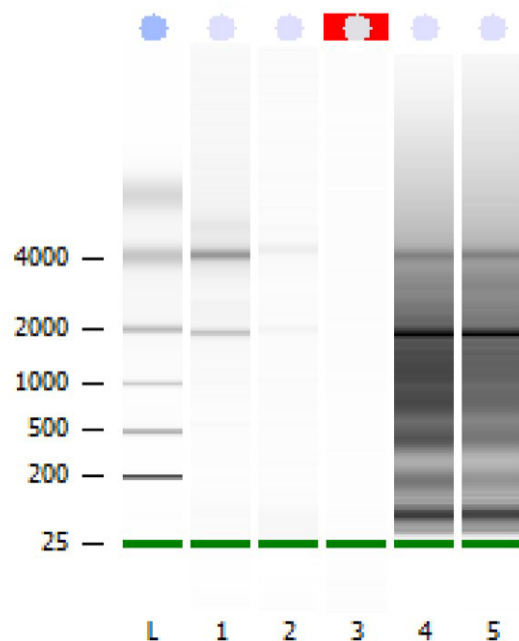
*Cette illustration représente les profils des ARNs totaux contenus dans les SMPs déposées sur puce Agilent. Ces données confirment que les quantités de matériel génétique obtenir à partir d'une rate sont suffisantes pour la construction d'une bibliothèque, le séquençage et l'identification des miARNs.*

*L : Ladder (marqueur de poids),*

*1 et 2 : Echantillons d'ARNs de référence*

*4 : Echantillon d'ARN des SMPs naïves*

*5 : Echantillon d'ARN des SMP<sub>LPS</sub>*



L'ensemble de nos résultats établit les splénocytes comme une source de MPs de la réponse immune pour l'étude de leurs effets sur la sénescence. En effet, comparativement aux nombreuses études réalisées à partir de MPs plasmatiques chez le rat, la rate permet la collecte de quantités importantes de MPs leucocytaires (0.42 nmoles de MPs par rate vs 0.1 nmoles à partir du plasma). A plus long terme, ils laissent envisager l'étude de traitements systémiques potentiellement modulateurs des propriétés des SMPs examinés *in vitro* ou *in vivo* après ré-injection chez l'animal transplanté.

# **Significance of immune cell-derived microparticles in ischemia reperfusion: Induction of endothelial senescence and vascular dysfunction**

**Ali El Habhab**<sup>1</sup>, Raed Altamimy<sup>1</sup>, Abbas Malak<sup>2</sup>, Mohamad Kassem<sup>1</sup>, Guillaume Kreutter<sup>1</sup>, Lamia Amoura<sup>1</sup>, Sonia Khemais-Benkhiat<sup>2</sup>, Fatiha Zobairi<sup>1,5</sup>, Valérie B. Schini-Kerth<sup>1,3</sup>, Laurence Kessler<sup>1,4,5</sup>, Florence Toti<sup>1,3</sup>

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

2. UMR CNRS 7213, Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

3. Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

4. Department of Diabetes and Nutrition Endocrinology, University Hospital of Strasbourg,

5. Faculty of Medicine, Federation of Translational Medicine (FMST), Strasbourg, France

**Running title:** MPs, ischemia reperfusion, endothelial senescence

## **Corresponding author:**

TOTI Florence

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

Faculty of Pharmacy

74 route du Rhin, BP 60024

67401 Illkirch-Graffenstaden, France

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

## Abstract

**Background:** Endothelial-derived microparticles (EMPs) are surrogate markers of vascular injury after ischemia reperfusion, their elevated plasma levels identifying graft dysfunction or rejection. EMPs are also pro-senescent endothelial effectors. We examined the impact of MPs of leukocyte origin on endothelial cell function under conditions mimicking innate and adaptive immune responses.

**Methods:** MPs were generated from rat splenocytes (SMPs) treated by 5 $\mu$ g/ml LPS or 25 ng/ml PMA-1 $\mu$ M A23187 ionophore. SMPs (1-30 nM) were incubated with primary porcine coronary endothelial cells (ECs) at passage 1 or coronary artery rings. Senescence was assessed by senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity (SA- $\beta$ -GAL), oxidative stress using dihydroethidium, tissue factor activity by Tenase assay, protein expression by western blot and confocal microscopy.

**Results:** SMPs were captured by 82% of cultured ECs as shown by PKH26 staining. SMPs (30 nM) induced a significant 3-fold raise in SA- $\beta$ -GAL after 48 h, and up-regulated senescent markers p53, p21, p16 without apoptosis. AT1, ACE were up-regulated. A 2-fold up-regulation of NADPH oxidase subunits and 3-fold down-regulation of eNOS indicated a SMP-driven oxidative stress and blunted ring relaxation. SMPs were pro-coagulant, prompting TF activity and a secondary generation of EMPs. They up-regulated the inflammatory makers VCAM-1, ICAM-1, COX-2 but not COX-1, after 24h in ECS and 12h in rings. In addition, early SMPs-induced phosphorylation of NF- $\kappa$ B p38, ERK, JNK and AKT occurred after 1h. A 80% depletion in leucocyte-derived MPs reduced senescence by 60%.

**Conclusion:** Findings indicate that immune MPs promote premature endothelial senescence and thrombogenicity through redox-sensitive activation of MAPKs and PI3-kinase/Akt, and endothelial and vascular dysfunction. Graft pre-conditioning and the control of pro-senescent MPs shedding could preserve ECs at graft vicinity in the early stages of ischemia reperfusion to favor optimal graft vascularization and delay its dysfunction.

## Introduction

Endothelial damage is a prime sensor of ischemia reperfusion (IR) and a potential inducer of pro-coagulant and pro-inflammatory responses via leukocyte and platelet recruitment. Ischemia reperfusion injury (IRI) is a major cause of graft damage characterized by oxidative stress and inflammation. Upon restoration of blood flow, IRI generates at site of engraftment reactive oxygen species (ROS), the release of cytokines, and prompts the expression of adhesion molecules by endothelial cells (ECs), and consecutive leukocyte adhesion and extravasation into the post-ischemic tissues [1]. In addition, chemokines released by donor and recipient tissues favor neutrophil and monocyte recruitment in the early stages of reperfusion [2], eventually amplifying IRI-induced inflammation. Consecutively, graft damage initiated during the ischemic period and persisting after reperfusion would favor immediate or acute rejection peri-transplantation, as typified in pancreatic islet transplantation. Indeed, owing to islet isolation (ischemia) and their injection into the portal vein (reperfusion), this cellular therapy is associated with a particular form of IR termed Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR), that causes 50%–70% islet loss within the first 48 h [3]. The noxious interaction between the damaged endothelium and the leukocyte recruitment during IR is also demonstrated ex-vivo and in animal models of islet transplantation [4].

Indirect signs in favor of an endothelial-related graft failure come from the study of circulating endothelial cells and more often from the measurement of the endothelial-derived microparticles (EMPs), as a signature of endothelial damage [5]. In cardiac transplantation, elevated plasma levels of EMPs were associated with rejection and time cold-ischemia [6]. Conversely, in patients with renal failure, EMP levels decrease after transplantation, indicating endothelial recovery [7].

Microparticles (MPs) are (0.1–1.0  $\mu$ m) fragments shed from the plasma membrane of activated or apoptotic cells, that are released in body fluids [8]. MPs harbor cell membrane proteins and contain active lipids, proteins and mRNA, making them pro-inflammatory and pro-coagulant cellular effectors. They also identify the cell lineage from which MPs were stemmed [9, 10]. A common feature of MPs is their pro-coagulant properties relying on (i) the exposure of phosphatidylserine that catalyzes the assembly of blood coagulation complexes and (ii) the eventual presence of tissue factor (TF), the cellular initiator of blood coagulation inducible at endothelial and leukocyte surfaces.

Pro-coagulant MPs were identified in the plasma of patients with islet graft rejection, possibly in association with IR [11, 12]. Local coagulation events characterized elevated TF expression at graft vicinity were identified in IBMIR [13, 14]. Furthermore, TF borne by MPs is active and elevated TF<sup>+</sup>-MPs were associated with myocardial rejection [15] and a worsened outcome in stem cell transplantation [16]. In a previous report, we showed that TF<sup>+</sup>-MPs released from insulin-secreting cells after cytokines or oxidative challenge act as autocrine inflammatory effectors reducing insulin secretion [17]. This latter observation suggests that conditions associated with IR could favor MP-driven graft dysfunction through multiple cell lineages.

Circulating MPs originating from platelets, lymphocytes, monocytes activated by inflammation are likely to favor leukocyte recruitment at the surface of the inflamed endothelium known to expose adhesion molecules, such as ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin [18-20]. In addition, pro-coagulant alveolar MPs were also found surrogate markers of strong IRI in a rat ex-vivo lung reperfusion model, indicating their relevance in other cellular compartments than blood [21].

Little is known on the role of ageing on the endothelial damage and eventual vascular dysfunction, possibly altering engraftment. In renal transplantation, graft survival was extended from 5 to 10 years when graft was harvested from 21-30 years old donors compared to elderly ones over 60 years [22]. In liver and cardiac transplantation, the age of the donor hampers graft survival [23, 24]. Our team and others previously reported that endothelial senescence is associated with a pro-coagulant and pro-inflammatory shift of the endothelium with major TF activity, endothelial dysfunction and associated with the shedding of pro-senescent EMPs [25, 26].

Although immune senescence might be viewed as protective against graft loss [27, 28], the impact of immune cells during early IR events or later upon adaptive immune response remains unexplored with respect to endothelial senescence and dysfunction. We compared the impact of MPs generated from splenocytes, under conditions mimicking innate or adaptive immune responses, on premature endothelial senescence.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Male Wistar rats (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. 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).

### **Splenocyte isolation and culture**

Rats were anaesthetized by sub-lethal IP injection of 5-mg/kg sodium pentobarbital (Ceva Animal Health, Libourne, France), and euthanized by exsanguination. Spleens were withdrawn, weighed and placed in a 10-cm petri dish containing 10 ml sterile phosphate-buffered saline (PBS). All further experiments were realized under sterile conditions. The spleen tissue was homogenized using a 2-ml rubber syringe plunger and the homogenate filtered through 100- $\mu$ m sterile cell strainers into a 50-ml tube to remove cell debris. Following centrifugation at 300 g for 5 min, the supernatant was removed, and the cell pellet gently tapped for re-suspension in a 5-ml ammonium-chloride-potassium (ACK) erythrocyte lysis buffer (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>3</sub>, and 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.4) for 5 min. The After centrifugation of remaining cells (300g, 5 min) and washing in PBS, the final cell suspension was re-suspended in RPMI-1640 medium (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 2 mM L-glutamate, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 10% heat-inactivated (56°C, 30 min) fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Saint Aubin, France). Cell mortality never exceeded 5% by trypan blue exclusion. Cells seeded into T75 culture flask at  $5 \cdot 10^6$  cells/ml were maintained in complete RPMI-1640 medium at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humid atmosphere, macrophages were removed from the splenocyte suspension that was maintained 4 h in culture medium before stimulation and the generation of splenocyte-derived MPs (see below)..

### **Generation, isolation, quantification and characterization of MPs from splenocytes suspension**

Splenocytes were stimulated by 5  $\mu$ g/ml of lipopolysaccharide (LPS) (from *Escherichia coli* 0127:B8; Sigma) or a combination of PMA (25 ng/ml; Enzo) and A12387 calcium ionophore (1  $\mu$ M; Sigma) at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. A respective 2.5- and 3.5-fold increase in MP concentration was measured by prothrombinase assay in the supernatant

of splenocytes in response to LPS (SMP<sub>LPS</sub>) and PMA/I (SMP<sub>PMA/I</sub>) as compared to MPs assessed in the supernatant of untreated splenocytes (SMP<sub>CTL</sub>). Cell apoptosis was measured by annexin-5 propidium iodide double staining. Symmetrically, IP/a-5 double labeling showed a respective 2- and 3-fold increase in splenocyte apoptosis (see supplementary data Figures 1A-B).

MPs were isolated and washed by differential centrifugation of the suspension. Briefly, splenocytes and cellular debris were discarded by a first centrifugation step at 800 g for 15 min at room temperature and the supernatant submitted to a double centrifugation step at 14 000 g and 4°C for 60 min. The suspension from splenocytes (SMP) of washed concentrated MPs was re-suspended in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) and was kept for less than one month at 4°C. MP measurement (total MP) was performed by prothrombinase assay after capture onto Annexin-A5 coated micro-wells using a microplate spectrophotometer set in kinetic mode. In this assay, phosphatidylserine is the rate-limiting factor of the generation of thrombin from prothrombin detected at 405 nm using a chromogenic substrate (PNAPEP0216, cryopep, Montpellier, France). MPs concentration was referred to as phosphatidylserine (PhtdSer) equivalent, by reference to a standard curve made with synthetic vesicles of known amounts of PhtdSer [29]. Characterization of the SMP cell origin was performed by capturing SMPs onto biotinylated antibodies directed against leucocyte CDs before quantification by prothrombinase assay as described elsewhere [30]. Biotinylated monoclonal antibodies to the following various cell types were insolubilized onto streptavidin-coated microtitration plates and incubated with SMPs: (1) anti-CD45 for leucocyte common antigen, (2) anti-CD3 for T lymphocyte population, (3) anti-CD4 for T helper cells, (4) anti-CD8b for T cytotoxic cells, (5) anti-CD161a for natural killer cells, (6) anti-CD25 for IL-2 receptor T cells and splenic dendritic cells, (7) anti-CD31, a dual probe for apoptotic endothelial cells and platelets stimulation, (8) anti-CD11b/c for monocyte/macrophage and granulocyte, (9) anti-CD11b for neutrophils. All characterization antibodies were purchased from BD Pharmingen, San Jose, USA. The MPs concentration was obtained by subtracting the OD values measured using isotype control biotinylated IgGs.

### **Isolation of Coronary Artery Endothelial Cells (ECs)**

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 [31]. 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% CO<sub>2</sub> 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).

### **Endothelial cell treatments**

Young passage 1 ECs (P1 ECs) were seeded at 75%-80% confluence in multiwell plates and were incubated with SMP<sub>CTL</sub>, SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> (1-30 nM PhtdSer eq.) for 30 min to 48 h in complete MCDB medium at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cell quantity and medium volume varied with the well size. In untreated cells, endothelial replicative senescence was induced by serial passaging or and premature senescence by a 48h incubation with 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of P1 Ecs, as described elsewhere [25]. Briefly, ECs were passaged at regular intervals until senescence was reached at passage 3 and evidenced by the presence of senescence-associated β-galactosidase activity (see below). In all cases, the medium was changed every 48 hours. In a set of experiments, P1 ECs were exposed to selective inhibitors of PI3-kinase (PI3Ki, LY294002, 10 μM), p38 MAPK (p38i, SB203580, 10 μM) or ERK ½ (ERKi, PD98059, 10 μM) for 1 h prior to the addition of SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>. In another set of experiments, P1 ECs were exposed for 30 min either to an NADPH oxidase inhibitor (VAS-2870, 5 μM), a cyclooxygenase inhibitor (indomethacin, 30 μM), or a mixture of mitochondrial inhibitors of the respiratory chain (MKR) (myxothiazol, KCN and rotenone, 1 μM each) before the addition of SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>. In other experiments, P1 ECs cells were pretreated 1h with 10 μM inhibitors of TLR-dependent and -independent inflammatory signaling pathways before incubation with SMP<sub>LPS</sub> and SMP<sub>PMA/I</sub> (Interleukin-1 Receptor-Associated-Kinase-1/4 Inhibitor (IRAKi) or (5Z)-7-Oxozeaenol (TAK-1i), a potent ATP-competitive irreversible inhibitor of ERK2, TAK-1 (MMK7) and MEK1)

### **Measurement of apoptosis**

Apoptosis was detected by flow cytometry using Annexin-5 and propidium iodide double labeling. ECs were harvested by trypsin treatment, washed and incubated with fluorescent Annexin-5 (5 microg/mL ImmunoTools, Friesoythe, Germany) and 2.5 µg/ml propidium iodide (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) for 15 min, at room temperature in the dark. The degree of apoptosis was measured as the proportion of Annexin-a5<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> double stained cells by flow cytometry. Fluorescence acquisition was performed by Guava EasyCyte Plus FlowCytometry System (Millipore). Analysis was performed from a minimum of 2000 events.

### **Kinetics of SMPs transfer to target endothelial cells**

SMP red fluorescent staining was achieved by the addition of 2 µM of the PKH26 lipid probe (Sigma, L'isle d'Abeau Chesnes, France) per 30-60 nM of MPs as described previously [32]. SMPs were washed twice by centrifugation (14 000 g, 60 min) in HBSS at 4°C. P1 ECs were incubated during 6, 24 and 48 h with PKH26-stained SMPs (10 nM). Capture of MPs by target ECs was assessed on the endothelial monolayer by fluorescent microscopy (Leica FW 4000, X40 objective) and quantified by flow cytometry after trypsin treatment. The efficacy of the MP capture by ECs was expressed as the percentage of PKH26-labelled ECs exhibiting the red MP fluorescence (Guava Easy Cyte Plus System, Millipore).

### **Measurement of Senescence-associated β-galactosidase activity**

Senescence-associated β-galactosidase activity (SA-β-gal) was measured in ECs by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) after labelling with the fluorogenic cell permeable substrate C12FDG (5-dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-galactopyranoside, Invitrogen, ThermoFisher, Illkirch, France) as previously described [33]. Briefly, ECs were pretreated with 300 µM chloroquine for 1 h before addition of 33 µM C12FDG. After 1h incubation, ECs were washed with ice-cold PBS, trypsinized and analyzed immediately. 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 mean fluorescence intensity (MFI) of the population. Auto-fluorescence gains were determined in unlabeled cells and set at the first logarithmic decade. Typically, in P3 cell suspensions, a maximum of 90% cells were labeled and a shift of mean fluorescence was observed from 18-20 MFI in P1 ECs to 55-65 MFI in senescent ECs.

### **Assessment of Senescence-associated- $\beta$ -galactosidase activity in the endothelial monolayer**

The proportion of ECs with senescence-associated- $\beta$ -galactosidase activity (SA- $\beta$ -gal) was measured in the endothelial monolayer using light microscopy and the Senescence Cell Histochemical Staining Kit (Sigma) according to the manufacturer's guidelines. SMP<sub>LPS</sub>- or SMP<sub>PMA/IL</sub>-treated and untreated P1 ECs were washed in HBSS and fixed with a 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde solution in PBS. After 3 PBS washings, cells were incubated at pH6 in the SA- $\beta$ -gal staining solution containing the 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-d-galactopyranoside (X-gal) galactosidase chromogenic substrate. Blue staining reflecting SA-betaGAL activity was continuously assessed from 2h to 12h post substrate addition at 37°C in a CO<sub>2</sub>-free atmosphere, using P3 senescent ECs as positive control and senescent cells counted

### **Western blot analysis**

After treatment, cells were washed twice with PBS and then lysed in extraction buffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM sodium pyrophosphate, 20 mM NaF, 0.01 mM okadaic acid, 1% Triton X-100 (Euromedex, Souffelweyershem, France), a tablet of complete protease inhibitor (Roche), pH 7.5). Total proteins (20  $\mu$ g or 30  $\mu$ g) were separated on 8% or 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels at 100V for 2h and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (GE healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) at 100V for 2 h. Aspecific binding sites were saturated by incubation of membranes for 1h with Tris-buffered saline solution (TBS, Euromedex) containing 3% bovine serum albumin and 0.1 % Tween 20. Membranes were incubated overnight at 4°C with blocking solution containing 3 % BSA and primary antibodies directly against: rabbit polyclonal eNOS (1:1000 dilution; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), rabbit polyclonal p53, mouse monoclonal gp91 phox, rabbit polyclonal p22 phox, rabbit polyclonal AT1, mouse monoclonal anti-PAR1 (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), mouse monoclonal p21, mouse monoclonal p16 (1:500 dilution; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal p47 phox, rabbit polyclonal cleaved caspase3, mouse monoclonal COX-1 (1:1000 dilution; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), mouse monoclonal COX-2 (diluted 1:500 dilution; BD Biosciences), rabbit polyclonal ACE (1:1000 dilution; Abbiotec), TF (1:1000 dilution, Sekisui Diagnostics, Sekisui Virotech GbmH, Rüsselsheim, Germany), mouse monoclonal anti- $\beta$ -tubulin (diluted 1:3000 dilution; Sigma-Aldrich), rabbit polyclonal anti-Akt, rabbit polyclonal anti-p38, rabbit polyclonal anti-ERK1/2, mouse monoclonal anti-JNK (1:1000 dilution, Cell

Signaling Technology, US), mouse monoclonal anti-ICAM1, rabbit monoclonal anti-VCAM1 (1:1000 dilution, Abcam, UK), Anti  $\beta$ -tubulin (1:20000 dilution, abcam, UK). After washing, membranes were incubated with the peroxidase-conjugated corresponding secondary antibodies at RT for 60 min (1:5000 dilution of anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin G; Cell Signaling Technology). Pre-stained markers (Invitrogen, France) were used for molecular mass determination. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence and their density analyzed using the ImageQuant acquisition system and analysis software (LAS4000 and ImageQuant TL 8.1, Amersham, UK). Data are expressed as a ratio to the housekeeping protein  $\beta$ -tubulin.

### **Measurement of cellular and mitochondrial oxidative stress**

P1 ECs were seeded into 6-well plates ( $2.10^5$  cells/well) before 6h treatment by  $SMP_{LPS}$  or  $SMP_{PMAI}$  or by 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  as a positive control of oxidative-stress induced senescence. P1 ECs were treated by 2.5  $\mu$ M Dihydroethidium, a redox-sensitive red fluorescent dye, for 30 min or by 5  $\mu$ M MitoSOX<sup>TM</sup> Red, a mitochondrial superoxide indicator, for 10 min at 37°C. After three warm PBS washing, P1 ECs were harvested by scraping in MCDB131 media before flow cytometry assessment (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Light scatter parameters were set to eliminate dead cells and subcellular debris. The red ethidium signal was measured and ROS accumulation was calculated as a fold increase by comparison with untreated P1 ECs (P1) (P1=100 %). Auto-fluorescence gains were determined in unlabeled cells and set at the first logarithmic decade.

### **Tissue factor activity**

Endothelial TF activity was measured at EC surface by Tenase assay using ECs cultured in 96 well plates ( $5.10^4$ /well). After warm washing by HBSS, purified human Factor X (150 nM, Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France), Factor VIIa (5 nM, Novoseven, Denmark) were added and incubated for 30 min in the presence of 1 mM  $CaCl_2$ . The ability of TF to perform the conversion of Factor X into Xa was revealed by the cleavage of a specific chromogenic substrate (CS11, 0.1 mM, Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France). Variations in absorbance were recorded using a microplate spectrophotometric reader in kinetic mode set at 405 nm (Molecular Device, UK). Data are expressed as fM of active TF per  $5.10^4$  living cells by reference to a standard curve established with known amounts of highly purified lipidated recombinant human TF (ADF Biomedical, Neuville-sur-Oise, France) [17].

### **Vascular reactivity**

Vascular reactivity studies of coronary artery rings were performed as previously described [34]. Briefly, the coronary artery was cleaned of connective tissue, cut into rings (2–3 mm in length), incubated 12 h under sterile conditions with different concentrations of SMPs and then suspended in organ baths containing oxygenated (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) Krebs bicarbonate solution (composition in mM: NaCl 119, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.18, CaCl<sub>2</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 25, and D-glucose 11, pH 7.4, at 37 ° C) for the determination of changes in isometric tension.

After equilibration and functional tests, rings were pre-contracted with the thromboxane mimetic U46619 (1–60 nM) before construction of concentration-response curves to bradykinin. Relaxations are expressed as a percentage of the contraction to U46619.

### **Immunofluorescence studies**

To characterize the mechanism underlying the SMP-induced endothelial dysfunction, the expression level of several proteins involved in NO, inflammation responses were determined by immunofluorescence in sections of the coronary artery. For this purpose, frozen arteries embedded in Tissue-Tek OCT (Sakura 4583, Leiden, The Netherlands) were cryosectioned at 14 µm. Sections were air dried for 15000 min and stored at –80 °C until use. Sections were first fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), washed and treated with either 10% milk in phosphate-buffered saline containing 0.1% Triton X-100 for 1h at room temperature to block nonspecific binding. Coronary artery sections were then incubated overnight at 4 °C with an antibody directed against either eNOS (1/1000, cat: 610297, BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France), VCAM1 (1:1000 dilution, 134047, Abcam, UK) and COX-2 (1/250 dilution, 15191, Abcam, UK). For negative controls, the primary antibody was omitted. Sections were then washed with phosphate-buffered saline, incubated with the fluorescent secondary antibody (1/400, Alexa 633-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG, A-21070 and A-21050, Thermo Fisher, Illkirch, France) for 2 h at room temperature in the dark before being washed with phosphate-buffered saline and mounted in Dako fluorescence mounting medium (Dako S3023, Les Ulis, France) and cover-slipped before being evaluated by confocal microscopy using a confocal laser-scanning microscope (Leica TSC SPE, Mannheim, Germany). Quantification of fluorescence levels was performed using Image J software (version 1.49p for Windows, US National Institutes of Health).

### **Cell and SMP depletion:**

Cells or SMPs suspensions were submitted to selective immuno-magnetic depletion using antibodies insolubilized on streptavidin coated magnetic beads (Dynabeads M-280, 2.8  $\mu\text{m}$  diameter). Magnetic streptavidin-coated beads were washed in TBS and 1 ml of bead stock solution (1 mg/ml) was incubated with 10  $\mu\text{g}$  biotinylated antibodies directed against either rat neutrophil CD11b or monocytes/macrophages cells CD11b/c or endothelial cells CD31. Control isotype IgG coated beads were prepared using the same procedure. SMP suspensions were incubated with the magnetic beads in an Eppendorf tube (50  $\mu\text{l}$  beads/ 300  $\mu\text{l}$  of concentrated SMPs) attached to a rolling device. Immuno-depletion was achieved by the addition of 1  $\mu\text{g}$  of a chosen antibody-coated bead suspension to the concentrated MPs and the mixture further incubated for 90 min on a rolling device at 4°C, before a 2 min contact with the magnet. The supernatant was submitted to a double depletion step in order to achieve 75%-80% depletion. Total MPs and MPs phenotype were quantitated before and after magnetic immune-depletion. (See depleted MP suspensions features in supplementary data Table 2).

### **Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error mean (S.E.M.) and analyzed using GraphPad Prism5<sup>®</sup> (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 performed at least in three separate experiments.

## **Results**

### **LPS or PMA induce the generation of splenocyte-derived microparticles (SMPs) that interact with young endothelial cells (ECs)**

Compared to vehicle, both chosen inducers led to a significant MP release (3- and 2-fold enhancement by LPS or by the combination PMA/ A23189 calcium ionophore (PMA/I), respectively) after 24h, MPs concentration in supernatant increased by respectively 2.5- and 3.5-fold in response to LPS (SMP<sub>LPS</sub>) or PMA/I (SMP<sub>PMA/I</sub>). These data were in accordance with the respective 2- and 3-fold increase in splenocyte apoptosis assessed by IP/a-5 double labeling (see supplementary data figure 1A-B). Characterization of the MP cell origin showed



two different MP patterns as the signatures of innate or adaptive cell targeting (supplementary figure 2 and table 1). LPS induced a significant 2.5-fold raise in both CD11b<sup>+</sup>-MPs and CD11b/c<sup>+</sup>-MPs indicating a major activation of the innate immune cells. By contrast, CD8b<sup>+</sup>-MPs, CD4<sup>+</sup>-MPs, CD161a<sup>+</sup>-MPs CD25<sup>+</sup>-MPs concentrations remained unchanged (supplementary Figure 2 and table 1), as anticipated for specific targeting. Conversely, PMA/I induced a different SMP pattern with a significant raise in CD8b<sup>+</sup>-MPs (16-fold increase), CD4<sup>+</sup>-MPs (7-fold increase), CD25<sup>+</sup>-MPs (7-fold increase), CD45RA<sup>+</sup>-MPs (7-fold increase), representative of lymphocyte activation. Kinetics of PKH26-labeled SMP integration into target ECs plasma membrane were similar for both SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>, 28% of fluorescent P1 ECs being stained after 6 h, the proportion increasing thereafter to a 82% plateau at 24 h (Figure 1A-B).

**SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> are specific inducers of premature senescence in target P1 ECs with no pro-apoptotic effect**

SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> but not SMP<sub>CTL</sub> markedly increased SA-β-gal activity measured by flow cytometry in target P1 ECs after 48 h. Significant elevations were observed in response to 10 nM and 30 nM SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>, the latter concentration leading to values of SA-β-gal activity observed in P3 senescent cells (Figure 2A). Simultaneously, the persisting absence of apoptosis suggested a specific pro-senescent effect. Indeed, even at highest 30 nM SMP concentration, no sign of apoptosis could be evidenced, neither by flow cytometry nor by western blot analysis of cleaved caspase-3 (Supplementary data figure 3A-B). Conversely, a short 6h exposure to 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prompted maximum ECs apoptosis (33.67±2.57% vs 9.34 ± 0.72% in untreated cells) (Supplementary data figure 3A).

The pro-senescent feature of SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> was also evidenced on EC monolayers by transmission microscopy, using the X-Gal blue SA-β-gal substrate. A significant 3-fold increase in cells bearing SA-β-gal activity was induced after 48h, values reaching those observed in a monolayer of senescent P3 cells obtained by serial passaging (Figure 2B, see M & M). In addition, the expression of senescence markers increased as early as 24h after incubation with SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>. A 4-fold up-regulation of p53 and respective 5- and 3-fold increase in the expression of down-stream p21 and p16 proteins was observed in P1 ECs (Figure 2C-E).

The SMP-driven specific pro-senescent effect was also confirmed by the fact that concentrations of truly soluble LPS (0.5-5 μg/ml) or PMA/I (2.5-25 ng/ml / 0.1-1 μM) remained unable to promote senescence in our model (Supplementary figure 4A).

Furthermore, no soluble moiety from splenocyte supernatant could account for the induction of premature senescence, since incubation of P1 ECs with MP-depleted splenocyte supernatants did not lead to senescence (Supplementary figure 4B).

### **SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> induce oxidative stress in target P1 ECs**

Since reactive oxygen species (ROS) are strong inducers of senescence we examined whether SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>-induced premature senescence alter ROS concentration. Ethidium fluorescence probing of ROS showed an early significant 2-fold increase induced by 10 nM SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> after 6 h. By comparison, even at a high degree of apoptosis induced by 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, only a 2.7-fold enhancement in ROS concentration could be measured after 6 h (Figure 3A). In addition, 10 nM SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>, increased by a 2-fold range the Mitosox fluorescence that probes mitochondrial ROS (Figure 3B). These data suggest that SMPs even at low concentration promote oxidative stress of mitochondrial and cytoplasm origin that may be causative in the induction of senescence.

The source of ROS was further characterized using inhibitors of the major vascular sources of ROS including NADPH oxidase (VAS-2870), cyclooxygenases (COXs, indomethacin) and the mitochondrial respiration complex (myxothiazol + KCN + rotenone). VAS-2870 and indomethacin blunted 50 $\pm$ 2,3% of both SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>-induced ROS formation, whereas the mitochondrial respiration complex inhibitors had only minor effects (Figure 3C). These findings suggest that NADPH oxidase and COXs contribute to the SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>-induced oxidative stress, as previously reported in response to pro-senescent endothelial MPs from coronary artery ECs [25].

Because endothelial senescence is characterized by endothelial dysfunction and a reduced formation of nitric oxide (NO), the effect of SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> on the expression of eNOS was assessed. Western blot analysis indicated a respective 80.5% $\pm$ 3.1 and 75%  $\pm$ 1.8 down-regulation by SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>, suggesting a blunted formation of NO (Figure 3D). In addition, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup> subunits of NADPH oxidase were up-regulated respectively by a 2.5-, 2.4- and 3.3-fold range (Figure 3E-G).

### **SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> promote a thrombogenic status in target P1 ECs by enhancing tissue factor activity and promoting the local angiotensin system**

SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> shifted the endothelial phenotype to a pro-coagulant status as shown by the respective  $\sim$  6-fold and 4-fold up-regulation of TF expression assessed by western blot (Figure 4A). In addition, SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> respectively increased by a 2,5-fold and 2-fold

the activity of TF measured by Tenase assay (Figure 4B). The SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>-driven pro-coagulant response was also evidenced through the secondary shedding of endothelial pro-coagulant microparticles (EMP) detected by prothrombinase assay, but not in response to SMP<sub>CTL</sub> (SMP<sub>LPS</sub>: 12,7 nM, SMP<sub>PMA/I</sub>: 12,17 nM vs 6,8 nM SMP<sub>CTL</sub>,  $p < 0.001$ , Figure 4C).

Because the local angiotensin system has been associated with endothelial senescence and vascular dysfunction, the expression of the angiotensin converting enzyme (ACE) and of the angiotensin receptor AT1 was assessed in SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>-treated P1 ECs. As shown in Figure 4D-E, ACE and AT1R were significantly up-regulated by a respective 4-fold and 2-fold, suggesting a thrombogenic effect as reported elsewhere [25].

To confirm a thrombogenic effect of SMPs interacting with ECs, SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> were incubated during 12h and under sterile conditions with porcine coronary rings before assessment of bradykinin endothelial-induced relaxation. Both SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> blunted relaxation in a dose-dependent manner, SMP<sub>PMA/I</sub> being more efficient with a 50% inhibition measured in response to a 10 nM concentration vs. 30 nM for SMP<sub>LPS</sub> (Figure 5A-B). Of note, SMP<sub>CTL</sub> had no effect, even at 30 nM. The MP-driven inhibition of relaxation was also confirmed by the fact that truly soluble 5 µg/ml of LPS or 25 ng/ml / 1 µM of PMA/I remained unable to alter vascular reactivity in response to bradykinin. In addition, MP lysates had no effect, indicating the pivotal role of the MP membrane structure in the endothelial targeting (supplementary data Figure 5A-C).

### **SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> are endothelial pro-inflammatory effectors ECs**

Because senescent cells secrete chemokines and cytokines involved in leukocyte recruitment and promoting the endothelial inflammation, we further assessed inflammatory markers induced by 30 nM SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> in P1 ECs. Exposure to both SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> induced within 30 min the phosphorylation of IκBα by western blot and within 1h the phosphorylation of NF-κB in a time-dependent manner from 30 min until 6 hours after MP addition ( $p < 0,001$  vs P1 ECs, Figure 6A-D). The inflammatory potency of SMPs was totally abolished by 1h pre-treatment with 10 µM Tak-1 inhibitor, whereas inhibitors of IRAK had no effect, thereby suggesting the involvement of TAK-1-dependent pathway in the SMP-induced senescence (Figure 6E).

In addition, after 24h stimulation, both SMPs induced a significant and respective 3- and 2-fold up-regulation of ICAM-1 ( $p < 0,001$  vs P1 ECs), VCAM-1 ( $p < 0,01$  vs P1 ECs), (Figure 7A-B), and a 4-fold increased COX-2 expression ( $p < 0,001$  vs P1 ECs), whereas COX-1 remained unchanged (Figure 7C-D). Interestingly, SMP<sub>LPS</sub> and SMP<sub>PMA/I</sub> up-regulated the

expression of PAR1 by 2,5- and 3-fold respectively, and no modification of the proportion of N-ter glycosylation could be observed upon treatment, suggesting that the newly synthesized PAR-1 would mainly remain unactivated (Figure 7E).

The potency of SMPs to act as vascular effectors was further confirmed in coronary artery rings incubated for 12 h. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMAI</sub> induced a significant endothelial expression of VCAM-1, COX-2 and a 45 % decrease in eNOS expression by confocal fluorescence microscopy.

### **SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMAI</sub> prompt MAPKs and PI3 kinase pathways**

Since the redox-sensitive mitogen-activated protein kinase (MAPK) has been involved in the signaling pathway leading to senescence [25], experiments were performed to determine the role of redox-sensitive kinases in SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMAI</sub> -induced premature ECs senescence. Exposure of P1 ECs to both SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMAI</sub> induced within 30 min the phosphorylation of p38 MAPK, ERK1/2, JNK and Akt, which persisted in a time-dependent manner at least for 2 h (Figure 9 A-H). A 30 min pretreatment by selective inhibitors of p38 MAPK, ERK1/2 and PI3-kinase significantly reduced SMP<sub>LPS</sub>- or SMP<sub>PMAI</sub>-induced senescence by 57±3,3%, 54.7±4.1% and 51±3,6% respectively, as revealed by measurement of SA-β-gal activity after 48 h (Figure 10A).

These data indicate that various redox-sensitive kinases contribute to the induction of premature endothelial senescence in response to SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMAI</sub>. Altogether, data suggest that SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMAI</sub> induce ECs senescence through an early activation of the MAPK and the PI3-kinase/Akt pathways.

### **Neutrophil- and monocyte-derived SMP contribute early endothelial senescence**

The SMP cell origin pattern generated in response to LPS had shown a global 2,2-fold increase in leucocyte-derived SMP (captured onto CD45), a 65% elevation in neutrophil (captured onto CD11b) and monocyte (captured onto C11bc) (supplementary data Table 1-2). In a previous work we had demonstrated that EMP from senescent cells are pro-senescent [25]. Therefore, to further characterize the specific contribution of innate immunity to MP-driven senescence, we depleted SMP<sub>LPS</sub> of endothelial CD31<sup>+</sup>-MPs, before specific removal of either neutrophil- and monocyte-derived SMP.

A 80% depletion in CD11b<sup>+</sup>-MPs and 75% in CD11b/c<sup>+</sup>-MPs reduced the SMP-driven SA-β-gal activity by 55%-60 % after 48 h incubation, mean fluorescence intensity of the treated cells returning to values close to those measured in pre-senescent P2 cells.

## **Discussion**

In this study, we report for the first time that MPs generated from LPS or PMA/calcium ionophore treated splenocytes (LPS SMP<sub>LPS</sub> and SMP<sub>PMA/I</sub>) induce endothelial dysfunction and premature senescence via early NADPH oxidase-dependent oxidative stress and inflammatory response. Such SMPs trigger both the MAPK and PI3-kinase/Akt pathways. Premature senescence resulted in severe endothelial dysfunction characterized by eNOS down-regulation, oxidative stress, vascular dysfunction, up-regulation of TF expression and activity, and the generation of secondary pro-coagulant endothelial MPs by ECs. Most importantly, SMPs were strictly pro-senescent and had no pro-apoptotic potential, indicating a specific effect

### **Splenocytes as a source of immune cell-derived MPs**

In our model, MPs are generated from primary cells, namely splenocyte, their quantity and cell origin being specific of the inducer, LPS treatment favoring the release of MPs from neutrophils and PMA/I from Lymphocytes. Furthermore, splenocyte phenotyping confirmed the cell activation (supplementary figure 2 and Table1). Our data are in accordance with previous reports of a 2-3 fold raise in monocyte THP-1 and CEM T Lymphocyte –derived MPs in response to LPS and Actinomycin D by others team [35-38].

### **Respective contribution of SMP<sub>LPS</sub> and SMP<sub>PMA/I</sub> to senescence**

Although SMPs had different cell origin profiles when generated by LPS or PMA/I treatment, they shared common endothelial pro-senescent effects, with however different ranges in the expression or activity of key proteins. SMP<sub>LPS</sub> were more effective in the up-regulation of senescent markers p16 and p21 and prompted higher pro-coagulant and pro-inflammatory responses via TF and VCAM-1. Similarly, kinetics of ECs responses varied, with an earlier NF-κB activation triggered by SMP<sub>LPS</sub>, whereas MAP kinases, PI3kinases and AKT were phosphorylated at comparable time.

### **SMPs are early pro-inflammatory effectors of premature endothelial senescence triggered by innate and adaptive immune cells.**

Our data demonstrate that MPs generated from immune cells are pro-senescent endothelial effectors. Indeed, SA-β-gal activity was significantly increased in response to SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>, an effect that was not observed in response to MPs harvested from naïve control

splenocyte. Interestingly, the pro-senescent effect of both SMPs was TAK kinase-dependent. We identified an early activation of NF- $\kappa$ B 1h after SMP stimulation. Furthermore, depletion from either monocyte or neutrophil-derived MPs decreased the pro-senescent effect, suggesting that their recruitment at the surface of the inflamed endothelium would contribute to endothelial dysfunction. Finally, because PI3-kinase, p38 MAPK and ERK1/2, JNK and Akt were activated in the first hours, we anticipated their early involvement in the SMP-driven senescence, that was indeed confirmed by pharmacological inhibition. In accordance with our data, the activation of p38 MAPK has been reported a redox-sensitive contributor to senescence in HUVEC after serum starvation, using p38 silencing [39].

Previous report by Curtis et al showed that MPs released from human aortic ECs are pro-inflammatory autocrine effectors [40]. We herein demonstrate a paracrine pro-inflammatory action of immune cells-derived MPs on ECs. Altogether, these observations suggest that MPs from monocytes and neutrophil would contribute to an early endothelial inflammation, which could in turn amplify the endothelial dysfunction and senescence. In our system, the significant secondary shedding of pro-coagulant endothelial MPs confirmed this hypothesis. Of note, endothelial MPs generated by senescent ECs of different species are pro-senescent effectors [25, 26, 41].

### **SMPs are pro-oxidant and pro-coagulant effectors promoting endothelial dysfunction in isolated primary ECs and in coronary rings.**

Previous studies have indicated that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces EC senescence and that ROS mediate both premature senescence and replicative senescence in coronary and aortic ECs [25, 26, 42]. Furthermore, endothelial MPs released from premature or replicative senescent cells prompt the generation of superoxide anions in young ECs in a NADPH oxidase and cyclooxygenase-dependent manner, thereby acting as an amplification loop for endothelial dysfunction [25, 26].

Using a pharmacological approach, we herein demonstrate that both SMP<sub>LPS</sub> and SMP<sub>PMA/I</sub> are pro-senescent and similarly contribute to a significant early oxidative stress in young coronary ECs via NADPH oxidase and cyclooxygenases. Our data obtained with primary cells, do not confirm the ROS accumulation and enhanced NO production combined to unchanged endothelial NO synthase activity previously reported in the Eahy.926 endothelial lineage treated by monocyte-derived MPs from apoptotic THP-1 cells released in response to VP-16 [43]. Discrepancies might rely on the initial stress or on the cellular model.

Because, ageing is associated with progressive endothelial senescence and dysfunction and

also characterized by enhanced MP shedding [44, 45], we also studied the effect of SMPs on the endothelial-dependent vascular relaxation of porcine coronary rings. Data confirm that SMP<sub>LPS</sub> and SMP<sub>PMA/I</sub> blunt bradykinin-induced relaxation in coronary artery rings, thereby indicating that SMPs alter the production of NO, the main endothelial vaso-protector. Immuno-labeling of the rings revealed a reduced expression of e-NOS and an increased expression of COX-2 in the endothelial layer in response to SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>, whereas SMP<sub>CTL</sub> had no effect (Figure 8). Taken together, our data confirm and extend the previous reports indicating that the endothelium-dependent vaso-relaxation is a prime target of circulating pathological MPs isolated from patients with acute myocardial infarction [46].

Other authors have reported that Angiotensin II triggers endothelial senescence and MP shedding [26] through AT1 receptor, enhanced ACE activity and redox-sensitive pathways [26, 42]. In accordance, we show herein that SMP-induced premature endothelial senescence is characterized by up-regulated AT-1 and ACE, indicating EC dysfunction and thrombogenic potential (Figure 4). Since the TF gene is early expressed in response to cytokines, it was tempting to anticipate that SMP-driven premature endothelial senescence was associated with a TF-driven pro-coagulant switch of the endothelial phenotype. Indeed, our observation of an early enhancement in TF activity (6h) is in compliance with previous reports of TF-associated endothelial dysfunction [25, 47]. On the other hand, the contribution of the up-regulated PAR-1 observed after 24h remains to be deciphered with respect to down-stream cytokine-driven pathways and pro-coagulant phenotype [48, 49].

Of note, because VCAM-1 and ICAM-1 were found up-regulated in isolated ECs (24h) or in ECs lining rings after only 12h incubation with SMPs, it can be anticipated that in the vessel, an acute generation of leukocyte MPs favors endothelial inflammation and consecutive senescence. As a proof of concept, data from our team indicate that circulating MPs from septic rats that are mainly of leukocyte origin, prompt NF- $\kappa$ B activation in the vessel wall and cardiac tissues, and are suitable candidates for pharmacological control [50]. Interestingly, several reports indicate that human sepsis is characterized by the release of MPs from leukocytes and neutrophils [30, 51, 52]. Other reports indicate that spleen exacerbates the inflammatory response during MI and worsens the infarct size [53].

## **Conclusion**

Altogether, our findings demonstrate that leukocyte MPs generated under inflammatory conditions act as true pro-senescent mediators of endothelial dysfunction with specific



contribution of innate and adaptive cells leading to vascular dysfunction. The early consequences of IR remain difficult to decipher, therefore the study of MPs as a signature of cellular activation and damage appears an alternate approach to in vivo experiments. In this view, our model of MPs-mediated endothelial senescence might prove useful to assess new cyto-protective strategies and their monitoring. Indeed, Graft pre-conditioning and the control of pro-senescent MPs shedding might limit I/R in the early stages of transplantation, preserve ECs at graft vicinity and delay its dysfunction, especially in islets transplantation where vascularization is essential.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

RA is supported by a PhD fellowship from the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Iraq.

