

Rôle du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans l'apoptose des cellules béta pancréatiques

Sandrine Cornali Lablanche

▶ **To cite this version:**

Sandrine Cornali Lablanche. Rôle du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans l'apoptose des cellules béta pancréatiques. Médecine humaine et pathologie. 2009. dumas-00631109

HAL Id: dumas-00631109

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00631109

Submitted on 11 Oct 2011

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

2009 **N°**

Rôle du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans l'apoptose des cellules β pancréatiques

---

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLÔME D'ETAT

Sandrine CORNALI LABLANCHE
Née le 20 Mai 1979 à S^{t} Etienne (42)

Thèse soutenue publiquement à la faculté de médecine de Grenoble* le 6 Novembre 2009 devant le jury composé de :

Président du jury :

M. le P^{r} S. HALIMI

Membres :

M. le P^{r} P.Y. BENHAMOU
M. le P^{r} E. FONTAINE
M. le D^{r} F. BAYLE

** La faculté de médecine n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

REMERCIEMENTS

M. le Pr S. HALIMI

Merci d'avoir accepter d'assurer la présidence de ce jury.
Merci pour l'enseignement clinique et scientifique précieux dispensé aux cours de ces années de formation. A son contact, j'ai découvert et appris la richesse de la Diabétologie que je pensais initialement ennuyeuse et routinière.

M. le Pr P.Y BENHAMOU

Merci pour l'initiation, la direction et l'encadrement scientifique de ce travail.
Merci pour son oreille bienveillante et attentive, ses conseils avisés et l'attention portée à l'organisation de mon cursus. J'ai appris à ses côtés à exercer une médecine rigoureuse, critique et surtout profondément humaine.

M. le Pr E. FONTAINE

Merci pour la direction scientifique, méthodologique et pédagogique de ce travail.
Merci pour sa disponibilité, son soutien et ses encouragements dans les moments difficiles de cette année de recherche.
Merci de m'avoir initiée avec beaucoup de patience à la recherche fondamentale.

M. le Dr F. BAYLE

Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

L'équipe du Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

Me C. CHAUVIN pour son expertise en matière de culture cellulaire et la formation apportée à la technique de spectrofluorométrie.
Me C. COTTET pour la formation dispensée en matière de microscopie confocale, de cytométrie en flux et d'analyse d'images.
Me C. GONZALEZ pour la formation apportée aux techniques de culture cellulaire.

Les personnalités médicales et paramédicales rencontrées au cours de mes études

Merci pour leur compagnonnage, leur enseignement et leur collaboration.

M. Olivier LABLANCHE

Merci pour son soutien sans faille depuis le début des mes études de Médecine.
Merci de supporter (dans les deux sens du terme) tous mes projets professionnels.
Merci pour sa présence et sa disponibilité au quotidien qui permettent que la vie reste facile et agréable malgré les emplois du temps chargés.
Merci pour toutes ces soirées de formation aux outils informatiques qui font que je suis désormais capable de rendre un manuscrit décent.

Mes parents

Merci pour leur soutien et leurs encouragements. J'espère avoir été à la hauteur de la confiance qu'ils m'ont accordée.

Ma famille et mes proches en général et plus particulièrement

Merci à Dominique, mon beau-père pour sa présence, ses encouragements, sa disponibilité et les soins attentifs dispensés à notre fils quand ses parents sont absents ou occupés par leur travail.

Merci à Isabelle et Jean-Pierre O. pour leur soutien permanent.

THESE soutenue par Sandrine CORNALI LABLANCHE

TITRE

« Rôle du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans l'apoptose des cellules β pancréatiques »

CONCLUSION

Notre travail a permis d'étudier la régulation du Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale (PTP) sur un modèle murin de cellules β (INS-1) et d'identifier la Cyclosporine A et la Metformine comme deux inhibiteurs du PTP des cellules INS-1.

Nous avons montré que le D-Glucose (30 mM) et le D-Fructose (2,5 mM), aux concentrations portales telles que les voient les îlots pancréatiques au cours de la greffe, induisent un surcroît de mortalité (Mortalité cellulaire multipliée par trois) via une ouverture du PTP.

Nous avons identifié que la Cyclosporine A et la Metformine en inhibant l'ouverture du PTP, préviennent la mort cellulaire induite par le D-Glucose et le D-Fructose.

Ce travail a permis de préciser :

- **la régulation du PTP sur un modèle de cellule β.**
- **les voies d'agression auxquelles peuvent être soumis les îlots pancréatiques au cours de la greffe, notamment par l'identification de la cytotoxicité du D-Fructose.**

Enfin, même si ces résultats doivent être validés sur l'îlot humain, notre travail permet d'envisager le PTP comme une cible thérapeutique intéressante pour tenter de préserver la viabilité des cellules β pancréatiques au cours de la greffe d'îlots de Langerhans.

Les perspectives de notre travail sont désormais de valider notre modèle sur l'îlot humain en étudiant l'effet des fortes concentrations de glucose et de fructose, de la Cyclosporine A et de la Metformine sur le PTP de la cellule β humaine. Nous prévoyons également d'étudier l'implication du PTP dans les mécanismes d'apoptose induite par les phénomènes d'ischémie-reperfusion sur des cellules INS-1 et sur des îlots humains.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER : **GRENOBLE, le** 8 oct 2009.

LE DOYEN :

Pr B. SELE

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE 1 U.F.R. DE MEDECINE

LE PRESIDENT DU JURY :

Pr S. HALIMI

Pr. Serge HALIMI
Endocrinologie-Diabétologie
Nutrition
C.H.U. de GRENOBLE
6e A - 2e tranche
B.P. 217 X
38043 GRENOBLE CEDEX

RESUME

L'apoptose des cellules β pancréatiques au cours de la greffe d'îlots est un problème majeur : 50 % du greffon est perdu dans les quinze jours qui suivent la transplantation en raison de phénomènes non spécifiques (Ischémie-reperfusion, glucotoxicité...). Le pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) est un complexe protéique mitochondrial impliqué dans la mort cellulaire. Sa régualtion n'a, à ce jour, jamais été explorée sur des cellules pancréatiques endocrines.

Nous avons étudié la régulation du PTP sur un modèle murin de cellules β (INS-1) et l'implication du PTP dans la mort cellulaire induite par 30 mM de D-Glucose et par 2,5 mM de D-Fructose sur ce type cellulaire.

Nous montrons que la Cyclosporine A, l'inhibiteur de référence du PTP, et la Metformine inhibent l'ouverture du PTP sur des cellules INS-1 perméabilisées et sur des cellules INS-1 intactes. De plus, nous décrivons qu'une exposition des cellules INS-1 intactes à 30 mM de D-Glucose ou à 2,5 mM de D-Fructose induit une ouverture du PTP et une majoration de la mort cellulaire des INS-1. Enfin, nous montrons que la Cyclosporine A et la Metformine, en inhibant l'ouverture du PTP, réduisent la mort cellullaire induite par le D-Glucose et le D-Fructose.

Nous concluons que la cytotoxicité induite par le D-Glucose et le D-Fructose passe par une ouverture du PTP et que la mort cellulaire induite par le D-Glucose et le D-fructose peut être prévenue par la Cyclosporine A et la Metformine via une inhibition du PTP.

Ainsi, cibler le PTP dans la greffe d'îlots de Langerhans peut être une stratégie intéressante pour préserver la viabilité des cellules β au cours de cette procédure.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION 9

A. LE DIABETE DE TYPE 1 9

B. LA TRANSPLANTATION D'ILOTS DE LANGERHANS 9

1. Introduction 9

2. Principes généraux de la transplantation d'îlots de Langerhans 10

3. Résultats de la transplantation d'îlots de Langerhans 11

4. Les obstacles à la généralisation de la transplantation d'îlots 15

C. LA MORT CELLULAIRE 16

1. Définition 16

2. La nécrose 16

3. L'apoptose 17

4. Les mécanismes d'activation de l'apoptose 18

D. LE PORE DE TRANSITION DE PERMEABILITE MITOCHONDRIALE 20

E. PTP ET CELLULES BETA PANCREATIQUES 23

II. OBJECTIFS 25

III. MATERIEL ET METHODES 26

A. CULTURE CELLULAIRE 26

1. Type cellulaire 26

2. Conditions de culture 26

B. ETUDE DE LA REGULATION DU PTP 27

1. Etude de la régulation du PTP par méthode de rétention calcique sur INS-1 perméabilisées . 27

2. Etude de la régulation du PTP par microscopie confocale sur INS-1 intactes 28

C. ETUDE DE LA MORT CELLULAIRE 31

1. Induction de la mort cellulaire et traitement par les inhibiteurs du PTP 31

2. Quantification de la mort cellulaire par cytométrie en flux 32

D. ANALYSE D'IMAGES 35

E. ANALYSE STATISTIQUE 35

IV. RESULTATS 36

A. ETUDE DE LA REGULATION DU PTP SUR CELLULES PERMEABILISEES 36

B. ETUDE DE LA REGULATION DU PTP SUR CELLULES INTACTES 37

1. Effet de la Cyclosporine A et de la Metformine sur le PTP 37

2. Effet de l'hyperglycémie et de l'hyperfructosémie sur le PTP 43

3. Effet de la CsA et de la Metformine sur l'ouverture du PTP induite par 30 mM de glucose 44

4. Effet de la CsA et de la Metformine sur l'ouverture du PTP induite par 2,5 mM de fructose .. 46

C. EFFET DU D-GLUCOSE SUR LA VIABILITE DES CELLULES INS-1 48

D. EFFET DES INHIBITEURS DU PTP SUR LA MORT CELLULAIRE INDUITE PAR LE GLUCOSE. 49

E. EFFET DU D-FRUCTOSE SUR LA VIABILITE DES INS-1 51

F. EFFET DES INHIBITEURS DU PTP SUR LA MORT CELLULAIRE INDUITE PAR LE FRUCTOSE 52

V. DISCUSSION 54

VI. CONCLUSION 60

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 61

I. INTRODUCTION

A. Le diabète de type 1

En France, le diabète de type 1 touche 0,5 % de la population totale et environ 10 % des patients diabétiques. On dénombre actuellement 13,74 nouveaux cas de diabète de type 1 pour 100 000 habitants par an en France. L'incidence du diabète de type 1 est très faible avant l'âge de 1 an. Elle augmente ensuite avec l'âge, avec un pic entre 4 et 6 ans, un second, plus important entre 10 et 14 ans et enfin un troisième pic entre 30 et 40 ans. La prévalence du diabète de type 1 varie d'un pays à l'autre avec un gradient Nord-Sud.

Le diabète de type 1 est une maladie métabolique chronique résultant de la destruction sélective, par le système immunitaire, des cellules β des îlots de Langerhans. La destruction des cellules β aboutit à une déficience insulino-sécrétoire totale responsable de l'apparition d'une hyperglycémie chronique exposant le patient à des risques de complications métaboliques, macroangiopathiques et microangiopathiques [1-3]. Cette déficience insulino-sécrétoire impose la mise en route d'une insulinothérapie exogène, à la fois vitale sur le plan métabolique et essentielle pour la prévention des complications dégénératives [4].

B. La transplantation d'îlots de Langerhans

1. Introduction

La recherche thérapeutique en matière de diabète de type 1 vise le même objectif général : prévenir les complications chroniques et invalidantes de la maladie en restaurant une glycémie la plus normale possible, le plus tôt possible et le plus longtemps possible. Parmi les principales

pistes de recherche moderne dans le domaine du diabète de type 1, s'est développée depuis une quinzaine d'années, la greffe d'îlots de Langerhans. Cette technique consiste à transplanter au patient diabétique de type 1 un tissu endocrine capable de sécréter de l'insuline : les îlots de Langerhans.

2. Principes généraux de la transplantation d'îlots de Langerhans

La technique de transplantation d'îlots de Langerhans [5] débute par le prélèvement minutieux (sans effraction de la capsule pancréatique) du pancréas d'un donneur cadavérique dans le cadre d'un prélèvement multi-organes. Le pancréas est acheminé dans les plus brefs délais vers le laboratoire d'isolement dans un liquide de conservation réfrigéré. Le pancréas est ensuite soumis à une digestion enzymatique (collagénase). Le digestat est purifié par une centrifugation en gradient de densité de façon à séparer les îlots de Langerhans du reste du pancréas exocrine. On obtient une préparation constituée de 90% d'îlots pancréatiques qui peut être immédiatement administrée au patient, maintenue en culture pendant 8 à 15 jours ou cryoconservée. L'attitude actuelle consiste à favoriser la transplantation rapide (quelques heures) des îlots de façon à minimiser la perte de tissu. Le greffon ainsi obtenu est infusé directement dans la veine porte du receveur, par voie transcutanée, sous contrôle échographique. Les îlots (50 à 500 µm) sont arrêtés par leur taille au niveau du parenchyme hépatique. Une revascularisation propre se développe dans les quinze jours suivant la transplantation.

Concernant la morbidité de la transplantation d'îlots, on dénombre 9 % de complications hémorragiques et 4 % de thrombose de la veine porte [6].

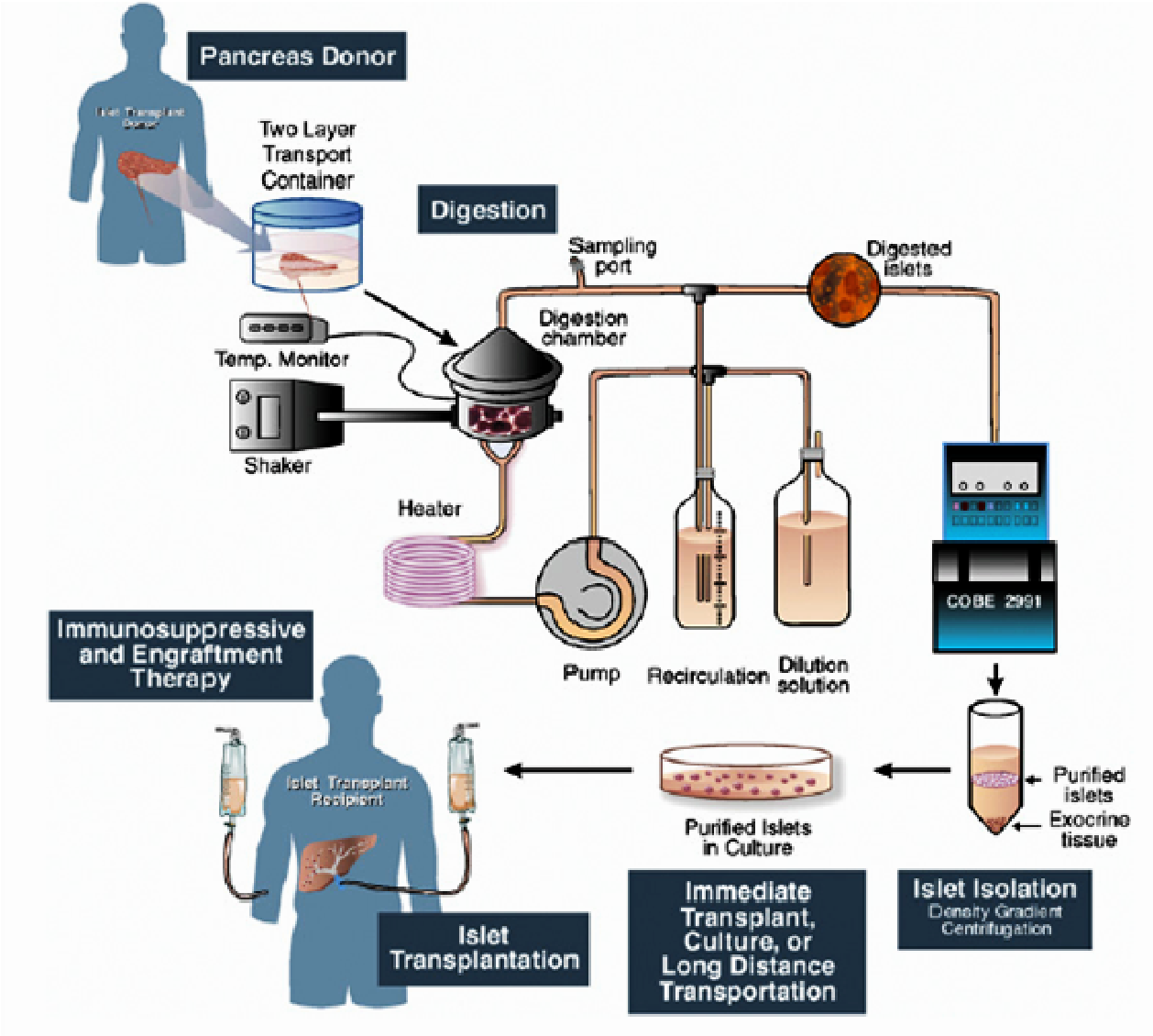


Figure 1: La transplantation d'îlots de Langerhans.

(Issue de "Current status of pancreatic islet transplantation. Merani S, Shapiro AM. Clin Sci (Lond).2006 Jun; 110(6):611-25".)

3. Résultats de la transplantation d'îlots de Langerhans

La transplantation d'îlots de Langerhans a pris un élan en 2000 avec la publication des résultats de l'équipe canadienne d'Edmonton [7]. Ce groupe a appliqué un traitement par greffe itérative d'îlots allogéniques, chez des patients diabétiques de type 1 présentant un diabète instable avec hypoglycémies sévères, en utilisant un nouveau protocole d'immunosuppression dit d'Edmonton (Eviction des corticostéroïdes, induction immunosuppressive par un anticorps anti

récepteur de l'interleukine 2, maintenance par l'association de sirolimus et de tacrolimus à faible dose).

Ryan et *al* d'Edmonton ont récemment publié les résultats d'une série de 65 cas de transplantation d'îlots [8]. Ces données canadiennes sont corroborées par l'expérience grenobloise et du réseau GRAGIL [44].

a. Résultats concernant l'obtention de l'insulino-indépendance

L'insulino indépendance est définie par ce groupe comme un sevrage complet de toute insulinothérapie exogène pendant au moins 4 semaines et l'absence de glycémie capillaire supérieure à 10 mmol/L plus de deux fois par semaine.

Sur les 65 patients transplantés, 47 ont connu une période d'insulino-indépendance.

