



**HAL**  
open science

# Analyse morphométrique et étude de la répartition des cellules bêta humaines entre la tête et la queue du pancréas

Marc Diedisheim

► **To cite this version:**

Marc Diedisheim. Analyse morphométrique et étude de la répartition des cellules bêta humaines entre la tête et la queue du pancréas. Médecine humaine et pathologie. 2013. dumas-01217426

**HAL Id: dumas-01217426**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01217426>**

Submitted on 19 Oct 2015

**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.

## AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES  
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2013

N° 206

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE  
DOCTEUR EN MÉDECINE

Analyse morphométrique et étude de la répartition des cellules bêta  
humaines entre la tête et la queue du pancréas

Présentée et soutenue publiquement  
le 30 Octobre 2013  
Par

***Marc DIEDISHEIM***

Né le 30 janvier 1984 à Paris (75)

Dirigée par M. Le Professeur Etienne LARGER, P.U-P.H

Jury :

M. Le Professeur Christian Boitard, P.U-P.H ..... Président

M. Le Professeur Xavier Bertagna, P.U-P.H

M. Le Docteur Guillaume Assie, P.H.U

M. Raphaël Scharfmann, D.R 1 Inserm

*Mes sincères remerciements au Professeur Etienne Larger, pour m'avoir donné goût il y a quatre ans à la diabétologie alors que je me destinais à la neurologie.*

*Merci pour m'avoir confié ce travail de recherche, ainsi que pour son aide et ses conseils.*

*Merci à Louise, pour son soutien et sa présence au quotidien.*

*Merci aussi à mes parents, pour m'avoir aidé et encouragé durant mes longues études.*

*Un grand merci à la communauté d'internautes qui partagent bénévolement leurs connaissances, particulièrement dans les forums consacrés à Adobe Photoshop® et ImageJ®.*

*Enfin une grande pensée à Aurore, qui ne m'a pas du tout aidé à la rédaction de cette thèse, mais qui illuminait mes pensées avant même son arrivée, et les illumine encore plus depuis le 18 septembre.*



# TABLE DES MATIERES

<b>Introduction</b> .....	- 4 -
<b>Première partie : Données actuelles</b> .....	- 6 -
I. La Structure Anatomique .....	- 6 -
II. La répartition des ilots de Langerhans .....	- 10 -
II.A Etudes antérieures à un immuno-marquage spécifique .....	- 10 -
II.B Etudes histologiques utilisant la technique de Chalkley .....	- 10 -
II.C Etudes semi-automatisées par informatique .....	- 12 -
II.D Lames virtuelles .....	- 13 -
II.E Immunomarquage par fluorescence ou techniques enzymatiques .....	- 15 -
III. Projet nPOD .....	- 18 -
<b>Seconde partie : Notre Etude</b> .....	- 20 -
I. Objectif de l'étude .....	- 20 -
II. Matériel et Méthodes .....	- 21 -
II.A Source de données .....	- 21 -
II.B Fixation et inclusion du pancréas .....	- 21 -
II.C Immuno-marquage .....	- 22 -
II.D Analyse morphométrique .....	- 23 -
II.E Sélection des lames virtuelles .....	- 24 -
II.F Statistiques .....	- 25 -
III. Résultats .....	- 27 -
III.A Méthode d'analyse : semi-automatisation .....	- 27 -
III.B Données cliniques .....	- 43 -
III.C Tissu pancréatique et coupe de tissu .....	- 44 -
III.D Masse marquée par l'insuline .....	- 45 -
III.E Ilots endocrines .....	- 47 -
III.F Différences entre la tête et la queue du pancréas .....	- 47 -
<b>Troisième partie : Discussion</b> .....	- 49 -
I. Principaux résultats .....	- 49 -

II.	La répartition des cellules bêta dans le pancréas humain.....	- 50 -
III.	Lames virtuelles et analyse semi-automatisée.....	- 52 -
IV.	Coupe de tissu et tissu pancréatique.....	- 53 -
V.	Champs d'application de la mesure de la masse bêta.....	- 54 -
VI.	Le projet nPOD.....	- 55 -
VII.	Perspectives.....	- 57 -
<b>Conclusion.....</b>		<b>- 59 -</b>
<b>Annexes.....</b>		<b>- 60 -</b>
I.	Annexe 1. Procédure de préparation standardisée des pancréas.....	- 60 -
II.	Annexe 2. Procédure d'immuno-marquage.....	- 62 -
III.	Annexe 3. Caractéristiques cliniques et biologiques de chaque individu.....	- 66 -
<b>Bibliographie.....</b>		<b>- 68 -</b>

## Introduction

Etudier la répartition des ilots de Langerhans peut surprendre à notre époque où nous disséquons les cellules bêta pancréatiques à l'échelle moléculaire. La décision de réaliser ce travail fait suite à une étude rapportant une plus grande incidence de diabète à l'âge adulte en cas d'irradiation pour un néphroblastome gauche dans l'enfance versus un néphroblastome droit (de Vathaire et al., 2012). Cette latéralisation du risque est, pour les auteurs, expliquée par les conséquences de l'irradiation d'un plus grand nombre de cellules bêta qui sont concentrées dans la queue du pancréas, donc à gauche. Cette interprétation est appuyée par deux articles cités en référence. Le premier traite de la disposition des cellules bêta dans les ilots humains, sans aborder leur répartition entre la tête et la queue (Bosco et al., 2010). Le second décrit effectivement une plus grande fréquence d'ilots dans la queue que dans la tête du pancréas (Wittingen and Frey, 1974) ; mais il s'agit d'une étude antérieure à l'immunomarquage de l'insuline, réalisée avec une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, portant uniquement sur 9 pancréas, et un décompte très faible d'ilots.

Une recherche plus approfondie dans la littérature retrouve des résultats discordants (Rahier et al., 1983a; Rahier et al., 2008; Saisho et al., 2013; Saito et al., 1978a; Sakuraba et al., 2002; Wang et al., 2013; Wittingen and Frey, 1974; Yoon et al., 2003). Ces résultats discordants sont associés à une méthode de calcul de la fraction cellulaire bêta différente d'une étude à une autre (lorsqu'elle est décrite) :

- il peut s'agir d'un ratio cellulaire (nombre de cellule bêta par rapport à un nombre total de cellules) ou d'un ratio de surface (surface marquée par l'insuline uniquement, ou surface cellulaire bêta) ;

- qu'il s'agisse d'un nombre de cellules ou d'une surface, le dénominateur de la fraction bêta peut être la surface de tissu pancréatique uniquement, ou la surface totale de la coupe de tissu incluant tissu adipeux, tissu de soutien, vaisseaux et canaux pancréatiques, voire même des ganglions lymphatiques ; ce dénominateur n'est pas toujours défini.
- le nombre de coupes est souvent précisé, mais la méthode d'échantillonnage et la proportion de tissu réellement étudiée sont moins détaillés (souvent un champ sur 5 à un grossissement x10 ou x20). Ces critères sont importants pour l'analyse des cellules bêta qui sont réparties de manière hétérogène dans le pancréas.

Cette fraction cellulaire bêta permet de mesurer la masse cellulaire bêta, en la multipliant par la masse pancréatique. Or l'étude de la masse cellulaire bêta est un des piliers de la recherche sur le diabète de type 2, afin de mieux en comprendre la physiopathologie. A cette fin, elle est régulièrement étudiée chez des individus diabétiques de type 2 (Butler et al., 2003; Clark et al., 2001; Clark et al., 1988; Gepts and Lecompte, 1981; Guiot et al., 2001; Kilimnik et al., 2011; Kloppel et al., 1985; Maclean and Ogilvie, 1955; Marchetti et al., 2008; Marchetti et al., 2010; Rahier et al., 2008; Rahier et al., 1983b; Saito et al., 1978b; Saito et al., 1979; Sakuraba et al., 2002; Stefan et al., 1982; Vishwanathan et al., 1972; Westermark and Wilander, 1978; Yoon et al., 2003), chez des individus obèses (Kloppel et al., 1985; Rahier et al., 2008; Saisho et al., 2013; Yoon et al., 2003) ou durant la grossesse (Butler et al., 2010; Van Assche et al., 1978).

C'est devant ces questions de méthodologie, et pour savoir si les ilots endocrines sont réellement plus concentrés dans la queue du pancréas chez l'Homme, que ce travail a été réalisé.

# Première partie : Données actuelles

## I. La Structure Anatomique

Le pancréas, étymologiquement « tout en viande » (grec : Πανκρεας, *pan* : tout ; *kréas* : viande), est un organe annexé au tube digestif, situé en rétropéritonéal. Cet organe peut être divisé en trois régions anatomiques :

- la tête : extrémité duodénale, séparée du corps par le bord droit de la veine mésentérique supérieure
- le corps : partie intermédiaire,
- la queue : extrémité splénique ; la limite entre queue et corps est mal définie, souvent arbitraire (réalisée afin d'obtenir un corps et une queue de longueur égale).

Le pancréas assure deux fonctions étroitement associées à la digestion, une fonction exocrine et une fonction endocrine, portées par des populations cellulaires distinctes. La population cellulaire exocrine constitue la majorité du tissu pancréatique, et sécrète les enzymes pancréatiques dans le duodénum via le canal de Wirsung. La population cellulaire endocrine est beaucoup moins importante en nombre, environ 1% du pancréas (Bonner-Weir, 2005), et est répartie à travers l'ensemble de la glande pancréatique sous forme d'ilots, les ilots de Langerhans.

Les ilots de Langerhans ont été décrits pour la première fois par l'anatomo-pathologiste allemand Paul Langerhans en 1869 (Langerhans, 1869) : il note dans des pancréas de lapins « des petites cellules de forme polygonale et de contenu très homogène, avec des noyaux ronds sans nucléoles, principalement regroupées en paires ou petits groupes ». Alors que Von Mering et Minkowski apportent la preuve expérimentale de l'origine pancréatique du diabète sucré en 1889, en réalisant pour la première fois une



**Histoire de l'insuline, de la découverte des îlots endocrines à la découverte de l'insuline.**

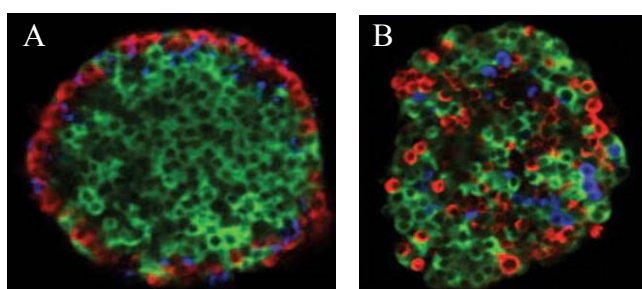
- A** : P. Langerhans.  
**B** : O. Minkowski (gauche) et J. von Mering (droite).  
**C** : E. Laguesse.  
**D** : C.H. Best (gauche) et F. Banting (droite).  
**E** : L. Thompson (premier patient traité par l'insuline).  
**F** : R. Yalow.



pancréatectomie totale chez des chiens (Mering and Minkowski, 1890), c'est Edouard Laguesse, anatomo-pathologiste lillois, qui émet pour la première fois l'hypothèse que ces amas cellulaires sécrètent une substance impliquée dans le diabète et la régulation de la glycémie (Laguesse, 1893), et donne à ces amas cellulaires le nom d'îlots de Langerhans. Il faudra attendre 1921 pour que Banting et Best isolent l'insuline de pancréas canins (dénommée isletin), permettant de traiter pour la première fois un patient diabétique de type 1 le 11 janvier 1922 (Banting et al., 1922) ; enfin, en 1960, Yalow dosera l'insuline par radio-immunologie (Yalow and Berson, 1960), technique rapidement étendue au dosage de multiples hormones et autres substances.

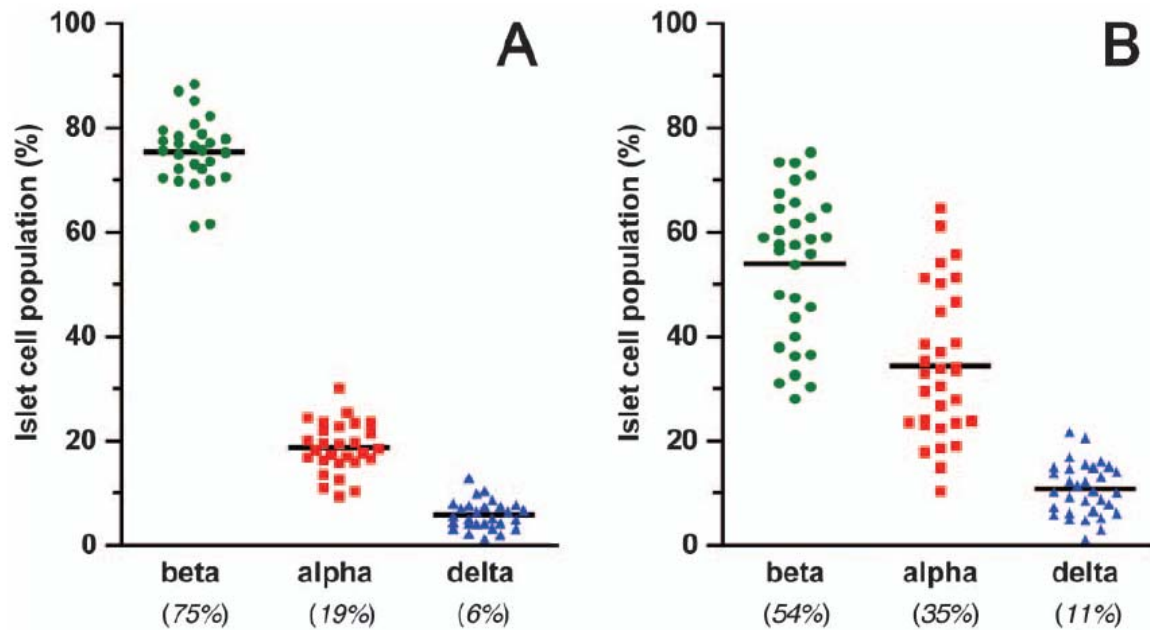
Les îlots de Langerhans regroupent les cellules endocrines présentes dans le pancréas, principalement : cellules bêta (sécrètent de l'insuline, représentent 60 à 80 % des cellules composant un îlot), cellules alpha (glucagon, 15-20 %), cellules delta (somatostatine, 5 – 10 %), cellules PP (polypeptide pancréatique, 15-20 %) (Bonner-Weir, 2005), et cellules epsilon (ghréline, 1%) (Wierup et al., 2002).

Il existe des différences importantes dans la structure des îlots entre les rongeurs et l'humain (Bosco et al., 2010; Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006; Kharouta et al., 2009; Kim et al., 2009). Chez les rongeurs, les cellules alpha sont disposées en périphérie des îlots et les cellules bêta sont regroupées au cœur de l'îlot (Figure 1A), permettant entre autre une sécrétion synchronisée de l'insuline par l'ensemble des cellules bêta, et, le flux sanguin étant centrifuge, l'expression d'un tonus inhibiteur de l'insuline sur les cellules alpha. En revanche chez l'Humain les cellules alpha et bêta apparaissent dispersées dans l'ensemble de l'îlot



**Figure 1 : Différence d'architecture d'un îlot de Langerhans entre la souris et l'humain. A : îlot murin. B : îlot humain avec entremêlement des cellules  $\beta$  avec les cellules  $\alpha$  et  $\delta$ .**  
Magnification x40 ; cellules  $\beta$ , vert ; cellules  $\alpha$ , rouge ; cellules  $\delta$ , bleu.  
Tirées de (Brissova et al., 2005)

(Figure 1B). Une autre différence importante entre les rongeurs et l'humain concerne la composition cellulaire de l'îlot : les cellules alpha et bêta représentent respectivement 19 et 75 % des cellules endocrines chez le rongeur, contre 35 et 54 % chez l'humain (Figure 2). On note également une hétérogénéité inter-individuelle plus importante chez l'humain.



**Figure 2 : Composition cellulaire endocrine d'îlots de souris et d'humains.** **A :** La composition de 28 îlots de souris (de 3 souches différentes) montre une homogénéité du pourcentage de chaque type cellulaire. **B :** En revanche, la composition de 32 îlots humains révèle une hétérogénéité inter-individuelle plus importante, une proportion moindre de cellules bêta et plus importante de cellules alpha. Tiré de (Brissova et al., 2005)

Il est donc important de se rappeler qu'une réalité chez le rongeur, même démontrée avec la plus grande certitude scientifique, ne peut pas être forcément appliquée chez l'Humain.



## ***II. La répartition des ilots de Langerhans***

### **II.A Etudes antérieures à un immuno-marquage spécifique**

L'étude de Wittingen et al., évoquée dans l'introduction et réalisée en 1974, retrouve donc « une concentration d'ilots dans la queue significativement plus grande que dans la tête et le corps » (Wittingen and Frey, 1974). Plus précisément, cette étude est basée sur l'étude de neuf pancréas dont les coupes sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine, sans coloration immunohistochimique des cellules endocrines. Dans ces conditions, les auteurs comptaient en moyenne 25 ilots par section de 30 mm<sup>2</sup> dans la tête, contre 45 dans la queue du pancréas, soit un nombre absolu très faible d'ilot (peut-être en rapport avec la méthode utilisée).

Saito et al. ont également étudié la répartition et le volume des ilots sans immuno-marquage spécifique (Saito et al., 1978a) : ils retrouvent une plus grande densité d'ilots dans la tête du pancréas, mais les ilots étant de taille plus petite, ils représentent une surface totale plus faible dans la tête que dans la queue.

### **II.B Etudes histologiques utilisant la technique de Chalkley**

Plusieurs équipes ont par la suite étudié la répartition des ilots de Langerhans dans le pancréas humain à l'aide d'immuno-marquage à l'insuline. Une première partie de cette littérature est constituée d'articles des années 1980, à une époque où l'informatique n'était pas utilisable pour ces études. La méthode de référence pour étudier la surface occupée par un sous-type cellulaire était alors la technique de Chalkley, développée dans la première moitié du XX<sup>e</sup> siècle (Chalkley, 1943) : on superpose à l'image étudiée une grille, puis on catégorise les cellules se trouvant sous chaque intersection de lignes verticales et horizontales, permettant de calculer un ratio pour un type cellulaire.

C'est avec cette méthode que Malaisse-Lagae et al. étudient 8 pancréas et rapportent le double de cellules bêta dans la queue par rapport à la partie postérieure de la tête (Malaisse-Lagae et al., 1979). Cette partie postérieure de la tête est caractérisée par la présence de nombreuses cellules PP, quasi inexistantes en dehors de ce lobe, et par la pauvreté en cellules bêta (Gersell et al., 1979; Orci et al., 1976; Orci et al., 1978; Rahier et al., 1983b; Stefan et al., 1982; Wang et al., 2013). Dans l'étude de Malaisse-Lagae, le nombre de cellules bêta dans la partie antérieure de la tête n'est étudiée, ne permettant pas d'en calculer le nombre dans l'ensemble de la tête,

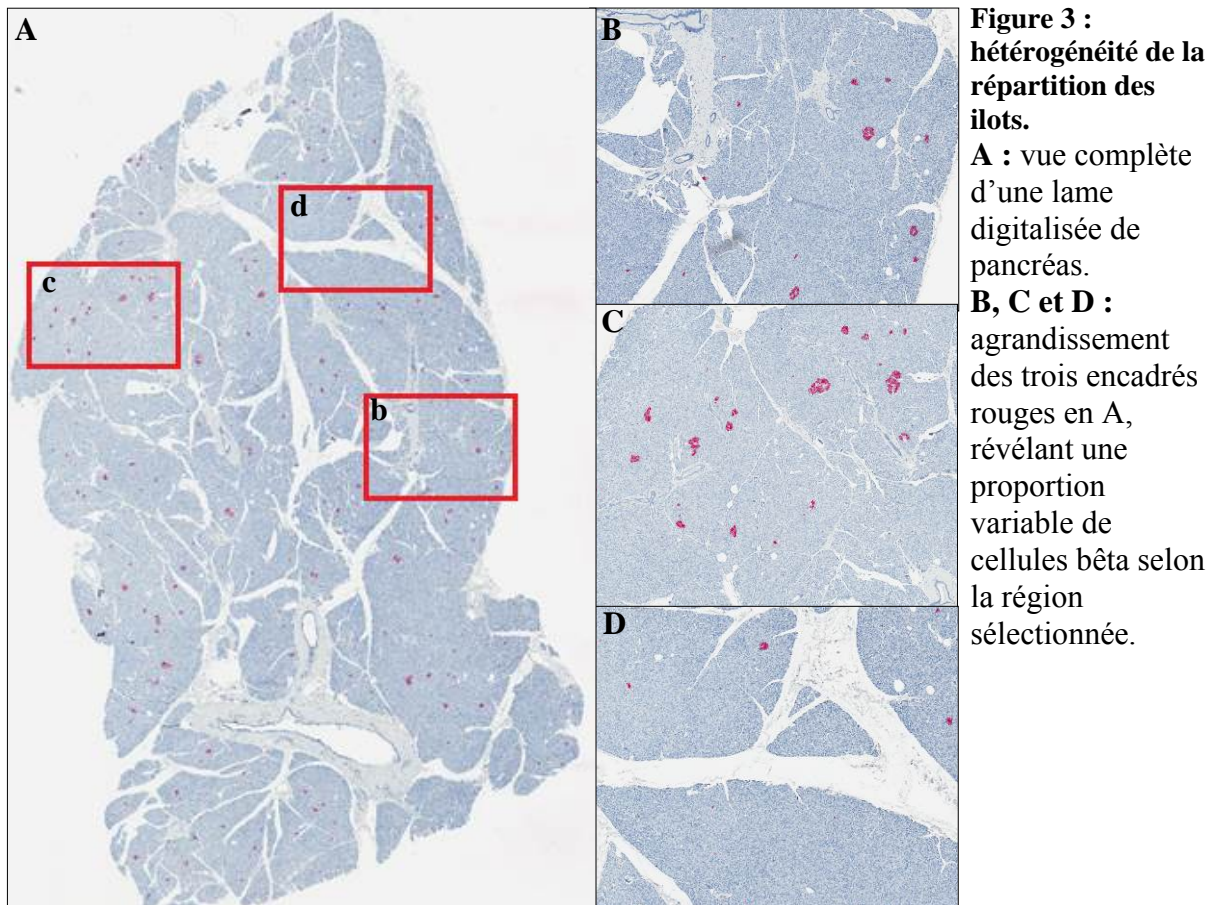
Rahier et al. utilisent également cette méthode de Chalkley, en étudiant un champs sur cinq de chaque coupe. C'est avec cette méthode qu'il a analysé l'évolution de la masse endocrine de 7 pancréas de sujets âgés de 1 à 72 ans au moment du décès (Rahier et al., 1981), puis la répartition des ilots et des cellules bêta à travers le pancréas (Rahier et al., 1983a). Dans ce deuxième travail, Rahier a observé un volume de cellules bêta deux fois plus important dans la queue que dans l'ensemble de la tête du pancréas ; mais cette étude n'incluait que deux individus contrôles (et huit diabétiques de type 2).

