

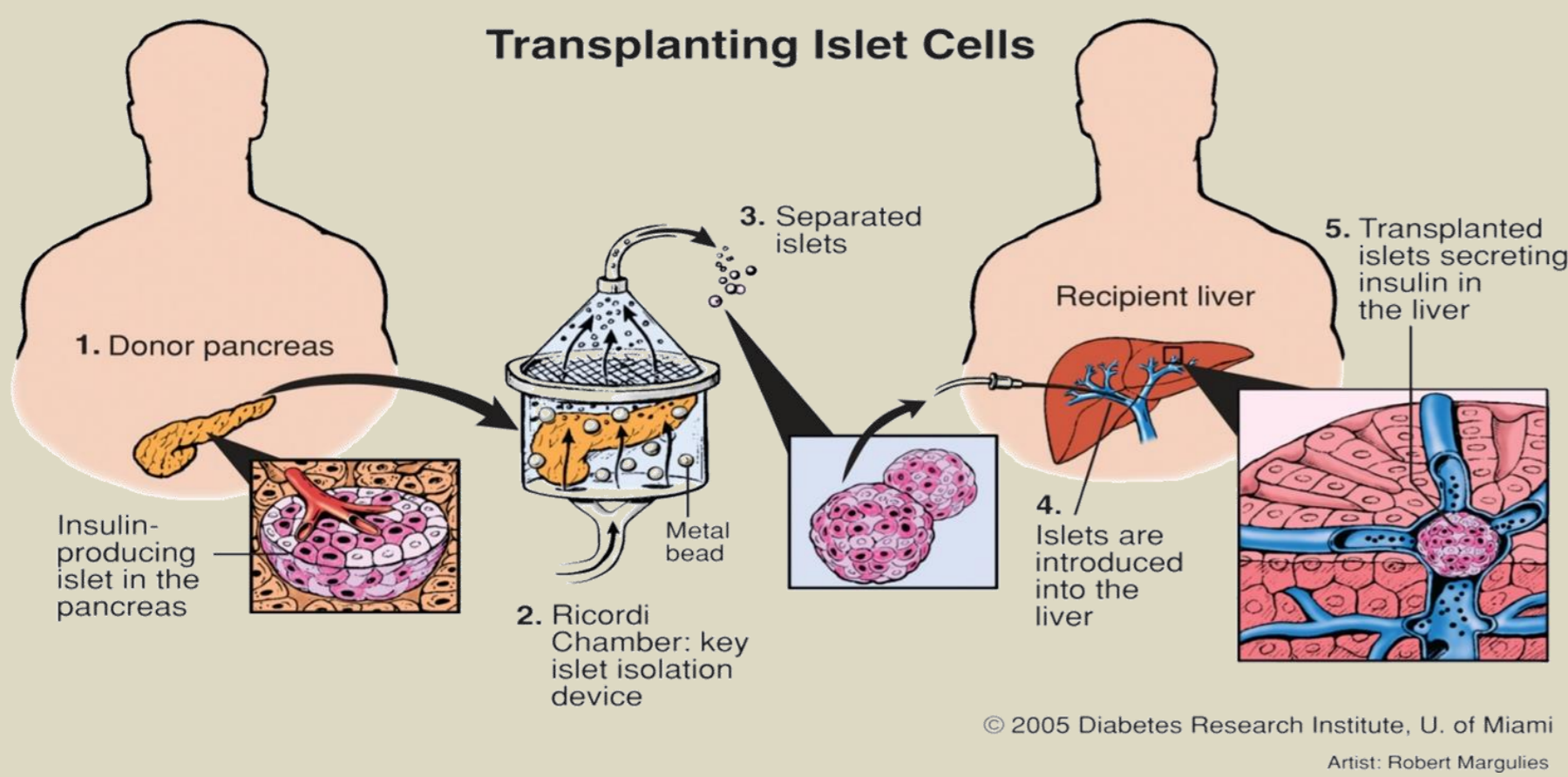
Apport des cellules souches mésenchymateuses pour la préservation de la fonctionnalité cellulaire bêta dans la thérapie cellulaire du diabète de type 1

Laporte C^{1,2}, Derouiche R^{1,2}, Cottet C^{1,2}, Gauchez A-S⁴, Moisan A⁵, Benhamou P-Y^{1,2,3}, Lablanche S^{1,2,3}

¹ Université Grenoble Alpes, LBFA et BEEsy, Grenoble, France ; ² Inserm U1055, Grenoble, France ; ³ Département d'Endocrinologie, Pôle DigiDune, Centre hospitalier Universitaire, Grenoble, France ; ⁴ Institut de Biologie et de Pathologie, Centre hospitalier Universitaire, Grenoble, France ;

