



HAL
open science

Rôle des interactions cellulaires sur les sécrétions hormonales dans les îlots pancréatiques

Quentin Perrier

► **To cite this version:**

Quentin Perrier. Rôle des interactions cellulaires sur les sécrétions hormonales dans les îlots pancréatiques. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03166138

HAL Id: dumas-03166138

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03166138>

Submitted on 11 Mar 2021

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

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2021

RÔLE DES INTERACTIONS CELLULAIRES SUR LES SECRETIONS HORMONALES
DANS LES ÎLOTS PANCREATIQUES

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
PHARMACIE HOSPITALIÈRE – PRATIQUE ET RECHERCHE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLÔME D'ÉTAT

Quentin PERRIER

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le : 08/03/2021

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. le Professeur Pierrick BEDOUCH

Membres :

M. le Professeur Domenico BOSCO (directeur de thèse)

M. le Docteur Walid RACHIDI (tuteur universitaire)

Mme la Docteure Sandrine LABLANCHE

Mme la Docteure Marie-Dominique DESRUET

1. *L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes :
Mme Christine DEMEILLIERS

Année 2019 - 2020

ENSEIGNANTS – CHERCHEURS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055
PU-PH	BEDOUCHE	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042
MAST	BELLET	BEATRICE	-
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042
PU	BURMEISTER	WIM	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309
Professeur Emerite	CALOP	JEAN	
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU -PH	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON
MCF	DEMEILLIERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042
PRCE	FITE	ANDREE	-
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emerite	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	MELO DI LIMA	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553
AHU	MNOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	OUKACNE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, TheMAS
MCF	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042
PAST	RIEU	ISABELLE	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	WOUESSIDJEW	DENIS	DPM – UMR 5063 CNRS

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
 ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
 BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie
 CRI : Centre de Recherche INSERM
 CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
 DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
 IAB : Institute for Advanced Biosciences
 IBS : Institut de Biologie Structurale
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
 LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
 MAST : Maitre de Conférences Associé à Temps Partiel
 MCF : Maitre de Conférences des Universités
 MCU-PH : Maitre de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
 PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
 PRAG : Professeur Agrégé
 PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement

*« Tout seul on va plus vite, ensemble, on va plus loin »
Proverbe africain*

Remerciements

A **Monsieur le Professeur Pierrick Bedouch**. Mes remerciements les plus sincères de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie pour votre suivi tout au long de mon parcours d'interne, et du suivi que vous avez pu faire sur l'ensemble de mes projets. J'espère que nous allons continuer à travailler en collaboration, comme nous avons déjà pu le faire ces précédentes années.

A **Monsieur le Professeur Domenico Bosco**. Un très grand merci pour le pari que tu as fait en m'acceptant en tant qu'étudiant de master 2, puis en encadrant mon travail de thèse. Tu m'as fait profiter de ton expérience et j'ai ainsi pu apprendre énormément à tes côtés. Tu as en effet toujours pris le temps de répondre à mes très/trop nombreuses questions, et ne m'a pas lâché durant le confinement lié à l'épidémie du coronavirus. Merci

A **Monsieur le Professeur Walid Rachidi**. Je te suis très reconnaissant pour l'attention que tu as pu porter à mon projet de recherche. L'intérêt que tu as pour la formation dispensée dans le master 2 TCGIT de Grenoble fait totalement le lien avec les innovations thérapeutiques prochainement disponibles. Enfin, j'espère que nous pourrons collaborer dans le futur.

A **Madame la Docteure Sandrine Lablanche**. C'est dans les suites de mon stage en diabétologie (tout haut de mon 2^{ème} semestre d'interne) que nous avons pu commencer à travailler ensemble. Je te présente toute ma reconnaissance pour le soutien dont tu as fait preuve tant au niveau personnel que professionnel. Nous allons pouvoir continuer à travailler ensemble grâce à ta persévérance.

A **Madame la Docteure Marie-Dominique Desruet**. Je te remercie pour avoir accepté de juger mon travail et ainsi (comme tu le dis si bien) « de participer à ma remise de diplôme ». J'ai particulièrement été touché par ton enthousiasme et ton énergie lors de nos collaborations et j'espère que cela continuera.

A mes parents, votre « titi » a bien grandi mais aura eu besoin de vous jusqu'au bout et encore surement après. Je ne serai jamais arrivé là sans votre aide et les mots me manquent pour vous faire comprendre à quel point je suis chanceux de vous avoir à mes côtés.

A mes grands-parents, entre un papy centenaire et une mamie 3 roues, j'espère vous rendre fière et vous oriente bien volontiers vers la table des abréviations pour comprendre ce que je raconte

A mon parrain, mes oncles, tantes, cousins et cousines vous êtes si nombreux et pourtant nous arrivons toujours à garder contact. La période actuelle n'est pas propice à partager un verre, mais soyez sûr que nous nous rattrapons.

A « marraine », tu me suis depuis la naissance et même si tu ne comprends pas toujours ce que je fabrique avec ces études qui n'en finissent plus, tu as toujours été là pour moi et je t'en suis profondément reconnaissant.

A mes amis de la fac, Big up à ma neuneue avec qui on a tout partagé depuis la PACES. Ce fut tout d'abord une expérience avec la corpo, nous avons passé de très bon moment. Une attention toute particulière à mes 2 anciens colocataires, robin et alex. Puis ce fut le concours de l'internat avec beaucoup d'efforts mais une team soudée et de la réussite à tous les niveaux (Popo, Marianne, Alex, Marie, Anne-Flore, Binome et tant d'autres).

A mes chefs, Renaud. R, Corine. D, Charlotte. J, Magali. HG, Anne. G, Anne-Sophie. L, Magalie. B, Pierre-Yves. B, Anne-Laure. B, Olivier. C, Julien. L, Aurélie. B, Thierry. R, Rachel. T, Lionel. R, Fabienne. R (€€), Christine. C (Triplikatats for ever), Sophie. C, Mélanie. M, Agathe. MN. A Audrey. L, si on devait personnifier inspecteur gadget ce serait toi. Puis à Delphine. S, merci pour ta franchise et notre super congrès Europharmat. Ensuite à Roseline. M (maman chat), merci pour ton soutien et tes conseils. Et Enfin à Marjorie. D, merci pour ta douceur, ton soutien sur les plans personnels et professionnels, tu as toujours su trouver les mots justes.

A mes co-interne, re-Marie et Sophie (team Vienne), Sarah, Eva, Johana, Julien et Anne (team diabéto) Louise et re-re-Marie (team NutNut), à Caroline (Team moidieu city) merci pour ces fous rires, à Antoine et Florian (team Néphro) à Anne-Flore et Laurentine (team PUI) et à Sami (team ATU).

A toutes les collègues de travail et pas que : Mes externes que j'espère ne pas avoir trop martyrisés, ceux qui ont été mes internes désolé pour toutes ces questions, Cristelle et ces MDS, Sylvie ma préparatrice des MO avec Karine, aux préparateurs des essais merci pour les 10 kilos supplémentaires en 6 mois (Anne, Sylvie, Camille, Nathalie). A toute l'équipe du LITC de Genève, ce fût une super expérience à vos côtés pour le travail, mais surtout pour avoir découvert Genève : apéritifs à Carouge, les röstis, le chocolat ... On doit encore se retrouver au ski et à Europaparck !! Un merci tout particulier à Vanessa pour la collaboration sur l'ensemble de nos expériences, et ta gentillesse. GG, on aime la qualité <3. Et enfin, Caroline, merci pour m'avoir appris à tenir une pipette, je ne savais rien faire en arrivant et ce n'est plus le cas (enfin j'espère). Ton franc parlé m'a permis de passer de très bon moment, encore merci !