- 94 % des patients ont connus une période d'insulino-indépendance d'au moins 1 mois
- 80 % des patients restent insulino-indépendants à un an
- 10 % des patients demeurent insulino-indépendants à 5 ans (Fig.2)

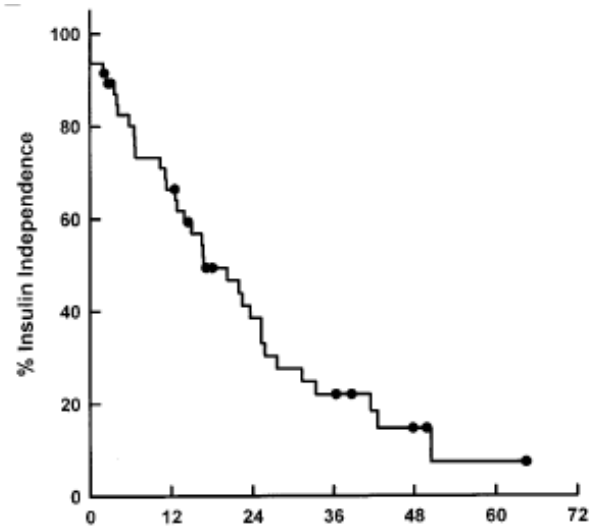


Figure 2 : Evolution de l'insulino-indépendance en fonction du temps après greffe d'îlots de Langerhans.

(Issu de Ryan et al. (2005) Five-year follow-up after clinical islet transplantation. Diabetes 54, 2060–2069)

b. Résultats concernant la restauration d'une insulino-sécrétion

Tous les patients transplantés restaurent un C-Peptide positif (>0,35 nmol/L) en post-greffe.

80 % des patients conservent un C-Peptide positif 5 ans après la greffe d'îlots (Fig.3) ; ce C-Peptide positif n'étant cependant pas suffisant pour maintenir une insulino-indépendance chez la majorité des patients.

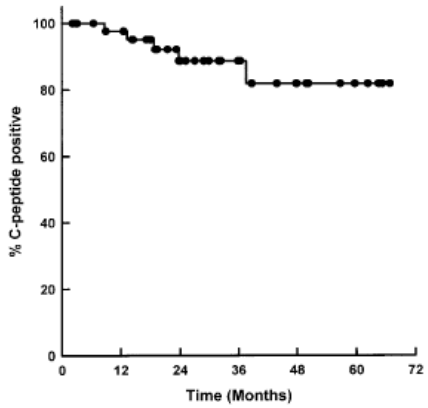


Figure 3 : Evolution du C-Peptide en fonction du temps après greffe d'îlots de Langerhans.

(Issu de Ryan et al. (2005) Five-year follow-up after clinical islet transplantation. Diabetes 54, 2060–2069)

c. Résultats concernant l'équilibre glycémique

L'équilibre glycémique varie considérablement en fonction du succès de la greffe (Fig.4) :

- Les patients, rendus insulino-indépendants par la greffe d'îlots, présentent une nette amélioration de leur équilibre glycémique avec une HbA1c moyenne au terme du suivi de l'ordre de 6,4 % Vs 9,3 % en pré-greffe.

- Les patients ayant dû reprendre une insulinothérapie exogène en post-greffe mais conservant un C-Peptide positif présentent une HbA1c sensiblement identique à la population précédente (HbA1c = 6,7 %).

- Les patients ayant dû reprendre une insulinothérapie exogène en post-greffe et présentant un C-Peptide indosable n'améliorent pas leur équilibre glycémique. (HbA1c = 9 %)

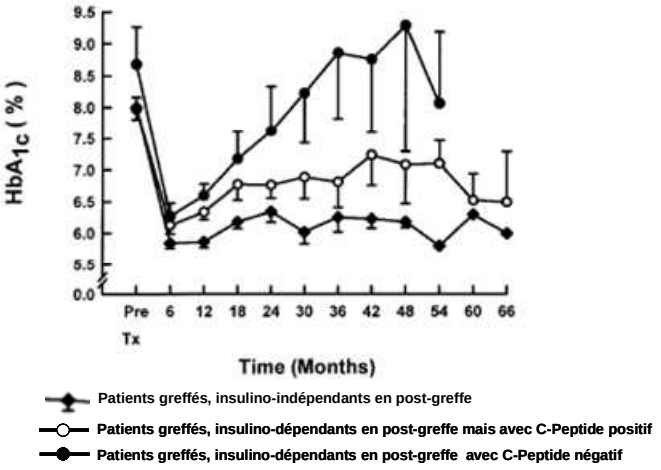


Figure 4 : Évolution de l'hémoglobine glyquée au cours du temps après greffe d'îlots de Langerhans.
(Issu de Ryan et al. (2005) Five-year follow-up after clinical islet transplantation. Diabetes 54, 2060–2069)

d. Résultats concernant l'instabilité glycémique et la survenue d'hypoglycémies

La survenue d'hypoglycémies est évaluée par ce groupe par l'HYPO score : l'HYPO score est un score composite d'évaluation des hypoglycémies basé sur la mesure de la fréquence, de la sévérité et du degré de perception des hypoglycémies par le patient.

L'HYPO score est nettement diminué grâce à la transplantation d'îlots (Fig.5).

L'instabilité glycémique, évaluée par le LI score, est également nettement amélioré au cours de la transplantation d'îlots (Fig.5).

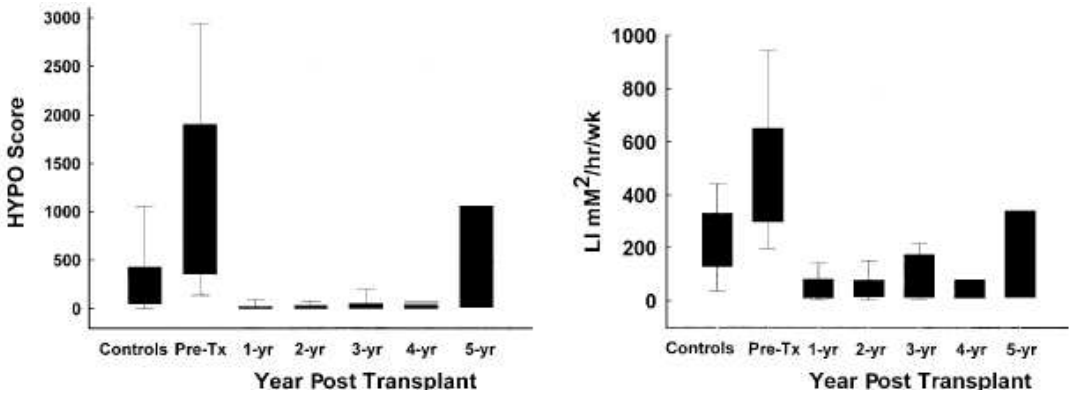


Figure 5 : Evolution de l'HYPO Score et du LI Score en fonction du temps après greffe d'îlots de Langerhans.
(Issu de Ryan et al. (2005) Five-year follow-up after clinical islet transplantation. Diabetes 54, 2060–2069)

4. Les obstacles à la généralisation de la transplantation d'îlots

Si l'on hiérarchise les obstacles à la généralisation de la transplantation d'îlots pancréatiques comme thérapeutique du diabète de type 1, trois ordres d'écueils se dégagent :

- Ceux tenant à la difficulté d'obtenir de manière standardisée et reproductible une large quantité d'îlots à partir d'un pancréas humain ; c'est là tout le sens des recherches conduites dans le domaine des cellules souches et de la régénération des cellules ß.

- Ceux liés à la survenue de manifestations de rejet allogénique spécifique et de récurrence du processus auto-immun, représentant un défi majeur pour les immunologistes.

- Ceux liés à des phénomènes inflammatoires non spécifiques affectant la viabilité et la fonctionnalité endocrine des îlots. En effet, on considère que près de la moitié de la masse d'un greffon d'îlots est perdue dans les premières semaines suivant la greffe en raison de ces phénomènes non spécifiques. (Exposition aux cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β), exposition au NO, agression de type ischémie-reperfusion) [9-10].

De plus, les îlots pancréatiques implantés au niveau du foie se retrouvent dans un microenvironnement métabolique et pharmacologique extrêmement différent de leur environnement systémique habituel : les îlots implantés au niveau du foie bénéficient d'une vascularisation essentiellement portale. Les concentrations portales des immunosuppresseurs, du glucose et du fructose entre autres, sont entre 2 à 5 fois plus élevées que leurs concentrations systémiques.

Ainsi, l'exposition des îlots à des concentrations supra-physiologiques de diverses drogues ou nutriments peut être en partie responsable de la perte de viabilité et/ou de fonctionnalité des cellules β.

L'apoptose des cellules β pancréatiques au cours de la greffe d'îlots de Langerhans apparaît donc comme un problème majeur de cette technique.

C. La mort cellulaire

1. Définition

La mort cellulaire est un processus qui conduit à une cessation de l'activité biologique. Contrairement à la quiescence cellulaire qui est aussi caractérisée par une diminution de nombreuses activités biologiques, les modifications qui accompagnent la mort cellulaire sont irréversibles. Il est toutefois difficile de définir à quel instant la cellule a dépassé le point de non retour dans le processus de mort. La mort cellulaire peut être induite par deux mécanismes distincts : **la nécrose** et **l'apoptose.**

2. La nécrose

La nécrose ou « mort cellulaire accidentelle » représente la réponse d'une cellule à d'importantes lésions.

Le processus de nécrose débute par une augmentation du volume cellulaire, une rupture de la membrane cytoplasmique et une autolyse des organites cellulaires.

In vivo, la nécrose génère une réaction inflammatoire.

3. L'apoptose

L'apoptose aussi appelée « **mort cellulaire programmée** » est un processus où la cellule intervient dans sa propre destruction.

Le phénomène d'apoptose peut être un phénomène physiologique : l'apoptose est impliquée dans le développement embryonnaire (où elle participe à la sculpture des organes et des tissus) ou encore dans le contrôle de l'homéostasie du système immunitaire. Des dérégulations de l'apoptose sont associées à de nombreuses pathologies : l'inhibition de l'apoptose est impliquée dans le développement de cancers ou de syndromes lymphoprolifératifs. Son exacerbation est responsable par exemple, de la mort neuronale dans les pathologies neurodégénératives.

L'apoptose est un mécanisme actif qui nécessite l'activation d'une machinerie intracellulaire complexe. L'entrée en apoptose s'accompagne de modification fonctionnelle et structurelle typique : la cellule apoptotique présente un phénotype morphologique particulier qui permet de la distinguer d'une cellule nécrotique : ce phénotype associe une diminution du volume cellulaire, une fragmentation du noyau, une condensation de la chromatine qui peut s'accompagner de l'émission de corps apoptotiques.

L'entrée en apoptose est également caractérisée par une rupture de l'asymétrie de la membrane plasmique : il existe une translocation du résidu phosphatidyl-sérine (PS) du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe de la membrane. Les résidus PS ainsi exposés constituent des signaux pro-phagocytaires pour les cellules spécialisées avoisinantes. Ainsi, les cellules apoptotiques sont éliminées avant que la membrane plasmique ne soit rompue, prévenant la libération de constituants cytoplasmiques impliqués dans le développement du processus inflammatoire.

L'apoptose *in vivo* ne génère donc pas de phénomène inflammatoire.

4. Les mécanismes d'activation de l'apoptose

On distingue classiquement deux voies principales d'activation de l'apoptose :

- **Une voie dite extrinsèque**, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (Fig.6).

- **Une voie dite intrinsèque** mettant particulièrement en jeu la mitochondrie (Fig.7).

Ces deux voies conduisent à l'activation de protéases à cystéine appelées **caspases**, responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés : exposition de la phosphatidylsérine à la surface de la membrane cellulaire, arrêt de la réplication, fragmentation du noyau et du cytosquelette entraînant la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes.

4.1 La voie extrinsèque

La signalisation par le récepteur de mort FAS recrute un complexe composé d'une molécule adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) et de la procaspase-8 : FADD se lie à travers son propre domaine de mort à ceux des récepteurs Fas. FADD contient également un domaine qui se lie à la procaspase-8. La formation de ce complexe FADD-Fas-Procaspase 8 entraîne le clivage de la procaspase 8 qui est alors produite sous sa forme active. La caspase 8 active déclenche la cascade d'activation séquentielle des différentes caspases parmi lesquelles la caspase 3. Ces différentes protéases effectuent le clivage de plusieurs molécules, parmi lesquelles des protéines de structure et des protéines impliquées dans les systèmes de réparation cellulaire.

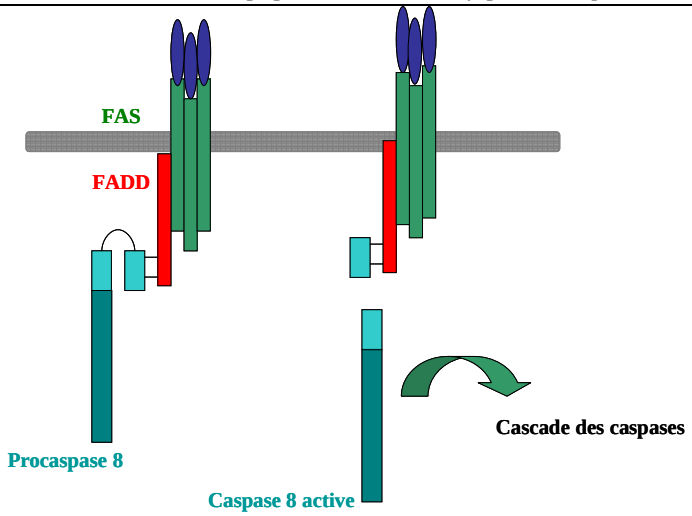


Figure 6 : Voie extrinsèque d'activation de l'apoptose.

4.2 La voie intrinsèque

A coté de leur rôle fondamental dans le métabolisme énergétique, les mitochondries occupent une place majeure dans le processus de mort cellulaire programmée [11]. L'espace inter-membranaire contient de nombreuses protéines pro-apoptotiques dormantes comme le cytochrome c et L'AIF : une fois libéré par la mitochondrie, le cytochrome C se complexe avec APAF-1 et la procaspase 9 pour conduire à l'activation de celle-ci. La caspase 9 active ensuite la procaspase 3 qui déclenche toute la cascade d'activation des caspases.

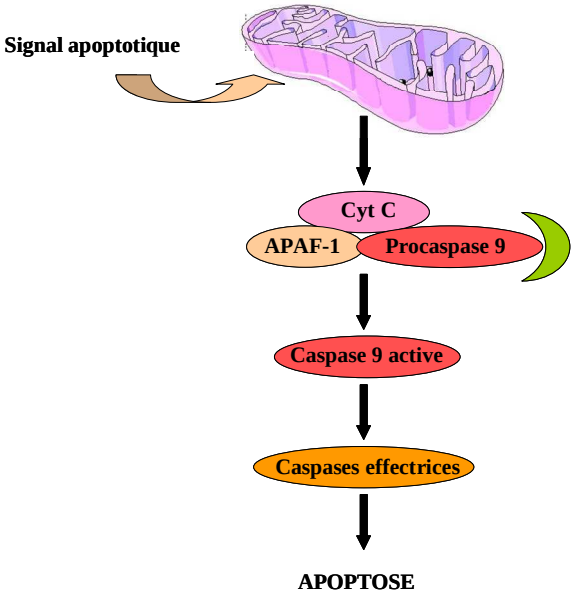


Figure 7 : Voie intrinsèque d'activation de l'apoptose.

Deux voies métaboliques différentes permettent la libération de ces protéines pro-apoptotiques :

- La première est régulée par les protéines de la famille Bcl-2 et aboutit à la formation de larges canaux au sein de la membrane mitochondriale externe.

- La seconde repose sur la rupture de la membrane mitochondriale externe consécutive au gonflement mitochondrial, lui-même consécutif à l'ouverture d'un canal de la membrane mitochondriale interne dénommé **PTP (Permeability Transition Pore)** [12].

D. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale

En condition normale, la membrane mitochondriale interne est imperméable aux molécules électriquement chargées, les échanges ne se faisant que par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques hautement régulés. En conséquence, le milieu matriciel (l'intérieur de la mitochondrie) est chimiquement très différent du cytosol. Ceci permet, entre autre, d'établir un gradient de concentration de protons (la force protomotrice) nécessaire à la synthèse d'ATP.

Dans certaines situations, la membrane interne devient librement perméable à tous les composés dont la taille est inférieure à 1.5 kDa. Cette modification de perméabilité de la membrane interne (appelée ***transition de perméabilité***) est due à l'ouverture en son sein d'un canal non spécifique appelé le Pore de Transition de Perméabilité (**PTP**) [12].

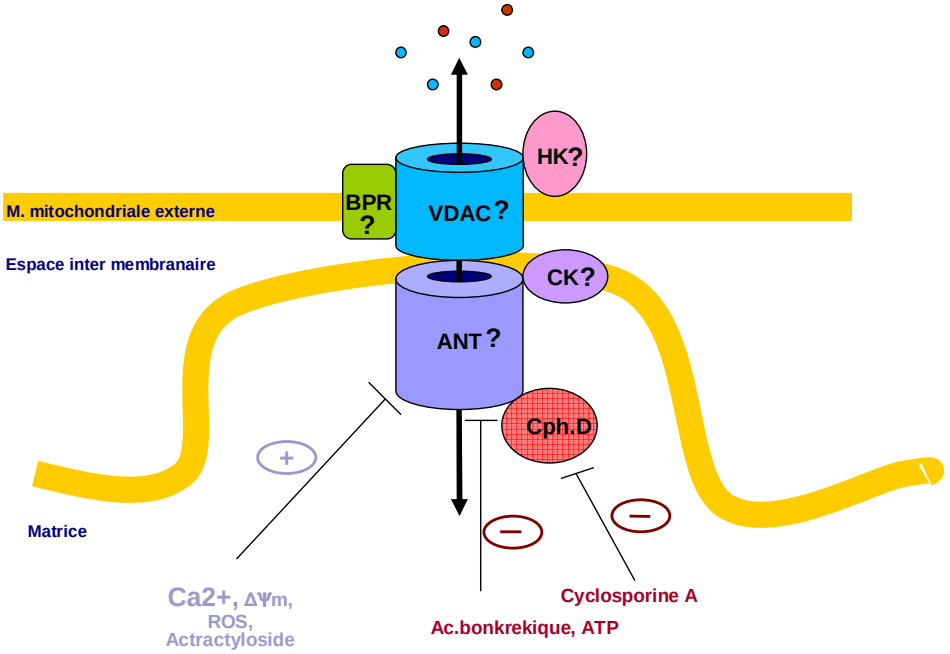
In vitro sur mitochondries isolées, l'ouverture du PTP entraîne :

- Un gonflement mitochondrial (dû à la force osmotique des protéines restant dans la matrice) qui aboutit à la rupture de la membrane externe et à la libération de molécules pro-apoptotiques.

- Une forte production de radicaux libres de l'oxygène [13].

- Un découplement de l'oxydation phosphorylante entraînant un déficit énergétique cellulaire.