⁵ Etablissement Français du Sang, Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, St-Ismier, France ;

camillelaporte38@gmail.com



Contexte scientifique : La thérapie cellulaire du diabète de type 1 représentée par la transplantation d'îlots de Langerhans est une thérapeutique efficace pour restaurer la stabilité glycémique du patient diabétique de type 1 instable. Bien que les résultats métaboliques de la transplantation soient désormais bien démontrés, ils sont contrebalancés par les effets indésirables des traitements immunosuppresseurs et la perte de fonctionnalité à long terme. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) de part leurs propriétés immunomodulatrices, cytoprotectrices et proangiogéniques, pourraient être une ressource utile au cours de la transplantation d'îlots de Langerhans pour limiter le recours au traitement immunosuppresseur et préserver la viabilité du greffon d'îlots à long terme.

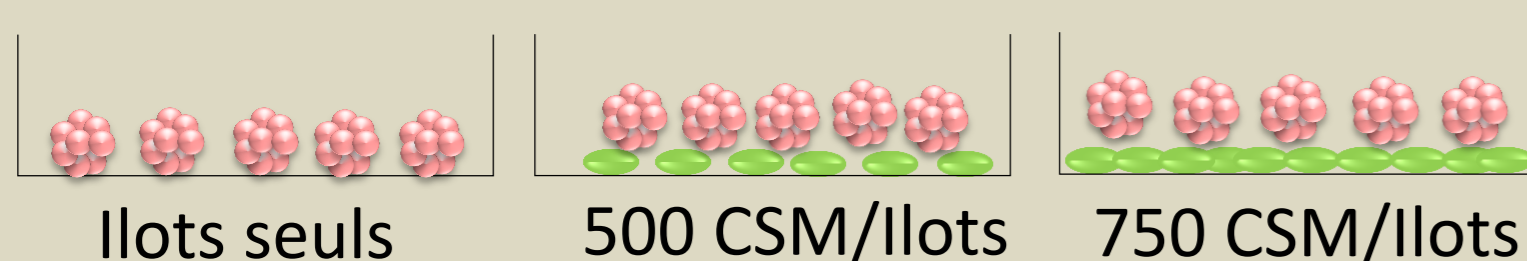
Objectif scientifique : Evaluer l'apport des CSM sur la viabilité et la fonctionnalité cellulaire β.

Méthodes

1. Caractérisation des CSM

- Analyse de l'expression d'antigènes de surface spécifiques en cytométrie en flux (EFS St Ismier)
- Evaluation de la multipotentialité Chondrogenèse, Ostéogenèse et Adipogenèse induites *in vitro*

2. Co-culture îlots/CSM



Conditions de culture

- Contrôle
- 300 UI.ml⁻¹ d'IL1-β, 3000 UI.ml⁻¹ d'IFN γ et TNF α
- 600 UI.ml⁻¹ d'IL-1 β, 6000 UI.ml⁻¹ d'IFN γ et TNF α

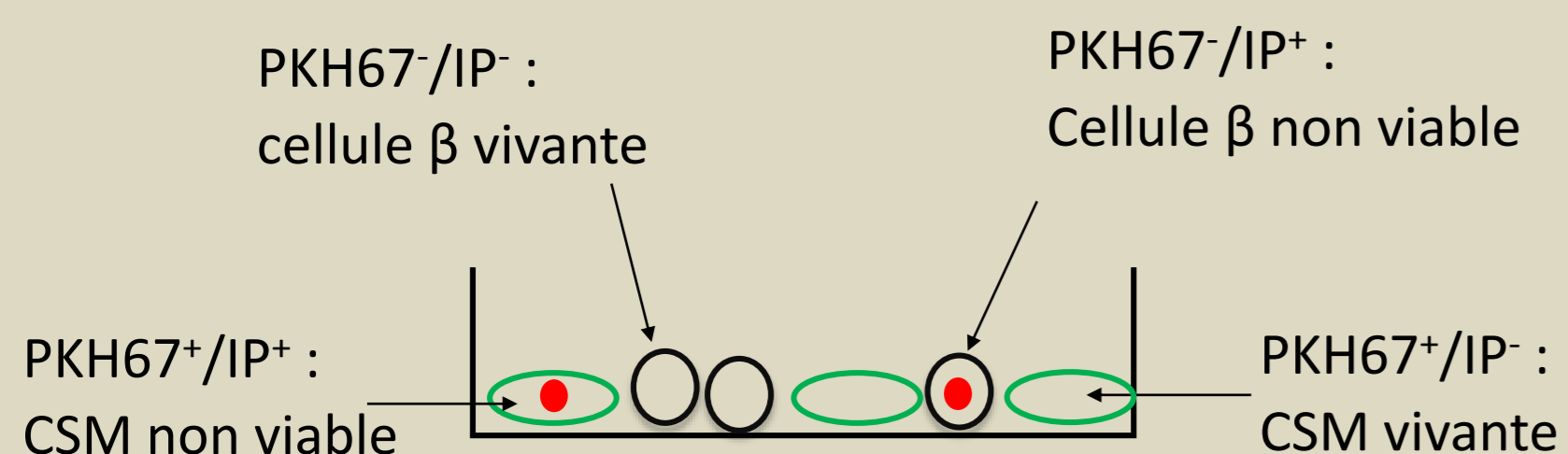
Durée des stress :