Aux amis de l'internat, merci aux 3 bureaux de l'AIPBG, on a fait un peu bougé et amorcer cette « super » R3C. Au bureau du love (FNSIP-BM) ce fut un plaisir de passer cette année avec vous : les bordelaises et leur habileté inégalée au ski, les parisiens et le lillois pour leur hospitalité, les 2 présidents vous êtes des amours et à toi Clémence avec qui je peux tout partager. A la team plongée : Pops', Marie, Agathe, Justine il faut se programmer le niveau 2 dans les îles ! A Agathe la découverte de ce semestre, je sais que je t'embête beaucoup <3. A mon binôme de l'internat, Marie, ENCORE, on a commencé par un concours, enchainé sur 6 mois de collocation à alterner entre cinéma et pizza, puis 6 mois de retrouvaille en NutNut. Cet internat n'aurait pas été le même sans toi. On se retrouvera après la thèse pour mettre le feu au dance floor.

Table des matières

Remerciements	7
Table des figures	12
Table des tableaux.....	12
Table des annexes.....	12
Table des abréviations.....	13
Préambule	14
Partie 1 : Le diabète, la recherche au service des innovations thérapeutiques ...	15
1. Le pancréas.....	15
1.1 Anatomie	15
1.2 La fonction exocrine	15
1.3 La fonction endocrine.....	15
2. Le diabète.....	16
2.1 Epidémiologie.....	16
2.2 Définition	17
2.3 Diabète de type 1	18
2.4 Diabète de type 2.....	19
2.5 Les complications du diabète.....	19
2.5.1 Les complications aiguës	19
2.5.2 Les complications chroniques	20
3. Les traitements du DT1.....	21
3.1 L'insulinothérapie	21
3.2 Transplantation	22
3.2.1 La transplantation de pancréas	22
3.2.2 La transplantation d'îlots pancréatiques.....	23
4. Les pistes de recherche en remplacement et régénération des cellules β.....	27
4.1 Remplacement des cellules β	27
4.1.1 La xénotransplantation	27
4.1.2 Utilisation de cellules souches	28
4.1.3 Favoriser la revascularisation des îlots et les protéger de la réponse immunitaire	30
4.2 Régénération des cellules β	32
5. Les îlots pancréatiques : microenvironnement, architecture et interactions cellulaires.....	33
5.1 Le microenvironnement des îlots	34
5.2 Cytoarchitecture et composition cellulaire des îlots.....	35
5.3 Les interactions cellulaires entre les cellules insulaires	37
5.3.1 Les différents types d'interactions	37
5.3.2 Les interactions β - β	37
5.3.3 Les interactions α - β	38
5.3.4 Les interactions δ - β et δ - α	40

Partie 2 : L'article	43
Introduction	43
Matériel et méthode	45
Les animaux	45
Isolement des îlots pancréatiques de rat.....	45
Dissociation des îlots pancréatiques et méthodes de tri cellulaire	45
Test de sécrétion en réponse au glucose réalisé par incubation statique	46
Liste des anticorps utilisés.....	49
Préparation des chambres de Cunningham.....	50
Préparation des globules rouges pour le RHPA.....	50
Quantification de la sécrétion d'insuline par RHPA.....	50
IF et analyse des lames de RHPA.....	51
Immunofluorescence	53
Analyse statistique.....	54
Résultats	55
Les cellules insulaires de rat β et non β triées par FACS forment des pseudo-îlots d'architecture comparable à des îlots natifs	55
La sécrétion d'insuline est affectée par les contacts cellulaires directs β -non β	56
La sécrétion du glucagon ne semble pas affectée par les contacts intercellulaires β -non β directs ou paracrines	58
Enrichissement satisfaisant en cellules α effectué avec la deuxième méthode de tri par FACS	58
La sécrétion d'insuline n'est pas affectée par les contacts cellulaires directs β - α	59
Les effets des contacts α - β sur la sécrétion du glucagon sont incertains.....	60
Effet des contacts cellulaires directs sur la sécrétion d'insuline par RHPA	61
Discussion	65
Conclusion et perspectives	69
Références	71
Annexes	79

Table des figures

Partie 1 : Le diabète, la recherche au service des innovations thérapeutiques ... 15

Figure 1. Estimations du nombre d'adultes atteints de diabète (en million) (2).....	17
Figure 2. Méthode d'isolement des îlots humains pancréatiques	24
Figure 3. Vascularisation des îlots pancréatiques	35
Figure 4. Photo en microscopie à fluorescence d'îlots isolés de rat et humain	36
Figure 5. Collaboration tripartite des cellules α , β et δ	42

Partie 2 : L'article..... 43

Figure 1. Résumé des interactions entre les cellules endocrines du pancréas.....	43
Figure 2. Formation des pseudo-îlots	47
Figure 3. Photos en microscopie à fluorescence des pseudo-îlots β / non β et mix β -non β ..	55
Figure 4. Résultats du test de sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par le glucose pour les pseudo-îlots du tri β / non β	56
Figure 5. Résultats du test de sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par le glucose en modifiant la proportion des cellules non β des pseudo-îlots du tri β / non β	57
Figure 6. Résultats du test de sécrétion du glucagon en réponse à une stimulation par le glucose pour les pseudo-îlots du tri β et non β	58
Figure 7. Résultats du test de sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par le glucose pour les pseudo-îlots du tri β et α	59
Figure 8. Résultats du test de sécrétion du glucagon en réponse à une stimulation par le glucose pour les pseudo-îlots du tri β et α	60
Figure 9. Photos en microscopie à fluorescence de cellules formant des plaques de lyse par RHPA	61
Figure 10. Evaluation de la sécrétion d'insuline par RHPA de cellules isolées	64

Table des tableaux

Tableau 1. Liste des anticorps utilisés durant les expériences	49
--	----

Table des annexes

Annexe 1. Procédure d'isolement d'îlots pancréatiques de rat.....	80
Annexe 2. Plaque d'agarose et tests d'incubation statique	81
Annexe 3. Chambre de Cunningham.....	81
Annexe 4. Schématisation des conditions de RHPA	82