La structure moléculaire exacte du PTP reste encore l'objet de débat. Il est admis que le PTP est un complexe multi protéique régulé, entre autre, par des interactions protéines-protéines. Le seul composant unanimement reconnu comme faisant partie du PTP est la cyclophyline D [14-15]. Cette isoforme mitochondriale des cyclophylines favorise la transition de perméabilité. Les autres composants du PTP restent hypothétiques. A titre d'exemple, le transporteur des nucléotides adényliques (ANT), qui est généralement proposé comme étant le cœur du système (la protéine qui forme le canal), n'est pas indispensable à la transition de perméabilité puisque celle-ci persiste chez des mitochondries dépourvues d'ANT [16].



VDAC : Voltage dependent anion channel
ANT : Adénine nucléotide translocase
HK : Hexokinase
BPR : Récepteur Périphérique aux Benzodiazépines
Cph.D : Cyclophiline D
CK : Créatine Kinase

Figure 8 : Représentation schématique du PTP.

A défaut d'avoir identifié la nature moléculaire du PTP, sa régulation est relativement bien connue [12] :

- **Le calcium est l'inducteur majeur de l'ouverture du PTP**. La quantité de calcium nécessaire à l'ouverture du pore varie en fonction de la présence de cofacteurs agissant soit comme activateurs (moins de calcium étant alors requis pour ouvrir le pore), soit comme inhibiteurs (plus de calcium étant requis pour ouvrir le pore). Les autres principaux activateurs physiologiques de l'ouverture du PTP sont le phosphate, la dépolarisation mitochondriale et toutes les situations pro-oxydantes.

- L'inhibiteur pharmacologique de référence du PTP est la **Cyclosporine A** (CsA) qui agit en détachant la Cyclophiline D du reste du PTP. Les principaux inhibiteurs physiologiques de l'ouverture du PTP sont les protons (les situations de pH acide), et les nucléotides adényliques (ATP et ADP). **La Roténone et la Metformine** font partie des inhibiteurs pharmacologiques

connus du PTP : la roténone inhibe le PTP via une inhibition **directe** du complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale. La Metformine entraine, elle, une inhibition du complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale, via **un mécanisme probablement indirect** faisant intervenir une interaction avec la membrane plasmique.

Enfin, il faut savoir qu'il existe des **spécificités de régulation en fonction des tissus**. Si le calcium est toujours l'inducteur majeur de l'ouverture du PTP, l'action des autres cofacteurs peut varier considérablement d'un type cellulaire à l'autre [17]. Il est donc **fondamental** de vérifier pour chaque type cellulaire l'action réelle des cofacteurs et des drogues supposés réguler le PTP.

E. PTP et cellules β pancréatiques

La littérature concernant le PTP dans la cellule β est assez pauvre. Koshkin *et al.* [18] ont étudié la régulation du PTP dans les cellules MIN6 et INS-1 (des modèles cellulaires murins correspondant aux cellules β) et retrouvent bien un effet inhibiteur de la Cyclosporine A.

Concernant l'implication du PTP dans la mort cellulaire des cellules β :

- La mort cellulaire induite par le PK11195 (un ligand du récepteur périphérique des benzodiazépines) est inhibée par l'acide bonkrekique (un inhibiteur connu du PTP) laissant penser que le PTP pourrait être impliqué dans ce mécanisme d'apoptose [19].

- L'IL-1 induit un relargage du cytochrome c dans les cellules RINm5F (insulinome de rat) qui est partiellement prévenue par la Cyclosporine A [21]. Deux travaux provenant d'équipes différentes indiquent que la mort cellulaire des cellules β induite par les cytokines inflammatoires s'accompagne d'une dépolarisation mitochondriale [20-21]. Cette dernière pourrait être due à l'ouverture du PTP, mais ceci n'est pas démontré dans

ces articles, ni par l'utilisation d'inhibiteur du PTP, ni par une mesure directe de l'ouverture du PTP.

- La toxicité du NO sur les cellules RINm5F implique les mitochondries (sortie cytochrome c) et est partiellement sensible à la Cyclosporine A soutendant un rôle du PTP dans le mécanisme de mort cellulaire induite par le NO [22].

En revanche, dans d'autres types cellulaires que les cellules β pancréatiques, l'ischémie-reperfusion, la glucotoxicité, l'effet du NO et des cytokines ont été largement étudiés. L'ischémie-reperfusion combine plusieurs conditions favorables à l'ouverture du PTP (surcharge calcique, surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, consommation des nucléotides adényliques et accumulation de phosphate). Plusieurs travaux effectués sur des cellules neuronales, myocardiques ou vasculaires ont montré que l'ischémie-reperfusion, lorsqu'elle se prolonge, est responsable d'une ouverture du PTP entraînant la mort cellulaire par apoptose [23]. L'effet des cytokines a lui aussi largement été étudié sur différents modèles cellulaires et semble impliquer le PTP, notamment dans les cellules hépatiques [24]. L'effet du NO sur le PTP est variable selon le type cellulaire étudié : si dans la majorité des cas, le NO favorise l'ouverture du PTP, dans d'autres cellules, il l'inhibe [25]. Enfin, la toxicité du glucose sur les cellules vasculaires implique le PTP (probablement via des phénomènes de stress oxydant) et est prévenue par différents inhibiteurs du PTP [26].

II. OBJECTIFS

S'il est clair que la cellule β possède un PTP et que les phénomènes potentiellement responsables de la mort cellulaire sont connus pour impliquer le PTP dans plusieurs modèles cellulaires, leurs effets directs sur le PTP de la cellule β demandent à être précisés.

Notre projet vise donc à étudier l'effet du glucose et du fructose sur un modèle murin de cellules β en culture (INS-1) afin de répondre à trois questions:

- **Ces situations induisent-elles une apoptose des cellules β ?**
- **Si oui, cette apoptose est-elle liée à une ouverture du PTP ?**
- **Enfin, les inhibiteurs du PTP préviennent-ils la mort cellulaire des cellules β exposées à ces situations ?**

Nous avons, dans un premier temps, étudié la régulation du PTP afin de préciser :

- **L'effet des inhibiteurs connus du PTP (Cyclosporine A, Roténone et Metformine) sur notre type cellulaire.**
- **L'effet de 30 mmol/l de glucose et de 2,5 mmol/l de fructose sur l'ouverture du PTP des cellules INS-1.**

Une fois la régulation du PTP connue dans notre type cellulaire, nous avons testé l'effet du glucose et du fructose sur la viabilité des cellules β.

Enfin, nous avons évalué l'effet de la Cyclosporine A et de la Metformine sur la mort cellulaire induite par le glucose et le fructose.

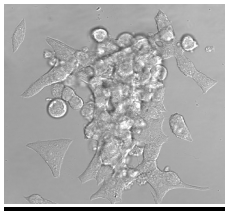
III. MATERIEL ET METHODES

A. Culture cellulaire

1. Type cellulaire

Les cellules INS-1 ont été généreusement offertes par Mme le Dr F. De Fraipont (CHU de Grenoble).

Les INS-1 sont des lignées cellulaires issues d'insulinome de rat. Leur index de prolifération est relativement bas (temps de doublement proche de 100 h). Les INS-1 présentent des caractéristiques morphologiques typiques de cellules β natives (granules de sécrétion à centre dense et halo périphérique clair) [27].



INS-1 (lumière transmise)

2. Conditions de culture

Les INS-1 sont cultivées en milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 mM d'HEPES, 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, 2 mM de L-Glutamine, 100 UI/ml de Pénicilline, 100 µg/ml de Streptomycine et 50 µM de 2-Mercaptoéthanol. Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence à 37°C dans une atmosphère humide (5% de $C0_2$). A confluence, les cellules sont récoltées après trypsinisation (0,05 % Trypsine - 0,02 % EDTA, 1 ml pour 5-15 millions de cellules) par centrifugation à 100 *g* à 4°C pendant 5 min puis comptées à l'aide d'une cellule de Mallassez [27].

B. Etude de la régulation du PTP

1. Etude de la régulation du PTP par méthode de rétention calcique sur INS-1 perméabilisées

Les INS-1 sont incubées dans leur milieu RPMI 1640 complet habituel. Les cellules sont ensuite perméabilisées par une incubation pendant deux minutes à 25°C dans un milieu contenant 10 mM de Tris Mops (PH 7,4), 250 mM de sucrose, 1 mM de Pi, 5 mM de Succinate ou 5 mM de Glutamate/2,5 mM de Malate et 50 µg/ml de Digitonine.

Pour tester l'effet des inhibiteurs connus du PTP sur les INS-1, 1 µM de Cyclosporine A ou 1,25 µM de Roténone sont ajoutés à ce milieu. Pour tester l'effet de la Metformine sur l'ouverture du PTP, les INS-1 sont incubées une nuit en présence de 100 µM de Metformine.

L'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale est induite par l'addition régulière de pulse de 12,5 µM de calcium sur les cellules INS-1 perméabilisées à la Digitonine. Sous ce protocole, à chaque pulse de calcium, les mitochondries captent et retiennent le calcium. Lorsque la concentration de calcium intra-mitochondrial nécessaire à l'induction de la perméabilité de transition est atteinte, on assiste à une ouverture du PTP matérialisée par un relargage de calcium dans le milieu extérieur (Fig.9). Les mesures de Ca^{2+} nécessaires à l'ouverture du pore, sont déterminées fluorométriquement par l'utilisation d'un spectrofluorimètre PTI Quantamaster C61 en présence de 0,25 µM de Calcium Green-5N (Molecular Probes, Eugene, OR, Excitation 506 nm - Emission 527 nm).

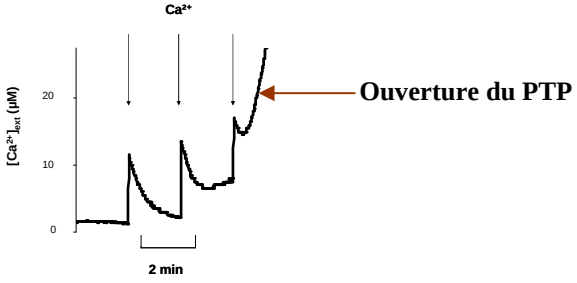


Figure 9 : Capacité de rétention calcique des INS-1.

2. Etude de la régulation du PTP par microscopie confocale sur INS-1 intactes

Principe de la Microscopie Confocale à Balayage Laser

L'inconvénient majeur de la microscopie à fluorescence conventionnelle est sa perte de résolution axiale due à la superposition d'informations issues des plans adjacents.

La microscopie confocale a permis de pallier cet inconvénient puisque son principe est de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans le plan focal. Le principe général de cette approche est schématisé sur la figure 10 : le rayon laser excitateur pénètre dans l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes, auparavant répertoriés et choisis en fonction de leurs propriétés à se fixer sur des molécules particulières d'une structure ou d'un objet d'intérêt. Lors de l'impact optique, il y a émission de rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable (« *trou d'épingle* » ou « *pinhole* »), il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de préparation et d'éliminer le signal provenant d'autres plans. Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leurs longueurs d'onde puis détectés par des photomultiplicateurs ou détecteurs.

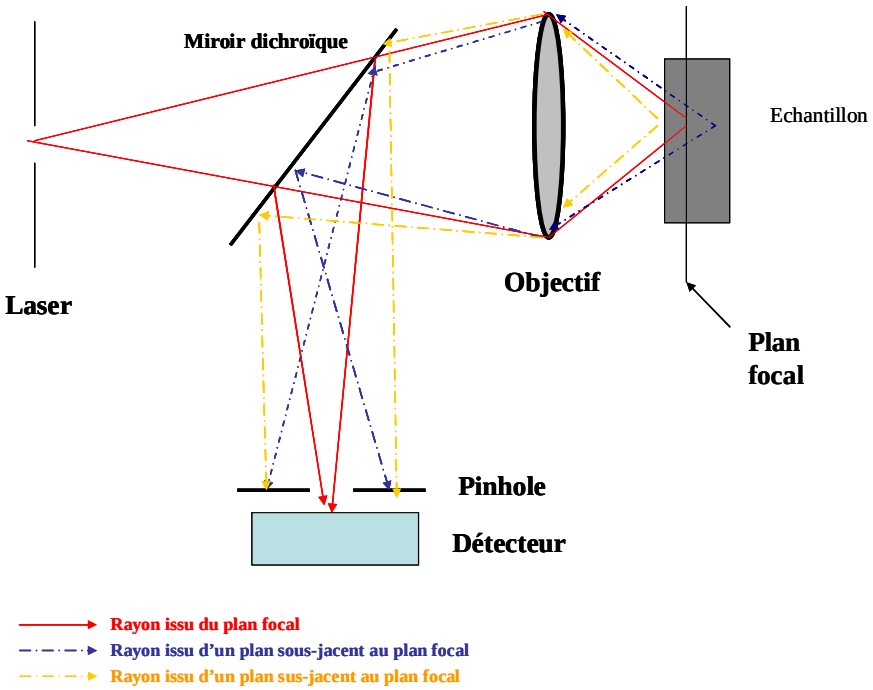


Figure 10 : Principe de la microscopie confocale.

Etude de la régulation du PTP sur cellules intactes

La régulation du PTP, *in vivo*, sur cellules INS-1 intactes a été étudiée selon la méthode décrite par Dumas et *al.* [28] : les cellules sont observées à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SP2 AOBS, LEICA Microsystems Heidelberg, Germany) équipé d'une chambre d'incubation (11 % O_2 - 5 % CO_2 - 37°C, PeCom, Erbach, Germany). Cette chambre d'incubation permet de maintenir des conditions gazométriques et de température optimales garantissant le maintien des cellules en vie pendant toute la durée de l'observation sous microscope.

Les cellules sont incubées pendant 30 min en présence de 10 nM de TMRM (Tétra Méthyl Rhodamine Méthyl Ester) (Excitation 543 nm - Emission 573 nm (Fluorescence orangée)). Le TMRM est une sonde fluorescente cationique lipophile diffusant librement au travers des membranes. Compte tenu de sa charge, le TMRM s'accumule fortement au sein des mitochondries et permet ainsi le marquage des mitochondries polarisées. En cas de dépolarisation mitochondriale,

le TMRM diffuse hors des mitochondries ; on assiste alors à une diminution de l'intensité de fluorescence des mitochondries. Le principe de la technique décrite par Dumas *et al.* consiste à étudier la fluorescence et la localisation du NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) par rapport au signal TMRM : le NADH, substrat du complexe I de la chaine respiratoire, est majoritairement localisé au niveau intra-mitochondrial. Le NADH est auto fluorescent en lumière ultra-violette (Excitation 360 nm - Emission 460 nm (Signal bleu)). Lorsque le PTP est fermé, le NADH majoritairement intra-mitochondrial, est co-localisé avec le signal TMRM. **En cas d'ouverture transitoire du PTP,** le NADH et les protons diffusent hors de la mitochondrie. Les ions H+, sont dans un premier temps repompés par la mitochondrie, assurant ainsi le maintien du potentiel de membrane mitochondrial alors que le NADH demeure hors de la mitochondrie. Il se produit alors une **délocalisation du NADH par rapport au signal TMRM**. **En cas d'ouverture complète et définitive du PTP,** les capacités de captage des ions H+ sont dépassées, le potentiel de membrane s'effondre et l'on assiste à une dépolarisation mitochondriale matérialisée par une diminution de la fluorescence du TMRM (Fig.11).

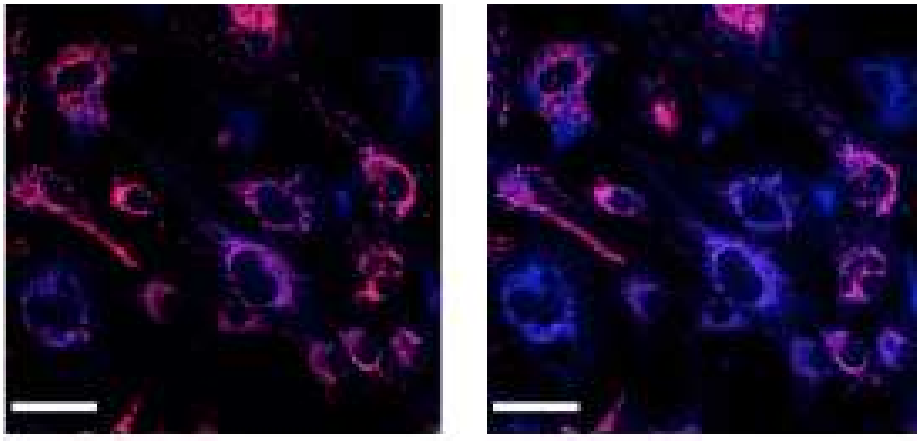


Figure 11 : Ouverture du PTP en microscopie confocale. D'après Dumas et al [28].

Les deux canaux de fluorescence sont observés avec la même ouverture du pinhole (Airy 2) pour s'autoriser à la superposition des images de NADH et de TMRM. L'acquisition des images a nécessité une ouverture de pinhole Airy 2 compte tenu du faible signal d'auto fluorescence du NADH.

Pour déclencher l'ouverture du PTP, les cellules sont exposées à 150 nM d'A23187 (Ionophore à Calcium). Afin d'étudier l'effet des inhibiteurs potentiels du PTP sur les INS-1, les cellules sont incubées avec 1 µM de Cyclosporine A ou 1,25 µM de Roténone 30 min avant l'exposition à l'A23187 ou 100 µM de Metformine 24 heures avant l'exposition à l'A23187.

C. Etude de la mort cellulaire

1. Induction de la mort cellulaire et traitement par les inhibiteurs du PTP

Induction de la mort cellulaire par le D-Glucose

Les INS-1 sont incubées pendant 24 h, 48 h, 72 h en présence de 11 mM (contrôle) ou 30 mM de D-Glucose, en présence ou non de Cyclosporine A 1 µM, de Roténone 1,25 µM ou de Metformine 100 µM. Les cellules sont également incubées 72 h en présence de 11 mM de D-Glucose + 19 mM de D-Mannitol (contrôle osmotique).

Induction de la mort cellulaire par le D-Fructose

Les INS-1 sont incubées pendant 24 h, 48 h, 72 h en présence ou non de 2,5 mM de D-Fructose (équivalent à la concentration portale humaine de fructose) et en présence ou non de Cyclosporine A 1 µM, de Roténone 1,25 µM ou de Metformine 100 µM.

2. Quantification de la mort cellulaire par cytométrie en flux

Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant de faire défiler des cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide.

La cytométrie en flux consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule ou à leur structure interne.

- aux propriétés optiques de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photo-multiplicateurs (PMT), amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur par l'intermédiaire d'une composante informatique et optique (miroir dichroïque et filtre optique).