Plus récemment au début des années 2000, toujours en utilisant la méthode de Chalkley avec une grille de 90 points par champs, Yoon et al (Yoon et al., 2003) et Sakuraba et al. (Sakuraba et al., 2002) ne retrouvent pas de différence significative dans la densité de cellules bêta entre la tête et la queue du pancréas chez respectivement 10 et 15 individus non diabétiques. En revanche Rahier, dans son célèbre travail sur la masse bêta dans le diabète de type 2, calculait à nouveau une masse de cellules bêta 25% moindre dans la tête comparée à la queue du pancréas chez les 52 contrôles non diabétiques (Rahier et al., 2008).

## II.C Etudes semi-automatisées par informatique

Grâce à l'outil informatique, de nouvelles méthodes d'analyse de surface se développent : au lieu d'étudier uniquement un certain nombre de points d'une image, des programmes analysent des régions entières par reconnaissance de couleur ou seuillage. Ainsi l'équipe de Butler utilise en 2003 (Butler et al., 2003), en 2005 (Meier et al., 2005) et en 2013 (Saisho et al., 2013) le logiciel Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Springs, MD) pour quantifier la masse cellulaire bêta chez des individus contrôles et des diabétiques de type 2 (Butler), des diabétiques de type 1 (Meier), et des obèses (Saisho). Le programme n'analyse que quelques champs obtenus grâce à un microscope relié à un ordinateur, ne représentant chacun qu'une petite partie de la coupe histologique. Pour contourner ce problème, les auteurs utilisent deux solutions : ils limitent l'étude du tissu à un objectif x4 afin de réaliser des sections plus grandes, et ils « *sélectionnent une aire représentative de l'ensemble de la coupe* ». Mais ces solutions sont très imparfaites :

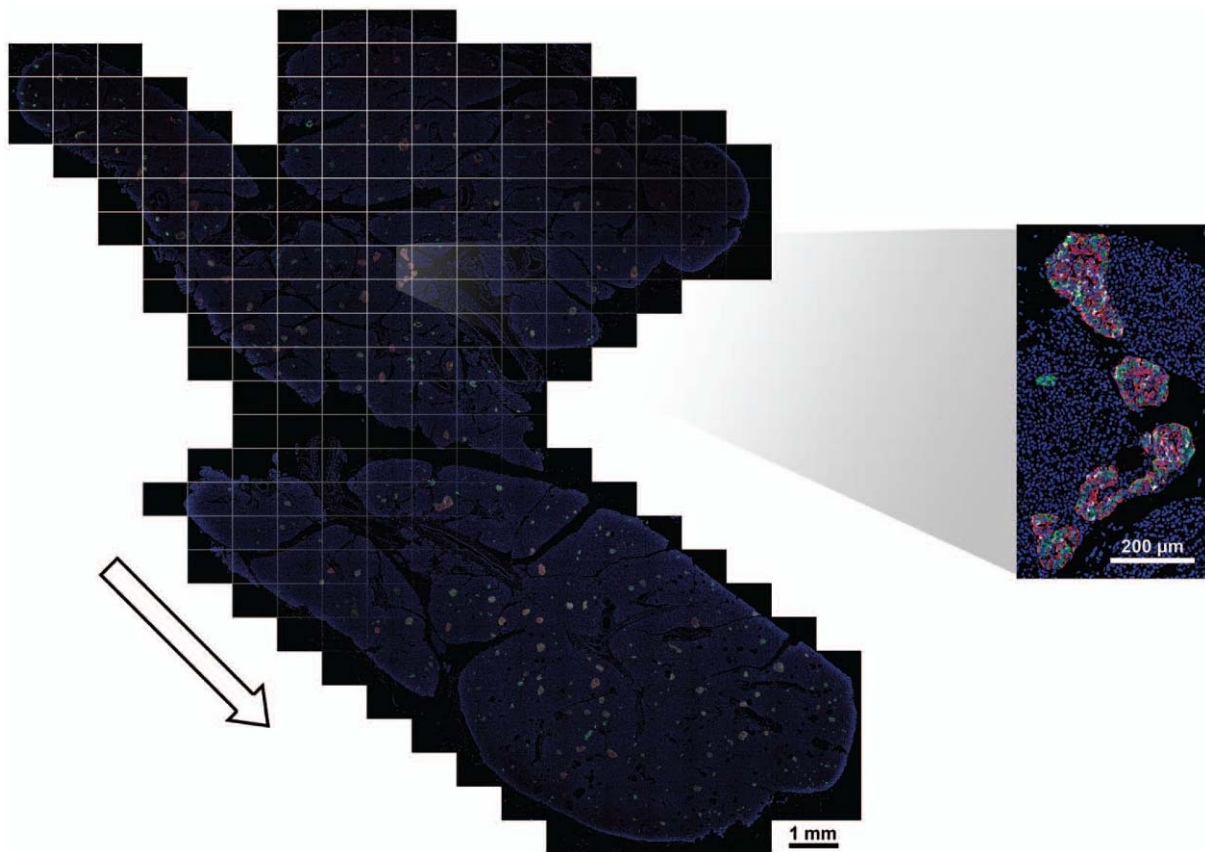
- les ilots étant répartis de manière très hétérogène, la Figure 3 illustre la notion très abstraite d'« aire représentative » ;
- alors que l'on analysait l'ensemble de la coupe de tissu, mais uniquement à travers un nombre restreint de points (méthode de Chalkley), on étudie désormais une surface continue de tissu, mais cette surface analysée est très faible au regard de la surface de la coupe de tissu ;
- en limitant l'analyse à un grossissement x4, des informations structurelles sont perdues.



## II.D Lames virtuelles

C'est pour répondre à cette problématique qu'un nouveau type d'image a récemment été développé, en tirant profit de la puissance de calcul et des espaces de stockage des systèmes informatiques actuels : les lames virtuelles ou *Whole Digital Slide Images* (Isse et al., 2012; Prasad and Prabhu, 2012; Rojo et al., 2009). Ces images en très haute résolution correspondent à l'acquisition de l'ensemble d'une coupe de tissu par un microscope automatique. Ainsi, au lieu de prendre quelques images d'une lame, on acquiert des centaines d'images à fort grossissement (souvent x20, soit une magnification x200), qui sont ensuite reconstruites pour former la lame virtuelle, dans laquelle on peut se déplacer et zoomer avec un logiciel adapté (par exemple le logiciel ImageScope, Aperio Technologies, Inc, Vista, California) (Figure 4).

L'équipe de Hara décrit une technique de travail précise sur des lames virtuelles de pancréas, afin d'étudier la taille des îlots (Kilimnik et al., 2012; Kilimnik et al., 2011; Kim et al., 2011). Ne possédant pas assez de coupes de tissu, ils n'ont pas étudié l'existence de différence régionale entre la tête et la queue du pancréas. En revanche l'équipe de Wang a pu analyser la répartition des îlots entre la tête et la queue à partir de lames virtuelles avec un marquage en immunofluorescence (Wang et al., 2013). Dans ces conditions, les cellules bêta représentent 1,3 % de la surface du pancréas dans la queue contre seulement 0,8% dans la tête. Toutefois cette étude ne porte que sur 23 pancréas, et les auteurs ne précisent pas comment cette fraction cellulaire bêta est calculée (par rapport à l'ensemble de la coupe de tissu, ou uniquement par rapport au tissu pancréatique en excluant le tissu adipeux, et le tissu conjonctif). Butler et al. ont étudié des lames virtuelles de pancréas d'individus diabétiques avec un immuno-marquage enzymatique, sans décrire précisément leur méthode d'analyse (Butler et al., 2013).



**Figure 4** **Lame virtuelle d'une section de pancréas (femme de 66 ans).** Une série de coupes continues sont acquises par un microscope numérique (représentées par chaque encadré) et fusionnées en une seule image ; immunomarquage à l'insuline (vert), glucagon (rouge), somatostatine (blanc) et nucléaire (bleu). De **(Kilimnik et al., 2012)**

## II.E Immunomarquage par fluorescence ou par techniques enzymatiques

Les images acquises par microscope optique sont en mode de couleur RVB (initiales de Rouge-Vert-Bleu) : la couleur de chaque pixel est définie par trois composantes (rouge, vert et bleu), la valeur de chacune des trois composantes variant entre 0 et 255. Ainsi le triplet  $[255, 0, 0]$  donne un rouge pur,  $[0, 255, 0]$  un vert pur,  $[0, 0, 255]$  un bleu pur ; les triplets  $[0, 0, 0]$  et  $[255, 255, 255]$  donnent respectivement du noir et du blanc. Dans les images en niveaux de gris, la couleur de chaque pixel est définie par une seule composante variant entre 0 (noir) et 255 (blanc).

Une méthode d'analyse classique d'une image numérisée repose sur le seuillage. La première étape consiste à convertir les couleurs en niveaux de gris. La seconde étape réalise le seuillage proprement dit selon l'intensité de gris. A partir d'une valeur seuil fixée (par exemple à 123), l'ensemble des pixels sont convertis en noir ou blanc : les pixels dont la valeur est supérieure au seuil prennent la valeur 255 (blanc), et ceux dont la valeur est inférieure au seuil prennent la valeur 0 (noir). La troisième étape consiste à quantifier le nombre de pixels noirs. Cette méthode est parfaitement adaptée à des images marquées en immunofluorescence, qui ne comportent qu'une seule couleur par fluorochrome : une seule des trois composantes rouge, vert, ou bleu, varie en fonction de l'intensité du marquage. Par exemple, dans une image marquée avec un fluorochrome rouge, la couleur varie entre  $[0, 0, 0]$  pour un pixel non marqué par le fluorochrome (apparaissant noir) et  $[255, 0, 0]$  pour un pixel marqué de manière intense (apparaissant rouge pur). Lors de la conversion en niveau de gris, l'intensité du gris correspond alors à l'intensité de marquage, et un seuillage peut être facilement réalisé.

En revanche, une image marquée par méthodes enzymatiques possède plusieurs couleurs, chacune des couleurs variant en intensité. Cette association de couleur permet l'apport d'informations structurelles et anatomiques absentes du marquage par fluorescence. Lors de la conversion en niveaux de gris de cette image, un gris d'une intensité donnée peut correspondre à plusieurs couleurs sur l'image d'origine. Dans ces conditions, il est possible de réaliser un seuillage selon l'intensité de gris uniquement si le marquage d'intérêt est nettement plus intense sur l'image d'origine. Dans le cas inverse, il devient difficile de trouver un seuillage avec un bon rapport sensibilité / spécificité : soit le seuillage inclut tout le marquage d'intérêt mais est très contaminé, soit le seuillage est spécifique mais exclue une part importante du marquage d'intérêt. Cette problématique se pose particulièrement lorsque le marquage d'intérêt représente une faible partie de l'image, la contamination étant

proportionnellement plus importante, ce qui est le cas d'un immuno-marquage à l'insuline d'une coupe de pancréas (environ 1%).



### **III. Projet nPOD**

On peut s'étonner de l'absence de réponse claire à une question qui paraît simple, avec plus de 40 années écoulées depuis les premières études sur ce sujet. Outre les méthodes d'analyse histologique, un problème majeur rencontré dans l'étude du pancréas humain (et expliquant les échantillons souvent restreints) est avant tout sa disponibilité : des biopsies en routine ou post-mortem ne sont pas réalisables en raison de la position rétro-péritonéale de cet organe, tandis que l'obtention de pancréas entier de qualité est rare (diminution de réalisation d'autopsie, difficultés propres au pancréas possédant une forte capacité d'auto-digestion, priorité à la réalisation de transplantations d'ilots). C'est dans cette problématique que s'inscrit le projet nPOD (*The Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes*, [www.jdrfnpod.org](http://www.jdrfnpod.org)), développé par la *Juvenile Diabetes Research Foundation*, initialement afin de permettre l'étude du pancréas dans le diabète de type 1 (Campbell-Thompson et al., 2012a). Ce projet a plusieurs objectifs :

- recueillir les pancréas et d'autres tissus adjacents (ganglions, duodénum, rate) d'individus décédés, à travers une collaboration scientifique dans le monde entier ; ces organes proviennent d'individus présentant un diabète de type 1 mais également un diabète de type 2, d'individus « à risque » de diabète de type 1 (anticorps positifs mais normoglycémiques), et d'individus non diabétiques (et décédés de pathologie n'affectant pas le pancréas).
- réaliser des coupes histologiques avec différents immuno-marquages de manière standardisée ;
- favoriser la collaboration entre les chercheurs scientifiques pour étudier les aspects immunologiques, histologiques, viraux et métaboliques du développement du diabète de type 1.

Mis en place en 2007, le projet met à disposition de la communauté scientifique internationale en août 2013 11.756 coupes histologiques provenant de 255 pancréas, et s'implémente de 50 pancréas par an. Parallèlement, les publications utilisant cette base de données apparaissent à un rythme croissant : 3 en 2008-2009, 3 en 2010, 6 en 2012, 18 en 2012 (<http://www.jdrfnpod.org/publications.php>). 91 projets actifs de recherche sont déclarés auprès de nPOD (<http://www.jdrfnpod.org/current-projects.php>).

Si ce projet a initialement pour but d'étudier les mécanismes physiopathologiques du diabète de type 1, il peut également servir à d'autres projets de recherche. Kim et al. ont utilisé des coupes de pancréas d'individus sains afin d'analyser la structure de quelques îlots, sans réaliser de quantification ni d'analyse globale des lames virtuelles (Kim et al., 2009). Plus récemment Butler et al. (Butler et al., 2013) ont utilisé des coupes de pancréas de personnes diabétiques de type 2 pour étudier une corrélation entre masse bêta et utilisation d'analogues du GLP-1 ou d'inhibiteurs de la DPP-4. En revanche aucune publication n'a concerné la structure du pancréas provenant d'individus sains en analysant les lames dans leur intégralité.

## **Seconde partie : Notre Etude**

### ***I. Objectif de l'étude***

L'objectif principal de notre étude était d'étudier la distribution des ilots de Langerhans dans la tête comparée à la queue du pancréas chez des individus non diabétiques.

Le deuxième objectif, conditionnant la réussite de l'objectif principal, était de savoir si les pancréas de la base nPOD pouvaient être utilisés pour cette analyse. Cela nécessitait de :

- mettre au point un outil informatique pour analyser des lames virtuelles de pancréas immunomarquées par technique enzymatique ;
- valider cette méthode d'analyse en comparant les données de masse bêta obtenues avec celles de la littérature, en les corrélant aux données cliniques disponibles dans la base nPOD (âge, IMC) ;
- analyser la répartition de l'immuno-marquage à l'insuline entre la tête et la queue du pancréas.

## **II. Matériel et Méthodes**

### **II.A Source de données**

Les coupes histologiques de pancréas ont été téléchargées à partir du réseau nPOD (<http://www.jdrfnpod.org/>), mis en place par la Fondation de la Recherche sur le Diabète Juvenile (JDRF), à l'université de Floride à Gainesville, Floride (Campbell-Thompson et al., 2012a). En juillet 2013, nous avons téléchargé les images à un grossissement x10 (magnification x100) ; à cette résolution, chaque image contient entre 50 et 800 millions de pixels (chaque image pèse entre 200Mo et 1,2Go). Les pancréas proviennent de donneurs d'organes américains en état de mort cérébrale, sans critère d'exclusion (hormis une sérologie VIH, VHB ou VHC positive). Ces donneurs sont classés en quatre catégories : diabétique de type 1, à risque de diabète de type 1 (au moins un anticorps positif parmi les anticorps anti-GADAb, IA-2Ab, ZnT8 et âge inférieur à 30 ans), diabétique de type 2, non diabétique. Pour chaque individu, la cause du décès, l'âge et l'indice de masse corporelle (IMC) ont été systématiquement collectés sur la base de données nPOD, ainsi que l'hémoglobine glyquée (HbA1c) et le peptide-C quand ceux-ci avaient été réalisés.

### **II.B Fixation et inclusion du pancréas**

Le projet nPOD utilise une procédure de préparation standardisée des pancréas prélevés sur donneurs décédés (annexe 1). Le pancréas est divisé en trois régions : la tête, le corps et la queue. La tête correspond à la région duodénale jusqu'à la région proximale de l'isthme (situé en avant des vaisseaux mésentériques supérieurs) ; le reste du pancréas est divisé en deux parties égales pour obtenir le corps (partie médiane) et la queue (extrémité

splénique). Chaque région est pesée, puis est découpée de dedans en dehors en sections de 5 mm d'épaisseur, tout en maintenant l'orientation anatomique. L'intégrité des tissus est maintenue grâce à un temps de préparation inférieur à 2 heures. En vue d'une inclusion en paraffine, chaque section est éventuellement recoupée afin d'obtenir des blocs d'environ 1,5 x 1,5 x 0,5 cm, qui sont fixés dans une solution de formaldéhyde 10% neutralisée pendant  $24 \pm 8$  heures. La fixation est terminée par un transfert dans de l'éthanol 70%, puis les échantillons sont inclus en paraffine. Enfin des coupes de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées, afin d'obtenir au moins 7 coupes provenant de la tête, 4 du corps et 4 de la queue du pancréas.

## II.C Immuno-marquage

Tous les pancréas de la base nPOD ont eu des colorations standardisées : hématoxyline-éosine et double immunomarquage : insuline et Ki67, glucagon et CD3. Pour certains organes, d'autres immunomarquages ont été faits. Dans la plupart des cas ces colorations ont été faites sur des coupes de la tête et des coupes de la queue du pancréas.

Les immunomarquages ont été faits selon une procédure établie par le réseau nPOD (annexe 2) et décrite par Campbell-Thompson (Campbell-Thompson et al., 2012b). Pour les lames que nous avons utilisées, marquées à l'insuline et Ki67, les échantillons avaient été déparaffinés puis incubés avec un anticorps polyclonal anti-insuline porcine fait chez le cobaye (DAKO, Carpinteria, CA) et un anticorps monoclonal de souris anti-Ki67 humain. Les révélations ont été faites respectivement par un système phosphatase alcaline-Fast Red et par un système peroxydase-DAB. Les marquages incluent des contrôles positifs et négatifs pour chaque anticorps, et chaque nouveau lot d'anticorps est validé pour reproduire l'intensité des colorations précédentes. Enfin une contre coloration à l'hématoxyline est réalisée, celle-ci assez marquée en général a été source de difficultés dans notre analyse d'image. Les lames immunomarquées sont ensuite scannées par un microscope automatique à une magnification

x200 puis reconstruites en une lame virtuelle avec un Aperio ScanScope CS (Aperio Technologies, Vista, CA) et Spectrum Plus version 11 (Aperio Technologies, Vista, CA).