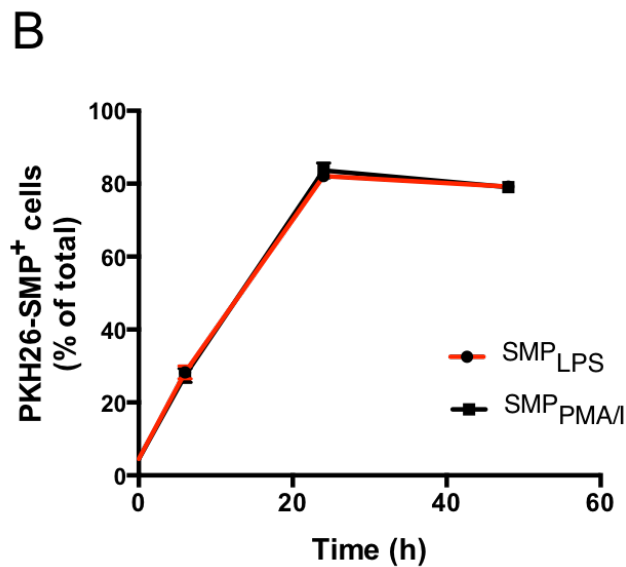
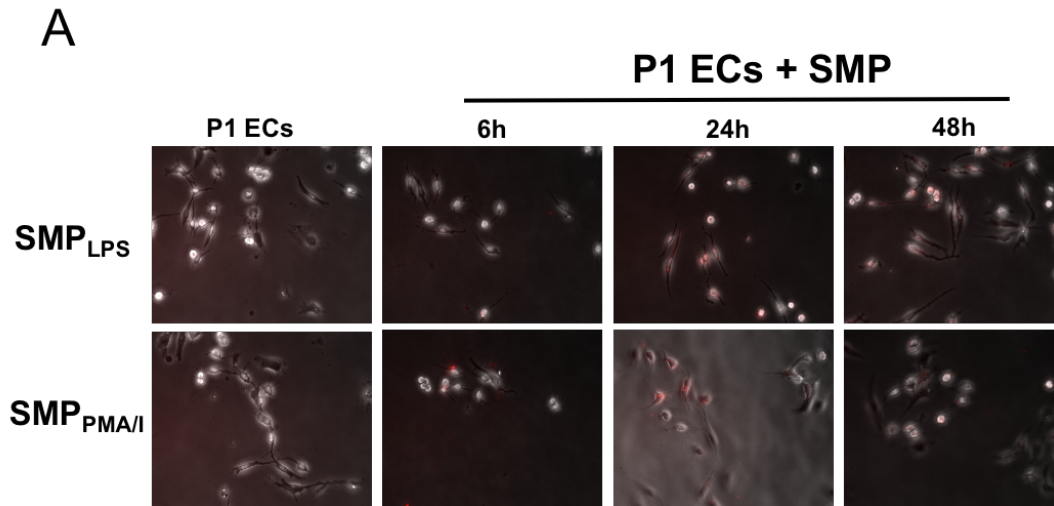


## References

1. Yang, Q., et al., *Cellular and molecular mechanisms of endothelial ischemia/reperfusion injury: perspectives and implications for postischemic myocardial protection*. Am J Transl Res, 2016. **8**(2): p. 765-77.
2. Jin, C., et al., *Human myocardium releases heat shock protein 27 (HSP27) after global ischemia: the proinflammatory effect of extracellular HSP27 through toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4*. Mol Med, 2014. **20**: p. 280-9.
3. Eich, T., O. Eriksson, and T. Lundgren, *Visualization of early engraftment in clinical islet transplantation by positron-emission tomography*. N Engl J Med, 2007. **356**(26): p. 2754-5.
4. Kourtzelis, I., et al., *Developmental endothelial locus-1 modulates platelet-monocyte interactions and instant blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation*. Thromb Haemost, 2016. **115**(4): p. 781-8.
5. Bakouboula, B., et al., *Significance of membrane microparticles in solid graft and cellular transplantation*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 2499-514.
6. Morel, O., et al., *Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection*. J Heart Lung Transplant, 2008. **27**(1): p. 38-45.
7. Al-Massarani, G., et al., *Kidney transplantation decreases the level and procoagulant activity of circulating microparticles*. Am J Transplant, 2009. **9**(3): p. 550-7.
8. Ridger, V.C., et al., *Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology*. Thromb Haemost, 2017. **117**(7): p. 1296-1316.
9. Morel, O., et al., *Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(1): p. 15-26.
10. Sabatier, F., et al., *Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(3): p. 454-71.
11. Toti, F., et al., *Studies of circulating microparticle release in peripheral blood after pancreatic islet transplantation*. Transplant Proc, 2011. **43**(9): p. 3241-5.
12. Moreau, F., et al., *Rescue of a pancreatic islet graft after steroid therapy*. Transplantation, 2012. **93**(3): p. e10-1.
13. Johansson, H., et al., *Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1755-62.
14. Moberg, L., et al., *Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation*. Lancet, 2002. **360**(9350): p. 2039-45.
15. Morel, O., et al., *Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(12): p. 2594-604.*
16. De Rop, C., et al., *Evaluation of tissue factor bearing microparticles as biomarkers in allogeneic stem-cell transplantation*. Transplantation, 2011. **92**(3): p. 351-8.
17. Gleizes, C., 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): p. 733-40.
18. Mause, S.F. and C. Weber, *Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange*. Circ Res, 2010. **107**(9): p. 1047-57.

19. Owens, A.P., 3rd, et al., *Monocyte tissue factor-dependent activation of coagulation in hypercholesterolemic mice and monkeys is inhibited by simvastatin*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 558-68.
20. Mastronardi, M.L., et al., *Circulating microparticles from septic shock patients exert differential tissue expression of enzymes related to inflammation and oxidative stress*. Crit Care Med, 2011. **39**(7): p. 1739-48.
21. Olland, A., et al., *Microparticles: A new insight into lung primary graft dysfunction?* Hum Immunol, 2016.
22. Terasaki, P.I., et al., *Significance of the donor age effect on kidney transplants*. Clin Transplant, 1997. **11**(5 Pt 1): p. 366-72.
23. Lue, A., et al., *How important is donor age in liver transplantation?* World J Gastroenterol, 2016. **22**(21): p. 4966-76.
24. Chamogeorgakis, T., et al., *Impact of donor age on cardiac transplantation outcomes and on cardiac function*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2016. **23**(4): p. 580-3.
25. Abbas, M., et al., *Endothelial Microparticles from Acute Coronary Syndrome Patients Induce Premature Coronary Artery Endothelial Cells Ageing and Thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-mediated Activation of MAPKs and PI3-kinase Pathways*. Circulation, 2016.
26. Burger, D., et al., *Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence*. J Am Heart Assoc, 2012. **1**(3): p. e001842.
27. Heinbokel, T., et al., *Immunosenescence and organ transplantation*. Transplant Rev (Orlando), 2013. **27**(3): p. 65-75.
28. Heinbokel, T., et al., *Impact of immunosenescence on transplant outcome*. Transpl Int, 2013. **26**(3): p. 242-53.
29. Jy, W., et al., *Measuring circulating cell-derived microparticles*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(10): p. 1842-51.
30. Delabranche, X., et al., *Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy*. Intensive Care Med, 2013. **39**(10): p. 1695-703.
31. Brodsky, S.V., et al., *Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen*. Circ Res, 2004. **94**(3): p. 377-84.
32. Constantinescu, A.A., et al., *Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2014. **13**(2): p. 219-26.
33. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. Nat Protoc, 2009. **4**(12): p. 1798-806.
34. Niazi, Z.R., et al., *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, 2017. **40**(12): p. 966-975.
35. Ehsan, M., et al., *Adiponectin limits monocytic microparticle-induced endothelial activation by modulation of the AMPK, Akt and NFkappaB signaling pathways*. Atherosclerosis, 2016. **245**: p. 1-11.
36. Wang, J.G., et al., *Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1beta-dependent manner*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2366-74.
37. Yang, C., et al., *Generation of lymphocytic microparticles and detection of their proapoptotic effect on airway epithelial cells*. J Vis Exp, 2015(96): p. e52651.

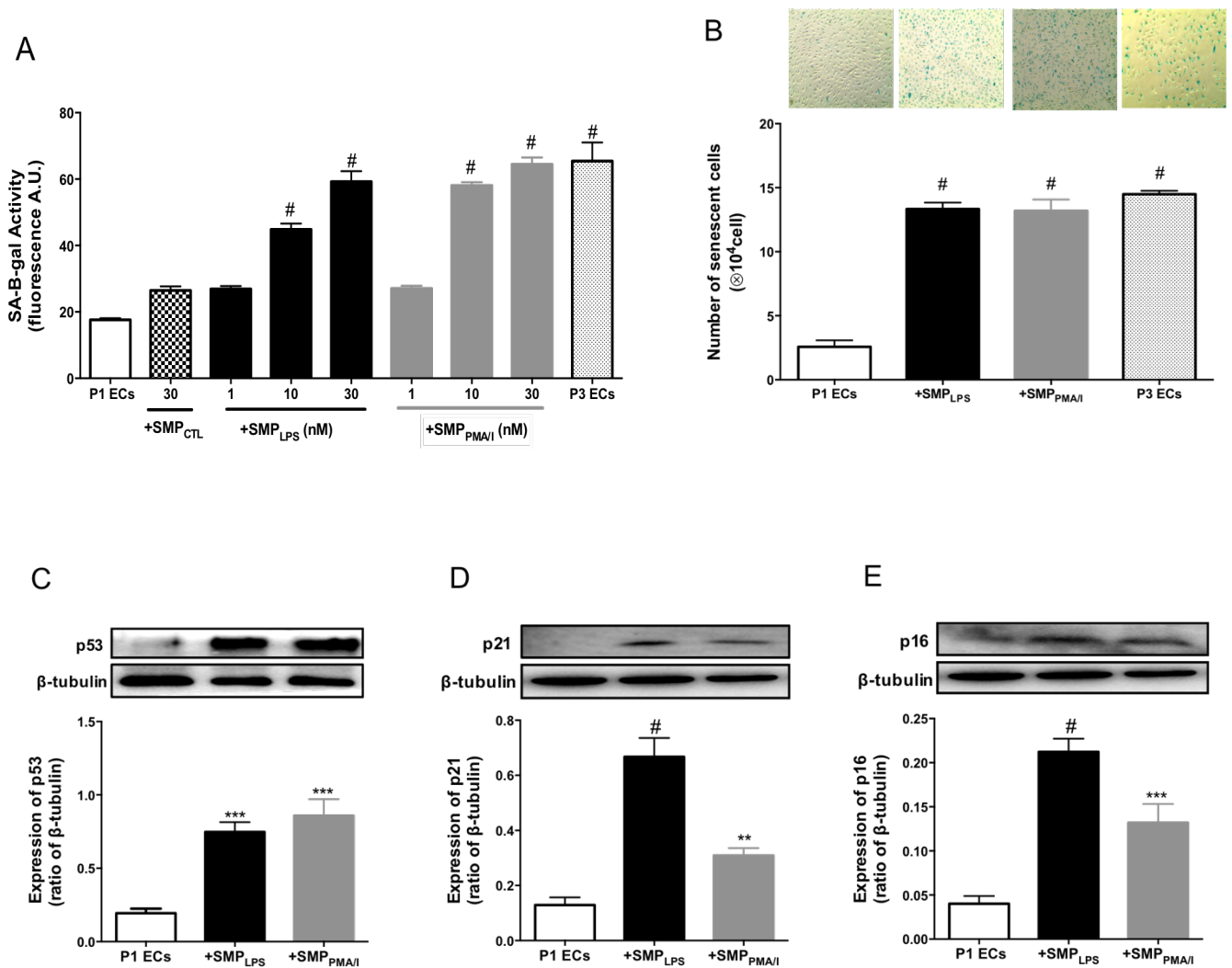
38. Martin, S., et al., *Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression*. *Circulation*, 2004. **109**(13): p. 1653-9.
39. Wu, Z., et al., *Role of p38 mitogen-activated protein kinase in vascular endothelial aging: interaction with Arginase-II and S6K1 signaling pathway*. *Aging (Albany NY)*, 2015. **7**(1): p. 70-81.
40. Curtis, A.M., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(4): p. 701-9.
41. Simoncini, S., et al., *Biogenesis of Pro-senescent Microparticles by Endothelial Colony Forming Cells from Premature Neonates is driven by SIRT1-Dependent Epigenetic Regulation of MKK6*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 8277.
42. Khemais-Benkhiat, S., et al., *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*, 2016. **71**(12): p. 1581-1590.
43. Mastronardi, M.L., et al., *Microparticles from apoptotic monocytes enhance nitrosative stress in human endothelial cells*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2011. **25**(6): p. 653-60.
44. Karbach, S., et al., *eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation*. *Curr Pharm Des*, 2014. **20**(22): p. 3579-94.
45. Gustafson, C.M., et al., *Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans*. *Biol Sex Differ*, 2015. **6**: p. 10.
46. Boulanger, C.M., et al., *Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction*. *Circulation*, 2001. **104**(22): p. 2649-52.
47. Bavendiek, U., et al., *Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): p. 25032-9.
48. Mhatre, M.V., et al., *Thrombin Augments LPS-Induced Human Endometrial Endothelial Cell Inflammation via PAR1 Activation*. *Am J Reprod Immunol*, 2016. **76**(1): p. 29-37.
49. van Hinsbergh, V.W., *Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation*. *Semin Immunopathol*, 2012. **34**(1): p. 93-106.
50. Boisrame-Helms, J., et al., *Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats*. *Thromb Haemost*, 2014. **111**(1): p. 154-64.
51. Delabranche, X., et al., *Evidence of NETosis in Septic Shock-induced Disseminated Intravascular Coagulation*. *Shock*, 2016.
52. Fujimi, S., et al., *Activated polymorphonuclear leukocytes enhance production of leukocyte microparticles with increased adhesion molecules in patients with sepsis*. *J Trauma*, 2002. **52**(3): p. 443-8.
53. Tian, Y., et al., *The spleen contributes importantly to myocardial infarct exacerbation during post-ischemic reperfusion in mice via signaling between cardiac HMGB1 and splenic RAGE*. *Basic Res Cardiol*, 2016. **111**(6): p. 62.



**Figure 1. Integration of SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> into the young P1 ECs plasma membrane.**

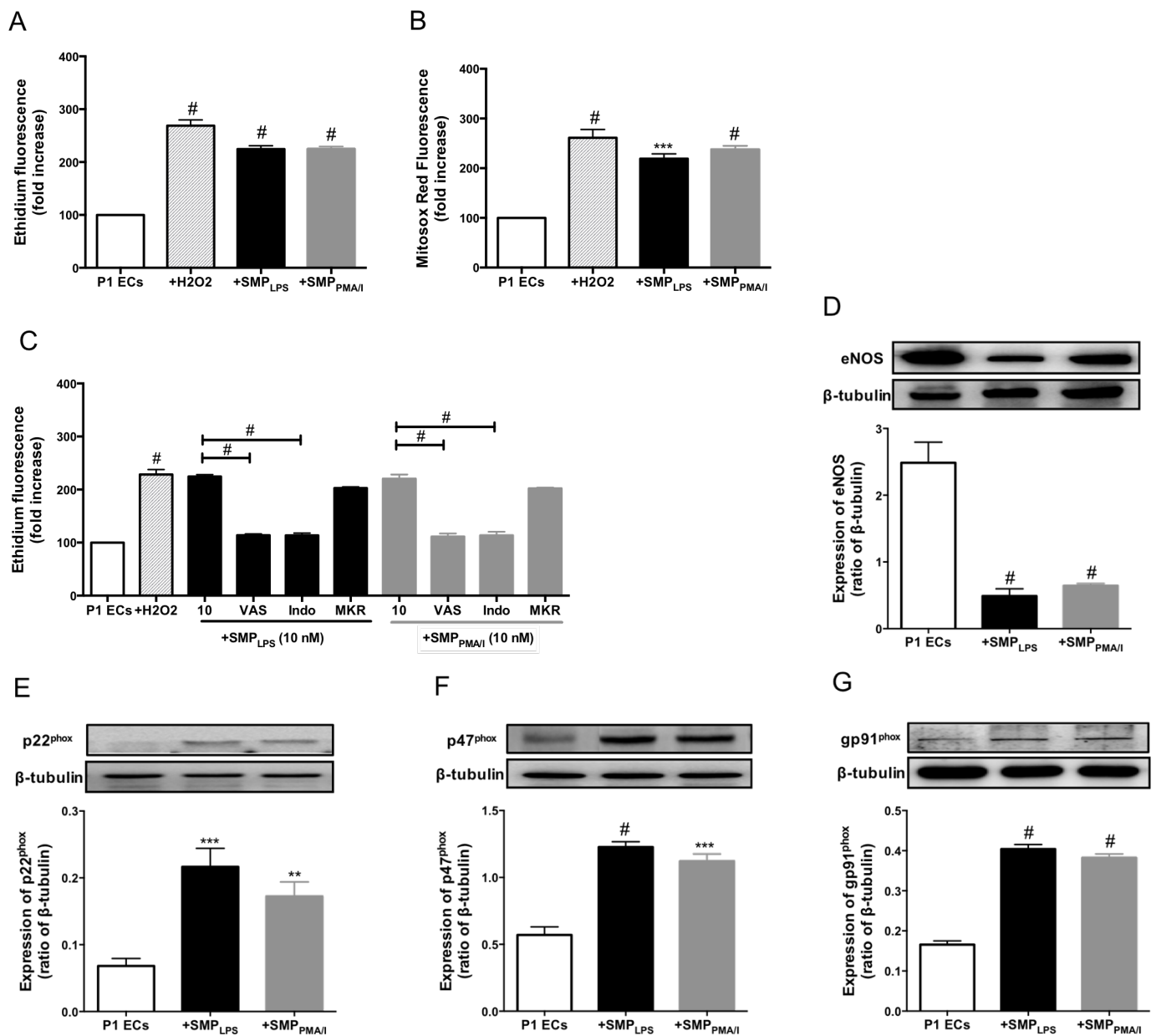
P1 ECs were incubated for 6, 24 and 48 h with SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> labeled with the red fluorescent lipid probe PKH26. (A) Representative micrographs showing fluorescent signal of labeled SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> captured by P1 ECs. (B) Kinetics of SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> integration by P1 ECs. Data express as the percentage of PKH26-labeled SMPs positive P1 ECs. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of experiments performed at least on three different cells cultures.

P1 ECs: untreated P1 endothelial cells, SMP<sub>LPS</sub>: SMP collected from LPS stimulated splenocytes, SMP<sub>PMA/I</sub>: SMP collected from PMA/I stimulated splenocytes.

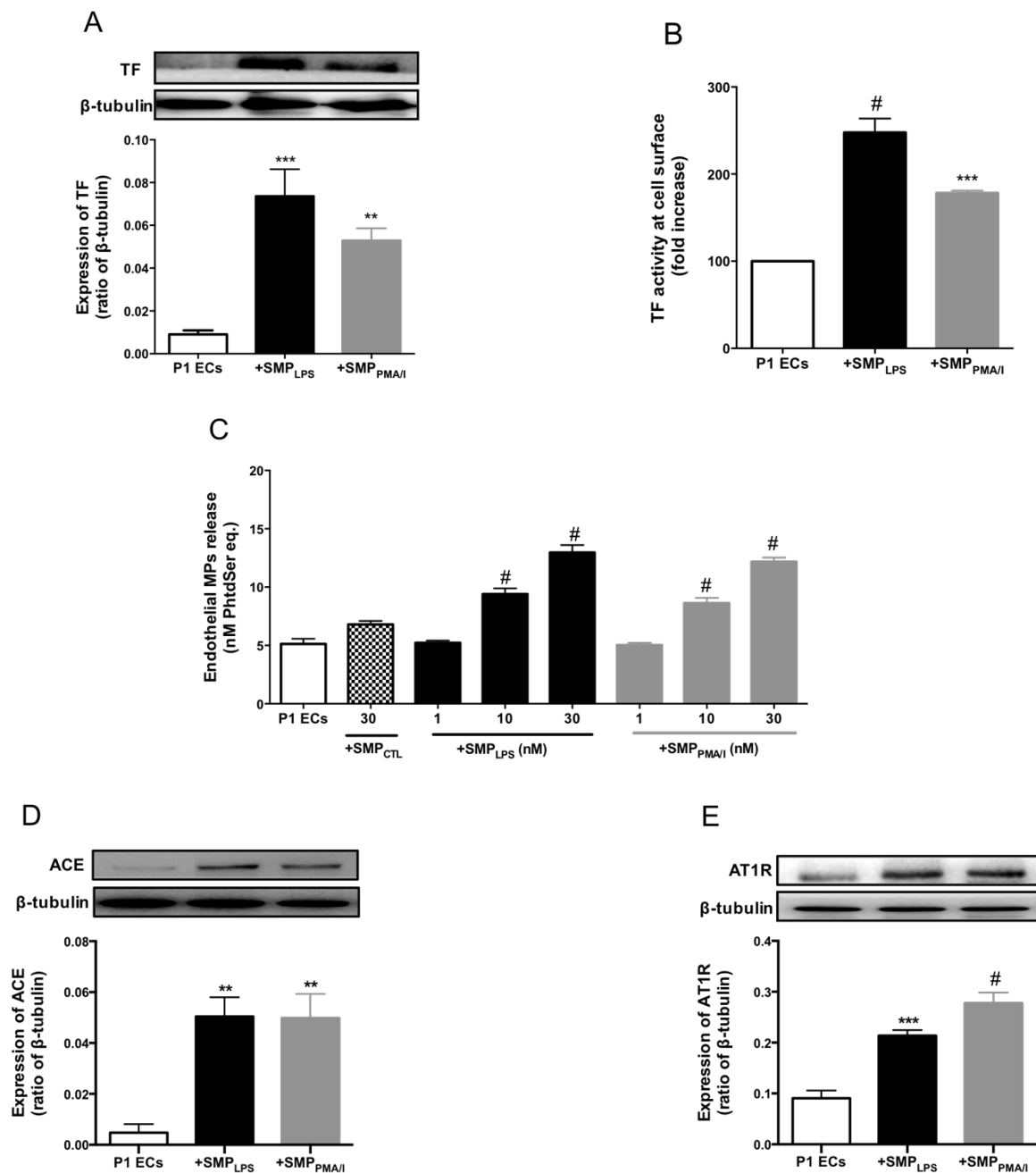


**Figure 2. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/1</sub> induce premature senescence in target P1 ECs.**

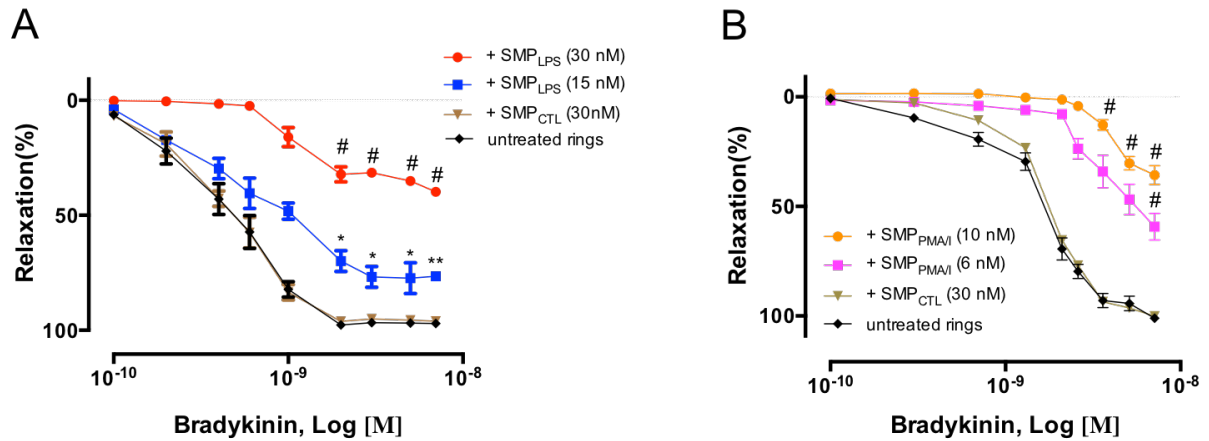
(A) Measurement of SA-β-gal activity in P1 ECs. P1 ECs were incubated for 48 h either with splenocyte microparticles harvested in the supernatant of untreated splenocytes (30 nM PhtdSer eq), different concentrations of SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/1</sub> (1-30 nM PhtdSer eq). SA-β-gal activity was assessed using the fluorescent C12FDG substrate by flow cytometry. (B) P1 ECs were incubated for 48 h with 10 nM PhtdSer eq SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/1</sub> (10 nM PhtdSer eq) before assessment of SA-β-gal enzymatic activity using the chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-d-galactopyranoside (X-gal) at pH6. Data express as the number of blue cells per 10<sup>4</sup> cells. (C-E) P1 ECs were incubated for 24 h with 30 nM PhtdSer eq. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/1</sub> before determination of the expression of p53 (C), p21 (D) and senescence marker p16 (E) proteins by western blot. Immunoblots (upper panel) and densitometry analysis of cumulative data (lower panel). Data are expressed as mean ± SEM of experiments performed at least on three different cells cultures. SMP<sub>CTL</sub>: SMP collected from unstimulated splenocyte, P3 ECs : Senescent cells. \*\**P*<0.01 vs P1 ECs, \*\*\**P*<0.001 vs P1 ECs, #*P*<0.0001 vs P1 ECs.



**Figure 3. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> promote oxidative stress and the up-regulation of pro-oxidant enzymes in P1 ECs.** (A) P1 ECs were incubated for 6 h either with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 nM PhtdSer eq SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> before the determination of oxidative stress using the redox-sensitive probe DHE. (B) P1 ECs were incubated for 6 h either with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 nM PhtdSer eq. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> before the determination of mitochondrial ROS using Mitoxox red. (C) P1 ECs were incubated for 30 min with an inhibitor of either NADPH oxidase (VAS, VAS-2870, 5  $\mu$ M), cyclooxygenase (Indo, indomethacin, 30  $\mu$ M) or of the mitochondrial respiratory chain complex (MKR, myxothiazol + potassium cyanide + rotenone, 1  $\mu$ M each) before the addition of 10 nM PhtdSer eq SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> for 6 h, and the subsequent measurement of oxidative stress. (D-G) P1 ECs were incubated for 24 h with 30 nM PhtdSer eq SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> before determination of the expression of eNOS and NADPH oxidase subunits by western blot. Immunoblots (upper panel) and densitometry analysis of cumulative data (lower panel). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of experiments performed at least on three different cells cultures. <sup>\*\*</sup> $P$ <0.01 vs P1 ECs, <sup>\*\*\*</sup> $P$ <0.001 vs P1 ECs, <sup>#</sup> $P$ <0.0001 vs P1 ECs.



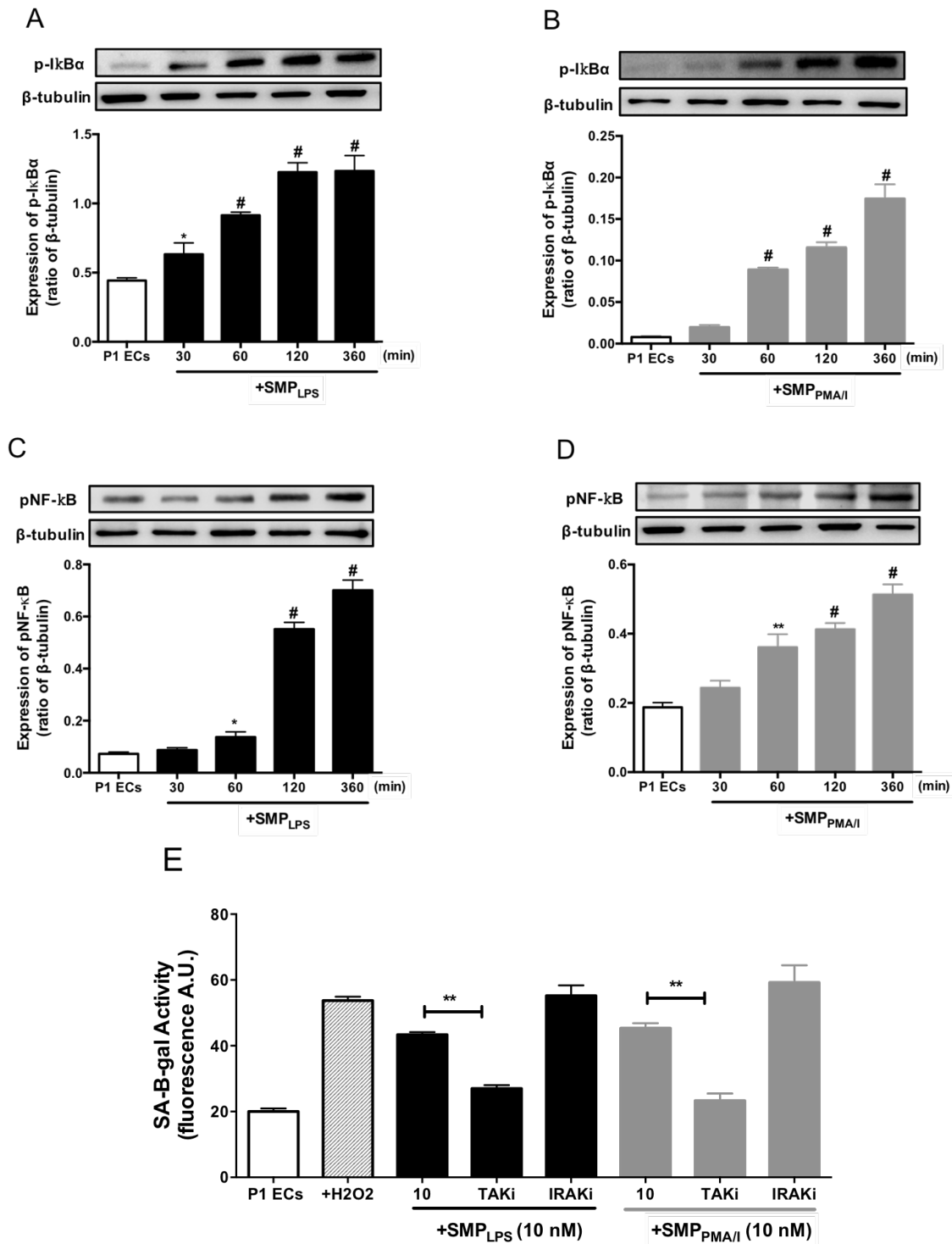
**Figure 4.  $SMP_{LPS}$  or  $SMP_{PMAI}$  induce a pro-coagulant response, promote the local angiotensin system in P1 ECs and the secondary shedding of pro-coagulant MPs.** (A-B) P1 ECs were incubated with 10-30 nM PhtdSer eq.  $SMP_{LPS}$  or  $SMP_{PMAI}$  before determination of the expression of TF by western blot after 24 h (A), and TF activity measured at cell surface after 6 h (B) by Tenase assay. Results expressed as fold increase Tenase activity in P1 ECs: PMTF per  $10^4$  cells. (C) P1 ECs were incubated for 24 h either with 30 nM PhtdSer eq  $SMP_{CTL}$ , different concentrations of  $SMP_{LPS}$  or  $SMP_{PMAI}$  (1-30 nM PhtdSer eq.) before measurement of endothelial MPs in the supernatant by prothrombinase assay. (D-E) P1 ECs were incubated for 24 h with 30 nM PhtdSer eq.  $SMP_{LPS}$  or  $SMP_{PMAI}$  before determination of the expression of ACE (A), AT1R (B) by western blot. Immunoblots (upper panel) and densitometry analysis of cumulative data (lower panel). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of experiments performed at least on three different cells cultures. \*\* $P < 0.01$  vs P1 ECs, \*\*\* $P < 0.001$  vs P1 ECs, # $P < 0.0001$  vs P1 ECs.



**Figure 5. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/II</sub> blunt bradykinin endothelial-induced relaxation in porcine coronary artery rings.**

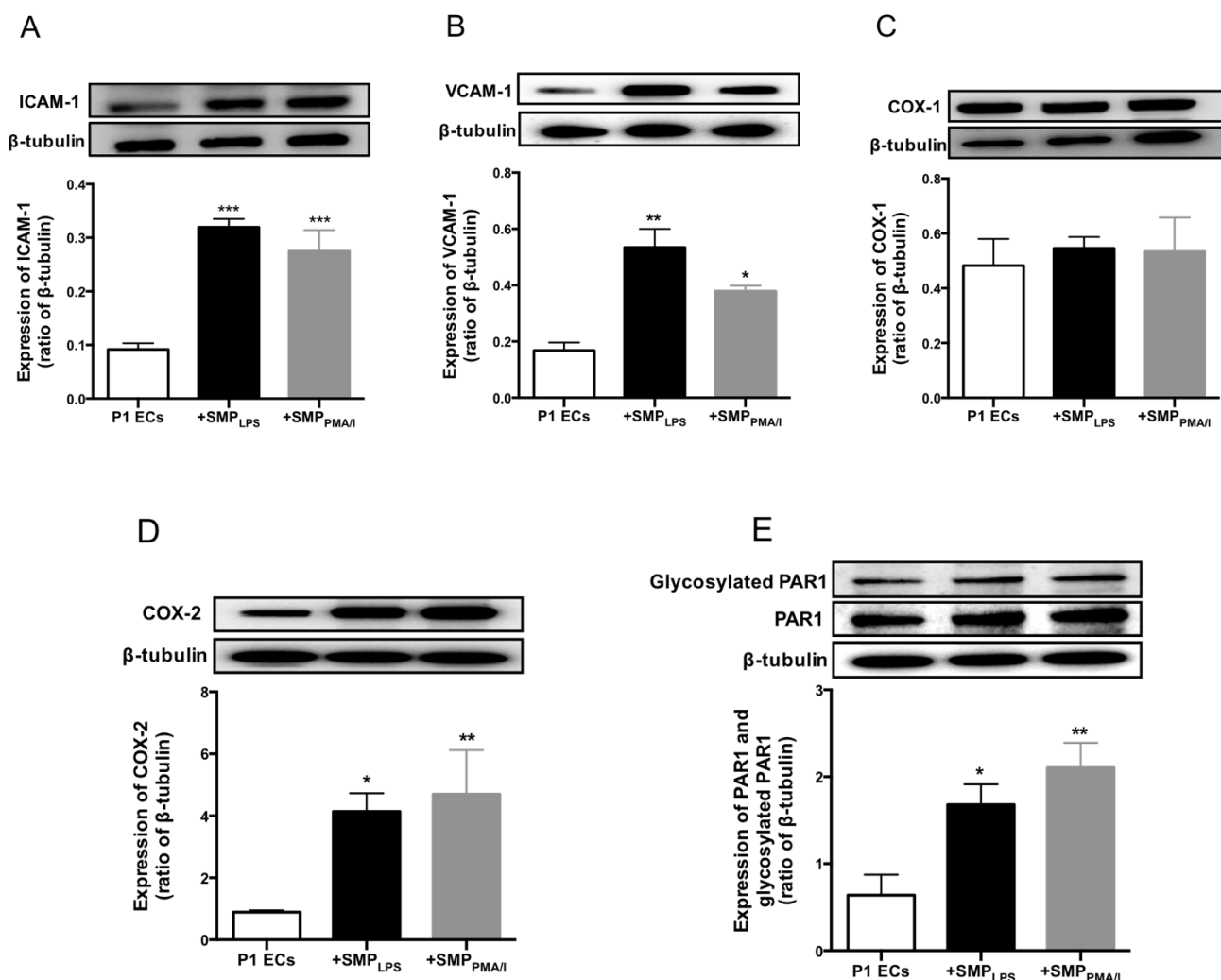
Effect of SMPs on the vascular reactivity to bradykinin. (A-B) Coronary artery rings were incubated for 12 h with different concentrations of SMP<sub>LPS</sub> (A) or SMP<sub>PMA/II</sub> (B) (1-30 nM PhtdSer eq.) before construction of concentration-response curves to bradykinin. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of experiments performed at least on three different rings incubation. \* $P < 0.05$  vs untreated rings, \*\* $P < 0.01$  vs untreated rings, # $P < 0.0001$  vs untreated rings.



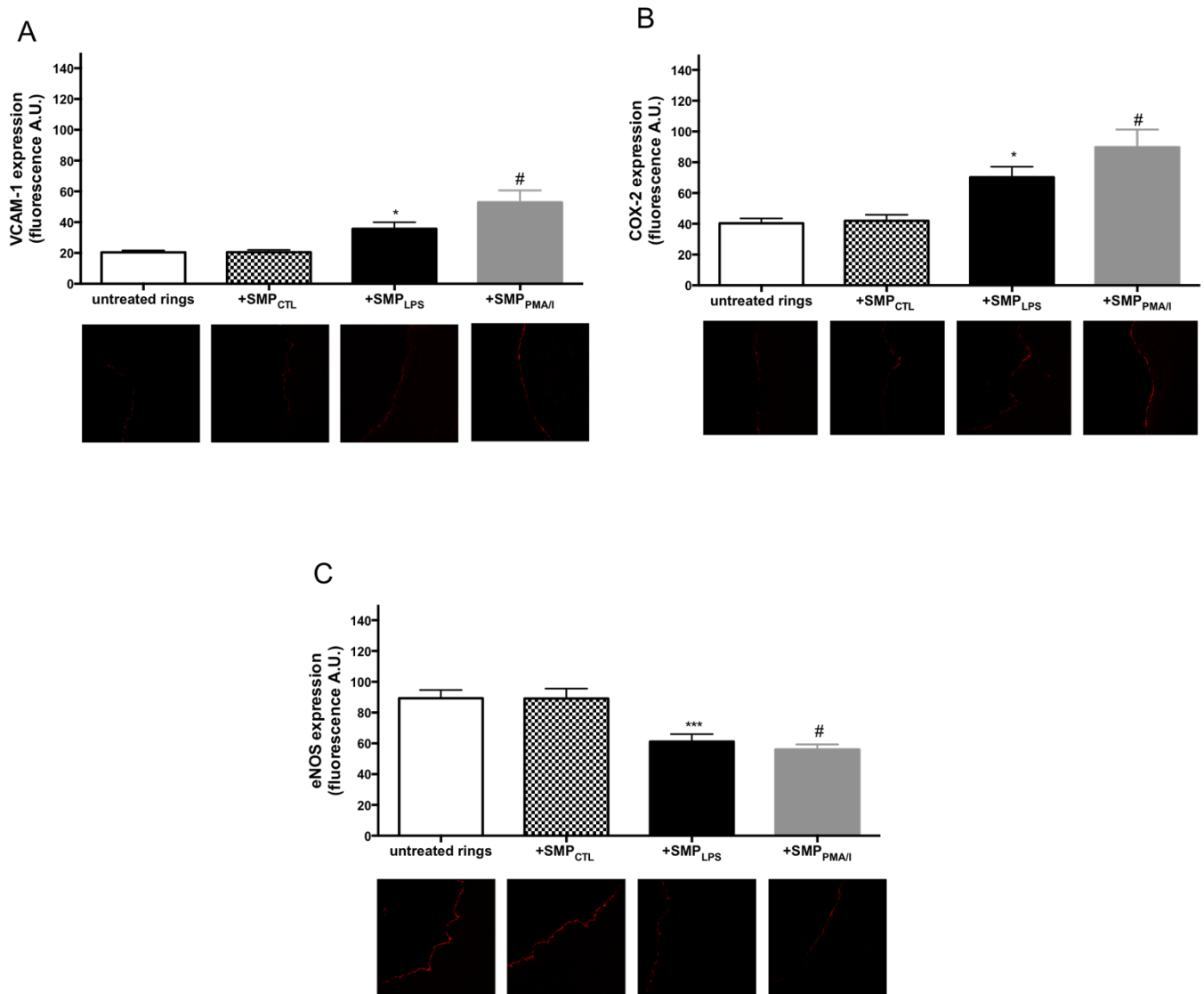


**Figure 6. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> trigger phosphorylation of IkBα and NF-κB in P1 ECs.**

P1 ECs were incubated for 24 h with 30 nM PhtdSer eq. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> before determination of the phosphorylation level of IkBα (A-B), and NF-κB (C-D). Immunoblots (upper panel) and densitometry analysis of cumulative data (lower panel). (E) P1 ECs were incubated either with 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and a selective inhibitor of TAK-1 kinase (TAKi, (5z)-7-Oxozeanol, 10 μM) or IRAK (IRAKi, 10 μM) for 30 min prior to the addition of 10 nM PhtdSer eq. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> for 48 h before the determination of SA-β-gal activity. Data are expressed as mean±SEM of experiments performed at least on three different cells cultures. \**P*<0.05 vs P1 ECs, \*\**P*<0.01 vs P1 ECs, #*P*<0.0001 vs P1 ECs, \*\**P*<0.01 vs +10 nM SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub>

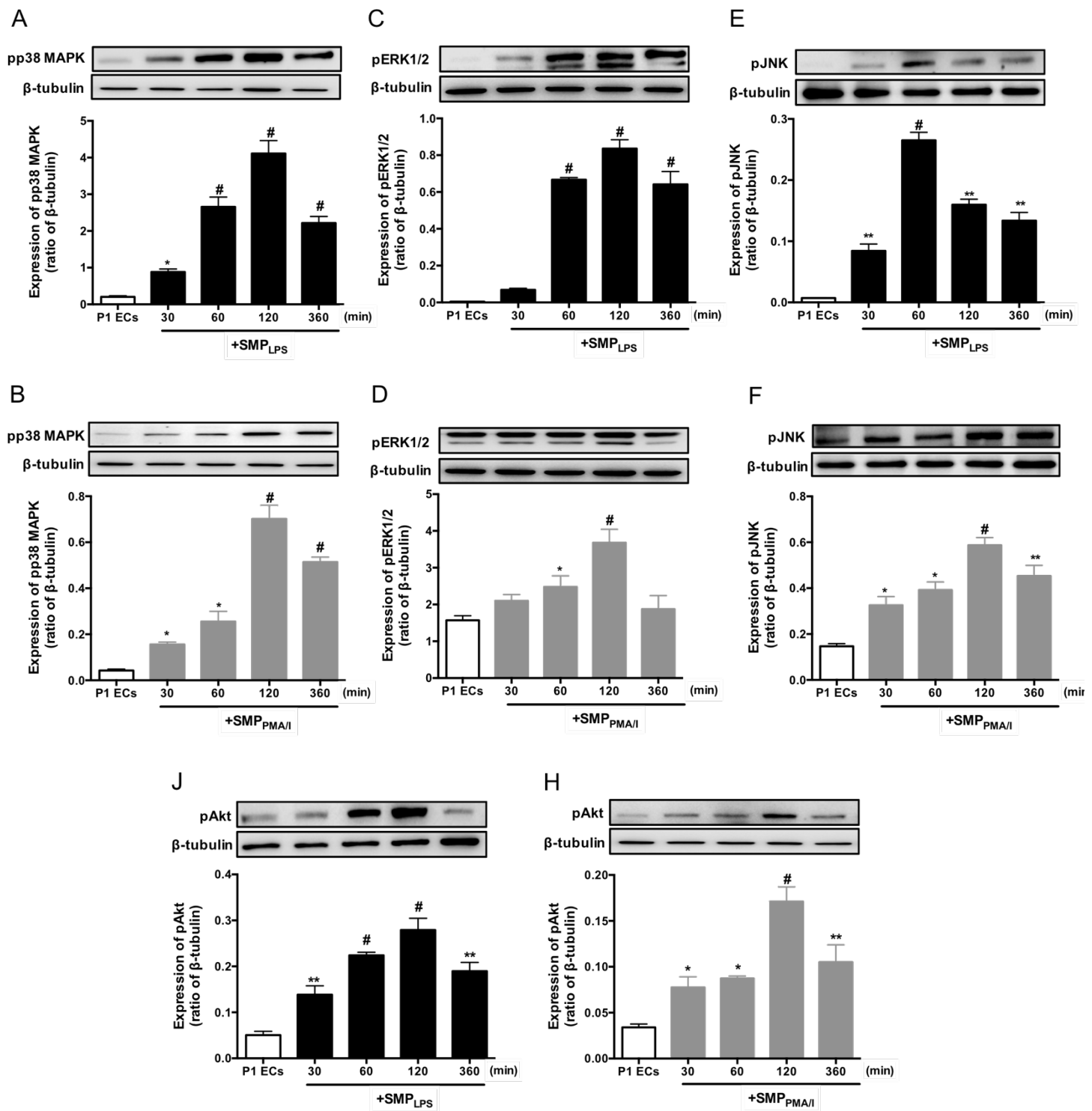


**Figure 7. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMAI</sub> induce a pro-inflammatory responses in P1 ECs with up-regulation of endothelial adhesion molecules, PAR-1 and COX-2.** P1 ECs were incubated for 24 h with 30 nM PhtdSer eq. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMAI</sub> before determination of the expression of ICAM-1 (A), VCAM-1 (B), COX-1 (C), COX-2 (D), PAR1 and glycosylated PAR1 (E). Immunoblots (upper panel) and densitometry analysis of cumulative data (lower panel). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of experiments performed at least on three different cells cultures. \* $P$ <0.05 vs P1 ECs, \*\* $P$ <0.01 vs P1 ECs, \*\*\* $P$ <0.001 vs P1 ECs.



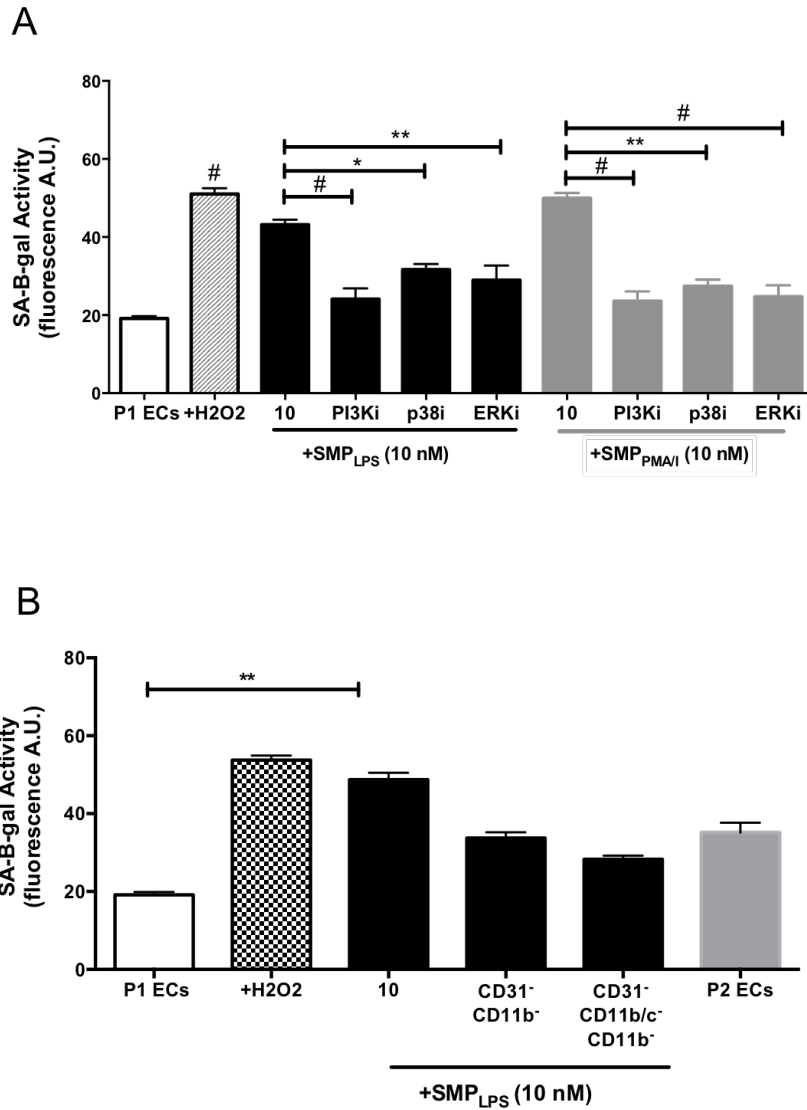
**Figure 8. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> induce the up-regulation of VCAM-1 and COX-2 and the down-regulation of eNOS in coronary artery rings.**

P1 ECs were incubated for 12 h with either 30 nM SMP<sub>CTL</sub>, 10 nM SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> before determination of the expression of VCAM-1 (A), COX-2 (B), and eNOS (C) by confocal fluorescence microscopy. Representative micrographs showing fluorescent signal of different labeled antibody. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of experiments performed at least on three coronary artery rings incubation. \* $P$ <0.5 vs untreated rings, \*\*\* $P$ <0.001 vs untreated rings, # $P$ <0.0001 vs untreated rings.