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un

paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

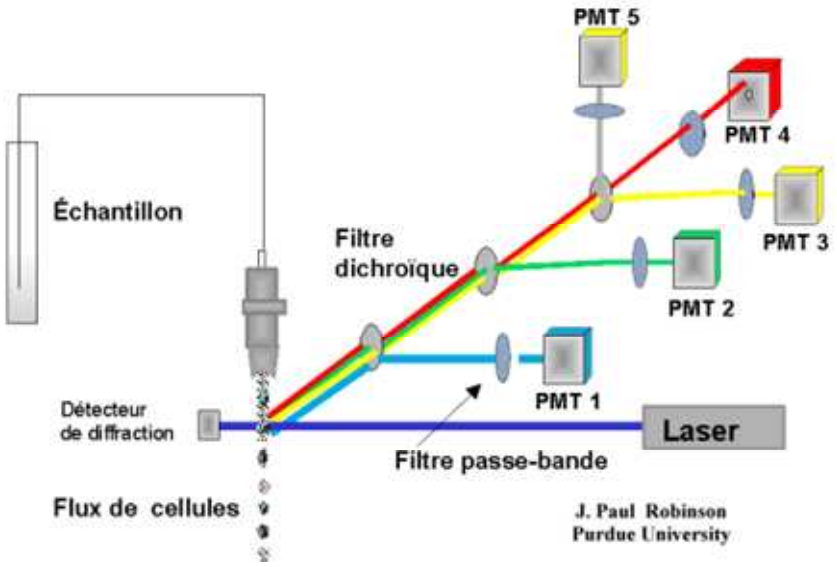


Figure 12: Principe de la cytométrie en flux.

Détection de l'apoptose par cytométrie en flux

Pour la détection de l'apoptose par cytométrie en flux, nous avons utilisé un double marquage des cellules par l'Annexin-V couplée au FluoProbes 488 (Excitation 490 nm - Emission 520 nm) et l'Iodure de Propidium (Excitation 535 nm - Emission 617 nm) (MolecularProbes, Interchim) [29-30].

Les cellules en phase précoce d'apoptose externalisent leurs résidus phospatydilsérines à la surface de leur membrane plasmique. L'Annexin-V se fixe aux résidus phospatydilsérines et permet ainsi le marquage des cellules à tous les stades de l'apoptose. L'Iodure de Propidium (IP) se lie sélectivement et quantitativement au niveau de la structure polynucléotidique de l'ADN en s'intercalant entre les paires de bases nucléotidiques. L'IP ne traverse pas la membrane des cellules vivantes. Au cours de l'apoptose tardive, il existe une fragmentation de la membrane cellulaire permettant l'accès de l'IP à l'ADN. L'IP permet donc le marquage des cellules en cours d'apoptose tardive ou de nécrose.

Pour l'analyse des cellules par cytométrie en flux, les cellules exposées aux différentes conditions d'induction de la mort cellulaire (30 mM glucose, 2,5 mM fructose…) sont récoltées par trypsinisation, centrifugées à 100 *g* pendant 5 min à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans 100 µl de tampon Annexin-V (10 mM HEPES NaOH, pH 7,4, 150 nM de NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ et 1,8 mM de $CaCl_2$). Les cellules sont incubées pendant 15 min à l'abri de la lumière en présence de 5 µl d'Annexin-V FP 488. Les cellules sont ensuite marquées avec 10 µl d'IP à 1mg/ml et analysées immédiatement au cytomètre en flux.

L'acquisition des données (≈ 5 000 cellules/point) est réalisée à l'aide d'un cytomètre en flux FACSCAN (Becton-Dickinson Biosciences, San José, CA) équipé d'un laser argon (15 mW-488 nm). Le logiciel d'acquisition utilisé est CellquestPro (Becton-Dickinson Biosciences).

Le seuil d'analyse pour l'IP et l'Annexin-V FP 488 a été ajusté sur le seuil d'autofluorescence de cellules non marquées. L'analyse a été réalisée à l'intérieur d'une région définie sur le diagramme Taille/Granularité ciblant la population d'intérêt afin de s'amender des débris cellulaires. Les données sont recueillies en fonction de l'intensité de fluorescence sur le canal FL-1 (Annexin-V) et sur le canal FL-3 (Iodure de Propidium).

Le graphique est divisé en quatre régions en fonction de la positivité du signal Annexin V FP 488 ou du signal IP. La population cellulaire Annexin V^- / IP^- correspond aux cellules vivantes. La population Annexin V^+ / IP^- correspond aux cellules en cours d'apoptose précoce. La population Annexin V^+/ IP^+ correspond aux cellules au stade d'apoptose tardive ou aux cellules nécrotiques (Fig.13).

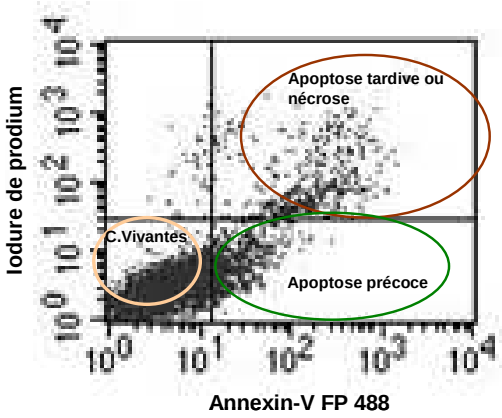


Figure 13 : Cytogramme des cellules INS-1 témoins.

D. Analyse d'images

L'analyse d'image s'est faite à l'aide des logiciels Image J® (logiciel gratuit du NIH Image) et Volocity® (Improvision, France).

Le programme Image J permet de réduire le bruit de fond et d'attribuer la valeur zéro au bruit de fond. Ceci permet par la suite de fixer facilement un seuil d'analyse pour les intensités de fluorescence du NADH et du TMRM : toute valeur différente de zéro sera ainsi prise en compte pour l'analyse des intensités de fluorescence par le logiciel Volocity®.

L'intensité de fluorescence étant dépendante du nombre de cellules présentes dans le champ analysé, nous avons arbitrairement rapporté l'intensité de fluorescence basale à 100 de façon à pouvoir comparer les variations d'intensités de fluorescence de cellules différentes.

E. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± déviation standard. La significativité statistique des différences observées a été analysée en utilisant un test t de Student (apparié ou non apparié). Les valeurs observées ont été considérées comme statistiquement différentes lorsque $p < 0,05$.

IV. RESULTATS

A. Etude de la régulation du PTP sur cellules perméabilisées

L**a Cyclosporine A inhibe l'ouverture du PTP :** en effet, en présence de Cyclosporine A, on constate une augmentation de la quantité de calcium nécessaire à l'ouverture du PTP (Fig.14B).

La Roténone inhibe l'ouverture du PTP avec la même puissance que la Cyclosporine A (Fig.14C).

La Metformine inhibe l'ouverture du PTP avec une puissance intermédiaire par rapport à la Cyclosporine A et à la Roténone (Fig.14D).

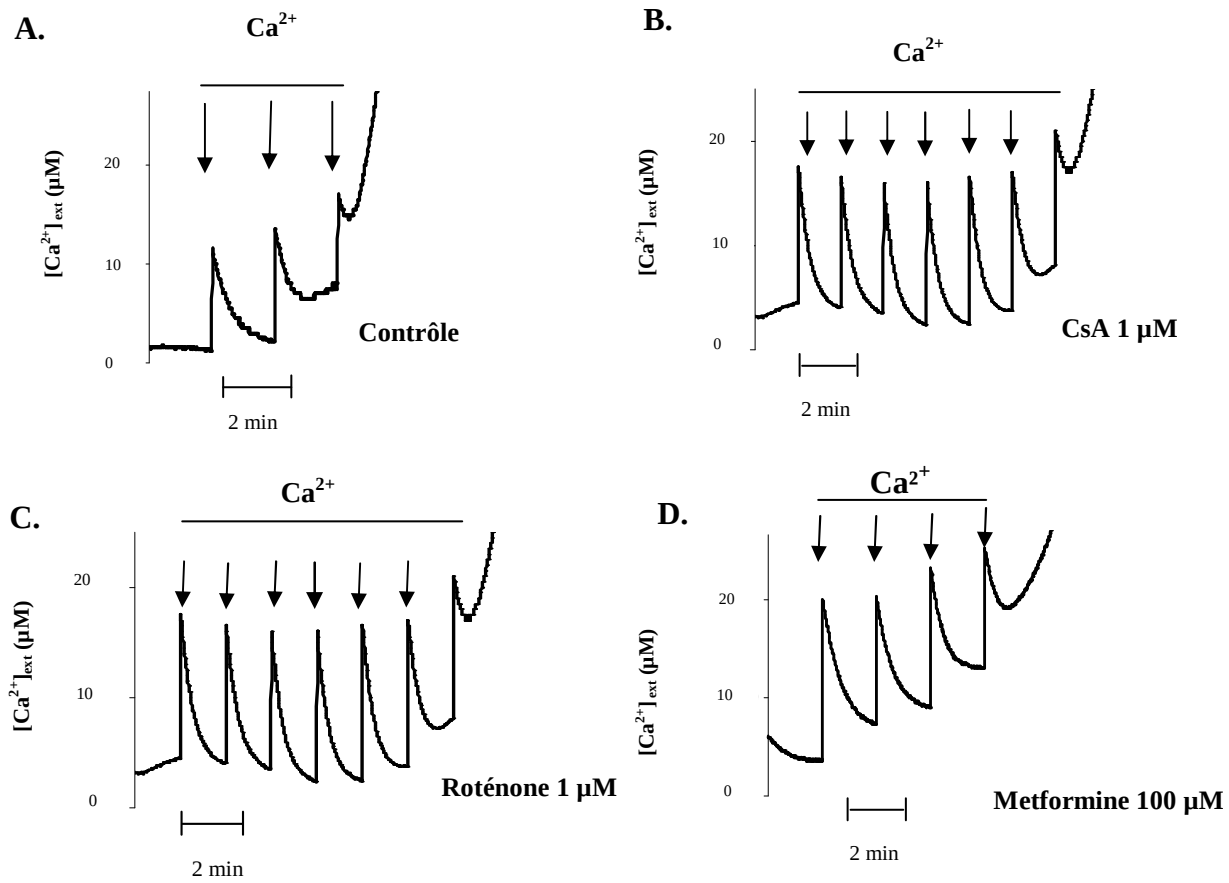


Fig. 14 : Effets de la Cyclosporine A, de la Roténone et de la Metformine sur la capacité de rétention calcique de cellules INS-1 perméabilisées. Les cellules contrôles (A), les cellules exposées à 1 µM de Cyclosporine A (B) ou 1,25 µM de Roténone (C) ou 100 µM de Metformine (D), sont perméabilisées à la digitonine dans un milieu contenant 0,25 µM de Calcium Green. A chaque flèche, 12,5 µM de Ca^{2+} ont été administrées toutes les 2 min. Images représentatives de trois expériences différentes.

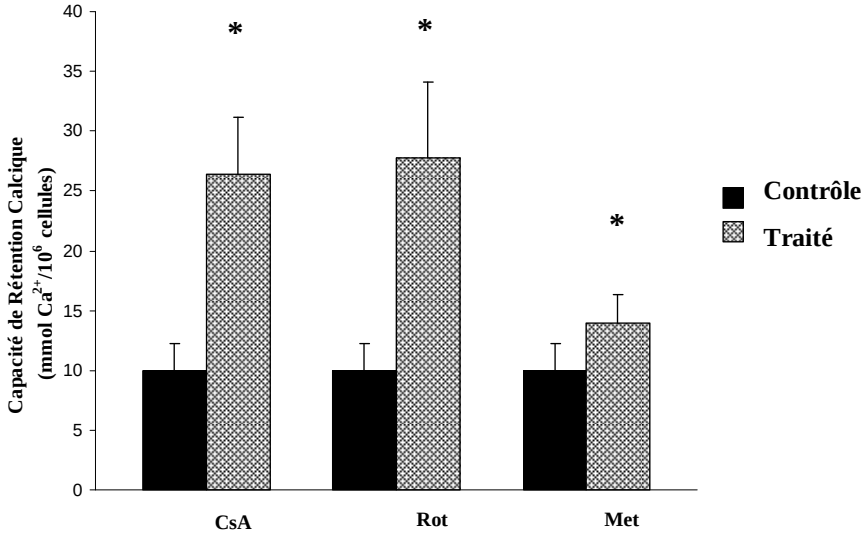


Fig. 15 : Quantification de la capacité de rétention calcique pour chaque condition expérimentale. Chaque barre représente la moyenne ± DS de trois expériences différentes. (* p < 0,05 comparativement aux cellules contrôles).

B. Etude de la régulation du PTP sur cellules intactes

1. Effet de la Cyclosporine A et de la Metformine sur le PTP

A l'état basal et avant addition d'A23187, le NADH est majoritairement localisé au niveau intra-mitochondrial : il existe une co-localisation du signal NADH avec le signal TMRM (Fig. 16.3).

L'ouverture du PTP induite par surcharge calcique (addition de 150 nM d'A23187) conduit à :

- **Une augmentation de l'intensité de fluorescence du NADH** (Fig. 16.4 ; 17A) (100 UA à T0 min, 223,66 UA ± 20,74 30 min après l'administration d'A23187) ($p < 0,05$).

- **Une diminution de l'intensité de fluorescence du TMRM** (Fig.16.5 ; 17A) (100 UA à T0 min, 43,65 UA ± 12,43 30 min après l'administration d'A23187) ($p < 0,05$).

- **Une augmentation de la surface de distribution du NADH par rapport à la surface de distribution du TMRM** (Fig.17B) avec **une augmentation du rapport de surface de NADH/TMRM** (Fig. 17C) témoignant d'une diffusion du NADH hors de la mitochondrie

et donc d'une ouverture du PTP (Surface de NADH : 100 à T0 min, 169,31 ± 12,21 30 min après l'administration d'A23187 ($p < 0,05$) ; Surface de TMRM : 100 à T0 min, 94,6 ± 16,68 30 min après l'administration d'A23187).

Ces caractéristiques (augmentation de l'intensité de fluorescence du NADH, diminution d'intensité de fluorescence du TMRM et augmentation du rapport de surface NADH/TMRM) sont typiques d'une ouverture du PTP (Fig. 17 ; Fig. 16.6).

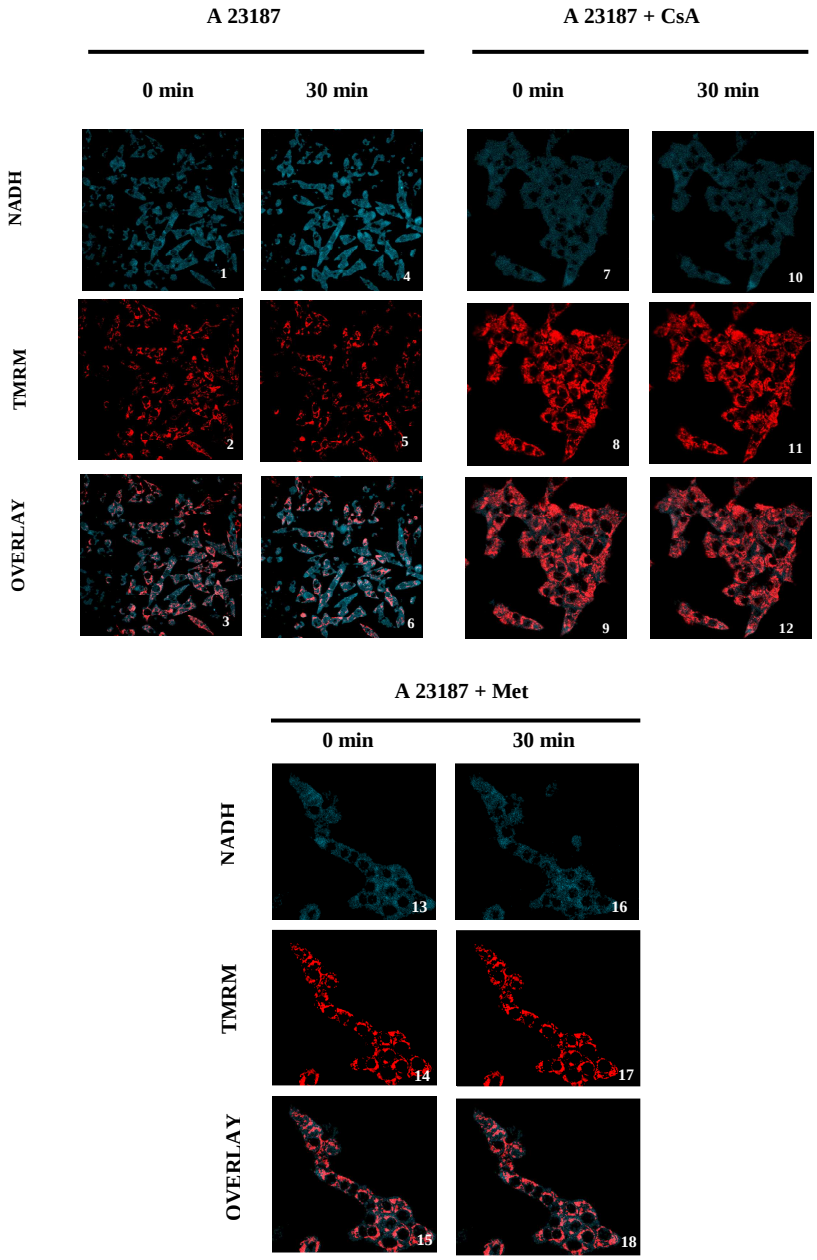


Fig. 16 : Double marquage des cellules INS-1 pour l'autofluorescence du NADH (signal bleu) et le potentiel de membrane mitochondrial (TMRM, signal rouge). Les cellules INS-1, marquées par 10 nM de TMRM, sont exposées à 150 nM d'A23187 en présence ou non de 1 µM de Cyclosporine A ou 100 µM de Metformine. Acquisition des images par microscopie confocale (Objectif 63X à huile, Airy 2). Images représentatives de trois de expériences différentes.