Table des abréviations

Ach : Acétylcholine

AEC : *Amniotic epithelial cell*

ATP : Adénosine triphosphate

BSA : *Bovine serum albumin*

CMRL : *Connaught medical research laboratory*

CRH : *Corticotropin releasing hormone*

DAPI : 4',6-Diamidino-2-phénylindole

DT1 : Diabète de type 1

DT2 : Diabète de type 2

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ESC : *Embryonic stem cell*

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

FACS : *Fluorescence-activated cell sorting*

FITC : *Fluorescein isothiocyanate*

FSC : *Forward Scatter*

GABA : Acide gammaaminobutyrique

GLP-1 : *Glucagon like peptide 1*

HLA : *Human leucocyte antigen*

IBMIR : *Instant blood mediated inflammatory reaction*

IBMX : 3-Isobutyl-1-méthylxanthine

IF : Immunofluorescence

iPSC : *Induced pluripotent stem cell*

KRB: *Krebs-Ringer bicarbonate buffer*

MEC : Matrice extracellulaire

MSC : *Mesenchymal stromal cell*

PBS : *Phosphate buffer saline*

PERV : *Porcine enterovirus*

PKA : Protéine kinase A

PPDG : P-phenylenediamine glycerol

RHPA : *Reverse hemolytic plaque assay*

SSC : *Side Scatter*

SSTR : Récepteur de la somatostatine

TRITC : *Tetramethyl rhodamine isothiocyanate*

Préambule

Le diabète est une maladie touchant plusieurs centaines de millions de personnes à travers le monde. L'activité de recherche, sous la direction du Professeur Bosco, et en lien avec le Laboratoire de transplantation cellulaire, repose sur l'importance des contacts cellulaires dans la sécrétion et la biosynthèse hormonales des îlots pancréatiques.

L'objectif de mon travail de recherche a été de comprendre à deux niveaux différents l'impact des contacts cellulaires sur les sécrétions hormonales au sein des îlots.

Ici, dans une première partie bibliographique, je présenterai d'abord quelques rappels sur le diabète de type 1 et sur l'allogreffe d'îlots humains pancréatiques. Par la suite, j'exposerai l'avancée de la recherche autour des thérapies cellulaires, géniques et d'ingénierie tissulaire dans le diabète de type 1. Enfin je ferai un état des lieux sur les connaissances actuelles autour des interactions cellulaires dans les îlots et leurs impacts sur l'homéostasie glucidique.

Dans une seconde partie, j'exposerai sous la forme d'un article, le travail que j'ai réalisé portant sur l'importance des contacts cellulaires dans la sécrétion hormonale d'insuline et de glucagon, *in vitro*, à partir de cellules primaires de rats.

Enfin, je conclurai sur l'apport de mon travail au niveau scientifique et sur les perspectives à suivre après ces travaux.

Partie 1 : Le diabète, la recherche au service des innovations thérapeutiques

1. Le pancréas

1.1 Anatomie

Le pancréas est un organe annexe du tube digestif, situé dans le rétro-péritoine entre le duodénum et la rate. Il mesure entre 15 et 25cm de long pour un poids de 75 à 100g (1). Il s'agit d'une glande amphicrine avec 85% de tissu exocrine, 5% de tissu endocrine, le reste étant surtout de la matrice extracellulaire (MEC) et des vaisseaux.

1.2 La fonction exocrine

La fonction exocrine principale du pancréas est de permettre la digestion des nutriments non digérés au niveau de l'estomac. Cela est rendu possible par la sécrétion des sucs et enzymes (amylases, lipases, protéases) par les cellules acineuses.

1.3 La fonction endocrine

La partie endocrine est composée des îlots pancréatiques. Ces îlots sont décrits pour la première fois en 1869 par Paul Langerhans, et c'est Edouard Languesse qui les nomme par la suite îlots de Langerhans en son honneur. La fonction endocrine principale du pancréas est de permettre la régulation de la glycémie par la sécrétion de différentes hormones (insuline, glucagon et somatostatine). Les îlots constituent des agrégats de cellules endocrines, leur diamètre pouvant varier entre 100 et 200 μ m. Chez l'humain, les cellules les plus abondantes sont les cellules β productrices d'insuline, puis les cellules α productrices de glucagon et enfin les cellules δ productrices de somatostatine.

On peut également retrouver, mais en quantité plus faible, les cellules PP productrices du polypeptide pancréatique et les cellules ϵ productrices de ghréline.

2. Le diabète

C'est près de 4000 ans avant J.-C. en Chine que les premiers signes du diabète sont décrits : « urine sucrée », « urine de miel ». Par la suite, différents noms sont donnés à cette maladie : maladie du sucre, diabète sucré et diabète mellitus. Aujourd'hui on peut distinguer deux grands types de diabète : le diabète juvénile qualifié aussi de diabète insulino-dépendant puis de diabète de type 1 (DT1) et le diabète non insulino-dépendant appelé aussi diabète de type 2 (DT2).

2.1 Epidémiologie

Le diabète est une préoccupation de santé majeure, avec 463 millions de personnes atteintes dans le monde en 2019, et une prévalence estimée à 700 millions en 2045 (figure 1). En 2019, 4,2 millions de décès sont imputables au diabète et les dépenses de santé en lien avec le diabète représentent plus de 760 milliards USD. Les dépenses de santé des patients diabétiques sont estimées comme étant deux fois plus importantes que celles d'un patient non diabétique (2).

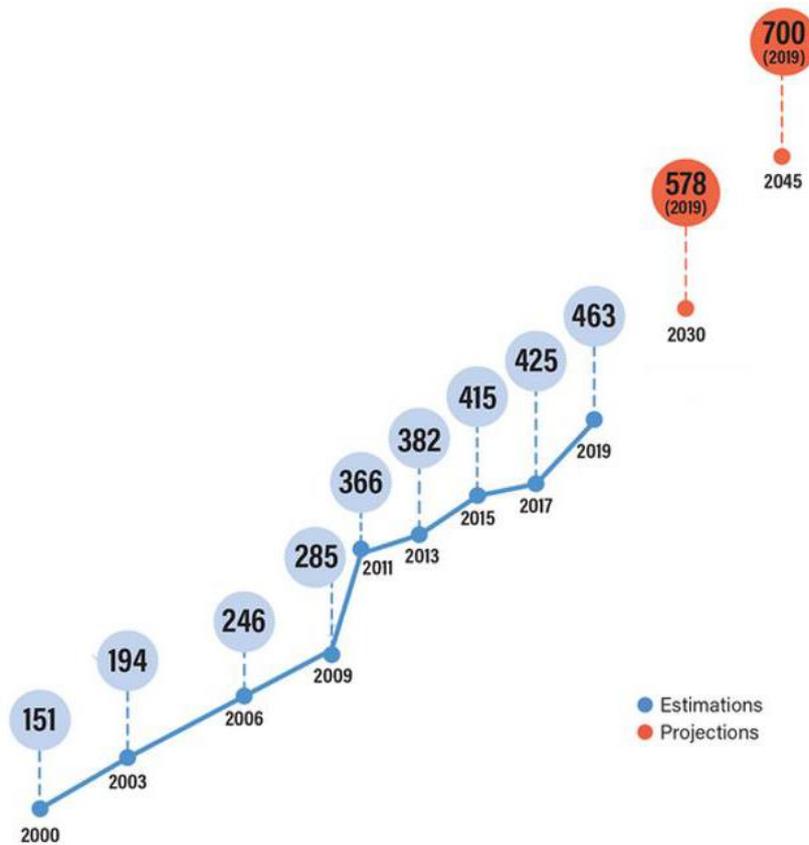


Figure 1. Estimations du nombre d'adultes atteints de diabète (en million) (2)

2.2 Définition

Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique. Il est défini par la présence d'au moins un des critères suivant selon l'Organisation Mondiale de la Santé (3) :