**Figure 9.  $SMP_{LPS}$  or  $SMP_{PMA/I}$  trigger phosphorylation of p38 MAPK, ERK1/2, JNK and Akt in P1 ECs.**

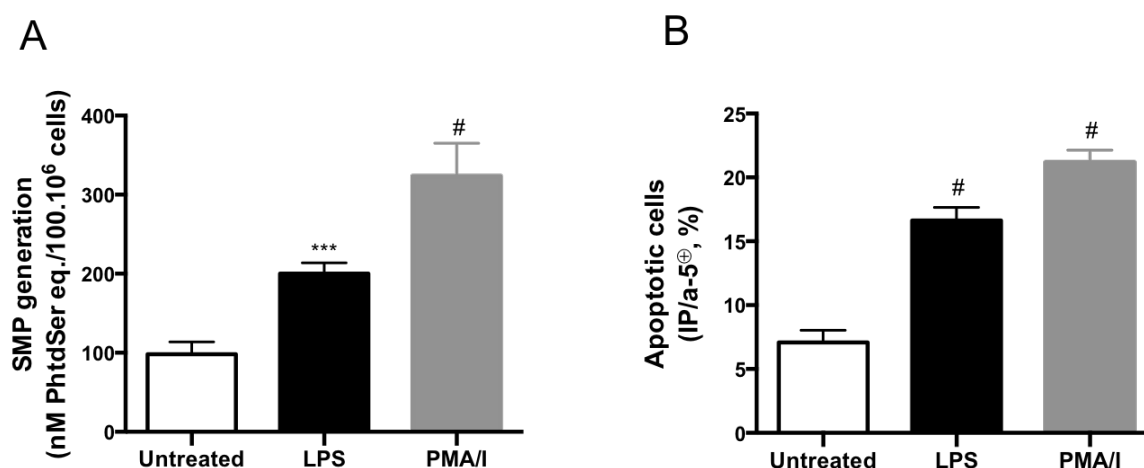
P1 ECs were incubated for 24 h with 30 nM PhtdSer eq.  $SMP_{LPS}$  or  $SMP_{PMA/I}$  before determination of the phosphorylation level of p38 MAPK (A-B), ERK1/2 (C-D), JNK (E-F), and Akt (J-H). Immunoblots (upper panel) and densitometry analysis of cumulative data (lower panel). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of experiments performed at least on three different cells cultures. \*\* $P < 0.05$  vs P1 ECs, \*\* $P < 0.01$  vs P1 ECs, # $P < 0.0001$  vs P1 ECs.



**Figure 10. SMP<sub>LPS</sub> induce endothelial senescence through MAPKinase and PI3Kinase pathways, and via neutrophil-derived MPs.**

(A) P1 ECs were incubated either with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and a selective inhibitor of PI3-kinase (PI3Ki, LY294002, 10  $\mu$ M), p38 MAPK (p38i, SB203580, 10  $\mu$ M) or ERK  $\frac{1}{2}$  (ERKi, PD98059, 10  $\mu$ M) for 1 h prior to the addition of 10 nM PhtdSer eq. SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMAI</sub> for 48 h before the determination of SA- $\beta$ -gal activity. (B) Effect of the removal of either CD31<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>-MPs, or CD31<sup>+</sup>/CD11b<sup>+/c</sup><sup>-</sup>-MPs on the endothelial pro-senescent effect of SMP<sub>LPS</sub>. P1 ECs were incubated with either un-depleted or depleted 10 nM SMP<sub>LPS</sub> for 48h before the determination of SA- $\beta$ -gal activity. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of experiments performed at least on three different cells cultures. \* $P$ <0.05 vs P1 ECs \*\* $P$ <0.01 vs P1 ECs, \*\*\* $P$ <0.001 vs P1 ECs, # $P$ <0.0001 vs P1 ECs.

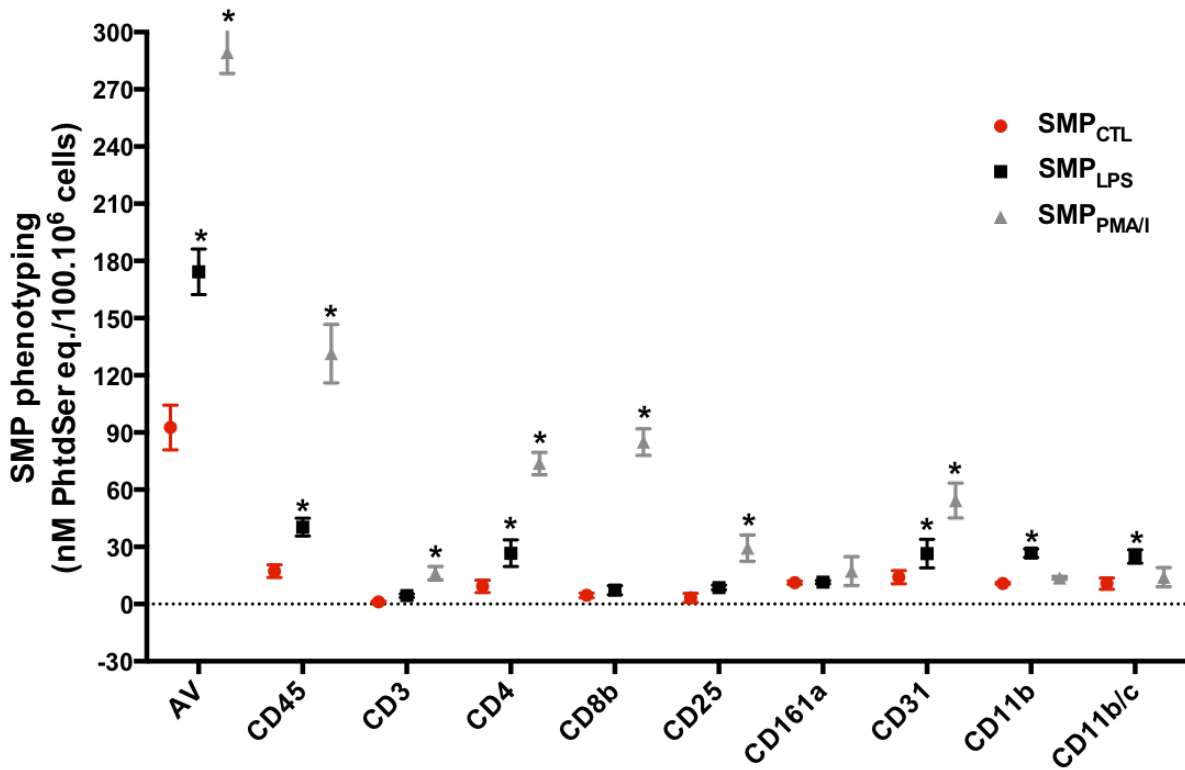
# Supplementary data



## **Supplemental Figure 1. Effect of LPS and PMA/calcium ionophore on the generation of microparticles by splenocytes and splenocyte apoptosis.**

Rat splenocytes ( $5 \cdot 10^6$  cells/ml) in 20 ml were stimulated for 24 h in the absence or presence of LPS (5  $\mu$ g/ml) or a combination of 25 ng/ml PMA and 1  $\mu$ M A12387 calcium ionophore. (A) Rat splenocyte-derived microparticles (SMP) in cell supernatant were measured by prothrombinase assay and expressed as nanomoles of phosphatidylserine equivalents (nM PhtdSer eq.) per  $100 \cdot 10^6$  cells. (B) Splenocytes apoptosis was measured by flow cytometry using Annexin-5 and propidium iodide double labeling.

Untreated : Unstimulated rat splenocytes, LPS : Lipopolysaccharide, PMA/I : phorbol 12-myristate 13-acetate + A23187 calcium ionophore. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of experiments performed at least on three different cells cultures. \*\* $P < 0.01$  vs untreated, # $P < 0.001$  vs untreated.



**Supplemental Figure 2. Measurement of A5<sup>+</sup>-SMP (AV), CD45<sup>+</sup>-SMP, CD3<sup>+</sup>-SMP, CD4<sup>+</sup>-SMP, CD8b<sup>+</sup>-SMP, CD25<sup>+</sup>-SMP, CD161a<sup>+</sup>-SMP, CD31<sup>+</sup>-SMP, CD11b<sup>+</sup>-SMP, CD11b/c<sup>+</sup>-SMP released in the supernatant of splenocytes after 24h LPS and PMA/calcium ionophore stimulation.**

Rat splenocyte-derived microparticles (SMP) were measured in cell supernatants by prothrombinase assay and expressed nM PhtdSer eq. per 100.10<sup>6</sup> cells. Characterization of the SMP cell origin was performed by capturing SMP onto biotinylated antibodies directed against leucocyte CDs before quantification by prothrombinase assay. Data are expressed as mean ± SEM of experiments performed at least on three different cells cultures.

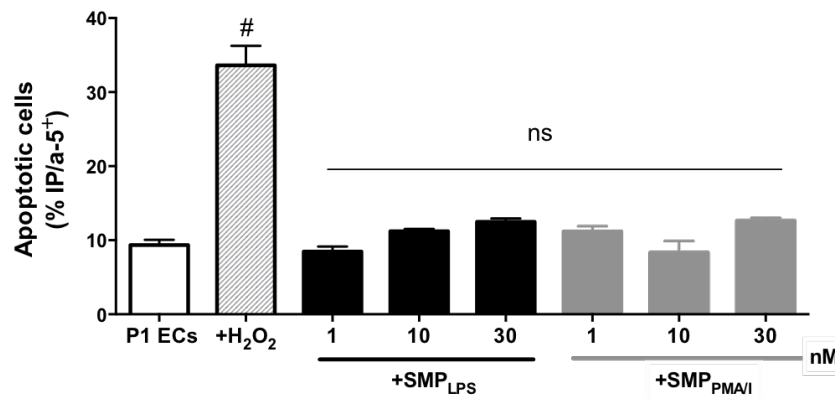
SMP<sub>CTL</sub>: SMP collected from unstimulated splenocytes, SMP<sub>LPS</sub>: SMP collected from LPS stimulated splenocytes, SMP<sub>PMA/I</sub>: SMP collected from PMA/I stimulated splenocytes, AV : Annexin 5. \**P*<0.05 vs SMP<sub>CTL</sub>.

Rat Splenocytes MPs concentration (nM Phtdser eq.)	SMP <sub>CTL</sub>	SMP <sub>LPS</sub>	SMP <sub>PMA/I</sub>
AV +	95±8	177±11	290±10
CD45 +	17,2±3,5	40,3±5,3	131,4±16,6
CD3 +	1,13±0,3	4,4±1,1	16,16±2,8
CD4 +	9,3±3,7	26,7±7,3	73,76±6,2
CD8b +	4,5±1,16	7,3±2,7	85±7
CD25 +	3,26±2,6	8,7±1,3	29,3±6,7
CD161a +	11,23±0,96	11,53±0,8	17,3±4,43
CD31 +	14,06±2,5	26,4±6,6	54,3±9,7
CD11b +	10,8±0,46	26,7±1,9	13,7±0,53
CD11b/c +	10,7±2,3	25,1±2,9	14,1±2,8

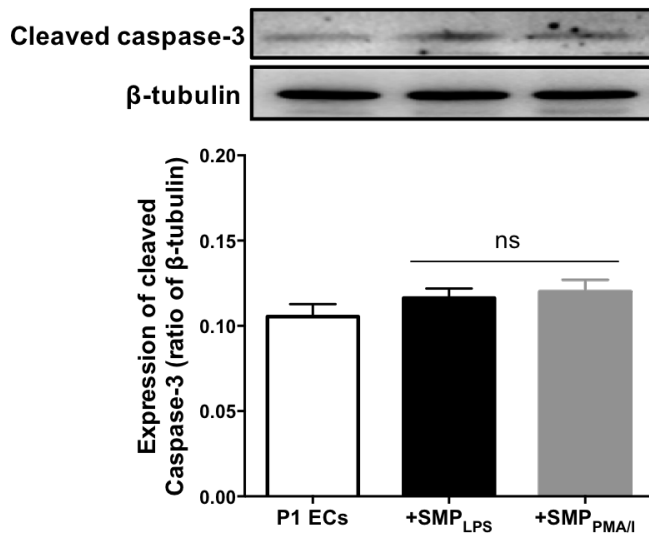
**Supplemental Table 1. Measurement of A5<sup>+</sup>-SMP (Annexin V), CD45<sup>+</sup>-SMP, CD3<sup>+</sup>-SMP, CD4<sup>+</sup>-SMP, CD8b<sup>+</sup>-SMP, CD25<sup>+</sup>-SMP, CD161a<sup>+</sup>-SMP, CD31<sup>+</sup>-SMP, CD11b<sup>+</sup>-SMP, CD11b/c<sup>+</sup>-SMP generated by splenocytes after 24h LPS and PMA/calcium ionophore stimulation.** Data are expressed as nM PhtdSer and mean ± SEM of experiments performed at least on three different cells cultures.



A

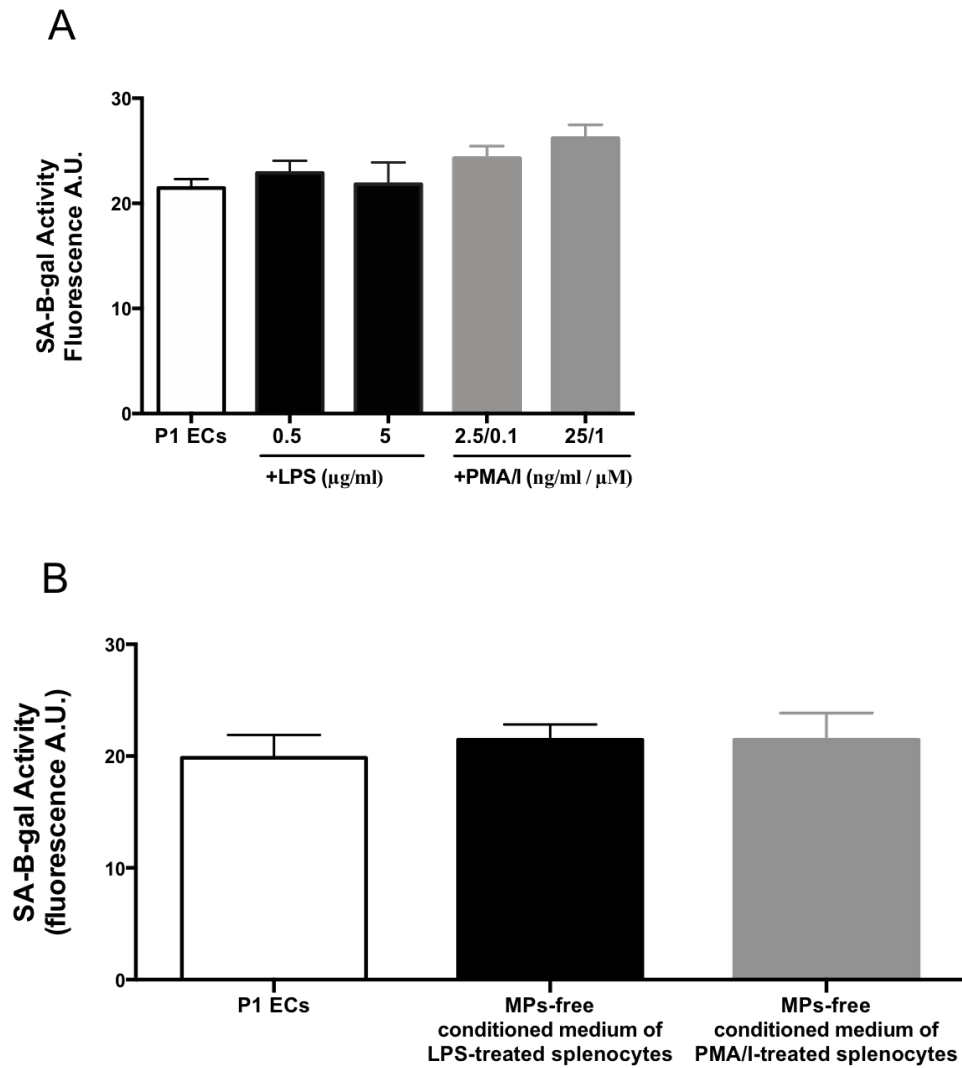


B



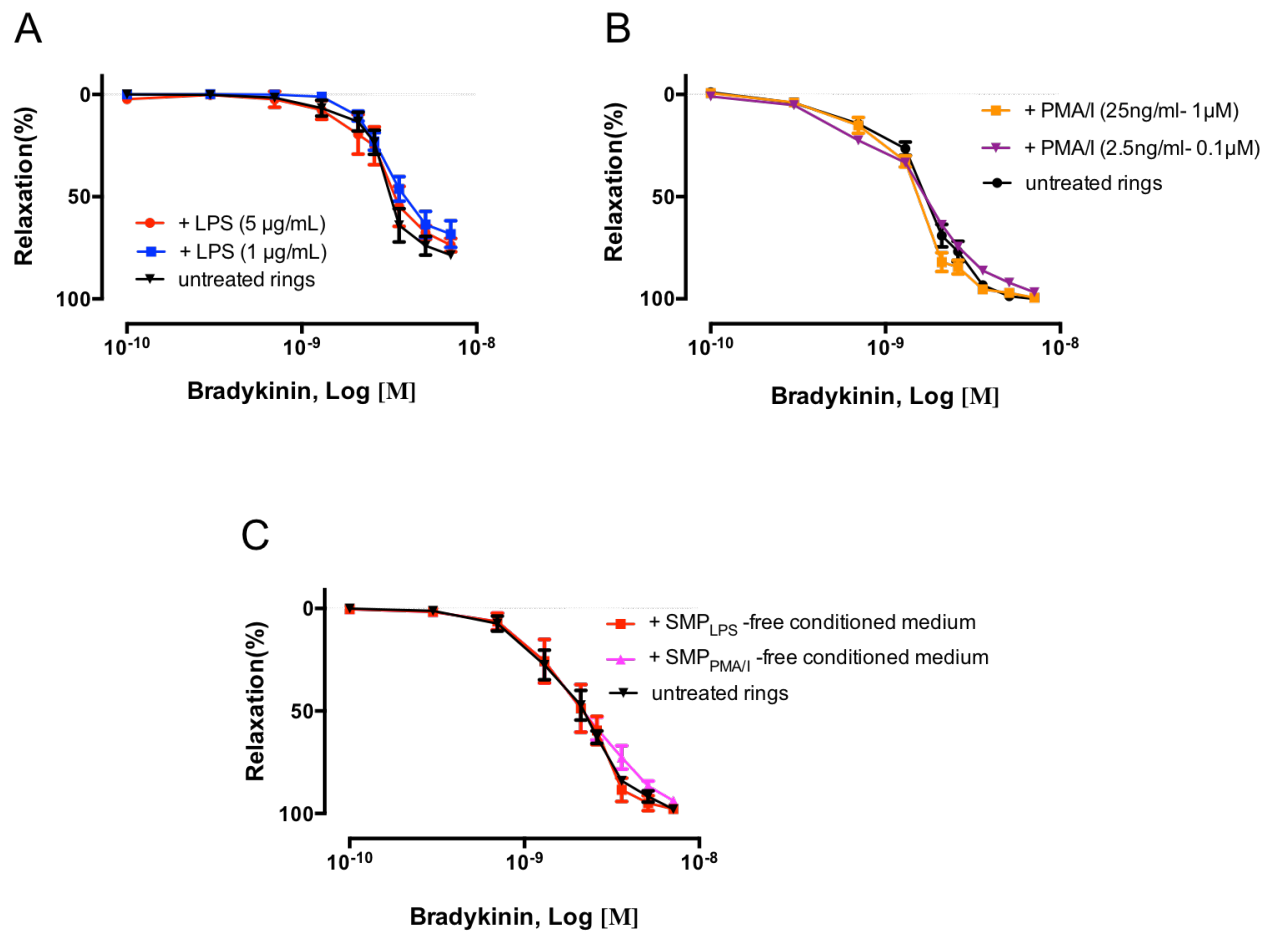
**Supplementary Figure 3. Impact of SMPs from stimulated splenocytes on P1 young endothelial cells (ECs) apoptosis and cleaved caspase-3 expression.**

(A) P1 ECs were incubated for 24 h either with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, different concentrations of SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> (1-30 nM PhtdSer eq.) before determination of the percentage of apoptotic cells using Annexin-5 and propidium iodide double labeling by flow cytometry. (B) P1 ECs were incubated for 24 h with SMP<sub>LPS</sub> or SMP<sub>PMA/I</sub> (30 nM PhtdSer eq.) before determination of the expression of cleaved caspase-3 by western blot. Immunoblots (upper panel) and densitometry analysis of cumulative data (lower panel). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of experiments performed at least on three different cell cultures. ns : no significant vs P1 ECs, <sup>#</sup>*P*<0.001 vs P1 ECs.



**Supplemental Figure 4. LPS, PMA/I or truly soluble mediators from the supernatant of LPS- or PMA/I-treated splenocytes are not pro-senescent**

(A) P1 ECs were incubated for 48 h with different concentrations of LPS or PMA/I. SA-β-gal activity was measured by flow cytometry. (B) P1 ECs were incubated for 48 h in the absence (P1 ECs) or presence of the conditioned medium of LPS- or PMA/I-treated splenocyte after removal of SMPs by a double step high centrifugation. SA-β-gal activity was measured by flow cytometry. Data are expressed as mean ± SEM of experiments performed at least on three different cells cultures.



**Supplemental Figure 5. Bradykinin endothelial-induced relaxation in coronary artery rings in the presence of LPS, PMA/I or truly soluble mediators from the supernatant of LPS- or PMA/I-treated splenocytes**

(A) Coronary artery rings were incubated for 12 h with different concentrations of (A) LPS or (B) PMA/I or (C) in the presence of the conditioned medium of LPS- or PMA/I-treated splenocyte after removal of SMPs, before construction of concentration-response curves to bradykinin. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of experiments performed at least on three different rings.

	Before depletion	After CD31 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup> -MPs depletion	After CD31 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup> /CD11b/c <sup>+</sup> -MPs depletion
<b>Total SMP<sub>LPS</sub></b>	270±15 nM	220±9 nM	190±13 nM
<b>CD31<sup>+</sup>-SMP<sub>LPS</sub></b>	40.7±8 nM	22±3.4 nM	20±2.5 nM
<b>CD11b<sup>+</sup>-SMP<sub>LPS</sub></b>	36.2±7 nM	8±1.3 nM	6 nM
<b>CD11b/c<sup>+</sup>-SMP<sub>LPS</sub></b>	31.6±5 nM	25±3 nM	8±1.8 nM

**Supplemental Table 2. SMP measurement and characterization of their cell origin in total and immunodepleted suspensions.** A5<sup>+</sup>-SMP<sub>LPS</sub> (Total SMP<sub>LPS</sub>), CD31<sup>+</sup>-SMP, CD11b<sup>+</sup>-SMP, CD11b/c<sup>+</sup>-SMP were measured in concentrated and washed SMP suspensions obtained by 24 h LPS treatment and after specific removal by immuno-depletion using magnetic beads coated antibodies directed against CD31, CD11b, or CD11b/c. (n=2)

*Article 2*

---

## Article 2: en préparation

Impact of Pro-Senescent Endothelial Microparticles on Rat Pancreatic Islet.  
Mohamad Kassem, **Ali El Habhab**, Guillaume Kreutter, Lamia Amoura, Philippe Blatzinger, Malak Abbas, Fatiha Zobairi, Valérie B. Schini-Kerth, Laurence Kessler, Florence Toti

**Contexte :** La transplantation d'îlots pancréatiques est une thérapie cellulaire proposée pour les patients DT1 instable. Elle permet de restaurer le contrôle glycémique et d'améliorer l'insulino-indépendance observée chez 50% des patients transplantés après 5 ans. Chez les patients transplantés d'îlots, un pic précoce de MPs circulantes pro-coagulantes a été observé avant la perte de la masse insulaire fonctionnelle, parallèlement à une augmentation des besoins en insuline, suggérant que les MPs seraient utiles comme biomarqueur non invasif et précoce de la perte du fonction d'îlots pancréatiques [358, 359]. De plus, de premiers résultats dans la cohorte MIPIL, ont montré que les MPs de cellules endocrines sont aussi précocement déversées dans le flux sanguin. Des études sont en cours pour établir le phénotype des MPs circulantes chez les patients greffés d'îlots dans la cohorte clinique STABILOT dans l'espoir d'établir un marqueur composite de la cause de la dysfonction, notamment en recherchant la signature cellulaire de la réponse immune, innée ou adaptative.

D'une manière générale, si la durée de vie du greffon s'améliore progressivement avec la prise en charge du patient et l'amélioration des procédures, l'âge du donneur représente une autre cause possible de la dysfonction progressive du greffon, limitant l'efficacité de la greffe. En France, les donneurs jeunes sont attribués à la transplantation du pancréas entier, exagérant l'impact de l'âge sur le succès de la greffe d'îlots. Le vieillissement est caractérisé par la sénescence cellulaire. Bien que la sénescence immune puisse être considérée comme favorable à la transplantation, il est tentant de supposer que la sénescence des cellules du greffon et de son environnement favorise sa dysfonction. En particulier, des études de notre laboratoire ont montré que la sénescence est associée à une altération de la morphologie et de la fonction du pancréas dont les signes précoces ont été mis en évidence chez le rat d'âge moyen alors même que la fonction endothéliale n'était pas affectée dans les artères aortiques et que les taux de MPs circulantes étaient superposables à ceux mesurés chez un rat jeune [370] (voir annexe N°1). Parallèlement à l'observation de la sénescence pancréatique, d'autres membres de l'équipe ont observé des signes d'altération vasculaire par marquage X-gal révélant une sénescence au

niveau de la crosse aortique, un site de perturbation de l'écoulement sanguin (thèse M. Kassem, 2017), ce qui suggère que la dysfonction endothéliale apparaît progressivement et initialement aux sites vasculaires les plus fragiles.

**Rationnel et Objectifs :** Nous nous sommes posé la question de l'impact de la dysfonction endothéliale sur la revascularisation et la survie péri et post-transplantation du greffon insulaire. En effet, les MP endothéliales (EMPs) libérées par les cellules endothéliales sénescents agissent comme des effecteurs pro-thrombotiques, pro-sénescents et pro-oxydants [249]. En outre, les MP endothéliales pro-sénescents véhiculent le facteur tissulaire, un médiateur central de la réaction inflammatoire et pro-coagulante IBMIR au cours des premières heures post-injection des îlots [60] (cf. premier article). Enfin, dans le contexte de l'injection intra portale des îlots, la pression en oxygène dans les vaisseaux hépatiques et l'outillage antioxydant limité des cellules endothéliales de ces vaisseaux sont favorables à une dysfonction accélérée, et potentiellement à la libération de EMPs délétères.

Dans la présente étude, nous avons cherché à étudier l'impact des MPs endothéliales (EMPs) pro-sénescents sur la sénescence prématurée des îlots pancréatiques isolés, mimant les conditions d'ischémie suite au stress d'isolement.

**Méthodologie et résultats :** Les EMPs pro-sénescents ou non ont été récoltés à partir de surnageant de culture de cellules endothéliales primaires de l'artère coronaire porcine. Les cellules sénescents ont été cultivés jusqu'au passage 3 (P3) et les cellules jeunes jusqu'au passage 1 (P1). Les îlots pancréatiques ont été isolés à partir de rats wistar mâles et traités pendant 24 heures avec les EMPs de cellules jeunes ou pro-sénescents.

Nous avons comparé sur l'effet et la cinétique d'interaction des deux types d'EMPs avec les îlots grâce à un marquage des MPs par la sonde lipidique fluorescente PKH26. La spécificité de l'effet pro-sénéscent est attestée par l'étude de la viabilité des îlots et de l'apoptose mesurées par cytométrie en flux après double marquage. L'impact sur la dysfonction a été également confirmé par mesure de la sécrétion d'insuline en réponse à une augmentation de la concentration en glucose.

Nos résultats indiquent l'effet pro-sénéscent des EMPs de cellules sénescents uniquement. Il est attesté par la surexpression des marqueurs p53, p21 et p16.

Nos données montrent que les EMPs pro-sénescents induisent une sénescence cellulaire dans les îlots pancréatiques et altèrent leur fonctionnalité sans affecter la viabilité. Ceci indique que

ces EMPs sont des bio-effecteurs précoces de la perte du greffon et de sa fonction.

Dans la perspective des résultats du premier article, ces données confirment l'importance de l'environnement cellulaire des îlots pour leur survie et indiquent que leur protection vis à vis de l'activation cellulaire serait bénéfique pour prolonger une masse cellulaire fonctionnelle suffisante. Dans le cadre de la transplantation d'îlots, les cellules leucocytaires sont recrutées aux abords de l'îlot et donc susceptibles d'amplifier le dommage endothélial de l'îlot fragilisé par l'ischémie mais aussi celui du vaisseau hépatique très sensible au stress oxydant.

**Perspectives :** Nos données sont en accord avec l'influence délétère probable de l'âge du donneur, susceptible de favoriser une atteinte endothéliale du capillaire intra insulaire avec pour conséquences de probables répercussions néfastes sur la fonction des cellules endocrines de l'îlot via des effets paracrines. Symétriquement, la sénescence endothéliale hépatique est aussi susceptible de favoriser la perte de fonction, et l'âge du receveur reste donc une donnée à explorer.

Nos résultats suggèrent également que le contrôle pharmacologique de la libération de MPs et de l'activation cellulaire au cours de l'isolement des îlots et en péri-opératoire constitue une piste possible de préservation de la fonction de l'îlot.

**Limites :** La génération d'une quantité suffisante de EMPs pro-sénescents dans un modèle de sénescence endothéliale répliquative de rat était techniquement difficile en raison de la petite taille des animaux. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser des cultures primaires de cellules endothéliales d'artère coronaire porcine, comme une source pratique et illimitée de cellules endothéliales.

D'autres sources possibles de cellules endothéliales primaires, plus liées au contexte de la transplantation d'îlots pancréatiques, auraient été la veine porte hépatique ou le système vasculaire mésentérique de rat. Bien que ces deux dernières sources permettent un modèle autologue elles restent moins pratiques en raison de la petite taille de l'animal, et du nombre limité de passages pour la culture.

D'autres équipes ont publié des études de modèle de communication inter-cellulaire médié par les microparticules in vitro en utilisant deux espèces différentes. Dans ces conditions, déconnectées du système immunitaire et de cellules du système réticuloendothélial, le contexte immun n'est pas impliqué. Cependant, dans notre modèle nous n'avons pas non plus exploré les effets combinés de la réponse auto-immune et de la sénescence endothéliale.



# Impact of Pro-Senescent Endothelial Microparticles on Rat Pancreatic Islet

**Mohamad Kassem**<sup>1</sup>, Ali El Habhab<sup>1</sup>, Guillaume Kreutter<sup>1</sup>, Lamia Amoura<sup>1</sup>, Philippe Blatzinger<sup>4</sup>, Malak Abbas<sup>2</sup>, Fatiha Zobairi<sup>1</sup>, Valérie B. Schini-Kerth<sup>1,3</sup>, Laurence Kessler<sup>1,4,5\*</sup>, Florence Toti<sup>1,3\*</sup>

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

2. UMR CNRS 7213, Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

3. Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

4. Department of Diabetes and Nutrition Endocrinology, University Hospital of Strasbourg,

5. Faculty of Medicine, Federation of Translational Medicine (FMTS), Strasbourg, France

\* Equal contributing authors

**Running title:** Microparticles impact on pancreatic islet

## Corresponding author:

Florence Toti

INSERM UMR 1260 Regenerative Nanomedicine, Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg

74 route du Rhin, BP 60024

67401 Illkirch-Graffenstaden, France

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

## Abstract

**Background:** Pancreatic islets transplantation is cell therapy for patients with brittle type 1 diabetes, the effectiveness of which remains limited due to the progressive graft dysfunction. Aging is one of the limiting cause of graft success characterized by cellular senescence. We investigated whether pro-senescent endothelial microparticles prompt islet senescence and dysfunction *in vitro*.

**Material and Methods:** Pancreatic islets were isolated from male Wistar rats (200-250 g) (n>4). The microparticles (MPs) were isolated from primary porcine coronary artery endothelial cells after one passage (P1) or after three passage (P3, corresponding to the appearance of senescence). After concentration, 5 nM of MPs P1 and P3 and 100  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were applied for 24 hours on the pancreatic islet. Viability was assessed by fluorescence microscopy (Propidium iodide (PI) / Fluorescein diacetate double labeling), apoptosis by flow cytometry (PI /Annexin V double labeling). Islet function was assessed by calculating the stimulation index defined as the ratio of the secreted insulin measured by Elisa after incubation in low 2.5 mM compared to high 25 mM glucose media. Senescence markers p53, p21 and p16 were measured in islet by western blot. The integration of MPs stained by the lipid fluorescent PKH26 probe was assessed by microscopy and flow cytometry.

**Results:** The stimulation index that show the ability of islets to secrete insulin in response to glucose significantly decreased after treatment by P3 ECs derived MPs ( $1.7 \pm 0.2$  vs.  $2.7 \pm 0.2$  untreated islet,  $p < 0.05$ ) without altering the viability ( $89.47\% \pm 1.69$  vs.  $93.15\% \pm 0.97$  for untreated islet) and with no evidence of significant apoptosis. P3 MPs treatment induced a significant 2 fold increase of the expression of p53, p21 and p16 ( $p < 0.05$ ), whereas P1 MPs had no significant effect. Microscopy and flow cytometry data showed that ECs MPs are well incorporated in pancreatic islet cells.

**Conclusion:** Pro-senescent endothelial induces cellular senescence in pancreatic islets and alters their function without modifying viability. These data suggest an impact of the donor age on islet graft success and question relevance of the pre-conditioning of the graft to limit the aged-induced senescence of the isolated islets prior transplantation and the effect of IBMIR one of the earlier cause for graft failure.

## Background

The World Health Organization (WHO) currently reported 630 million people with diabetes worldwide, it predicts also that until year 2030 diabetes will be the seventh leading cause of death worldwide [1]. T1D is due to the autoimmune destruction of pancreatic islets leading to insufficient insulin production in young adults and children [2]. Treatment of T1D necessitates the daily monitoring of glycaemia and the injection of insulin [3].

Islet transplantation is a cell therapy proposed in patients with brittle T1D, with life threatening issues. Indeed, the grafted islet's  $\alpha$  and  $\beta$  cells dramatically contribute to the restoration of a glycemic control [4]. Pancreatic islets are injected in the portal vein as a cell suspension, which will engraft in liver microvessels.

Despite improvements in immunosuppression protocols, and improved insulin independence rates, reaching up to 50% at 5 years, a gradual loss of islet function that marks chronic graft dysfunction is reported [5].

Currently, the pancreas of younger donors are preferentially allocated to whole pancreas transplantation and those of older donors to islet transplantation. Moreover, aging is accompanied by a loss of vasoprotective capacity of the endothelium due to an endothelial senescence [6] that may constitutes another cause of altered vascularization and dysfunction of the graft.

Cellular senescence is defined by an irreversible cell cycle arrest of the cell accompanied by gene and chromosomal changes [7]. It occurs in response to various signals such as cellular stress, telomere erosion, DNA damage, oxidative stress, or oncogenic activation. Senescence is characterized by a shifted pH of the lysosomal  $\beta$ -galactosidase (Senescence-Associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ gal) activity) [8, 9].

The senescence process involves different actors of cell cycle regulation like tumors suppressor and cyclin dependent kinases. The antioxidant capacity of the pancreas is weak, suggesting a particular susceptibility to oxidative stress eventually leading to endothelial dysfunction [10]. Microparticles (MPs) are submicron plasma membrane fragments (0.05 to 1  $\mu$ m in diameter) released into the extracellular space by stimulated or apoptotic cells after plasma membrane remodeling [11]. MPs express bio-active molecules and surface antigens that are characteristics of cells origin. In islet-transplanted patients, an early peak of circulating procoagulant MPs was observed before graft loss and was associated with increased insulin needs suggesting that MPs could prove useful as a noninvasive and early biomarker of the loss of islet graft function [12]. Data from the literature clearly demonstrate that endothelial MPs contribute to vascular

responses and that when released from senescent cells promote thrombogenicity and endothelial dysfunction [13-15]. The amount of MPs released in the systemic circulation is directly correlated to disease severity [16]. Besides their role as stress markers, MPs act as cellular effectors by delivering the content of harbored active molecules to target cells [17].

In the present study, we sought to determine the role of pro-senescent endothelial MPs in the premature senescence of pancreatic islets. Pro-senescent and young MPs were harvested from the supernatant of porcine coronary artery endothelial cells and incubated with freshly isolated rats islets before measurement of islet function and identification of senescence markers.

## **Material and Methods**

### **Ethics statement**

Male Wistar rats (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. Experiments conform 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 a local ethic committee (Comite d'éthique en Matière d'expérimentation animale de Strasbourg, authorization 03799.01). All animal experiments were done in a registered animal yard within Faculty of Pharmacy (Authorization number E-67-218-26).

### **Endothelial primary cell culture**

Pig hearts were collected from the local slaughterhouse (COPVIAL, Holtzheim, France) and endothelial cells were isolated from the left circumflex coronary arteries as described previously [18]. Briefly, left circumflex coronary artery was excised from fresh heart, cleaned of adhesive conjunctive tissues and the remaining blood was flushed with cold Phosphate Buffered Saline (DPBS) without calcium (Lonza, BE17-512F, Basel, Switzerland). Endothelial cells (ECs) were isolated by filling the artery with a 1 mg/ml, type I collagenase solution (Worthington, Serlabo Technologies, Entraigues sur la Sorgue, France) dissolved in MCDB131 medium (Invitrogen ; Carlsbad, CA, USA) with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml), fungizone (250 µg/ml) and L-glutamine (1mM, all from Lonza, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) for 15 min at 37°C. The ECs were collected after circular massages of the arteries and the remaining cells were flushed with medium. Collected cells were gently centrifuged at 600 g for 5 min, then medium was removed and cells were suspended in MCDB131 medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml), fungizone (250 mg/ml), and L-glutamine (1 mM). Extracted cells

from arteries were seeded in a T25 flask and cultivated at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. The ECs that quickly adhere to the bottom of the flask, were selected by removing non-adherent cells within the medium 6-8 hours after seeding. ECs were sequentially passaged from passage P1 (young cells) to P3 (senescent cells). The medium was changed every 48 h. The cells developed a senescent phenotype (circular shape, largest and better visible nucleus) from the third passage (cells P3).

### **MPs isolation and measurement**

MPs were collected from the supernatant at P1 and P3 passage by sequential centrifugation under sterile conditions [19]. Briefly, cells and debris were discarded by centrifugation at 800 g for 10 min and the supernatant was further centrifuged at 13 000 g, 4 °C for 60 min. The final suspension was kept for less than 30 days at 4°C. MPs measurement was performed by prothrombinase assay after capture onto biotinylated Annexin-5 as previously described [20]. This procedure realizes on the high affinity of annexin-5 (Ann-V) for phosphatidylserine (PS) at MPs surface. The first step consists of the immobilization of biotinylated Ann-V (400 ng / mL) on a plate coated with streptavidin (Roche, France). After three washings with Tris buffered saline (TBS) to remove any excess of non-covalently linked Ann-V. 100 µl sample were added to each well and incubated at 37°C for one hour. After three washes with TBS, the amount of insolubilized MPs was measured by prothrombinase assay. In this assay, the degree of exposure of anionic phospholipids (PS) on the surface of MPs is the limiting factor of the prothrombinase reaction. PS in the presence of the coagulation factors (FII 4.2 µM, FVa 250 pM, FXa 53 pM and CaCl<sub>2</sub> 2 mM), catalyzes the assembly of the prothrombinase complex which converts prothrombin into thrombin. After 10 minutes at 37°C, the generated thrombin is measured using a chromogenic substrate, pNAPEP 0216 (1.52 mM). The cleavage reaction product is detectable at 405 nm. Absorbance is then converted into equivalent phosphatidylserine (eq PhtdSer) by reference to a standard curve obtained using a suspension of synthetic vesicles of known amounts of PS (33% (w/w) of PS and 67% (w/w) of phosphatidylcholine) [21].

### **Rats pancreatic islets isolation**

Pancreatic islets were isolated from Wistar male rats (mean weight 250 g) as described elsewhere [22, 23]. Briefly, rats were anaesthetized by intraperitoneally injection of mixture of Ketamine and Xylazine. A 10 mL of 1 mg/mL Type-XI collagenase (C7657, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) suspension in Hanks balanced saline solution (HBSS) (Lonza, BE10-527F, Basel, Switzerland) was injected into the common bile duct of the euthanized animals. Pancreas

was excised within 30 min maximum, digested at 37°C for 10 min 30 seconds and submitted to strong hand shaking. Digestion was stopped by the addition of cold HBSS supplemented with 1 % bovine serum albumin. The digest was centrifuged at 300 g for 1 min and fat removed. The pellet was submitted to three successive cold washings (4°C) in FBS-supplemented HBSS. Isolation of islets was achieved using a three density gradient Ficoll PM-400 solutions (F4375, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) (densities: 1108, 1096, 1069 g/ml) and centrifugation at 800g for 18 min at 4°C. Islets were recovered from the interface between second and third density, and their purity was evaluated after dithizone (D5130, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) labeling by optical microscopy. Islets were re-suspended in RPMI 1640 (Gibco 21875-034, Saint Aubin, France) containing 11.2 mM glucose and supplemented with 1% penicillin, 1% streptomycin and 10% FBS. After manual handpicking, 200 islets were cultured in non-adherent six-wells plates, and incubated at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours before treatment.

### **Pancreatic islet treatments**

Incubated pancreatic islets were treated for 24 hours by three different agents: 5 nM PhtdSer EQ P1 or P3 cell-derived MPs and hydrogen peroxide 100 µM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (H1009, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA as a positive control). The negative control corresponds to the addition of an equivalent volume of medium. In preliminary experiments the optimal 5 nM MPs concentration was determined by a dose curve response (0-20 nM PhtdSer EQ) established for a 24 hours incubation time.

### **Islet viability**

After 24 hours of stimulation, islet viability was assessed by 2 different approaches. In the first one, we examined the double red PI / green fluorescein diacetate staining. Using an epi fluorescence microscope, red necrotic cells and green viable cells were counted within a suspension of 30-labeled islets. The viability of the islets was calculated as the ratio of green and red fluorescent area / total islet area.

In the second approach, 30 islets per condition were disassociated to isolated cell suspension, and studied by flow cytometry using double PI / Ann-V staining. For this purpose, islets were first centrifuged at 600 g for 10 minutes. After removal of the supernatant, the pellet was suspended in 500 µl of a solution 2x trypsin (340 000 IU/L) and then incubated for 8-10 minutes at 37°C with gentle shaking. After checking under the microscope the complete dissociation of the islets, the reaction was stopped by addition of 700 µl of supplemented medium followed by a 10 minutes centrifugation at 1500 g. The pellet was resuspended in 500 µl fixation buffer

and 5  $\mu$ l of a 50  $\mu$ g/ml annexin 5-FITC solution (final concentration 0.5  $\mu$ g/ml) and 4.5  $\mu$ l of IP solution at 100  $\mu$ g/l (final concentration 1  $\mu$ g/ml) were added. After 10 minutes in the incubator, the cell suspension was analyzed using a flow cytometer set at logarithmic gain. 5000 events were recorded for each sample (Facs calibur, Becton Dickinson, La Jola, CA, USA).

### **Measurement of islet function by Glucose-stimulated insulin secretion**

Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) was measured in 40 islets in a KREBS solution supplemented with 0.5% albumin, 10 mM HEPES and 2.5 mM (0.45 g / L) glucose (basal), or 25 mM (4.5 g / L) glucose (stimulated). After MPs treatment (see below), islets were transferred for 1 hour into the KREBS solution supplemented with 2.5 mM glucose and then centrifuged at 1500 g for 10 minutes. The pelleted islets were incubated for another 1 hour in the KREBS solution 2.5 mM glucose, centrifuged at 1500 g for 10 minutes and their supernatant stored at -80°C until insulin measurement. Islets were finally incubated in the KREBS solution supplemented with 25 mM glucose for 1 hour 30 minutes, centrifuged at 1500 g for 10 minutes and their supernatant harvested and stored at -80°C. The amount of secreted insulin was determined by ELISA (Millipore cat# EZRMI-13K, Billerica, MA, USA). The glucose stimulation index (SI) is the measure of the ability of the purified pancreatic islets to produce insulin when stimulated by an increase in the concentration of glucose. It was calculated by the ratio of insulin concentration after high glucose concentration stimulation (25 mM) to insulin concentration after low glucose concentration stimulation (2.5 mM).

### **Assessment of MPs integration into islets**

MPs collected from P1 and P3 cells were labeled by a red fluorescent lipid probe PKH26 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), washed twice by centrifugation (13 000 g, 60 min), and 5 nM PhtdSer EQ. MPs were incubated with 20 pancreatic islets for each condition for 24 h at 37°C. Accumulation of the probe on target cell surface was observed by fluorescent microscopy (emission maximum  $\lambda$ =567 nm) and quantified by flow cytometry using a FACS-scan cytometer set at logarithmic gain. 5000 events were recorded for each sample.

### **Assessment of Senescence markers by Western blot**

The degree of senescence was evaluated by the expression of p53, p21 and p16 senescence markers in 200 islets per each condition. Following centrifugation of the islets, cellular proteins were extracted after 15 min incubation at 4°C with a specific lysis buffer (Tris/HCl 20 mM (pH 7.5; Q-Biogene, California, USA), NaCl 150 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, sodium pyrophosphate 10 mM, NaF 20 mM, okadaic acid 0.01 mM (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) containing a

tablet of protease inhibitor (Complete Roche, Basel, Switzerland) and 1% Triton X-100 (Euromedex, 2000-B, Souffelweyersheim, France).

Protein lysates (25 µg) were loaded on 10% SDS-polyacrylamide gels at 100 V for 2 h and transferred electrophoretically onto polyvinylidene difluoride membranes (Amersham, Life Sciences, Germany) at 100 V for 120 min. Aspecific binding was blocked by incubation in TBS buffer (Biorad) containing 5% bovine serum albumin (BSA) (Euromedex, 04-100-812-E, Souffelweyersheim, France), and 0.1% Tween 20 (Sigma) (TBS-T) for 2 h.