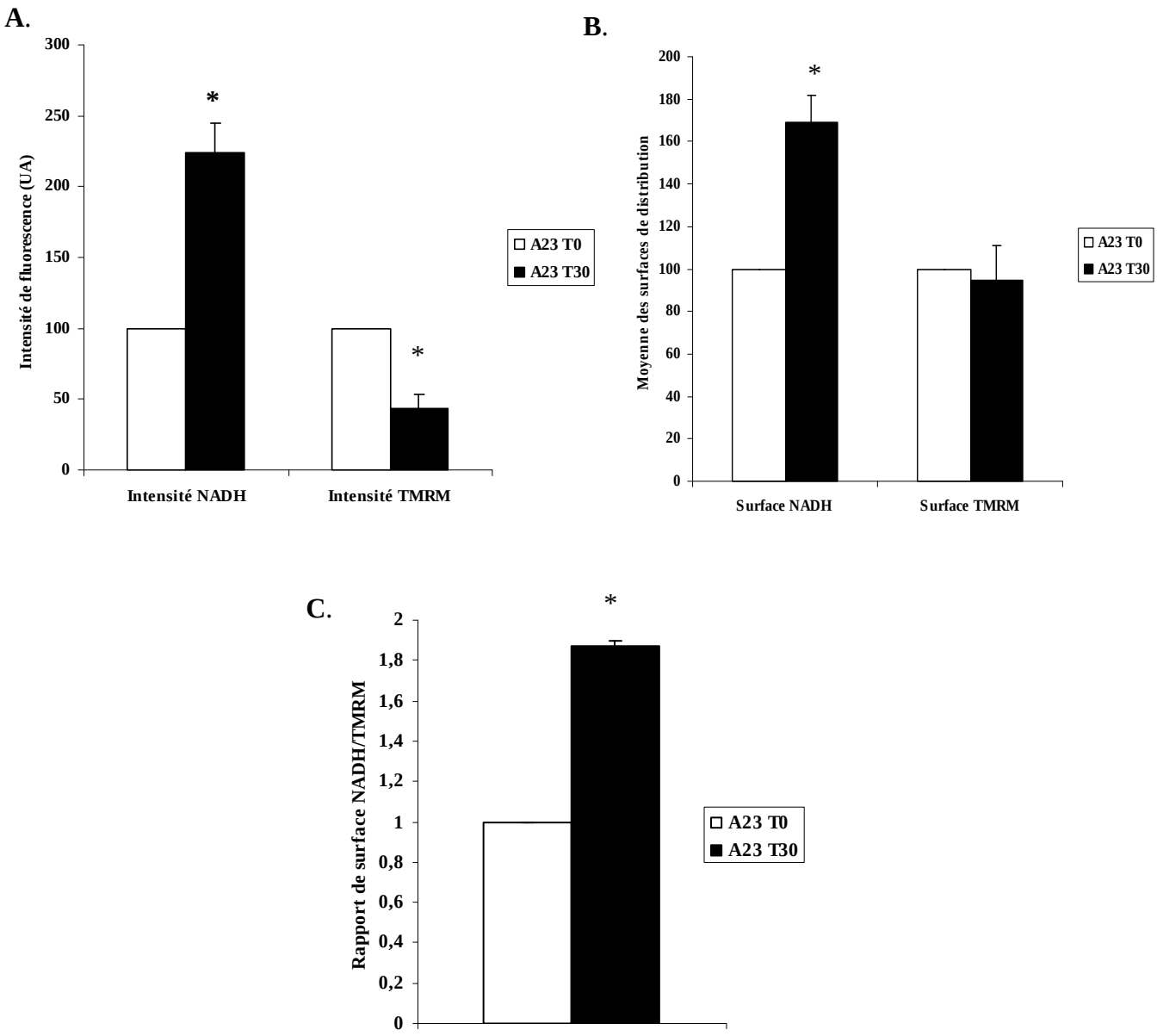


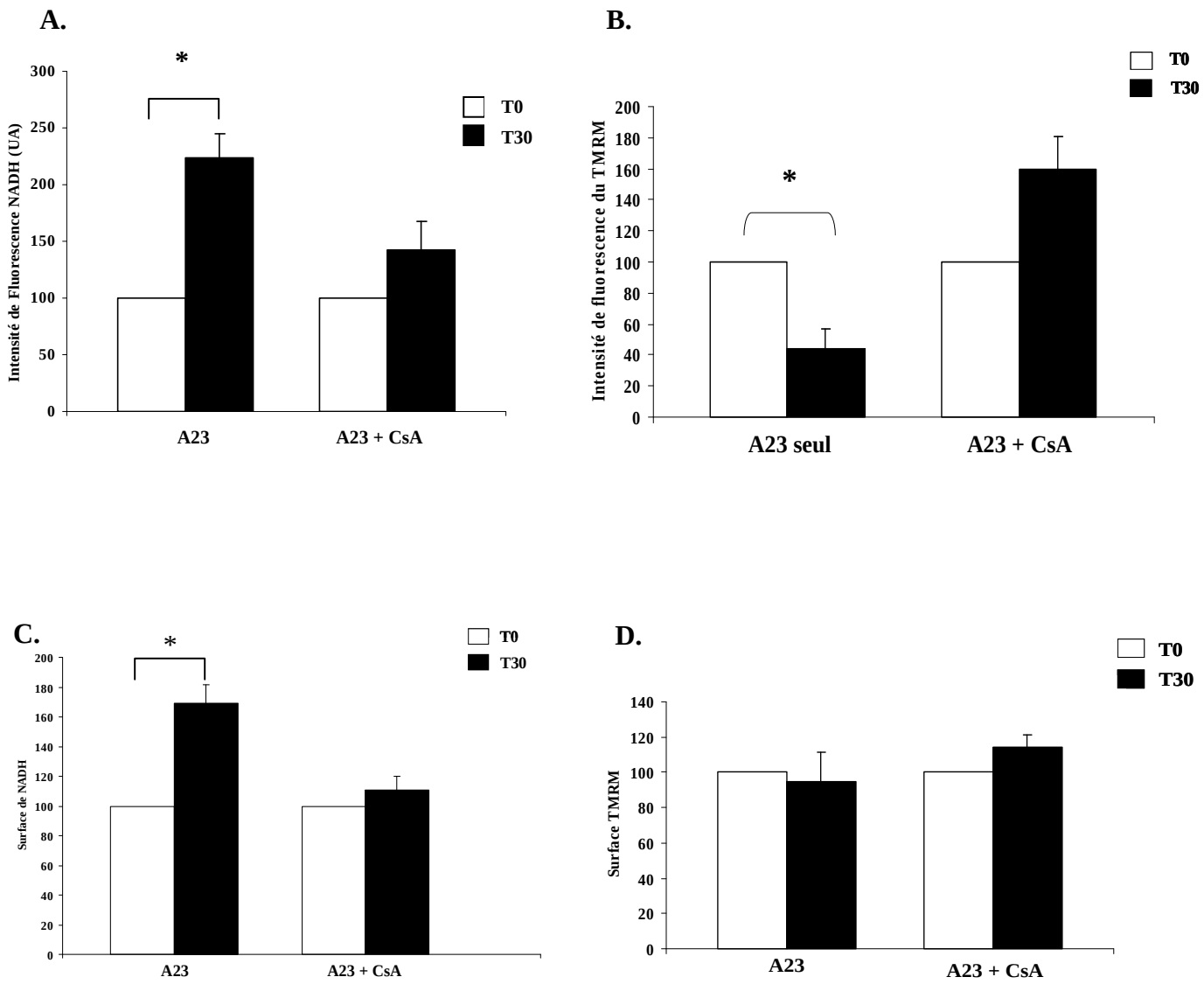
Fig. 17 : Quantification de l'intensité de fluorescence du NADH, du TMRM et de la surface de distribution du NADH et du TMRM après induction de l'ouverture du PTP par surcharge calcique (A23187). Chaque barre représente la moyenne de trois expériences différentes. (* $p < 0,05$ par rapport à T0)

En présence de 1 µM de Cyclosporine A, on constate une inhibition de l'ouverture du PTP avec :

- Une **absence d'augmentation de l'intensité de fluorescence du NADH** (100 UA à T0 min, 143 ± 25 UA 30 min après l'administration d'A23187 en présence de Cyclosporine A) (Fig. 16.10 ; 18A) ($p > 0.05$).

- Une **absence de diminution de l'intensité de fluorescence du TMRM** (100 UA à T0 min, 134 UA ± 13,65 UA 30 min après l'administration d'A23187 en présence de Cyclosporine A) (Fig. 16.11 ; 18B) ($p > 0.05$).

- Une **absence d'augmentation du rapport de surface de NADH/TMRM**. Le signal NADH reste majoritairement co-localisé avec le signal TMRM témoignant d'une absence d'ouverture du PTP (Rapport NADH/TMRM = 1 à T0 min ; Rapport NADH/TMRM = 0,96 30 min après l'administration d'A23187 en présence de Cyclosporine A) (Fig. 18C, D, E ; Fig. 16.12) ($p > 0.05$)



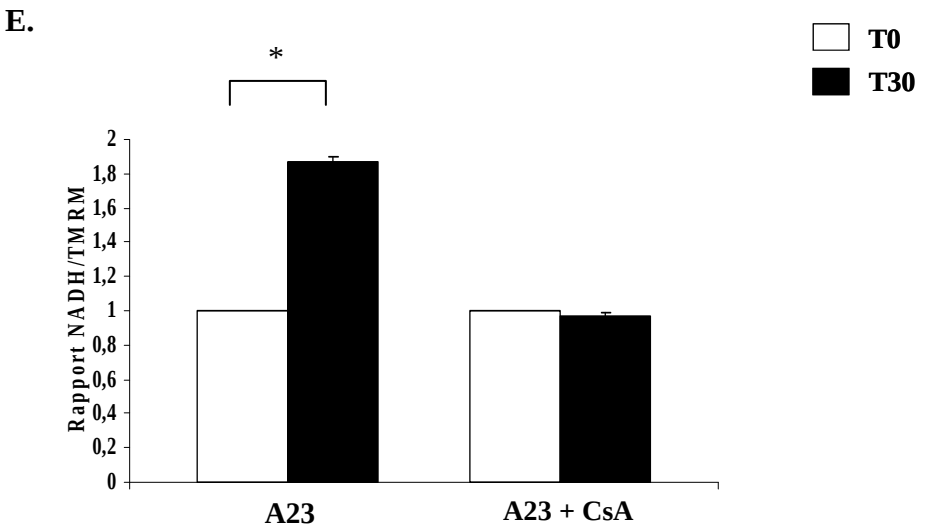


Fig. 18: Quantification de la fluorescence et de la surface de distribution du NADH et du TMRM après surcharge calcique (A23187) en présence ou non de 1 µM de Cyclosporine A. Chaque barre représente la moyenne de trois expériences différentes (* $p < 0.05$).

En présence de 100 µM de Metformine, on constate une inhibition de l'ouverture du PTP avec :

- **Une absence d'augmentation de l'intensité de fluorescence du NADH** (100 UA à T0 min, 112,29 ± 4,5 UA 30 min après l'administration d'A23187 en présence de Metformine) (Fig.16.16 ; 19A) ($p > 0.05$).

- **Une absence de diminution de l'intensité de fluorescence du TMRM** (100 UA à T0 min, 159,5 UA ± 21 UA 30 min après l'administration d'A23187 en présence de Metformine (Fig.16.17 ; 19B) ($p > 0.05$).

- **Une absence d'augmentation du rapport de surface de NADH/TMRM**. Le signal NADH reste majoritairement co-localisé avec le signal TMRM témoignant d'une absence d'ouverture du PTP (Rapport NADH/TMRM = 1 à T0 min ; Rapport de NADH/TMRM = 0,83 ± 0,033 30 min après l'administration d'A23187 en présence de Metformine (Fig.19 C, D, E ; Fig.16.18) ($p > 0.05$).

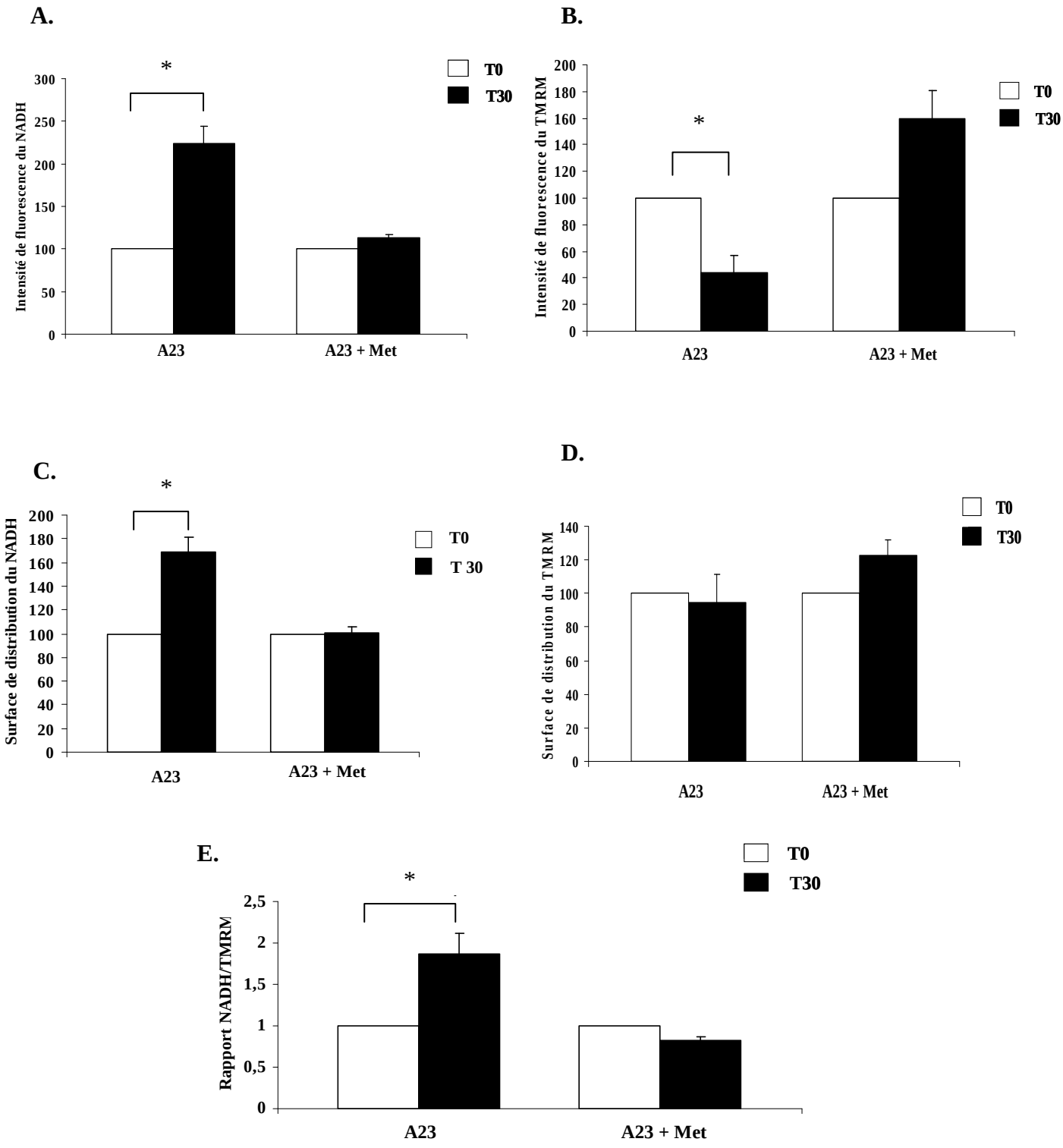


Fig. 19: Quantification de la fluorescence et de la surface de distribution du NADH et du TMRM après surcharge calcique (A23187), en présence ou non de 100 µM de Metformine. Chaque barre représente la moyenne de trois expériences différentes (* $p < 0.05$).

2. Effet du glucose et du fructose sur le PTP

En condition normale, les mitochondries sont fortement polarisées et le NADH est majoritairement localisé au niveau intra-mitochondrial : il existe une co-localisation du signal NADH avec le signal TMRM (Fig. 20.3).

Après 24 h d'incubation en présence de 30 mM de D-Glucose (Fig. 20.6) ou 2,5 mM de D-Fructose (Fig. 20.9), il se produit une ouverture du PTP matérialisée par une délocalisation du NADH par rapport au signal TMRM avec **augmentation du rapport NADH/TMRM** témoignant d'une diffusion du NADH hors de la mitochondrie et donc d'une ouverture du PTP (Rapport NADH/TMRM des cellules témoins = 1 ,89 ± 0,102; Rapport NADH/TMRM après 24 h d'incubation en présence de 30 mM de D-Glucose = 3,68 ± 0 ,362 ; Rapport NADH/TMRM après 24 h d'incubation en présence de 2,5 mM de D-Fructose = 3 ± 0 ,24.) ($p < 0, 05$) (Fig. 20 ; Fig. 21)

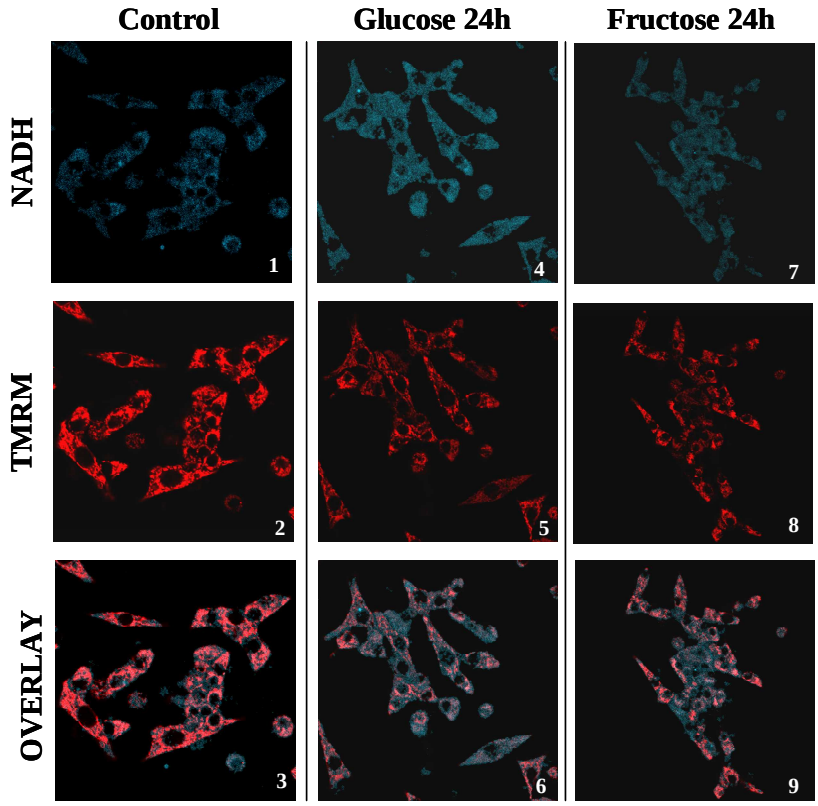


Fig. 20 : **Effet du D-Glucose et du D-Fructose sur l'ouverture du PTP** : double marquage des cellules INS-1 pour l'autofluorescence du NADH (signal bleu) et le potentiel de membrane mitochondrial (TMRM, signal rouge). Les cellules INS-1, marquées par 10 nM de TMRM, sont incubées pendant 24 h en présence de 30 mM de D-Glucose ou 2,5 mM de D-Fructose. Acquisition des images par microscopie confocale (Objectif 63X à huile, Airy 2). Images repésentatives de huit expériences différentes.