- Glycémie à jeun $\geq 1,26\text{g/L}$
- HbA1c $\geq 6,5\%$
- Glycémie plasmatique aléatoire $\geq 2\text{g/L}$
- Glycémie $\geq 2\text{g/L}$ 2h après un test d'hyperglycémie provoquée *per os*

2.3 Diabète de type 1

Le DT1 représente 10% des formes de diabète. Dans 75% des cas il est détecté chez les enfants ou adolescents (4). Il s'agit d'une maladie auto-immune résultant de l'infiltration de macrophages et lymphocytes au sein des îlots et favorisant un phénomène inflammatoire qui aboutit à la destruction des cellules β . Différents anticorps peuvent être retrouvés : anti acide glutamique décarboxylase (GAD), anti tyrosine phosphatase IA2, anti ZnT8 (5,6) pour les principaux. La destruction des cellules β induit une forte diminution de la production endogène d'insuline, l'hyperglycémie survenant généralement lorsque 80 à 90% des cellules β sont détruites (7). Le DT1 est généralement découvert à ce stade, de manière brutale devant la présence d'un syndrome cardinal pouvant être associé à une crise acido-cétosique (paramètres qui seront définis ultérieurement). L'étiologie exacte de la destruction des cellules β reste encore aujourd'hui incertaine. Elle pourrait allier différents paramètres :

- Des prédispositions génétiques
 - o Au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2, 90% des patients diabétiques vont présenter un génotype HLA (*human leucoyte antigen*) DR3 Q2 ou HLA DR4 Q8 (8)
- Des facteurs environnementaux
 - o Infections virales : enterovirus, coxsackie B virus, rotavirus, cytomégalovirus (9,10)
 - o Autres : vitamine D, alimentation ... (11)

2.4 Diabète de type 2

Le DT2 est la forme la plus fréquente de diabète (90%), et survient généralement chez des personnes de plus de 40 ans. La pathogénèse du DT2 se caractérise par : une insulino-résistance périphérique progressive, une diminution de la sensibilité au glucose des cellules β , une altération de la production du glucose hépatique et enfin une perte de fonction des cellules β pouvant aboutir à un état d'insulino-requérance (12). Différents facteurs de risques sont retrouvés dans le DT2 : l'obésité, la surconsommation d'alcool ou de tabac, la composition du microbiote intestinal (13); et les prédispositions génétiques (n'impliquant pas les HLA contrairement au DT1) qui ont un caractère héréditaire plus important que dans le DT1 (14,15).

2.5 Les complications du diabète

2.5.1 Les complications aiguës

Au sein des complications aiguës, on peut distinguer des situations liées à l'hyperglycémie ou à l'hypoglycémie.

En absence d'insuline le glucose ne peut pas être stocké, ce qui induit une hyperglycémie. Une autre source d'énergie doit donc être trouvée : les acides gras libres. Leur métabolisme au niveau du foie engendre la production de corps cétoniques, on parle alors de décompensation acido-cétosique du diabète. Cette crise acido-cétosique se caractérise par : hyperglycémie importante, cétonémie, cétonurie, glycosurie, déshydratation, nausées, polyurie, confusion, coma et finalement la mort. Cette complication acido-cétosique survient essentiellement en cas de DT1, les patients DT2 ayant une sécrétion d'insuline résiduelle.

Associé à cette crise acido-cétosique on peut également retrouver un syndrome cardinal (polyuro-polydipsie, perte de poids malgré polyphagie) (16).

Les patients diabétiques qui reçoivent des traitements hypoglycémisants (insuline, sulfamide, glinide) sont à risques d'expérimenter des épisodes hypoglycémiques. Ceux-ci se manifestent par différents symptômes : transpiration, fatigue, tremblements et vertiges. La plupart des hypoglycémies peu sévères peuvent être corrigées par une prise orale de sucre rapide. Mais en cas d'hypoglycémie sévère et prolongée, des convulsions peuvent survenir et la situation peut évoluer jusqu'au coma et la mort (16).

2.5.2 Les complications chroniques

Les patients diabétiques, malgré les traitements ont souvent un équilibre glycémique qui reste imparfait. Ils expérimentent des épisodes quotidiens d'hyperglycémies d'amplitudes variables. Ces épisodes répétés vont au long cours induire des lésions micro et macro-vasculaires à l'origine de complications (17).

2.5.2.1 Les complications micro-vasculaires

Les complications micro-vasculaires se caractérisent par une altération de la membrane basale des capillaires et de leur perméabilité. Différents types d'atteintes peuvent survenir :

- Néphropathie diabétique : il s'agit d'un processus progressif aboutissant à un défaut de filtration du rein, et à une insuffisance rénale. Le diabète représente la première cause d'insuffisance rénale terminale dans les pays développés (18)

- Rétinopathie diabétique : il s'agit d'une atteinte des petits vaisseaux de la rétine induisant des micro-thromboses, la formation de nouveaux vaisseaux et aboutissant à une altération de la vision pouvant évoluer jusqu'à la cécité (19)
- Neuropathie diabétique : il s'agit d'une atteinte des nerfs périphériques se traduisant par une dysautonomie et une hypo-sensitivité (20,21)

2.5.2.2 Les complications macro-vasculaires

Les lésions macro-vasculaires correspondent à la formation de plaques d'athéroscléroses. Ces plaques constituent un risque d'hypo-perfusion des membres inférieurs (risque de claudication, ulcères, amputations), de cardiomyopathie ischémique, d'accident vasculaire cérébrale et d'hypertension par activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (17,22–24).

3. Les traitements du DT1

La prise en charge du DT1 est pluridisciplinaire (médecins, pharmaciens, infirmiers, prestataires...) et pluri-cite (domicile, ville, hôpital). Les recommandations hygiéno-diététiques liées aux risques cardiovasculaires, mais également les recommandations spécifiques au diabète (notamment liées à l'alimentation) constituent un des piliers de la prise en charge de ces patients.

3.1 L'insulinothérapie

Avec la découverte de l'insuline en 1921 par Frederick Banting et Charles Best (25), le DT1 est passé du stade de maladie aiguë et mortelle, au stade de

maladie chronique. Dès 1923 les laboratoires se lancent dans la production d'insuline à partir d'extraits de pancréas de porc ou de bœuf, mais de faible pureté et engendrant de nombreuses réactions immunitaires. Il a fallu attendre les années 80 pour voir arriver sur le marché la première insuline humaine synthétique. Depuis l'arsenal thérapeutique des insulines n'a cessé de s'élargir. Les patients DT1 reçoivent quotidiennement de l'insuline de manière discontinue (stylo à insuline) ou continue (pompe à insuline). Bien que l'insulinothérapie a permis une avancée majeure dans la prise en charge des patients DT1 et une diminution des complications, elle ne permet pas d'atteindre une euglycémie continue (26). Pour les patients diabétiques qui présentent toujours une variabilité glycémique importante et qui expérimentent des hypoglycémies sévères, il peut être proposé les alternatives suivantes :

- Un pancréas artificiel : administration d'insuline par pompe en boucle fermée, de manière automatisée et régulée par une intelligence artificielle (27)
- Une transplantation

3.2 Transplantation

Il peut être proposé aux patients diabétiques de remplacer directement la source de production endogène d'insuline par la transplantation d'un pancréas entier ou par la transplantation d'îlots pancréatiques.