Membranes were then incubated overnight at 4°C in TBS-T containing 5% BSA and polyclonal rabbit antibody raised against human p53 (1/1000) (Santa Cruz Biotechnology FL-393 SC-6243, Dallas, Texas, USA), human p21 (1/1000) (Abcam ab7960, Cambridge, UK), monoclonal antibody to human p16 (1/1000) (Abcam ab51243, Cambridge, UK). After 3 washings with TBS-T, membranes were incubated with an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and density signals of each band detected using ECL Substrate (170-0561, BIO-RAD, United States). Membranes were incubated with a mouse monoclonal anti-β-tubulin I mouse antibody (Sigma-Aldrich, T7816, Missouri, USA) for normalization purposes. In addition, to allow comparison between different experiments, all data were reported to the untreated control expressed as 100%.

### **Statistical analysis**

All experiments were produced with n=4-5 repetitions. Data are expressed as mean ± S.E.M. Mean values were compared using one-way ANOVA followed by the Mann-Whitney multiple comparisons test using GraphPad Prism version 6.01 for Windows™ (GraphPad Software, San Diego, USA). p <0.05 was considered statistically significant.

## **Results**

### **MPs integration into the islet**

Fluorescent PKH26 stained MPs confirmed the interaction between MPs and pancreatic islets. Indeed, after 24 hours incubation with 5nM eq PhtdSer MPs, the PKH26-red labelling was identified in the islets by fluorescent microscopy, suggesting that MPs had integrated into islets (Figure 1A).

After complete dissociation of the islets, flow cytometry showed a significant increase in the proportion of fluorescent cells after treatment with both P1 and P3 labeled MPs compared to the untreated islets (P1-MPs 39.5 ± 0.86%, P3-MPs 42.75 ± 5.20% vs. untreated islets 6.91 ± 1.83%, p<0.001) (Figure 1 B).



### **Effect of pro-senescent endothelial MPs on islet viability**

Treatment by P3-ECs derived MPs (P3-MPs) or by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed a significant decrease of pancreatic islets viability only with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (89.47% ± 1.61 for P3-MPs; 84.09% ± 1.69 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; p<0.05) compared to untreated islets after 24 hours. Similarly to P3-MPs the P1-Ecs-derived MPs (P1-MPs) did not lead to any significant change in islet viability (93.21% ± 0.81 for P1; 93.15% ± 0.97 for untreated islets, p>0.05). In addition, no morphological change of the islets could be evidenced and central necrosis remained low in both P1- and P3-MPs treated islets (Figure 2).

Furthermore, apoptosis quantification by flow cytometry performed on cell suspensions after complete dissociation of the islets confirmed the absence of a significant viability loss in MPs-treated islets. P3-MPs led to a trend to increase in apoptosis (P3-MPs: 36.66% ± 2.09 vs. 24.80% ± 2.53, p>0.05 in untreated islets). However H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment was associated with a significant increase in apoptosis (38.12% ± 4.14 vs. 24.80 ± 2.53% in the untreated islets, p<0.05) indicating that the isolated islets indeed remained sensitive to oxidative stress under our conditions. Furthermore, the degree of apoptosis after P1-MPs treatment (27.70% ± 3.04) was similar to that of untreated islets (Figure 3).

### **Pro-senescent endothelial MPs alter islet function**

A significant 41% SI reduction was observed after treatment with the pro-senescent P3-MPs (1.23 ± 0.06 in P3-MPs vs 2.10 ± 0.31 in untreated islets, p<0.05). Treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> led to a 43% decrease in the ability of islets to secrete insulin in response to glucose (1.20 ± 0.06 vs. untreated islets; p<0.01). A non-significant trend to a SI decrease was observed after P1-MPs treatment (1.76 ± 0.27, p>0.05 vs. untreated islets) (Figure 4).

### **Pro-senescent MPs induce the up-regulation of senescence markers**

P3-MPs significantly increased the expression of p53 after 24 hours compared to P1-MPs and untreated islets (P3-MPs: 1.78 ± 0.15 vs. P1-MPs: 1.10 ± 0.12 or untreated islets: 1, p<0.05). A similar pattern was observed for p21 up-regulation (P3-MPs: 2.08 ± 0.38 for; vs. P1-MPs 0.94 ± 0.11 or untreated islets; p<0.05). The expression of p16, the p21 downstream effector, was solely and significantly increased by P3-MPs (1.80 ± 0.28 for P3-MPs vs. untreated islets, p<0.05), whereas no significant variation was observed after treatment by P1-MPs (0.94 ± 0.09). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced a higher p53 up-regulation than P3-MPs (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2.19 ± 0.43 vs. untreated islets, p<0.05). By contrast no significant effect of P1-MPs could be detected on the expression level of p53, p21 and p16, suggesting a specific pro-senescent action exerted by P3-MPs (Figure 5).

## **Discussion**

The present study demonstrates that endothelial pro-senescent P3-MPs integrate into freshly isolated islets, prompt the up-regulation of senescence markers and alter islets' function assessed by glucose SI.

### **Endothelial MPs from young and senescent cells similarly integrate into the islet**

In previous functional MP-mediated cross-talk studies, we had shown that PKH-26 labelled MPs released from insulin secreting cells after over-night cytokine stimulation or oxidative stress are early pro-inflammatory autocrine effectors that interact with the  $\beta$ -cell plasma membrane within 8 hours and reduce insulin secretion [19]. Similarly, MPs shed from exocrine pancreatic cells in response to 1  $\mu$ g/mL LPS, also altered the  $\beta$ -cell function after 18 h treatment [24].

### **Pro-senescent endothelial MPs do not impair islet viability**

After 24 hours incubation, P3-MPs did not induce significant changes in cell viability. Moreover, apoptosis measurements confirmed this observation, with a non-significant slight increase by flow cytometry, whereas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment led to a high apoptotic response.

### **Pro-senescent endothelial MPs decrease islet function**

In contrast to P1 MPs, pro-senescent P3-MPs, prompted a 41% significant decrease of the stimulation index, close to the maximal reduction observed in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Those data are highly suggestive of a deleterious message specifically conveyed to endocrine cells by endothelial P3-MPs. Indeed, pro-senescent P3-MPs diminish the ability of insulin secretion of pancreatic islets without affecting their viability. It is therefore likely that the MPs influence other mechanisms that control the activity of the  $\beta$ -cells with limited necrosis or apoptosis after 24 h. In the context of pancreatic islet transplantation, our data question the impact of senescent endothelial cells and shed pro-senescent MPs within the islet graft and likewise at the end of the hepatic capillary, at vicinity of the engrafted islets.

### **Pro-senescent endothelial MPs induce the senescence of the islet**

Pro-senescent P3-MPs dramatically increased senescent markers upstream p53, and downstream p21, p16 by a 2 fold range, whereas P1-MPs remained not effective after 24 h. p53 is a cell cycle regulator involved in tumor suppression and controlling intricate pathways of cell death and survival [25]. The activation of p53 and p21 can lead to apoptosis or senescence [26], whereas the down-stream p16 is characteristic of cellular senescence [27].

In accordance with the reported of poorer recovery of the function of older islets that overexpress p16, our observation of the increased expression of senescent markers induced by pro-senescent P3-MPs is therefore highly suggestive of the senescence of the cells constituting the islets [28]. These data are consistent with previous works from our team and others describing the redox sensitive pro-senescent and thrombogenic effect of such MPs on the endothelium that are able to up-regulate tissue factor expression [14, 29]. Furthermore, in response to inflammatory or oxidative stress, MPs promote the expression of tissue factor by endothelial or insulin secreting  $\beta$ -cells. In the context of islet transplantation, IBMIR (Instant blood mediated inflammatory reaction) is an early inflammatory process initiated by the contact of islet with the portal blood that is associated with leukocyte and platelet activation, tissue factor expression at the vicinity of and within islets, and disseminated coagulation events associated with the negative outcome of clinical islet transplantation [19, 30].

Our data point at pro-senescent endothelial MPs as early contributors to islet dysfunction already present in the isolated islet suspension. Whether their pro-senescent, pro-coagulant action will impair the islet engraftment remains to be determined in transplantation models. However, the fact that pro-senescent MPs already reduce the function of the isolated islet is highly suggestive of an altered graft function.

## **Conclusion**

In conclusion, our study has shown a deleterious paracrine effect of the pro-senescent endothelial P3-MPs on islet function that is associated with enhanced senescence. These data confirm the presence of a noxious MPs mediated cross-talk between senescent endothelial and pancreatic islet cells. Our data, also point at MPs as a therapeutic target in the preservation of islets and are in favor of an early pre-conditioning of the graft. Because engraftment is conditioned by islet vascularization and the migration of the recipient endothelial cells. The endothelium of the recipient appears another source of pro-senescent MPs that might need pharmacological control.

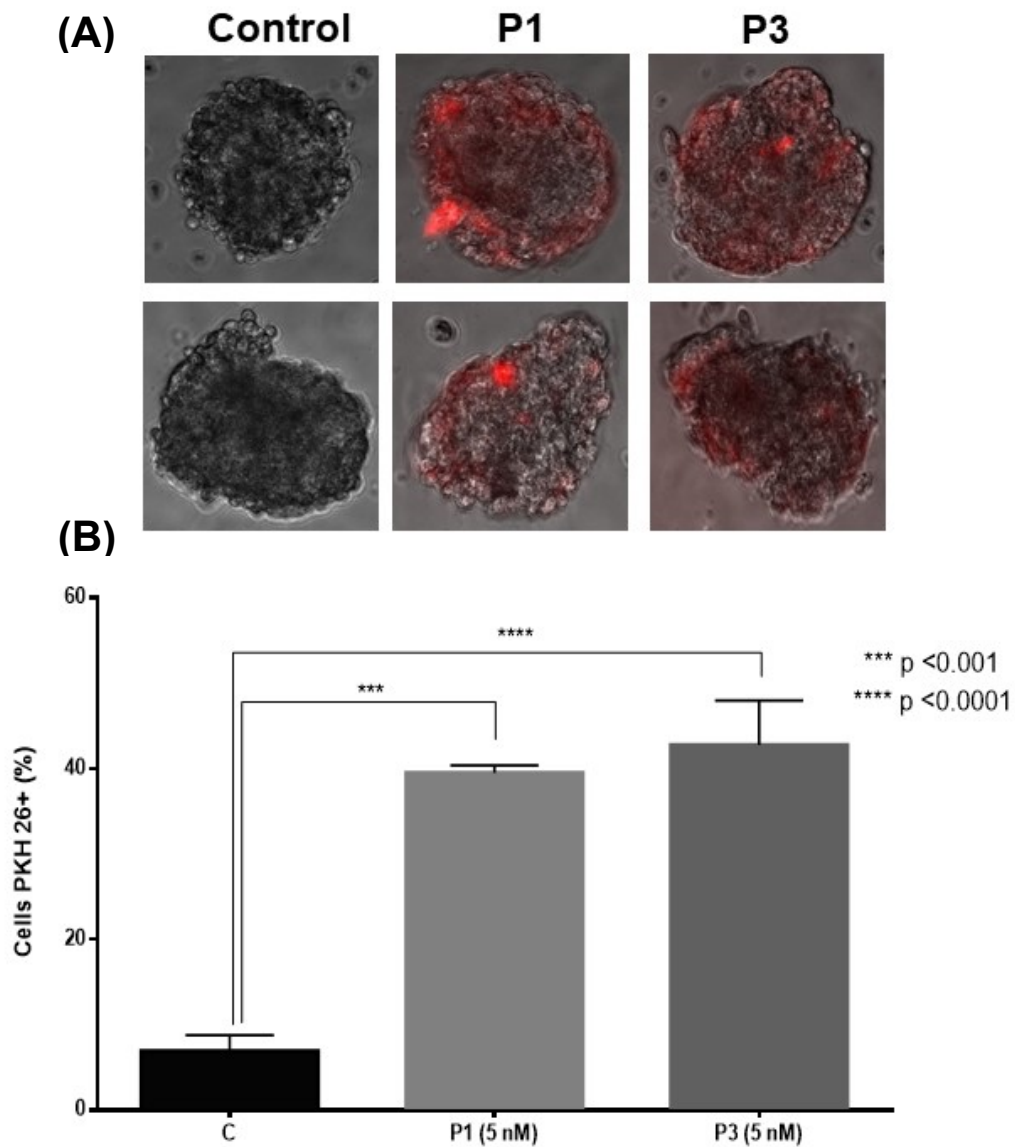
## **Acknowledgments**

Authors are indebted to Romain VAUCHELLE from the Faculty of Pharmacy for confocal microscopy and image analysis (PIQ platform). This work was supported in part by an unrestricted grant from ASDIA.

## References

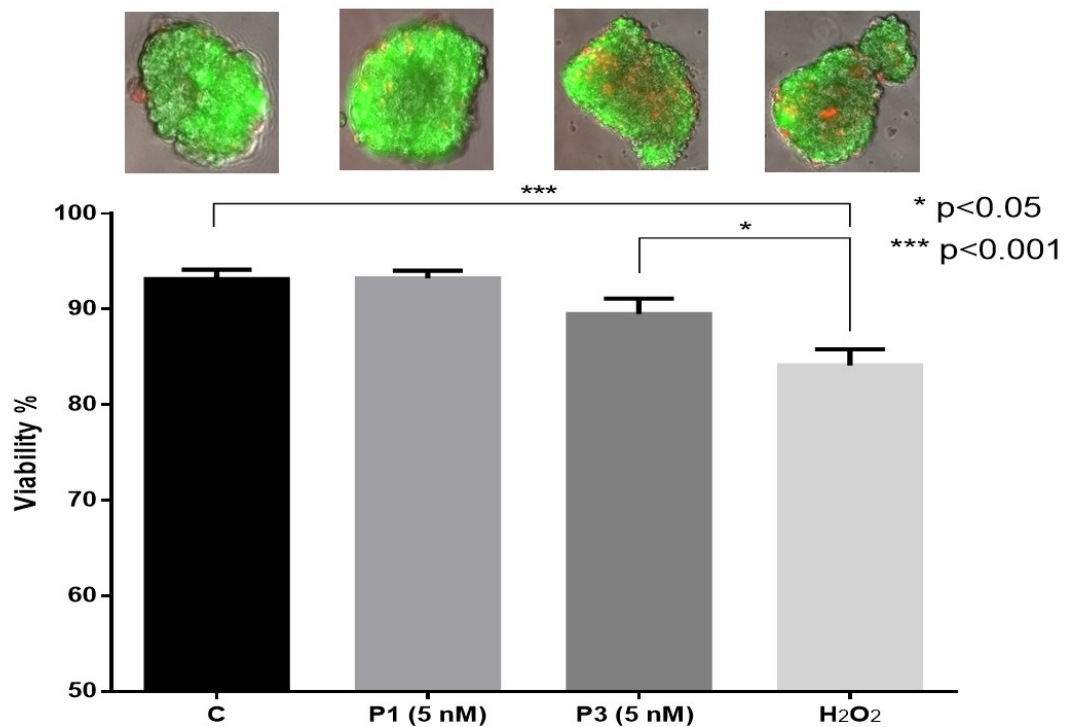
1. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
2. van Belle, T.L., K.T. Coppieters, and M.G. von Herrath, *Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 79-118.
3. Feinman, R.D., et al., *Dietary carbohydrate restriction as the first approach in diabetes management: critical review and evidence base*. Nutrition, 2015. **31**(1): p. 1-13.
4. Yeoh, E., et al., *Interventions That Restore Awareness of Hypoglycemia in Adults With Type 1 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis*. Diabetes Care, 2015. **38**(8): p. 1592-609.
5. Bellin, M.D., et al., *Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes*. Am J Transplant, 2012. **12**(6): p. 1576-83.
6. Yoon, H.J., et al., *Alterations in the activity and expression of endothelial NO synthase in aged human endothelial cells*. Mech Ageing Dev, 2010. **131**(2): p. 119-23.
7. Tchkonina, T., et al., *Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 966-72.
8. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
9. Chkhotua, A., et al., *Replicative senescence in organ transplantation-mechanisms and significance*. Transpl Immunol, 2002. **9**(2-4): p. 165-71.
10. Theys, N., et al., *Early low protein diet aggravates unbalance between antioxidant enzymes leading to islet dysfunction*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6110.
11. Morel, O., et al., *Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(12): p. 2594-604.
12. Toti, F., et al., *Studies of circulating microparticle release in peripheral blood after pancreatic islet transplantation*. Transplant Proc, 2011. **43**(9): p. 3241-5.
13. Sabatier, F., et al., *Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(3): p. 454-71.
14. Burger, D., et al., *Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence*. J Am Heart Assoc, 2012. **1**(3): p. e001842.
15. Abbas, M., et al., *Endothelial Microparticles from Acute Coronary Syndrome Patients Induce Premature Coronary Artery Endothelial Cells Ageing and Thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-mediated Activation of MAPKs and PI3-kinase Pathways*. Circulation, 2016.
16. Bakouboula, B., et al., *Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(5): p. 536-43.
17. Scholz, T., et al., *Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P*. Thromb Haemost, 2002. **88**(6): p. 1033-8.
18. Auger, C., et al., *The EGCg-induced redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase and relaxation are critically dependent on hydroxyl moieties*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(1): p. 162-7.
19. Gleizes, C., 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): p. 733-40.
20. Jy, W., et al., *Measuring circulating cell-derived microparticles*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(10): p. 1842-51.
21. Mallat, Z., et al., *Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity*. Circulation, 1999. **99**(3): p. 348-53.
22. Bucher, P., et al., *Assessment of a novel two-component enzyme preparation for human islet isolation and transplantation*. Transplantation, 2005. **79**(1): p. 91-7.
23. Ricordi, C., et al., *Automated method for isolation of human pancreatic islets*. Diabetes, 1988. **37**(4): p. 413-20.
24. Constantinescu, A.A., et al., *Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2014. **13**(2): p. 219-26.
25. Biegging, K.T., S.S. Mello, and L.D. Attardi, *Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(5): p. 359-70.

26. Abbas, T. and A. Dutta, *p21 in cancer: intricate networks and multiple activities*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(6): p. 400-14.
27. Romagosa, C., et al., *p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors*. Oncogene, 2011. **30**(18): p. 2087-97.
28. Krishnamurthy, J., et al., *p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential*. Nature, 2006. **443**(7110): p. 453-7.
29. Abbas, M., *Role of vascular microparticles in endothelial senescence: Study of their pro-coagulant properties and pharmacological modulation in a porcine model of replicative senescence*. 2014, University of Strasbourg.
30. Johansson, H., et al., *Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1755-62.



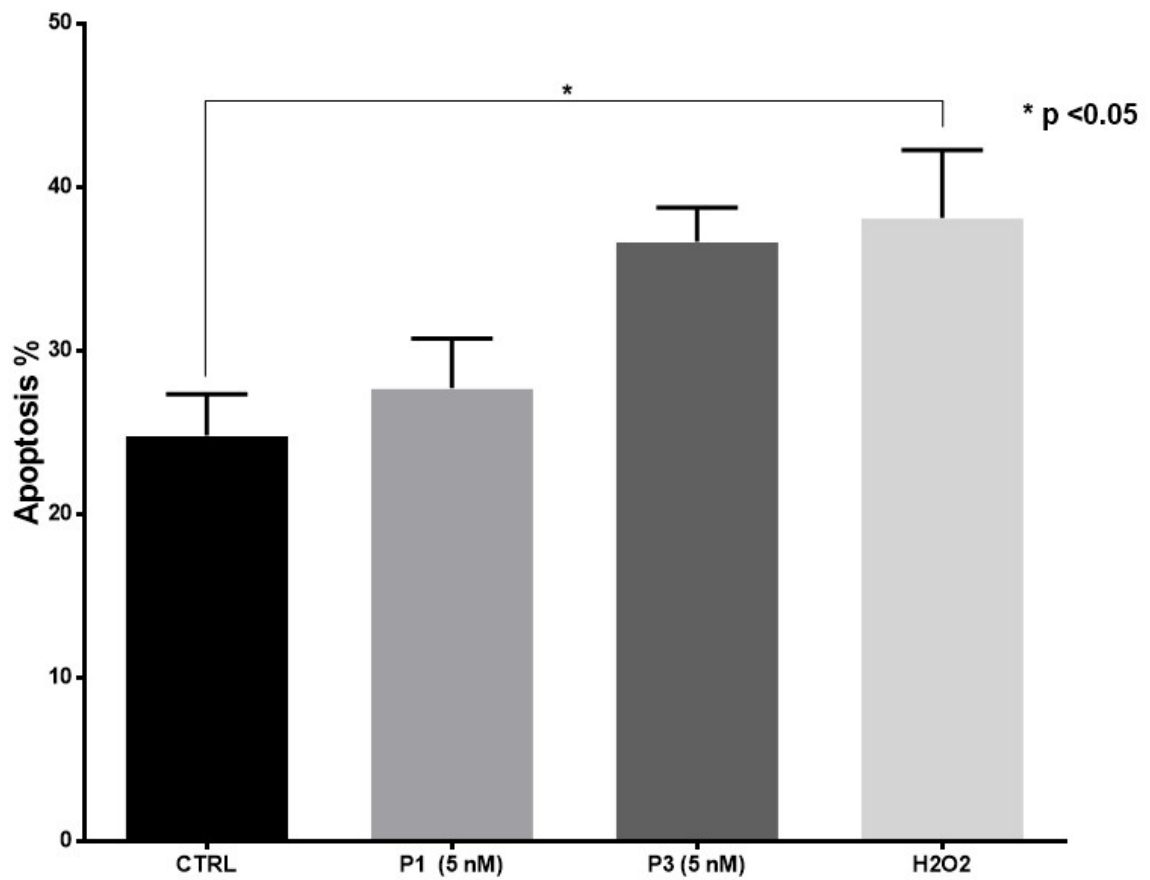
**Figure 1: MPs integration into the islets**

MPs integration into islet was assessed after 24 h treatment by 5 nM PhtdSer EQ of P1-, P3-MPs labeled by red PKH26 lipid probe. (A) Representative images by fluorescent microscopy (magnification 20 x). (B) Quantification of the labeled PKH26 probed pancreatic islet cells after trypsin dissociation by flow cytometry (n=4). \*\*\* p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.



### Figure 2: Islet viability

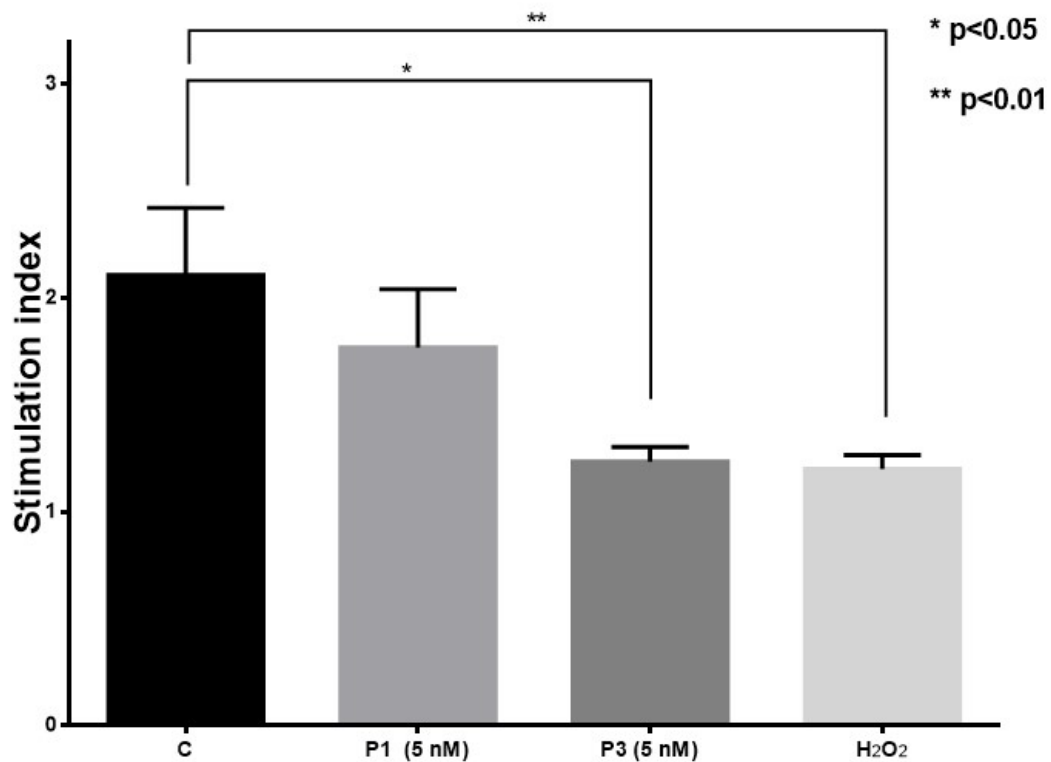
Islet viability was assessed by double propidium iodide (PI) / Fluorescein diacetate double labeling after 24 h treatment by 5 nM PhtdSer EQ of P1-, P3-MPs or 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Viability was calculated as the % of green and red fluorescent / total islet area (magnification 20 x), quantification was performed using Image J software, results expressed as mean  $\pm$  SEM of n=5 per group. \* p<0.05, \*\*\* p<0.001.



### Figure 3: Apoptosis in isolated pancreatic islets

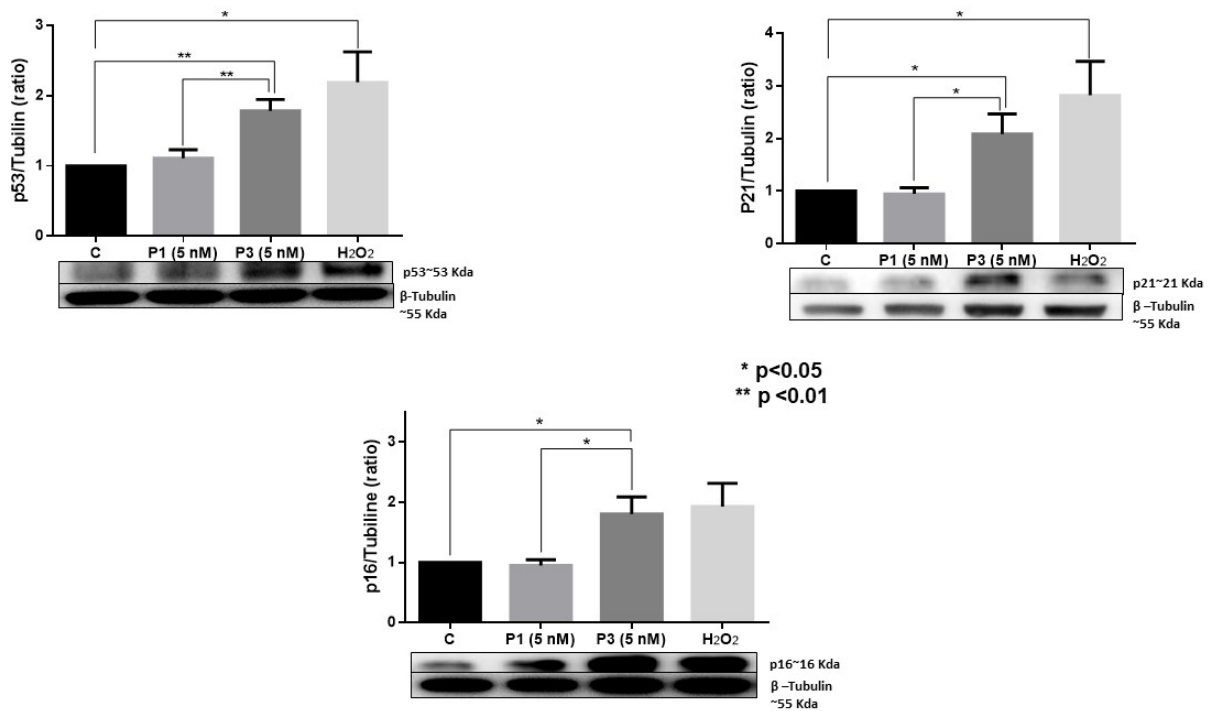
Islet apoptosis was evaluated after trypsin dissociation into cell suspension following a 24 h treatment by 5 nM PhtdSer EQ of P1-, P3-MPs or 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cell suspension was analysed by flow cytometry after propidium iodide (PI) / FITC-Ann-V double labeling. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=5 per group. \* p<0.05.





#### Figure 4: Islet Function test

Islet function was evaluated by the stimulation index (insulin amount secreted after incubation in KREBS solution supplemented with 25 mM glucose / amount of insulin secreted after incubation in KREBS solution supplemented with a 2.5 mM glucose) after 24 h treatment by 5 nM PhtdSer EQ of P1-, P3-MPs or 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=5 per group \* p<0.05, \*\* p<0.01.



### Figure 5: Expression of senescence markers in MPs treated pancreatic islets

The senescence markers p53, p21, and p16, after 24 h treatment by 5 nM PhtdSer EQ of P1-, P3-MPs or 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, were measured by Western blot (lower panel representative blot, upper panel: cumulative data). Quantification of Chemiluminescence as a ratio of protein of interest/ housekeeping protein levels (Tubulin) performed by Image J software. Results are expressed as means  $\pm$ SEM of n=5 per group, \* p < 0.05, \*\*p < 0.01.

## *Discussion générale*

---

## VI Discussion générale

Dans ce travail, deux éléments principaux de l'impact pro-sénescence des MPs sur la fonction de l'endothélium et du greffon ont été identifiés :

1- L'impact pro-sénescence des MPs leucocytaires associée à une dysfonction endothéliale, un stress oxydant et à une réponse inflammatoire précoce conférant à l'endothélium un phénotype thrombogénique.

Ainsi, dans cette première étude, nous montrons pour la première fois que les MPs de splénocytes traités au LPS ou au PMA / ionophore calcique ( $SMP_{LPS}$  et  $SMP_{PMA/I}$ ) induisent une dysfonction endothéliale et une sénescence prématurée via un stress oxydant et une réponse inflammatoire précoce. La sénescence prématurée induite par les SMPs entraîne une dysfonction endothéliale sévère caractérisée par une stimulation précoce des voies MAP-Kinases et PI3-kinase/Akt. De manière importante, les  $SMP_{LPS}$  et  $SMP_{PMA/I}$  étaient strictement pro-sénescence et n'avaient aucun potentiel pro-apoptotique, indiquant un effet spécifique.

2- L'impact des MPs endothéliales pro-sénescence sur la fonction des îlots isolés, c.à.d. en situation d'ischémie. Grâce à cette deuxième étude, l'impact des EMPs est démontrée non seulement sur la cellule endothéliale mais sur aussi sur l'architecture fonctionnelle complète constituée par l'îlot avec une perte de la sécrétion de l'insuline en réponse à l'élévation de la concentration glycémique

### Effets différenciés des MPs splénocytaires

En réponse aux stimuli, toute cellule est capable de libérer des MPs, en quantité et avec un cinétique variable selon l'origine de la cellule émettrice. Les MPs expriment des antigènes de surface et des biomolécules actives caractéristiques de l'origine des cellules et du stress initiateur.

Dans notre modèle, les MPs sont générées à partir des cellules primaires, à savoir les splénocytes en culture qui présentent majoritairement des cellules immunes, y compris des plaquettes. En effet, la suspension splénocytaire est débarrassée des érythrocytes par choc osmotique et ne contient que très peu de macrophages. Nos données confirment que le taux de SMPs générées suite à la stimulation est corrélé avec le taux d'apoptose des splénocytes en accord avec les données expérimentales *in vitro* [271], confirmant un rôle possible de biomarqueurs avec une concentration de MPs systémiques corrélée au degré de sévérité de la maladie [268]. Nos travaux préliminaires ont ainsi montré que les splénocytes émettent des MPs avec un profil d'origine cellulaire différent selon l'inducteur. Le traitement par le LPS

favorise la libération des MPs des neutrophiles et des monocytes tandis que le traitement avec la combinaison PMA/I entraîne la génération des microparticules d'origine lymphocytaires. Ainsi, ces résultats suggèrent aussi que la détection d'un profil spécifique des MPs splénocytaires établirait le type de réponse immune à leur origine : réponse innée ou réponse adaptative. Cette hypothèse devra être étayée dans des modèles animaux par la mesure des MPs circulantes et splénocytaires.

Dans la présente étude, les MPs provenant de splénocytes en repos n'ont aucun effet sur la sénescence endothéliale. Ces résultats confirment un propre effet des SMPs stimulées et qui dépendent du stress induit (LPS ou PMA/I). Fait important, aucune variation significative de l'apoptose des cellules mesurée par cytométrie en flux ou par l'expression de la caspase-3 n'a été observée, indiquant que la génération des EMPs est induite par la sénescence indépendamment de l'apoptose (cf. ci-dessous).

### **Sénescence prématurée spécifique induite par les microparticules leucocytaires**

Nous avons d'abord établi un modèle de sénescence endothéliale induite par les SMPs en utilisant des cellules endothéliales coronaires de l'artère coronaire du porc. Un modèle de sénescence endothéliale répliquative a été développé dans notre laboratoire et nous l'avons utilisé à titre comparatif.

Dans notre modèle, les  $SMP_{LPS}$  et  $SMP_{PMA/I}$  induisent une sénescence prématurée détectée par l'activité de l'enzyme SA-bêta gal et par les marqueurs protéiques p53, P16, p21. La sénescence est associée à la génération secondaire des MPs endothéliales (EMPs) pro-coagulantes détectées par dosage pro-thrombinase. Cette découverte confirme et élargit le concept selon lequel la libération de MPs est la conséquence du remodelage de la membrane plasmique et de l'externalisation de la phosphatidylsérine dans le feuillet externe de la bicouche. En effet, si la phosphatidylsérine est un marqueur connu pour l'élimination réticuloendothéliale, la génération de MPs est généralement associée à l'activation cellulaire ou à l'apoptose et très peu de données associent génération de MPs et sénescence [249, 354].

Les études examinant la relation entre la sénescence et l'apoptose dans les cellules endothéliales ont donné des résultats contradictoires. L'une indique que contrairement aux fibroblastes, le devenir final des cellules endothéliales sénescents est de subir une apoptose [371]. D'autres études suggèrent que la sénescence répliquative des cellules endothéliales n'entraîne pas d'apoptose, mais augmente plutôt la sensibilité de ces cellules aux stimuli apoptotiques tels que le TNF- $\alpha$  et les LDL oxydés [211].

Des résultats similaires à nos données ont été publiés dans un modèle utilisant des cellules endothéliales coronaires porcine ou aortiques murines et des modèles de sénescence répllicative ou prématurée [249, 354]. Compte-tenu de la diminution du taux d'autophagie observée dans les cellules sénescents, on ne peut exclure que la libération de MPs pro-sénescents représente à cours-terme un processus adaptatif pour d'évacuer des composants nocifs hors de la cellule. Conformément à ce point de vue, des travaux antérieurs ont suggéré que les MPs sont des outils d'évacuation leur conférant un rôle de modulateurs de la cascade apoptotique comme la caspase-3 : L'inhibition de la libération de MPs provoque l'accumulation de la caspase-3 dans la cellule, favorise l'apoptose et le détachement des cellules endothéliales [372]. Cependant, les MPs étant des effecteurs cellulaires, la protection est rapidement contrecarrée par la transmission d'un signal délétère paracrine ou autocrine porté par la MP.

### **Les caractéristiques phénotypiques associés à la sénescence endothéliale**

Parmi divers effecteurs régissant la survie ou la fonction cellulaire, une attention particulière a été accordée à la production d'espèces réactives de l'oxygène dans le système vasculaire par le biais du vieillissement. Dans la présente étude, la sénescence prématurée des ECs coronaires primaires induite les  $SMP_{LPS}$  et  $SMP_{PMA/I}$  a été associée à une augmentation progressive de la production de ROS comme démontré par la coloration DHE. Au sein des cellules endothéliales coronaires, les sources d'augmentation de la production de ROS liées au sénescence sont principalement dues à la NADPH oxydase et aux mitochondries, comme cela a été démontré au cours du vieillissement endothélial [373], de la sénescence répllicative ou prématurée [249, 354].

Au cours du vieillissement, la dysfonction mitochondriale a été caractérisée par la dépolarisation de la membrane mitochondriale et la génération de ROS mitochondriales identifiée par la sonde MitoSOX. Comme la chaîne respiratoire mitochondriale est perturbée, le couplage diminue et le nombre d'électrons qui échappent à la chaîne augmente favorisant la génération de ROS et le stress oxydant et la dépolarisation de la membrane mitochondriale.

L'accumulation de ROS observée à 48h n'est pas compensée, la production de l'activité de la eNOS chute au cours de la sénescence endothéliale prématurée. La réduction de la biodisponibilité de NO a été attribuée à une augmentation des ROS des mitochondries et à la production concomitante de peroxy-nitrite [374]. En utilisant une approche pharmacologique, nous démontrons que les  $SMP_{LPS}$  et  $SMP_{PMA/I}$  sont pro-sénescents et contribuent de manière similaire à un stress oxydant précoce dans les ECs jeunes via la sur-expression de la NADPH oxydase et les cyclooxygénases. Nos données obtenues avec des cellules primaires ne

confirment pas l'accumulation de ROS et la production accrue de NO combinées à l'activité inchangée d'eNOS rapportée dans un modèle de communication intercellulaire d'une lignée endothéliale Eahy.926 traitée par des MPs monocytaires (THP-1) générées en réponse à VP - 16 [338]. La discordance est probablement due à l'utilisation de lignées immortalisées et à la différence de modèles cellulaires.

L'augmentation précoce de la formation de ROS stimulant les voies des protéines de suppresseurs p53, p21 et p16 [217]. La sénescence prématurée endothéliale induite par  $SMP_{LPS}$  et  $SMP_{PMAI}$  a été associée à une augmentation spectaculaire de l'expression de p53, p21 et p16 sans induction d'apoptose. Des résultats similaires ont été publiés récemment montrant l'augmentation de l'expression des marqueurs de sénescence dans les ECs de coronaires de porc induite par les EMPs pro-sénescentes ou par des microparticules endothéliales circulantes chez les patients atteints de syndrome coronarien aigu [249]. Cependant, des études sur les cellules veineuses de cordon ombilical (HUVECs) indiquent que la voie p53 / p21 est impliquée dans l'induction de l'apoptose ou la sénescence, alors que p16 est seulement impliquée dans l'induction de la sénescence [375].

### **La sénescence endothéliale : un déplacement vers un état pro-coagulant et pro-inflammatoire**

Alors que l'on suppose généralement que la sénescence endothéliale est caractérisée par un déplacement vers un état thrombotique accru, le mécanisme sous-jacent reste jusqu'à présent mal étudié. Dans la présente étude, la sénescence endothéliale prématurée induite par les  $SMP_{LPS}$  et  $SMP_{PMAI}$  déplace le phénotype endothélial vers un statut pro-coagulant comme en témoignent (i) la génération secondaire des EMPs pro-coagulantes (ii) l'augmentation de l'expression et de l'activité de TF, l'initiateur cellulaire de la cascade de coagulation, et (iii) l'augmentation de l'expression du système local d'angiotensine.

Ces résultats suggèrent que les MPs leucocytaires libérées au cours de la réaction IBMIR sont susceptibles d'induire un processus précoce de sénescence prématurée au voisinage de l'îlot greffé. Nos travaux *in vitro* ont montré un effet pro-thrombotique et pro inflammatoire de ces MPs sénescentes. Ces données suggèrent que dans un contexte de greffe d'îlots pancréatiques, les  $TF^+$ -MPs circulantes libérées à partir de cellules leucocytaires et endothéliales au voisinage du site d'implantation des îlots lors de l'IBMIR exercent un effet délétère *in vivo* en péri-greffe. Toutefois, le rôle de l'ischémie sur l'expression du facteur tissulaire par les cellules des îlots, son impact sur la libération de  $TF^+$ -MPs et l'action pro-sénescente de ces dernières est peu

connu. En effet, notre laboratoire a démontré *in vitro* l'effet pro-coagulant nocif des TF<sup>+</sup>-MPs endocrines en réponse à un stress ischémique et cytokinique [357], ainsi que l'action autocrine pro-sénescence et pro-thrombotique exercée par les TF<sup>+</sup>-MPs endothéliales [249]. Il est intéressant de noter que les données d'une étude pilote menée aux Hôpitaux universitaires de Strasbourg indiquent que le rejet des îlots transplantés est associé à l'augmentation des MPs circulantes d'origine endocrine (étude MIPIL et STABILOT en cours).

Les MPs semblent représenter à la fois une conséquence et une cause de l'inflammation endothéliale. Au cours de l'inflammation stérile, qui implique la production de médiateurs pro-inflammatoires, voire les cytokines et les chimiokines, et le recrutement de cellules inflammatoires notamment neutrophiliques les MPs sont également libérées au site du recrutement ou d'invasion par les cellules immunes (leucocytes) [40]. Nos résultats montrent que les SMP<sub>LPS</sub> et SMP<sub>PMAI</sub> pro-sénescence induisent une réponse inflammatoire précoce en activant la voie de NF-κB et favorisent l'interaction et l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales en augmentant l'expression d'ICAM-1 et VCAM-1. D'autres études ont montré l'activation de la voie de NF-κB et l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion par des microparticules monocytaires [334]. De plus, nous avons montré que les SMP<sub>LPS</sub> et SMP<sub>PMAI</sub> altèrent la fonction vasculaire et surexpriment des marqueurs de l'inflammation dans des anneaux d'artères coronaires du porc. D'autres études ont montré que l'injection des MPs circulantes de patients septiques chez les souris entraîne l'augmentation de l'expression d'iNOS, de COX-2 et de NF-κB dans le cœur et les poumons, conduisant à la dysfonction des organes. Ces données sont reproduites dans un modèle animal de choc septique dans lequel les MPs leucocytaires circulantes sont très élevées et induisent une vasoplégie et l'inflammation des tissus cardiovasculaires chez le rat receveur [338, 339].

Le rôle pro-oxydant des MPs dans le compartiment vasculaire a été remis en question par une étude récente suggérant des effets antioxydants médiés par des MPs portant le morphogène Sonic Hedgehog [376]. Il est donc probable que le message pro / anti-oxydant des MPs pourrait varier en fonction des conditions d'émission des MPs et donc de leurs propriétés. Tandis que les MPs émises lors de l'apoptose [346] ou en réponse aux stimuli sénescence [354] affichent un message pro-oxydant, d'autres MPs pourraient être protectrices. Il faut également noter que de telles MPs protectrices peuvent être des « scavengers » pour des molécules cytoprotectrices comme la protéine C activée [339], ou les GLP-1 [357] voire endogènes comme la lactadherine [319].



## **Revascularisation des îlots et sénescence endothéliale en transplantation**

La revascularisation des îlots pancréatiques transplantés constitue un défi majeur pour assurer la fonction du greffon. Elle dépend de la reconstitution des vaisseaux endothéliaux intra-îlots. Au sein des îlots âgés, les ECs sénescents sont probablement la principale source endogène de cellules endothéliales et peuvent contribuer à la production des EMPs pro-sénescents. Par conséquent, la préservation de l'endothélium intra-insulaire contre la sénescence accélérée pourrait améliorer le succès de la greffe.

En outre, l'altération vasculaire du receveur et le déclenchement de la réaction d'IBMIR favorisent l'induction de la sénescence endothéliale dans les capillaires hépatiques au voisinage de l'îlot greffé. Le ciblage thérapeutique des médiateurs pro-sénescents et pro-inflammatoires tels que les MPs, le PAI-1, l'HMGB1 par exemple, améliore les effets nocifs associés à la sénescence (Palmer 2015). À cet égard, les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse (BM-MSCs) sont connues par leurs effets anti-inflammatoires et leur rôle cytoprotecteurs. Ces BM-MSCs pourraient être intéressantes comme thérapie cellulaire complémentaire dans la transplantation d'îlots. De plus, les BM-MSCs ont d'autres propriétés immunosuppressives [431] et une capacité à libérer des profacteurs angiogéniques, utile pour l'implantation rapide des îlots [432]. Dans une étude récente, une équipe a utilisé pour l'implantation rapide des îlots utile pour l'implantation rapide des îlots montré que la co-transplantation des îlots avec des BM-MSCs dans des souris NOD permet la migration des BM-MSCs vers l'îlot transplanté et favorise la néo-vascularisation [377]. De plus, ils ont observé une amélioration de la tolérance immunitaire des allogreffes d'îlots greffés.

Puisque les ECs jouent un rôle essentiel dans la revascularisation de l'îlot après la transplantation, nous avons cherché à déterminer si les EMPs pro-sénescents exercent un effet pro-sénescence sur les îlots pancréatiques isolés. Le décryptage des mécanismes sous-jacents s'avère intéressant pour développer un ciblage thérapeutique afin de protéger les îlots fonctionnels chez les individus âgés ou de prévenir la perte et la dysfonction accélérée des îlots avant et après la transplantation.

Les données de la deuxième étude, montrent que les EMPs pro-sénescents sont des effecteurs cellulaires paracrines de la sénescence dans les îlots pancréatiques. De plus, nous avons montré que les EMPs pro-sénescents conduisaient à une altération précoce de la fonction des îlots après 24 h, alors que la viabilité n'était pas affectée. Nous avons clairement montré que les MPs s'intègrent facilement dans l'îlot. Cependant, bien que le transfert d'informations véhiculées

par les EMPs pro-sénescentes puisse être prouvé par un test fonctionnel, il reste à identifier les voies impliqués dans l'induction de la sénescence. Par la suite, la mise en place d'un modèle de boucle fermé « tubing loop » qui permet d'étudier l'effet des MPs sur les îlots pancréatiques en présence des composants sanguins pourrait être une approche intéressante. L'effet pharmacologique des médicaments initialement étudiés *in vitro* devra être évalué *in vivo*. Pour cette dernière étape, le modèle de greffe d'îlot intra-portale chez le rat est une technique de référence qui permet d'étudier l'interaction entre les MPs circulant et les îlots. Ces MPs, qui peuvent être identifiées par des marqueurs spécifiques, pourraient être administrées en tant que modulateurs de la fonction des îlots par voie intraveineuse ou dans la chambre oculaire, comme récemment proposé dans l'étude du rôle du système vasculaire sur le rajeunissement des îlots âgés chez le jeune receveur [378].

## *Conclusion générale et perspectives*

---

## VII Conclusion générale et perspectives

En conclusion, L'ensemble de nos données suggère que les mécanismes d'ischémie reperfusion induisent une dysfonction endothéliale accélérée via les microparticules leucocytaires et endothéliales. Les microparticules leucocytaires induisent une sénescence prématurée endothéliale via l'activation des voies MAPKinases et PI3-kinase, un stress oxydant, une réponse inflammatoire et un phénotype thrombogénique. L'ensemble de nos données suggère que l'endothélium du vaisseau de l'hôte ou du greffon serait ciblé par des microparticules leucocytaires libérées notamment dans le contexte de l'IBMIR péri-greffe, et progressivement avec les difficultés de contrôle des traitements immunosuppresseurs amplifiées par la libération secondaire de MPs endothéliales elles-mêmes pro-coagulantes et pro-sénescentes.