- 24h / les îlots de rat
- 36h / les îlots humains

3. Evaluation de la viabilité en cytométrie en flux : double marquage PKH67/IP

→ Discrimination des deux populations de cellules par marquage des CSM au PKH67 avant co-culture.

→ L'IP est un marqueur de nécrose ou d'apoptose tardive



4. Evaluation des capacités insulino-sécrétrices par GSIS

Dosage de l'insuline par RIA

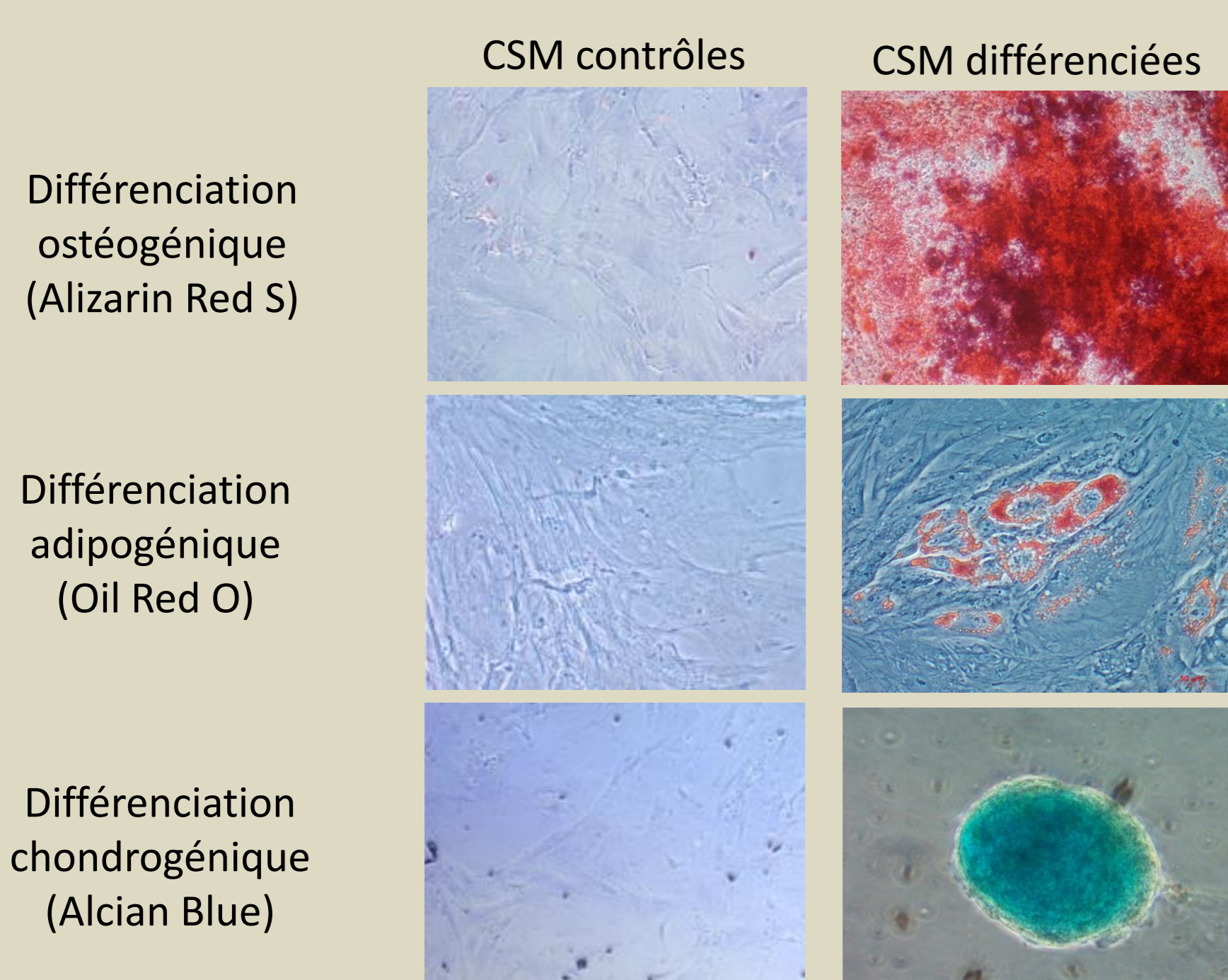
5. Investigation mécanistique : dosage immuno-enzymatique (ELISA)

Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses

1. Expression d'antigènes de surface spécifiques

Contrôle qualité	Spécifications
Identité	
CD14 et CD45	Inférieur à 5 %
CD90, CD73 et CD105	Supérieur à 90 %

2. Potentiel de différenciation



→ Les cellules souches mésenchymateuses sont fonctionnelles

Résultats – îlots de rat

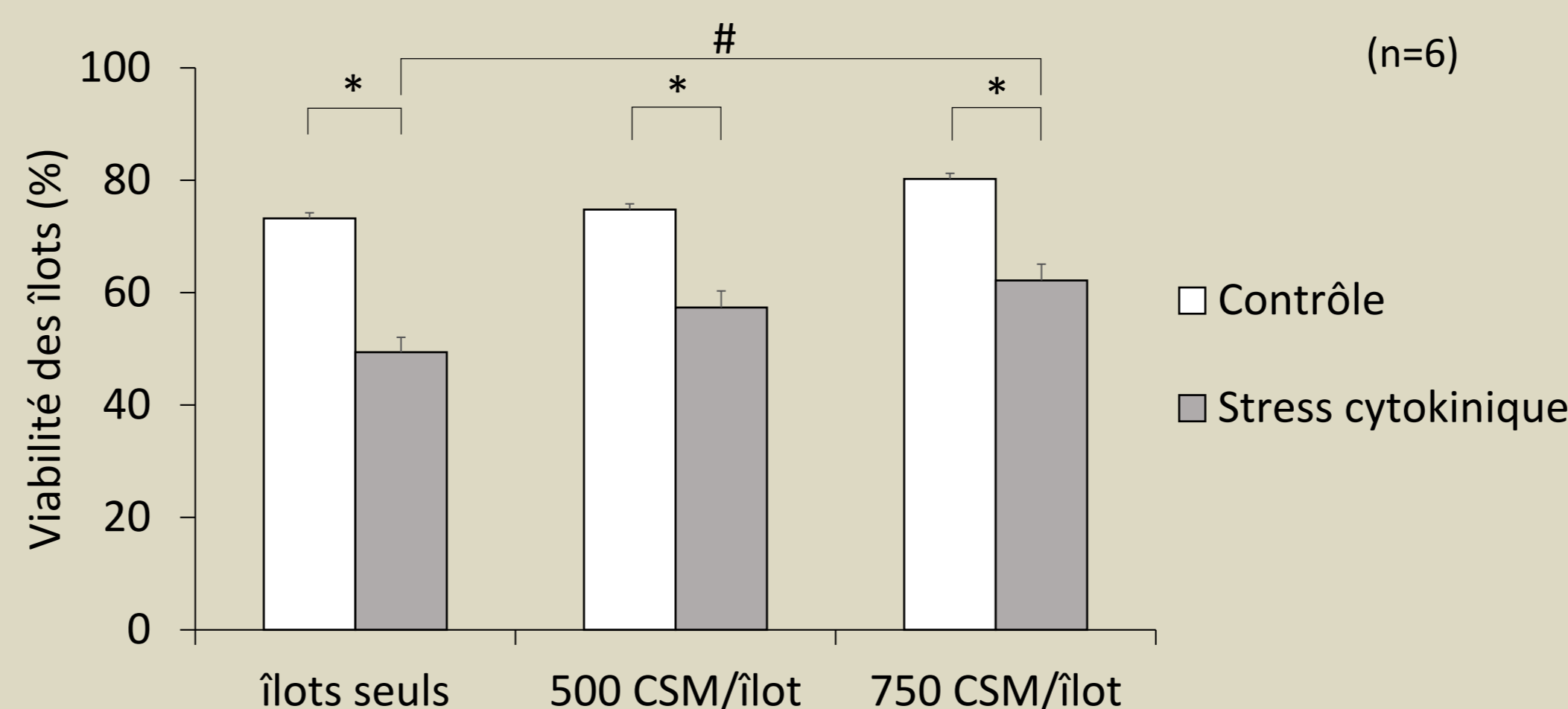


Figure 2. Viabilité des îlots de rats soumis à un stress cytokinique (600 UI.ml⁻¹ d'IL-1 β, 6000 UI.ml⁻¹ d'IFN γ et TNF α) (p<0,05 ± SEM) pendant 24H, en l'absence et en présence de CSM (500 CSM/îlot et 750 CSM/îlot)

La coculture îlots/CSM suivant un ratio de 750 CSM/îlot de rat augmente significativement la viabilité des îlots murins en condition de stress cytokinique par rapport aux îlots seuls (62,17% ± 6,52 contre 49,41% ± 7,48; p<0,05).