3.2.1 La transplantation de pancréas

La première transplantation de pancréas a été réalisée en 1966 à Minneapolis (28). Depuis lors, de nombreux progrès ont été faits sur la technique

de transplantation et d'immunosuppression. Désormais, il est possible d'obtenir une insulino-indépendance à 5 ans dans 70% des cas (29). Quoi qu'il en soit, cela reste une opération chirurgicale majeure avec de nombreux risques péri et post opératoires (hémorragie importante, thrombose aigüe, rejet, pancréatite) pouvant induire une perte précoce du greffon et la mort (30,31). Cette transplantation ne peut donc pas être proposée à tous les patients, et la transplantation d'îlots apparaît comme étant une alternative acceptable.

3.2.2 La transplantation d'îlots pancréatiques

La transplantation d'îlots pancréatiques est une technique peu invasive (procédure de radiologie interventionnelle) et présentant des risques modérés (hémorragies, thromboses, altération des enzymes hépatiques, sténose hépatique, hypertension portale) dans 10% des cas (32–35).

3.2.2.1 Technique

Le processus d'isolement d'îlots est complexe, et regroupe plusieurs étapes (figure 2) :

- Acceptation, réception et préparation du pancréas : les îlots sont obtenus à partir du pancréas d'un donneur décédé. Une fois le pancréas réséqué, il est acheminé en condition réfrigérée dans un centre d'isolement où il sera d'abord nettoyé de l'excès de tissu et désinfecté
- Digestion du pancréas : l'enzyme de digestion (collagénase) est perfusé de manière semi-automatique à 4°C. Ensuite le pancréas est coupé en une dizaine de morceaux qui sont placés dans une chambre de digestion

à 37°C avec des billes métalliques afin d'avoir une digestion enzymatique et mécanique (36)

- Purification des îlots : la séparation du digestat exocrine des îlots est réalisée grâce à la densité différente de ces deux types de tissu. La séparation se fait par centrifugation dans un gradient de densité de Ficoll. Ensuite la pureté de la préparation et le nombre d'îlots obtenus sont quantifiés
- Mise en culture des îlots : cette étape peut durer d'un à quelques jours, ce qui laisse le temps nécessaire à l'organisation de la greffe et l'induction immunosuppressive du receveur
- Conditionnement des îlots et transplantation : le jour de la greffe, les îlots sont placés dans une poche de transfert et la transplantation est réalisée par infusion des îlots au niveau de la veine porte

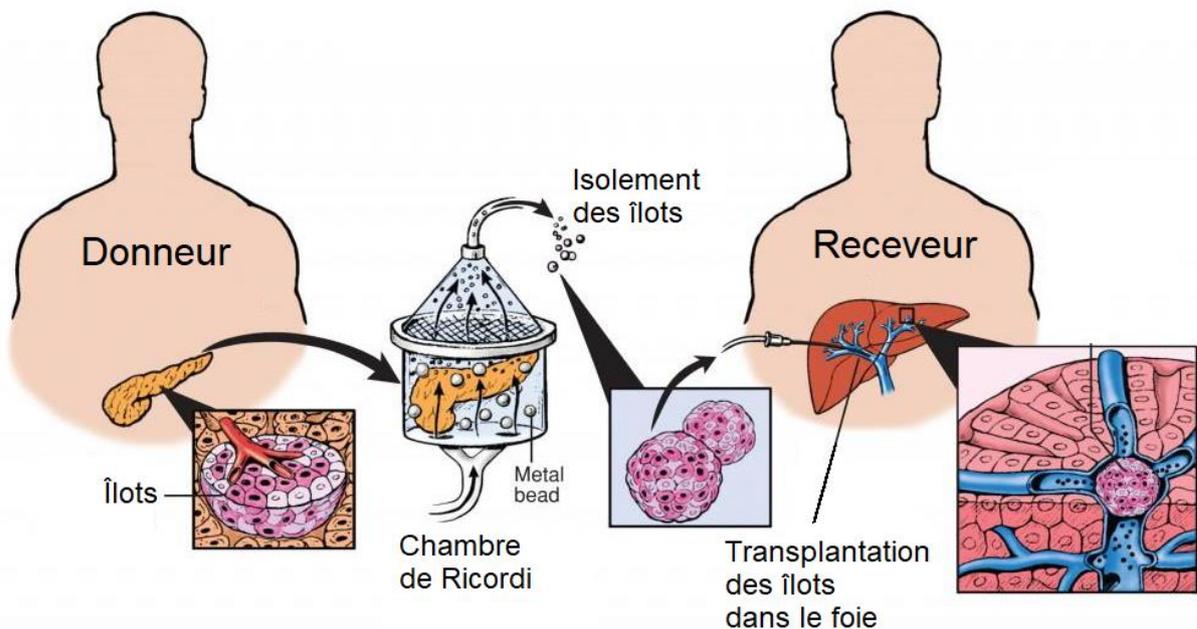


Figure 2. Méthode d'isolement des îlots humains pancréatiques
D'après Diabetes Research Institute, Université de Miami, Robert Margulies,
2005

3.2.2.2 Historique

La première transplantation d'îlots humains pancréatiques a été effectuée à Minneapolis en 1974 (37). Mais il fallut attendre les années 2000 pour avoir une première série de 7 patients insulino-indépendants à 1 an de leur transplantation grâce à un nouveau protocole dit d'Edmonton (38). Les principaux changements menés dans ce protocole par rapport aux précédents sont : une immunosuppression sans glucocorticoïde, la transplantation d'une masse importante d'îlots à partir de plusieurs donneurs, la mise en place d'un procédé standardisé d'isolement d'îlots. A ce jour, avec les améliorations entourant la technique d'isolement (sélection du donneur et de l'organe (39,40), les solutions de préservation d'organes (41,42), les enzymes de digestion (43,44), la technique de purification (45,46) et la culture des îlots (47–49)) et la prise en charge péri-transplantatoire avec notamment la suppression des corticoïdes et l'adaptation des protocoles d'immunosuppression (38), on observe une insulino-indépendance de 80% après 1 à 2 injections d'îlots, avec une insulino-indépendance maintenue à 5 ans pour 50% des patients transplantés (50,51). L'induction immunosuppressive correspond actuellement à un traitement par anticorps anti-thymocyte pour la première transplantation et anti-IL2 (basiliximab) pour les injections suivantes. L'immunosuppression au long cours correspond à une association d'inhibiteur de la calcineurine (tacrolimus) et de l'acide micophénolique (52).

3.2.2.3 Les limites

Des contraintes techniques et pratiques liées à l'évolution des patients péri et post transplantation vont être distinguées.

Tout d'abord, comme il a récemment été démontré au cours d'une analyse de risques (53), le processus d'isolement d'îlots pancréatiques humains regroupe de nombreux risques et le taux de réussite des isollements est variable selon les centres (20 à 60%) (54). De plus, une des contraintes majeures correspond à la disponibilité des pancréas humains. En effet, ces organes proviennent de donneurs décédés qui doivent répondre à différents critères (âge, temps d'ischémie des organes, valeurs biologiques), ce qui rend leur disponibilité limitée (40).