Parce que l'altération de la fonction des ECs prématurément ou avec l'âge pourrait altérer la réussite de la greffe, nos données apportent de nouvelles informations sur les MPs leucocytaires circulantes, en tant que contributeurs possibles à la dysfonction endothéliale chez le transplanté. Ces données sont en faveur de l'existence d'un cross-talk délétère entre les cellules endothéliales et le système immunitaire par l'intermédiaire de microparticules leucocytaires. Ces résultats suggèrent l'importance de rechercher des modulateurs pharmacologiques susceptibles de contrôler la réponse des cellules endothéliales aux microparticules ce qui serait du plus grand intérêt dans le contexte clinique de la transplantation.

De plus, la deuxième partie de notre étude a montré un effet délétère des EMPs pro-sénescentes sur la fonctionnalité de l'îlot pancréatique de rat. Parallèlement à cette observation, nous avons montré une augmentation de la sénescence cellulaire, éventuellement liée à un effet paracrine des MPs endothéliales. Ces données sont fortement en faveur de l'existence d'un rétro-contrôle négatif entre les cellules endothéliales et les cellules des îlots pancréatiques via les MPs endothéliales pro-sénescentes. De plus, nos données suggèrent que le pré-conditionnement de l'îlot pourrait améliorer le succès de la greffe en limitant la dysfonction liée à l'âge dans l'organe du donneur avant son implantation ou liée aux effets délétères des microparticules.

Le pré-conditionnement pharmacologique des îlots pancréatiques a été peu étudié dans des modèles animaux. Cependant, l'aPC (protéine C activée) qui est une protéine anticoagulante et cytoprotectrice ciblant les récepteurs PAR-2 à médiation anti-inflammatoire et anti-apoptotique, pourrait contribuer à la protection des îlots. En effet, la préservation de la fonction des îlots transplantés a été montré chez des souris génétiquement modifiées qui sur-expriment le récepteur à l'aPC (EPCR) [379]. De plus, une autre étude a montré l'utilité de l'aPC pour empêcher la réaction IBMIR en protégeant les îlots isolés dans un modèle de tubing loop [380].

De même, la thrombomoduline, une autre protéine membranaire exprimée sur la surface des cellules endothéliales, est un cofacteur de la thrombine. Elle réduit la coagulation sanguine en transformant la thrombine, d'une enzyme pro-coagulante en une enzyme anticoagulante. Elle a récemment été identifiée comme un outil intéressant pour préserver la fonction des îlots chez les souris diabétiques transplantés [381].

Une autre forme de pré-conditionnement pourrait être le ciblage des floppases qui favorisent la libération des MPs par l'action de l'antagoniste du TMEM16F. Cependant l'action de cet inhibiteur reste mal défini. D'autre part, l'annexine-5, ou la diannexine, pourrait être utilisée pour constituer une exosquelette protecteur autour des cellules activées, ce qui contrebalançait le processus de libération de MPs. Ce type de ciblage de phosphatidylsérine pourrait être bénéfique pendant les réponses cellulaires aiguës comme observé pendant la réaction IBMIR, ou inversement dans l'activation cellulaire progressive et la libération de MPs observées pendant la sénescence [382].

Notre travail a montré un effet néfaste des MPs leucocytaires et endothéliales pro-sénescentes sur la fonction de l'endothélium et des îlots. Ainsi, les médiateurs de la sénescence, tels que les protéines du système local de l'angiotensine, les protéines impliquées dans la génération de ROS ou les protéines de la voie inflammatoire sont des cibles potentielles de nouvelles stratégies de protection de l'endothélium et des îlots transplantés. Leur rôle et celui des protéines d'adhésion dans les interactions paracrines dans l'îlot et entre l'îlot et son environnement hépatique doit être précisé pour mieux cibler les MPs délétères.

En conclusion, les MPs leucocytaires pro-sénescentes apparaissent comme les principaux effecteurs de la dysfonction endothéliale en transplantation et leur modulation pharmacologique en limitant leur génération ou en reprogrammant leurs propriétés, favoriserait un contrôle local par une administration ciblée.

## VIII Bibliographie

1. Diaz-Valencia, P.A., P. Bougneres, and A.J. Valleron, *Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review*. BMC Public Health, 2015. **15**: p. 255.
2. Patterson, C.C., et al., *Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study*. Lancet, 2009. **373**(9680): p. 2027-33.
3. Barrett, J.C., et al., *Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes*. Nat Genet, 2009. **41**(6): p. 703-7.
4. Zaccane, P., et al., *Parasitic worms and inflammatory diseases*. Parasite Immunol, 2006. **28**(10): p. 515-23.
5. Diana, J., et al., *Innate immunity in type 1 diabetes*. Discov Med, 2011. **11**(61): p. 513-20.
6. Li, M., L.J. Song, and X.Y. Qin, *Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(5): p. 749-58.
7. Mannering, S.I., et al., *The A-chain of insulin is a hot-spot for CD4+ T cell epitopes in human type 1 diabetes*. Clin Exp Immunol, 2009. **156**(2): p. 226-31.
8. Brodie, G.M., et al., *B-cells promote intra-islet CD8+ cytotoxic T-cell survival to enhance type 1 diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(4): p. 909-17.
9. Ionescu-Tirgoviste, C., et al., *A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14634.
10. Henderson, J.R. and M.C. Moss, *A morphometric study of the endocrine and exocrine capillaries of the pancreas*. Q J Exp Physiol, 1985. **70**(3): p. 347-56.
11. Bendayan, M., *Pathway of insulin in pancreatic tissue on its release by the B-cell*. Am J Physiol, 1993. **264**(2 Pt 1): p. G187-94.
12. Longnecker, D.S., *Anatomy and Histology of the Pancreas*, in *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. 2014.
13. Bosco, D., et al., *Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans*. Diabetes, 2010. **59**(5): p. 1202-10.
14. Katsarou, A., et al., *Type 1 diabetes mellitus*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17016.
15. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-300.
16. Ryan, E.A., D. Bigam, and A.M. Shapiro, *Current indications for pancreas or islet transplant*. Diabetes Obes Metab, 2006. **8**(1): p. 1-7.
17. Cabrera, O., et al., *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2334-9.
18. Leibiger, I.B., B. Leibiger, and P.O. Berggren, *Insulin signaling in the pancreatic beta-cell*. Annu Rev Nutr, 2008. **28**: p. 233-51.
19. Leitao, C.B., et al., *Current challenges in islet transplantation*. Curr Diab Rep, 2008. **8**(4): p. 324-31.
20. Brennan, D.C., et al., *Long-Term Follow-Up of the Edmonton Protocol of Islet Transplantation in the United States*. Am J Transplant, 2016. **16**(2): p. 509-17.
21. Lablanche, S., 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): p. 1714-22.
22. Hering, B.J., et al., *Phase 3 Trial of Transplantation of Human Islets in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia*. Diabetes Care, 2016. **39**(7): p. 1230-40.

23. Lablanche S, V.M., Kessler L, Wojtusciszyn A, Borot S, Thivolet T, Frimat L, Bosco D, Bosson JL, Kerr-Conte J, Colin C, Tétaz R, Renard E, Penfornis A, Morelon E, Egelhofer H, Benomar K, Badet L, Berney T, Pattou F, Benhamou PY, *TRIMECO : Essai contrôlé randomisé comparant l'efficacité métabolique de la transplantation d'îlots pancréatiques allogéniques à l'insulinothérapie intensive pour le traitement du diabète de type 1. Données préliminaires* Diabetes Metab Res Rev, 2017. **43**(2): p. A1- A36.
24. Ponte, G.M., et al., *Toward maximizing the success rates of human islet isolation: influence of donor and isolation factors.* Cell Transplant, 2007. **16**(6): p. 595-607.
25. Merani, S. and A.M. Shapiro, *Current status of pancreatic islet transplantation.* Clin Sci (Lond), 2006. **110**(6): p. 611-25.
26. Ricordi, C., et al., *Automated method for isolation of human pancreatic islets.* Diabetes, 1988. **37**(4): p. 413-20.
27. Shapiro, A.M., M. Pokrywczynska, and C. Ricordi, *Clinical pancreatic islet transplantation.* Nat Rev Endocrinol, 2017. **13**(5): p. 268-277.
28. Bennet, W., et al., *Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation?* Diabetes, 1999. **48**(10): p. 1907-14.
29. Merani, S., et al., *Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation.* Br J Surg, 2008. **95**(12): p. 1449-61.
30. Kaufman, D.B., et al., *Purified canine islet autografts. Functional outcome as influenced by islet number and implantation site.* Transplantation, 1990. **50**(3): p. 385-91.
31. Lau, J. and P.O. Carlsson, *Low revascularization of human islets when experimentally transplanted into the liver.* Transplantation, 2009. **87**(3): p. 322-5.
32. Vajkoczy, P., et al., *Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin.* Am J Pathol, 1995. **146**(6): p. 1397-405.
33. Brissova, M. and A.C. Powers, *Revascularization of transplanted islets: can it be improved?* Diabetes, 2008. **57**(9): p. 2269-71.
34. Molnar, C., et al., *Islet engraftment and revascularization in clinical and experimental transplantation.* Cell Transplant, 2013. **22**(2): p. 243-51.
35. Hughes, S.J., et al., *Hyperoxia improves the survival of intraportally transplanted syngeneic pancreatic islets.* Transplantation, 2003. **75**(12): p. 1954-9.
36. Niclauss, N., et al., *Rapamycin impairs proliferation of transplanted islet beta cells.* Transplantation, 2011. **91**(7): p. 714-22.
37. Tamura, K., et al., *Transcriptional inhibition of insulin by FK506 and possible involvement of FK506 binding protein-12 in pancreatic beta-cell.* Transplantation, 1995. **59**(11): p. 1606-13.
38. Barkai, U., A. Rotem, and P. de Vos, *Survival of encapsulated islets: More than a membrane story.* World J Transplant, 2016. **6**(1): p. 69-90.
39. Shen, H., D. Kreisel, and D.R. Goldstein, *Processes of sterile inflammation.* J Immunol, 2013. **191**(6): p. 2857-63.
40. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 826-37.
41. Braza, F., et al., *Role of TLRs and DAMPs in allograft inflammation and transplant outcomes.* Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(5): p. 281-90.
42. Shah, K.B., et al., *Formation of the inflammasome during cardiac allograft rejection.* Int J Cardiol, 2015. **201**: p. 328-30.

43. Wu, H., et al., *TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury*. J Clin Invest, 2007. **117**(10): p. 2847-59.
44. Witko-Sarsat, V., et al., *Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects*. Lab Invest, 2000. **80**(5): p. 617-53.
45. Kumar, V. and A. Sharma, *Neutrophils: Cinderella of innate immune system*. Int Immunopharmacol, 2010. **10**(11): p. 1325-34.
46. Savchenko, A.S., et al., *VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice*. Blood, 2014. **123**(1): p. 141-8.
47. Oklu, R., et al., *Reduced hind limb ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor-4 mutant mice is associated with decreased neutrophil extracellular traps*. J Vasc Surg, 2013. **58**(6): p. 1627-36.
48. Soares, M.P. and F.H. Bach, *Heme oxygenase-1 in organ transplantation*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 4932-45.
49. Won, K.C., et al., *A protective role for heme oxygenase-1 in INS-1 cells and rat islets that are exposed to high glucose conditions*. J Korean Med Sci, 2006. **21**(3): p. 418-24.
50. Abraham, N.G., et al., *Heme oxygenase: a target gene for anti-diabetic and obesity*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(5): p. 412-21.
51. Lee, S., et al., *Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(2): p. 317-26.
52. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
53. Tsung, A., et al., *Increasing numbers of hepatic dendritic cells promote HMGB1-mediated ischemia-reperfusion injury*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 119-28.
54. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. **343**(5): p. 338-44.
55. Kim, H.J., et al., *TLR2 signaling in tubular epithelial cells regulates NK cell recruitment in kidney ischemia-reperfusion injury*. J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2657-64.
56. Nilsson, B., K.N. Ekdahl, and O. Korsgren, *Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment*. Curr Opin Organ Transplant, 2011. **16**(6): p. 620-6.
57. Moberg, L., O. Korsgren, and B. Nilsson, *Neutrophilic granulocytes are the predominant cell type infiltrating pancreatic islets in contact with ABO-compatible blood*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(1): p. 125-31.
58. Eriksson, O., et al., *Positron emission tomography in clinical islet transplantation*. Am J Transplant, 2009. **9**(12): p. 2816-24.
59. Naziruddin, B., et al., *Evidence for instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical autologous islet transplantation*. Am J Transplant, 2014. **14**(2): p. 428-37.
60. Johansson, H., et al., *Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1755-62.
61. Rafael, E., et al., *Changes in liver enzymes after clinical islet transplantation*. Transplantation, 2003. **76**(9): p. 1280-4.
62. Piemonti, L., et al., *Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 55-65.
63. Wachlin, G., et al., *IL-1beta, IFN-gamma and TNF-alpha increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction*. J Autoimmun, 2003. **20**(4): p. 303-12.



64. Tan, J. and G. Zhou, *Chemokine receptors and transplantation*. Cell Mol Immunol, 2005. **2**(5): p. 343-9.
65. Baker, M.S., et al., *Genetic deletion of chemokine receptor CXCR3 or antibody blockade of its ligand IP-10 modulates posttransplantation graft-site lymphocytic infiltrates and prolongs functional graft survival in pancreatic islet allograft recipients*. Surgery, 2003. **134**(2): p. 126-33.
66. Key, N.S., J.G. Geng, and R.R. Bach, *Tissue factor; from Morawitz to microparticles*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2007. **118**: p. 165-73.
67. Rao, L.V. and U.R. Pendurthi, *Tissue factor-factor VIIa signaling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 47-56.
68. Egorina, E.M., et al., *Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1208-16.
69. Viles-Gonzalez, J.F., et al., *Tissue factor coagulation pathway: a new therapeutic target in atherothrombosis*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **43**(5): p. 669-76.
70. Moberg, L., et al., *Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation*. Lancet, 2002. **360**(9350): p. 2039-45.
71. Hoffman, M. and D.M. Monroe, *Coagulation 2006: a modern view of hemostasis*. Hematol Oncol Clin North Am, 2007. **21**(1): p. 1-11.
72. Furie, B. and B.C. Furie, *In vivo thrombus formation*. J Thromb Haemost, 2007. **5** **Suppl 1**: p. 12-7.
73. Bennet, W., et al., *Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes*. Ups J Med Sci, 2000. **105**(2): p. 125-33.
74. Buhler, L., et al., *Adult porcine islet transplantation in baboons treated with conventional immunosuppression or a non-myeloablative regimen and CD154 blockade*. Xenotransplantation, 2002. **9**(1): p. 3-13.
75. Levi, M., T. van der Poll, and H.R. Buller, *Bidirectional relation between inflammation and coagulation*. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2698-704.
76. Ricklin, D., et al., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 785-97.
77. Tjernberg, J., et al., *Acute antibody-mediated complement activation mediates lysis of pancreatic islets cells and may cause tissue loss in clinical islet transplantation*. Transplantation, 2008. **85**(8): p. 1193-9.
78. Mohanakumar, T., et al., *A significant role for histocompatibility in human islet transplantation*. Transplantation, 2006. **82**(2): p. 180-7.
79. Radillo, O., et al., *Complement-fixing islet cell antibodies in type-1 diabetes can trigger the assembly of the terminal complement complex on human islet cells and are potentially cytotoxic*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **79**(3): p. 217-23.
80. Noguchi, H., et al., *Evaluation of islet transplantation from non-heart beating donors*. Am J Transplant, 2006. **6**(10): p. 2476-82.
81. Contreras, J.L., et al., *Activated protein C preserves functional islet mass after intraportal transplantation: a novel link between endothelial cell activation, thrombosis, inflammation, and islet cell death*. Diabetes, 2004. **53**(11): p. 2804-14.
82. Biancone, L., et al., *Platelet-activating factor synthesis and response on pancreatic islet endothelial cells: relevance for islet transplantation*. Transplantation, 2006. **81**(4): p. 511-8.
83. Ehrnfelt, C., et al., *Adult porcine islets produce MCP-1 and recruit human monocytes in vitro*. Xenotransplantation, 2004. **11**(2): p. 184-94.

84. Omer, A., et al., *Macrophage depletion improves survival of porcine neonatal pancreatic cell clusters contained in alginate macrocapsules transplanted into rats*. Xenotransplantation, 2003. **10**(3): p. 240-51.
85. Chandra, A.P., et al., *Chemokine and toll-like receptor signaling in macrophage mediated islet xenograft rejection*. Xenotransplantation, 2007. **14**(1): p. 48-59.
86. Rossi, L., et al., *Prolonged islet allograft survival in diabetic mice upon macrophage depletion by clodronate-loaded erythrocytes*. Transplantation, 2008. **85**(4): p. 648-50.
87. Murray, A.G., et al., *Neonatal porcine islet cells induce human CD4+, but not CD8+, lymphocyte proliferation and resist cell-mediated cytolytic injury in vitro*. Diabetes, 1999. **48**(9): p. 1713-9.
88. Uppaluri, R., et al., *Prolongation of cardiac and islet allograft survival by a blocking hamster anti-mouse CXCR3 monoclonal antibody*. Transplantation, 2008. **86**(1): p. 137-47.
89. Fiorina, P., et al., *Characterization of donor dendritic cells and enhancement of dendritic cell efflux with CC-chemokine ligand 21: a novel strategy to prolong islet allograft survival*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 912-20.
90. Fiorina, P., et al., *Phenotypic and functional differences between wild-type and CCR2-/- dendritic cells: implications for islet transplantation*. Transplantation, 2008. **85**(7): p. 1030-8.
91. Fisher, A.J., et al., *Elevated levels of interleukin-8 in donor lungs is associated with early graft failure after lung transplantation*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(1): p. 259-65.
92. Shinichiro, O., et al., *The effect of selective neutrophil elastase inhibitor on pancreatic islet yields and functions in rat with hypercytokinemia*. Ann Transplant, 2011. **16**(4): p. 99-106.
93. Kuhlreiber, W.M., et al., *Islet isolation from human pancreas with extended cold ischemia time*. Transplant Proc, 2010. **42**(6): p. 2027-31.
94. de Groot, M., et al., *Response of encapsulated rat pancreatic islets to hypoxia*. Cell Transplant, 2003. **12**(8): p. 867-75.
95. Hearse, D.J., et al., *Xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion?* Acta Physiol Scand Suppl, 1986. **548**: p. 65-78.
96. Southorn, P.A. and G. Powis, *Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions*. Mayo Clin Proc, 1988. **63**(4): p. 381-9.
97. Hotta, M., et al., *Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes*. J Exp Med, 1998. **188**(8): p. 1445-51.
98. Benhamou, P.Y., et al., *Adenovirus-mediated catalase gene transfer reduces oxidant stress in human, porcine and rat pancreatic islets*. Diabetologia, 1998. **41**(9): p. 1093-100.
99. Barton, F.B., et al., *Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010*. Diabetes Care, 2012. **35**(7): p. 1436-45.
100. McCall, M., et al., *Anakinra potentiates the protective effects of etanercept in transplantation of marginal mass human islets in immunodeficient mice*. Am J Transplant, 2012. **12**(2): p. 322-9.
101. Sigrist, S., et al., *Activation of human macrophages by allogeneic islets preparations: inhibition by AOP-RANTES and heparinoids*. Immunology, 2004. **111**(4): p. 416-21.
102. Koulmanda, M., et al., *Alpha 1-antitrypsin reduces inflammation and enhances mouse pancreatic islet transplant survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(38): p. 15443-8.

103. SoRelle, J.A., et al., *Withaferin A inhibits pro-inflammatory cytokine-induced damage to islets in culture and following transplantation*. Diabetologia, 2013. **56**(4): p. 814-24.
104. Takahashi, H., et al., *Superiority of fresh islets compared with cultured islets*. Transplant Proc, 2009. **41**(1): p. 350-1.
105. Ozmen, L., et al., *Inhibition of thrombin abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction triggered by isolated human islets: possible application of the thrombin inhibitor melagatran in clinical islet transplantation*. Diabetes, 2002. **51**(6): p. 1779-84.
106. Jung, D.Y., et al., *Effect of nicotinamide on early graft failure following intraportal islet transplantation*. Exp Mol Med, 2009. **41**(11): p. 782-92.
107. Moberg, L., et al., *Nicotinamide inhibits tissue factor expression in isolated human pancreatic islets: implications for clinical islet transplantation*. Transplantation, 2003. **76**(9): p. 1285-8.
108. Schmidt, P., et al., *Adenovirus-mediated expression of human CD55 or CD59 protects adult porcine islets from complement-mediated cell lysis by human serum*. Transplantation, 2003. **75**(5): p. 697-702.
109. Bennet, W., et al., *Damage to porcine islets of Langerhans after exposure to human blood in vitro, or after intraportal transplantation to cynomolgus monkeys: protective effects of sCRI and heparin*. Transplantation, 2000. **69**(5): p. 711-9.
110. Wuillemin, W.A., et al., *Potentiation of C1 inhibitor by glycosaminoglycans: dextran sulfate species are effective inhibitors of in vitro complement activation in plasma*. J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1953-60.
111. Spirig, R., et al., *The complement inhibitor low molecular weight dextran sulfate prevents TLR4-induced phenotypic and functional maturation of human dendritic cells*. J Immunol, 2008. **181**(2): p. 878-90.
112. Ascon, M., et al., *Renal ischemia-reperfusion leads to long term infiltration of activated and effector-memory T lymphocytes*. Kidney Int, 2009. **75**(5): p. 526-35.
113. Chalasani, G., et al., *The allograft defines the type of rejection (acute versus chronic) in the face of an established effector immune response*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7813-20.
114. Day, Y.J., et al., *Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: the role of CD4+ T cells and IFN-gamma*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 3108-14.
115. Diamond, A.S. and R.G. Gill, *An essential contribution by IFN-gamma to CD8+ T cell-mediated rejection of pancreatic islet allografts*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 247-55.
116. Guo, Z., et al., *A substantial level of donor hematopoietic chimerism is required to protect donor-specific islet grafts in diabetic NOD mice*. Transplantation, 2003. **75**(7): p. 909-15.
117. Fiorina, P., et al., *Targeting the CXCR4-CXCL12 axis mobilizes autologous hematopoietic stem cells and prolongs islet allograft survival via programmed death ligand 1*. J Immunol, 2011. **186**(1): p. 121-31.
118. Gur, H., et al., *Immune regulatory activity of CD34+ progenitor cells: evidence for a deletion-based mechanism mediated by TNF-alpha*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2585-93.
119. D'Addio, F., et al., *Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in new-onset type 1 diabetes: a multicenter analysis*. Diabetes, 2014. **63**(9): p. 3041-6.
120. Agarwal, A. and K.A. Newell, *The role of positive costimulatory molecules in transplantation and tolerance*. Curr Opin Organ Transplant, 2008. **13**(4): p. 366-72.

121. Tezza, S., et al., *Novel immunological strategies for islet transplantation*. Pharmacol Res, 2015. **98**: p. 69-75.
  122. Chatenoud, L., *CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 123-32.
  123. Chatenoud, L., et al., *Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(1): p. 123-7.
  124. Keymeulen, B., et al., *Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes*. N Engl J Med, 2005. **352**(25): p. 2598-608.
  125. Belghith, M., et al., *TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1202-8.
  126. Citro, A., et al., *CXCR1/2 inhibition enhances pancreatic islet survival after transplantation*. J Clin Invest, 2012. **122**(10): p. 3647-51.
  127. Walsh, P.T., D.K. Taylor, and L.A. Turka, *Tregs and transplantation tolerance*. J Clin Invest, 2004. **114**(10): p. 1398-403.
  128. Nicolls, M.R., et al., *CD4-dependent generation of dominant transplantation tolerance induced by simultaneous perturbation of CD154 and LFA-1 pathways*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 4831-9.
  129. Battaglia, M., A. Stabilini, and M.G. Roncarolo, *Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4743-8.
  130. Gagliani, N., et al., *Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells*. Nat Med, 2013. **19**(6): p. 739-46.
  131. Nishimura, R., et al., *Tacrolimus inhibits the revascularization of isolated pancreatic islets*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e56799.
  132. Laubichler, M.D., Aird, William C., Maienschein, Jane, *The endothelium in history*, in *Endothelial Biomedicine*. 2007, Cambridge University Press. p. 3-20.
  133. Pugsley, M.K. and R. Tabrizchi, *The vascular system. An overview of structure and function*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2000. **44**(2): p. 333-40.
  134. Yuan, S.Y. and R.R. Rigor, *Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease, in Regulation of Endothelial Barrier Function*. 2010, Morgan & Claypool Life Sciences
- Copyright (c) 2011 by Morgan & Claypool Life Sciences.: San Rafael (CA).
135. Galley, H.F. and N.R. Webster, *Physiology of the endothelium*. Br J Anaesth, 2004. **93**(1): p. 105-13.
  136. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. Circ Res, 2007. **100**(2): p. 158-73.
  137. van Hinsbergh, V.W., *Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(1): p. 93-106.
  138. Al-Soudi, A., M.H. Kaaij, and S.W. Tas, *Endothelial cells: From innocent bystanders to active participants in immune responses*. Autoimmun Rev, 2017. **16**(9): p. 951-962.
  139. Lammert, E., O. Cleaver, and D. Melton, *Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels*. Science, 2001. **294**(5542): p. 564-7.
  140. Zanone, M.M., E. Favaro, and G. Camussi, *From endothelial to beta cells: insights into pancreatic islet microendothelium*. Curr Diabetes Rev, 2008. **4**(1): p. 1-9.
  141. Islam, M.S., *Advance in Experimental Medecine and Biology: The Islets of Langerhans*. Vol. 654. 2010.
  142. Kamba, T., et al., *VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(2): p. H560-76.

143. In't Veld, P. and M. Marichal, *Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans*. Adv Exp Med Biol, 2010. **654**: p. 1-19.
144. Jansson, L., et al., *Pancreatic islet blood flow and its measurement*. Ups J Med Sci, 2016. **121**(2): p. 81-95.
145. Dolensek, J., M.S. Rupnik, and A. Stozer, *Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas*. Islets, 2015. **7**(1): p. e1024405.
146. Lou, J., et al., *Expression of alpha-1 proteinase inhibitor in human islet microvascular endothelial cells*. Diabetes, 1999. **48**(9): p. 1773-8.
147. Bedoya, F.J., et al., *Regulation of pancreatic beta-cell survival by nitric oxide: clinical relevance*. Islets, 2012. **4**(2): p. 108-18.
148. Johansson, M., et al., *Islet endothelial cells and pancreatic beta-cell proliferation: studies in vitro and during pregnancy in adult rats*. Endocrinology, 2006. **147**(5): p. 2315-24.
149. Kaido, T., et al., *Regulation of human beta-cell adhesion, motility, and insulin secretion by collagen IV and its receptor alpha1beta1*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53762-9.
150. Mombouli, J.V. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: from physiology to therapy*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 61-74.
151. Hou, Y.C., A. Janczuk, and P.G. Wang, *Current trends in the development of nitric oxide donors*. Curr Pharm Des, 1999. **5**(6): p. 417-41.
152. Mas, M., *A Close Look at the Endothelium: Its Role in the Regulation of Vasomotor Tone*. 2 ed. Vol. 8. 2008: European Urology Supplements.
153. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
154. Zhuo, J.L. and X.C. Li, *New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II*. Peptides, 2011. **32**(7): p. 1551-65.
155. Schmidt-Ott, K.M., S. Kagiya, and M.I. Phillips, *The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis*. Regul Pept, 2000. **93**(1-3): p. 65-77.
156. Olivares-Reyes, J.A., A. Arellano-Plancarte, and J.R. Castillo-Hernandez, *Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **302**(2): p. 128-39.
157. Lerman, L.O. and A. Lerman, *All oxidase roads lead to angiotensin, too*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 703-4.
158. Horiuchi, M., M. Akishita, and V.J. Dzau, *Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system*. Hypertension, 1999. **33**(2): p. 613-21.
159. Abeywardena, M.Y. and R.J. Head, *Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function*. Cardiovasc Res, 2001. **52**(3): p. 361-71.
160. Csikos, T., S. Gallinat, and T. Unger, *Extrarenal aspects of angiotensin II function*. Eur J Endocrinol, 1997. **136**(4): p. 349-58.
161. Dasgupta, C. and L. Zhang, *Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease*. Drug Discov Today, 2011. **16**(1-2): p. 22-34.
162. Devasagayam, T.P., et al., *Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects*. J Assoc Physicians India, 2004. **52**: p. 794-804.
163. Di Meo, S., et al., *Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 1245049.
164. Griendling, K.K. and M. Ushio-Fukai, *NADH/NADPH Oxidase and Vascular Function*. Trends Cardiovasc Med, 1997. **7**(8): p. 301-7.

165. Aubin, M.C., et al., *Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47**(5): p. 702-10.
166. Kusama, N., et al., *Reduced hyperpolarization in endothelial cells of rabbit aortic valve following chronic nitroglycerine administration*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(4): p. 487-97.
167. Griffith, T.M., et al., *5-Methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin can modulate electrotonically mediated endothelium-dependent vascular relaxation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(19): p. 7008-13.
168. Siti, H.N., Y. Kamisah, and J. Kamsiah, *The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review)*. Vascul Pharmacol, 2015. **71**: p. 40-56.
169. Sitia, S., et al., *From endothelial dysfunction to atherosclerosis*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(12): p. 830-4.
170. Yang, G., et al., *Novel mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes*. J Cardiovasc Dis Res, 2010. **1**(2): p. 59-63.
171. Munzel, T., et al., *Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease?* Eur Heart J, 2010. **31**(22): p. 2741-8.
172. Desrois, M., et al., *Nitric oxide pathway after long-term cold storage and reperfusion in a heterotopic rat heart transplantation model*. Transplant Proc, 2005. **37**(10): p. 4553-5.
173. Carden, D.L. and D.N. Granger, *Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 255-66.
174. Kumar, S., et al., *Ischemic acidosis causes apoptosis in coronary endothelial cells through activation of caspase-12*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(1): p. 172-80.
175. Andreadou, I., et al., *To prevent, protect and save the ischemic heart: antioxidants revisited*. Expert Opin Ther Targets, 2009. **13**(8): p. 945-56.
176. Ogawa, S., et al., *Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels*. Am J Physiol, 1992. **262**(3 Pt 1): p. C546-54.
177. Rosenberger, P., et al., *Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 195-202.
178. Lum, H. and K.A. Roebuck, *Oxidant stress and endothelial cell dysfunction*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(4): p. C719-41.
179. Hadi, H.A., C.S. Carr, and J. Al Suwaidi, *Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome*. Vasc Health Risk Manag, 2005. **1**(3): p. 183-98.
180. Kattoor, A.J., et al., *Oxidative Stress in Atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2017. **19**(11): p. 42.
181. Guzik, T.J., et al., *Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors*. Circ Res, 2000. **86**(9): p. E85-90.
182. Therade-Matharan, S., et al., *Reoxygenation after hypoxia and glucose depletion causes reactive oxygen species production by mitochondria in HUVEC*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **287**(5): p. R1037-43.
183. Sies, H., *Total antioxidant capacity: appraisal of a concept*. J Nutr, 2007. **137**(6): p. 1493-5.
184. Wang, Y., O.K. Chun, and W.O. Song, *Plasma and dietary antioxidant status as cardiovascular disease risk factors: a review of human studies*. Nutrients, 2013. **5**(8): p. 2969-3004.

185. Ye, Z. and H. Song, *Antioxidant vitamins intake and the risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2008. **15**(1): p. 26-34.
186. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
187. Dinh, Q.N., et al., *Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 406960.
188. Karbach, S., et al., *eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(22): p. 3579-94.
189. Huang, Y., et al., *TNF-alpha induces endothelial dysfunction via PKC-zeta-dependent NADPH oxidase activation*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2012. **32**(5): p. 642-7.
190. Eltzschig, H.K. and C.D. Collard, *Vascular ischaemia and reperfusion injury*. Br Med Bull, 2004. **70**: p. 71-86.
191. Fukushima, S., et al., *A novel strategy for myocardial protection by combined antibody therapy inhibiting both P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 via retrograde intracoronary route*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I251-6.
192. Akers, D.L., et al., *Effect of short-term treatment with a monoclonal antibody to P-selectin on balloon catheter-induced: intimal hyperplasia, re-endothelialization, and attenuation of endothelial-dependent relaxation*. Mol Cell Biochem, 1997. **176**(1-2): p. 13-20.
193. Boyle, E.M., Jr., et al., *Treating myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting endothelial cell transcription*. Ann Thorac Surg, 1999. **68**(5): p. 1949-53.
194. Zhang, C., *The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(5): p. 398-406.
195. Golias, C., et al., *Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease*. In Vivo, 2007. **21**(5): p. 757-69.
196. Su, J.B., *Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment*. World J Cardiol, 2015. **7**(11): p. 719-41.
197. Caballero, A.E., et al., *Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes*. Diabetes, 1999. **48**(9): p. 1856-62.
198. Inoguchi, T., et al., *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells*. Diabetes, 2000. **49**(11): p. 1939-45.
199. Cassuto, J., et al., *Peroxynitrite disrupts endothelial caveolae leading to eNOS uncoupling and diminished flow-mediated dilation in coronary arterioles of diabetic patients*. Diabetes, 2014. **63**(4): p. 1381-93.
200. Evans, J.L., et al., *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes*. Endocr Rev, 2002. **23**(5): p. 599-622.
201. Maechler, P., L. Jornot, and C.B. Wollheim, *Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27905-13.
202. Marfella, R., et al., *Circulating adhesion molecules in humans: role of hyperglycemia and hyperinsulinemia*. Circulation, 2000. **101**(19): p. 2247-51.
203. Zhu, M., et al., *Propofol protects against high glucose-induced endothelial apoptosis and dysfunction in human umbilical vein endothelial cells*. Anesth Analg, 2015. **120**(4): p. 781-9.
204. Hadi, H.A. and J.A. Suwaidi, *Endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Vasc Health Risk Manag, 2007. **3**(6): p. 853-76.
205. Zhang, H., et al., *Role of TNF-alpha in vascular dysfunction*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(3): p. 219-30.

206. Luster, A.D. and A.M. Tager, *T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(9): p. 711-24.
207. Tan, K.C., et al., *Effects of angiotensin II receptor antagonist on endothelial vasomotor function and urinary albumin excretion in type 2 diabetic patients with microalbuminuria*. Diabetes Metab Res Rev, 2002. **18**(1): p. 71-6.
208. Sabatier, F., et al., *Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles*. Diabetes, 2002. **51**(9): p. 2840-5.
209. Herrera, M.D., et al., *Endothelial dysfunction and aging: an update*. Ageing Res Rev, 2010. **9**(2): p. 142-52.
210. Matz, R.L., et al., *Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products*. Physiol Res, 2000. **49**(1): p. 11-8.
211. Hoffmann, J., et al., *Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide*. Circ Res, 2001. **89**(8): p. 709-15.
212. Smith, A.R. and T.M. Hagen, *Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (R)-alpha-lipoic acid*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1447-9.
213. Idris Khodja, N., et al., *Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32039.
214. Deng, Q., et al., *High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1050-9.
215. Cantaluppi, V., et al., *Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells*. Kidney Int, 2012. **82**(4): p. 412-27.
216. Hayflick, L., *THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-36.
217. Erusalimsky, J.D., *Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology*. J Appl Physiol (1985), 2009. **106**(1): p. 326-32.
218. Burton, D.G. and V. Krizhanovsky, *Physiological and pathological consequences of cellular senescence*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(22): p. 4373-86.
219. Deschenes-Simard, X., et al., *Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation*. Genes Dev, 2013. **27**(8): p. 900-15.
220. Kong, Y., et al., *Regulation of senescence in cancer and aging*. J Aging Res, 2011. **2011**: p. 963172.
221. Sone, H. and Y. Kagawa, *Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice*. Diabetologia, 2005. **48**(1): p. 58-67.
222. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
223. Beausejour, C.M., et al., *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways*. Embo j, 2003. **22**(16): p. 4212-22.
224. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
225. Lee, B.Y., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 187-95.
226. Narita, M., et al., *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. Cell, 2003. **113**(6): p. 703-16.



227. Bakkenist, C.J., et al., *Disappearance of the telomere dysfunction-induced stress response in fully senescent cells*. *Cancer Res*, 2004. **64**(11): p. 3748-52.
228. Minamino, T. and I. Komuro, *Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis*. *Circ Res*, 2007. **100**(1): p. 15-26.
229. Stowe, D.F. and A.K. Camara, *Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function*. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(6): p. 1373-414.
230. Piotrowska, A. and E. Bartnik, *[The role of reactive oxygen species and mitochondria in aging]*. *Postepy Biochem*, 2014. **60**(2): p. 240-7.
231. Marcotte, R., C. Lacelle, and E. Wang, *Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3*. *Mech Ageing Dev*, 2004. **125**(10-11): p. 777-83.
232. Rodier, F., J. Campisi, and D. Bhauumik, *Two faces of p53: aging and tumor suppression*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(22): p. 7475-84.
233. Young, A.R., et al., *Autophagy mediates the mitotic senescence transition*. *Genes Dev*, 2009. **23**(7): p. 798-803.
234. Young, A.R. and M. Narita, *Connecting autophagy to senescence in pathophysiology*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(2): p. 234-40.
235. Giacinti, C. and A. Giordano, *RB and cell cycle progression*. *Oncogene*, 2006. **25**(38): p. 5220-7.
236. Canepa, E.T., et al., *INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions*. *IUBMB Life*, 2007. **59**(7): p. 419-26.
237. Besson, A., S.F. Dowdy, and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond*. *Dev Cell*, 2008. **14**(2): p. 159-69.
238. Takahashi, A., et al., *Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(11): p. 1291-7.
239. Rufini, A., et al., *Senescence and aging: the critical roles of p53*. *Oncogene*, 2013. **32**(43): p. 5129-43.
240. Lee, J.T. and W. Gu, *The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination*. *Cell Death Differ*, 2010. **17**(1): p. 86-92.
241. Brown, J.P., W. Wei, and J.M. Sedivy, *Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts*. *Science*, 1997. **277**(5327): p. 831-4.
242. Sengupta, S., T.R. Peterson, and D.M. Sabatini, *Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress*. *Mol Cell*, 2010. **40**(2): p. 310-22.
243. S, B.T.a.H., *Molecular Mechanisms of Cellular Senescence*. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 2013.
244. Malaquin, N., A. Martinez, and F. Rodier, *Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype*. *Exp Gerontol*, 2016. **82**: p. 39-49.
245. Coppe, J.P., et al., *Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor*. *PLoS Biol*, 2008. **6**(12): p. 2853-68.
246. Fingar, D.C., et al., *Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E*. *Genes Dev*, 2002. **16**(12): p. 1472-87.
247. Brodsky, S.V., et al., *Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen*. *Circ Res*, 2004. **94**(3): p. 377-84.
248. Kim, C.S., et al., *p53 impairs endothelium-dependent vasomotor function through transcriptional upregulation of p66shc*. *Circ Res*, 2008. **103**(12): p. 1441-50.

249. Abbas, M., et al., *Endothelial Microparticles from Acute Coronary Syndrome Patients Induce Premature Coronary Artery Endothelial Cells Ageing and Thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-mediated Activation of MAPKs and PI3-kinase Pathways*. *Circulation*, 2016.
250. Yang, J., et al., *Human endothelial cell life extension by telomerase expression*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(37): p. 26141-8.
251. Khemais-Benkhiat, S., et al., *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*, 2016. **71**(12): p. 1581-1590.
252. Palmer, A.K., et al., *Cellular Senescence in Type 2 Diabetes: A Therapeutic Opportunity*. *Diabetes*, 2015. **64**(7): p. 2289-98.
253. Tamura, Y., et al., *beta-cell telomere attrition in diabetes: inverse correlation between HbA1c and telomere length*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014. **99**(8): p. 2771-7.
254. Zhu, Y., et al., *The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs*. *Aging Cell*, 2015. **14**(4): p. 644-58.
255. Helman, A., et al., *Effects of ageing and senescence on pancreatic beta-cell function*. *Diabetes Obes Metab*, 2016. **18 Suppl 1**: p. 58-62.
256. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. *Exp Cell Res*, 1961. **25**: p. 585-621.
257. Krishnamurthy, J., et al., *Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(9): p. 1299-307.
258. Erusalimsky, J.D. and D.J. Kurz, *Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease*. *Exp Gerontol*, 2005. **40**(8-9): p. 634-42.
259. Salama, R., et al., *Cellular senescence and its effector programs*. *Genes Dev*, 2014. **28**(2): p. 99-114.
260. Krizhanovsky, V., et al., *Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis*. *Cell*, 2008. **134**(4): p. 657-67.
261. Wang, J., H. Geiger, and K.L. Rudolph, *Immunoaging induced by hematopoietic stem cell aging*. *Curr Opin Immunol*, 2011. **23**(4): p. 532-6.
262. Kasiske, B.L., et al., *Cancer after kidney transplantation in the United States*. *Am J Transplant*, 2004. **4**(6): p. 905-13.
263. Martins, P.N., S.G. Tullius, and J.F. Markmann, *Immunosenescence and immune response in organ transplantation*. *Int Rev Immunol*, 2014. **33**(3): p. 162-73.
264. Heinbokel, T., et al., *Impact of immunosenescence on transplant outcome*. *Transpl Int*, 2013. **26**(3): p. 242-53.
265. Bauer, M.E. and L. Fuente Mde, *The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence*. *Mech Ageing Dev*, 2016. **158**: p. 27-37.
266. Morel, O., et al., *Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(12): p. 2594-604.
267. Morel, O., et al., *Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection*. *J Heart Lung Transplant*, 2008. **27**(1): p. 38-45.
268. Bakouboula, B., et al., *Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. **177**(5): p. 536-43.
269. Baj-Krzyworzeka, M., et al., *Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(5): p. 450-9.

270. Delabranche, X., et al., *Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy*. Intensive Care Med, 2013. **39**(10): p. 1695-703.
271. Aupeix, K., et al., *The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection*. J Clin Invest, 1997. **99**(7): p. 1546-54.
272. Milioli, M., et al., *Quantitative proteomics analysis of platelet-derived microparticles reveals distinct protein signatures when stimulated by different physiological agonists*. J Proteomics, 2015. **121**: p. 56-66.
273. Ridger, V.C., et al., *Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology*. Thromb Haemost, 2017. **117**(7): p. 1296-1316.
274. MacKenzie, A., et al., *Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 825-35.
275. Huber, L.C., et al., *The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles*. Apoptosis, 2007. **12**(2): p. 363-74.
276. Bianco, F., et al., *Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells*. Embo j, 2009. **28**(8): p. 1043-54.
277. Perez-Casal, M., et al., *The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein C treatment in sepsis*. Crit Care, 2011. **15**(4): p. R195.
278. Simak, J. and M.P. Gelderman, *Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers*. Transfus Med Rev, 2006. **20**(1): p. 1-26.
279. Reich, C.F., 3rd and D.S. Pisetsky, *The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis*. Exp Cell Res, 2009. **315**(5): p. 760-8.
280. Baron, M., et al., *Cell-derived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation?* J Cell Mol Med, 2012. **16**(7): p. 1365-76.
281. Collier, M.E., et al., *Microparticle-associated tissue factor is recycled by endothelial cells resulting in enhanced surface tissue factor activity*. Thromb Haemost, 2013. **110**(5): p. 966-76.
282. Satta, N., et al., *Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide*. J Immunol, 1994. **153**(7): p. 3245-55.
283. Satta, N., J.M. Freyssinet, and F. Toti, *The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide*. Br J Haematol, 1997. **96**(3): p. 534-42.
284. Morel, O., et al., *Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious?* Haematologica, 2009. **94**(3): p. 313-7.
285. Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 569-79.
286. Lawson, C., et al., *Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease*. J Endocrinol, 2016. **228**(2): p. R57-71.
287. Hugel, B., et al., *Membrane microparticles: two sides of the coin*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 22-7.
288. Dignat-George, F. and C.M. Boulanger, *The many faces of endothelial microparticles*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(1): p. 27-33.
289. Kunzelmann-Marche, C., J.M. Freyssinet, and M.C. Martinez, *Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity. Role of transient receptor potential channels and ERK pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19876-81.

290. Coleman, J.A., F. Quazi, and R.S. Molday, *Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1831**(3): p. 555-74.
291. Hamon, Y., et al., *ABCI promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(7): p. 399-406.
292. Folmer, D.E., R.P. Elferink, and C.C. Paulusma, *P4 ATPases - lipid flippases and their role in disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1791**(7): p. 628-35.
293. Daleke, D.L., *Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(2): p. 233-42.
294. Segawa, K., et al., *Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure*. *Science*, 2014. **344**(6188): p. 1164-8.
295. Yang, H., et al., *TMEM16F forms a Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation*. *Cell*, 2012. **151**(1): p. 111-22.
296. Whitlock, J.M. and H.C. Hartzell, *Anoctamins/TMEM16 Proteins: Chloride Channels Flirting with Lipids and Extracellular Vesicles*. *Annu Rev Physiol*, 2017. **79**: p. 119-143.
297. Yu, K., et al., *Identification of a lipid scrambling domain in ANO6/TMEM16F*. *Elife*, 2015. **4**: p. e06901.
298. Fujii, T., et al., *TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(41): p. 12800-5.
299. Lhermusier, T., H. Chap, and B. Payrastre, *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*, 2011. **9**(10): p. 1883-91.
300. Toti, F., et al., *Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder*. *Blood*, 1996. **87**(4): p. 1409-15.
301. Scott, C.S., et al., *T-Cell Membrane CD45RA (2H4) and CD45RO (UCHL1) Determinants: II, Aberrant HLA-ABC Expression by CD45RA and CD45RO Cell Subpopulations of Mature CD4(+) T-Cell Leukaemias*. *Leuk Lymphoma*, 1991. **4**(1): p. 39-47.
302. Martinez, M.C. and J.M. Freyssinet, *Deciphering the plasma membrane hallmarks of apoptotic cells: phosphatidylserine transverse redistribution and calcium entry*. *BMC Cell Biol*, 2001. **2**: p. 20.
303. Wolfs, J.L., et al., *Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(13): p. 1514-25.
304. Morel, O., et al., *Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis*. *Semin Immunopathol*, 2011. **33**(5): p. 469-86.
305. Bishop, A.L. and A. Hall, *Rho GTPases and their effector proteins*. *Biochem J*, 2000. **348 Pt 2**: p. 241-55.
306. Sebbagh, M., et al., *Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(4): p. 346-52.
307. Simons, K. and R. Ehehalt, *Cholesterol, lipid rafts, and disease*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(5): p. 597-603.
308. Sonnino, S. and A. Prinetti, *Membrane domains and the "lipid raft" concept*. *Curr Med Chem*, 2013. **20**(1): p. 4-21.