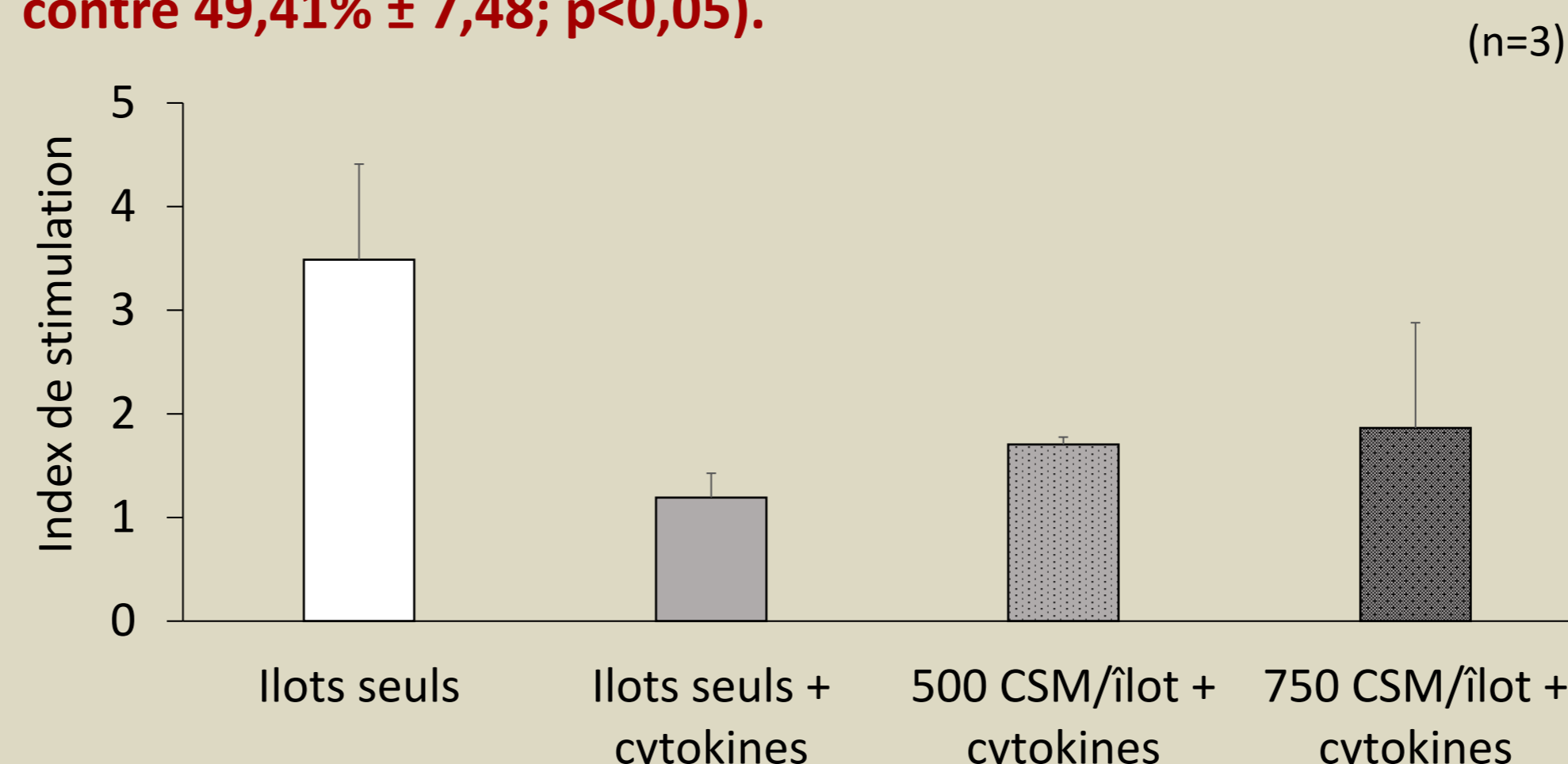


Figure 3. Index de stimulation des îlots humains soumis à un stress cytokiniques : IL1-β (600 UI.ml⁻¹) / IFN γ (6000 UI.ml⁻¹) / TNF α (6000 UI.ml⁻¹) pendant 24H, en l'absence et en présence de CSM (500 et 750 CSM/îlot)

L'exposition des îlots murins aux cytokines inflammatoires altère la sécrétion insulino-sécrétrices qui est partiellement restaurée en présence de CSM.