Par ailleurs, après l'isolement, les îlots perdent leur vascularisation. Une fois les îlots infusés au niveau portal, leur revascularisation peut prendre plusieurs semaines (55), et durant ce laps de temps, ils peuvent manquer de nutriments et se retrouver en hypoxie (56). Les îlots isolés, en plus de leur absence de vascularisation, sont déconnectés de leur MEC. La vascularisation et la MEC étant essentielles à la fonction et la survie (57) des îlots, leur absence induit la perte de nombreux îlots.

Enfin, le foie est actuellement le site préférentiel de transplantation. Cette glande représente un environnement pro-inflammatoire et propice à une réaction inflammatoire et pro-coagulante précoce (*IBMIR : instant blood mediated inflammatory reaction*) aboutissant à la destruction de 50 à 70% des îlots (58–60). En plus de ce phénomène inflammatoire, les îlots peuvent également être la cible de la réponse immunitaire à l'origine de rejet (61). Afin d'éviter un phénomène de rejet aigu, une induction immunosuppressive est

réalisée, avec les risques qui peuvent en résulter comme l'hépatite aiguë (62). Puis, afin de prévenir un rejet plus tardif, une immunosuppression au long cours, est nécessaire avec également les risques pouvant s'y rapporter (lymphoprolifération (63), altération de la fonction rénale et infections (64)).

4. Les pistes de recherche en remplacement et régénération des cellules β

L'allo-transplantation d'îlots humains pancréatiques a montré des bénéfices cliniques chez les patients DT1. Malheureusement, le fait que ces îlots proviennent de donneurs décédés, induit une restriction quant à leur disponibilité.

Pour trouver des alternatives, il existe de nombreuses pistes de recherche dans les domaines cellulaire, génique et de l'ingénierie tissulaire. On peut distinguer des techniques portant sur le remplacement des cellules β par un apport exogène de ces cellules ou d'îlots et des techniques portant sur la régénération des cellules β .

4.1 Remplacement des cellules β

4.1.1 La xénotransplantation

Une source alternative aux îlots humains pourrait être l'utilisation d'îlots de provenance xénogénique tel que les îlots porcins. L'utilisation de ces îlots présente plusieurs difficultés. La réaction de type IBMIR est très présente avec les îlots porcins, et différentes pistes sont explorées afin de la réduire (65–67). Le risque de transmission de pathogène spécifique, tel que le PERV (*porcine endogenous retrovirus*) est très important, mais est en train d'être maîtrisé par des technologies géniques (siRNA = *small interfering RNA*) (68).

Le premier essai de transplantation xénogénique d'îlots a été conduit chez l'humain en 2005, il portait sur 12 patients associant des îlots néonataux de porcs associés à des cellules de Sertoli, cependant les données précliniques étaient insuffisantes (69). Il fallut attendre 2011 pour qu'un nouvel essai clinique en Nouvelle-Zélande soit mené chez 14 patients avec des îlots néonataux de porcs encapsulés. Cet essai rapporte une diminution des hypoglycémies chez ces patients et l'absence de transmission de pathogènes (70,71).

4.1.2 Utilisation de cellules souches

Comme source importante en thérapie cellulaire on peut trouver des cellules souches embryonnaires (ESC = *embryonic stem cells*) et des cellules souches pluripotentes induites (iPSC = *induce pluripotent stem cells*) qui sont définies par leurs pluripotences (capacité d'auto-renouvellement et de différenciation).

L'utilisation des ESC, bien qu'étant reconnue comme ayant le meilleur potentiel car pouvant se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme), continue de se questionner sur le plan éthique. Une alternative à l'utilisation des ESC pourrait provenir des iPSC. Les iPSC sont obtenues par reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes par une méthode virale ou non virale (72), permettant ainsi une thérapie personnalisée autologue. A ce jour, il existe de nombreux protocoles permettant la différenciation des cellules souches en cellules productrices d'insuline.

L'obtention *in vitro* de cellules matures productrices d'insuline reste actuellement controversée. Les protocoles *in vitro* aboutissent à l'obtention de 30

à 60% de cellules productrices d'insuline : la majorité des cellules restantes ne sont pas identifiées et peuvent être des cellules pro-génitrices non différenciées (73,74). Il existe encore plusieurs limites à l'utilisation de ces cellules souches :

- Le profil de sécurité : l'utilisation des rétrovirus afin d'obtenir les iPSC induit l'intégration de transgènes pouvant perturber le fonctionnement endogène de transcription. L'utilisation de c-Myc comme facteur de reprogrammation induit un risque de tumeur, risque de tératome en cas de transplantation de cellules non différenciées (75,76). De plus, les iPSC présentent une mémoire épigénétique de leur origine somatique pouvant affecter leur profil de sécurité (77)
- L'étiologie exacte du DT1 étant non identifiée, l'utilisation de cellules autologues (comme les iPSC) pourrait induire une récurrence immunitaire
- La présence de cellules polyhormonales : une fois qu'une cellule endocrine est à expression polyhormonale, elle ne peut plus se différencier en cellule β mature (78). Or, ces cellules à expression polyhormonale ne parviennent pas à avoir une sécrétion d'insuline régulée en réponse au glucose (79–81)
- Manque de rendement et d'efficacité des protocoles de différenciation
- La variation de l'efficacité et la sécurité des protocoles de différenciation selon les lignées de ESC (82) ou selon la provenance des iPSC (77,83)

Enfin, ces protocoles centrés sur l'obtention de cellules β matures, délaissent encore trop souvent l'importance des autres types cellulaires de l'îlot.

4.1.3 Favoriser la revascularisation des îlots et les protéger de la réponse immunitaire

L'isolement des îlots conduit à la perte de leur vascularisation, innervation et contact avec la MEC. Un enjeu majeur pour améliorer l'efficacité de la transplantation est de favoriser la restauration de ces paramètres, ce qui peut être facilité par différents types cellulaires via des techniques de co-culture ou d'obtention de pseudo-îlots :

- Les cellules endothéliales progénitrices peuvent favoriser la revascularisation (84)
- Les neurones cholinergiques peuvent favoriser la ré-innervation (85)
- Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC : *Mesenchymal stromal cell*) et les cellules amniotiques épithéliales (AEC : *Amniotic epithelial cell*) ont des propriétés anti-inflammatoires, immuno-modulatrices et pro-angiogéniques favorisant les contacts entre les îlots et la MEC (86,87)

Le recours à une immunosuppression prolongée est un frein majeur au maintien de la fonctionnalité des îlots transplantés. A cette fin, l'encapsulation a pour but d'empêcher l'accès des cellules et médiateurs immunitaires aux îlots transplantés et donc de diminuer le recours à une immunosuppression. Deux méthodes d'encapsulation doivent être distinguées : la micro-encapsulation et la macro-encapsulation.