309. Del Conde, I., et al., *Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation*. *Blood*, 2005. **106**(5): p. 1604-11.
310. Rank, A., et al., *Clearance of platelet microparticles in vivo*. *Platelets*, 2011. **22**(2): p. 111-6.
311. Flaumenhaft, R., *Formation and fate of platelet microparticles*. *Blood Cells Mol Dis*, 2006. **36**(2): p. 182-7.
312. Rand, M.L., et al., *Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(7): p. 1621-3.
313. Augustine, D., et al., *Dynamic release and clearance of circulating microparticles during cardiac stress*. *Circ Res*, 2014. **114**(1): p. 109-13.
314. Bakouboula, B., et al., *Significance of membrane microparticles in solid graft and cellular transplantation*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011. **16**: p. 2499-514.
315. Schoenwaelder, S.M., et al., *Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function*. *Blood*, 2009. **114**(3): p. 663-6.
316. Dasgupta, S.K., et al., *Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles*. *Blood*, 2009. **113**(6): p. 1332-9.
317. Dasgupta, S.K., et al., *Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium*. *Circulation*, 2012. **125**(13): p. 1664-72.
318. Burger, D., et al., *Microparticles: biomarkers and beyond*. *Clin Sci (Lond)*, 2013. **124**(7): p. 423-41.
319. Rautou, P.E. and N. Mackman, *Del-etion of microvesicles from the circulation*. *Circulation*, 2012. **125**(13): p. 1601-4.
320. Livshits, M.A., et al., *Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 17319.
321. Lacroix, R., et al., *Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop*. *J Thromb Haemost*, 2013.
322. Owens, A.P., 3rd, et al., *Monocyte tissue factor-dependent activation of coagulation in hypercholesterolemic mice and monkeys is inhibited by simvastatin*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(2): p. 558-68.
323. Mallat, Z., et al., *Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2000. **101**(8): p. 841-3.
324. Canault, M., et al., *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*, 2007. **171**(5): p. 1713-23.
325. Wekesa, A.L., et al., *Predicting carotid artery disease and plaque instability from cell-derived microparticles*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2014. **48**(5): p. 489-95.
326. Giesen, P.L., et al., *Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2311-5.
327. Santilli, F., et al., *Microparticles as new markers of cardiovascular risk in diabetes and beyond*. *Thromb Haemost*, 2016. **116**(2): p. 220-34.
328. Mesri, M. and D.C. Altieri, *Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(33): p. 23111-8.
329. Scanu, A., et al., *Stimulated T cells generate microparticles, which mimic cellular contact activation of human monocytes: differential regulation of pro- and anti-*

- inflammatory cytokine production by high-density lipoproteins.* J Leukoc Biol, 2008. **83**(4): p. 921-7.
330. Neri, T., et al., *Role of NF-kappaB and PPAR-gamma in lung inflammation induced by monocyte-derived microparticles.* Eur Respir J, 2011. **37**(6): p. 1494-502.
331. Eyre, J., et al., *Monocyte- and endothelial-derived microparticles induce an inflammatory phenotype in human podocytes.* Nephron Exp Nephrol, 2011. **119**(3): p. e58-66.
332. Berda-Haddad, Y., et al., *Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1alpha.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(51): p. 20684-9.
333. Barry, O.P., et al., *Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles.* J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 136-44.
334. Wang, J.G., et al., *Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1beta-dependent manner.* Blood, 2011. **118**(8): p. 2366-74.
335. Jy, W., et al., *Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: elevated EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis.* Front Biosci, 2004. **9**: p. 3137-44.
336. Buesing, K.L., et al., *Endothelial microparticles induce inflammation in acute lung injury.* J Surg Res, 2011. **166**(1): p. 32-9.
337. Densmore, J.C., et al., *Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury.* Shock, 2006. **26**(5): p. 464-71.
338. Mastronardi, M.L., et al., *Circulating microparticles from septic shock patients exert differential tissue expression of enzymes related to inflammation and oxidative stress.* Crit Care Med, 2011. **39**(7): p. 1739-48.
339. Boisrame-Helms, J., et al., *Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats.* Thromb Haemost, 2014. **111**(1): p. 154-64.
340. Chironi, G., et al., *Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(12): p. 2775-80.
341. Tual-Chalot, S., et al., *Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction.* Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(2): p. 261-8.
342. Agouni, A., et al., *Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome.* Am J Pathol, 2008. **173**(4): p. 1210-9.
343. Cheng, F., et al., *Berberine improves endothelial function by reducing endothelial microparticles-mediated oxidative stress in humans.* Int J Cardiol, 2013. **167**(3): p. 936-42.
344. Mostefai, H.A., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase regulate nitric oxide and reactive oxygen species productions by apoptotic lymphocyte microparticles in endothelial cells.* J Immunol, 2008. **180**(7): p. 5028-35.
345. Martin, S., et al., *Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression.* Circulation, 2004. **109**(13): p. 1653-9.
346. Essayagh, S., et al., *Microparticles from apoptotic monocytes induce transient platelet recruitment and tissue factor expression by cultured human vascular endothelial cells via a redox-sensitive mechanism.* Thromb Haemost, 2007. **98**(4): p. 831-7.
347. Terrisse, A.D., et al., *Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow.* J Thromb Haemost, 2010. **8**(12): p. 2810-9.

348. Brodsky, S.V., et al., *Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(5): p. H1910-5.
349. Tsimmerman, G., et al., *Involvement of microparticles in diabetic vascular complications*. Thromb Haemost, 2011. **106**(2): p. 310-21.
350. Ettelaie, C., et al., *Tissue factor-containing microparticles released from mesangial cells in response to high glucose and AGE induce tube formation in microvascular cells*. Microvasc Res, 2008. **76**(3): p. 152-60.
351. Sinning, J.M., et al., *Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes*. Eur Heart J, 2011. **32**(16): p. 2034-41.
352. Chen, J., et al., *Circulating endothelial progenitor cells and cellular membrane microparticles in db/db diabetic mouse: possible implications in cerebral ischemic damage*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(1): p. E62-71.
353. Nomura, S., et al., *Activated platelet and oxidized LDL induce endothelial membrane vesiculation: clinical significance of endothelial cell-derived microparticles in patients with type 2 diabetes*. Clin Appl Thromb Hemost, 2004. **10**(3): p. 205-15.
354. Burger, D., et al., *Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence*. J Am Heart Assoc, 2012. **1**(3): p. e001842.
355. Turner, M., et al., *OS 02-03 EFFECT OF HIGH GLUCOSE EXPOSURE ON ENDOTHELIAL MICROPARTICLE FORMATION AND COMPOSITION*. J Hypertens, 2016. **34** **Suppl 1 - ISH 2016 Abstract Book**: p. e48.
356. Figliolini, F., et al., *Isolation, characterization and potential role in beta cell-endothelium cross-talk of extracellular vesicles released from human pancreatic islets*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e102521.
357. Gleizes, C., 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): p. 733-40.
358. Toti, F., et al., *Studies of circulating microparticle release in peripheral blood after pancreatic islet transplantation*. Transplant Proc, 2011. **43**(9): p. 3241-5.
359. Moreau, F., et al., *Rescue of a pancreatic islet graft after steroid therapy*. Transplantation, 2012. **93**(3): p. e10-1.
360. AMOURA, L., ZOBARI, F. , YVER, B , MEYER, N. , KREUTTER G, G. , EL HABHAB, A. , SAHRAOUI, S. , TOTI, F. , KESSLER, L., *Beta cells-derived microparticles as early biomarkers of rejection in islet transplanted patients: Toward the identification of the cause of the graft loss*. Diabetologia, 2017. **60**(supplement 1): p. 1-608.
361. Garcia, S., et al., *Phenotypic assessment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: switch from cell activation to apoptosis*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(12): p. 2184-9.
362. Olland, A., et al., *Microparticles: A new insight into lung primary graft dysfunction?* Hum Immunol, 2016.
363. Al-Massarani, G., et al., *Kidney transplantation decreases the level and procoagulant activity of circulating microparticles*. Am J Transplant, 2009. **9**(3): p. 550-7.
364. Al-Massarani, G., et al., *Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation*. Am J Transplant, 2008. **8**(11): p. 2360-7.
365. De Rop, C., et al., *Evaluation of tissue factor bearing microparticles as biomarkers in allogeneic stem-cell transplantation*. Transplantation, 2011. **92**(3): p. 351-8.

366. Kreutter, G., et al., *Endothelial microparticles released by activated protein C protect beta cells through EPCR/PAR1 and annexin A1/FPR2 pathways in islets*. J Cell Mol Med, 2017.
367. Boulanger, C.M., et al., *Extracellular vesicles in coronary artery disease*. Nat Rev Cardiol, 2017. **14**(5): p. 259-272.
368. Fitzner, B., et al., *Senescence determines the fate of activated rat pancreatic stellate cells*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(11): p. 2620-30.
369. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 34-45.
370. Kassem, M., et al., *Senescence of Pancreas in Middle-Aged Rats with Normal Vascular Function*. Ann Transplant, 2017. **22**: p. 177-186.
371. Wagner, M., et al., *Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis*. Exp Gerontol, 2001. **36**(8): p. 1327-47.
372. Abid Hussein, M.N., et al., *Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment*. Thromb Haemost, 2007. **98**(5): p. 1096-107.
373. Touyz, R.M. and A.M. Briones, *Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension*. Hypertens Res, 2011. **34**(1): p. 5-14.
374. van der Loo, B., et al., *Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1731-44.
375. Chen, J., et al., *Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(4): p. H1575-86.
376. Marrachelli, V.G., et al., *Sonic hedgehog carried by microparticles corrects angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in mice*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72861.
377. Cao, X.K., et al., *Co-combination of islets with bone marrow mesenchymal stem cells promotes angiogenesis*. Biomed Pharmacother, 2016. **78**: p. 156-64.
378. Almaca, J., et al., *Young capillary vessels rejuvenate aged pancreatic islets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(49): p. 17612-7.
379. Gock, H., et al., *Human Endothelial Protein C Receptor Overexpression Protects Intraportal Islet Grafts in Mice*. Transplant Proc, 2016. **48**(6): p. 2200-7.
380. Akima, S., et al., *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, 2009. **9**(7): p. 1533-40.
381. Cui, W., et al., *Thrombomodulin improves early outcomes after intraportal islet transplantation*. Am J Transplant, 2009. **9**(6): p. 1308-16.
382. Gidon-Jeangirard, C., et al., *Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the release of CD4+ and PrPc+ membrane particles in a human T lymphocyte model*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5712-8.



## IX Production scientifique et communication orales

**El Habhab A**, Abbas M, Kassem M, Kreutter G, Amoura L, Zobairi F, Schini-Kerth V, Toti F, Kessler L. Significance of immune cell-derived microparticles in ischemia reperfusion: Induction of endothelial senescence and vascular dysfunction, article soumis à American Journal of Transplantation

Kassem M, **El Habhab A**, Kreutter G, Amoura L, Baltzinger P, Abbas M, Zobairi F, Schini-Kerth V, Kessler L, Toti F. Impact of pro-senescent endothelial microparticles on rat pancreatic islet, article en preparation

Kreutter G, Kassem M, **El Habhab A**, Baltzinger P, Abbas M, Boirame-Helms J, Lamoura L, Peluso J, Yves B, Zobairi F, Ubeaud-Sequier G, Kessler L, Toti F. Endothelial microparticles release after activated protein C protect Beta cells through EPCR/PAR1 and Annexin A1/FPR2 pathways. J Cell Mol Med. 2017 May 19. doi : 10.1111/jcmm. 13191

Kassem M, Rasul Z, Abbas M, **El Habhab A**, Kreutter G, Khemais S, Auger C, Antal M, Schini-Kerth V, Toti F, Kessler L. The Endocrine Pancreas, an early sensor of senescence in middle-aged rats with normal vascular function. Ann Transplant. 2017 Mar 31; 22:177-186

### communications orales

**El Habhab A**, Kassem M, Kreutter G, Abbas M, Zobairi F, Schini-Kerth V, Toti F, Kessler L. Leukocyte-derived microparticles favor endothelial senescence: A new mechanism possibly contributing to IBMIR in islet transplantation, ADA (American Diabetes Association), 9-13 juin, San-diego – Etats Unis 2017. Diabetes 2017 Jun; 66 (Supplement 1): A1-A100

**El Habhab A**, Abbas M, Kassem M, Kreutter G, Zobairi F, Schini-Kerth V, Toti F, Kessler L. Leukocyte-derived microparticles favor endothelial senescence: Impact for pancreatic islet engraftment, IMIRT (The Third International Meeting on Ischemia Reperfusion Injuries in Transplantation), 21-22 avril, Poitiers-France 2016

**El Habhab A**, Abbas M, Kassem M, Kreutter G, Khemais S, Zobairi F, Auger C, Schini-Kerth V, Toti F, Kessler L. Leukocytes derived microparticles induce endothelial senescence: contibution to IBMIR and significance for iset transplantation, 6th EPITA (The European Pancreas and Islet Transplant Association) winter symposium & 35th AIDPIT workshop, 24-

26 janvier, Igls-Austria 2016. Acta Diabetol (2016) 53: 137

**El Habhab A**, Abbas M, Kassem M, Kreutter G, Zobairi F, Yver B, Schini-Kerth V, Kessler L, Toti F. Immune response favors the release of leukocyte-derived microparticles mediating endothelial senescence, and pro-coagulant and pro-inflammatory phenotype, ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis), 8-13 juillet, Berlin-Allemagne 2017. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis Vol 1, issue S1 July 2017, Pages 1-1451

## Prix et distinctions

**Association Est-transplant** : Prix de thèse de science, Novembre 2017, Nancy-France

## *Annexe*

---

Received: 2016.08.11

Accepted: 2016.12.19

Published: 2017.03.31

# Senescence of Pancreas in Middle-Aged Rats with Normal Vascular Function

Authors' Contribution:  
Study Design A  
Data Collection B  
Statistical Analysis C  
Data Interpretation D  
Manuscript Preparation E  
Literature Search F  
Funds Collection G

ABCDEF 1 **Mohamad Kassem**  
B 2 **Zahid Rasul Niazi**  
B 2 **Malak Abbas**  
C 1 **Ali El Habhab**  
D 1 **Guillaume Kreutter**  
A 2 **Sonia Khemais-Benkhiat**  
ABCD 2 **Cyril Auger**  
AD 3 **Maria-Cristina Antal**  
ADE 2 **Valérie B. Schini-Kerth**  
ABCDE 2 **Florence Toti**  
ACDEF 1,4 **Laurence Kessler**

1 EA7293, Vascular and Tissular Stress in Transplantation, Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France  
2 UMR CNRS 7213, Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France  
3 Histology Institute, Federation of Translational Medicine of Strasbourg, University of Strasbourg, Strasbourg, France  
4 Department of Diabetes and Nutrition Endocrinology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

**Corresponding Author:** Mohamad Kassem, e-mail: mohamadjkassem@gmail.com  
**Source of support:** This work was supported in part by an unrestricted grant from IP-Santé

**Background:** In organ transplantation, particularly pancreas transplantation, donor age is a determinant factor for graft survival. Physiological aging is crucial in the progressive deterioration of organs in adulthood. We compared the senescence and function features of pancreas and vascular tissues in young rats and middle-aged rats.

**Material/Methods:** Islet morphology and the area of cells secreting insulin or glucagon was investigated using immunohistology in young rats (12 weeks) and middle-aged rats (52 weeks) (n=8). Senescence markers, oxidative stress (ROS), and tissue factor (TF) were measured in the rat pancreases. Circulating microparticles (MPs) were measured as surrogates of vascular cell injury. Vascular function was studied in mesenteric arterial rings.

**Results:** Larger islets were twice as frequent in young rats versus middle-aged rats. In middle-aged rats there was a significant decrease of the  $\beta$ -cells/islet area ratio. Western blot analysis showed an increased expression of p53, p21, and p16 senescence markers (2-, 7- and 3-fold respectively) with no modification in caspase-3 activation. A 30% decrease of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was observed together with a 4-fold increase in TF expression. ROS formation increased significantly (2-fold) in middle-aged rats and their main source, determined by pharmacological inhibition, was NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide (NO) synthase. No sign of vascular injury (microparticles) or dysfunction was evidenced.

**Conclusions:** Modification in islet morphology and function were detected in middle-aged rats before any measurement of macro-vascular dysfunction. The data indicate a pancreatic senescence in the process of aging associated with uncontrolled accumulation of oxidative species that suggests a determining role of donor age in transplantation.

**MeSH Keywords:** Cell Aging • Cell-Derived Microparticles • Islets of Langerhans • Reactive Oxygen Species • Tissue Factor • Transplantation

**Full-text PDF:** <http://www.annalsoftransplantation.com/abstract/index/idArt/901009>

 3629

 1

 5

 36



## Background

In organ transplantation, and particularly in pancreas and pancreatic islet transplantation, donor age is a determinant for the efficacy of graft function and survival [1]. Physiological aging is crucial in the progressive deterioration of all organs, and is associated with chronic and metabolic diseases, including obesity, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes (T2D) [2,3].

Cell senescence arises progressively with age or may arise because of organ premature dysfunction that consecutively alters cell function promoted by acute stress. Cellular senescence is characterized by an irreversible arrest of cell division that occurs after telomere erosion, DNA damage, oxidative stress, or oncogenic activation. It is supported by a shift in optimum pH of lysosomal  $\beta$ -galactosidase (senescence-associated  $\beta$ -galactosidase [SA- $\beta$ gal] activity), which is the gold standard for the detection of senescence cells [4,5]. The proteins p53, p21, and p16 are cell cycle inhibitors contributing to the senescence process. It would seem that  $\beta$ -cell proliferation and/or ROS (reactive oxygen species) generation accelerates cellular senescence [6,7].

Pancreatic islet, an endocrine structure with an organized vascularization, undergoes morphological changes and functional decline during normal aging [8], thereby suggesting a possible interaction between islet cells and the vascular endothelium.

Endothelial cells contribute to many vital physiological functions such as the control of hemostasis and blood pressure [9,10]. Endothelium-mediated vasodilatory function progressively declines with age [11]. It is associated with decreases in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and in nitric oxide (NO) formation, (a major vasoprotector of aging endothelial cells), leading to a progressive deterioration of cell function owing to cell cycle arrest and senescence [12,13].

Oxidative stress causes endothelial aging and dysfunction through uncontrolled production of ROS [14]. Inflammation, which increases with age, is another major cause of cell dysfunction. At the surface of the inflamed endothelium, the expression of tissue factor (TF), which is the membrane initiator of coagulation and an early responsive gene, is upregulated as are pro-adhesive membrane proteins involved in leucocyte recruitment [15].

Microparticles (MPs) are submicron plasma membrane vesicles shed by stressed or apoptotic cells. They are circulating markers of vascular cell damage and behave as cellular effectors. In blood flow, MPs are procoagulant and convey the active form of TF. MP cell origin can be determined by detection of specific membrane proteins. An inflammation driven  $\beta$ -cell membrane remodeling can lead to insulin impairment and the release of TF-bearing MPs able to induce  $\beta$ -cell

apoptosis [16,17]. Furthermore, MPs are circulating surrogate markers of endothelial damage and associated with cardiometabolic risk factors [18].

These findings raise the question of the contribution of pancreas senescence to the pancreas or islets graft failure. The aim of the present study was to: (1) analyze islet morphological or functional changes, and determine whether alteration of the pancreas within the process of aging could sense pancreatic senescence-driven dysfunction, and (2) compare the variations of markers of senescence and oxidative stress with age in the pancreas and vessels using plasma MPs as a surrogate of vascular tissue damage.

## Material and Methods

### Ethics statement

Male Wistar rats (Janvier-Labs, Le Genest-St-Isle, France) were housed in a temperature-controlled (22°C) room and maintained on a standard 12-hour light/dark cycle (lights on at 07:00 am) with free access to food and water. Experiments conform 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 a local ethic committee (Comite d'éthique en Matière d'expérimentation animale de Strasbourg, authorization 03799.01). All animal experiments were done in a registered animal yard within Faculty of Pharmacy (Authorization number E-67-218-26).

### Animal model, blood and tissue sampling

Young, 12-week-old male Wistar rats (n=8) with average body weight (463.6±9.49 g) and 52-week-old middle-aged male Wistar rats (n=8) with average body weight (739.4±46.29 g) were investigated. Rats were anaesthetized by sub-lethal IP injection of 50 mg/kg sodium pentobarbital (Ceva Animal Health, Libourne, France), and euthanized by exsanguination. The pancreas and mesenteric artery were removed and weighed. The pancreas was cut into three parts. One part was fixed in freshly depolymerized paraformaldehyde 4% (Electron Microscopy Sciences 15710, Hatfield) and subsequently embedded in paraffin for histological analysis. The second part was embedded in Tissu-Tek O.C.T. Compound (Sakura 4583, Leiden, Netherlands) and snap-frozen for immunofluorescence studies and the determination of the formation of ROS. The third part was frozen in liquid nitrogen for Western blot analysis. Blood samples were withdrawn by heart puncture and harvested on 13 mM sodium citrate or 1.8 mg/mL EDTA. Citrated plasma was obtained by sequential centrifugation as recommended by the SSC committee of the International society for Thrombosis and

Haemostasis (ISTH) for the measurement of MPs in plasma. Plasma was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis.

### Histological and morphological analyses

Four micrometer ( $\mu\text{m}$ ) thick paraffin sections of pancreas samples were stained with hematoxylin-eosin and Gomori's trichrome stain. Four sections were taken from each sample every 100  $\mu\text{m}$ . For each section, the surface of the islets was measured using ImageJ software. The mean islet surface area was calculated by adding the values measured for each of the four sections to cover the whole islet area.

### Immunohistochemistry and immunofluorescence determinations

For immunohistochemistry, paraffin-embedded pancreas sections were subjected to microwave antigen retrieval in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0). After incubation with the primary antibody, mouse monoclonal anti-PSA-NCAM (1/500) (Millipore, clone 2-2B, MAB5324, Darmstadt, Germany) overnight, labeling was revealed by anti-mouse (two hours) and ABC complex formation (30 minutes) (VECTASTAIN Elite ABC Kit (Standard), California, USA); VIP (VECTOR VIP Peroxidase (HRP) Substrate Kit, California, USA) as a chromogen.

Double labeling of insulin and glucagon was performed by immunofluorescence on paraffin-embedded pancreas sections by overnight incubation with rabbit polyclonal anti-insulin (1/200, 4590S Cell Signaling, Danvers, USA) or mouse monoclonal anti-glucagon primary antibodies (1/5,000, G2654 Sigma, Missouri, USA), followed by two hours incubation at room temperature with an Alexa Fluor 488 FITC-goat anti-mouse IgG (H+L) and Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Life technologies, USA antibodies). Nuclei were stained with DAPI (Roche Diagnostics, Meylan, France), and sections were cover-slipped with fluorescence-mounting medium (Dako S3023, Carpinteria, USA). For negative controls, primary antibodies were omitted.

### Intra peritoneal glucose tolerance test (IPGTT)

Rats were fasted for eight hours before intraperitoneal injection of glucose (2 g/kg). Glucose plasma concentrations were measured in the blood of the tail vein using a glucometer (BG STAR, Agamatrix, USA) at different times 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 minutes.

### Biological markers

Glucose was measured in plasma collected at the moment of sacrifice by the hexokinase spectrophotometry method, insulin by ELISA kit (Millipore cat# EZRMI-13K, Billerica, MA, USA).

### Western blot analysis

Protein lysates from frozen pancreatic tissue were incubated with extraction buffer (Tris/HCl 20 mM (pH 7.5; Q-Biogene, California, USA), NaCl 150 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, sodium pyrophosphate 10 mM, NaF 20 mM, okadaic acid 0.01 mM (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) containing a tablet of protease inhibitor (Complete Roche, Basel, Switzerland) and 1% Triton X-100 (Euromedex, 2000-B, Souffelweyersheim, France). Total proteins (30  $\mu\text{g}$ ) were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels at 100 V for two hours and transferred by electrophoresis onto polyvinylidene difluoride membranes (Amersham, Life Sciences, Germany) at 100 V for 120 minutes. Non specific binding was blocked by incubation in TBS buffer (Biorad) containing 5% bovine serum albumin (BSA) (Euromedex, 04-100-812-E, Souffelweyersheim, France), and 0.1% Tween 20 (Sigma) (TBS-T) for two hours.

Membranes were then incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in TBS-T containing 5% BSA and polyclonal antibody raised against human p53 (1/1,000) (Santa Cruz Biotechnology FL-393 SC-6243, Dallas, Texas, USA), human p21 (1/1,000) (Santa Cruz Biotechnology C-19 SC-397, Dallas, Texas, USA), human p16 (1/1,000) (Abcam ab51243, Cambridge, UK), rat eNOS (1/1,000) (BD Transduction Laboratory cat: 610297), human TF (1/1,000) (Sekisui diagnostics, Sekisui Wiretech Gbmh, Russelsheim, Germany), and rat cleaved caspase-3 (1/1,000) (Cell Signaling Technology, Danvers, USA). After three washings with TBS-T, membranes were incubated with an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and density signals of each band detected using ECL Substrate (170-0561, BIO-RAD, United States). Membranes were incubated with a mouse polyclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (Millipore MAB 374, Darmstadt, Germany), or monoclonal anti- $\beta$ -tubulin I mouse antibody (Sigma-Aldrich, T7816, Missouri, USA) for normalization purposes.

### Determination of mitochondrial ROS formation and sources

*In situ* formation of ROS was assessed as previously described [19]. The redox-sensitive red fluorescent dye dihydroethidium (DHE, 2.5  $\mu\text{M}$ ) was applied to 25  $\mu\text{m}$  unfixed cryosections of the pancreas for 30 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$  in a light-protected humidified chamber. Sections were washed three times with PBS, mounted in DAKO, and cover-slipped. The sections were examined under a confocal microscope (Confocal Leica TSC SPE-Mannheim, Germany). To determine sources of ROS, sections were incubated 30 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$  before DHE staining with the specific inhibitors VAS-2870 (VAS, NADPH oxidase 10  $\mu\text{M}$ ), N-nitro-L-arginine (L-NA, NO synthase inhibitors 300  $\mu\text{M}$ ), Indomethacin (Indo, cyclooxygenases COX 10  $\mu\text{M}$ ) and MRK (inhibitors of the mitochondrial respiration chain, myxothiazol 0.5  $\mu\text{M}$  + rotenone 1  $\mu\text{M}$  + potassium cyanide (KCN) 1  $\mu\text{M}$ ).

## Vascular reactivity

Vascular reactivity studies of secondary mesenteric artery rings were performed as previously described [20]. Briefly, the secondary mesenteric artery was cleaned of connective tissue, cut into rings (2–3 mm in length) and suspended in organ baths containing oxygenated (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) Krebs bicarbonate solution (composition in mM: NaCl 119, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub> 1.18, CaCl<sub>2</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 25, and D-glucose 11, pH 7.4, at 37°C) for the determination of changes in isometric tension. After equilibration and functional tests, rings were pre-contracted with phenylephrine (PE, 1 μM) before construction of concentration-response curves to acetylcholine (ACh). In some experiments, rings were exposed to an inhibitor for 30 minutes before contraction with PE. Relaxations were expressed as percentage of the contraction induced by PE [21].

## Microparticles measurement and characterization

Platelet-free rat plasma (PFP) was obtained from blood by sequential centrifugation steps: 15 minutes at 500 g, and supernatant further submitted to 13,000 g for five minutes. The PFP was kept at –80°C. MPs measurement was performed using prothrombinase assay after capture onto annexin-5 as previously described. The assay allows extensive washing of insolubilized MPs, taking advantage of the high affinity of annexin-5 for the phosphatidylserine (PtdSer) exposed at MPs surface. MPs concentration was referred to as PtdSer equivalent, by reference to a standard curve made with synthetic vesicles of known amounts of PtdSer [22].

In addition, MPs cell origin was determined by replacing annexin-5 with specific biotinylated monoclonal antibodies, each directed against one typical CD: mouse IgG against rat CD61 for platelet (Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-rat CD45 for leucocytes (Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-rat CD54 for endothelial cells (Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-rat CD245 for erythroid cells (BD Pharmingen, New Jersey, USA).

## Image analysis

For immunohistochemistry and immunofluorescence analysis, four sections from each pancreas sample were taken every 100 μm, and the mean value of 400 μm tissue labeling was calculated for each sample. Images were analyzed by the NIH ImageJ software.

## Statistical analyses

Data are expressed as mean ± S.E.M. Mean values were compared using unpaired Student's *t*-test for the comparisons of groups using GraphPad Prism version 6.01 for Windows™ (GraphPad Software, San Diego, USA). A value of *p*<0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Size distribution and morphology of islets are altered in middle-aged rats

Histological examination of pancreas sections from young rats showed a normal islet morphology with a regular, spherical shape surrounded by a thin collagen capsule, whereas middle-aged rat islets showed an altered shape with high fragmentation of the biggest islets into small irregular units surrounded by dense fibrous tissue (Figure 1A, 1B). Regardless of age, the size distribution ranged from 300 μm<sup>2</sup> to >80,000 μm<sup>2</sup>, although small islets (300 μm<sup>2</sup> to 20,000 μm<sup>2</sup>) were significantly more abundant in middle-aged rats compared to young rats (92.7%±1.9 vs. 86.8%±1.4, *p*<0.05). The larger islets (20,000 μm<sup>2</sup> to 40,000 μm<sup>2</sup>) appeared to be characteristic features of young rats compared to middle-aged rats (8.6%±0.9 vs. 4.3%±1, *p*<0.01) (Figure 1C). There was no modification of exocrine tissue regarding the age of rats.

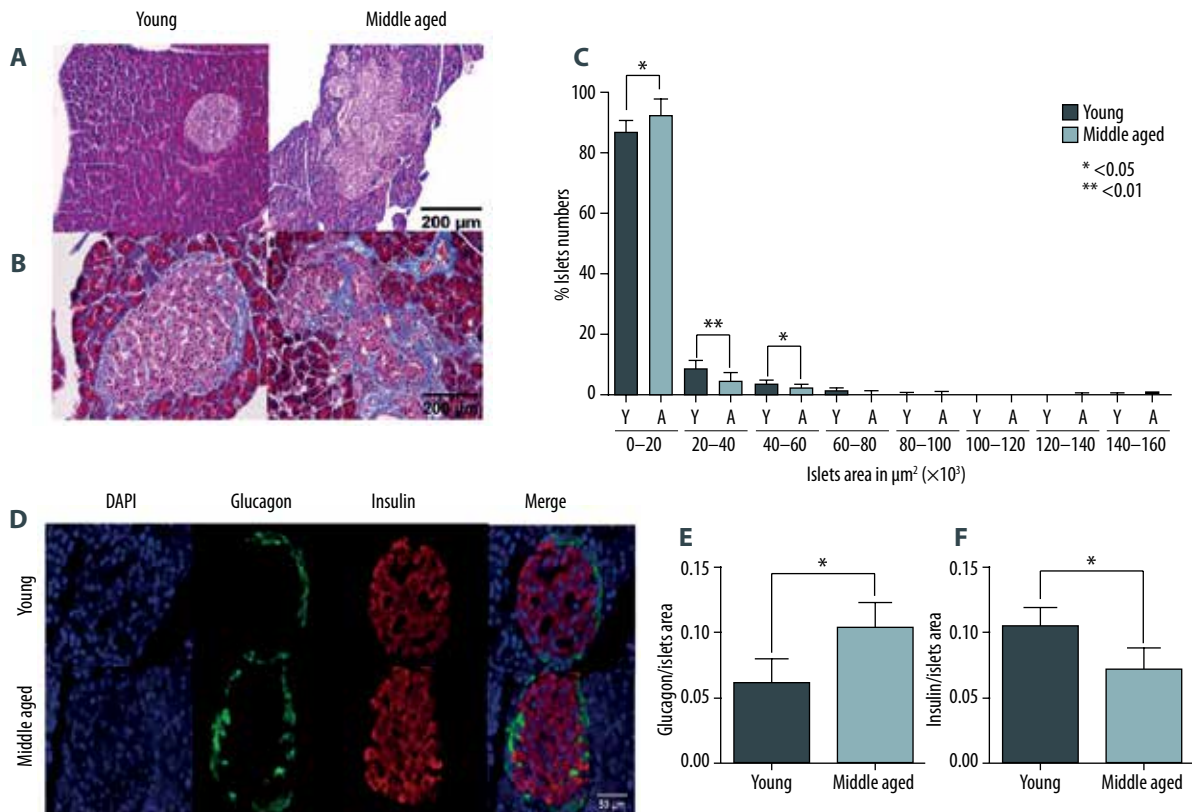
### Islet cell populations, plasticity, and activity

Because PSA-NCAM was shown by Karaca et al. [23] as a specific marker of β-cell function and activity, we investigated its expression in pancreatic tissues of both rat subsets by measuring the surface ratio of labelled PSA-NCAM to islet area. PSA-NCAM staining remained restricted to the islet endocrine tissue in both young and aged pancreases, and the PSA-NCAM labelled area expressed as a ratio of islet surface was identical between young rats at compared to middle-aged rats (0.42±0.01 vs. 0.41±0.01). Double insulin/glucagon immunolabeling showed a similar distribution of both β and α cells in the islets of young rats and middle-aged rats (Figure 1D). However, in middle-aged rats, the glucagon/islets surface ratio increased significantly from 6.04%±0.01 to 10.40%±0.01 (*p*<0.05) (Figure 1E), while the insulin area/islet surface ratio significantly decreased from 93.96%±0.01 to 89.60%±0.01 (*p*<0.05) (Figure 1F).

### IPGTT and insulin levels were modified in middle-aged rats

At the beginning of the IPGTT test after fasting for eight hours, young rats compared to middle-aged rats showed higher (but not significantly different) glycaemia level. After fasting, a shift in glucose response was shown at 15–30 minutes: 250 mg/dL after 15 minutes shifting to 267.3±16.7 in middle-aged rats vs. 211±6.7 mg/dL in young rats after 30 minutes) (Figure 2A). In addition, values of glycaemia in middle-aged rats remained elevated at all test points starting from 30 minutes when compared to young rats. However, this elevation was significantly higher only after 30 minutes (211±6.7 increased to 267.3±16.7; *p*<0.01) and 120 minutes (156±5.4 increased to 199.8±16.7; *p*<0.05) of intraperitoneal injection of glucose in young rats and middle-aged rats, respectively. Therefore, it





**Figure 1.** Islet morphology, size distribution, and glucagon and insulin-secreting cell area are altered in middle-aged rats: (A) Morphological analysis of islet structure was determined on formaldehyde-fixed 4  $\mu\text{m}$  thick paraffin sections after hematoxylin-eosin staining (scale bar=200  $\mu\text{m}$ ). (B) Accumulation of collagen was evidenced using Gomori's trichrome (scale bar=200  $\mu\text{m}$ ) at 10 $\times$ . (C) Size range distribution was determined by measurement of total islet area every 20,000  $\mu\text{m}^2$ . Four sections for each sample were taken (section every 100  $\mu\text{m}$ ). (D) The distribution of glucagon and insulin-secreting cells was analyzed on 4  $\mu\text{m}$  paraffin sections following double-labeling with fluorescent anti-insulin and anti-glucagon antibodies; cell nuclei were revealed with blue DAPI staining (scale bar=50  $\mu\text{m}$ ), (magnification 40 $\times$ ). The ratio of glucagon (E) and insulin (F) areas per islet area and quantification was performed using ImageJ software; results expressed as mean  $\pm$ SEM of eight rats per group, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

was clearly shown that plasma glucose remained unchanged, whereas insulin levels significantly increased in middle-aged rats from  $5.69 \pm 0.47$  to  $7.05 \pm 0.35$  ng/mL ( $p < 0.05$ ) (Figure 2B).

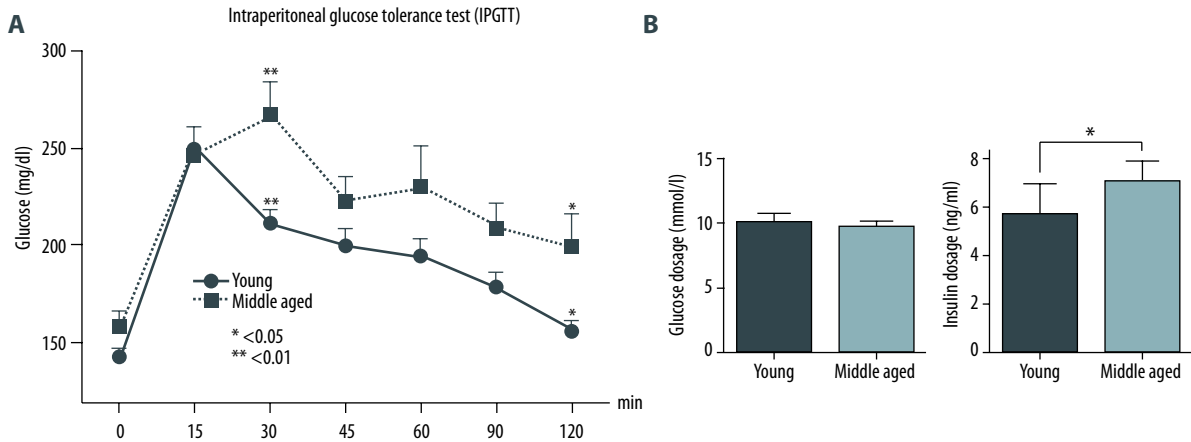
### Senescence markers were overexpressed and oxidative stress increased with aging in rat pancreatic tissue

Because ROS production was reported to promote senescence, we measured ROS in pancreas cryosections and detected a 2-fold increase in middle-aged rats compared to young rats (Figure 3A). ROS staining was homogenous and detected in whole pancreatic tissue. Pharmacological inhibitors applied on pancreatic sections revealed that the major sources of ROS in middle-aged rats were the NADPH oxidase and uncoupled NO synthase (Figure 3A). Furthermore, a 30% decrease in eNOS expression was demonstrated by Western-blot

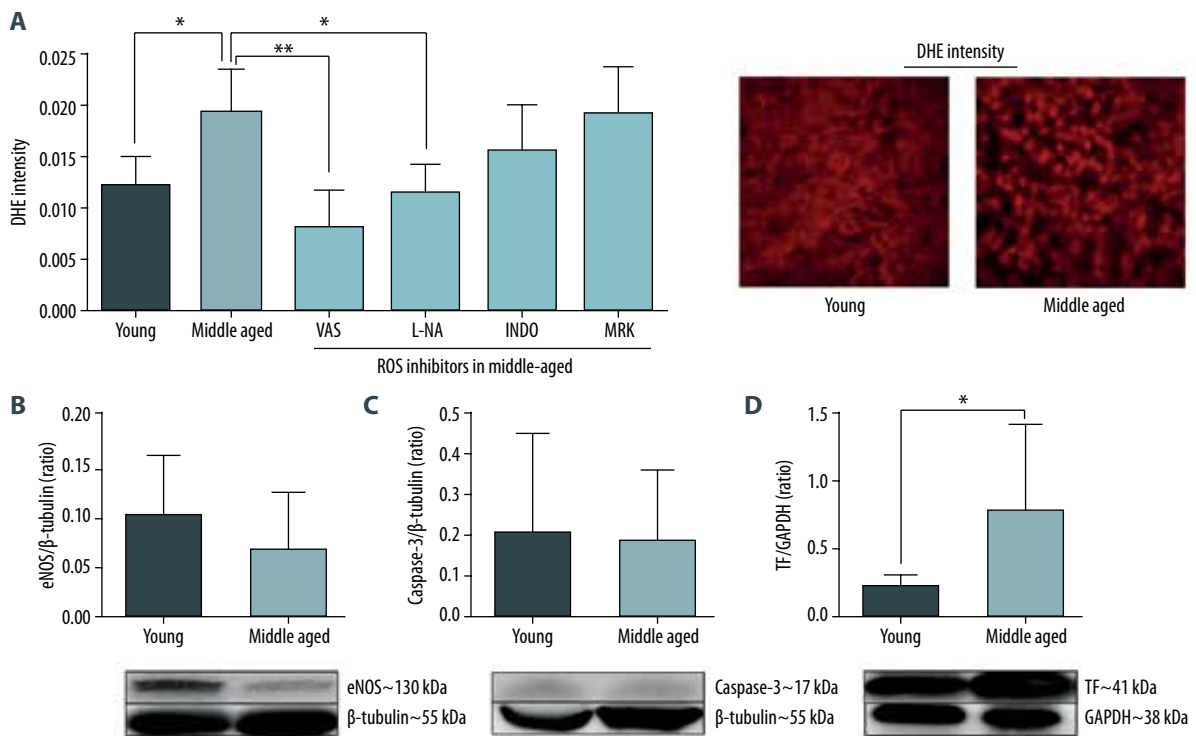
in the pancreas lysates from middle-aged rats compared to young rats (Figure 3B). Interestingly, no modification in activated caspase-3 levels could be established between young and middle-aged samples, thereby excluding apoptosis induction in the older pancreases (Figure 3C). In addition, a significant 4-fold upregulation of TF expression was evidenced, suggesting enhanced thrombogenicity and inflammation (Figure 3D).

Senescence markers were significantly upregulated among aged individuals with a doubled p53 expression, along with a seven-fold increase in cyclin-dependent kinase inhibitor protein p21, and a three-fold rise in its downstream p16 effector, as previously demonstrated [24] (Figure 4).

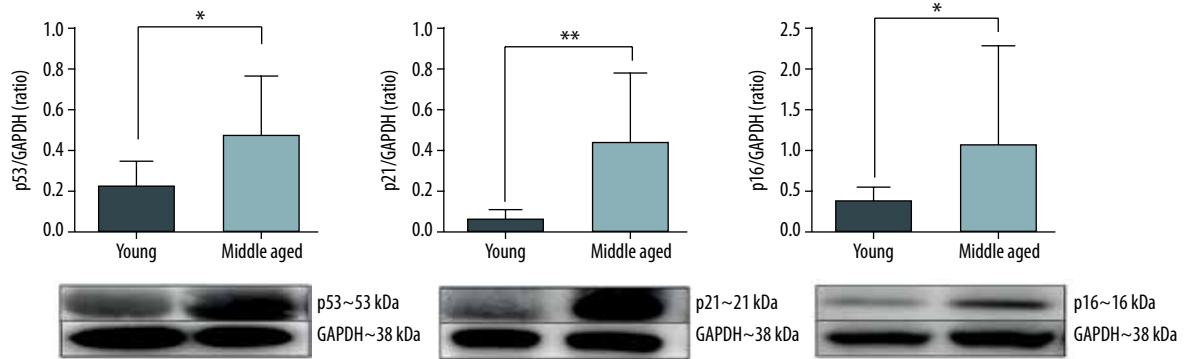




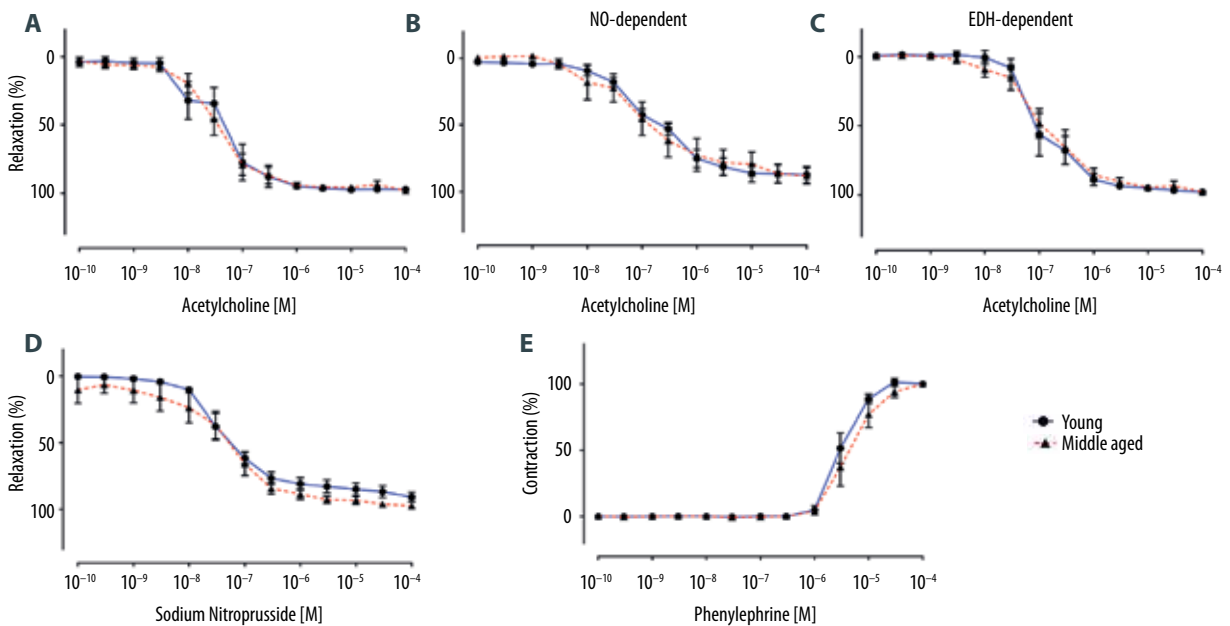
**Figure 2.** IPGTT, plasma glucose and insulin concentrations: (A) Intra-peritoneal glucose tolerance test IPGTT: glucose was measured in blood samples obtained from the tail vein using a glucometer in fasting rats. (B) Plasma glucose concentration was assessed by hexokinase spectrophotometry method. Insulin concentration was established by ELISA kit (Millipore cat# EZRMI-13K) using samples drawn by heart puncture at the time of sacrifice. Results expressed as mean  $\pm$ SEM of eight rats per group, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 3.** Expression of oxidative stress in pancreas tissues: (A) *In situ* ROS accumulation measured by fluorescent immunohistochemistry using the redox-sensitive probe dihydroethidium and sources of ROS investigated by pharmacological inhibition for 30 minutes using VAS-2078 (NADPH oxidase), L-NA (NO synthase inhibitor), indomethacin (cyclooxygenases COX), and MRK (inhibitors of mitochondrial respiration chain) incubated on sections, using confocal laser-scanning microscope (Confocal Leica TSC SPE) magnification 20 $\times$ . (B) Markers of oxidative stress, eNOS; (C) markers of apoptosis, cleaved caspase-3; and (D) markers of inflammation, TF, were measured by Western blot (lower panel representative blot, upper panel cumulative data). Quantification of red fluorescence as well as that of chemiluminescence as a ratio of protein of interest/housekeeping protein levels (GAPDH or  $\beta$ -Tubulin) performed by ImageJ software. Results expressed as means  $\pm$ SEM of eight rats per group, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 4.** Expression of senescence markers in pancreatic tissues. The senescence markers p53, p21, and p16 were measured by Western blot (lower panel representative blot, upper panel cumulative data). Quantification of chemiluminescence as a ratio of protein of interest/housekeeping protein levels (GAPDH) performed by ImageJ software. Results are expressed as means  $\pm$ SEM of eight rats per group, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 5.** No variation of vascular reactivity of the secondary mesenteric artery. Concentration-relaxation curves to acetylcholine in mesenteric artery rings with endothelium in young rats and middle-aged rats. (A) Global relaxation in presence of acetylcholine. (B) NO component of relaxation assessed in the presence of indomethacin (10  $\mu$ M) and apamin plus charybdotoxin (100 nM each). (C) EDH component in the presence of indomethacin and L-NA (300  $\mu$ M). (D) Relaxation resulted from sodium nitroprusside (an exogenous donor of NO). (E) Contraction occurred in presence of phenylephrine. Results are shown as mean  $\pm$ SEM of eight different rats.