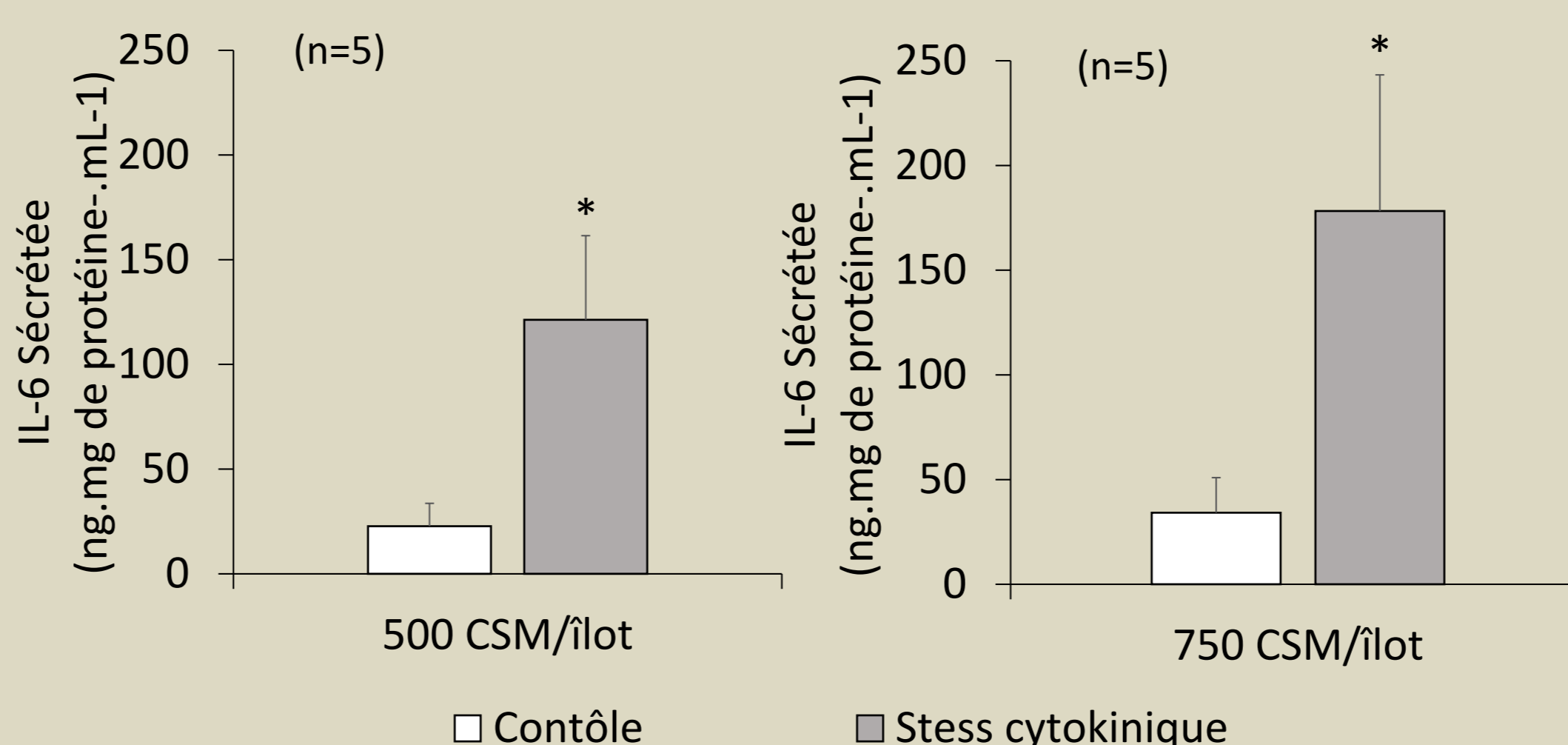


Figure 4. Mesure de la sécrétion d'IL-6 des CSM humaines en coculture avec les îlots murins en condition contrôle et en présence de cytokines (600 UI.ml⁻¹ d'IL-1 β, 6000 UI.ml⁻¹ d'IFN γ et TNF α) pendant 24H en présence d'un ratio de 500 CSM/îlot (A) et 750 CSM/îlot (B) (p<0,05 ± SEM)

La quantité d'IL-6 sécrétée augmente significativement au cours du stress cytokinique dans les conditions 500 CSM/îlot et 750 CSM/îlot comparée aux conditions contrôles (121,3 ± 40,2 contre 22,7 ± 10,9 ; p<0,05 pour le ratio 500 CSM/îlot et 178,3 ± 65 contre 34,2 ± 16,8 ; p<0,05 pour le ratio 750 CSM/îlot).