## II.D Analyse morphométrique

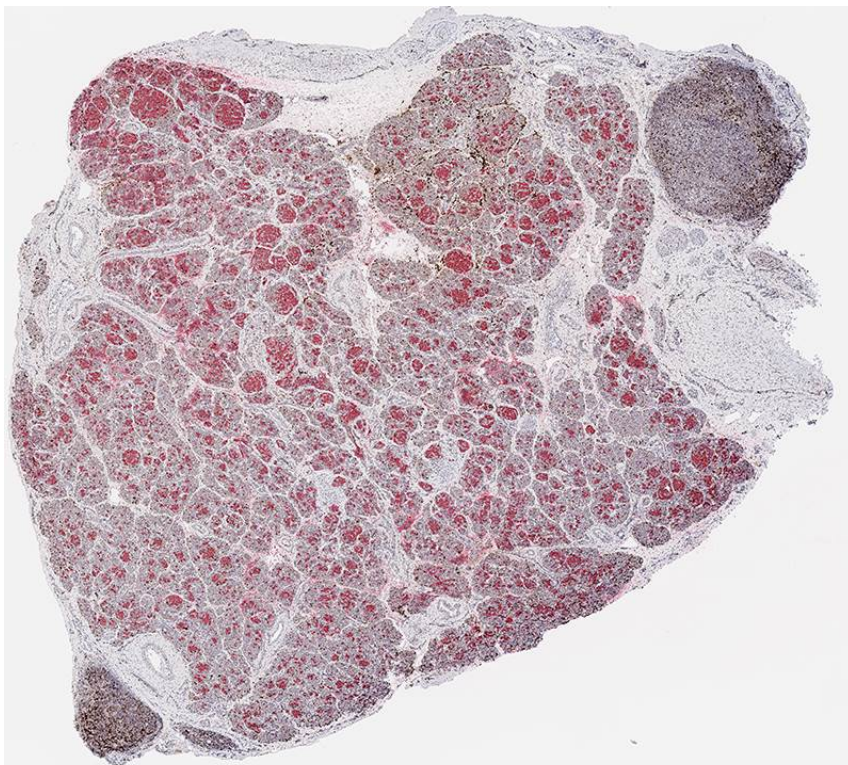
La mise au point de la méthodologie d'analyse représente une partie significative de mon travail de thèse et sera développée au chapitre des résultats. Après exclusion des ganglions lymphatiques facilement repérables grâce à la contre-coloration à l'hématoxyline, nous avons pour chaque image analysé la surface de coupe, la surface de tissu exocrine de chaque coupe, c'est-à-dire la surface de coupe moins le tissu adipeux, le tissu conjonctif, les lumières vasculaires, canalaire et autres artéfacts de coupe, et la surface marquée au fast-red (insuline). Cela nécessitait de mettre au point une procédure d'analyse d'image permettant de séparer automatiquement et sans ambiguïté les parties de la coupe marquées au fast-red (insuline). Nous avons mis au point une procédure permettant dans un premier temps, de délimiter la surface à analyser, puis de la convertir en trois niveaux de gris : noir pour l'insuline, gris foncé pour le parenchyme pancréatique (tissu exocrine), gris clair pour le mésenchyme incluant le tissu conjonctif, la graisse, les vaisseaux et les canaux pancréatiques. Enfin les surfaces de ces différentes parties ont été mesurées. On avait pour chaque coupe une échelle, permettant de vérifier que la magnification était constante et permettant d'exprimer les surfaces en valeur absolues (mm<sup>2</sup>). Ces étapes ont été effectuées avec le logiciel Photoshop version CS6 Extend (Adobe Systems, San Jose, CA) pour ce qui est de la partie pré-analytique. Les mesures de surface ont été faites avec une macro écrite pour le logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Les surfaces marquées à l'insuline ont été rapportées d'une part à la surface de coupe, d'autre part à la surface exocrine, et enfin, lorsqu'on avait la masse du pancréas, les pourcentages ont été convertis en masse. Une partie de la difficulté tient au fait que seul le cytoplasme des cellules bêta est marqué par la réaction immunohistochimique,

ne représentant ainsi qu'une fraction des cellules bêta. Une analyse a été conduite en prenant en compte l'ensemble de la surface des îlots de Langerhans (incluant les autres types de cellules endocrines), qui ont été délimité de manière automatique par un script avec le logiciel Photoshop.

## II.E Sélection des lames virtuelles

Les lames virtuelles ont été téléchargées via le site internet du réseau nPOD (<http://www.jdrfnpod.org/>) : 509 lames virtuelles de coupes de pancréas d'individus non diabétiques avec un immuno-marquage à l'insuline étaient disponibles (en date du 10/06/2013). Nous avons exclu de l'analyse :

- les lames correspondant à des coupes sériées : ces lames ont été reconnues car présentant une architecture similaire, avec distribution identique comparée à une autre lame du même individu. Cette sélection a été faite par 2 observateurs en vidéoprojection de l'ensemble des lames disponibles. Dans cette même étape de sélection des lames nous avons éliminé les lames trop dégradées ou présentant un bruit de fond trop important ;
- les lames dont l'immuno-histochimie de l'insuline avait été faite à la peroxydase-DAB, puisque colorées en marron alors que notre analyse avait été mise au point pour des surfaces rouges ;
- enfin les lames provenant de pancréas fœtaux ont été exclues en raison d'organisation et de marquage à l'insuline particuliers (Figure 5).



**Figure 5 : coupe pancréatique d'un fœtus de 32 semaines d'aménorrhée.** Les coupes provenant de fœtus ont été exclues en raison de la différence importante de structure du pancréas et d'organisation des îlots.

## II.F Statistiques

Les données ont été analysées avec deux logiciels SigmaPlot® version 12.5 (San Jose, CA) et GraphPad Prism® version 6.02 (San Diego, CA).

La majeure partie de nos données n'étant pas distribuées normalement, nous avons utilisé pour comparer les échantillons indépendants le test non paramétrique de Mann-Whitney et pour comparer les données en paires appariées le test de Wilcoxon pour observations appariées (par exemple pour analyser la distribution de la surface marquée par l'insuline dans la tête et la queue du pancréas).

Concernant l'étude de la masse pancréatique et de la masse marquée à l'insuline, une corrélation avec chacune des données cliniques a été évaluée par le test de corrélation de rangs de Spearman. En cas de corrélation de Spearman associée au seuil de  $p < 0.05$ , nous



avons réalisé une analyse par régression linéaire multiple afin de démontrer et de quantifier l'association indépendante.

Sauf précision inverse, les moyennes sont rapportées avec l'écart-type. Un  $p$  inférieur à 0,05 est considéré comme significatif.

### **III. Résultats**

#### **III.A Méthode d'analyse : semi-automatisation**

Les lames virtuelles ont été téléchargées de la base nPOD à une magnification x100 et à une échelle de 1,005  $\mu\text{m}$  par pixel (1 mm = 995 pixel). Elles ont une surface moyenne de 2,64  $\text{cm}^2$  soit 263 millions de pixels par image (70 à 540 millions de pixel par lame, la taille de la coupe de pancréas augmentant avec l'âge).

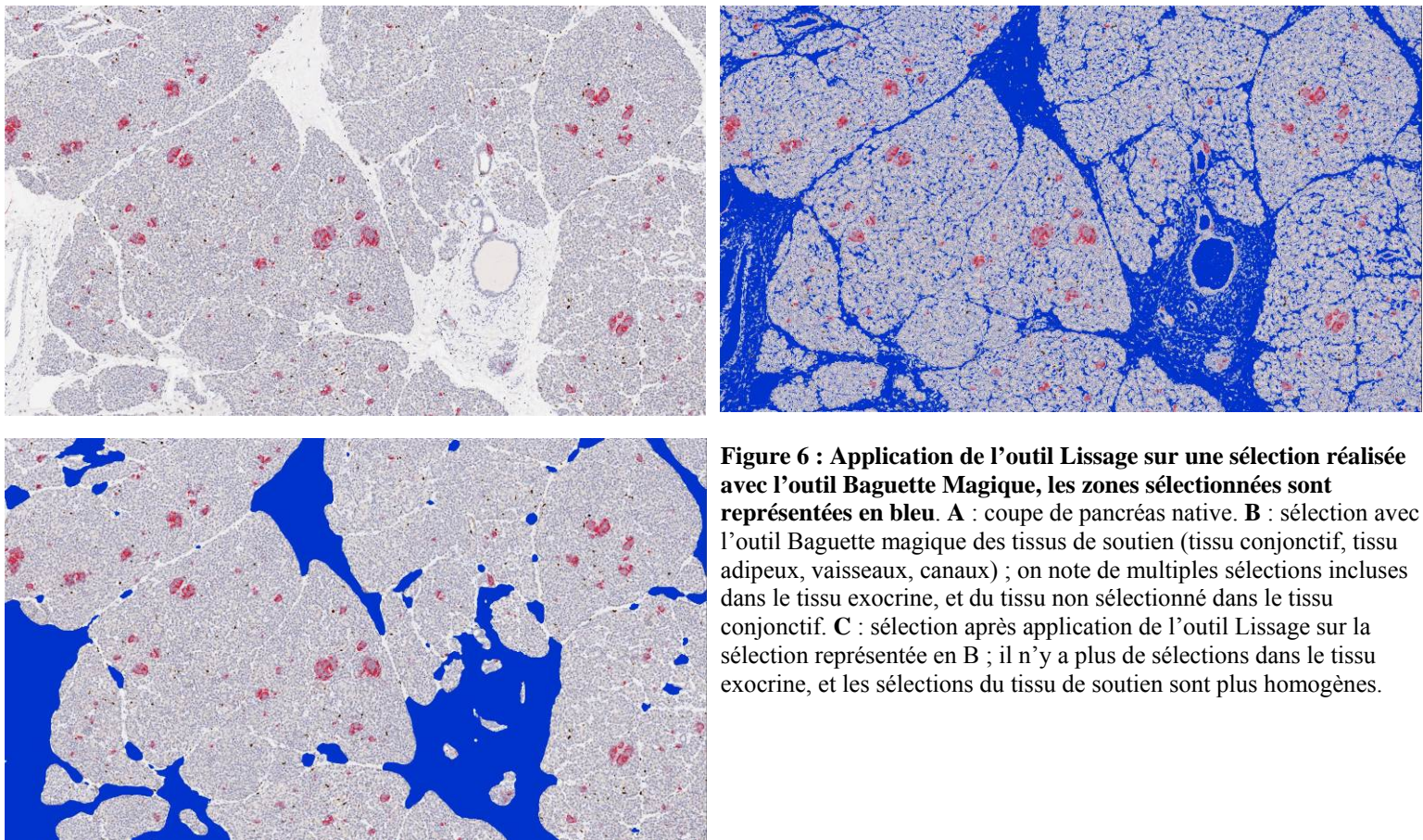
La première étape a consisté à délimiter la surface à analyser (coupe de tissu) ; puis l'image a été convertie en trois niveaux de gris : noir pour l'insuline, gris foncé pour le parenchyme pancréatique (tissu exocrine), gris clair pour le mésenchyme incluant le tissu conjonctif, la graisse, les vaisseaux et les canaux pancréatiques. Ces étapes ont été réalisées avec le logiciel Photoshop<sup>®</sup>. Puis les surfaces de ces différentes parties ont été mesurées.

##### **III.A.1 Les fonctions utilisées avec Photoshop<sup>®</sup>**

- sélection avec l'outil baguette magique : en cliquant sur un pixel, cet outil sélectionne les pixels de couleur et de luminosité plus ou moins similaires à ce pixel en fonction de la tolérance définie par l'utilisateur ; plus la tolérance est faible, moins la baguette magique va sélectionner de nuances de couleurs ; plus la tolérance est élevée, plus la baguette magique va sélectionner une large plage de couleurs ; l'utilisateur précise si la recherche de pixels similaires est réalisée sur l'ensemble de l'image ou uniquement sur les pixels contigus.
- sélection avec l'outil plage de couleurs : cet outil permet de définir une plage de couleurs en les sélectionnant sur l'image à l'aide de pipettes. Tous les pixels de

l'image dont la couleur appartient à cette plage sont alors sélectionnés. La plage de couleurs peut être sauvegardée, afin de sélectionner la même plage de couleurs sur un ensemble de fichiers ;

- modification d'une sélection de pixels avec l'outil lissage : permet de modifier une sélection réalisée avec l'outil baguette magique ou l'outil plage de couleurs. Pour chaque pixel sélectionné, Photoshop examine les pixels dans un rayon défini par l'utilisateur. Si plus de la moitié des pixels voisins sont sélectionnés, le pixel reste dans la sélection, et les pixels désélectionnés environnants sont ajoutés à la sélection. Si moins de la moitié des pixels voisins sont sélectionnés, le pixel est retiré de la sélection. L'objectif est d'harmoniser les zones sélectionnées et les zones non sélectionnées (Figure 6) ;
- scripts : un script est une série de tâches exécutées sur un fichier unique ou un lot de



**Figure 6 : Application de l'outil Lissage sur une sélection réalisée avec l'outil Baguette Magique, les zones sélectionnées sont représentées en bleu. A : coupe de pancréas native. B : sélection avec l'outil Baguette magique des tissus de soutien (tissu conjonctif, tissu adipeux, vaisseaux, canaux) ; on note de multiples sélections incluses dans le tissu exocrine, et du tissu non sélectionné dans le tissu conjonctif. C : sélection après application de l'outil Lissage sur la sélection représentée en B ; il n'y a plus de sélections dans le tissu exocrine, et les sélections du tissu de soutien sont plus homogènes.**

fichiers. Les scripts peuvent inclure des étapes permettant à l'utilisateur d'accomplir manuellement certaines tâches.

### **III.A.2 Sélection de la coupe de tissu**

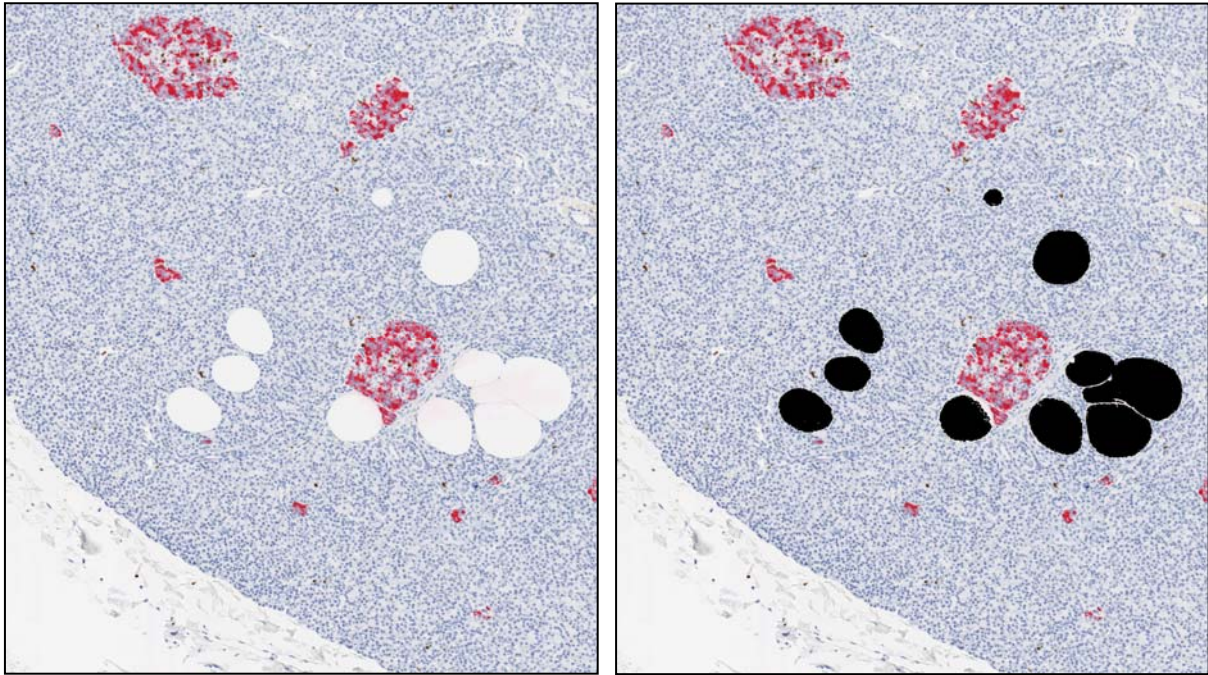
Cette première étape a consisté à délimiter la surface de tissu à analyser (coupe de tissu). Un script combinant l'outil de sélection baguette magique (réglée en pixels contigus) et l'outil lissage a permis de semi-automatiser la sélection. En raison d'une balance des blancs différente entre les lames virtuelles, et de la présence d'éventuelles contaminations (bulles, poussières), cette sélection a ensuite été validée manuellement pour chaque lame.

### **III.A.3 Sélection du tissu pancréatique**

Lors de cette seconde étape, nous avons identifié le tissu pancréatique regroupant le tissu exocrine et le tissu endocrine, donc en excluant de la coupe de tissu le tissu conjonctif, le tissu adipeux, les canaux et les vaisseaux. Là encore un script combinant l'outil de sélection baguette magique (réglée en pixels non contigus) et l'outil lissage a permis de semi-automatiser la sélection. Comme pour l'étape précédente, cette sélection est validée manuellement pour chaque lame.

37 lames présentaient des trous répartis sur l'ensemble du tissu (Figure 7). Ces trous étaient automatiquement exclus de la surface à analyser. Cet artéfact ne gêne pas la quantification du tissu endocrine, car les lacunes touchent l'ensemble des tissus sans biais de sélection.

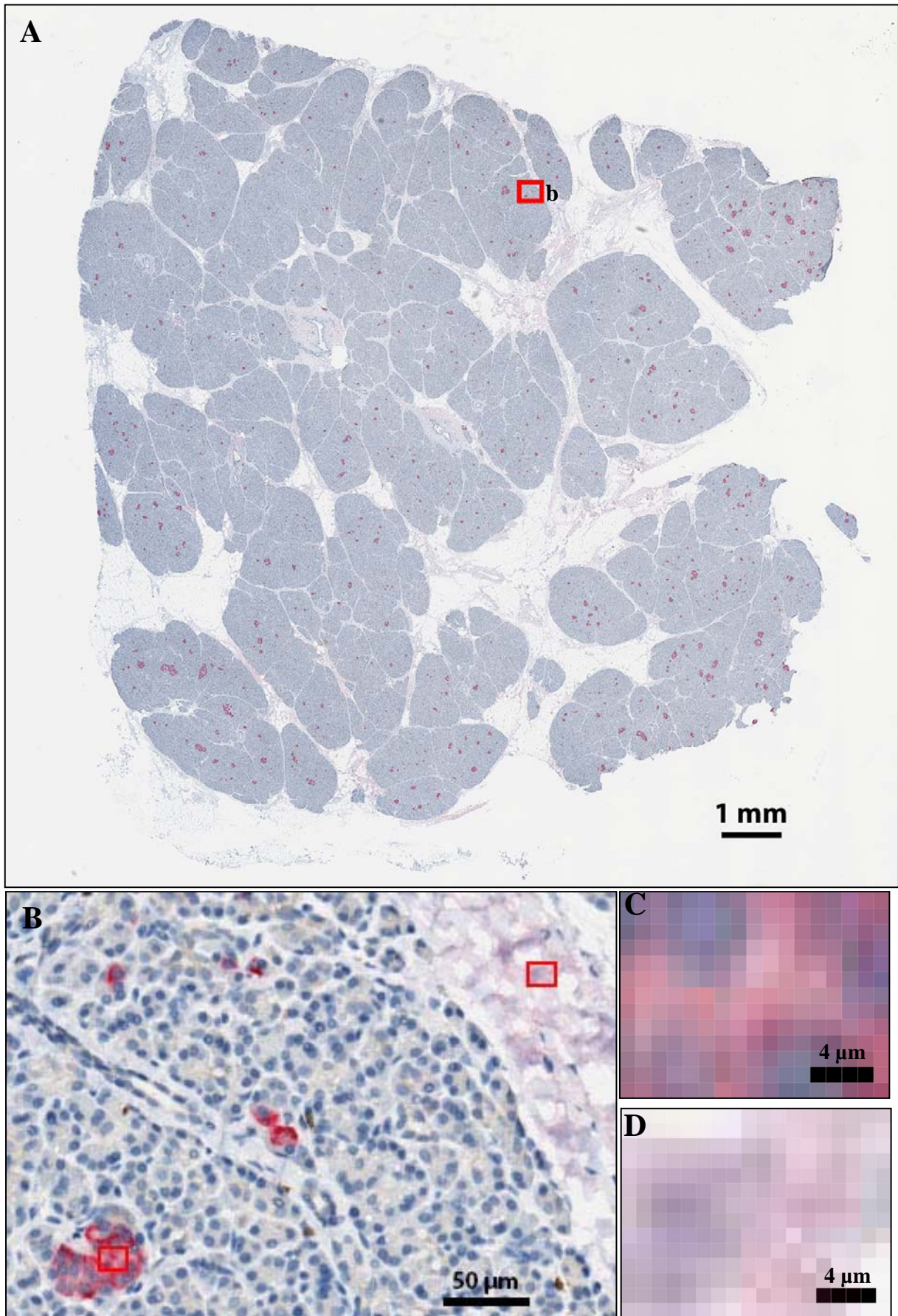




**Figure 7 : Détection automatisée de trous liés à des artefacts dans le tissu.** A gauche l'image originale, à droite les trous ont été automatiquement détectés et remplacés par du noir.