- Micro-encapsulation

Cela consiste à enrober de manière individuelle les îlots dans une capsule biocompatible de composition variable : alginate, polyéthylène glucose, agarose, cellulose (88). L'enjeu majeur de cette technique repose sur la capacité de survie des îlots dans un milieu potentiellement hypoxique et en manque de nutriments. Les capsules ont donc été progressivement enrichies avec différents éléments en vue d'augmenter l'efficacité de cette technique :

- Les relargueurs d'oxygène (89–91)
- Les nanoparticules ou peptides pouvant relarguer différents facteurs de contrôles (92)
- Les cellules endothéliales progénitrices ou des MSC pouvant être incluses dans la composition de la capsule, ou dans la composition des îlots afin de promouvoir la vascularisation et l'immuno-modulation (93)

Pour exemple, le dispositif DiabeCell® correspond à une encapsulation d'îlots par triple couches, et ayant montré chez des patients diabétiques une diminution des épisodes hypoglycémiques et un bon contrôle glycémique au long cours (94).

- Macro-encapsulation

Les dispositifs de macro-encapsulation sont conçus pour procurer un microenvironnement favorable aux cellules. Contrairement à la technique précédente, l'ensemble des îlots devant être transplantés le sont au sein de la même capsule. Les dispositifs actuellement en essais cliniques chez l'humain regroupent différentes technologies décrites précédemment.

Le dispositif de la compagnie ViaCyte (San Diego, Californie, USA), PEC-Encap™ (ou VC-01™) en étude de phase I/II (NCT02239354 et NCT03163511) regroupe trois technologies : la différenciation d'ESC humaines en endoderme puis en progéniteurs pancréatiques (PEC-01) qui seront encapsulés dans un hydrogel, et enfin une macro-encapsulation dans le dispositif Encaptra™ (95).

Le dispositif de la compagnie Beta-O₂ Technologies, appelé *β-air bio-artificial pancreas* en essais de phase I/II (NCT02064309) regroupe trois technologies : l'utilisation d'îlots humains pancréatiques encapsulés dans deux types d'alginate, puis un macro-dispositif en Teflon recouvert d'alginate avec un réservoir sous-cutané approvisionnable en oxygène et permettant l'oxygénation du dispositif (95).

La société Sernova a développé le système Cell Pouche™ actuellement en essai de phase I/II (NCT03513939) qui regroupe 2 technologies : un dispositif à base de polymère et mimant la MEC afin de favoriser un espace de vascularisation dans lequel sera injecté la préparation cellulaire Sertolin™ (co-culture d'îlots humains pancréatiques et de cellules de Sertoli) (88).

4.2 Régénération des cellules β

La régénération des cellules β est soutenue par différents constats. En effet, durant la grossesse ou chez les personnes obèses et insulino-résistantes, une augmentation de la masse cellulaire β est observée (96,97). De plus, au cours de la vie, il existe une perte continue de cellules β ; hors la masse cellulaire β est maintenue stable durant de très nombreuses années (98,99). Très récemment il a été montré qu'il est possible de stimuler la réplication des cellules β en stimulant spécifiquement leur mitose (100).

La trans-différenciation cellulaire représente la modification d'un type cellulaire en un autre type cellulaire par exposition à différents facteurs sans passer par le stade de cellules pluripotentes contrairement aux iPSC. La trans-différenciation repose sur le principe de plasticité cellulaire. Au sein du pancréas, les cellules les plus appropriées pour être trans-différenciées en cellules β sont : les cellules ductales, les cellules centro-acineuses, les cellules α et les cellules δ (101). Cette piste, dont les premières preuves pratiques *in vivo* dans un modèle murin date de 2010 (102), est encore très récente.

Quelques soient les axes de recherche en thérapie cellulaire, génique et de l'ingénierie tissulaire, il ne faut pas perdre de vue que les îlots sont des structures complexes, soumis à de nombreuses interactions et pouvant être qualifiés de mini-organes.

5. Les îlots pancréatiques : microenvironnement, architecture et interactions cellulaires

Les niveaux sanguins des trois principales hormones des îlots (glucagon, insuline et somatostatine) oscillent en permanence (103–105). Cela permet chez l'humain de maintenir une glycémie autour de 5mM (106). En condition d'hyperglycémie une sécrétion d'insuline augmentée et une faible sécrétion de glucagon sont observées. Le métabolisme du glucose à l'intérieur des cellules β induit une augmentation de l'adénosine triphosphate (ATP), une dépolarisation cellulaire, une entrée de Ca^{2+} et une exocytose des granules d'insuline (107). En condition d'hypoglycémie, une faible sécrétion d'insuline et une sécrétion de glucagon augmentée sont observées. Les îlots présentent des caractéristiques

micro-environnementales et architecturales qui favorisent certaines interactions cellulaires spécifiques selon les espèces.

5.1 Le microenvironnement des îlots

Les îlots étant qualifiés de mini-organes, leur microenvironnement est riche et diversifié.

L'innervation des îlots va influencer la sécrétion hormonale et le flux sanguin (108–110). Les projections axonales suivent les vaisseaux sanguins avec une organisation qui diffère selon les espèces. Chez le rongeur : le système nerveux parasympathique innerve les cellules α et β , le système nerveux sympathique innerve les cellules α et le système nerveux autonome innerve les vaisseaux ; chez l'humain le système nerveux sympathique innerve les cellules musculaires lisses des vaisseaux et on retrouve peu d'innervation parasympathique à l'intérieur des îlots (111,112).

Alors que les îlots représentent 1 à 2% du pancréas, ils reçoivent 6 à 20% de son flux sanguin (113). Chaque îlot est vascularisé par une ou plusieurs artérioles (figure 3) permettant ainsi un contrôle optimal de la glycémie (114). Les cellules endothéliales ont un rôle important pour le fonctionnement des cellules β (115). En effet, en cas de diminution du VEGF-A qu'elles secrètent, on observe une diminution de la vascularisation, de l'innervation, une altération de la sécrétion d'insuline et une diminution de la sensibilité des cellules au glucose (116,117). Les cellules endothéliales ont également un rôle de support pour les cellules β en sécrétant différents composants de la MEC (laminine, collagène).