Conclusion

Les cellules souches mésenchymateuses permettent une augmentation de la viabilité et de la fonctionnalité des îlots en condition de stress cytokinique. Le dosage immuno-enzymatique d'IL-6 indique une augmentation de la sécrétion de cette cytokine anti-inflammatoire par les CSM suite au stress cytokinique. D'autres dosages immuno-enzymatiques de VEGF, IL-10 et IL1-RA sont en cours pour déterminer les acteurs moléculaires impliqués dans les mécanismes de cytoprotection des CSM.

Résultats préliminaires – îlots humains

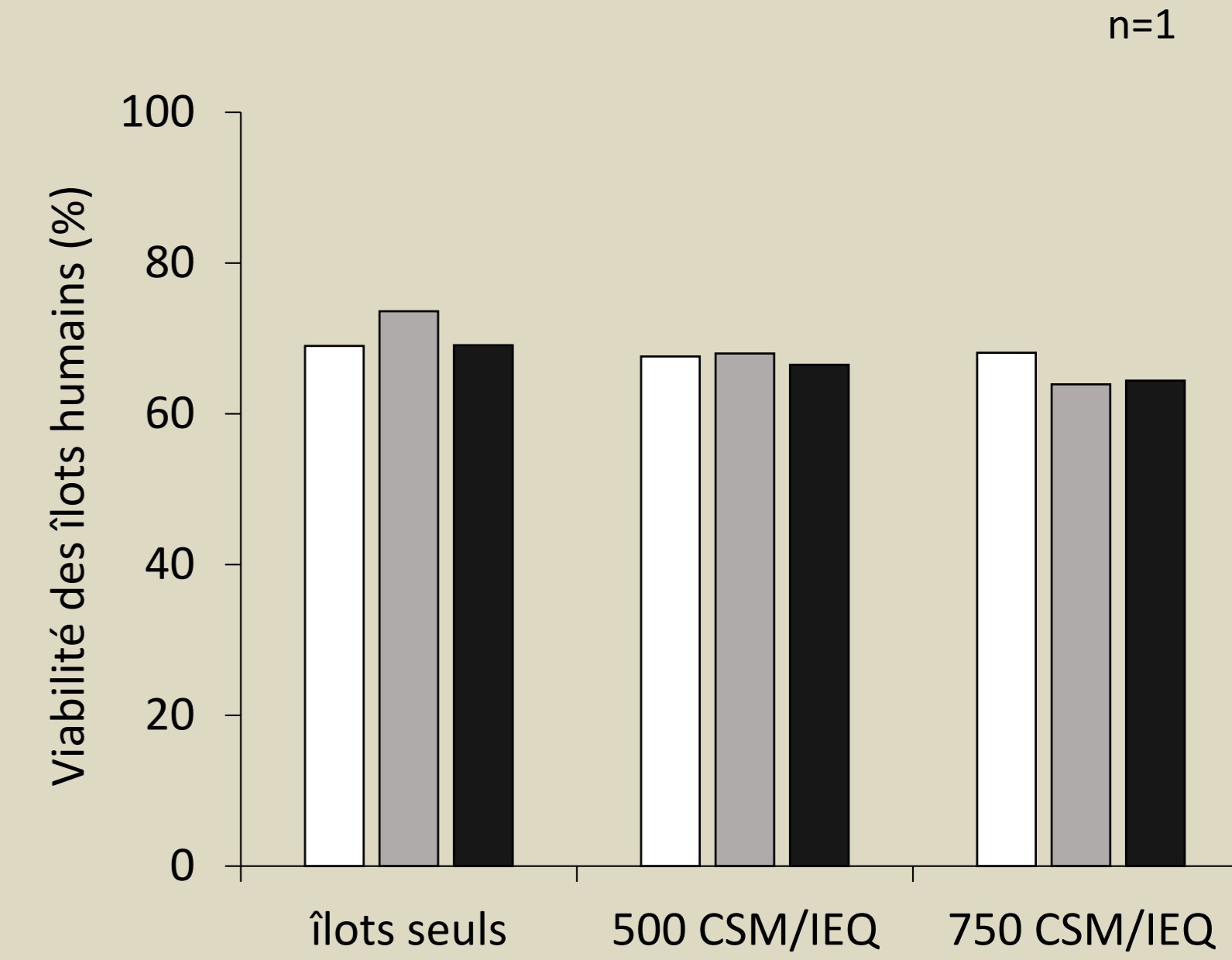


Figure 5. Viabilité des îlots humains soumis à des stress cytokiniques : IL1-β (300 UI.ml⁻¹) / IFN γ (3000 UI.ml⁻¹) / TNF α (3000 UI.ml⁻¹) ou IL1-β (600 UI.ml⁻¹) / IFN γ (6000 UI.ml⁻¹) / TNF α (6000 UI.ml⁻¹) pendant 36H, en l'absence et en présence de CSM (500 CSM/IEQ et 750 CSM/IEQ)

Pas d'effet du stress cytokinique et de la coculture avec les CSM sur la viabilité des îlots humains.