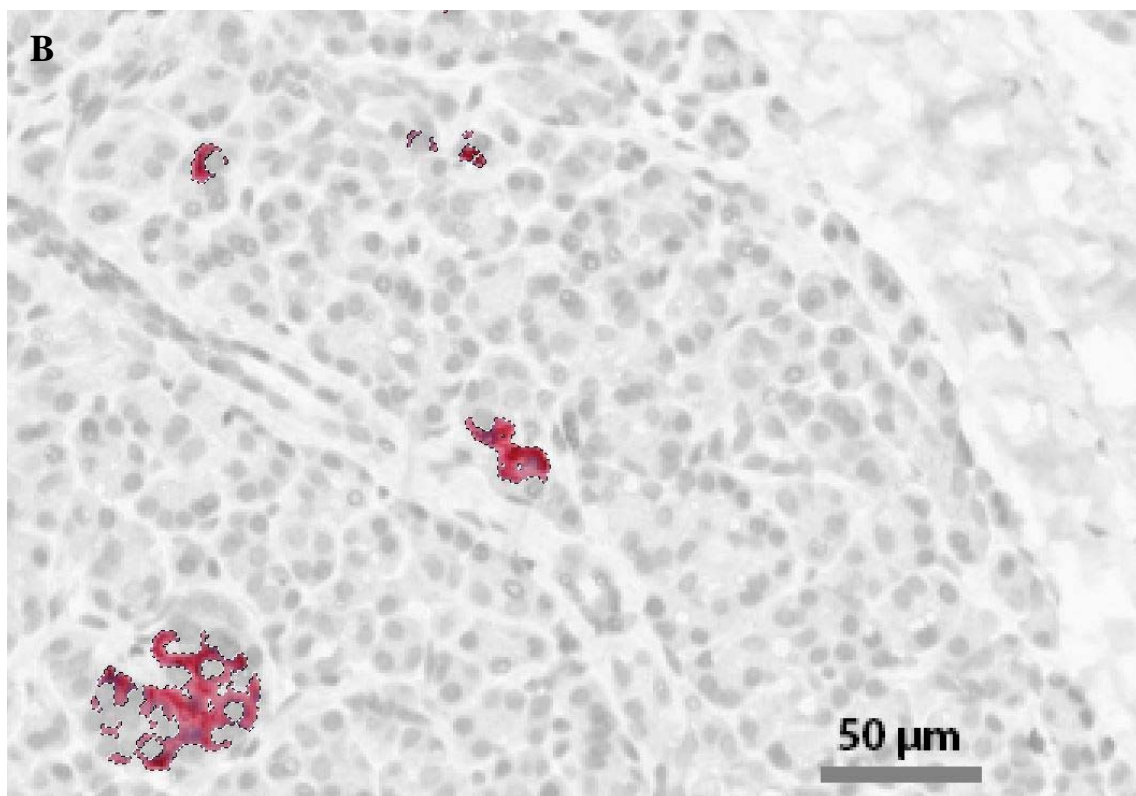
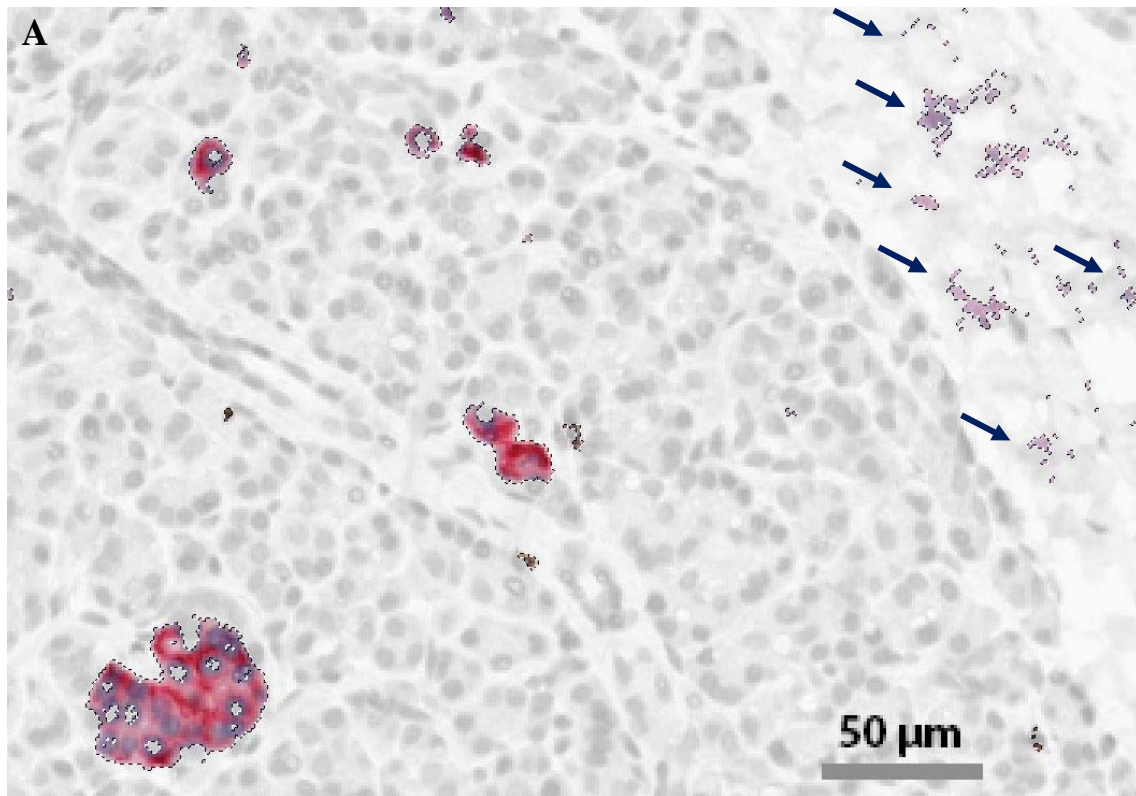
#### **III.A.4 Sélection de la surface marquée au Fast-Red (insuline)**

Les cytoplasmes contenant de l'insuline apparaissent en rouge (marqués au Fast-Red). La sélection est réalisée avec l'outil plage de couleurs. L'œil humain détermine facilement où sont les cellules bêta sur une vue d'ensemble (Figure 8 A-B). En revanche Photoshop analyse l'image pixel par pixel, et sélectionne tous les pixels dont la couleur appartient à la plage de couleurs définie. Si la plage de couleurs inclut le rose, les pixels roses seront sélectionnés, qu'ils correspondent réellement à un signal Fast-Red (Figure 8 C) ou à de la graisse rosée (Figure 8 D). Si la plage de couleurs est définie de manière sensible afin de sélectionner toute la surface marquée des cellules bêta, elle sélectionnera également des pixels ne correspondant pas à un immuno-marquage de l'insuline (Figure 9 A). En revanche, une plage de couleurs définie de manière spécifique pour ne pas être contaminée sera moins sensible (Figure 9 B).



**Figure 8 :** Lame virtuelle de pancréas avec un immunomarquage à l'insuline révélé par du Fast-Red (Rouge). **A :** coupe de pancréas vue dans son intégralité. **B :** agrandissement de la zone encadrée en A, permettant de visualiser facilement les cellules bêta (cytoplasme marqué en rouge). **C et D :** zones encadrées en B agrandie afin de visualiser chaque pixel : des pixels de couleur identique (roses et violet) apparaissent à la fois dans des cellules bêta (C) et dans le tissu adipeux (D).



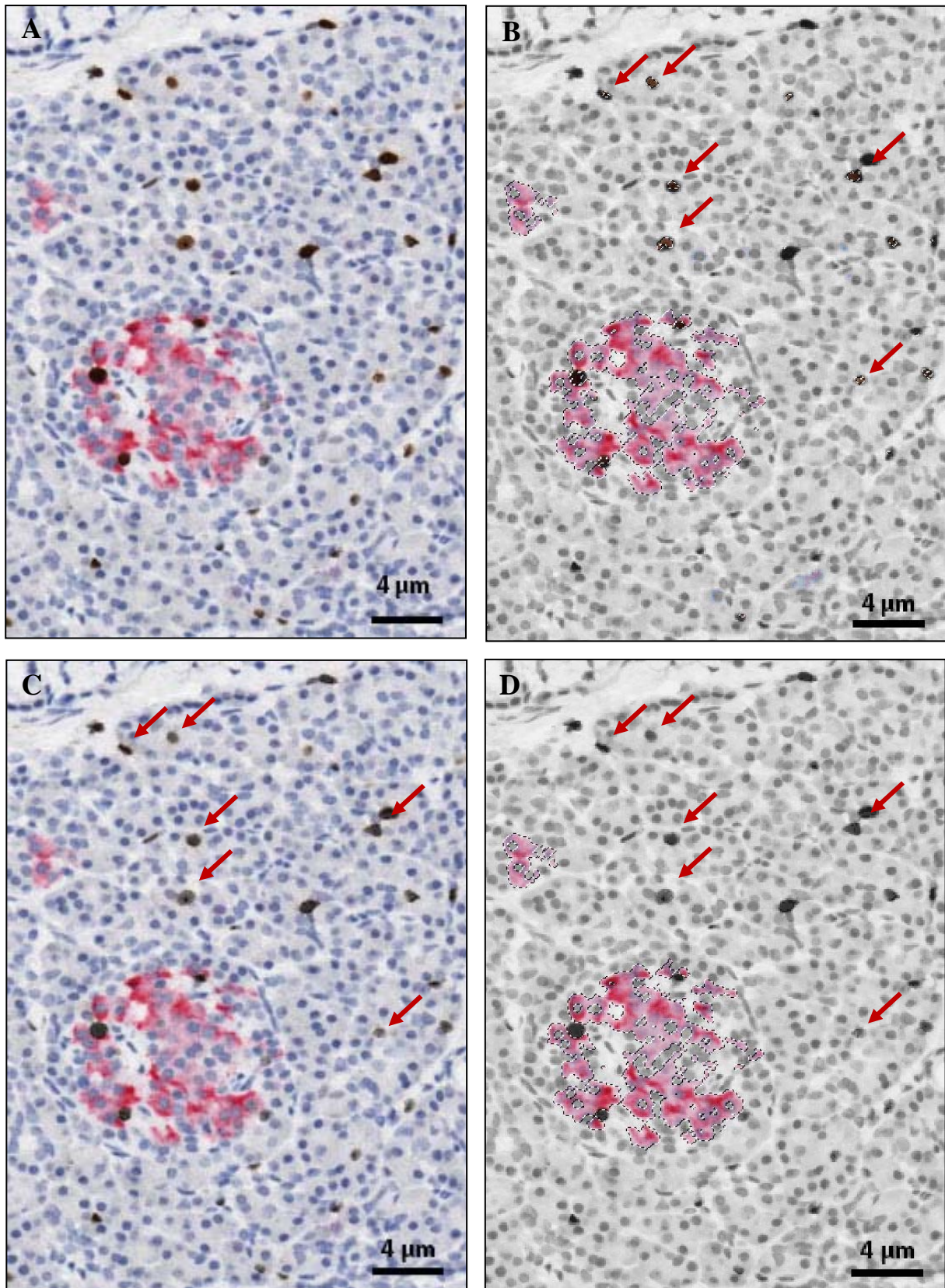


**Figure 9 : plage de couleurs définie de manière sensible (A) ou spécifique (B).** **A** : Plage de couleurs définie de manière sensible, sélectionnant largement le signal Fast-Red mais également des pixels du tissu adipeux sélectionnés (flèches). **B** : plage de couleurs définie de manière spécifique, sélectionnant uniquement le signal Fas-Red le plus intense. La sélection a été réalisée à partir de l'image présentée à la figure 8B. Les pixels non sélectionnés sont désaturés et apparaissent en gris.

La définition d'une plage de couleurs sensible mais restant spécifique est limitée par trois types de contamination : l'immunomarquage Ki-67 au DAB réalisé conjointement sur les lames, le tissu adipeux lorsqu'il apparaît rosé (lié à une contre coloration à l'hématoxyline assez marquée), et un immunomarquage Fast-Red non spécifique :

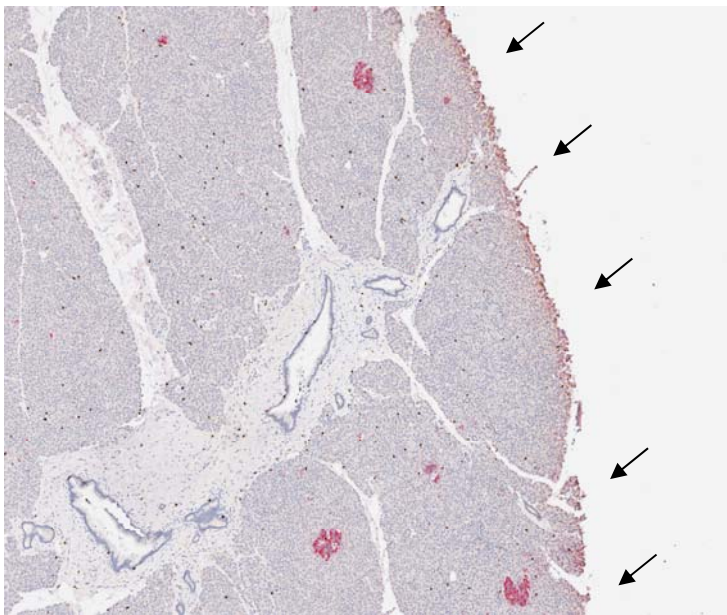
- l'immunomarquage du Ki-67 réalisé au DAB apparaît marron. L'ensemble des couleurs créées par ce marquage sont différentes de celles créées par le marquage Fast-Red, mais certaines couleurs sont incluses dans la plage de couleurs définie pour le marquage Fast-Red (en raison du mode de couleur RGB, voir Première partie II.E). Une première étape consiste donc à sélectionner le marquage DAB de manière spécifique et à le désaturer ; ces pixels devenant gris, ils ne seront plus sélectionnés par une plage couleur définie pour le marquage du Fast-Red (Figure 10) ;
- les pixels rosés du tissu adipeux sont plus compliqués à éviter : ces pixels ne peuvent pas être sélectivement désaturés comme le marquage DAB, car leur couleur est identique à certains pixels marqués par le Fast-Red. L'analyse du signal Fast-Red n'est réalisé que dans le tissu pancréatique, et les plages de tissu adipeux les plus larges sont exclues lors de la sélection du tissu pancréatique. les contaminations sont donc restreintes à de très faibles surfaces. Les plus importantes sont éliminées manuellement (toutes les images sont relues). Enfin les plus petites sont automatiquement exclues lors de l'étape de quantification par le logiciel ImageJ (voir III.A.7 Analyse avec ImageJ).



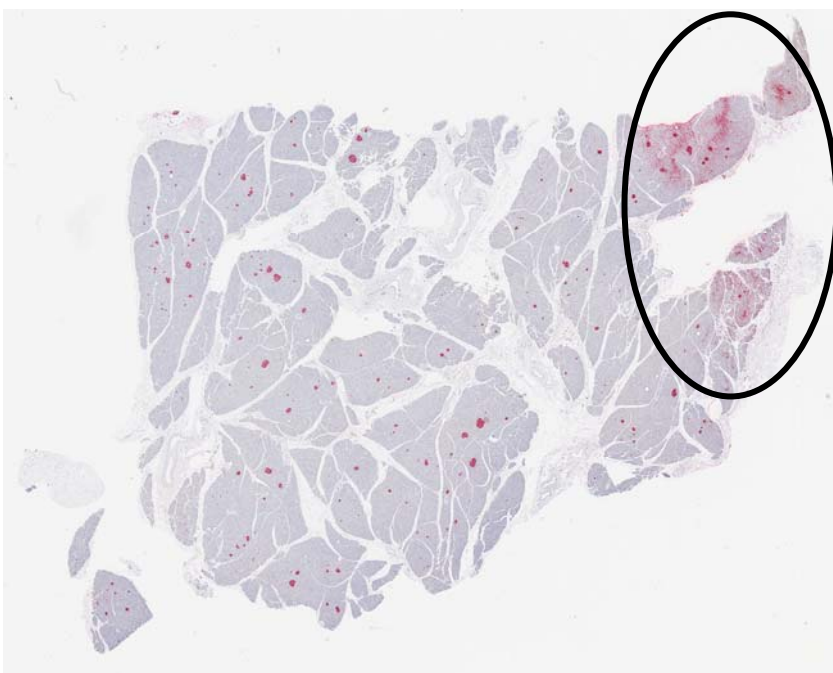


**Figure 10 : Sélection du signal Fast-Red et signal Ki-67.** **A** : agrandissement d'une lame virtuelle avec un immunomarquage à l'insuline (Fast-Red, rouge) et au Ki-67 (DAB, marron). **B** : sélection par plage de couleurs du signal Fast-Red à partir de l'image native A, contaminée par du signal DAB (flèches rouges ; le tissu non sélectionné est grisé). **C** : désaturation du signal DAB, apparaissant désormais en gris (flèches rouges). **D** : sélection par plage de couleurs du signal Fast-Red à partir de l'image C, permettant une sélection spécifique du signal Fast-Red (le tissu non sélectionné est grisé).

- un immunomarquage Fast-Red non spécifique a deux origines : un effet bord (Figure 11) et des problèmes techniques de réalisation de l'immunomarquage entrainant des bavures (Figure 12). Ces parties sont exclues manuellement de la surface analysée lors de la première étape.



**Figure 11 : Effet bord.** Cette coupe de pancréas présente sur le bord un immunomarquage Fast-Red non spécifique (flèches) nécessitant d'être manuellement exclu de la surface à analyser.

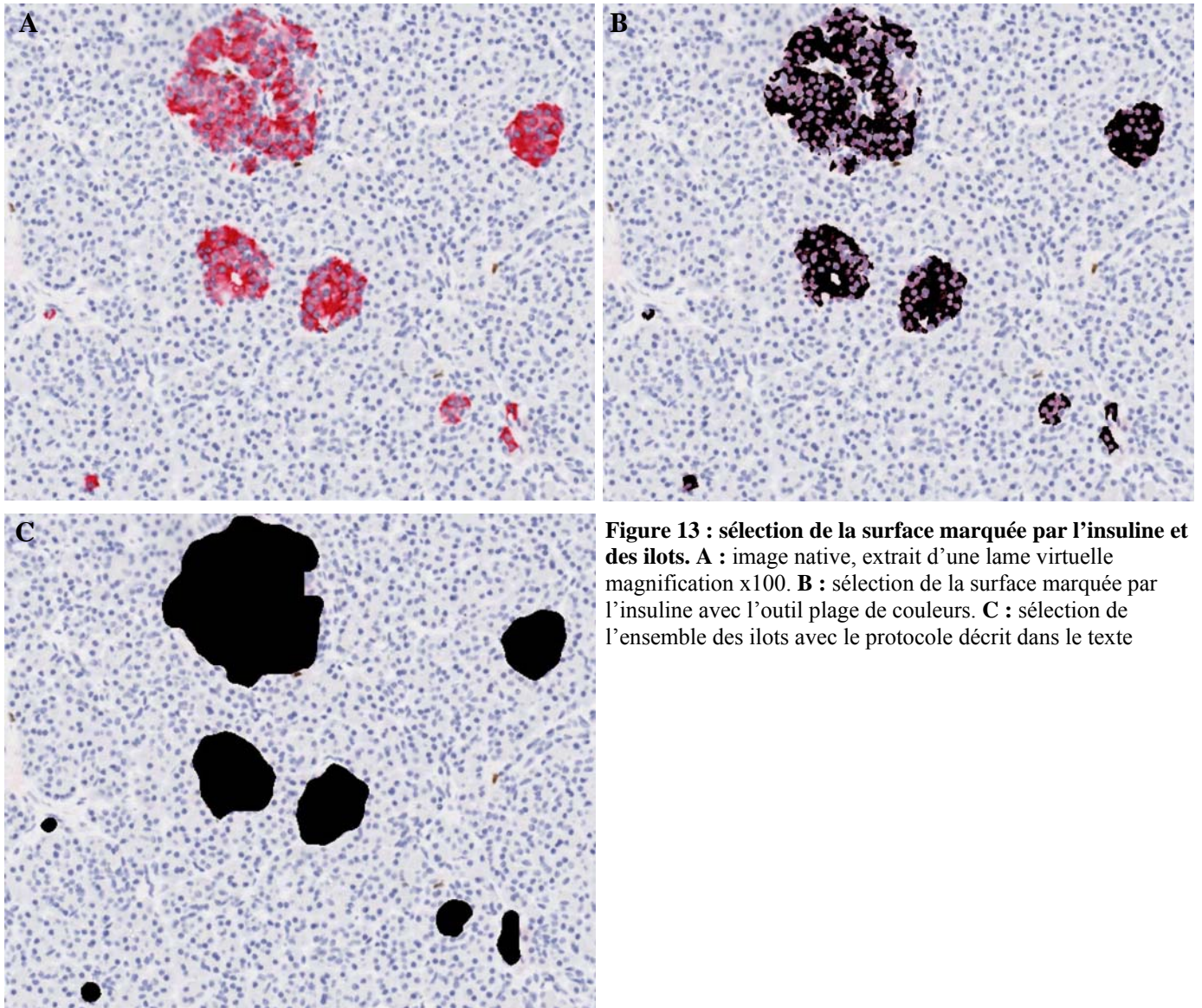


**Figure 12 : Immunomarquage Fast-Red non spécifique.** L'extrémité droite de cette lame présente un important signal Fast-Red non spécifique nécessitant d'être supprimé manuellement.

### III.A.5 Contour des ilots endocrines (Figure 13)

Seul le cytoplasme des cellules bêta est marqué par la réaction immunohistochimique, ne représentant qu'une fraction des cellules bêta. Cette sélection représente entre 30 et 90 % de la surface de la cellule bêta en fonction du plan de coupe (selon qu'il passe principalement par le noyau ou le cytoplasme). Afin de calculer la surface globale de l'îlot, la lame virtuelle était convertie en noir et blanc : noir pour le marquage au Fast-Red, blanc pour le reste. Puis nous avons appliqué un script excluant les pixels isolés et combinant une série de filtres de Photoshop® (filtres *médiane*, *minimum*, *maximum*) afin de dessiner la surface de l'îlot, incluant l'ensemble des cellules endocrines et les petits vaisseaux intra-insulaires. Chacun de ces filtres possède un paramètre défini par l'utilisateur. Après plusieurs essais, ces paramètres ont été enregistrés dans le script et appliqués sur l'ensemble des lames (Figure 13).