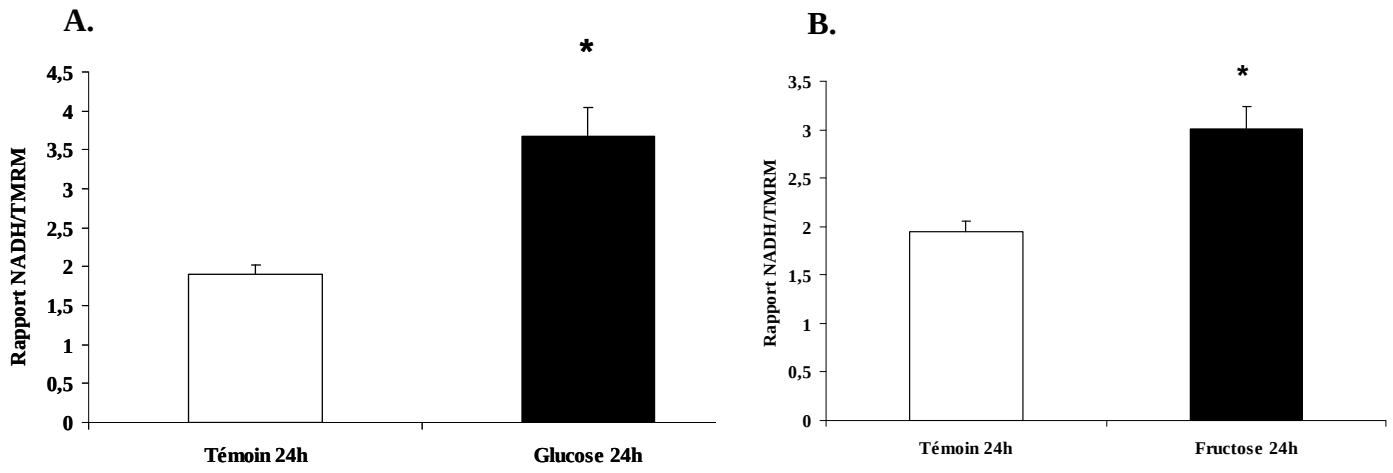


Fig. 21 : Quantification du rapport NADH/TMRM de cellules INS-1 après 24 h d'incubation (**A**) en présence de 30 mM de D-Glucose (**n=8**) ou (**B**) en présence de 2,5 mM de D-Fructose (**n=8)** (* $p < 0,05$).

3. Effet de la Cyclosporine A et de la Metformine sur l'ouverture du PTP induite par le glucose

La Cyclosporine A et la Metformine préviennent l'ouverture du PTP induite par 30 mM de D-Glucose.

En effet, après 24 h d'incubation **en présence de 30 mM de D-Glucose, nous décrivons une augmentation du rapport de surface de NADH/TMRM typique d'une ouverture du PTP** (Fig. 20 et Fig. 21).

Lorsque les cellules INS-1 sont incubées pendant 24 heures **en présence de 30 mM de D-Glucose et 1 µM de Cyclosporine A** (Fig. 22.9; 23) **ou 100 µM de Metformine** (Fig. 22.12 et Fig. 23), le NADH reste majoritairement co-localisé avec le signal TMRM et nous décrivons **une absence d'augmentation du rapport NADH/TMRM témoignant d'une absence d'ouverture du PTP** (Rapport NADH/TMRM des cellules témoins = 1 ,89 ± 0,102; Rapport NADH/TMRM après 24 h d'incubation en présence de 30 mM de D-Glucose = 3,68 ± 0 ,362 ; Rapport NADH/TMRM après 24 h d'incubation en présence de 30 mM de D-Glucose et 1 µM de Cyclosporine A = 2,15 ± 0,055 ; Rapport NADH/TMRM après 24 h d'incubation en présence de 30 mM de D-Glucose et 100 µM de Metformine = 1,97 ± 0,07).

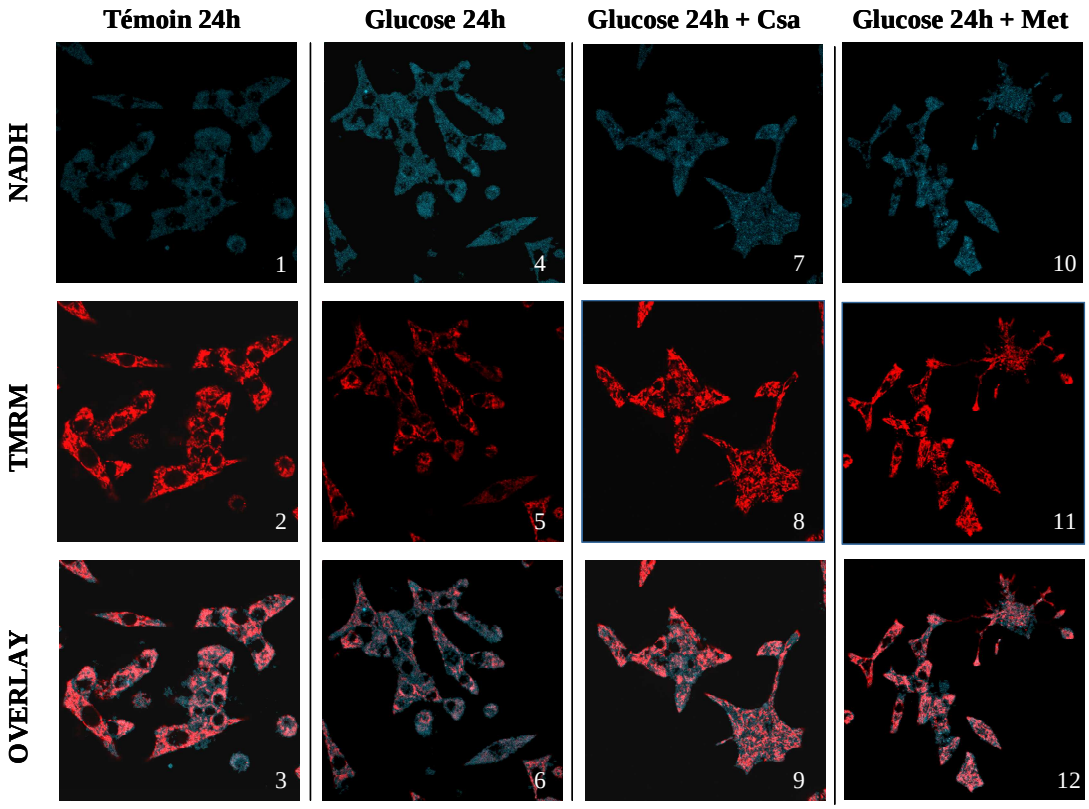


Fig. 22 : Effets de la Cyclosporine A (CsA) et de la Metformine (Met) sur l'ouverture du PTP induite par 30 mM de D-Glucose. Les cellules INS-1, incubées pendant 24 heures en présence de 30 mM de D-Glucose, en présence ou non de 1 µM de Cyclosporine A ou de 100 µM de Metformine, sont marquées par 10 nM de TMRM. Acquisition par microscopie confocale (Objectif 63 X à huile, Airy 2). Images représentatives de huit expériences différentes.

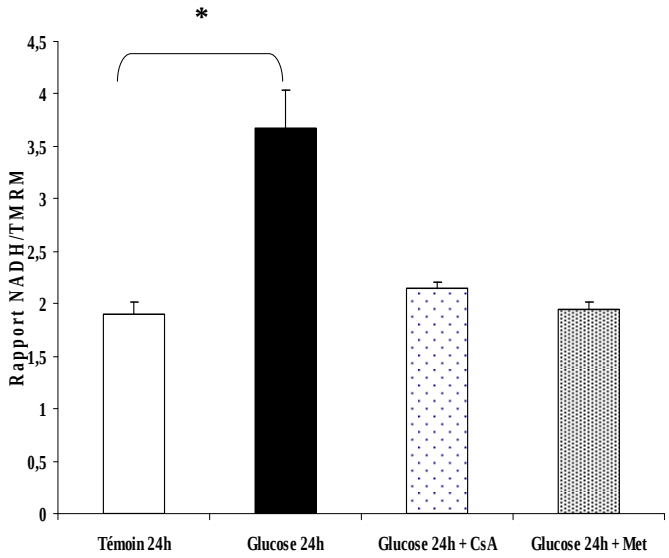


Fig. 23 : Quantification du rapport NADH/TMRM de cellules INS-1 après 24 h d'incubation en présence de 30 mM de D-Glucose et 1 µM de Cyclosporine A (**n=8**) ou 100 µM de Metformine. (**n=8**) (* $p < 0,05$).

4. Effet de la Cyclosporine A et de la Metformine sur l'ouverture du PTP induite par le fructose

La Cyclosporine A et la Metformine préviennent l'ouverture du PTP induite par 2,5 mM de D-Fructose.

Lorsque les cellules INS-1 sont incubées pendant 24 heures **en présence de 2,5 mM de D-Fructose et 1 µM de Cyclosporine A** (Fig. 24.9 ; 25) ou **100 µM de Metformine** (Fig. 24.12 et Fig. 25), le NADH reste majoritairement co-localisé avec le signal TMRM et nous décrivons **une absence d'augmentation du rapport NADH/TMRM témoignant d'une absence d'ouverture du PTP** (Rapport NADH/TMRM des cellules témoins = 1 ,95 ± 0,09; Rapport NADH/TMRM après 24 h d'incubation en présence de 2,5 mM de D-Fructose = 3,001 ± 0 ,262 ; Rapport NADH/TMRM après 24 h d'incubation en présence de 2,5 mM de D-Fructose et 1 µM de Cyclosporine A = 1,95 ± 0,16; Rapport NADH/TMRM après 24 h d'incubation en présence de 2,5 mM de D-Fructose et 100 µM de Metformine = 1,15 ± 0,023).

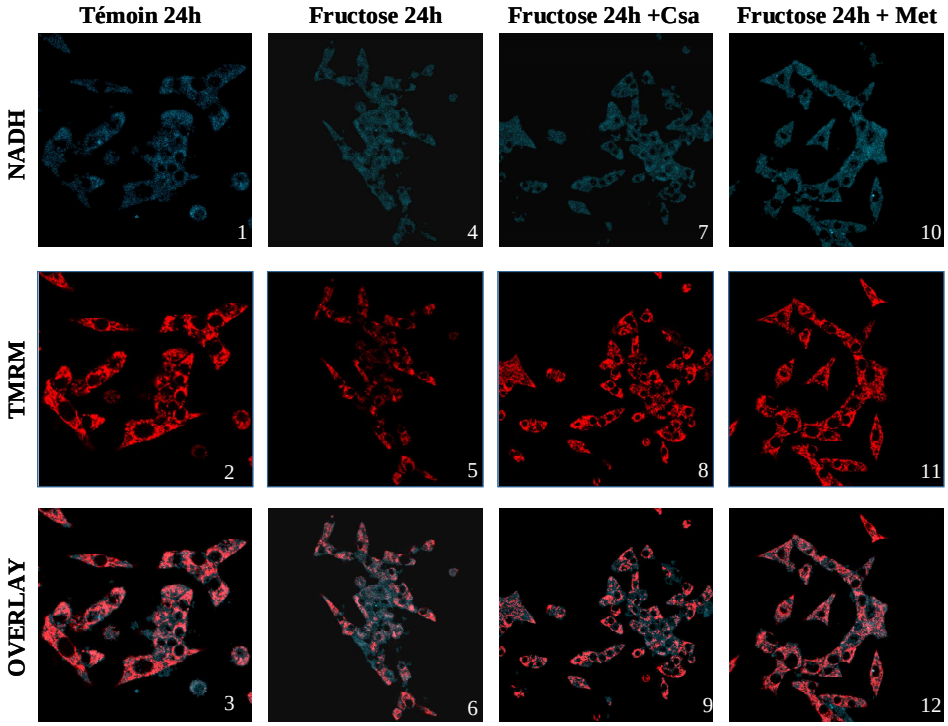


Fig. 24 : Effets de la Cyclosporine A (CsA) et de la Metformine (Met) sur l'ouverture du PTP induite par 2,5 mM de D-Fructose. Les cellules INS-1, incubées pendant 24 heures en présence de 2,5 mM de D-Fructose, en présence ou non de 1 µM de Cyclosporine A ou de 100 µM de Metformine, sont marquées par 10 nM de TMRM. Acquisition par microscopie confocale (Objectif 63 X à huile, Airy 2). Images représentatives de trois expériences différentes.

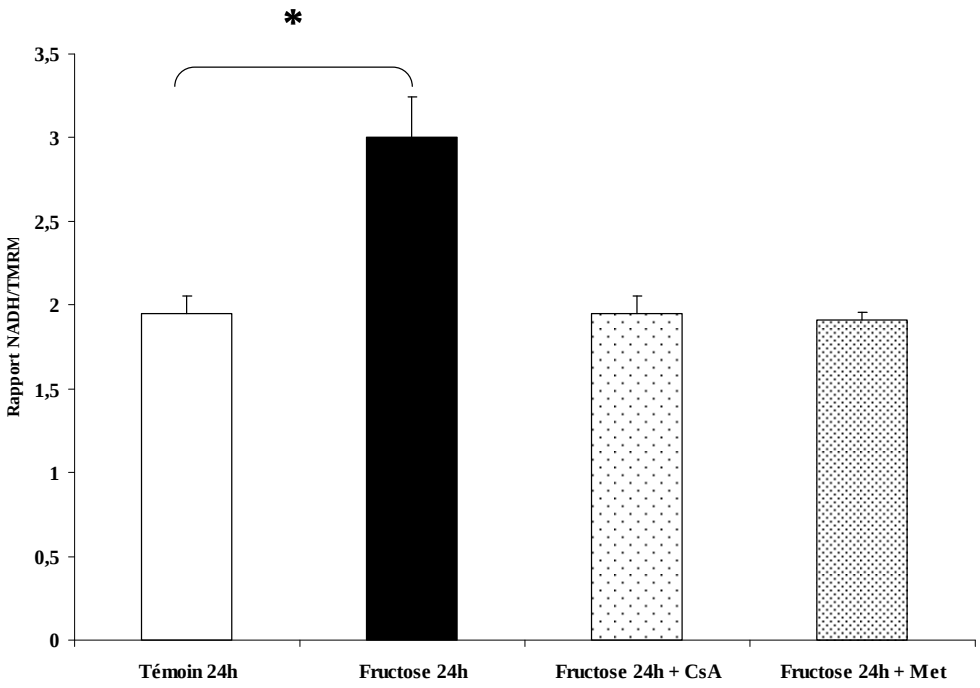


Fig. 25 : Quantification du rapport NADH/TMRM de cellules INS-1 après 24 h d'incubation en présence de 2,5 mM de D-Fructose (**n=3**) et 1 µM de Cyclosporine A (**n=3**) ou 100 µM de Metformine. (**n=3**) (* $p < 0,05$)

En conclusion, concernant la régulation du PTP, nous montrons que :

- **La Cyclosporine A et la Metformine inhibent l'ouverture du PTP sur des cellules INS-1 perméabilisées et intactes.**
- **L'exposition à de fortes concentrations de fructose ou de glucose induit une ouverture du PTP.**
- **La Cyclosporine A et la Metformine inhibent l'ouverture du PTP induite par 30 mM de glucose ou 2,5 mM de fructose.**

C. Effet du glucose sur la viabilité des cellules INS-1

En présence de 30 mM de D-Glucose, par rapport au contrôle 11 mM (Fig. 26-27), il existe une majoration de la mort cellulaire des cellules INS-1 avec un effet cinétique en fonction de la durée d'exposition au D-Glucose : on dénombre 78,2 ± 3,6 % des cellules vivantes à l'état basal, 67,2 ± 7 % après 24 h, 59,96 ± 0,94 % après 48 h ($p < 0,05$) et 37,6 ± 9,7 % de cellules vivantes après 72 h d'exposition à 30 mM de D-Glucose ($p < 0,05$).

L'effet toxique du glucose sur les cellules INS-1 est indépendant de l'effet d'hyperosmolarité : la mortalité induite par 30 mM de D-Mannitol est identique à celle des cellules contrôles.

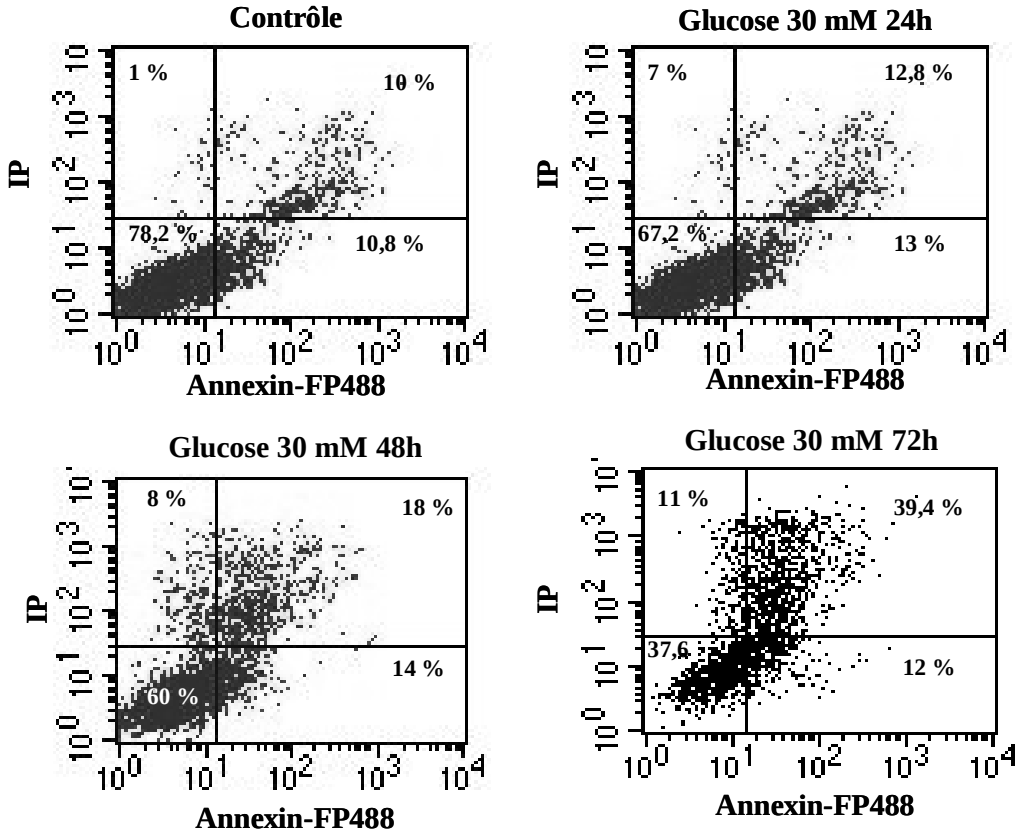


Fig. 26 : Effet de 30 mM D-Glucose sur la viabilité des INS-1 : les INS-1 sont incubées pendant 24 h, 48 h et 72 h en présence de 11 mM de D-Glucose (Contrôle) ou en présence de 30 mM de D-Glucose. La mort cellulaire est évaluée par cytométrie en flux par un double marquage Annexin-FP488 et Iodure de Propidium. Images représentatives de trois expériences différentes.