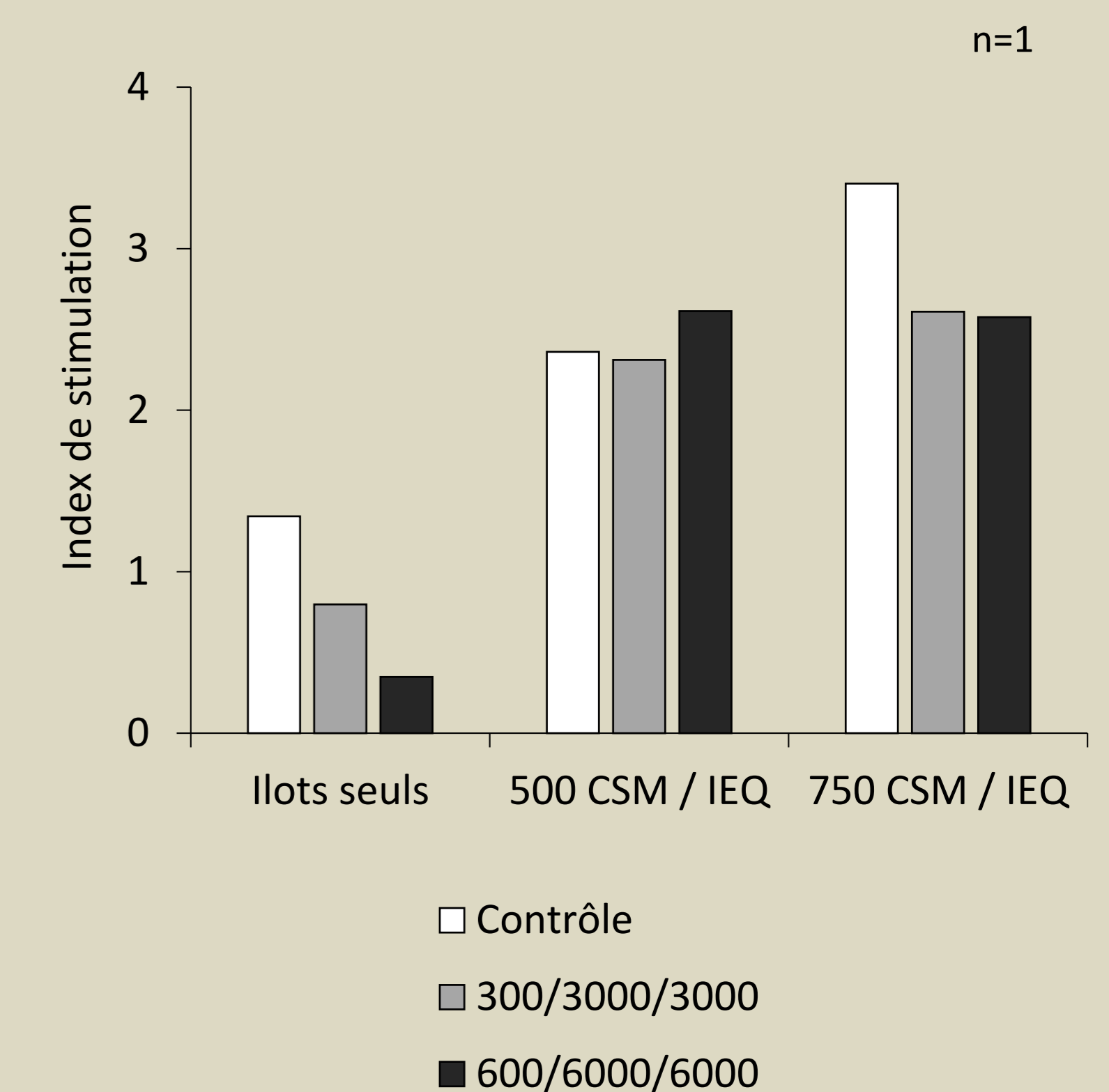


Figure 5. Index de stimulation des îlots humains soumis à des stress cytokiniques : IL1-β (300 UI.ml⁻¹) / IFN γ (3000 UI.ml⁻¹) / TNF α (3000 UI.ml⁻¹) ou IL1-β (600 UI.ml⁻¹) / IFN γ (6000 UI.ml⁻¹) / TNF α (6000 UI.ml⁻¹) pendant 36H, en l'absence et en présence de CSM (500 CSM/IEQ et 750 CSM/IEQ)

L'exposition des îlots humains aux cytokines inflammatoires altère l'insulinosécrétion.

La coculture en présence de CSM semble majorer la sécrétion d'insuline des îlots humains exposés au stress cytokinique.