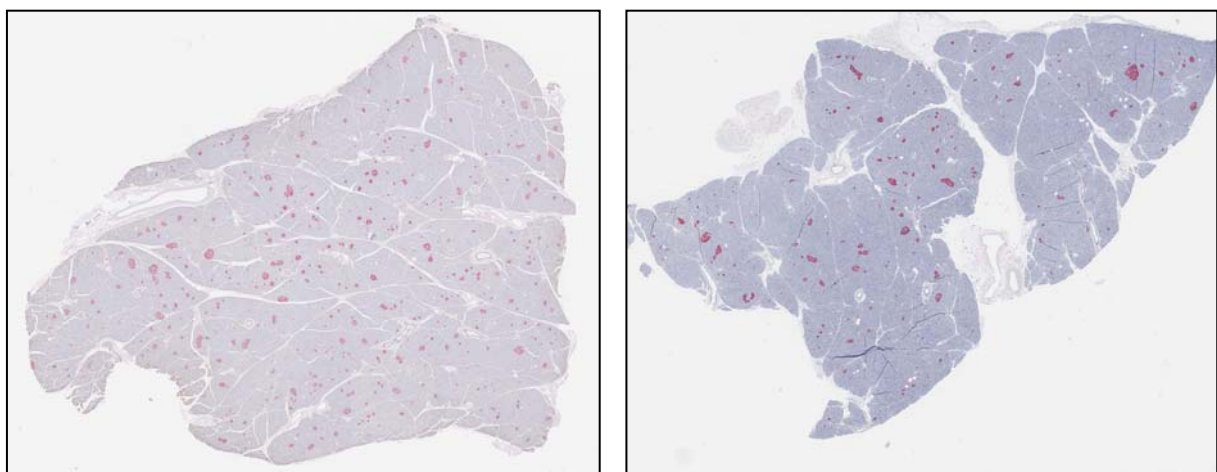


### III.A.6 Traitement semi-automatisé (Figure 15 A-F)

Les deux premières étapes concernant la délimitation de la surface à analyser et du tissu pancréatique ont été réalisées de manière automatique puis contrôlées, et si besoin ajustées image par image (Figure 15 A-C).

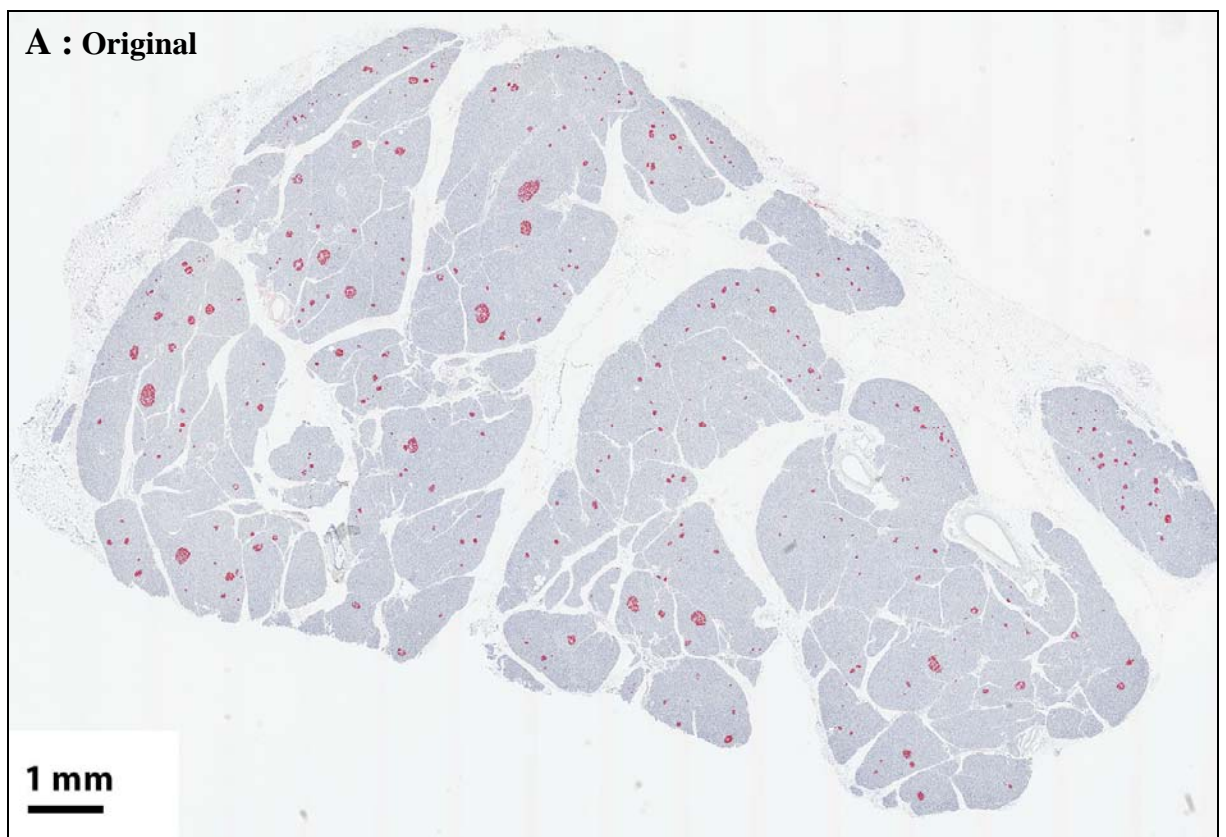
Puis les images ont été réparties en deux catégories en fonction de la balance des couleurs, celle-ci variant de manière importante entre les images : le signal Fast-red apparaissait rose dans certaines, et rouge intense dans d'autres, avec dans ce cas un tissu adipeux légèrement rosé (Figure 14). Les lames virtuelles étant en mode de couleur RVB (voir Première partie II.E), la balance des couleurs est définie par l'intensité du rouge, du vert et du bleu dans chaque image, et peut difficilement être équilibrée sans perte de signal. Nous avons donc réparti les lames en deux catégories en fonction de l'intensité de la couleur rouge (catégorie rouge et catégorie rose claire). Les lames provenant d'un même individu ont toujours été regroupées dans une même catégorie. Les paramètres des scripts convertissant le signal Fast-Red en noir (troisième étape), et définissant la surface des ilots (quatrième étape), ont alors été personnalisés pour chacune de ces deux catégories (Figure 15 D-F). Les moyennes de surface de tissu, de tissu pancréatique, et d'insuline, ne sont pas significativement différentes entre les deux catégories ( $p = 0,35, 0,75$  et  $0,45$  respectivement).

Puis les images obtenues lors de ces étapes étaient automatiquement compilées pour obtenir des images en trois niveaux de gris : noir pour l'insuline, gris foncé pour le parenchyme pancréatique (tissu exocrine), gris clair pour le mésenchyme incluant le tissu conjonctif, la graisse, les vaisseaux et les canaux pancréatiques, et blanc pour le reste de la

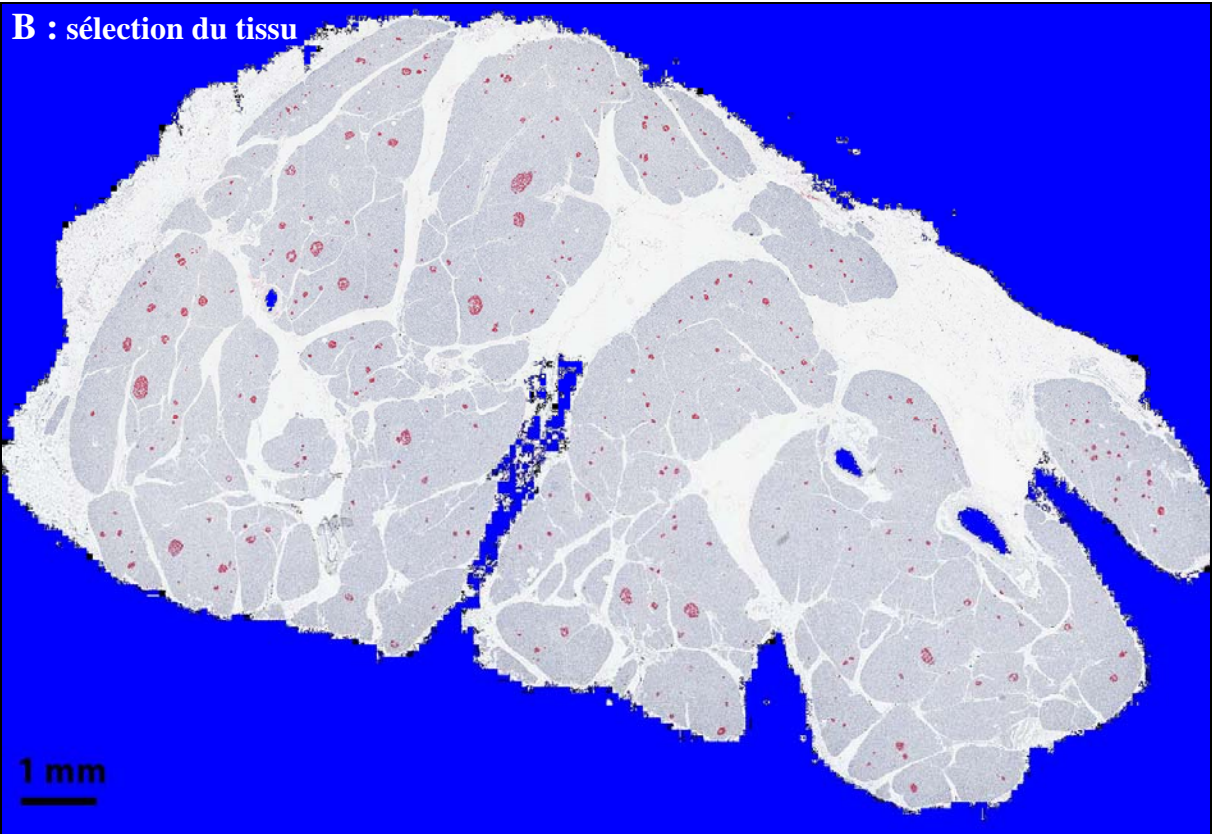


**Figure 14 : Différence de balance de couleurs.** La lame de gauche comporte une composante rouge plus prononcée que la lame de droite ; il est nécessaire de définir deux plages de couleurs différentes pour sélectionner le signal Fast-Red de manière sensible et spécifique sur chacune des images.

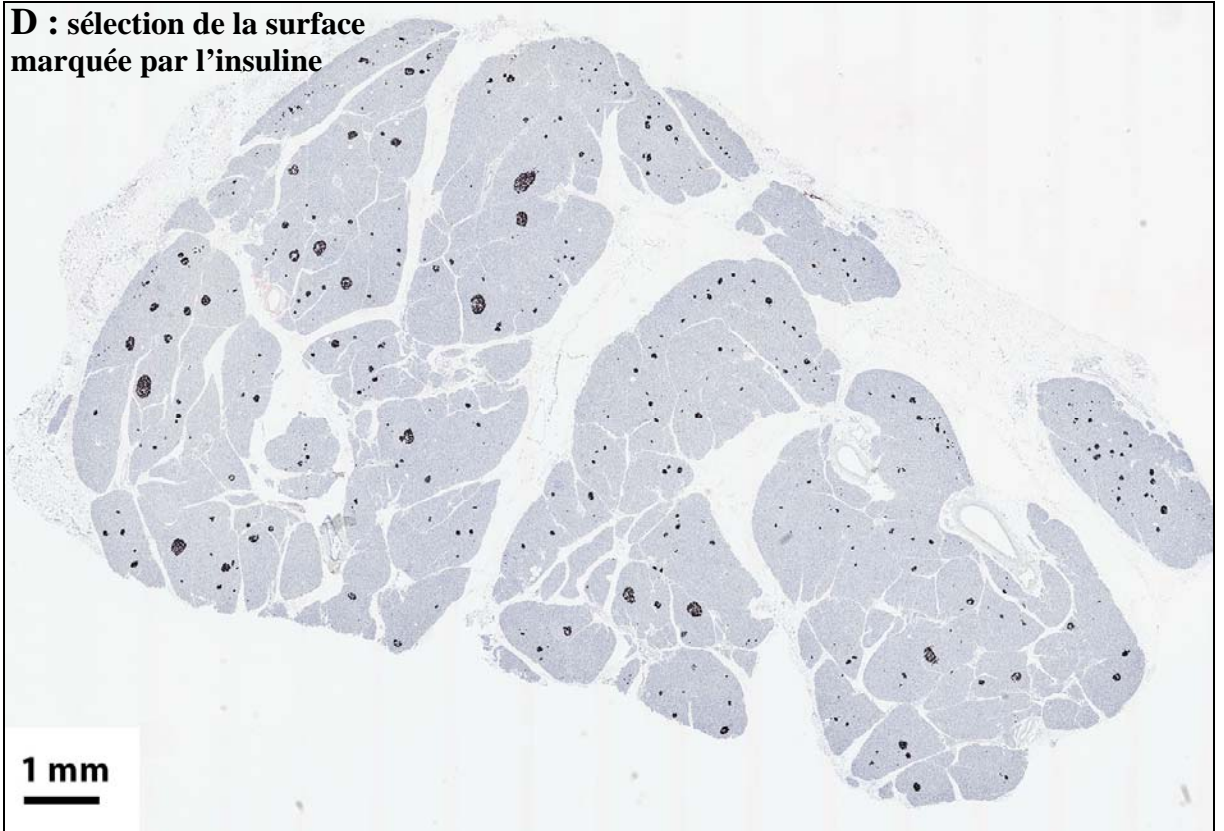
lame. Pour chaque lame virtuelle téléchargée, deux images ont été créées : une première où le noir représente la surface d'insuline révélée par le signal Fast-Red (Figure 15E), et une seconde où le noir représente la surface des ilots endocrines (Figure 15F). Ce sont ces images qui ont été analysées par une macro écrite pour le logiciel ImageJ.



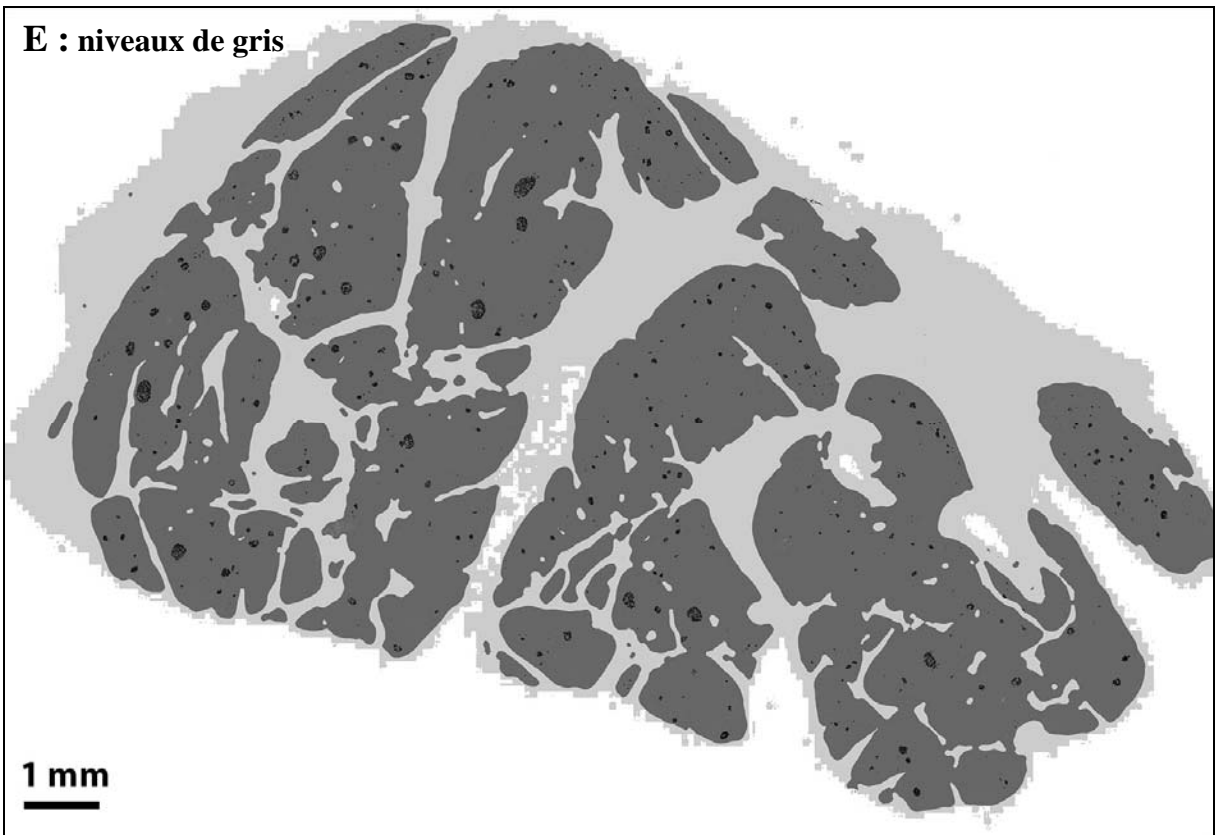




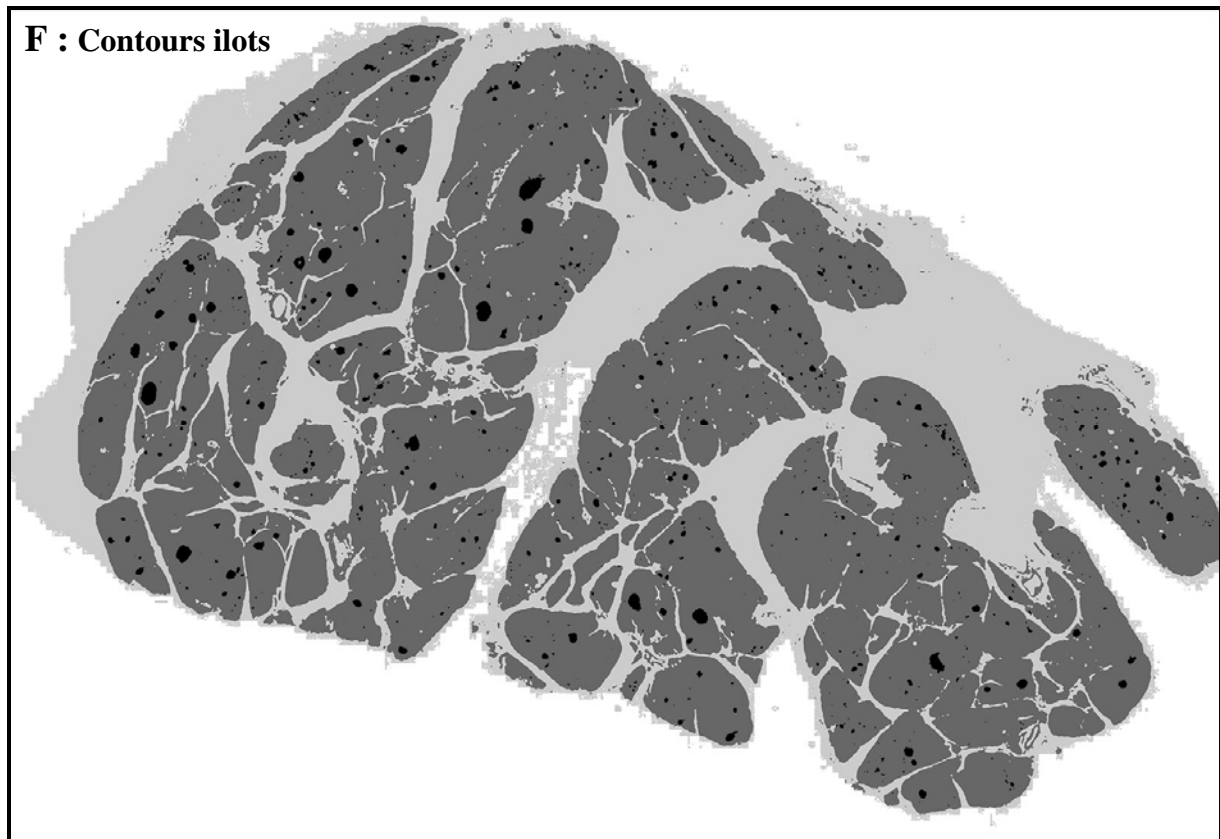
**D : sélection de la surface  
marquée par l'insuline**



**E : niveaux de gris**







**Figure 15 : Conversion d'une lame virtuelle en niveaux de gris.** **A** : lame virtuelle d'une coupe de pancréas d'une femme de 23 ans ; immunomarquage à l'insuline (rouge) et Ki-67 (marron) et coloration à l'hématoxyline. **B** : sélection de la coupe de tissu (en excluant la lumière des vaisseaux et des canaux ; le tissu non sélectionné apparaît en bleu). **C** : sélection du tissu pancréatique (le tissu non sélectionné apparaît en bleu). **D** : sélection de la surface marquée par l'insuline (la sélection apparaît en noir). **E** : image finale en niveaux de gris obtenue par compilation des images B, C et D, avec la surface marquée par l'insuline en noir, le tissu pancréatique exocrine en gris foncé, le reste du tissu en gris clair (tissu mésoenchymateux, tissu conjonctif, tissu adipeux, parois des gros vaisseaux) ; les quantifications de surface seront réalisées à partir de cette image. **F** : image finale similaire à la E mais le noir représente la surface des îlots endocrines.

### III.A.7 Analyse avec ImageJ

Après avoir été convertie en niveaux de gris, chaque lame virtuelle est analysée avec une macro écrite pour le logiciel ImageJ. La surface marquée en noir par l'insuline d'une cellule isolée est en moyenne de 60 pixels (moyenne calculée à partir de 100 mesures sur des cellules isolées provenant de 10 individus entre 0,3 et 75 ans ; pour chaque individu, 5 mesures étaient réalisées sur des lames provenant de la tête du pancréas, et 5 sur des lames provenant de la queue du pancréas). Les zones noires inférieures à 30 pixels ont été considérées comme des contaminations, et ont donc été exclues de l'analyse de la surface

marquée par l'insuline, et ont été incluses dans la surface pancréatique. Ces pixels noirs exclus représentaient en moyenne 1,2 % ( $\pm 1,0$ ) de l'ensemble des pixels noirs.