### Endothelial-dependent vascular reactivity and circulating MPs level were unmodified in middle-aged rats

Acetylcholine caused similar concentration-dependent relaxations in mesenteric arterial rings from young rats and middle-aged rats (Figure 5A). The NO component of the relaxation was assessed in the presence of indomethacin and charybdotoxin plus apamin to prevent the formation of vasoactive

prostanoids and endothelium-derived hyperpolarizing (EDH) (Figure 5B); the EDH-mediated component of relaxation was assessed in the presence of indomethacin plus L-NA (an inhibitor of eNOS) (Figure 5C). In both cases, no variation between the two groups could be established. In addition, the sodium nitroprusside, which is an NO donor, induced similar endothelium-independent relaxation in both groups (Figure 5D). Phenylephrine-induced contraction reached identical ranges

**Table 1.** Characterization of circulating MPs in young and middle-aged rats.

Plasma MPs concentration (nM Phtdser EQ.)	Young	Middle-Aged
CD61 +	1.23±0.11	1.03±0.18
CD45 +	0.68±0.09	0.61±0.13
CD54 +	0.43±0.04	0.36±0.06
CD245 +	0.36±0.05	0.26±0.08
Total MPs	5.08±0.23	4.53±0.43

CD 61 (platelet); CD 45 (leucocyte); CD 54 (leucocyte and endothelial); and CD 245 (erythrocyte). Results expressed as means ±SEM of eight rats per group.

in mesenteric artery rings from young rats and middle-aged rats (Figure 5E). Because premature senescence is not a feature of vascular tissues under condition of protective laminar flow, we assessed circulating MPs as plasma surrogates of an eventual vascular damage. In young rats and middle-aged rats, total MPs levels remained similar 5.08±0.23 vs. 4.53±0.43 nM PhtdSer EQ. respectively and no variation in the concentration of each MPs subpopulation from platelet, leucocyte, erythrocyte, or endothelial cell origin could be observed (Table 1).

## Discussion

In this study, we report the first experiment aiming to simultaneously compare the effect of age in the pancreas and in vascular tissues. By studying islet morphology and function, we found that larger islets were twice as frequent in young rats versus middle-aged rats. In addition, β-cells/islets area ratios were decreased significantly with age. The latter observation is in accordance with other studies that showed a decrease in β-cell mass and proliferation simultaneous to an increase in β-cell apoptosis [8,25–28]. A shift in glucose response was shown by IPGTT at 15–30 minutes with age, together with a significant increase in plasma insulin concentration. Altogether, our morphological and histological data were in accordance with other reports showing the impact of age on the ratio of α-cells to β-cells area [29].

Interestingly, our data demonstrated that in pancreatic tissue p53, p21, and p16 senescence markers were overexpressed, oxidative stress increased by ROS production, and eNOS down-expression, in middle-aged rats. Although a significant over-expression of TF was measured in the pancreas, no sign of vascular injury by MPs measurement, or of vascular dysfunction by contraction or relaxation studies in mesenteric artery rings, could be detected.

Our findings showed no difference in PSA-NCAM expression by β-cells between young rats and middle-aged rats, in accordance with the report of Gu et al. who could detect a significant 50% decrease in β-cell proliferation only in two years old rats by PCNA (anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen) labeling [29].

### Oxidative stress as an early inducer of senescence in pancreas of middle-aged rats

Although our data showing early senescence in the pancreas of middle-aged rats were obtained by global assessment in the pancreas lysates, it is tempting to speculate that islet dysfunction is at least in part driven by senescence. Our data indeed confirm and extend the previous observation by Liu et al. [24] showing an upregulation of p16 in the isolated islets from adult rats and the presence of SA-βgal activity only in the endocrine pancreatic tissue. Since no apoptosis could be detected by active caspase-3 labeling in the pancreas lysates, senescence appears a mechanism specifically prompted in the middle-aged rat pancreas.

Our data suggests an excessive production of ROS in middle-aged rat pancreas is driven by NADPH oxidase that is not counter-balanced due to the reduced expression of functional eNOS. Therefore, excessive oxidative stress seems to trigger early senescence in the pancreas while no evidence of oxidative stress-driven endothelial dysfunction could be evidenced in macro-vessels such as mesenteric arteries.

### The pancreas served as an early sensor of oxidative stress and senescence, before any sign of vascular injury in middle-aged rats

Our data on pancreatic function correlated with modified islet morphology occurring in middle-aged rats. In accordance with a previous report by Liu et al. [24], IPGTT assays showed an early alteration in glucose control, which we found concomitant with the occurrence of smaller, collagen-surrounded islets characterized by lower insulin and higher glucagon labeling, yet occurring to a smaller but significant extent. Furthermore, variations of glucose and insulin blood concentrations were highly suggestive of an early insulin resistance in middle-aged rats.

Most interestingly, while pancreas function was initially altered, vascular damage could not be evidenced in middle-aged rats when assessed in mesenteric arteries. In particular, accumulation of oxidative stress and the higher expression of thrombogenic and senescence markers, all widely recognized as a pattern of vascular dysfunction, were solely detected in the pancreatic tissue. Because early endothelial alteration could have remained limited and undetectable by vascular reactivity assays or Western blot analysis, we also investigated circulating MPs as surrogates of vascular damage or thrombogenicity.

Again, no significant variation in MPs levels from endothelial platelets or leucocyte origin could be shown between young rats and middle-aged rats.

This observation is of prime importance related to pancreas transplantation and in the context of islet transplantation, owing to the limited availability of organs. Indeed, in the latter case, allocated islets are generally isolated from elder grafts with presumed higher tissue damage and oxidative stress, with possible impact on three years post-transplantation insulin independence [30] and on delayed graft function in several cases.

Our data suggest that oxidative stress and consecutive senescence may become a therapeutic target in islet graft pre-conditioning, where multiple cellular lineages, like endothelial progenitor cells, contribute to islet protection [31] or constitute a local immunoprivileged site, like mesenchymal stem cells [32]. Because a variety of studies have shown that senescent cell burden is increased in aged tissues, further studies on the underlying mechanisms specifically favoring the early development of senescence in the pancreas of middle-aged individuals and to link cellular senescence to the pathogenesis of diabetes are needed [33].

In islet and pancreas transplantation, senescence would favor the progression of age-related dysfunction [34,35]. Therefore senescent cell clearance could have major benefits to human health

span and lifespan [36]. The development of new protective strategies during pancreas or islet transplantation will further rely on the identification of senescence pathways and on the characterization of reliable sensors of pancreas and islet senescence.

## Conclusions

The novelty of the present work is that it indicates the pancreas as an early sensor of age-related organ dysfunction before any sign of vascular disease or dysfunction in middle-aged individuals, and related to senescence-associated organ dysfunction. This observation may be of importance for a better outcome in pancreas or islet transplantation and suggests further prospects in islet preconditioning.

## Acknowledgments


Authors are indebted to Fatiha Zobairi and Blandine Yver from EA7293 for expert MP measurement, to Pr. Nelly Boehm and Dr. Brigitte Samama from the Institute of histology University of Strasbourg, for continuous assistance in histology experiments, to Romain Vauchelle from the Faculty of Pharmacy for confocal microscopy and image analysis (PIQ platform) and to Brigitte Pollet for expert assistance in vascular reactivity studies.

## References:

1. Heinbokel T, Hock K, Liu G et al: Impact of immunosenescence on transplant outcome. *Transpl Int*, 2013; 26(3): 242–53
2. Marino G, Lopez-Otin C: Autophagy and aging: new lessons from progeroid mice. *Autophagy*, 2008; 4(6): 807–9
3. Rajawat YS, Hilloti Z, Bossis I: Aging: Central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing Res Rev*, 2009; 8(3): 199–213
4. Campisi J, d'Adda di Fagnana F: Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007; 8(9): 729–40
5. Chkhotua A, Shohat M, Tobar A et al: Replicative senescence in organ transplantation-mechanisms and significance. *Transpl Immunol*, 2002; 9(2–4): 165–71
6. Tokuyama Y, Sturis J, DePaoli AM et al: Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*, 1995; 44(12): 1447–57
7. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K et al: Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 1999; 48(4): 927–32
8. Gong Z, Muzumdar RH: Pancreatic function, type 2 diabetes, and metabolism in aging. *Int J Endocrinol*, 2012; 2012: 320482
9. Michiels C: Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*, 2003; 196(3): 430–43
10. Lacraz G, Giroix MH, Kassis N et al: Islet endothelial activation and oxidative stress gene expression is reduced by IL-1Ra treatment in the type 2 diabetic GK rat. *PLoS One*, 2009; 4(9): e6963
11. Lyons D, Roy S, Patel M et al: Impaired nitric oxide-mediated vasodilatation and total body nitric oxide production in healthy old age. *Clin Sci (Lond)*, 1997; 93(6): 519–25
12. Tanabe T, Maeda S, Miyauchi T et al: Exercise training improves ageing-induced decrease in eNOS expression of the aorta. *Acta Physiol Scand*, 2003; 178(1): 3–10
13. Yoon HJ, Cho SW, Ahn BW, Yang SY: Alterations in the activity and expression of endothelial NO synthase in aged human endothelial cells. *Mech Ageing Dev*, 2010; 131(2): 119–23
14. Shaik S, Wang Z, Inuzuka H et al: Endothelium aging and vascular diseases biochemistry. In: *Genetics and Molecular Biology "Senescence and Senescence-Related Disorders"*. Wang Z, Inuzuka H (eds.), 2013; 2013-02-20
15. Morel O, Morel N, Jesel L et al: Microparticles: A critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol*, 2011; 33(5): 469–86
16. Gleizes C, Constantinescu A, Abbas M et al: Liraglutide protects Rin-m5f beta cells by reducing procoagulant tissue factor activity and apoptosis prompted by microparticles under conditions mimicking Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction. *Transpl Int*, 2014; 27(7): 733–40
17. Gleizes C, Kreutter G, Abbas M 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): 231–42
18. Amabile N, Cheng S, Renard JM et al: Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur Heart J*, 2014; 35(42): 2972–79
19. Zgheer F, Alhosin M, Rashid S et al: Redox-sensitive induction of Src/PI3-kinase/Akt and MAPKs pathways activate eNOS in response to EPA: DHA 6: 1. *PLoS One*, 2014; 9(8): e105102
20. Abbraldes JG, Iwakiri Y, Loureiro-Silva M et al: Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006; 290(5): G980–87
21. Idris Khodja N, Chataigneau T, Auger C et al: Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: Role of oxidative stress and the angiotensin system. *PLoS One*, 2012; 7(2): e32039
22. Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM et al: Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*, 2004; 2(10): 1846–47

23. Karaca M, Castel J, Tourrel-Cuzin C et al: Exploring functional beta-cell heterogeneity *in vivo* using PSA-NCAM as a specific marker. *PLoS One*, 2009; 4(5): e5555
24. Liu Y, Shi S, Gu Z et al: Impaired autophagic function in rat islets with aging. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 2013; 35(5): 1531-44
25. Maedler K, Schumann DM, Schulthess F et al: Aging correlates with decreased beta-cell proliferative capacity and enhanced sensitivity to apoptosis: A potential role for Fas and pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes*, 2006; 55(9): 2455-62
26. Gunasekaran U, Gannon M: Type 2 diabetes and the aging pancreatic beta cell. *Aging*, 2011; 3(6): 565-75
27. Helman A, Avrahami D, Klochendler A et al: Effects of ageing and senescence on pancreatic beta-cell function. *Diabet Obes Metab*, 2016; 18(Suppl.1): 58-62
28. De Jesus DF, Kulkarni RN: Epigenetic modifiers of islet function and mass. *Trends Endocrinol Metab*, 2014; 25(12): 628-36
29. Gu Z, Du Y, Liu Y et al: Effect of aging on islet beta-cell function and its mechanisms in Wistar rats. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 2012; 34(6): 1393-403
30. Ryan EA, Paty BW, Senior PA et al: Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*, 2005; 54(7): 2060-69
31. Cantaluppi V, Biancone L, Figliolini F et al: Microvesicles derived from endothelial progenitor cells enhance neoangiogenesis of human pancreatic islets. *Cell Transplant*, 2012; 21(6): 1305-20
32. Ben Nasr M, Vergani A, Avruch J et al: Co-transplantation of autologous MSCs delays islet allograft rejection and generates a local immunoprivileged site. *Acta Diabetol*, 2015; 52(5): 917-27
33. Waaijer ME, Parish WE, Strongitharm BH et al: The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age. *Aging Cell*, 2012; 11(4): 722-25
34. Palmer AK, Tchkonja T, LeBrasseur NK et al: Cellular senescence in type 2 diabetes: A therapeutic opportunity. *Diabetes*, 2015; 64(7): 2289-98
35. Verzola D, Gandolfo MT, Gaetani G et al: Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008; 295(5): F1563-73
36. Tchkonja T, Zhu Y, van Deursen J et al: Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*, 2013; 123(3): 966-72

# Endothelial microparticles released by activated protein C protect beta cells through EPCR/PAR1 and annexin A1/FPR2 pathways in islets

Guillaume Kreutter <sup>a</sup> , Mohamad Kassem <sup>a, b</sup>, Ali El Habhab <sup>a, b</sup>, Philippe Baltzinger <sup>a, c</sup>, Malak Abbas <sup>b</sup>, Julie Boisrame-Helms <sup>a, f</sup>, Lamia Amoura <sup>a, b</sup>, Jean Peluso <sup>e</sup>, Blandine Yver <sup>a</sup>, Zobairi Fatiha <sup>a</sup>, Geneviève Ubeaud-Sequier <sup>a, d, e, #</sup>, Laurence Kessler <sup>a, c, #</sup>, Florence Toti <sup>b, #, \*</sup>

<sup>a</sup> EA7293, Vascular and Tissular Stress in Transplantation, Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, Illkirch, France

<sup>b</sup> UMR7213 CNRS, Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch, France

<sup>c</sup> Department of Diabetology, University Hospital, CHU de Strasbourg, 1 place de l'Hôpital, Strasbourg Cedex, France

<sup>d</sup> Department of Pharmacy-sterilization, University Hospital, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>e</sup> UPS1401- Plateforme eBiocyte, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch, France

<sup>f</sup> Department of Anesthesia-Reanimation, University Hospital, CHU de Strasbourg, 1 place de l'Hôpital, Strasbourg Cedex, France

Received: November 28, 2016; Accepted: March 12, 2017

## Abstract

Islet transplantation is associated with early ischaemia/reperfusion, localized coagulation and redox-sensitive endothelial dysfunction. In animal models, islet cytoprotection by activated protein C (aPC) restores islet vascularization and protects graft function, suggesting that aPC triggers various lineages. aPC also prompts the release of endothelial MP that bear EPCR, its specific receptor. Microparticles (MP) are plasma membrane procoagulant vesicles, surrogate markers of stress and cellular effectors. We measured the cytoprotective effects of aPC on endothelial and insulin-secreting Rin-m5f  $\beta$ -cells and its role in autocrine and paracrine MP-mediated cell crosstalk under conditions of oxidative stress. MP from aPC-treated primary endothelial (EC) or  $\beta$ -cells were applied to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated Rin-m5f. aPC activity was measured by enzymatic assay and ROS species by dihydroethidium. The capture of PKH26-stained MP and the expression of EPCR were probed by fluorescence microscopy and apoptosis by flow cytometry. aPC treatment enhanced both annexin A1 (ANXA1) and PAR-1 expression in EC and to a lesser extent in  $\beta$ -cells. MP from aPC-treated EC (eM<sub>aPC</sub>) exhibited high EPCR and annexin A1 content, protected  $\beta$ -cells, restored insulin secretion and were captured by 80% of  $\beta$  cells in a phosphatidylserine and ANXA1-dependent mechanism. eMP activated EPCR/PAR-1 and ANXA1/FPR2-dependent pathways and up-regulated the expression of EPCR, and of FPR2/ALX, the ANXA1 receptor. Cytoprotection was confirmed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated rat islets with increased viability (62% versus 48% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), reduced apoptosis and preserved insulin secretion in response to glucose elevation (16 versus 5 ng/ml insulin per 10 islets). MP may prove a promising therapeutic tool in the protection of transplanted islets.

**Keywords:** Islets transplantation • microvesicles • activated protein C • annexin A1 • endothelium •  $\beta$ -cells • beta cells

## Introduction

Protein C is the circulating zymogen of aPC, an anticoagulant serine protease generated at the endothelial surface by thrombin-mediated

cleavage of the bound PC [1]. aPC exerts its dual property in the preservation of vascular integrity and function not only by limiting thrombin generation through the proteolytic inactivation of factors Va and VIIIa but also by acting as an endothelial cytoprotector triggering the protease-activated receptor 1 (PAR-1)-mediated anti-inflammatory and anti-apoptotic pathways [2]. When bound to its specific

<sup>#</sup>Equal contribution

\*Correspondence to: Florence TOTI  
E-mail: toti@unistra.fr



endothelial receptor (EPCR), aPC behaves as a PAR-1-biased ligand through a specific cleavage at arginine 46.

Because endothelial damage is a prime sensor of ischaemia–reperfusion and a potential inducer of procoagulant and pro-inflammatory responses, several pre-clinical and clinical studies have investigated the interest of aPC in organ failure and examined the mechanism by which aPC protects the vessel and therefore the organ perfusion and function [3]. Notably, new engineered aPC molecules, lacking anticoagulant properties but with high cytoprotective abilities, have entered a clinical trial aiming at showing neuroprotective effects in ischaemic brain stroke [4, 5].

Pancreatic islet transplantation by portal vein infusion is a cell therapy often associated with an early and acute form of ischaemia–reperfusion termed IBMIR (Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction) that causes the destruction of ~70% of the graft within the first 48 hrs [6]. Ischaemia is the consequence of the islet isolation that abolishes blood supply, while islet infusion through the portal vein triggers reperfusion damages before islets' full engraftment at the extremity of the secondary liver vessels [7, 8]. Infused islets and residual exocrine cells from the islet preparation trigger platelet activation, thrombin generation, the initiation of the complement cascade, the production of ROS and cytokines by leukocytes recruited at the vicinity of the islets [7, 9–11]. Under such pro-inflammatory conditions, the expression of tissue factor (TF), the cellular initiator of coagulation, is induced in leukocytes, endothelial and also insulin-secreting cells that all shed MP bearing the active form of TF thereby promoting coagulation close to the islets [10, 12, 13]. MP are plasma membrane vesicles released in response to a variety of cellular stress like inflammation or apoptosis [14]. MP expose or contain active proteins, lipids, mRNAs and act as cellular effectors between vascular cells or pancreatic cells [15, 16]. Regardless of the eventual presence of TF, all MP are procoagulant because they expose phosphatidylserine, an anionic phospholipid that constitutes the catalytic surface for blood coagulation complexes and that potentiates TF activity [14].

The initial interactions of the islets with the hepatic endothelium and vascular cells are crucial to islet engraftment [17, 18]. Indeed, the oxygen pressure decreases along the liver lobule making liver endothelial cells (EC) highly sensitive to oxidative stress and endothelial barrier exchanges pivotal for the maintenance of the microvessel function [19]. After transplantation, the restoration of the endothelial lining of the intra-islet capillary, which is mainly supported by the recipient's endothelial and progenitor cells, is key to islets' revascularization and function. Indeed, the islet capillary network presents an important proportion of highly fenestrated microvascular ECs that are involved not only in blood supply to endocrine cells, but that also affect adult  $\beta$ -cells function, that is insulin secretion [17, 18].

MP from progenitor ECs favour endothelial cell recruitment within the islet [20]. The possibility of a MP-driven cell crosstalk between endothelial and insulin-secreting  $\beta$ -cells within the liver vessels is supported by recent *in vitro* data showing that a suspension of MP and exosomes harvested from isolated islets modifies endothelial cell responses [17].

Most studies have examined the noxious MP properties and very few investigated their eventual beneficial effects. Interestingly, neutrophil and endothelial-derived MP were identified as shuttles for

annexin A1 (ANXA1), an anti-inflammatory lipocortin possibly involved in MP-driven cytoprotection [21, 22]. ANXA1 is a 37-kD member of the  $\text{Ca}^{2+}$  and phospholipid binding protein, superfamily that when secreted mainly binds to its formyl peptide receptors (FPR) [23–25]. Interestingly, MP released from aPC-treated ECs were reported cytoprotective. They bear the EPCR, the specific receptor of aPC, and deliver aPC to target ECs, thereby protecting them from pro-apoptotic and inflammatory mediators released during septic shock [26, 27].

Previous studies have underlined the interest of aPC in the preservation of islets from ischaemia–reperfusion during transplantation [28, 29] and underline a possible contribution of MP to the aPC-mediated beta cell cytoprotection. The mechanisms of aPC-mediated beta cell protection within the islet, which can be considered as the smallest functional architecture of the pancreas, remain yet unknown.

The aims of this study were (i) to evaluate the protective effect of aPC on beta cells in a model of ischaemia/oxidative stress under conditions mimicking IBMIR, (ii) to evaluate the effects of endothelial- and  $\beta$ -cell-derived MP released upon aPC treatment on naive beta cell function and survival (iii) to identify the eventual underlying mechanism of aPC-mediated beta cell cytoprotection.

## Materials and methods

### Rat $\beta$ Cell culture

Rat  $\beta$  cells, Rin-m5f (CRL-11605<sup>TM</sup>; ATCC, Manassas, VA, USA), were seeded at 125,000 cells/cm<sup>2</sup> in RPMI 1640 (PAN<sup>TM</sup> Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) medium containing 4.5 g/l glucose, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate and supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco, Saint Aubin, France) and 20  $\mu$ g/ml gentamycin (Lonza, Basel, Switzerland). Cells were cultured in 12-well culture plates at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere.

### Islets isolation

Rat islets were isolated by 1 mg/ml collagenase treatment (type XI; Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France) followed by density gradient separation (Ficoll; Sigma-Aldrich) as previously described [30].

Harvested islets were washed in RPMI-1640 medium containing 2 g/l glucose (PAN<sup>TM</sup> Biotech GmbH) and hand-picked. For optimal recovery of functional islets, each hundred recovered was maintained for 12 hrs in RPMI-1640 supplemented with 10% foetal calf serum, penicillin/streptomycin (100 UI/ml), in a Petri dish placed under humid 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C before any experimental procedure.

### Primary coronary artery EC

Pig hearts were collected from the local slaughterhouse (COPVIAL, Holtzheim, France), and primary coronary ECs were isolated from the left circumflex coronary arteries as previously described [31]. Briefly, left circumflex coronary arteries were excised from fresh heart, cleaned

of adhesive conjunctive tissues, and the remaining blood was flushed with cold phosphate-buffered saline (PBS) without calcium. ECs were isolated by collagenase treatment (type I, Worthington Biochemicals Corp., Lakewood, NJ, USA) at 1 mg/ml for 12 min. at 37°C. ECs were cultured in Petri dishes containing MCDB 131 medium (Life Technologies SAS, St Aubin, France) and 15% foetal calf serum supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml), amphotericin B (250 mg/ml) and L-glutamine (2 mM, all from Lonza, Levallois-Perret, France) and grown for 48–72 hrs (passage 0).

## MP generation, harvest and quantification

MP were harvested under sterile conditions from the supernatants of either young P1 ECs (eMP<sub>aPC</sub>) or Rin-m5f  $\beta$  cells ( $\beta$ MP) submitted to a 70 nM aPC treatment during 24 hrs (Xigris<sup>®</sup>, Lilly). Floating apoptotic cells and debris were first discarded (800 g 15 min.) and MP washed in Hanks balanced salt solution (HBSS) and concentrated by a double-centrifugation step (14,000 g, 1 hr). Washed MP were kept at 4°C for not more than 3 weeks. For control purposes, endothelial MP (eMP<sub>CTRL</sub>) were harvested from the supernatant of untreated ECs and isolated using the same procedure.

Total MP concentration was determined by prothrombinase assay as previously described. Briefly, MP captured onto insolubilized annexin A5 were incubated with blood clotting factors (FXa, FVa, FII) and CaCl<sub>2</sub>. Conversion of prothrombin to thrombin was revealed by a chromogenic substrate, using a spectrophotometric reader set at 405 nm. Results were expressed as nanomolar PhSer equivalent (nM PhSer eq.) by reference to a standard curve constructed using liposomes of known concentration and PhSer eq. proportion [14].

## Endothelial and $\beta$ cell MP-mediated crosstalk under oxidative stress in cells and islets

Rin-m5f rat insulin-secreting cells were chosen as an adequate model for the study of the  $\beta$  cell response to prolonged oxidative stress and hyperglycaemia. Indeed, although not responsive to a short metabolic raise by glucose stimulation, Rin-m5f develop apoptosis after prolonged exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [32].

When endothelial or Rin-m5f cells reached 70% of confluency, they were treated by 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to mimic the conditions of oxidative stress during islet ischaemia (Sigma-Aldrich), as reported elsewhere [13]. Cell supernatants were collected 24 hrs after induction of the oxidative stress, MP isolated as above and the MP-depleted supernatant was kept at 4°C for less than 1 month under sterile conditions for control purposes.

In MP-mediated crosstalk cellular models, endothelial or  $\beta$ -cell-derived washed MP were pre-incubated with Rin-m5f during 6 hrs before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (100  $\mu$ M). In some experiments, pre-treatment by 50 nM aPC was performed 4 hrs before application of the oxidative stress eventually combined to eMP.

MP-mediated crosstalk within the islets was assessed 12 hrs after their isolation and culture in RPMI containing 2 g/l glucose and supplemented with 10% foetal calf serum. 20 nM PhSer eq. eMP or eMP<sub>aPC</sub> were added to each 20 islet suspension, 12 hrs before addition of 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In some crosstalk experiments, signalling pathways were inhibited by pharmacological treatment of the MP-targeted cells. Phosphoinositide 3

kinase A (PI3K) was inhibited by 10  $\mu$ M LY294002 (Tocris, Lille, France) incubated 1 hr prior addition of endothelial-derived MP (20 nM PhSer eq.). Similarly, PAR-1 was blocked by pre-incubation with 10  $\mu$ g/ml ATAP2 antibody (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) as previously described [33]. Inhibition of the ALX/Formyl peptide receptor 2 (FPR2) was performed by continuous exposure to 10  $\mu$ M WRW4 (Tocris).

## Quantification of apoptosis in cell lineages and islets

Rinm-5F cells were washed and permeabilized by a 70% ethanol solution at 4°C for at least 24 hrs. After three washing steps, cells were resuspended in a solution containing I-A RNase A (Sigma-Aldrich) for 15 min. at 37°C. Saturating concentration of propidium iodide (Sigma-Aldrich) was applied (0.1 mg/ml) and the degree of apoptosis evaluated by the quantification of hypodiploid DNA by flow cytometry (Guava; Merck-Millipore, Molsheim, France). Necrosis, early apoptosis and late apoptosis were defined by annexin A5/PI<sup>+</sup>, annexin A5/PI<sup>-</sup> and annexin A5/PI<sup>+</sup>, respectively. A total of 5000 cells were acquired for each individual sample.

In some experiments, apoptosis was measured in isolated islets using a modified procedure. Briefly, 20 islets were treated by 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 4 hrs. Islets were harvested and centrifuged (800 g, 5 min.) and further submitted to trypsin (Lonza) during 10 min. at 37°C before inactivation by addition of FCS allowing the complete dissociation of the islets' and recovery of the constitutive cells. Islet cells were further pelleted and resuspended in RPMI medium without foetal serum. Double staining by FITC-annexin A5 and propidium iodide (PI) was performed in the dark at 25°C for 15 min. (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Apoptosis was measured by flow cytometry (Guava, Merck-Millipore) using parameters set at linear gain as above.

## Insulin measurement

Insulin released in the conditioned medium of Rin-m5F cells or in islet suspension was assessed by ELISA according to the supplier recommendations using the Matrix protocol when foetal calf serum was present in the medium (ELISA Kit Rat/Mouse Insulin; Millipore).

## Kinetics of the endothelial MP capture by target beta cells and EPCR probing

Endothelial MP isolated from aPC-treated ECs (eMP<sub>aPC</sub>) were stained using the PKH26 red fluorescence lipid probe (Sigma-Aldrich) as described elsewhere, [13] and washed. 20 nM PKH26-stained MP were added to growing cells at 70 % confluency in fresh medium and incubated during 1–24 hrs. Cells were then washed, fixed in paraformaldehyde 4% and kept at 4°C before EPCR labelling or assessment of PKH26- stained target cells by flow cytometry (see below).

After three washings, a biotinylated anti-EPCR antibody (SantaCruz; dilution: 1:100, 1 hrs, RT) was added to the suspension. Washed cells were incubated with FITC-streptavidin (Sigma-Aldrich; dilution: 1:150, 1 hr, RT) and DAPI solution (5 min., 300 nM) control conditions were untreated  $\beta$ -cells (CTRL) and  $\beta$ -cells incubated with the secondary antibody (data not show). After washing and strip mounting, cells were



observed by fluorescent microscopy (Leica FW 4000,  $\times 40$  objective). At least nine random fields were analysed by sample. Results are expressed as the percentage of PKH26-labelled  $\beta$ -cells exhibiting the red MP fluorescence and as the green fluorescence intensity/ $\beta$ -cells reflecting the degree of EPCR expression on  $\beta$ -cells. Analysis was performed using ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Kinetics of the PKH26-stained MP capture by target cells was also assessed by measurement of red fluorescence in cells using a flow cytometer set at logarithmic gain (Becton-Dickinson, Pont-de-Claix, France). At least 5000 events were recorded for each sample.

## Pharmacological modulation of the interaction between MP and target cells

PKH26-stained MP (20 nM) were incubated for 1 hr at 37°C with 10  $\mu\text{g/ml}$  annexin A5, 20  $\mu\text{g/ml}$  antibody against annexin A1, or vehicle and washed before their addition to target cells (70 % confluency) eventually pre-incubated for 30 min. with 10  $\mu\text{g/ml}$  WRW4, an inhibitor of FPR2. Red cell fluorescence was measured after 6 hrs. At least 5000 cells were acquired for each individual sample.

## Protein expression in target cells

After treatment, cells were washed twice with PBS and then lysed in TRIS buffer containing protease inhibitors (5  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 5 mM benzamide) and 2% Triton<sup>®</sup> X-100 on ice. Total proteins (30  $\mu\text{g}$ ) were separated by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide (Sigma-Aldrich) gels as previously described (4). Blotting membranes (nitrocellulose, GE Healthcare, Amersham, UK, USA) were incubated with the different primary antibodies directed against mouse PAR-1 (SantaCruz; 1:1000 dilution), rabbit cleaved caspase 3, mouse iNOS, mouse annexin A1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, 1:1000 dilution), FPR2/ALX (Abcam, Cambridge USA, 1:1000) overnight at 4°C. Detection of  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich; 1:5000 dilution) or beta tubulin (Abcam; 1:1000) was used for normalization. After washing, membranes were incubated with the secondary anti-mouse IgG antibody (Cell Signaling Technology, 1:10 000 dilution) at room temperature for 60 min. Pre-stained markers (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, CA, USA) were used for molecular mass determinations. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham, GE Healthcare). Density analysis was performed using ImageQuant LAS 4000 imager (GE Healthcare).

## Measurement of aPC activity at cell and MP surface

The activity of aPC bound to the cell membrane or borne by the isolated MP and concentrated from the supernatant was assessed using a specific chromogenic substrate (S2366, Cryopec, Montpellier, France) as previously described [27]. In brief, cells were washed three times and incubated with 0.75 mM S2366 and absorbance was measured at 37°C using a spectrophotometer equipped with a kinetics software (Ver-samax, molecular Device, UK). aPC activity was calculated by reference to a standard curve (Xigris<sup>®</sup>, 0.2–30 nM). Results are expressed as nM aPC/100,000 cells and nM aPC / 10 nM MP.

## Measurement of oxidative stress in beta cells

The intracellular ROS concentration was detected by the redox-sensitive fluorescent probe dihydroethidium (DHE, Thermo Fischer, Illkirch, France), chosen for its high specificity for mitochondrial  $\text{O}_2^-$ . Cells were stained with DHE (5  $\mu\text{M}$ ) at 37°C in dark for 30 min. and examined by a fluorescence-activated cell sorter (FACScan; BD Biosciences) with excitation length at 480–535 nm and emission at length 590–610 nm. ROS-positive cells were detected by red fluorescence probing. At least 5000 cells were acquired for each individual sample [34].

## Islets viability

Twenty islets maintained in cell RPMI supplemented with 10 % SVF were treated during 6 hrs by 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , then washed by centrifugation (500 g, 5 min.) and incubated with fluorescein diacetate (0.67  $\mu\text{M}$ ) and propidium iodide (4  $\mu\text{M}$ ) before observation by fluorescent microscopy (Leica FW 4000,  $\times 20$  objective). Nine random fields were analysed per sample. Fluorescence intensity was analysed using the ImageJ software. Results are expressed as green intensity/islet surface unit. Data were obtained from four different islet preparations.

## Assessment of $\beta$ -cells function within the islets

Islets function was assessed by measuring insulin secreted in the suspension of 20 isolated islets challenged by a 10-fold elevation in glucose concentration. Islets were pre-incubated for 2 hrs in Krebs solution containing 100 nM HEPES, 0.5 mg/ml human albumin, 2.5 mM glucose. Aliquots from the incubation medium were taken to measure the insulin secreted at low glucose concentration. Islets were thereafter pelleted and re-suspended in Krebs solution containing 25 mM glucose and medium aliquots were taken after 1 hr 30. All samples were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until insulin measurement by ELISA. Data are expressed as ng/ml of insulin per 10 islets.

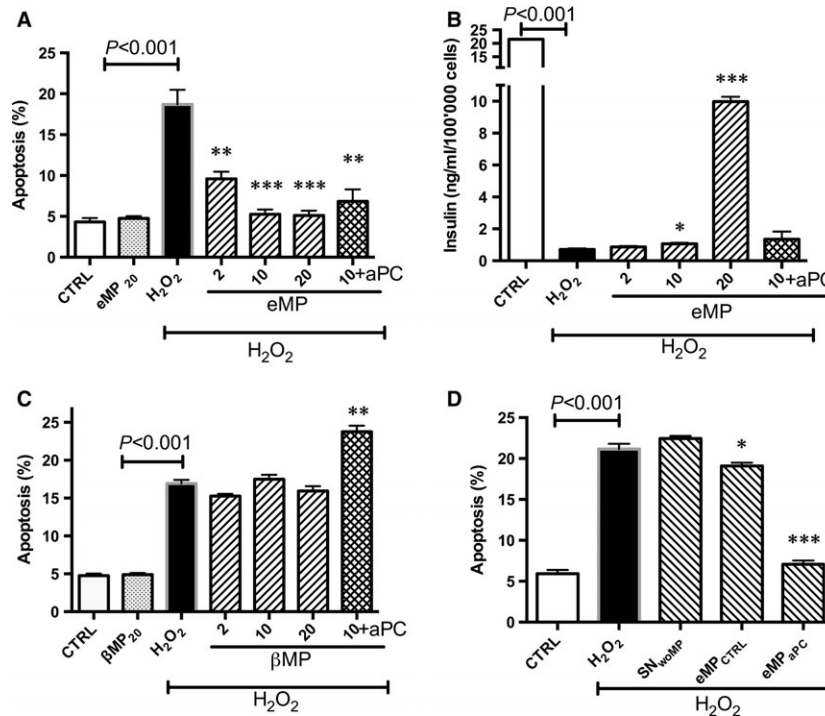
## Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M.) and analysed using GraphPad Prism5<sup>®</sup> Prism5 Graphpad Company, La Jolla, CA, USA. Statistical analysis between two groups was carried out using unpaired Student's *t*-test. A *P* value  $<0.05$  was considered significant. Experiments were performed at least in three separate experiments.

## Results

### aPC promotes the release of endothelial MP able to protect $\beta$ -cells against oxidative stress

An incubation with 20 nM endothelial MP (eMP<sub>aPC</sub>) harvested from aPC-treated ECs (ECs) prevented the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced  $\beta$ -cells apoptosis. The degree of apoptosis was reduced by threefolds ( $18.7 \pm 3.6\%$  versus  $5.1 \pm 1.2\%$ , Fig. 1A). The eMP<sub>aPC</sub>-mediated cytoprotective effect was confirmed by the prevention of the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced drastic



**Fig. 1** Effect of aPC alone or of aPC-generated microparticles on  $\beta$ -cells submitted to oxidative stress. (**A–B**)  $\beta$ -cells were pre-treated by aPC (70nM, 4 hrs) or endothelial cell-derived MP treated by aPC (eMP<sub>aPC</sub>, 6 hrs) before the 24 h-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Apoptosis was assessed by hypodiploid DNA labelling (**A**,  $n = 4$ ). Insulin secreted in supernatant was measured by ELISA (**B**,  $n = 4$ ). (**C**)  $\beta$ -cells were pre-treated with  $\beta$ -cells-derived MP (BMP) during 6 hrs before treatment by oxidative stress, in the absence or presence of 50 nM aPC (aPC  $n = 4$ ). (**D**)  $\beta$ -cells were treated by the supernatant of control untreated endothelial cells (SN<sub>wOMP</sub>) or by MP harvested from untreated resting endothelial cells (MP<sub>CTRL</sub>) during 6 hrs prior addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (aPC, activated protein C; CTRL, untreated cells; eMP, microparticles isolated from aPC-treated endothelial cells;  $\beta$ MP, microparticles from  $\beta$ -cells treated by aPC; PhSer eq., Phosphatidylserine equivalent). \* $P < 0.05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; \*\* $P < 0.01$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; \*\*\* $P < 0.001$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

drop in insulin secretion, concentrations in supernatant returning to significantly higher values from  $0.7 \pm 0.1$  ng/ml/100,000 cells in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated  $\beta$ -cells to  $10 \pm 0.5$  ng/ml/100,000 cells ( $P < 0.001$ ,  $n = 4$ , Fig. 1B). Of note, 20 nM eMP<sub>aPC</sub> were sufficient to mediate a cytoprotective effect that was not observed in  $\beta$ -cells treated by aPC alone (Fig. 1C). Furthermore, 50 nM aPC had no additive effect to eMP<sub>aPC</sub>, suggesting a specific eMP<sub>aPC</sub>-mediated cytoprotection. Importantly, aPC was not toxic to the  $\beta$ -cells (unchanged viability and absence of apoptosis, data not shown).

Because the effector abilities of MP vary with the cell and the agonist that have initiated their generation, we examined whether beta cell-derived MP ( $\beta$ MP<sub>aPC</sub>) generated by aPC treatment could also behave as autocrine effectors of  $\beta$ -cells. Conversely to eMP<sub>aPC</sub>,  $\beta$ MP<sub>aPC</sub> had no protective effect (Fig. 1C). Interestingly, the comparison between endothelial MP harvested from naive ECs (eMP<sub>CTRL</sub>) and those generated from aPC-treated ECs showed that eMP<sub>aPC</sub> were potent inhibitors of apoptosis, whereas prevention by eMP<sub>CTRL</sub> remained negligible ( $18.2 \pm 1\%$  apoptosis in eMP<sub>CTRL</sub>-treated versus  $21.2 \pm 0.7\%$  in untreated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated cells, Fig. 1D). Interestingly, treatment of  $\beta$ -cells by eMP-depleted supernatants obtained

after extensive centrifugation (14,000 g, 1 hr) did not lead to cytoprotection (MP+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $21.2 \pm 1.6\%$  versus SN+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $19.1 \pm 1$ ), thereby excluding the effect of a truly soluble effector, such as cytokines or exosomes, eventually present in the conditioned medium, and confirming a specific MP-driven response.

Altogether, these data indicate that endothelial-derived MP are specific effectors of  $\beta$ -cell cytoprotection and that treatment by aPC greatly enhances their ability.

### Kinetics of eMP<sub>aPC</sub> integration by $\beta$ -cells and transfer of functional EPCR

PKH26-labelled eMP<sub>aPC</sub> were incubated with  $\beta$ -cells during 1, 6 or 24 hrs. Their integration by the cell was probed by red fluorescence, and EPCR expression at  $\beta$ -cells surface was simultaneously followed using an anti-EPCR-biotinylated antibody. After 6-hrs incubation with eMP<sub>aPC</sub>, 32 % of the  $\beta$ -cells layer area showed red fluorescence, reaching a significant 74% plateau after 24 hrs that represented the maximal capture of the MP by  $\beta$ -cells ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$  versus MP-

untreated cells, Fig. 2B). EPCR expression, revealed by green fluorescence at  $\beta$ -cells surface, increased as early as 6 hrs after the addition of  $eMP_{aPC}$  ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$  versus untreated cells, Fig. 2C). Green and red fluorescences followed a similar time-curve, suggesting that  $eMP_{aPC}$  transfer EPCR to the target cell or early prompt its expression (Fig. 2).

At  $\beta$ -cells surface, the presence of detectable amounts of a functional EPCR able to bind aPC was supported by the measurement of a low but concentration-dependent aPC activity that remained, however, 10–15 times less than that quantified at the ECs surface ( $0.4 \pm 0.1$  eq nM aPC/100,000  $\beta$ -cells versus  $10.5 \pm 0.4$  nM aPC/100,000 ECs,  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ , Fig. 3A). Similarly, a functional EPCR borne by  $eMP_{aPC}$  was evidenced. Compared to  $eMP_{CTRL}$  harvested from aPC-untreated cells,  $MP_{aPC}$  bore a significantly  $\sim 20$ -fold greater aPC activity ( $eMP_{CTRL}$   $0.2 \pm 0.05$  nM aPC versus  $eMP_{aPC}$   $1.46 \pm 0.27$  nM aPC,  $P < 0.001$ ,  $n = 5$ , Fig. 3B).

### Interaction between $eMP_{aPC}$ and $\beta$ -cells is a phosphatidylserine- and annexin A1-dependent mechanism

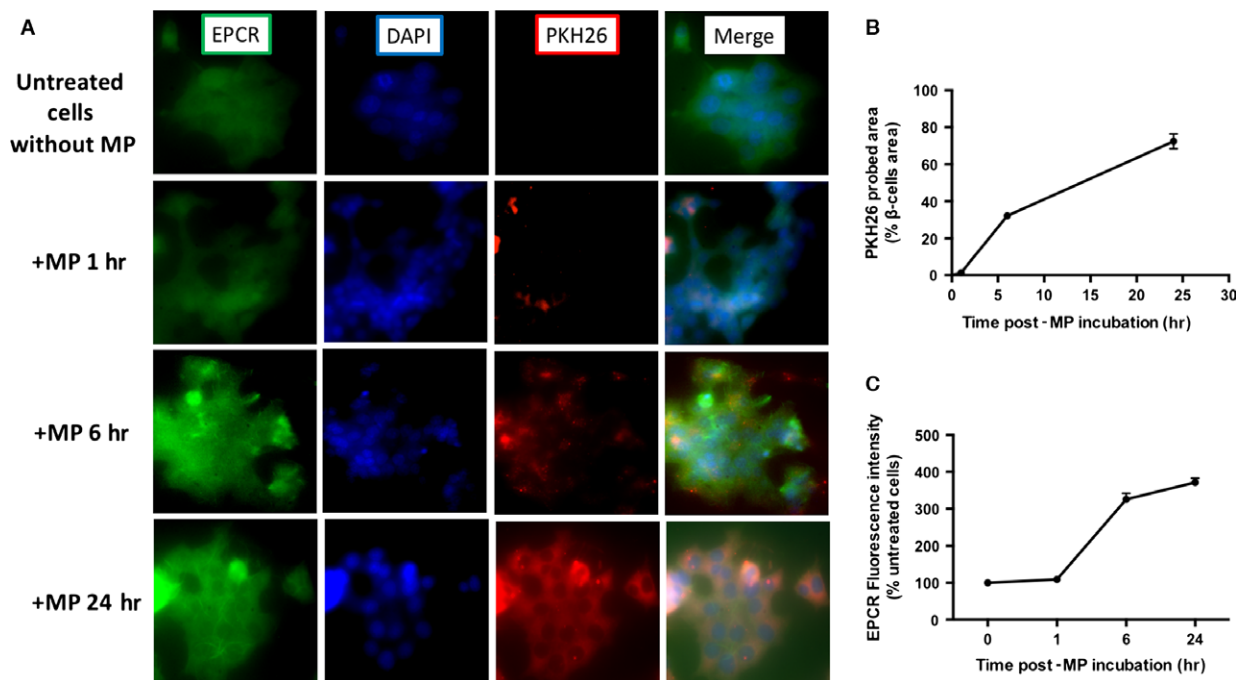
To better understand the mechanisms supporting  $eMP_{aPC}$  and  $\beta$ -cells interactions, PKH26-labelled  $eMP_{aPC}$  were pre-treated with annexin

A5, a protein with high affinity for phosphatidylserine, WRW4, an antagonist to FPR2/ALX or with an antibody directed against annexin A1, and further incubated with beta cells (Fig. 4). MP capture probed by the red fluorescence of beta cells was reduced by annexin A5 or by anti-annexin A1 antibodies, whereas the FPR2/ALX antagonist had no effect (annexin A5:  $22.5 \pm 1$  %; anti-ANXA1:  $29 \pm 2$  %, WRW4:  $38 \pm 1$  % of PKH26<sup>+</sup> cells versus  $40.5 \pm 2$  in control untreated cells,  $n = 4$ ). These data are strongly suggestive of phosphatidylserine- and ANXA1-dependent mechanisms governing the  $eMP$  integration in the target beta cells.