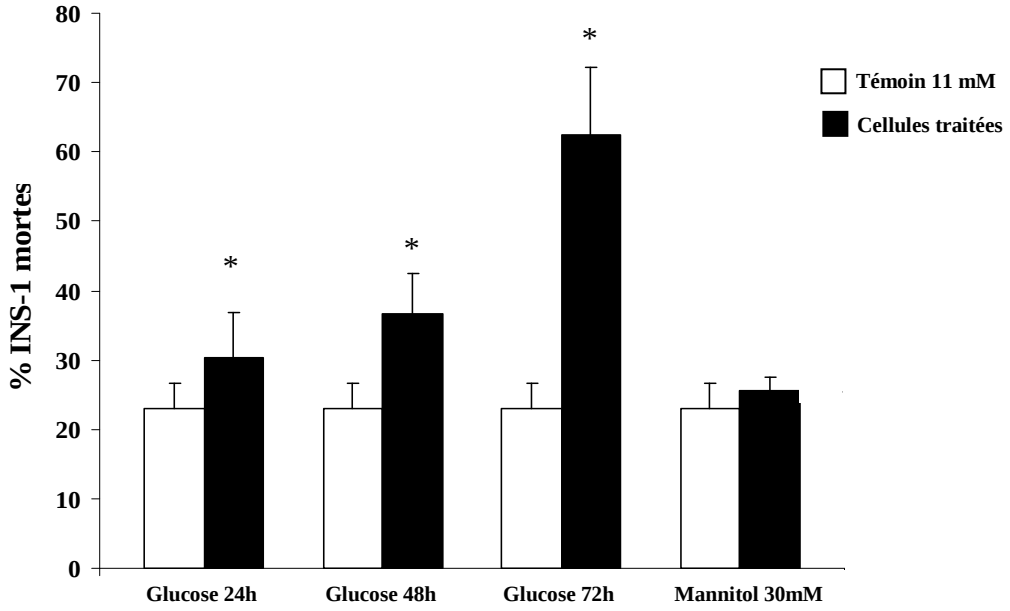


Fig. 27 : Quantification de la mort cellulaire induite par 30 mM de D-Glucose (*p < 0,05 comparativement aux cellules témoins). Chaque barre représente la moyenne ± DS de trois expériences différentes.

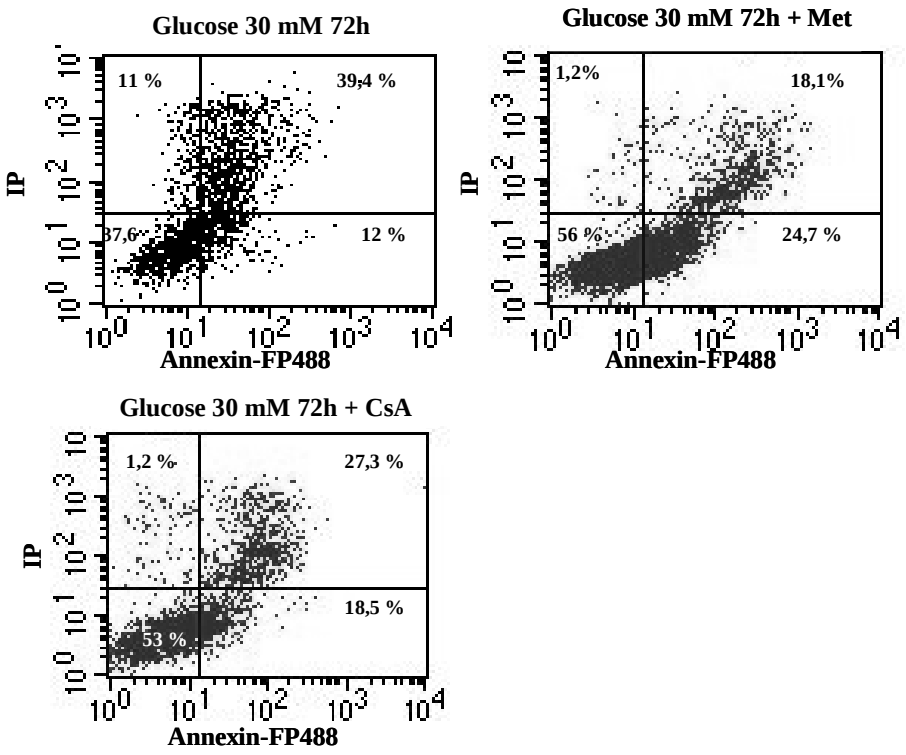
D. Effet des inhibiteurs du PTP sur la mort cellulaire induite par le glucose

La Cyclosporine A et la Metformine préviennent la mort cellulaire induite par 30 mM de D-Glucose.

En effet, on dénombre :

- **37,6 ± 9,7 %** de cellules vivantes après 72 h d'incubation **en présence de 30 mM de D-Glucose.**
- **53 ± 2,6 %** de cellules vivantes après 72 h d'incubation **en présence de 30 mM de D-Glucose et 1 µM de Cyclosporine A.**
- **56 ± 4 %** de cellules vivantes après 72 h d'incubation **en présence de 30 mM de D-Glucose et 100 µM de Metformine.**

A.



B.

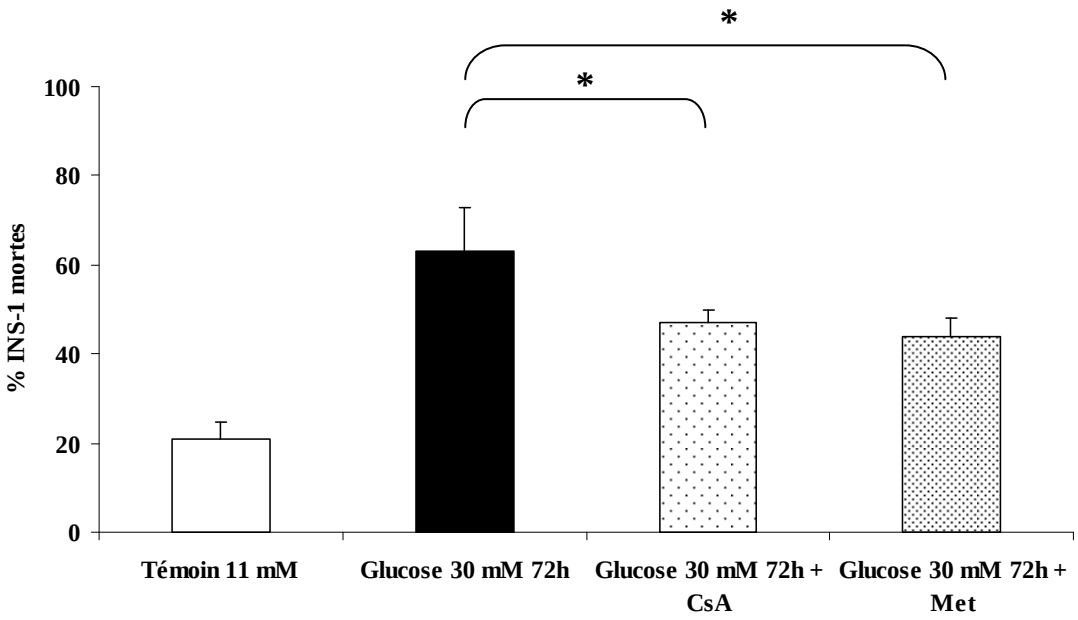


Fig. 28 : (A) Effets de la Cyclosporine A et de la Metformine sur la mort cellulaire induite par 30 mM de D-Glucose. Les cellules INS-1 sont incubées en présence de 30 mM de D-Glucose pendant 72 heures en présence ou non de 1 µM de Cyclosporine A ou de 100 µM de Metformine. La mort cellulaire est évaluée par cytométrie en flux par un double marquage Annexin-FP488 et Iodure de Propidium. Images représentatives de trois expériences différentes.

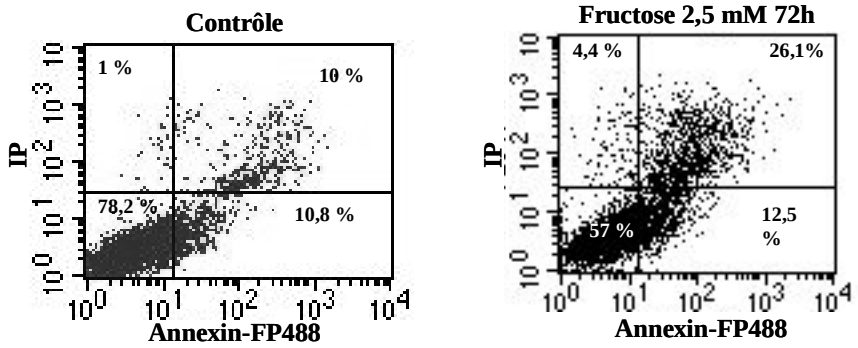
(B) Quantification de la mort cellulaire induite par 30 mM de D-Glucose en présence de CsA et de Metformine. Chaque barre représente la moyenne ± DS de trois expériences différentes. (* $p < 0,05$ comparativement aux cellules exposées à 30 mM de D-Glucose pendant 72 h sans inhibiteur du PTP).

E. Effet du fructose sur la viabilité des INS-1

L'exposition à 2,5 mM de fructose induit une majoration de la mort cellulaire des cellules INS-1.

Après 72 h d'incubation en présence de 2,5 mM de D-Fructose, on note une augmentation de 104,7 ± 6 % de cellules mortes comparativement aux cellules témoins ($p < 0,05$) (Fig. 29).

A.



B.

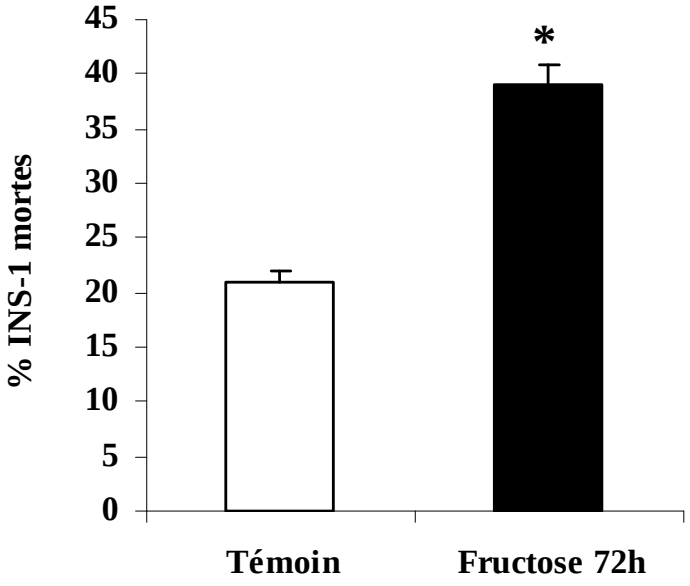


Fig. 29: (A) Effet de 2,5 mM de D-Fructose sur la viabilité des INS-1 : les cellules INS-1 sont incubées ou non pendant 72 h en présence de 2,5 mM de D-Fructose. La mort cellulaire est évaluée par cytométrie en flux par un double marquage Annexin-FP488 et Iodure de Propidium. Images représentatives de trois expériences différentes.

(B) Quantification de la mort cellulaire induite par 2,5 mM de D-Fructose. Chaque barre représente la moyenne ± DS de trois expériences différentes (* $p < 0,05$ comparativement aux cellules témoins).

F. Effet des inhibiteurs du PTP sur la mort cellulaire induite par le fructose

La Cyclosporine A et la Metformine préviennent complètement la mort cellulaire induite par 2,5 mM de D-Fructose.

En effet, on dénombre :

- **42 ± 7,6 %** de cellules mortes après 72h d'incubation **en présence de 2,5 mM de D-Fructose.**
- **19 ± 0,7 %** de cellules mortes après 72h d'incubation **en présence de 2,5 mM de D-Fructose et de 100 µM de Metformine.**
- **22 ± 5 %** de cellules mortes après 72h d'incubation **en présence de 2,5 mM de D-Fructose et 1 µM de Cyclosporine A** (Fig. 30 ; 31).

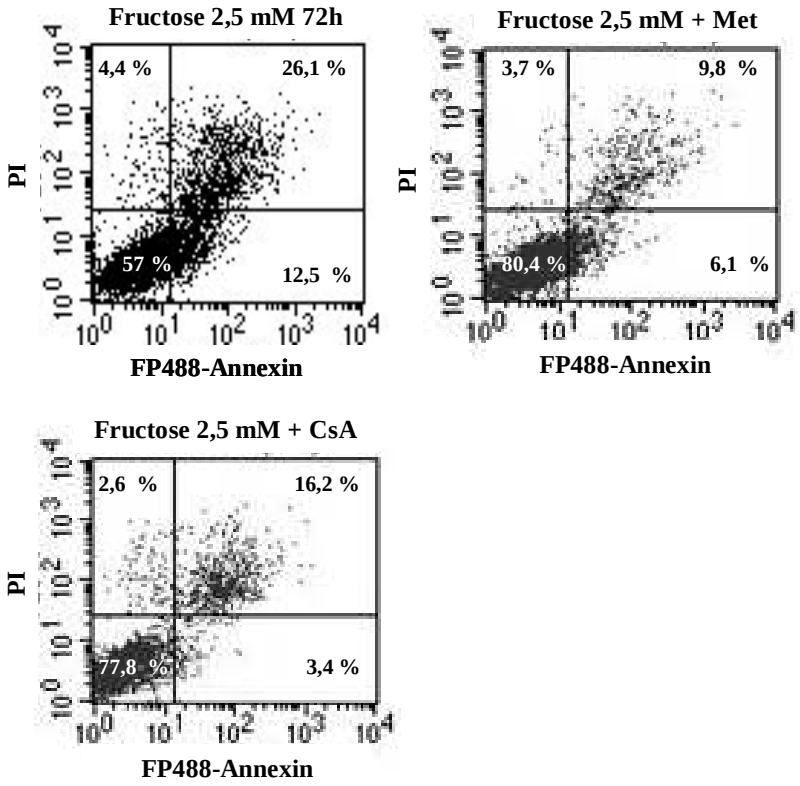


Fig. 30 : Effet de la Cyclosporine A et de la Metformine sur la mort cellulaire induite par 2,5 mM de D-Fructose. Les cellules INS-1 sont incubées en présence de 2,5 mM de D-Fructose pendant 72 heures en présence ou non de 1 µM de Cyclosporine A ou de 100 µM de Metformine. La mort cellulaire est évaluée par cytométrie en flux par un double marquage Annexin-FP488 et Iodure de Propidium. Images représentatives de trois expériences différentes.

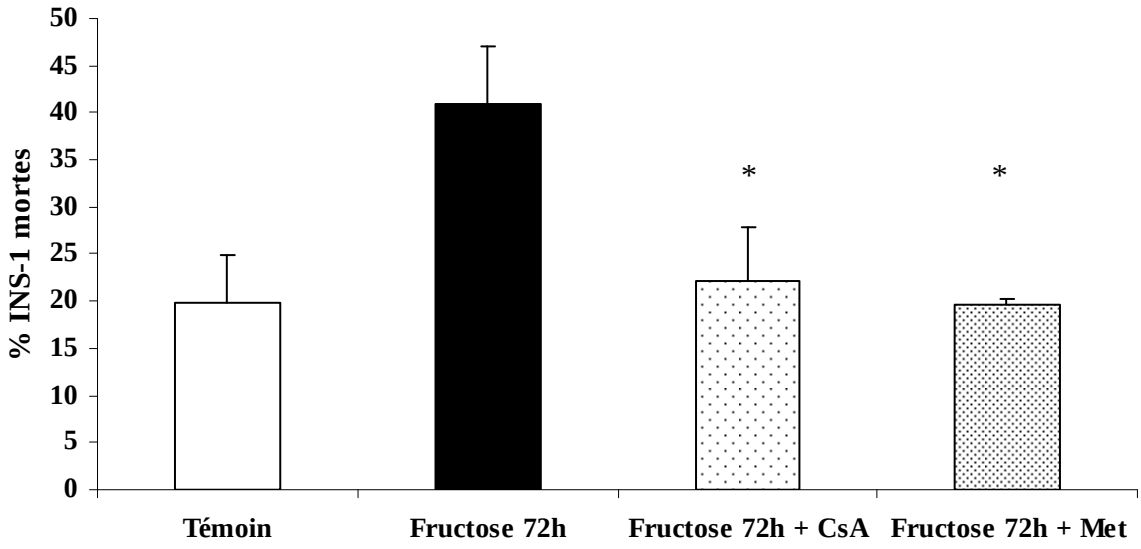


Fig. 31 : Quantification de la mort cellulaire induite par 2,5 mM de D-Fructose en présence de Cyclosporine A et de Metformine. Chaque barre représente la moyenne ± DS de trois expériences différentes. (* p < 0,05 par rapport aux cellules exposées à 2,5 mM de D-Fructose pendant 72 h sans inhibiteur du PTP)

En conclusion, nous montrons :

- **Une majoration de la mort cellulaire des INS-1 en présence de 30 mM de D-Glucose et 2,5 mM de D-Fructose.**
- **Une inhibition de la mort cellulaire induite par le glucose et le fructose en présence de Cyclosporine A et de Metformine.**

V. DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons étudié, dans un premier temps, la régulation du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans un modèle murin de cellules β. Nous montrons que **la Metformine, la Cyclosporine A et la Roténone inhibent l'ouverture du PTP dans ce type cellulaire.** Nous montrons également que **la mort cellulaire induite par le glucose et le fructose met en jeu une ouverture du PTP. La Cyclosporine A et la Metformine, en inhibant l'ouverture du PTP, préviennent la mort cellulaire induite par le glucose et le fructose.**

Nous n'avons retrouvé aucun article dans la littérature concernant l'effet de la Metformine sur le pore de transition de perméabilité mitochondriale de notre type cellulaire ou d'autres modèles de cellule β.