### III.B Données cliniques

Nous avons téléchargé 509 lames virtuelles de coupes de pancréas d'individus non diabétiques avec un immuno-marquage à l'insuline. Nous en avons exclu 94 de l'analyse : 49 car correspondant à des coupes sériées, 13 car contenant un immuno-marquage insuline au DAB (marron), 12 en raison d'une dégradation importante du tissu, 2 en raison de marquage non spécifique important ; enfin 18 lames provenant de pancréas fœtaux ont été exclues en raison d'organisation et de marquage à l'insuline particuliers (Figure 5). Au final, nous avons analysé 415 lames virtuelles provenant de 69 individus : 232 de la tête du pancréas, 71 du corps, et 112 de la queue. Nous avons des lames provenant à la fois de la tête et de la queue du pancréas pour 48 individus : en moyenne 3 lames de la tête (1 à 7) et 2 lames de la queue (1 à 6) par individu

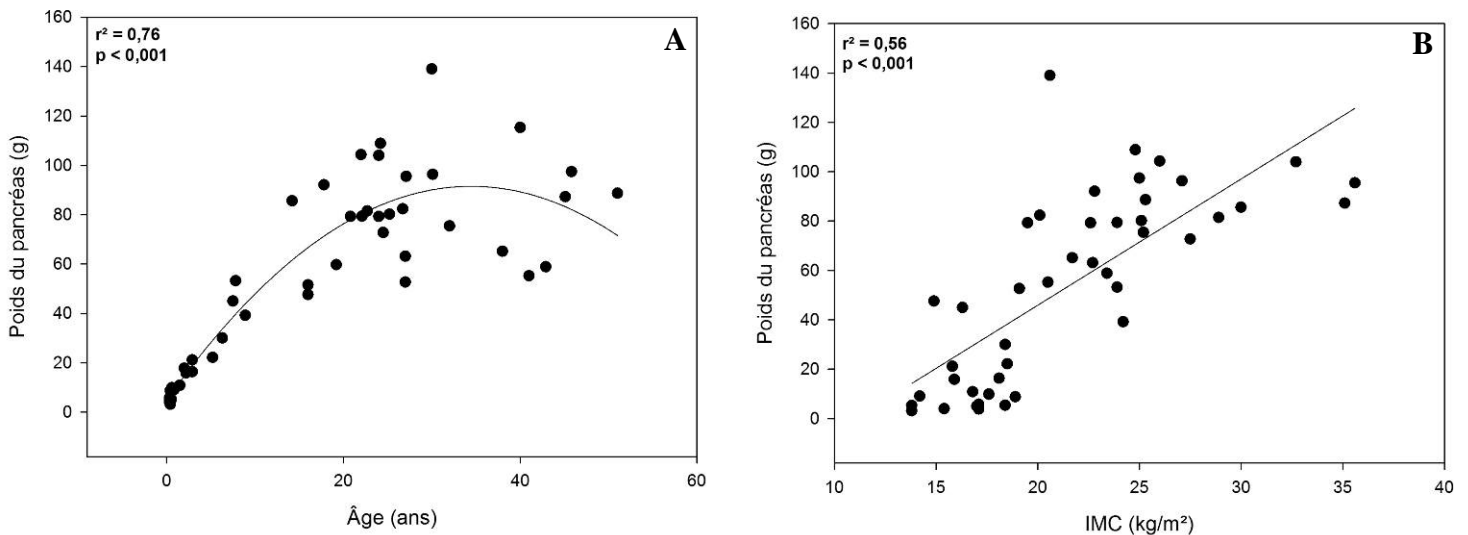
L'âge, l'IMC, le peptide-C, l'HbA1c et le poids du pancréas sont résumés dans le Tableau 1, pour l'ensemble des individus d'une part, et pour les individus avec au moins une coupe de la tête et une coupe de la queue du pancréas d'autre part. Les données de chaque individu sont présentées dans l'annexe 3.

**Tableau 1 : caractéristiques cliniques et biologiques ; moyenne  $\pm$  écart-type (extrêmes)**

	<b>Tous les individus (n = 69)</b>	<b>Individus avec au moins une coupe de la tête et une coupe de la queue (n = 48)</b>
<b>Genre</b>	67% H / 33% F	69% H / 31% F
<b>Age (années)</b>	25 $\pm$ 21 (0,3 – 75)	21 $\pm$ 19 (0,3 - 75)
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23 $\pm$ 5 (14 – 35)	22 $\pm$ 6 (14 - 35)

<b>HbA1c (%)</b>	5,6 ± 0,4 (4,9 – 6,3)	5,6 ± 0,4 (4,9 – 6,3)
<b>Peptide-C (ng/mL)</b>	5,1 ± 5,3 (0,3 – 22,9)	4,0 ± 4,0 (0,3 – 20,6)
<b>Pancréas (g)</b>	55 ± 37 (3,2 – 139)	49 ± 36 (3,2 – 115)

Le poids du pancréas est significativement corrélé à l'âge et à l'IMC de manière indépendante ( $p < 0,01$  après régression linéaire multiple) : le poids du pancréas augmente durant les premières années puis diminue après 40 ans, tandis qu'il augmente de manière continue avec l'IMC (Figure 16).



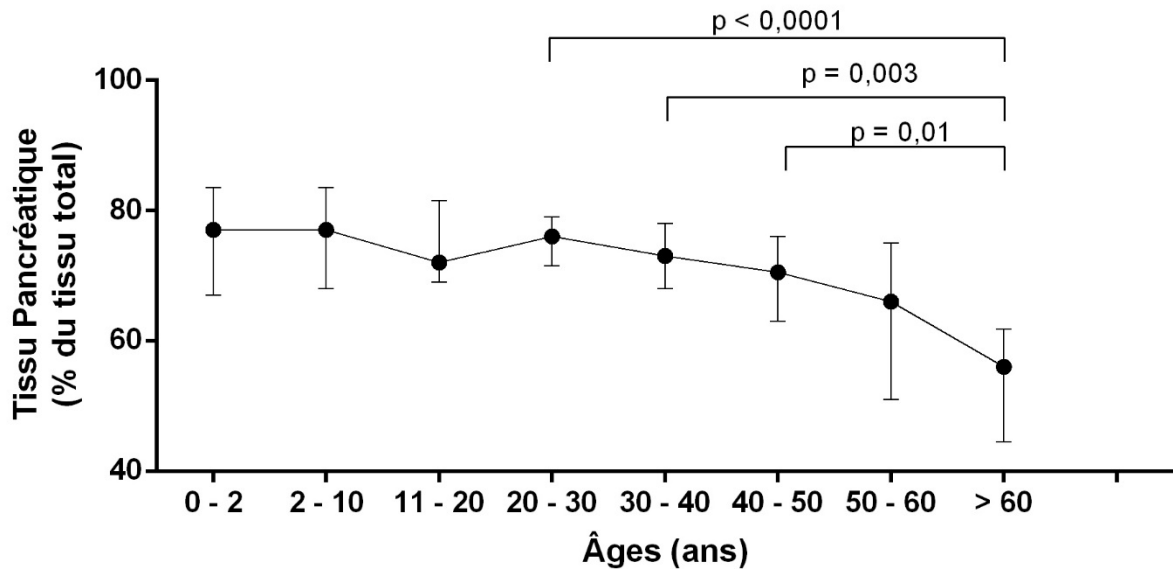
**Figure 16 : Evolution du poids du pancréas en fonction de l'âge (A) et de l'IMC (B).** Le poids du pancréas est associé de manière indépendante à l'âge et à l'IMC : il augmente durant les premières années puis diminue après 40 ans, et il augmente avec l'IMC.

Les analyses statistiques ont été réalisées par régression polynomiale de niveau 2 pour l'âge et de niveau 1 pour l'IMC.

### III.C Tissu pancréatique et coupe de tissu

Le tissu pancréatique (regroupant le tissu exocrine et endocrine) représente en moyenne 71 % de la coupe de tissu ; 29 % de la coupe sont donc constitués de tissu conjonctif, de tissu adipeux, de vaisseaux et de canaux pancréatiques. Ce pourcentage est inversement corrélé à l'IMC ( $r = -0,35$ ,  $p = 0,005$ ) et à l'âge ( $r = -0,40$ ,  $p < 0,001$ ) ; en analyse multivariée, le pourcentage de tissu pancréatique est inversement corrélé uniquement à l'âge ( $p < 0,01$ ), pas

à l'IMC ( $p = 0,65$ ). Le tissu pancréatique représente environ 74% du tissu jusqu'à l'âge de 40 ans, puis diminue progressivement jusqu'à 50% au-delà de 60 ans (Figure 17).



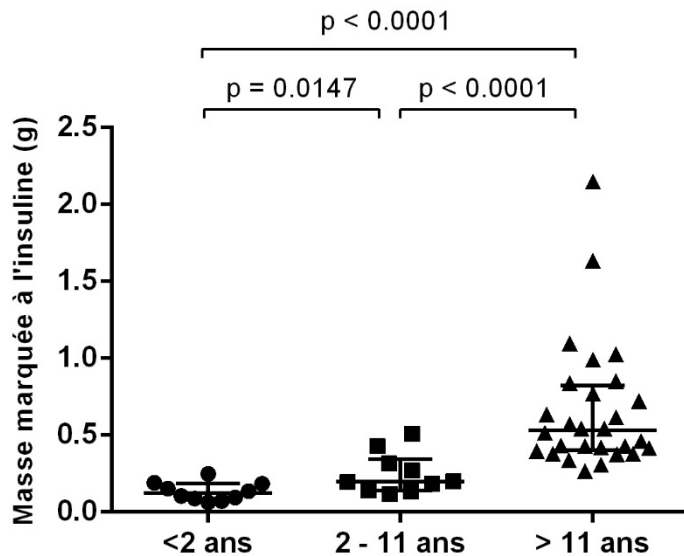
**Figure 17 : Diminution de la fraction de tissu pancréatique avec l'âge.** La fraction pancréatique (tissu endocrine et exocrine rapporté à l'ensemble du tissu) est stable à 74% jusqu'à l'âge de 40 ans, puis diminue progressivement jusqu'à 50% au-delà de 60 ans. Le point représente la médiane et les barres le 25<sup>e</sup> et 75<sup>e</sup> percentile. Test non paramétrique de Mann-Whitney.

### III.D Surface et masse marquées par l'insuline

La surface marquée par l'insuline représente 0,76 % de la coupe de tissu et 1,08 % du tissu pancréatique, soit une différence significative de 44% ( $p < 0,001$ ).

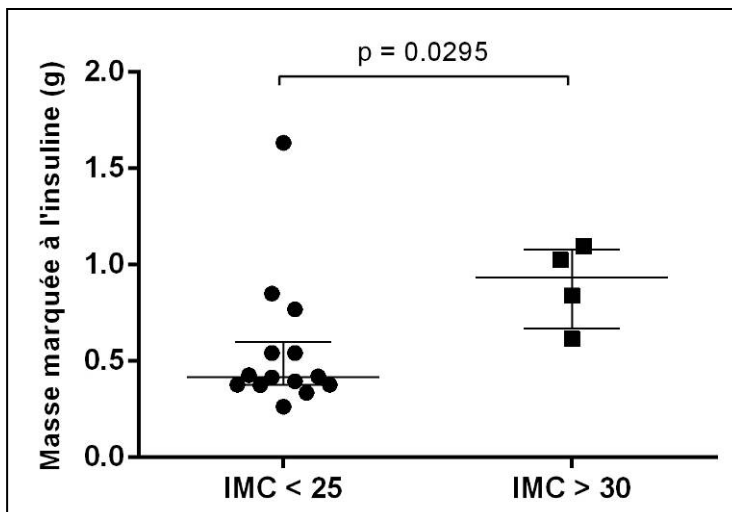
La masse moyenne marquée par l'insuline représente en moyenne 0,46g par pancréas. Cette masse est corrélée positivement à l'âge ( $r = 0,72$ ,  $p < 0,001$ ), à l'IMC ( $r = 0,81$ ,  $p < 0,001$ ), et au peptide-C ( $r = 0,29$ ,  $p = 0,05$ ), mais pas à l'HbA1c ( $p = 0,11$ ). En analyse multivariée, la masse bêta est significativement corrélée uniquement à l'IMC ( $p = 0,02$ ).

La masse marquée à l'insuline augmente de manière significative entre les nourrissons (< 2 ans : 0,13 g ± 0,06), les enfants (2 à 11 ans : 0,25 g ± 0,13) et l'adulte (> 11 ans : 0,66 g ± 0,42) (Figure 18).



**Figure 18 : masse marquée par l'insuline chez les nourrissons (< 2 ans), les enfants de 2 à 11 ans, et les adultes.** Chaque point représente un individu, les traits représentent la médiane, le 25è et le 75è percentile.  
Test non paramétrique de Mann-Whitney.

Parmi les individus de plus de 15 ans, cette masse est en moyenne de 0,55 g ± 0,35 chez les individus normo-pondéraux (n = 14) vs 0,89g ± 0,22 chez les individus obèses (n = 4), soit une augmentation de 62 % (p = 0,03) (Figure 19).



**Figure 19 : augmentation de la masse marquée à l'insuline de 62% chez les individus obèses.** Parmi les individus de plus de 15 ans, la masse moyenne marquée à l'insuline est de 0,55 g chez les normo-pondéraux (IMC < 25 kg/m<sup>2</sup>, n = 14), vs 0,89 g chez les obèses (IMC > 30kg/m<sup>2</sup>, n= 4). Chaque point représente un individu, les traits représentent la médiane, le 25è et le 75è percentile.  
Test non paramétrique de Mann-Whitney.

### III.E Ilots endocrines

Les ilots endocrines représentent 1,51 % de la coupe de tissu et 2,14 % du tissu pancréatique (différence significative de 42 %,  $p < 0,001$ ). La masse insulaire endocrine par pancréas est de 0,78 g pour l'ensemble des individus. Cette masse est corrélée positivement avec l'IMC ( $r = 0,78$ ,  $p < 0,001$ ) et avec l'âge ( $r = 0,74$ ,  $p < 0,001$ ) : 0,19 g  $\pm$  0,12 chez les individus de moins de 2 ans, 0,42 g  $\pm$  0,22 entre 2 et 11 ans, 1,00 g  $\pm$  0,65 chez les individus de plus de 11 ans.

En analyse multivariée, la masse insulaire est associée de manière indépendante à l'âge ( $p = 0,04$ ) et à l'IMC ( $p = 0,04$ ).

### III.F Différences entre la tête et la queue du pancréas

Le tissu pancréatique (endocrine et exocrine) représente 67 % du tissu dans la tête vs 75% dans la queue ( $p < 0,001$ ). Cette différence est inversement corrélée à l'âge ( $r = -0,32$ ,  $p = 0,02$ ) : lorsque l'âge augmente, la proportion de tissu pancréatique tend à être la même dans la tête et dans la queue. En revanche cette différence n'est pas corrélée à l'IMC.

Rapportée à l'ensemble de la coupe du tissu, il y a 15% d'insuline de plus dans la queue que dans la tête du pancréas : 0,83 vs 0,71 % ( $p = 0,004$ ). Mais rapportée au tissu pancréatique, il n'y a pas de différence significative : 1,12 vs 1,08 % ( $p = 0,28$ ) (Tableau 2).

**Tableau 2 : Différences entre la queue et la tête du pancréas.** Rapporté à l'ensemble de la coupe, il y a plus d'insuline dans la queue du pancréas (*insuline / coupe de tissu*). Mais il y a plus de tissu pancréatique dans la queue que dans la tête (*tissu pancréatique / coupe de tissu*). Lorsque l'insuline est rapportée au tissu pancréatique seul, il n'y a pas de différence entre la tête et la queue (*insuline / tissu pancréatique*).  
 Insuline = surface marquée par l'insuline ; tissu pancréatique = tissu endocrine + tissu exocrine ; coupe de tissu = ensemble du tissu fixé (tissu pancréatique, tissu adipeux, tissu conjonctif, vaisseaux, canaux).  
 Test non paramétrique de Wilcoxon pour observations appariées.

	<b>Tête</b>	<b>Queue</b>	<b>Différence (Tête vs Queue)</b>	<b>p</b>
<b>Tissu pancréatique / coupe de tissu (%)</b>	67	75	- 11%	<0,001
<b>Insuline / coupe de tissu (%)</b>	0,71	0,83	- 15%	0,004
<b>Insuline / tissu pancréatique (%)</b>	1,08	1,12	- 4 %	0,28

## Troisième partie : Discussion

### *I. Principaux résultats*

Nous avons étudié la distribution des cellules bêta entre la tête et la queue du pancréas à partir de lames virtuelles téléchargées de la base de données nPOD. Ces lames virtuelles regroupent en une seule image plusieurs centaines de champs acquis à un grossissement x10 (magnification x100). Elles permettent l'analyse de l'ensemble du tissu fixé, alors que la majorité des précédentes études n'en étudient que quelques champs. Nous avons développé un protocole informatique de quantification semi-automatisée permettant une analyse fine de chaque lame virtuelle dans son intégralité, en différenciant les cellules bêta, le tissu exocrine, et le tissu non pancréatique (tissu adipeux, tissu conjonctif, vaisseaux, canaux pancréatiques). Nous avons déterminé que 29% d'une coupe de pancréas sont constitués de tissu non pancréatique (principalement tissu adipeux et tissu conjonctif). Il est donc important de préciser comment est calculée la fraction bêta. Nous retrouvons une surface de cellules bêta plus importante dans la queue que dans la tête lorsqu'elle est rapportée à la surface de la coupe de tissu. En revanche, si cette surface est rapportée au tissu pancréatique uniquement, il n'y a pas de différence significative entre la tête et la queue.

Les données cliniques de la base de données nPOD et notre protocole d'analyse de quantification permettent également de retrouver des données déjà validées dans la littérature. La masse moyenne marquée à l'insuline est de 0,46 g par pancréas chez les 69 individus étudiés (âgés de 4 mois à 75 ans). Chez les adultes, la masse marquée à l'insuline est de 0,66g, et la masse endocrine de 1,00 g. La masse bêta est augmentée de 62 % chez les individus obèses vs les individus normo-pondéraux de plus de 15 ans.



Dans la littérature, les données concernant la distribution des cellules bêta sont hétérogènes. Afin de comprendre cette discordance, nous allons analyser les outils histologiques utilisés pour quantifier la fraction bêta du pancréas, avec l'apport de l'analyse semi-automatisée et des lames virtuelles. Puis les méthodes de calcul de cette fraction bêta vont être détaillées, en soulignant les différences entre les études. Enfin nous allons préciser l'intérêt de la base de données nPOD, et les données de la littérature que nous avons retrouvées validant notre méthode d'analyse.

## ***II. La répartition des cellules bêta dans le pancréas humain***

Les îlots de Langerhans sont répartis de manière hétérogène dans l'ensemble du pancréas. L'hétérogénéité de distribution des cellules bêta est étudiée chez les rongeurs, avec de nombreux résultats similaires rapportant une plus grande densité de cellules  $\beta$  dans le corps et la queue que dans la tête (Aguayo-Mazzucato et al., 2006; Baetens et al., 1979; Elayat et al., 1995; Leclercq-Meyer et al., 1985; Tasaka et al., 1989; Trimble et al., 1982; Trimble and Renold, 1981; Yukawa et al., 1999). En revanche, une étude plus récente rapporte au contraire un volume bêta plus important dans la tête que dans la queue (Hornblad et al., 2011), en étudiant la masse bêta par tomographie par projection optique (Sharpe et al., 2002). De plus, de récentes études histologiques montrent des différences d'architecture importantes de l'îlot entre l'humain et le rongeur, avec des cellules alpha réparties en périphérie chez le rongeur alors qu'elles sont entremêlées aux cellules bêta chez l'humain (Bosco et al., 2010; Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006; Kharouta et al., 2009). Une démonstration chez le rongeur ne doit donc pas devenir un dogme chez l'humain.

Chez l'Homme, la répartition des cellules bêta est étudiée depuis 40 ans, avec des résultats discordants : certaines équipes rapportent une densité plus grande dans la queue du pancréas (Rahier et al., 1983a; Rahier et al., 2008; Saito et al., 1978a; Wang et al., 2013; Wittingen and Frey, 1974), tandis que d'autres ne retrouvent pas de différence régionale (Saisho et al., 2013; Sakuraba et al., 2002; Yoon et al., 2003). Ces résultats contradictoires proviennent, entre autres, de méthodologies différentes dans l'analyse morphométrique, dans la méthode de calcul de la fraction bêta du pancréas, et dans les moyens mis en œuvre pour la mesurer. Les plus anciennes études utilisent des méthodes de coloration non spécifique (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (Wittingen and Frey, 1974) et coloration au trichrome de Masson (Saito et al., 1978a)), et rapportent dans ces conditions un nombre faible d'ilots (en moyenne 115 ilots par cm<sup>2</sup> dans l'étude de Wittingen). Les études plus récentes utilisent un immunomarquage spécifique de l'insuline.

Afin de quantifier ce marquage, la majorité des études utilisent la méthode de Chalkley de comptage manuel différentiel de points (Rahier et al., 1983a; Rahier et al., 2008; Saito et al., 1978a; Sakuraba et al., 2002; Yoon et al., 2003). Cette technique développée en 1943 (Chalkley, 1943) ne permet d'analyser qu'un nombre de points restreint par champ, et contraint souvent les auteurs à n'analyser en moyenne qu'un champs sur quatre au lieu d'analyser l'ensemble de la coupe de tissu. Or les cellules bêta ne représentent en moyenne que 1 % du pancréas et sont distribuées de manière hétérogène dans le tissu pancréatique (Bonner-Weir, 2005) ; il est donc difficile d'obtenir des champs représentatifs de l'ensemble d'une coupe de tissu.