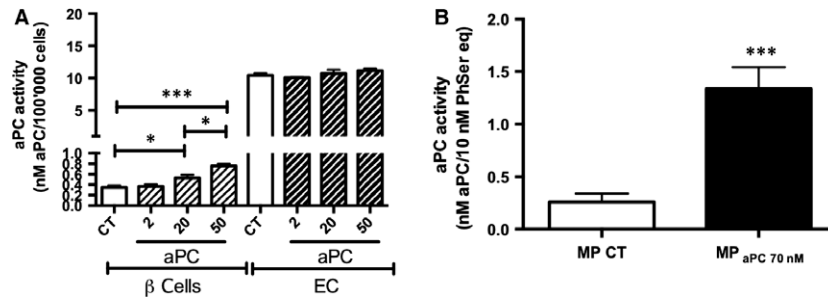
Interestingly, the basal expression of ANXA1 was barely detectable by Western blot in beta cells but was significantly higher in ECs. aPC up-regulated the endothelial ANXA1 by about 20% (Fig. 5B,  $P < 0.05$ ). The  $eMP_{aPC}$  ANXA1 content was significantly higher than that of  $eMP_{CTRL}$  (Fig. 5D,  $n = 3$ ). At the opposite, the basal PAR-1 expression in beta and ECs was comparable and was slightly enhanced by aPC. The PAR-1 content of  $eMP_{aPC}$  and  $eMP_{CTRL}$  was similar.

### $eMP$ protect beta cells by EPCR/PAR-1 and ANXA1/FPR2 pathways

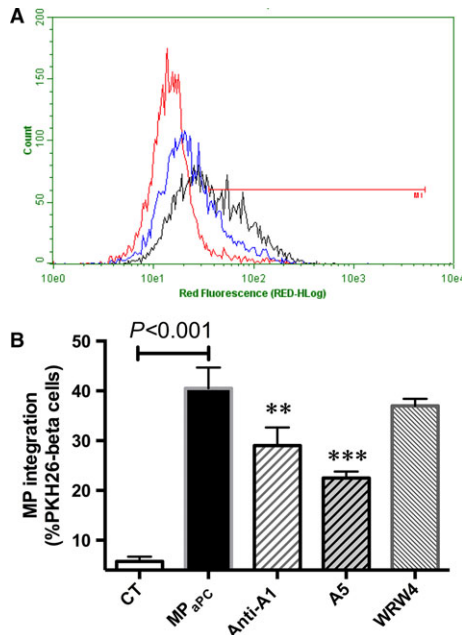
To further investigate the pathways involved in  $eMP$ -mediated beta cell cytoprotection, the cells were treated with different



**Fig. 2** Integration of  $eMP_{aPC}$  by  $\beta$ -cells and EPCR expression.  $\beta$ -cells were incubated during 1, 6, 24 hrs with PKH26-labelled endothelial  $eMP_{aPC}$  generated by aPC treatment, fixed and labelled with EPCR antibody and nuclei were labelled with DAPI. Representatives images of at least four independent experiments  $\times 40$  objective (A). (B) Integration of microparticles in  $\beta$ -cells. Results are expressed as the percentage of PKH<sup>+</sup> cells ( $n = 4$ ). (C) EPCR expression by fluorescence intensity using FITC labelling EPCR antibody in  $\beta$ -cells. Results expressed as fluorescence intensity/ $\beta$ -cells normalized with control of untreated cells without MP. Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$ ). (aPC, Activated protein C; EPCR, Endothelial protein C Receptor; MP, Microparticles; PFA, paraformaldehyde).



**Fig. 3** aPC activity at endothelial and  $\beta$ -cell surface after 24 hrs treatment (A) and by aPC-generated endothelial microparticles (B). Endothelial cells and  $\beta$ -cells were treated by aPC during 24 hrs. Harvested endothelial MP were washed and concentrated and their quantity measured by prothrombinase assay. aPC activity was assessed using a S2366 chromogenic substrate. (A) aPC activity expressed as nM aPC/100,000 cells ( $n = 3-4$ ). (B) aPC activity expressed as nM aPC/10 nM PhSer eq. ( $n = 5$ ). Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (aPC, activated protein C (Xigris<sup>®</sup>); CT, untreated cells;  $\beta$ MP,  $\beta$ -cells; EC, endothelial cells; eMP, endothelial MP; MP, microparticles; PhSer eq., phosphatidylserine equivalent. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).



**Fig. 4** Mechanism of eMP<sub>aPC</sub> integration by  $\beta$ -cells.  $\beta$ -cells pre-incubated with or without WRW4 (10  $\mu$ M 1 hr), a FPR2 antagonist were incubated during 6 hrs with PKH26-labelled eMP<sub>aPC</sub> pre-treated or not by 10  $\mu$ g/ml annexin A5 or 20  $\mu$ g/ml annexin A1 antibody for 1 hr. Incorporation was assessed by flow cytometry. (A) Representative cytogram of beta cells without MP (red), with MP (black) or with annexin A5 (blue). (B) Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$ . (CT, untreated cells; eMP<sub>aPC</sub>, cells treated by endothelial microparticles released after aPC treatment. \*\* $P < 0.01$  versus eMP<sub>aPC</sub>; \*\*\* $P < 0.001$  versus eMP<sub>aPC</sub>; † $P < 0.001$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ eMP<sub>aPC</sub>).

modulators (Fig. 6). Pre-incubation with a PAR-1 neutralizing antibody (ATAP2, SantaCruz, USA) partially reversed the eMP<sub>aPC</sub>-driven protective effect, and led to enhanced apoptosis

(eMP<sub>aPC</sub> .71  $\pm$  1% versus 13  $\pm$  2.1% in eMP<sub>aPC</sub>+ATAP2) suggesting a PAR1-dependent pathway. Similarly, pre-incubation of  $\beta$ -cells with WRW4 (10  $\mu$ M) partially reversed the eMP<sub>aPC</sub> cytoprotective effect. In addition, LY294002, a PI3 kinase inhibitor, totally abolished the eMP<sub>aPC</sub>-driven cytoprotection with a degree of apoptosis similar to the values observed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-challenged cells. These data suggest that PI3 kinase is a common step to the PAR-1 and annexin A1-mediated effects (eMP<sub>aPC</sub> : 7.1  $\pm$  1%; eMP<sub>aPC</sub>+ LY294002: 17.6  $\pm$  1.7%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells: 21.2  $\pm$  0.7%).

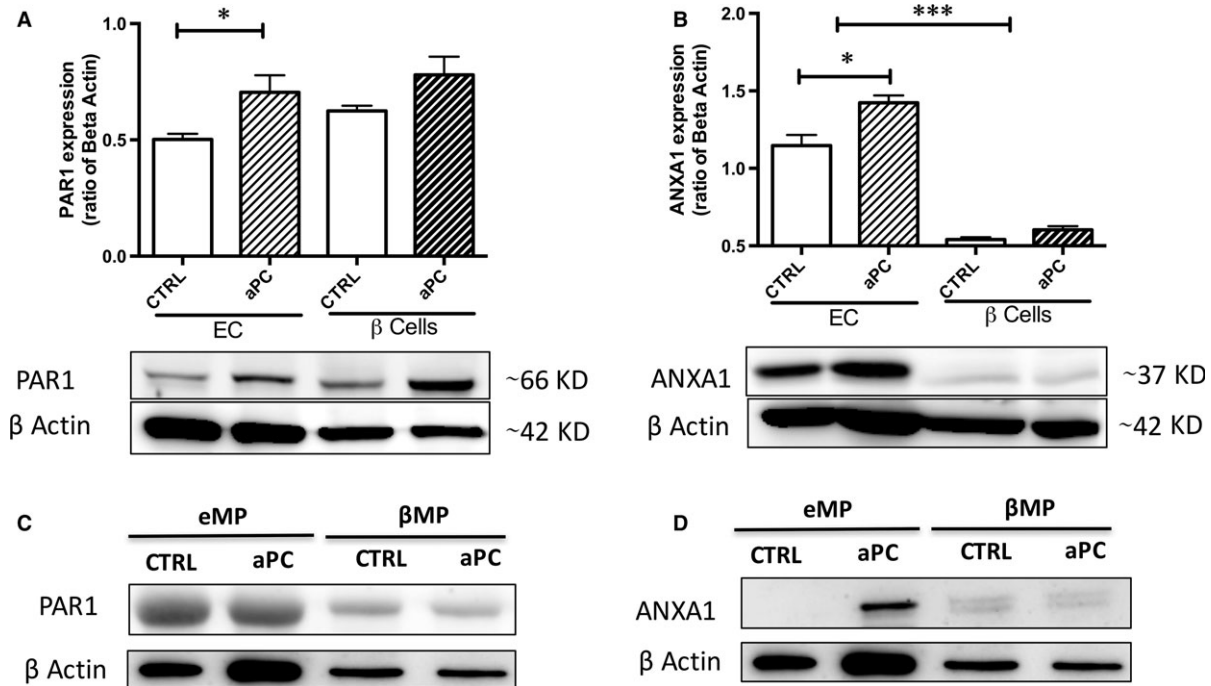
### eMP<sub>aPC</sub> up-regulate FPR2/ALX expression in $\beta$ -cells

To confirm the contribution of FPR2/ALX, we analysed its expression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated  $\beta$ -cells after 6 hrs. Whereas FPR2/ALX expression was low in control untreated and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated  $\beta$ -cells, Western blots showed that 20 nM eMP<sub>aPC</sub> prompted a significant sevenfold up-regulation of FPR2/ALX, suggesting a MP-driven effect ( $P < 0.01$ ,  $n = 4$ , Fig. 7).

### eMP<sub>aPC</sub> reduce markers of oxidative stress and apoptosis in $\beta$ -cells

We examined the oxygen species (ROS) content in eMP<sub>aPC</sub>-treated cells, in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The amount of ROS by DHE fluorescence was decreased by 20 nM eMP<sub>aPC</sub> (149.4  $\pm$  2.5 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells versus 120  $\pm$  4.7 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ MP treated cells (A.U.  $P < 0.01$ ,  $n = 4$ , Fig. 8A). Similarly, the expression of inducible NO synthase (iNOS) assessed by Western blot returned to baseline, suggesting its prime role in the eMP<sub>aPC</sub>-driven counteracted ROS generation. In addition, pro caspase-3 activation prompted by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was limited in the presence of eMP<sub>aPC</sub>, as shown by its reduced cleavage into active caspase 3 ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ , Fig. 8C).





**Fig. 5** Expression of annexin A1 and PAR-1 in eMP<sub>aPC</sub>. After 70 nM aPC treatment during 24 hrs, endothelial cells and β cell-derived MP were harvested from supernatants, washed and concentrated. Expression of PAR-1 (**A, C**) and annexin A1 (**B, D**) were assessed by Western blot in cell (**A, B**) ( $n = 4$ ) and MP lysates (**C, D**) ( $n = 3$ ). Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (aPC, activated protein C (Xigris<sup>®</sup>); CTRL, untreated cells; βMP, β-cell derived MP; EC, endothelial cells; eMP, endothelial MP; MP, microparticles; PhSer eq., phosphatidylserine equivalent. \* $P < 0.05$  versus CTRL \*\*\* $P < 0.001$  versus CTRL).

## eMP<sub>aPC</sub> protect islets against oxidative stress-induced apoptosis and restore islet function

The β-cell cytoprotection by eMP<sub>aPC</sub> observed above in Rinm-5f was further confirmed in isolated islets incubated with 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during 4 hrs. eMP<sub>aPC</sub> pre-treatment limited the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis measured by PI/AnV double staining of the dissociated constitutive islet cells using flow cytometry (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 17.2  $\pm$  4.7 % versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+MP: 3.8  $\pm$  2.8 %, unstimulated islets: 1  $\pm$  0.3%,  $P = 0.03$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $n = 4$ ). Accordingly, increased viability using PI/FDA double labelling was also measured (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 47.8  $\pm$  2.8%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+MP: 61.8  $\pm$  2%, unstimulated islets: 97.5  $\pm$  1 %,  $P = 0.007$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $n = 4$ ). Importantly, when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated islets were challenged by high glucose concentration (25 mM), their ability to secrete insulin was restored by eMP<sub>aPC</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 5.3  $\pm$  1; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+MP: 16.1  $\pm$  4.8; unstimulated: 25.2  $\pm$  1.9, ng/ml insulin /10 islets,  $P = 0.04$ ,  $n = 4$ , Fig. 9).

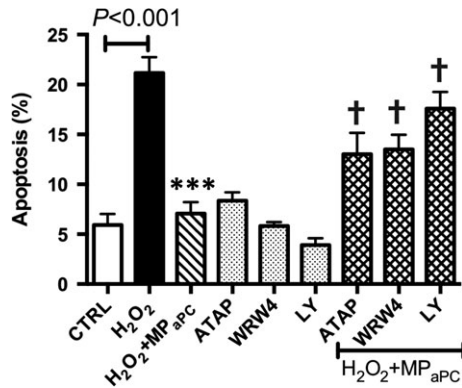
## Discussion

Our work demonstrates the protective effects of aPC-generated endothelial MP on β-cell function. The key finding of our data is that eMP<sub>aPC</sub> convey EPCR together with aPC and act as paracrine

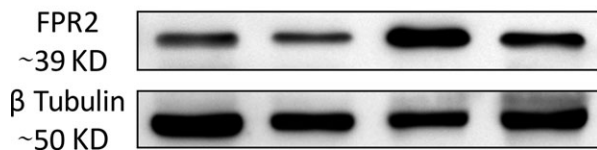
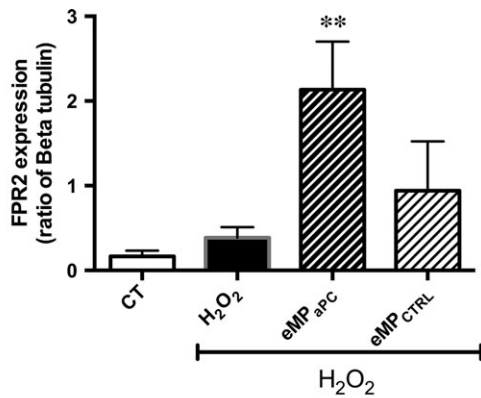
β-cell cytoprotective effectors, in line with previous observations of their autocrine cytoprotective effects [27]. In the present study, we show that eMP<sub>aPC</sub> deliver EPCR to target β-cells and prompt an EPCR-dependent PAR-1 pathway within β-cells. Interestingly, we evidenced that eMP<sub>aPC</sub> cargo annexin-A1 and active aPC and that MP interactions with the target cell are mediated through phosphatidylserine and ANXA1-dependent mechanisms [22]. In addition, EPCR and FPR2/ALX expressions in target cells were up-regulated by eMP<sub>aPC</sub>. The preservation of β-cell survival and function by eMP<sub>aPC</sub> was confirmed in isolated islets submitted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to mimic the oxidative stress associated with ischaemia. Altogether, the study demonstrates that endothelial MP act as true mediators in cell crosstalk within the islets and confirms the key contribution of the endothelium for islet engraftment, survival and function of prime importance in islet-transplanted patients [35].

## aPC favours the generation of endothelial MP able to prevent β-cell dysfunction and apoptosis

Several studies have suspected a possible MP-mediated effect on β-cell function and survival. Figliolini *et al.* studying a suspension of MP and exosomes, also termed extracellular vesicles, proposed



**Fig. 6** The protective effects of eMP<sub>aPC</sub> are mediated through the PAR-1/EPCR and ANXA1/FPR2 pathways. Apoptosis of  $\beta$ -cells submitted or not to oxidative stress and MP was assessed by flow cytometry.  $\beta$ -cells were pre-incubated with a PI3K inhibitor (LY 294002, 10  $\mu$ M, 1 hr) or FPR2 antagonist (WRW4, 10  $\mu$ M, 1 hr) or a PAR-1 antibody (ATAP2, 10  $\mu$ g/ml) before a 6-hrs treatment by MP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation. Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$ . (CTRL, untreated cells; MP<sub>aPC</sub>, endothelial microparticles released by aPC treatment. \*\*\* $P < 0.001$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; † $P < 0.001$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ MP<sub>aPC</sub>).



**Fig. 7** Expression of FPR2/ALX in eMP<sub>aPC</sub> - and eMP<sub>CTRL</sub>-treated  $\beta$ -cells submitted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  $\beta$ -cells were pre-incubated for 12 hrs with 20 nM eMP<sub>aPC</sub> or eMP harvested from untreated cells before addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. FPR2/ALX expression was evidenced by Western blot in cell lysates after 24 hrs. Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (CTRL, untreated cells; FPR2, formyl peptide receptor 2; eMP<sub>aPC</sub>, endothelial microparticles released by aPC treatment; eMP<sub>CTRL</sub>, endothelial microparticles harvested from unstimulated cells. \*\* $P < 0.01$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

that they would contribute to the crosstalk between endothelial and  $\beta$ -cells within the islets through the delivery of specific miRNA involved in  $\beta$ -cell function and endothelial angiogenesis [17]. We previously reported that MP shed from  $\beta$ -cells in response to oxidative or cytokine stress induce the apoptosis of naive  $\beta$ -cells [13] and that eMP isolated from aPC-treated septic rats restored the vascular tone and protect cardiac and vascular tissues from NF- $\kappa$ B and cyclooxygenase-2 activation [26]. Extracellular vesicles derived from endothelial progenitor cells were also reported protective in an islet model [20]. They also reduced ischaemia-reperfusion injury in rats by transferring pro-angiogenic miRNA [36, 37].

In the present study, we accordingly evidenced limited apoptosis in  $\beta$ -cells treated by endothelial-derived MP that was highly enhanced when MP were harvested from aPC-treated cells (Fig. 1). These observations of the eMP<sub>aPC</sub>-mediated effects were confirmed in eMP<sub>aPC</sub>-treated islets submitted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 9) and were independent from the presence of exosomes (Fig. 1D).

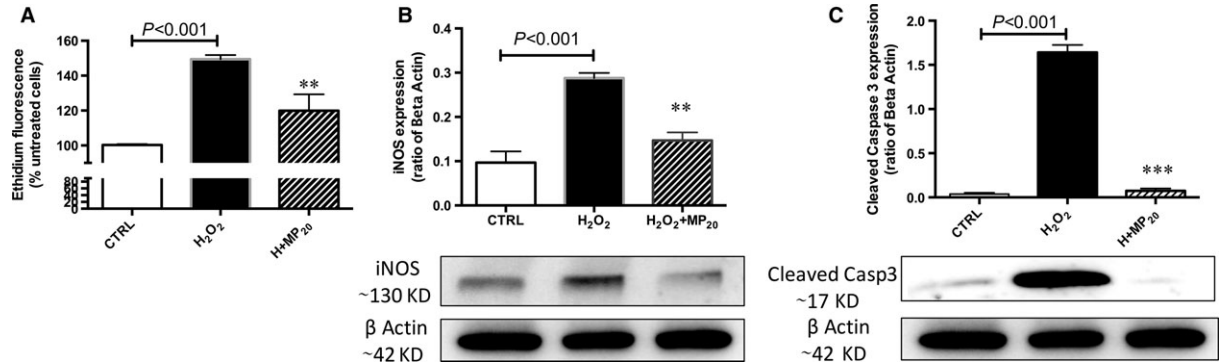
### eMP<sub>aPC</sub> deliver EPCR and mediate PAR-1-dependent cytoprotective signalling

Our data extend the previous observation that eMP<sub>aPC</sub> transfer of EPCR and convey aPC to target ECs [27] (Fig. 2). We showed that eMP<sub>aPC</sub> also target  $\beta$ -cells cytoprotection and relies at least in part on PAR-1- and PI3-kinase-dependent pathways. Specific inhibition of PI3 kinase totally abolished cytoprotection (Fig. 6), in line with the reported pl3K/Akt-dependent cytoprotective pathway initiated by the aPC-driven cleavage of raft-localized PAR-1 [38]. In our model, the transfer of EPCR/aPC may account for the MP-mediated beneficial effects (Figs 8 and 9). However, the eventual role of a truly soluble form of the EPCR/aPC complex eventually cleaved from eMP<sub>aPC</sub> by proteases present at the vicinity of the transplanted islet remains to be investigated *in vivo*. Indeed, in response to inflammatory and oxidative stress, endothelial EPCR is cleaved by TACE and shed as a soluble form in the perivascular environment, thereby blunting the cellular action of circulating aPC [39, 40]. Under conditions of oxidative stress, our data indicate that eMP<sub>aPC</sub> are beneficial actors still able to rescue damaged ECs through the delivery of the functional EPCR, aPC, PAR-1 complex and of ANXA1, of eventual interest in the preservation of the intra-islet endothelium (Fig. 1).

### Endothelial and $\beta$ -cell-derived MP have distinct properties in response to aPC treatment

In our study, we could not detect any  $\beta$ -cell cytoprotection against oxidative stress by aPC alone, although low EPCR expression was detectable as reported previously [41]. In addition,  $\beta$ MP<sub>aPC</sub> did not either protect  $\beta$ -cells and 50 nM aPC even slightly increased apoptosis (Fig. 1).

The fact that Contreras *et al.* demonstrated aPC efficacy in the preservation of islets and liver endothelium after islet transplantation



**Fig. 8** Effects of eMP<sub>aPC</sub> on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced β-cells apoptosis and oxidative stress. **(A)** β-cells were pre-incubated with 20 nM eMP<sub>aPC</sub> during 12 hrs before addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cells were incubated with the red probe dihydroxyethidium during 30 min. and red fluorescence was analysed by flow cytometry ( $n = 4$ ). **(B, C)** β-cells were pre-incubated with 20 nM eMP<sub>aPC</sub> during 12 hrs before addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $n = 4$ ). iNOS **(B)** and cleaved caspase 3 **(C)** were evidenced by Western blot in cell lysates harvested after 24 hrs. Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (CTRL, untreated cells; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MP<sub>aPC</sub>, endothelial microparticles released after aPC treatment. \*\* $P < 0.01$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; \*\*\* $P < 0.001$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

questions the underlying mechanisms [28]. In our study, despite the fact that aPC prompted PAR-1 expression in both β-cells and ECs, EPCR concentration and ANXA1 remained poorly expressed in β-cells and derived-MP compared to their endothelial counterparts (Figs 3 and 5).

Conversely, we evidenced, enhanced aPC-driven annexin A1 expression in ECs. In line with our data, the expression of various cytoprotective proteins as a Rac1, a PI3K-dependent EPCR downstream event has been reported [42]. Furthermore, an EPCR/PAR-1-dependent down-regulation of sPLA2 was described by Bae *et al.* [43]. One explanation could be brought by our observation of the EPCR-driven up-regulation of ANXA1, a well-known PLA2 inhibitor [43]. Therefore, ANXA1-enriched eMP<sub>aPC</sub> could account at least in part for the anti-inflammatory and anti-oxidative responses in target β-cells and islets.

Other observations of the preservative action of aPC on β-cells through the fine-tuning of immunosuppressive Treg in type 1 diabetes were associated with the up-regulation of EPCR on beta cells [41]. Our data showing a direct eMP<sub>aPC</sub>-driven modulation of the pro-inflammatory and pro-apoptotic responses of β-cells are in line with these.

### eMP<sub>aPC</sub> contain annexin A1 and mediate FPR2/ALX-dependent pathways in β-cells

As previously described in ECs, we found that PAR-1 inhibition only leads to the partial loss of the eMP<sub>aPC</sub> cytoprotective effect in β-cells [27]. In addition, Perez-Casal showed that aPC harboured by EPCR<sup>+</sup>-eMP was more efficient than aPC alone in cardiovascular cytoprotection and angiogenesis [42], an observation that was confirmed by our finding that eMP<sub>aPC</sub> expose higher aPC activity and greater amounts of EPCR (Figs 2 and 3) [21, 22, 44–46]

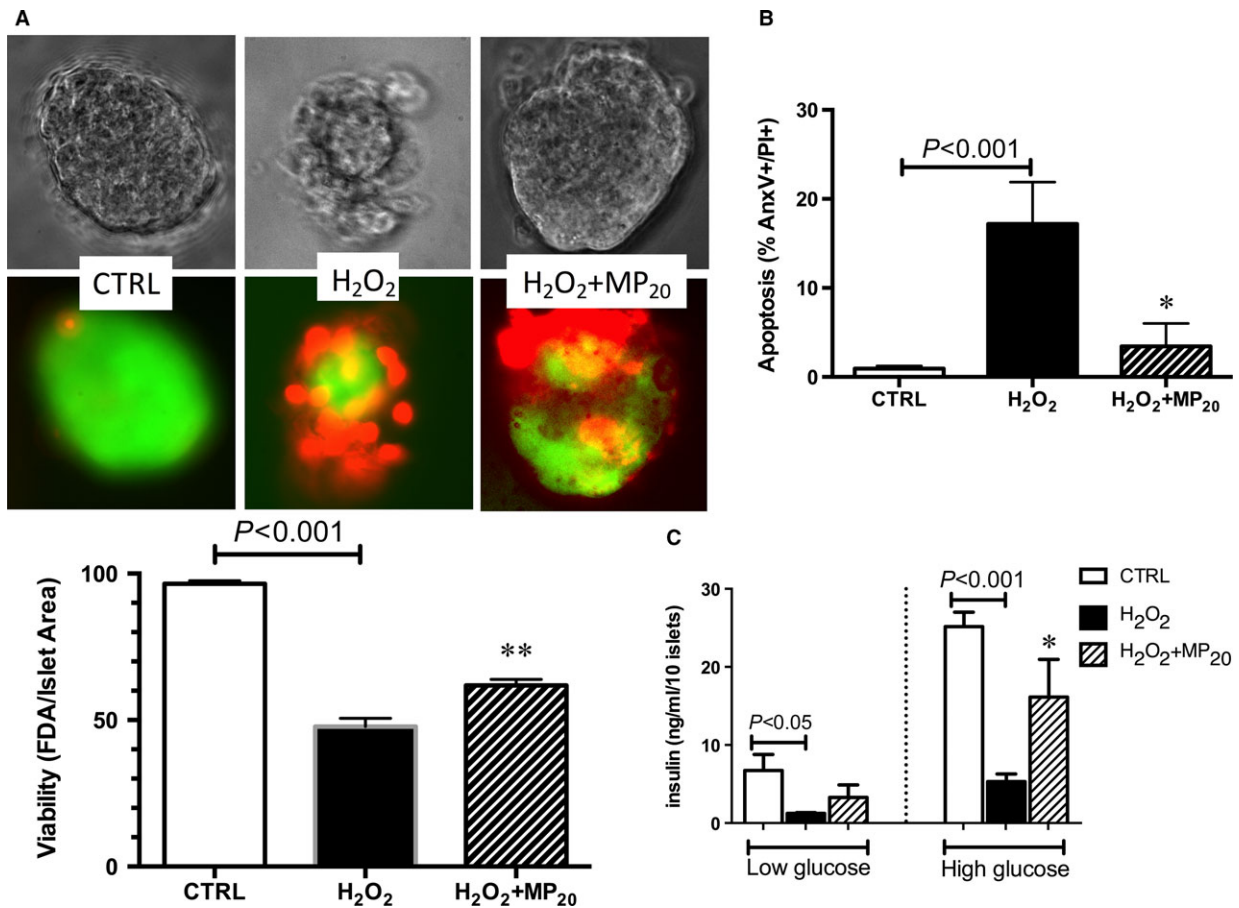
Our data bring a bunch of evidences strengthening the hypothesis of an alternate eMP<sub>aPC</sub>-mediated ANXA1-dependent pathway in β-cells (Figs 4–7). Indeed, eMP<sub>aPC</sub> reduced apoptosis, enhanced viability and restored insulin secretion under conditions of oxidative stress (Fig. 9), in line with the reported observation that ANXA1 directly enhances islet β-cell secretory function [47, 48]. Our data indeed confirm previous reports describing MP-embedded annexin A1 as a contributor to the MP capture by target cells and to downstream events [22]. Indeed, ANXA1-containing endothelial MP were proven beneficial through the transfer of either proteins, RNAs or miRNA to target cells [22, 35].

The previous observation that ANXA1 effects persisted after its removal from the culture medium [46] is consistent with our data showing that eMP<sub>aPC</sub> exert β-cell cytoprotection through the up-regulation of FPR2/ALX and PI3-kinase, a downstream event previously described in the inflamed endothelium (Fig. 6) [45]. In our hands, the ANXA1 content of endothelial MP was negligible when they were harvested from unstimulated ECs, whereas it was greatly enhanced by aPC treatment (Fig. 5).

Because FPR2 inhibition by the WRW4 antagonist only partially limited the eMP<sub>aPC</sub>-driven protection, it is tempting to speculate that ANXA1 exerts indirect effects through multiple mechanisms, among which ANXA1 binding to the phospholipids of the β-cell plasma membrane, as already reported in the presence of exogenous soluble ANXA1 [23–25]. However, our data demonstrate the up-regulation of FPR2/ALX by eMP<sub>aPC</sub> in target β-cells that would also have amplify the cell response to eMP<sub>aPC</sub> [49].

Our demonstration of an eMP-driven cytoprotection that is FPR2/ALX and phosphatidylserine dependent is consistent with a pioneered work showing that ANXA1 binds to pancreatic islets in a calcium-dependent and independent manner, highly suggestive of both receptor- and phospholipid-mediated mechanisms [47].

Altogether, in our hands, ANXA1 appeared pivotal in the eMP<sub>aPC</sub>-driven β-cell cytoprotection through multiple pathways,



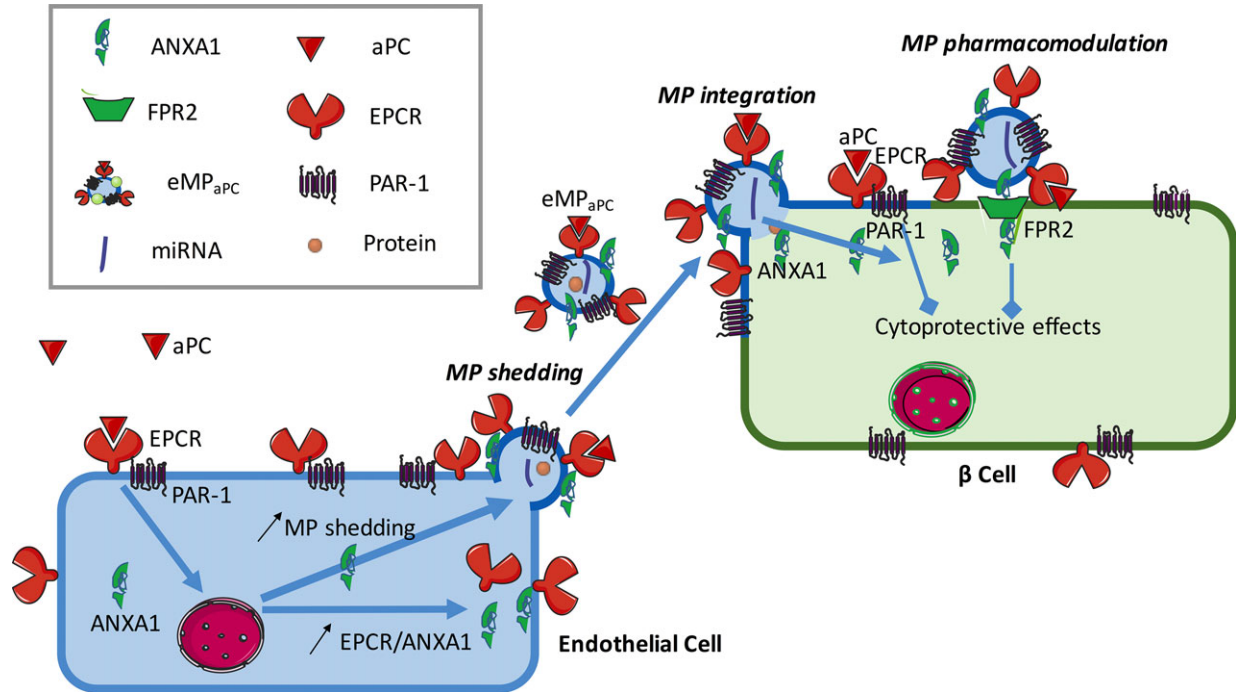
**Fig. 9** Effects of MP on islet viability, apoptosis and function. **(A)** Viability of islets. Rat islets were pre-incubated with MP<sub>aPC</sub> during 12 hrs before treatment by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during 6 additional hours a : Representative photographs of one islet per each condition. Following incubation, islets were stained by green FDA probe and red propidium iodide fluorescent probes. Red and green fluorescences were analysed after dissociation of the islet constitutive cells by flow cytometry following trypsin treatment. **(B)** Apoptosis : Cells of islets were stained by propidium iodide and annexin A5. Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. **(C)** islets function assessed by insulin secretion after glucose challenge: Islets were pre-incubated for 2 hrs in Krebs solution containing 2.5 mM glucose before incubation in Krebs buffer containing 25 mM glucose (high glucose). (CTRL, untreated cells; FDA, fluorescein diacetate; MP<sub>aPC</sub>, endothelial microparticles released by aPC treatment. \* $P < 0.05$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; \*\* $P < 0.01$  versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

namely enhancement of eMP capture, FPR2/ALX activation and its up-regulation [21, 22].

Nevertheless, our data remain to be confirmed in animal models although several clues of the importance of ANXA1 in cytoprotection can be found in the literature. Indeed, ANXA1 is localized into insulin secretory granules of the islets and was suggested to modulate insulin secretion in an autocrine or paracrine manner [22, 46, 50]. Under physiopathological conditions, the initial exposure of phosphatidylserine by apoptotic cells and MP shedding could be viewed as a protective response enabling the binding of the secreted ANXA1 [51] of benefit through an anti-inflammatory MP-mediated crosstalk, eventually prompted by miRNA transfer [22, 35]. Such a paracrine ANXA1 action was demonstrated for neutrophil-derived MP that exert a powerful anti-inflammatory effect on ECs *via* ANXA1 delivery [21].

In summary, this study characterizes a new cytoprotective action exerted by endothelial MP on insulin-secreting  $\beta$ -cells that could be significantly enhanced by aPC with great potency in isolated islets submitted to major oxidative stress (Fig. 10). In our model, aPC protected both  $\beta$ -cells and pancreatic islets through the release of endothelial aPC/EPCR<sup>+</sup>-MP that behaved as cellular effectors in the preservation of islet function. Two different and non-exclusive pathways initiated by such MP have been identified: one dependent on EPCR/PAR-1 and the other pertaining to the delivery of ANXA1 and FPR2/ALX-mediated responses. In the context of transplantation, MP may prove a promising therapeutic tool in the pre- and post-conditioning of islet grafts, especially in view of the new engineered protein C that retain cytoprotective effects with minimal anticoagulant properties [4]. Our data strongly support the ability of endothelial MP to convey endogenous or cytoprotective proteins that preserve islet





**Fig. 10** Hypothetical cytoprotective mechanisms triggered by endothelial microparticles released from aPC-treated cells. The binding of aPC to its receptor, EPCR, causes the specific cleavage of PAR-1 and activation of its dependent cytoprotective pathway in endothelial cell, thereby causing the up-regulation of annexin A1 and the release of EPCR and annexin A1 enriched-MP. These endothelial microparticles act by autocrine and paracrine pathways via the activation of the annexin A1 receptor, FPR2/ALX. They bind to target  $\beta$ -cells in a phosphatidylserine and FPR2-dependent manner and exert cytoprotection through the transfer of EPCR / PAR-1 and downstream via the activation of FPR2/ALX and PAR-1-mediated pathways.

function, limit the graft cell loss and favour islet re-vascularization and engraftment.

cells. JP contributed to flow cytometry analysis. FT, GUS and LK designed the study and FT, GUS and LK corrected the manuscript.

## Author Contributions

GK wrote the manuscript and performed the main part of the experimental study. MK contributed to the design of improved islet isolation procedures and performed part of the islet experiments and realized the image analysis. AEH performed part of the ECs experiments and Western blot and PB contributed to the production of MP. MA and LA helped in the extraction of primary endothelial cell and performed Western blot and DHE measurements. BY measured the MP, and FZ and LA gave technical support for flow cytometry. FT, FZ and JBH gave support for the design of aPC activity measurement in MP and

## Acknowledgements

We are indebted to Romain Vauchelles from the platform PIQ (Plateforme d'Imagerie Quantitative), UMR 7213 CNRS, Laboratory of Biophotonics and pharmacology, University of Strasbourg, who gave expert advices in the analysis of fluorescent cytometry images. This study was supported by the ASDIA (Assistance Service DIAbète) company. GK received grant from the University Hospital of Strasbourg.

## Disclosure

The authors of this manuscript have no conflict of interest to disclose.

## References

- Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol.* 2012; 95: 333–45.
- Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood.* 2007; 109: 2.
- Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, *et al.* PROWESS-SHOCK: Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med.* 2012; 366: 2055–64.
- Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. Cytoprotective-selective activated protein C therapy for ischaemic stroke. *Thromb Haemost.* 2014; 7–10.
- Wang Y, Zhao Z, Chow N, *et al.* Activated protein C analog promotes neurogenesis and improves neurological outcome after focal ischemic stroke in mice via protease

- activated receptor 1. *Brain Res.* 2013; 1507: 97–104.
6. **Eich T, Eriksson O, Lundgren T.** Visualization of Early Engraftment in Clinical Islet Transplantation by Positron-Emission Tomography. *N Engl J Med.* 2007; 356: 2754–5.
  7. **Emamaullee JA, Shapiro AMJ.** Factors influencing the loss of beta-cell mass in islet transplantation. *Cell Transplant.* 2007; 16: 1–8.
  8. **Bruni A, Gala-Lopez B, Pepper AR, et al.** Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014; 7: 211–23.
  9. **Goto M, Tjernberg J, Dufrane D, et al.** Dissecting the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2008(1); 15: 225–34.
  10. **Moberg L, Johansson H, Lukinius A, et al.** Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. *Lancet.* 2002; 360: 2039–45.
  11. **Özmen L, Ekdahl KN, Elgue G, et al.** Inhibition of thrombin abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction triggered by isolated human islets: possible application of the thrombin inhibitor Melagatran in clinical islet transplantation. *Diabetes.* 2002; 51: 1779–84.
  12. **Ma X, Ye B, Gao F, et al.** Tissue factor knockdown in porcine islets: an effective approach to suppressing the instant blood-mediated inflammatory reaction. *Cell Transplant.* 2012; 21: 61–71.
  13. **Gleizes C, Constantinescu A, Abbas M, et al.** Liraglutide protects Rin-m5f  $\beta$  cells by reducing procoagulant tissue factor activity and apoptosis prompted by microparticles under conditions mimicking Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction. *Transpl Int.* 2014; 27: 733–40.
  14. **Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, et al.** Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda).* 2005; 20: 22–7.
  15. **Buzas EI, György B, Nagy G, et al.** Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2014; 10: 356–64.
  16. **Morel O, Toti F, Morel N, et al.** Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica.* 2009; 94: 313–7.
  17. **Figliolini F, Cantaluppi V, De Lena M, et al.** Isolation, characterization and potential role in beta cell-endothelium cross-talk of extracellular vesicles released from human pancreatic islets. *PLoS One.* 2014; 9: e102521.
  18. **Zanone MM, Favaro E, Camussi G.** From endothelial to beta cells: insights into pancreatic islet microendothelium. *Curr Diabetes Rev.* 2008; 4: 1–9.
  19. **Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, et al.** Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases. *J Hepatol.* 2016; 66(1): 212–227 doi:10.1016/j.jhep.2016.07.009.
  20. **Cantaluppi V, Biancone L, Figliolini F, et al.** Microvesicles derived from endothelial progenitor cells enhance neoangiogenesis of human pancreatic islets. *Cell Transplant.* 2012; 21: 1305–20.
  21. **Dalli J, Norling LV, Renshaw D, et al.** Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood.* 2008; 112: 2512–9.
  22. **Jansen F, Yang X, Hoyer FF, et al.** Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 1925–35.
  23. **Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, et al.** Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. *J Immunol Res.* 2016; 2016: 8239258.
  24. **D'Acquisto F, Perretti M, Flower RJ.** Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol.* 2008; 155: 152–69.
  25. **Perretti M, Dalli J.** Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. *Br J Pharmacol.* 2009; 158: 936–46.
  26. **Boisramé-Helms J, Delabranche X, Degirmenci S-E, et al.** Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats. *Thromb Haemost.* 2014; 111(1): 154–64.
  27. **Perez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, et al.** Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica.* 2009; 94: 387–94.
  28. **Contreras JL, Eckstein C, Smyth CA, et al.** Activated protein C preserves functional islet mass after intraportal transplantation: a novel link between endothelial cell activation, thrombosis, inflammation, and islet cell death. *Diabetes.* 2004; 53: 2804–14.
  29. **Akima S, Hawthorne WJ, Favaloro E, et al.** Tirofiban and activated protein c synergistically inhibit the Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction (IBMR) from allogeneic islet cells exposure to human blood. *Am J Transplant.* 2009; 9: 1533–40.
  30. **Gotoh M, Maki T, Satomi S, et al.** Reproducible high yield of rat islets by stationary *in vitro* digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation.* 1987; 43: 725–30.
  31. **Auger C, Kim J-H, Chabert P, et al.** The EGCG-induced redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase and relaxation are critically dependent on hydroxyl moieties. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393: 162–7.
  32. **Gleizes C, Kreutter G, Abbas M, 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: 231–42.
  33. **Ortiz-Stern A, Deng X, Smoktunowicz N, et al.** PAR-1-dependent and PAR-independent pro-inflammatory signaling in human lung fibroblasts exposed to thrombin. *J Cell Physiol.* 2012; 227: 3575–84.
  34. **Khemais-benkhiat S, Idris-khodja N, Ribeiro TP, et al.** 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 Biol Sci.* 2015; 1–10.
  35. **Jansen F, Yang X, Baumann K, et al.** Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism. *J Cell Mol Med.* 2015; 19: 2202–14.
  36. **Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, et al.** Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* 2012; 82: 412–27.
  37. **Bitzer M, Ben-Dov IZ, Thum T.** Microparticles and microRNAs of endothelial progenitor cells ameliorate acute kidney injury. *Kidney Int.* 2012; 82: 375–7.
  38. **Bae J-S, Yang L, Rezaie AR.** Lipid raft localization regulates the cleavage specificity of protease activated receptor 1 in endothelial cells. *J Thromb Haemost.* 2008; 6: 954–61.
  39. **Qu D, Wang Y, Esmon NL, et al.** Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 395–402.
  40. **Menschikowski M, Hagelgans A, Eisenhofer G, et al.** Regulation of endothelial protein C receptor shedding by cytokines is mediated through differential activation of

- MAP kinase signaling pathways. *Exp Cell Res.* 2009; 315: 2673–82.
41. **Xue M, Dervish S, Harrison LC, et al.** Activated protein C inhibits pancreatic islet inflammation, stimulates T regulatory cells, and prevents diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *J Biol Chem.* 2012; 287: 16356–64.
  42. **Pérez-Casal M, Thompson V, Downey C, et al.** The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein C treatment in sepsis. *Crit Care.* 2011; 15: R195.
  43. **Bae J-S, Rezaie AR.** Thrombin and activated protein C inhibit the expression of secretory group IIA phospholipase A(2) in the TNF- $\alpha$ -activated endothelial cells by EPCR and PAR-1 dependent mechanisms. *Thromb Res.* 2010; 125: e9–15.
  44. **Facio FN, Sena AA, Araújo LP, et al.** Annexin 1 mimetic peptide protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Mol Med.* 2011; 89: 51–63.
  45. **Peshvariya HM, Taylor CJ, Goh C, et al.** Annexin peptide Ac2-26 suppresses TNF $\alpha$ -induced inflammatory responses via inhibition of Rac1-dependent NADPH oxidase in human endothelial cells. *PLoS One.* 2013; 8: e60790.
  46. **Rackham CL, Vargas AE, Hawkes RG, et al.** Annexin A1 is a key modulator of Mesenchymal Stromal Cell mediated improvements in islet function. *Diabetes.* 2015; 2: db150990.
  47. **Hong S-H, Won JH, Yoo S-A, et al.** Effect of annexin I on insulin secretion through surface binding sites in rat pancreatic islets. *FEBS Lett.* 2002; 532: 17–20.
  48. **Kang N, Won JH, Park YM.** Annexin I stimulates insulin secretion through regulation of cytoskeleton and PKC activity. *Animal Cells Syst.* 13: 17–23.
  49. **Belvedere R, Bizzarro V, Popolo A, et al.** Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells. *BMC Cancer.* 2014; 14: 961.
  50. **Ohnishi M, Tokuda M, Masaki T, et al.** Involvement of annexin-I in glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets. *Endocrinology.* 1995; 136: 2421–6.
  51. **Blume KE, Soeroes S, Waibel M, et al.** Cell surface externalization of annexin A1 as a failsafe mechanism preventing inflammatory responses during secondary necrosis. *J Immunol.* 2009; 183: 8138–47.

## Ali EL HABHAB

### Rôle des microparticules leucocytaires dans l'induction d'une sénescence accélérée : Implication pour la greffe d'îlots pancréatiques

Ce travail explore l'impact des microparticules (MPs) sur la réponse vasculaire dans les conditions d'ischémie reperfusion (IR) associées à la dysfonction du greffon. Il décrit les effets pro-sénescents paracrines de MPs d'origine endothéliales (EMPs) et leucocytaires (LMPs) dans un modèle de communication intercellulaire et sur l'îlot pancréatique de rat, qui constitue une entité fonctionnelle multicellulaire. Nos résultats indiquent que les LMPs induisent une sénescence endothéliale prématurée associée à une dysfonction endothéliale, identifiée dans les cellules et les anneaux d'artères coronaires. De plus, cette dysfonction est caractérisée par une signalisation redox sensible pro-inflammatoire et un phénotype thrombogénique avec la libération secondaire d'EMPs pro-coagulantes. La deuxième étude indique que les EMPs pro-sénescents provoquent une sénescence prématurée des îlots pancréatiques et altèrent leur fonctionnalité sans affecter leur viabilité. De ce fait, les MPs sont des cibles thérapeutiques intéressantes pour limiter l'IR et la dysfonction du greffon, notamment en greffe d'îlots pancréatiques.

**Mots clés** : sénescence, ischémie reperfusion, microparticules, endothélium, greffe d'îlots

This work explores the impact of microparticles (MPs) on vascular response under conditions of ischemia reperfusion (IR) associated with graft dysfunction. It describes the pro-senescent paracrine effects of endothelial-(EMPs) and leukocyte-derived MPs (LMPs) in a cellular cross-talk model and in rat pancreatic islets, which are multicellular functional units. Our results indicate that LMPs induce premature endothelial senescence associated with endothelial dysfunction, identified in coronary artery rings and endothelial cells. In addition, such endothelial dysfunction is characterized by a pro-inflammatory redox-sensitive signaling and a thrombogenic phenotype typified by a secondary release of pro-coagulant EMPs. The second study indicates that pro-senescent EMPs cause the premature senescence of islets and impair their functionality without affecting their viability. As a result, MPs are promising therapeutic targets for limiting IR and graft dysfunction, particularly in pancreatic islets transplantation.

**Keywords** : senescence, ischemia reperfusion, microparticles, endothelium, islets transplantation