En revanche, quelques travaux suggèrent un effet anti-apoptotique de la Metformine sur des îlots pancréatiques de patients diabétiques de type 2 : Marchetti *et al.* [31] décrivent une diminution de la mort cellulaire des îlots prétraités par de la Metformine associée à une diminution de l'activité des caspases 3.

L'inhibition du PTP par la Metformine a été largement décrite dans la littérature sur différents types cellulaires : Bhamra *et al.* [32] ont décrit un effet protecteur de la Metformine contre la mort cellulaire induite par un stress ischémique sur des cœurs isolés perfusés via une inhibition du PTP. Detaille *et al.* [26] ont montré que la Metformine, en inhibant le PTP, prévient la mort cellulaire induite par l'hyperglycémie sur des cellules endothéliales.

Nos données concernant l'effet inhibiteur de la Metformine sur le PTP sont donc cohérentes avec les données de la littérature.

Concernant la Cyclosporine A, un seul auteur a étudié l'effet de la Cyclosporine A sur le PTP de cellules INS-1 et MIN6 et retrouve un effet inhibiteur de la Cyclosporine A sur l'ouverture du PTP de ces deux types cellulaires [18]. Nous n'avons retrouvé qu'une seule étude [33] dans la littérature ayant étudié l'effet de la Cyclosporine A sur la viabilité des cellules β. Cette étude montrait une majoration de 10 % de la mort cellulaire de cellules HIT exposées pendant 48 heures à des concentrations de 10 µM de Cyclosporine A. Ces données sont discordantes avec les données de notre étude. Cependant, les concentrations de Cyclosporine A utilisées par Plaumann et *al* sont dix fois supérieures aux concentrations que nous avons testées dans notre étude. Un effet toxique de Cyclosporine A sur la cellule β, dose-dépendante, n'est donc pas à exclure.

Plusieurs études cliniques, dans les années 90, ont décrit une rémission ou un ralentissement de la perte de masse cellulaire β chez des patients diabétiques de type 1 nouvellement diagnostiqués, traités par Cyclosporine A [34-35]. La Cyclosporine A via ses propriétés immunosuppressives, permettrait de réduire la réponse auto-immune dirigée contre la cellule β. Cependant, à la lumière de nos résultats, nous pouvons nous interroger sur l'effet anti-apoptotique direct de la Cyclosporine A sur la cellule β, indépendamment de son effet immunosuppresseur.

De nombreux travaux ont décrit une altération de la sécrétion d'insuline des cellules β traitées par Cyclosporine A [36]. Cependant, quelque soit le modèle utilisé (cellules β isolées, îlots, pancréas perfusés), cette toxicité ne semble apparaître que pour des concentrations de Cyclosporine A allant de 3 à 10 µM. Quelques rares études décrivent une altération de l'insulinosécrétion pour des concentrations de cyclosporine A de 1µM, concentration à laquelle nous avons utilisé la Cyclosporine A dans notre étude.

A côté de son rôle dans la régulation de l'apoptose, le PTP pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire : à l'occasion d'ouvertures transitoires, le PTP permettrait tantôt une captation du Ca^{2+} cytosolique vers la mitochondrie tantôt un relargage de calcium de la mitochondrie vers le cytosol [37-38]. Krippiet et *al.* [39] ont évoqué le rôle central du PTP dans la sécrétion d'insuline : en effet, cette équipe a émis l'hypothèse du rôle du PTP comme feedback négatif dans le processus de sécrétion de l'insuline selon le modèle suivant : les variations de glucose extra et intracellulaire entraînent, au niveau de la cellule β, une augmentation de la synthèse d'ATP, aboutissant à :

- La fermeture des canaux K^+ ATP dépendant
- La dépolarisation de la membrane plasmique
- L'ouverture des canaux calciques voltage dépendant
- L'exocytose de l'insuline

Krippiet et *al.* [39] ont montré que l'ouverture des canaux calciques voltage dépendant entraîne une augmentation du calcium cytosolique suivie de :

- Une augmentation du Ca^{2+} mitochondrial
- Une diminution du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi m$) **via une ouverture probable du PTP**
- Une diminution de la synthèse d'ATP
- Une oscillation des concentrations de Ca^{2+} cytosolique
- Une oscillation du potentiel de membrane plasmique (($\Delta\Psi p$)

Cette équipe a montré que ces oscillations de Ca^{2+} cytosolique et mitochondrial, de ΔΨm, de ΔΨp sont essentielles à la sécrétion d'insuline plaçant ainsi le PTP au cœur du processus de sécrétion de l'insuline.

Cette même équipe a montré que la Cyclosporine A altère la sécrétion d'insuline de cellules β en inhibant les oscillations de calcium cytosolique, de ΔΨm et de ΔΨp consécutive à l'augmentation du glucose extra et intracellulaire au niveau de la cellule β [40]. Ainsi, l'inhibition du PTP par la Cyclosporine A pourrait altérer le mécanisme de sécrétion de l'insuline. Dans ces deux études, les concentrations de CsA utilisées allaient de 1 µM à 10 µM. L'effet inhibiteur de la Cyclosporine A sur les oscillations de Calcium cytosolique, mitochondrial, de ΔΨm et de ΔΨp n'apparaissent qu'à partir de 2 µM.

Dans ce contexte, nous prévoyons de compléter nos explorations par **une étude de la fonctionnalité des cellules INS-1 traitées par 1 µM de Cyclosporine A afin de préciser l'effet de cette concentration sur la sécrétion d'insuline et éventuellement de préciser davantage le rôle du PTP sur la sécrétion d'insuline.**

Dans notre étude, nous mettons en évidence une cytotoxicité du glucose, sur notre modèle de cellules β, mettant en jeu une ouverture du PTP. Même si la toxicité du glucose sur les cellules β est désormais bien connue, les mécanismes moléculaires induisant cette apoptose le sont moins : aucun article n'a décrit, de façon directe, une implication du PTP dans la mort cellulaire induite par le glucose. Cependant, un certain nombre de travaux décrivent des mécanismes pouvant faire suspecter une mise en jeu du PTP : Federici *et al.* [41] et Maedler *et al*. [42] ont décrit une activation des caspases 9, 8, 3, une augmentation de l'expression de Bad, Bax, Fas et une diminution de l'expression de Bcl-2 sur des cellules β *in vitro* exposées à de fortes concentrations de glucose. L'apoptose induite par le glucose est accompagnée d'une augmentation du stress

oxydant et d'une dépolarisation mitochondriale. Ces données peuvent être concordantes avec une ouverture du PTP : on sait que le stress oxydant est un puissant activateur du PTP et la dépolarisation mitochondriale observée après exposition au glucose peut être consécutive à l'ouverture du PTP. Bax est également un activateur du PTP.

Nous avons montré une toxicité du D-Fructose sur la viabilité des cellules INS-1 : de nombreuses études ont décrit l'effet diabétogène des régimes riches en fructose. D'autres travaux ont montré une majoration de l'insulinorésistance chez des rats soumis à un régime riche en fructose [45-46]. En outre, nous n'avons retrouvé, dans la littérature, aucune étude ayant étudié l'effet cytotoxique du fructose sur la cellule β. Une seule étude décrit une majoration de l'apoptose et des lésions de l'ADN de cellules L5178Y (lymphome de souris) incubées en présence de fructose.

Concernant la poursuite de ce projet, **nous prévoyons d'étudier l'effet de l'ischémie-reperfusion sur l'ouverture du PTP des cellules INS-1.** Aucune étude dans la littérature n'a testé l'effet de l'ischémie-reperfusion sur le PTP de notre type cellulaire. Pourtant, l'ischémie-reperfusion combine plusieurs conditions favorables à l'ouverture du PTP (surcharge calcique, surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, consommation des nucléotides adényliques et accumulation de phosphate). De plus, plusieurs travaux effectués sur des cellules neuronales, myocardiques ou vasculaires ont montré que l'ischémie-reperfusion, lorsqu'elle se prolonge, est responsable d'une ouverture du PTP entraînant la mort cellulaire par apoptose [23]. Il nous semble donc licite d'étudier l'effet de l'ischémie-reperfusion sur l'ouverture du PTP de notre type cellulaire.

Nous comptons également tester **l'effet du GLP-1 sur l'ouverture du PTP** et sur la mort cellulaire induite par le glucose et le fructose. En effet, des travaux récents ont montré un effet anti-apoptotique du GLP-1 *in vivo* et *in vitro* sur des modèles cellulaires de cellules β (MINS6) et

d'îlots isolés. Loredana *et al.* [43] ont décrit une diminution de la mort cellulaire induite par un stress oxydant sur des cellules MIN6 traitées par GLP-1 associée à une diminution de l'activité de la caspase 3, une augmentation de l'expression de Bcl-2 et Bcl-X. L'effet du GLP-1 sur le PTP n'a, à ce jour, pas été étudié.

Enfin, **nous envisageons de valider les résultats obtenus** avec les cellules INS-1 **sur des îlots humains** : nous étudierons la régulation du PTP et notamment l'effet de la Cyclosporine A, de la Metformine et du GLP-1 sur les îlots humains. Nous testerons la toxicité du glucose, du fructose sur les îlots et l'effet de la Cyclosporine A, de la Metformine et du GLP-1 sur la mort cellulaire induite par le glucose, le fructose et l'ischémie-reperfusion.

VI. CONCLUSION

En conclusion, notre travail a permis d'étudier la régulation du PTP sur un modèle murin de cellules β et d'identifier la Cyclosporine A et la Metformine comme deux inhibiteurs du PTP des cellules INS-1.

Nous avons montré que le D-Glucose et le D-Fructose, aux concentrations portales telles que les voient les îlots pancréatiques au cours de la greffe, induisent une mort cellulaire significative via une ouverture du PTP. La Cyclosporine A et la Metformine en inhibant l'ouverture du PTP, préviennent la mort cellulaire induite par le glucose et le fructose.

Ce travail a permis de mieux comprendre les voies d'agression auxquelles peuvent être soumis les îlots pancréatiques au cours de la greffe, notamment par l'identification de la cytotoxicité du D-Fructose.

Enfin, même si ces résultats doivent être validés sur l'îlot humain, notre travail permet d'envisager le PTP comme une cible thérapeutique intéressante pour tenter de préserver la viabilité des cellules β pancréatiques au cours de la greffe d'îlots de Langerhans.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. Arch Ophthalmol 1984; 102:520-526.

[2] Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. Glycosylated hemoglobin predicts the incidence and progression of diabetic retinopathy. JAMA 1988; 260:2864-2871.

[3] Chase HP, Jackson WE, Hoops SL, Cockerham RS, Archer PG, O'Brien D. Glucose control and the renal and retinal complications of insulin-dependent diabetes. JAMA 1989; 261:1155-1160.

[4] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993): the effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 329, 977–986.

[5] Merani S, Shapiro AM. Current status of pancreatic islet transplantation. Clin Sci (Lond).2006 Jun; 110(6):611-25).

[6] Bretzel RG, Jahr H, Eckhard M, Martin I, Winter D, Brendel MD. Islet cell transplantation today. Langenbecks Arch Surg. 2007 May; 392(3):239-53. Epub 2007 Mar 28.

[7] Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A. et al. (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N. Engl. J. Med. 343, 230–238.

[8] Ryan, E. A., Paty, B. W., Senior, P. A. et al. (2005) Five-year follow-up after clinical islet transplantation. Diabetes 54, 2060–2069.

[9] Davalli, A. M., Ogawa, Y., Ricordi, C., Scharp, D. W., Bonner-Weir, S. and Weir, G. C. (1995) A selective decrease in the β cell mass of human islets transplanted into diabetic nude mice. Transplantation 59, 817–820.

[10] Pileggi, A., Ricordi, C., Alessiani, M. and Inverardi, L. (2001) Factors influencing Islet of Langerhans graft function and monitoring. Clin. Chim. Acta 310, 3–16.

[11] Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. Trends in cell biology. 2000 Sep; 10(9): 369-77.

[12] Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. Biochimica et biophysica acta. 1995 Jul 17; 1241(2):139-76.

[13] Batandier C, Leverve X, Fontaine E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. The Journal of biological chemistry. 2004 Apr 23; 279(17):17197-204.

[14] Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton M. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Nature. 2005 Mar 31; 434(7033):658-62.

[15] Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. The Journal of biological chemistry. 2005 May 13; 280(19):18558-61.

[16] Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. Nature. 2004 Jan 29; 427(6973):461-5.

[17] Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. The Journal of biological chemistry. 1998 May 15; 273(20):12662-8.

[18] Koshkin V, Bikopoulos G, Chan CB, Wheeler MB. The characterization of mitochondrial permeability transition in clonal pancreatic beta-cells. Multiple modes and regulation. The Journal of biological chemistry. 2004 Oct 1; 279(40):41368-76.

[19] Marselli L, Trincavelli L, Santangelo C, Lupi R, Del Guerra S, Boggi U, et al. The role of peripheral benzodiazepine receptors on the function and survival of isolated human pancreatic islets. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrinology/European Federation of endocrine Societies. 2004 Aug; 151 (2): 207-14.

[20] Contreras JL, Smyth CA, Bilbao G, Young CJ, Thompson JA, Eckhoff DE. 17-beta-Estradiol protects isolated human pancreatic islets against proinflammatory cytokine-induced cell death: molecular mechanisms and islet functionality. Transplantation. 2002 Nov 15; 74(9):1252-9.

[21] Barbu A, Welsh N, Saldeen J. Cytokine-induced apoptosis and necrosis are preceded by disruption of the mitochondrial membrane potential (Deltapsi (m)) in pancreatic RINm5F cells: prevention by Bcl-2. Molecular and cellular endocrinology. 2002 Apr 25; 190(1-2):75-82.

[22] Tejedo J, Bernabe JC, Ramirez R, Sobrino F, Bedoya FJ. NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells. FEBS letters. 1999 Oct 8; 459(2):238-43.

[23] Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. Journal of molecular and cellular cardiology. 2005 Feb; 38(2):367-74

[24] Soriano ME, Nicolosi L, Bernardi P. Desensitization of the permeability transition pore by cyclosporin a prevents activation of the mitochondrial apoptotic pathway and liver damage by tumor necrosis factor-alpha. The Journal of biological chemistry. 2004 Aug 27; 279(35):36803-8.

[25] Brown GC. Nitric oxide and mitochondria. Front Biosci. 2007; 12:1024-33.

[26] Detaille D, Guigas B, Chauvin C, Batandier C, Fontaine E, Wiernsperger N. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. Diabetes. 2005 Jul; 54(7):2179-87.

[27] Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. Endocrinology. 1992 Jan; 130(1):167-78.

[28] Dumas JF, Argaud L, Cottet-Rousselle C, Vial G, Gonzalez C, Detaille D, Leverve X, Fontaine E. Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD (P) H localization in intact cells. J Biol Chem. 2009 May 29; 284(22):15117-25. Epub 2009 Apr 3.

[29] Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. Cytometry. 1999 Mar 1; 35(3):181-95.

[30] Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P.Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. Methods. 2008 Mar;44(3):205-21.

[31] Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, Bugliani M, Boggi U, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S.Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Nov; 89(11):5535-41.

[32] Bhamra GS, Hausenloy DJ, Davidson SM, Carr RD, Paiva M, Wynne AM, Mocanu MM, Yellon DM. Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. Basic Res Cardiol. 2008 may; 103 (3):274-84. Epub 2007 Dec 13.

[33] Plaumann S, Blume R, Börchers S, Steinfelder HJ, Knepel W, Oetjen E. Activation of the dual-leucine-zipper-bearing kinase and induction of beta-cell apoptosis by the immunosuppressive drug cyclosporin A. Mol Pharmacol. 2008 Mar; 73(3):652-9. Epub 2007 Nov 27.

[34] Koivisto VA, Leirisalo-Repo M, Ebeling P, Tuominen JA, Knip M, Turunen U, Mandrup-Poulsen T, Pelkonen R. Seven years of remission in a type I diabetic patient. Diabetes Care. 1993 Jul; 16(7):990-5.

[35] Dupré J, Stiller CR, Gent M, Donner A, von Graffenried B, Heinrichs D, Jenner M, Keown P, Mahon J, Martell R, et al. Clinical trials of cyclosporin in IDDM. Diabetes Care. 1988 Nov-Dec; 11 Suppl 1:37-44.

[36] Nielsen JH, Mandrup-Poulsen T and Nerup J (1986). Direct effects of cyclosporin A on human pancreatic β cells. Diabetes 35: 1049-1052.

[37] Zoratti M and Szabò I (1995). The mitochondrial permeability transition. Biochim Biophys Acta 1241: 139-17.

[38] Ichas F, Jouaville LS and Mazat J-P (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. Cell 89: 1145-1153.

[39] Krippeit-Drews P, Düfer M and Drews G (2000). Parallel oscillations of intracellular calcium activity and mitochondrial membrane potential in mouse pancreatic B-cells. Biochem Biophys Res Commun 267: 179-183.

[40] M. Dufer, P. Krippeit-Drews, N. Lembert, L.-A. Idahl and G. Drews. Diabetogenic Effect of Cyclosporin A Is Mediated by Interference with Mitochondrial Function of Pancreatic B-Cells Molecular Pharmacology October 1, 2001 60:873-879.

[41] Federici M, Hribal M, Perego L, Ranalli M, Caradonna Z, Perego C. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death Program. Diabetes 2001; 50:1290– 301.

[42] Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. J Clin Invest 2002; 110:851– 60.

[43] Loredana Farilla, Angela Bulotta, Boaz Hirshberg, Sergio Li Calzi, Nasif Khoury, Houtan Noushmehr, Cristina Bertolotto, Umberto Di Mario, David M. Harlan and Riccardo Perfetti. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. Endocrinology. 2003 Dec; 144(12):5149-58.

[44] Badet L, Benhamou PY, Wojtusciszyn A, Baertschiger R, Milliat-Guittard L, Kessler L, Penfornis A, Thivolet C, Renard E, Bosco D, Morel P, Morelon E, Bayle F, Colin C, Berney T; GRAGIL Group.Expectations and strategies regarding islet transplantation: metabolic data from the GRAGIL 2 trial.Transplantation. 2007 Jul 15;84(1):89-96.

[45] Faure P, Polge C, Monneret D, Favier A, Halimi S. Plasma 15-F2t isoprostane concentrations are increased during acute fructose loading in type 2 diabetes. Diabetes Metab. 2008 Apr;34(2):148-54. Epub 2008 Mar 7.

[46] Faure P, Barclay D, Joyeux-Faure M, Halimi S.Comparison of the effects of zinc alone and zinc associated with selenium and vitamin E on insulin sensitivity and oxidative stress in high-fructose-fed rats. J Trace Elem Med Biol. 2007; 21(2):113-9. Epub 2007 Mar 6.



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon pàtient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.