### **III. Lames virtuelles et analyse semi-automatisée**

La quantification semi-automatisée par informatique permet l'analyse d'une plus grande surface de tissu. Saisho et al. utilisent une technique de quantification semi-automatisée par informatique (Butler et al., 2003) mais leur quantification est restreinte à seulement un champ par section de tissu à un grossissement x4 « représentatif » de la section de pancréas. Les lames virtuelles permettent désormais l'acquisition de l'ensemble d'une coupe de tissu à fort grossissement (Rojo et al., 2009; Weinstein et al., 2009). Nous avons développé pour notre étude un protocole permettant l'analyse de l'ensemble des lames virtuelles. Mais si ces lames virtuelles permettent une analyse de larges surfaces de tissu, elles modifient la manière de quantifier. Contrairement à la méthode de Chalkley, on ne quantifie plus le nombre de cellules bêta mais uniquement la partie du cytoplasme contenant de l'insuline. Dans notre étude, ce cytoplasme immunomarcqué représente entre 30 % (plan de coupe passant principalement par le noyau) et 90 % de la surface cellulaire (plan de coupe passant principalement par le cytoplasme). Les « masses bêta » issues de ces quantifications semi-informatisées (plus précisément « masses de cytoplasme contenant de l'insuline immuno-marquée ») sont donc plus faibles que les masses bêta issues d'une quantification manuelle avec la technique de Chalkley. Nous trouvons chez les adultes une masse bêta de 0,66 g, plus faible que les masses bêta calculées par Rahier et al. à 0,89g (Rahier et al., 2008) ou par Yoon et al à 1,3g (Yoon et al., 2003). Cependant, nous avons développé une méthode permettant de mesurer la surface de l'ensemble de l'îlot à partir du marquage insuline. Avec cette méthode, nous calculons une masse insulaire moyenne de 1,00 g chez les adultes, comparable à la valeur habituellement retrouvée (Bonner-Weir, 2005).

#### **IV. Coupe de tissu et tissu pancréatique**

Si le numérateur de la fraction de surface bêta peut être calculé de plusieurs manières, il en est de même pour le dénominateur : la surface bêta peut être rapportée à la surface totale de la coupe de tissu, ou uniquement à la surface de tissu pancréatique regroupant le tissu exocrine et le tissu endocrine, en excluant le tissu adipeux et le tissu conjonctif. Lors du recueil de pancréas l'excès de tissu adipeux est retiré avant la pesée et la fixation de l'organe. Même dans ces conditions, il reste du tissu adipeux dans la plupart des coupes de pancréas. Grâce aux lames digitalisées (représentant l'ensemble de la coupe de tissu), nous avons pu quantifier cet ensemble de tissu adipeux, associé au tissu conjonctif, aux canaux pancréatiques et aux vaisseaux à 29 % de la surface de tissu fixé.

Cette différence est à prendre en compte lorsque les deux groupes comparés sont susceptibles d'avoir une fraction de tissu pancréatique différente. Nous retrouvons dans notre étude une fraction de tissu pancréatique plus importante dans la queue du pancréas, expliquant que les calculs de la fraction bêta en fonction des deux surfaces conduisent à des conclusions différentes : rapportée à l'ensemble de la coupe de tissu, il y a plus de cellules bêta dans la queue du pancréas, mais rapportée au tissu pancréatique seul, il n'y a pas de différence significative entre la queue et la tête. Or la méthode de mesure utilisée pour l'étude de la répartition des cellules bêta à travers le pancréas varie dans la littérature : certaines équipes calculent la fraction de cellules bêta par rapport à l'ensemble de la coupe de tissu (Rahier et al., 2008; Saito et al., 1978a; Wittingen and Frey, 1974), d'autres uniquement par rapport au tissu pancréatique en excluant le tissu adipeux et le tissu conjonctif (Rahier et al., 1983a; Sakuraba et al., 2002), d'autres équipes encore ne le précisent pas (Saisho et al., 2013; Yoon et al., 2003).

Cette différence entre tissu pancréatique et coupe de tissu doit aussi être pris en compte pour le calcul de la masse bêta. La masse bêta est le produit de la fraction bêta et de la masse

pancréatique. Or la masse pancréatique inclut tous les tissus fixés. En conséquence, pour le calcul de la masse bêta, la fraction bêta devrait toujours être rapportée à l'ensemble de la coupe de tissu, au risque de surestimer la masse bêta. Considérant que nous trouvons une surface de tissu non pancréatique en moyenne égale à 29% de la surface de la coupe de tissu, et considérant que 1 cm<sup>3</sup> de tissu adipeux, de tissu conjonctif et de tissu pancréatique ont la même masse, l'utilisation d'une fraction bêta rapportée au tissu pancréatique surestime en moyenne de 40% la masse bêta.

Par ailleurs, nous retrouvons que la fraction de tissu non pancréatique augmente avec l'âge, probablement par augmentation du tissu adipeux. Si la fraction bêta est calculée à partir du tissu pancréatique uniquement, puis multipliée par la masse du pancréas, la masse bêta sera surestimée de manière plus importante dans le groupe regroupant des individus plus âgés. C'est par exemple le cas dans l'étude de Butler et al. qui comparent la masse bêta d'individus diabétiques traités par une incrétine par rapport à des individus diabétiques traités par d'autres molécules (Butler et al., 2013), avec une différence de moyenne d'âge de 18 ans entre les deux groupes (Harja et al., 2013), pouvant expliquer en partie l'augmentation de la masse bêta dans le groupe incrétine, plus âgé.

## ***V. Champs d'application de la mesure de la masse bêta***

Ces précisions méthodologiques sont importantes, car le calcul de la masse bêta est étudié dans le diabète de type 2, afin de mieux appréhender la physiopathologie et les effets de molécules anti-diabétiques sur cette masse bêta. Or les données de la littérature sont là aussi discordantes. D'anciennes études utilisant des procédures histochimiques non spécifiques retrouvent une masse insulaire diminuée chez des individus diabétiques de type 2

comparés à des individus contrôles (Gepts and Lecompte, 1981; Maclean and Ogilvie, 1955; Saito et al., 1978b; Saito et al., 1979; Vishwanathan et al., 1972; Westermark and Wilander, 1978). Les études plus récentes utilisant des techniques immunocytochimiques aboutissent à des conclusions variables, de l'absence de différence significative (Clark et al., 2001; Guiot et al., 2001; Rahier et al., 1983a; Stefan et al., 1982) à une baisse modérée (25-40%) (Clark et al., 1988; Sakuraba et al., 2002; Yoon et al., 2003) ou plus importante (40-60%) (Butler et al., 2003; Kilimnik et al., 2011; Kloppel et al., 1985) de la masse cellulaire bêta chez des individus diabétiques de type 2 par rapport aux sujets contrôles. Ces résultats contradictoires peuvent être dus en partie à l'hétérogénéité de cette maladie et à des différences dans les sujets examinés, mais également aux méthodes utilisées pour l'analyse morphométrique qui varient en fonction des équipes comme pour l'étude de la répartition des cellules bêta. Par ailleurs, la masse bêta est également étudiée dans l'obésité (Kloppel et al., 1985; Rahier et al., 2008; Saisho et al., 2013; Yoon et al., 2003), en fonction de l'âge (Rahier et al., 1981; Saisho et al., 2013), et durant la grossesse (Butler et al., 2010; Van Assche et al., 1978).

## **VI. Le projet nPOD**

Outre les différences de méthodologie, les écarts retrouvés dans la littérature peuvent également s'expliquer par le manque de matériel adéquat entraînant des séries trop petites. Il est difficile d'obtenir du tissu pancréatique chez l'homme, car celui-ci n'est prélevé que lors d'autopsie, lorsque le pancréas peut avoir subi une autolyse. De plus la pratique d'autopsie se raréfie, et des informations cliniques fiables sur les cas d'autopsie ne sont pas toujours disponibles. Afin de dépasser cette limite, nous avons travaillé sur des coupes histologiques mises à la disposition de la communauté scientifique par le réseau nPOD. Ce réseau constitue

une base de données unique de coupes histologiques de pancréas, avec un recueil d'organes multicentrique, un processus de recueil et d'immunomarquage standardisé, et une centralisation des données cliniques et histologiques. Ce projet a été initialement créé pour stimuler la recherche sur le diabète de type 1 à travers une collaboration scientifique internationale, avec au mois d'août 2013 38 publications dans des revues internationales (<http://www.jdrfnpod.org/publications.php>) et 91 projets de recherche en cours (<http://www.jdrfnpod.org/current-projects.php>). Ces coupes ont également été utilisées dans l'étude du diabète de type 2 (Butler et al., 2013), bien que des défauts d'échantillonnage biaisent en partie cette étude (Harja et al., 2013). En revanche, nous sommes la première équipe à avoir utilisé les coupes de pancréas d'individus non diabétiques pour étudier le pancréas normal.

Le principal atout de cette base de données est le nombre de pancréas référencés : 255 pancréas au mois d'août 2013, soit 11.756 coupes histologiques. Les données cliniques et le poids du pancréas sont désormais recueillis de manière systématique pour tous les nouveaux cas. Grâce à ces données, nous retrouvons en accord avec l'étude de Saisho et al. une corrélation entre le poids du pancréas, l'âge et l'IMC (Saisho et al., 2007). Le poids du pancréas augmente dans l'enfance pour atteindre un plateau vers 20 ans. Entre 20 et 50 ans le poids du pancréas est corrélé à l'IMC. Après 50 ans, le poids du pancréas diminue avec l'âge. Nous retrouvons également une augmentation de la masse bêta en fonction de l'IMC avec une augmentation de 62% chez les individus obèses ( $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ ) par rapport aux individus normopondéraux ( $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ). Ces résultats confirment les résultats de Saisho et al. (Saisho et al., 2013) qui calculent la masse bêta à partir d'une masse pancréatique théorique fonction de l'âge et de l'IMC et non à partir de la masse réelle.

Cette base de données nPOD a toutefois des limites. Quelques coupes histologiques présentent des dégradations importantes rendant impossible une analyse morphométrique

correcte (seulement 3 % de notre sélection initiale). Par ailleurs, le contre-marquage à l'hématoxyline est parfois très renforcé, avec un tissu adipeux devenant rosé sur certaines lames, et l'intensité du signal Fast-Red varie d'un pancréas à un autre. Ces limites ne permettent pas une quantification totalement automatisée de la masse bêta, chaque lame devant être manuellement préparée et vérifiée afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de détection des surfaces d'intérêt. Plusieurs études décrivent de manière précise une méthodologie pour l'analyse morphométrique de lames virtuelles de pancréas, mais avec un immunomarquage par fluorescence (Kilimnik et al., 2011; Kim et al., 2011). Un marquage par immunofluorescence est plus simple à quantifier qu'un immunomarquage par techniques enzymatiques, car il ne contient qu'une seule couleur sur fond noir ; dans ces conditions, le seul paramètre à déterminer est le seuil d'intensité de marquage définissant les pixels positifs. En revanche, ce type d'immunomarquage n'apporte aucune information structurelle ni anatomique. Les lames virtuelles du réseau nPOD étant utilisées pour de nombreuses études, elles sont toutes immunomarcuées par techniques enzymatiques, permettant une analyse structurelle, une quantification plus fine du tissu pancréatique par rapport à la coupe de tissu, une quantification des dépôts amyloïdes, etc. A l'aide de scripts sur le logiciel Adobe Photoshop® et de macros sur le logiciel ImageJ®, nous avons défini un protocole permettant une quantification semi-automatisée rapide de ces lames virtuelles.

## ***VII. Perspectives***

La base de données nPOD est utilisable pour des études de morphométrie, comme le prouvent nos résultats concernant des données déjà validées dans la littérature : évolution du poids du pancréas avec l'âge, évolution de la masse bêta avec l'âge, évolution de la masse



bêta avec l'obésité. Grâce au protocole informatique semi-automatisé que nous avons développé, nous pouvons désormais réaliser rapidement des quantifications de qualité à partir de lames virtuelles en haute résolution. Ce protocole peut être adapté selon la surface d'intérêt étudiée. Or la base de données nPOD contient plusieurs types d'immunomarquages et des données cliniques précises, et elle rassemble à la fois des pancréas d'individus sains et diabétiques (type 1 et type 2). Cette base de données pourra donc être utilisée pour répondre à d'autres questions : évolution de la répartition des cellules bêta chez les individus diabétiques de type 2, répartition des cellules alpha chez des individus sains et chez des individus diabétiques de type 1 et de type 2. La fraction non pancréatique (tissu adipeux) et le tissu exocrine pourront également être étudiés chez des individus diabétiques.

## Conclusion

Le calcul de la fraction de cellules bêta pancréatiques doit être rigoureuse, et la méthode de calcul doit être précisée. Lorsque cette fraction est calculée en fonction de la surface totale de tissu, il y a plus de cellules bêta dans la queue du pancréas. En revanche, si la fraction est calculée en fonction du tissu pancréatique, en excluant le tissu adipeux et le tissu conjonctif, il y a autant de cellules bêta dans la tête et dans la queue. La fraction de tissu non pancréatique (tissu adipeux, tissu conjonctif) est à prendre en compte lors de l'analyse de la masse bêta, par exemple lorsqu'elle est calculée chez des individus présentant un diabète de type 2 ou une obésité.

Nous avons développé un protocole de quantification semi-automatisée adapté aux lames virtuelles de pancréas de la base de données nPOD. Cette base de données contient de nombreuses lames virtuelles, avec plusieurs immunomarquages, qui pourront être utilisées pour d'autres analyses morphométriques avec notre protocole.

## Annexes

### ***1. Annexe 1. Procédure de préparation standardisée des pancréas (tiré de <http://jdrfnpod.org/sops/histo.pdf>)***

1. Optional: Spread one stripe of blue ink on the anterior surface of the pancreas.
2. Tare scale with a container to hold the pancreas.
3. Weigh the pancreas and record.
4. Divide the pancreas into 3 regions. Head: Portion adjacent to the duodenum and includes the region proximal to the notch. Body and Tail: Equal division of remaining portion after head removed.
5. Weigh each region and record.
6. Remove a section from the Head-Body junction and a section from the Body-Tail junction to be minced for cryovials.
7. Mince tissues for cryovials with or without RNAlater to  $\approx 1.0$  gram pieces and evenly divide pieces among cryovials to ensure uniform distribution.
  - 7.1 Each vial without RNAlater will contain  $\approx 2-5$  grams of tissue. Immediately snap freeze the vials in liquid nitrogen and then transfer to  $-80^{\circ}\text{C}$  for storage.
  - 7.2 Each vial with RNAlater will contain about 1 gram of tissue. Mix contents with RNAlater and then equilibrate at room temperature for 30 minutes. Remix and snap freeze the vials and transfer to  $-80^{\circ}\text{C}$  for storage.
8. Section each pancreas region in a transverse “bread loaf” manner with alternating sections for paraffin and frozen OCT blocks.
9. In all cases, maintain medial to lateral/anterior to posterior orientations in cassettes as feasible depending on sample size.

10. Number blocks sequentially beginning with most medial section.

11. Sections for paraffin cassettes should be  $\approx 1.5 \times 1.5 \times 0.5$  cm. Place in labeled cassettes with the label oriented to the left. The orientation of the tissues in the cassettes should be as if viewed from the donor's midline through the long axis of the pancreas.

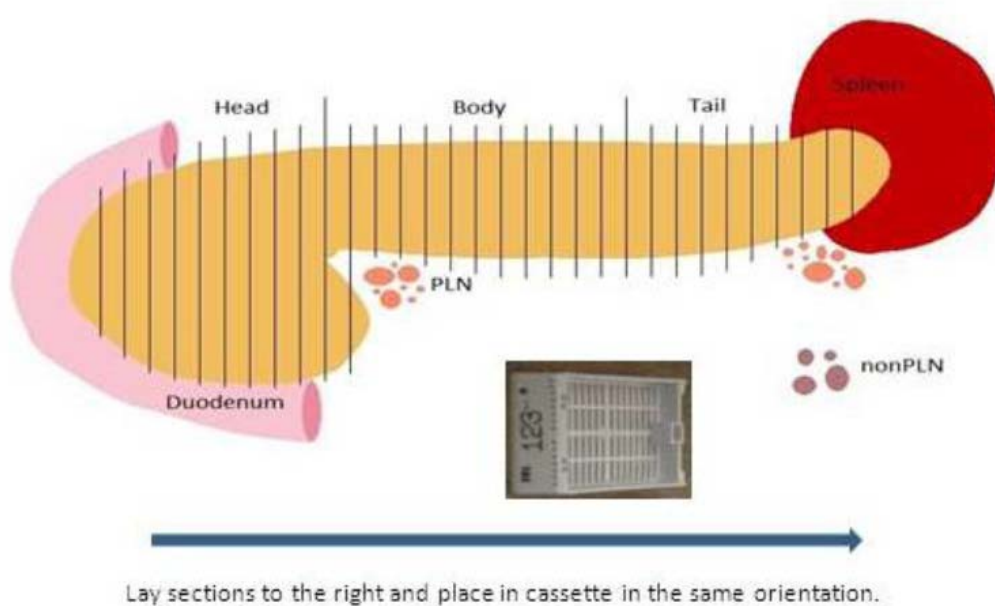
11.1 If the sections are too large to fit into one mold, cut each section in half and label cassettes A&B.

11.2 If the sections are still too large after being cut in half, cut each section perpendicular to the previous cut and label the cassettes A-D in a clockwise manner. If necessary, the sections can be trimmed further to fit in the cassettes.

11.3 Place cassettes in NBF and record the fixation start time when the last cassette is placed in fixative.

12. Fix samples using an automatic processor (16 hours) or stop the process manually ( $24 \pm 8$  hours). Fixation is ended by transfer to 70% ethanol. Record end time when preformed manually Trim tissues intended for OCT blocks to  $\approx 0.5 \times 0.5$  cm and place in cryomolds with a small amount of OCT media. Freeze as above.

12.1 If the sections are too large, sub-divide each section as for paraffin.

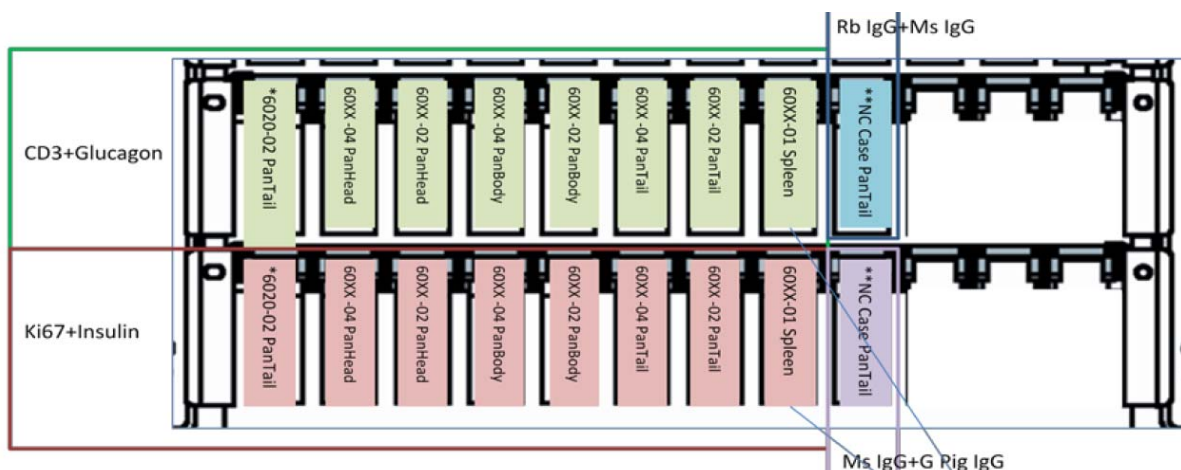


**II. Annexe 2. Procédure d'immuno-marquage (tiré de <http://jdrfnpod.org/sops/immunopathology.pdf>)**

1. Prepare all solutions according to manufacturer's recommendations. Optimize antibody detection by antigen retrieval screening, titration, and validation according to clinical practice standards.
2. Obtain serial unstained paraffin slides from the histology lab.
3. Clear and rehydrate paraffin sections according to the schedule below:

Reagent	Time (minutes)
Xylene	5
Xylene	5
100% EtOH	2
100% EtOH	2
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in MeOH	10
95% EtOH	1
95% EtOH	3
70% EtOH	1
Water	1

4. Perform antigen retrieval using citrate buffer in a steamer at 95°C for 30 minutes.
5. Wash slides in buffer for ≤ 5 minutes.
6. Load slides on Dako Autostainer.



- Any Control case, any pancreas region. Rotate case ID, region, and blocks every ~5 runs
- \*\* Case, PanTail or any region, negative controls for primaries.

Spleen

7. Dako Autostainer settings:

7.1 Block with Sniper for 15 minutes. Rinse once.

7.2 Incubate first primary antibody and negative control reagents (mouse or rabbit IgG) for 30 minutes. Rinse twice.

7.2.1 Apply primary antibody to tissues at optimal concentrations as previously determined. Dilute primary antibody in antibody diluent.

7.3 Incubate secondary antibody (Mach 2 HRP Polymer) for 30 minutes. Rinse twice.

7.4 Develop first chromogen (DAB) for 4 minutes. Rinse twice.

7.5 Block endogenous alkaline phosphatase (AP) with DEEB for 10 minutes. Rinse twice.

7.6 Block with 10% normal goat serum (for insulin primary) or Sniper (for glucagon) for 10 minutes. Rinse twice.

7.7 Incubate with second primary antibody or control reagent (guinea pig serum, mouse IgG) for 15 minutes. Rinse twice.

7.8 Incubate with secondary reagent-biotinylated goat anti-guinea pig (insulin) or goat anti-mouse AP conjugate for 30 minutes. Rinse twice.

7.9 Incubate with tertiary reagent-avidin-biotin-AP conjugate (insulin) or antibody diluents for 30 minutes. Rinse twice.

7.10 Develop with alkaline phosphatase (AP) staining system (Liquid Fast Red) for 4 minutes. Rinse twice with water.

7.11 Counterstain with Hematoxylin for 1 minute. Rinse twice with water.

8. Remove slides from rack and allow to air dry for  $\leq 2$  hours.

9. Coverslip using aqueous mounting media and label the slide.

10. Scan stained slides using an Aperio CS scanner and organize by donor and sample type using the Spectrum Plus information management system (Aperio, Vista, CA) (SOP Online Pathology).

11. Expected results and quality control measures:

11.1 Normal donors are expected to have intense (4+) islet cell staining for both insulin and glucagon cells without smearing or background on non-islet cells.

11.2 Spleen samples from all donors are expected to show 10-40% Ki67- or CD3- positive cells.

11.2.1 Ki-67 will be expressed in nuclei only.

11.2.2 CD3 will be expressed on cell membranes.

11.3 Positive and negative controls will be included in every run.

11.3.1 Positive controls (PC) consist of two samples:

11.3.1.1 One PC is a slide from a control donor.

11.3.1.2 Spleen is used as a positive tissue control for Ki67 and CD3.

11.3.2 Negative controls (NC) consist of two samples:

11.3.2.1 One NC is a slide from pancreas of the test case that is incubated with antibodies from the host species used to generate the primary antibodies in the double stain.

11.3.2.2 Spleen is used as a negative tissue control for endocrine cell markers.

Primary Antibodies Used in nPOD Immunohistochemistry Protocols

<b>Antigen</b>	<b>Host</b>	<b>Antibody Clone</b>	<b>Vendor</b>
Insulin	Guinea Pig	A0564	Dako
Ki67	Mouse	M1B-1	Dako
CD3	Rabbit	A0452	Dako
Glucagon	Mouse	ab10988	Abcam
Somatostatin	Rabbit	A0566	Dako
Pancreatic Polypeptide	Rabbit	A0619	Dako
Synaptophysin	Mouse	SY38	Dako
CK19	Mouse	M0772	Dako
CD4	Mouse	4B12	Dako
CD8	Mouse	C8/114B	Dako
CD20	Mouse	L26	Dako
CD45	Mouse	2B11+PD7/26	Dako
CD68	Mouse	PG-M1	Dako



### III. Annexe 3. Caractéristiques cliniques et biologiques de chaque individu

Patient	Nb de coupes	Age	Gender	Ethnicity	C-peptide (ng/ml)	HbA1c	IMC
6001	7	22	M	Caucasian	1,58		21,9
6003	8	23	F	Caucasian			29,3
6004	6	33	M				
6005	9	5	F	Caucasian			15,7
6007	13	9	M	African American			20
6008	2	50	F	Caucasian			24,2
6009	4	45	M	Caucasian	11,32		30,6
6010	4	47	F	Caucasian			19,7
6011	6	46	F	African American			26,3
6012	4	68	F	Caucasian	2,97		23,7
6013	3	65	M	Caucasian	2,8		24,2
6014	6	2	M	Caucasian			20,7
6015	8	39	F	Caucasian	1,99		32,2
6016	4	64	F	Caucasian			31,2
6017	5	59	F	Caucasian	9,89		24,8
6019	4	42	M	Caucasian	0,47	5,6	31
6020	12	60	M	Caucasian	2,82		29,8
6021	4	72	F	Hispanic	22,92		24,5
6022	6	75	M	Caucasian	4,99		30,6
6024	10	21	M	Caucasian	3,52		27,8
6029	8	24	F	Hispanic			22,6
6030	6	30,1	M	Caucasian	2,54		27,1
6034	6	32	F	Caucasian	3,15		25,2
6047	16	7,8	M	Caucasian	0,65	5,5	23,9
6048	9	30	M	Caucasian	17,91		20,6
6053	3	25	M	Caucasian	1,77		21,2
6055	4	27	M	Caucasian	0,59		22,7
6057	4	22	M	Caucasian	16,23		26
6058	4	27	M	Hispanic	9,09		19,1
6060	5	24	M	Caucasian	13,63		32,7
6075	6	16	M	African American	2,94		14,9
6091	7	27,1	M	Caucasian	7,71	6,3	35,6
6092	3	0,5	F	African American	0,35		13,8
6094	7	2,9	M	African American	3,55		15,8
6095	6	40	M	Hispanic		5,9	
6096	7	16	F	African American	2,97		
6098	8	17,8	M	Caucasian	1,41	4,9	22,8
6099	6	14,2	M	Caucasian	5,37		30

Patient	Nb de coupes	Age	Gender	Ethnicity	C-peptide (ng/ml)	HbA1c	IMC
6102	7	45,1	F	Caucasian	0,55	6,1	35,1
6103	6	1,5	M	Caucasian	0,98	6,1	16,8
6104	6	41	M	Caucasian	20,55		20,5
6106	6	2,9	M	Caucasian	7,36		18,1
6107	6	2,2	M	African American	5,9	5,2	15,9
6112	6	6,3	F	Hispanic	5,11	5,6	18,4
6115	5	0,42	M	Caucasian	4,59		17,1
6117	6	0,33	M	Caucasian	3,27		18,4
6122	3	0,42	F	Caucasian	0,34		13,8
6125	1	0,42	M	Caucasian	9,22		18,9
6126	7	25,2	M	Caucasian	0,88		25,1
6129	7	42,9	F	Caucasian	0,51	5,2	23,4
6130	7	5,2	M	Caucasian	4,8		18,5
6131	11	24,2	M	Caucasian	1,01		24,8
6134	7	26,7	M	Caucasian	3,59		20,1
6137	6	8,9	F	Hispanic	12,13	6,2	24,2
6140	7	38	M	Caucasian	11,1	6	21,7
6144	6	7,5	F	Hispanic	1,27		16,3
6160	6	22,1	M	Caucasian	0,4	5,2	23,9
6162	6	22,7	M	African American	7,61		28,9
6165	6	45,8	F	Caucasian	4,45	5,6	25
6168	6	51	M	Hispanic		6,2	25,3
6172	6	19,2	F	Caucasian	8,02	5,4	32,4
6174	12	20,8	M	Caucasian	3		19,5
6178	4	24,5	F	Caucasian	4,55	5	27,5
6182	4	2	M	Caucasian	2,28		
6183	2	0,33	M	African American			15,4
6187	3	0,33	M	Caucasian	0,72		17,1
6190	2	0,83	M	Hispanic	5,5	5	14,2
6217	3	0,6	M	Caucasian	1,31		17,6
6219	5	0,5	M	Hispanic	1,53		17

## Bibliographie

- 1 Aguayo-Mazzucato, C., Sanchez-Soto, C., Godinez-Puig, V., Gutierrez-Ospina, G., and Hiriart, M. (2006). Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PloS one* 1, e35.
- 2 Baetens, D., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., and Orci, L. (1979). Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of langerhans. *Science* 206, 1323-1325.
- 3 Banting, F., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., and Fletcher, A.A. (1922). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal* 12, 141.
- 4 Bonner-Weir, S. (2005). Islets of Langerhans: Morphology and Postnatal Growth. In *Joslin's diabetes mellitus* (Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Willkins), p. 41.
- 5 Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y.D., Giovannoni, L., Parnaud, G., and Berney, T. (2010). Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* 59, 1202-1210.
- 6 Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., and Powers, A.C. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 53, 1087-1097.
- 7 Butler, A.E., Campbell-Thompson, M., Gurlo, T., Dawson, D.W., Atkinson, M., and Butler, P.C. (2013). Marked expansion of exocrine and endocrine pancreas with incretin therapy in humans with increased exocrine pancreas dysplasia and the potential for glucagon-producing neuroendocrine tumors. *Diabetes* 62, 2595-2604.
- 8 Butler, A.E., Cao-Minh, L., Galasso, R., Rizza, R.A., Corradin, A., Cobelli, C., and Butler, P.C. (2010). Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia* 53, 2167-2176.
- 9 Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102-110.
- 10 Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.O., and Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2334-2339.
- 11 Campbell-Thompson, M., Wasserfall, C., Kaddis, J., Albanese-O'Neill, A., Staeva, T., Nierras, C., Moraski, J., Rowe, P., Gianani, R., Eisenbarth, G., *et al.* (2012a). Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes (nPOD): developing a tissue biobank for type 1 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews* 28, 608-617.

- 12 Campbell-Thompson, M.L., Heiple, T., Montgomery, E., Zhang, L., and Schneider, L. (2012b). Staining protocols for human pancreatic islets. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e4068.
- 13 Chalkley, H.W. (1943). Method for the Quantitative Morphologic Analysis of Tissues. *Journal of The National Cancer Institute* 4, 47-53.
- 14 Clark, A., Jones, L.C., de Koning, E., Hansen, B.C., and Matthews, D.R. (2001). Decreased insulin secretion in type 2 diabetes: a problem of cellular mass or function? *Diabetes* 50 *Suppl 1*, S169-171.
- 15 Clark, A., Wells, C.A., Buley, I.D., Cruickshank, J.K., Vanhegan, R.I., Matthews, D.R., Cooper, G.J., Holman, R.R., and Turner, R.C. (1988). Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9, 151-159.
- 16 de Vathaire, F., El-Fayech, C., Ben Ayed, F.F., Haddy, N., Guibout, C., Winter, D., Thomas-Teinturier, C., Veres, C., Jackson, A., Pacquement, H., *et al.* (2012). Radiation dose to the pancreas and risk of diabetes mellitus in childhood cancer survivors: a retrospective cohort study. *The lancet oncology* 13, 1002-1010.
- 17 Elayat, A.A., el-Naggar, M.M., and Tahir, M. (1995). An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *Journal of anatomy* 186 ( Pt 3), 629-637.
- 18 Gepts, W., and Lecompte, P.M. (1981). The pancreatic islets in diabetes. *The American journal of medicine* 70, 105-115.
- 19 Gersell, D.J., Gingerich, R.L., and Greider, M.H. (1979). Regional distribution and concentration of pancreatic polypeptide in the human and canine pancreas. *Diabetes* 28, 11-15.
- 20 Guiot, Y., Sempoux, C., Moulin, P., and Rahier, J. (2001). No decrease of the beta-cell mass in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50 *Suppl 1*, S188.
- 21 Harja, E., Lord, J., and Skyler, J.S. (2013). An analysis of characteristics of subjects examined for incretin effects on pancreatic pathology. *Diabetes technology & therapeutics* 15, 609-618.
- 22 Hornblad, A., Cheddad, A., and Ahlgren, U. (2011). An improved protocol for optical projection tomography imaging reveals lobular heterogeneities in pancreatic islet and beta-cell mass distribution. *Islets* 3, 204-208.
- 23 Isse, K., Lesniak, A., Grama, K., Roysam, B., Minervini, M.I., and Demetris, A.J. (2012). Digital transplantation pathology: combining whole slide imaging, multiplex staining and automated image analysis. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12, 27-37.
- 24 Kharouta, M., Miller, K., Kim, A., Wojcik, P., Kilimnik, G., Dey, A., Steiner, D.F., and Hara, M. (2009). No mantle formation in rodent islets -- the prototype of islet revisited. *Diabetes research and clinical practice* 85, 252-257.

- 25 Kilimnik, G., Jo, J., Periwal, V., Zielinski, M.C., and Hara, M. (2012). Quantification of islet size and architecture. *Islets* 4, 167-172.
- 26 Kilimnik, G., Zhao, B., Jo, J., Periwal, V., Witkowski, P., Misawa, R., and Hara, M. (2011). Altered islet composition and disproportionate loss of large islets in patients with type 2 diabetes. *PloS one* 6, e27445.
- 27 Kim, A., Kilimnik, G., Guo, C., Sung, J., Jo, J., Periwal, V., Witkowski, P., Dilorio, P., and Hara, M. (2011). Computer-assisted large-scale visualization and quantification of pancreatic islet mass, size distribution and architecture. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- 28 Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., and Hara, M. (2009). Islet architecture: A comparative study. *Islets* 1, 129-136.
- 29 Kloppel, G., Lohr, M., Habich, K., Oberholzer, M., and Heitz, P.U. (1985). Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Survey and synthesis of pathology research* 4, 110-125.
- 30 Laguesse, E. (1893). Sur la formation des ilots de Langerhans dans le pancreas. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances et Memoires de la Societe de Biologie* 5, 2.
- 31 Langerhans, P. (1869). *Beitrag zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldruse*. Berlin: Gustav Lange.
- 32 Leclercq-Meyer, V., Marchand, J., and Malaisse, W.J. (1985). Insulin and glucagon release from the ventral and dorsal parts of the perfused pancreas of the rat. Effects of glucose, arginine, glucagon and carbamylcholine. *Hormone research* 21, 19-32.
- 33 Maclean, N., and Ogilvie, R.F. (1955). Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. *Diabetes* 4, 367-376.
- 34 Malaisse-Lagae, F., Stefan, Y., Cox, J., Perrelet, A., and Orci, L. (1979). Identification of a lobe in the adult human pancreas rich in pancreatic polypeptide. *Diabetologia* 17, 361-365.
- 35 Marchetti, P., Dotta, F., Lauro, D., and Purrello, F. (2008). An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. *Regulatory peptides* 146, 4-11.
- 36 Marchetti, P., Lupi, R., Del Guerra, S., Bugliani, M., Marselli, L., and Boggi, U. (2010). The beta-cell in human type 2 diabetes. *Advances in experimental medicine and biology* 654, 501-514.
- 37 Meier, J.J., Bhushan, A., Butler, A.E., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2005). Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 48, 2221-2228.
- 38 Mering, J.V., and Minkowski, O. (1890). Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 26, 17.

- 39 Orci, L., Baetens, D., Ravazzola, M., Stefan, Y., and Malaisse-Lagae, F. (1976). Pancreatic polypeptide and glucagon : non-random distribution in pancreatic islets. *Life sciences* *19*, 1811-1815.
- 40 Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Baetens, D., and Perrelet, A. (1978). Pancreatic-polypeptide-rich regions in human pancreas. *Lancet* *2*, 1200-1201.
- 41 Prasad, K., and Prabhu, G.K. (2012). Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained specimen in medical research-a review. *Journal of medical systems* *36*, 2621-2631.
- 42 Rahier, J., Goebbels, R.M., and Henquin, J.C. (1983a). Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* *24*, 366-371.
- 43 Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Sempoux, C., and Henquin, J.C. (2008). Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* *10 Suppl 4*, 32-42.
- 44 Rahier, J., Wallon, J., and Henquin, J.C. (1981). Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia* *20*, 540-546.
- 45 Rahier, J., Wallon, J., Loozen, S., Lefevre, A., Gepts, W., and Haot, J. (1983b). The pancreatic polypeptide cells in the human pancreas: the effects of age and diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *56*, 441-444.
- 46 Rojo, M.G., Bueno, G., and Slodkowska, J. (2009). Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* *47*, 349-354.
- 47 Saisho, Y., Butler, A.E., Manesso, E., Elashoff, D., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2013). beta-cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes care* *36*, 111-117.
- 48 Saisho, Y., Butler, A.E., Meier, J.J., Monchamp, T., Allen-Auerbach, M., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2007). Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes. *Clin Anat* *20*, 933-942.
- 49 Saito, K., Iwama, N., and Takahashi, T. (1978a). Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas. *The Tohoku journal of experimental medicine* *124*, 177-186.
- 50 Saito, K., Takahashi, T., Yaginuma, N., and Iwama, N. (1978b). Islet morphometry in the diabetic pancreas of man. *The Tohoku journal of experimental medicine* *125*, 185-197.
- 51 Saito, K., Yaginuma, N., and Takahashi, T. (1979). Differential volumetry of A, B and D cells in the pancreatic islets of diabetic and nondiabetic subjects. *The Tohoku journal of experimental medicine* *129*, 273-283.

- 52 Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C., and Yagihashi, S. (2002). Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45, 85-96.
- 53 Sharpe, J., Ahlgren, U., Perry, P., Hill, B., Ross, A., Hecksher-Sorensen, J., Baldock, R., and Davidson, D. (2002). Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science* 296, 541-545.
- 54 Stefan, Y., Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., Patel, Y., and Unger, R.H. (1982). Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* 31, 694-700.
- 55 Tasaka, Y., Matsumoto, H., Inoue, Y., and Hirata, Y. (1989). Contents and secretion of glucagon and insulin in rat pancreatic islets from the viewpoint of their localization in pancreas. *The Tohoku journal of experimental medicine* 159, 123-130.
- 56 Trimble, E.R., Halban, P.A., Wollheim, C.B., and Renold, A.E. (1982). Functional differences between rat islets of ventral and dorsal pancreatic origin. *The Journal of clinical investigation* 69, 405-413.
- 57 Trimble, E.R., and Renold, A.E. (1981). Ventral and dorsal areas of rat pancreas: islet hormone content and secretion. *The American journal of physiology* 240, E422-427.
- 58 Van Assche, F.A., Aerts, L., and De Prins, F. (1978). A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *British journal of obstetrics and gynaecology* 85, 818-820.
- 59 Vishwanathan, K.A., Bazaz-Malik, G., Dandekar, J., and Vaishnava, H. (1972). A qualitative and quantitative histological study of the islets of Langerhans in diabetes mellitus. *Indian journal of medical sciences* 26, 807-812.
- 60 Wang, X., Zielinski, M.C., Misawa, R., Wen, P., Wang, T.Y., Wang, C.Z., Witkowski, P., and Hara, M. (2013). Quantitative analysis of pancreatic polypeptide cell distribution in the human pancreas. *PloS one* 8, e55501.
- 61 Weinstein, R.S., Graham, A.R., Richter, L.C., Barker, G.P., Krupinski, E.A., Lopez, A.M., Erps, K.A., Bhattacharyya, A.K., Yagi, Y., and Gilbertson, J.R. (2009). Overview of telepathology, virtual microscopy, and whole slide imaging: prospects for the future. *Human pathology* 40, 1057-1069.
- 62 Westermark, P., and Wilander, E. (1978). The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity onset diabetes mellitus. *Diabetologia* 15, 417-421.
- 63 Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H., and Sundler, F. (2002). The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory peptides* 107, 63-69.
- 64 Wittingen, J., and Frey, C.F. (1974). Islet concentration in the head, body, tail and uncinuate process of the pancreas. *Annals of surgery* 179, 412-414.
- 65 Yalow, R.S., and Berson, S.A. (1960). Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *The Journal of clinical investigation* 39, 1157-1175.

- 66 Yoon, K.H., Ko, S.H., Cho, J.H., Lee, J.M., Ahn, Y.B., Song, K.H., Yoo, S.J., Kang, M.I., Cha, B.Y., Lee, K.W., *et al.* (2003). Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 2300-2308.
- 67 Yukawa, M., Takeuchi, T., Watanabe, T., and Kitamura, S. (1999). Proportions of various endocrine cells in the pancreatic islets of wood mice (*Apodemus speciosus*). *Anatomia, histologia, embryologia* 28, 13-16.



## Résumé

**OBJECTIF :** Nous avons évalué la répartition des cellules bêta pancréatiques entre la tête et la queue du pancréas et l'intérêt des lames virtuelles dans l'analyse morphométrique.

**METHODES :** Nous avons utilisé des lames virtuelles de pancréas du réseau nPOD, provenant d'individus sans antécédent de diabète. Ces lames virtuelles permettent d'analyser l'intégralité de chaque coupe de pancréas à un agrandissement x100. Nous avons réalisé une quantification semi-automatisée des surfaces immunomarquées à l'insuline, des îlots endocrines et de la proportion de tissu non-pancréatique (tissu adipeux et le tissu conjonctif, vaisseaux) dans chaque coupe de pancréas.

**RESULTATS :** Nous avons étudié 415 lames virtuelles provenant de 69 individus. Notre protocole d'analyse est validé par des résultats correspondant aux données de la littérature : une masse insulaire moyenne de 1g chez les adultes, une masse cellulaire bêta corrélée à l'âge et à l'IMC, et augmentée de 65 % chez les adultes obèses comparés aux adultes normo-pondéraux. Le tissu non pancréatique représente 29% de la surface de chaque coupe de pancréas, et augmente avec l'âge. La fraction cellulaire bêta est plus importante dans la queue si elle est exprimée en fonction de la surface tissulaire totale (0,83 vs 0,71 % dans la tête). Mais il n'y a pas de différence lorsqu'elle est exprimée en fonction du tissu pancréatique.

**CONCLUSION :** Notre étude souligne l'importance d'une méthodologie détaillée pour le calcul de la masse et de la fraction cellulaire bêta pancréatique. Il est nécessaire d'analyser l'ensemble de la coupe de tissu afin de calculer la fraction de tissu non-pancréatique. Les lames virtuelles disponibles sur le réseau nPOD pourront être utilisées pour d'autres analyses morphométriques semi-automatisées.

**Mots clés :** Pancréas, Masse cellulaire bêta, Ilots de Langerhans, Lames virtuelles, Quantification semi-informatisée.