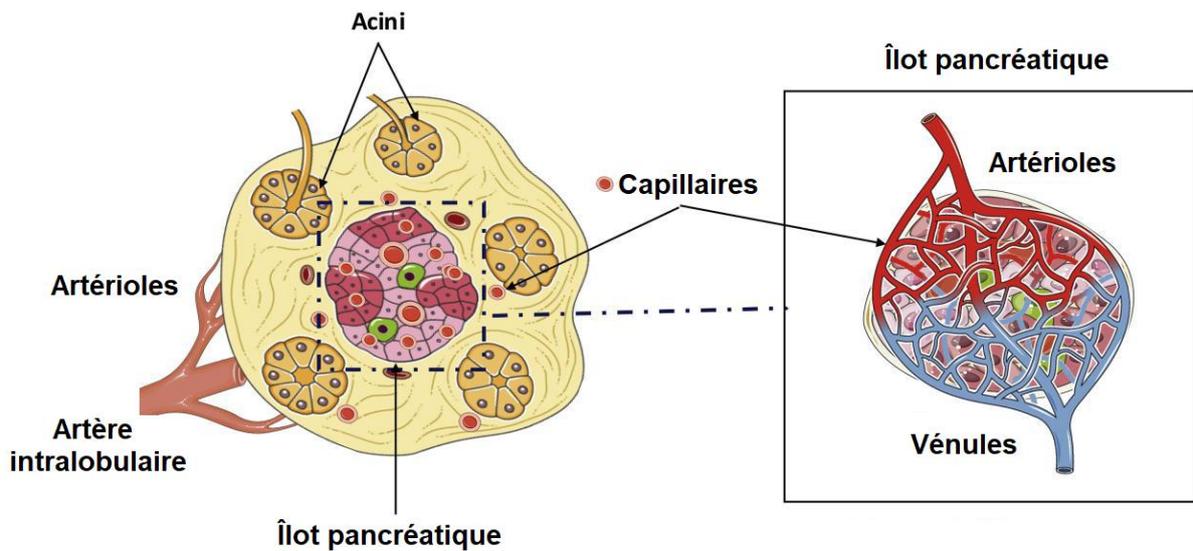


Figure 3. Vascularisation des îlots pancréatiques

Dans les îlots, la MEC est essentiellement présente entre les cellules endothéliales et les cellules endocrines, formant une (chez le rongeur) ou deux (chez l'humain) membranes basales. La destruction de la MEC lors de l'isolement d'îlots participe à leur faible survie *in vitro* ou même après transplantation (118). De par sa composition (laminine, fibronectine et facteurs de croissances), la MEC participe à l'homéostasie glucidique en permettant le développement du pancréas et en participant au fonctionnement régulé des cellules β (113,119).

5.2 Cytoarchitecture et composition cellulaire des îlots

Les principales cellules composant les îlots (α , β et δ) sont organisées de manières spécifiques et espèces dépendantes. Dans les îlots de rongeur, on observe un corps de cellules β et un manteau de cellules non β (principalement α et δ) comme présenté sur la figure 4A. Alors que chez l'humain, les cellules sont davantage mixées (figure 4B) (120,121).

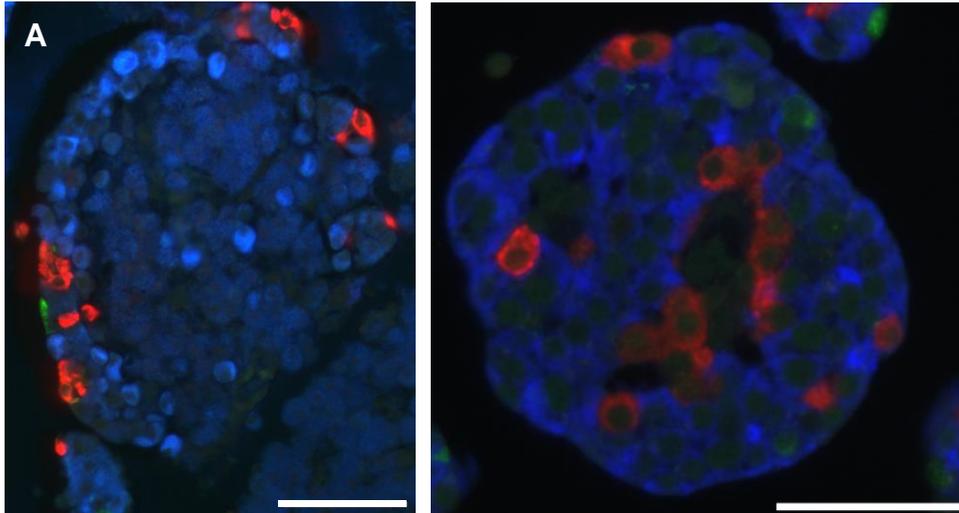


Figure 4. Photo en microscopie à fluorescence d'îlots isolés de rat et humain
A : Îlot natif de rat, cellules à insuline en bleu, cellules à glucagon en rouge, cellules à somatostatine en vert ; B : Îlot natif humain, cellules à insuline en bleu, cellules à glucagon en rouge, cellules à somatostatine en vert ; la barre représente 50 μ m

En plus de cette architecture spécifique, on retrouve également une différence de composition cellulaire entre le rongeur et l'humain :

- Les cellules β : 70-80% chez le rongeur, 50-60% chez l'humain (122)
- Les cellules α : 20% chez le rongeur, 30-40% chez l'humain (123,124)
- Les cellules δ : 6% chez le rongeur, < 10% chez l'humain (125,126)

Cette différence d'architecture et de composition cellulaire aboutit à deux constats :

- Chez le rongeur, les contacts homotypiques β - β sont favorisés
- Chez l'humain, les contacts hétérotypiques β -non β sont favorisés, avec 70% des cellules β ayant un contact hétérotypique contre 28% chez le rongeur (126,127)

Cela se traduit par une probabilité d'effets paracrines ou juxtacrines (voir ci-dessous) entre les cellules α et β plus importante chez l'humain que chez le rongeur.

5.3 Les interactions cellulaires entre les cellules insulaires

5.3.1 Les différents types d'interactions

La juxtacrinie est définie par une interaction directe entre deux cellules impliquant des molécules membranaires (128).

La paracrinie est définie au niveau de l'îlot par la sécrétion par une cellule insulaire d'un médiateur soluble agissant sur une autre cellule du même îlot via l'espace interstitiel. Plusieurs molécules sont rapidement dégradées dans l'espace interstitiel (129–131), ce qui permet de restreindre localement la régulation paracrine. Donc pour qu'un signal paracrine existe, il nécessite une proximité entre la source et la cible.

L'autocrinie est définie par la sécrétion d'un médiateur agissant sur la même cellule (ou une cellule du même type) via un récepteur spécifique (131).

D'autres types d'interactions existent au sein des îlots : l'endocrinie, via des médiateurs sécrétés dans la circulation sanguine, et les signaux synaptiques véhiculés par les neurones.

5.3.2 Les interactions β - β

Les cellules β sont couplées par des jonctions communicantes appelées GAP (132–135). Ces jonctions permettent l'échange de Ca^{2+} et la synchronisation des cellules β . La perte de ces jonctions perturbe la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (135,136). Les cellules β sécrètent de l'ATP qui peut agir comme médiateur autocrine et stimuler la sécrétion d'insuline (137,138). Il en est de même pour l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui est sécrété par la cellule β et qui va stimuler la sécrétion d'insuline via le récepteur GABA-A exprimé sur les cellules β humaines (139). L'insuline elle-même pourrait

affecter de manière autocrine la sécrétion d'insuline par les cellules β , des récepteurs à l'insuline étant en effet présents à la surface de ces cellules (140,141).

Par ailleurs, il a été montré chez le rongeur, au niveau de cellules isolées, que le contact d'une cellule β avec une autre cellule β potentialise la sécrétion d'insuline par rapport à une cellule β seule (142). Cet effet est moins évident chez l'humain (143).

5.3.3 Les interactions α - β

Les cellules β secrètent différents médiateurs qui inhibent la sécrétion de glucagon par les cellules α : l'insuline, le zinc, l'ATP et le GABA (144–149). Le GABA synthétisé via la GAD, exprimée par les cellules β , permet d'inhiber les cellules α en condition hyperglycémique (122). A noter que le zinc, présent au niveau des granules de la cellule β , a montré un effet inhibiteur sur les cellules α uniquement chez le rongeur (150,151).

Les cellules α secrètent différents médiateurs qui eux stimulent la sécrétion d'insuline par les cellules β : le glucagon (152,153), le GLP1 (154), l'acétylcholine (Ach) (155), le glutamate (156,157) et la *corticotropin releasing hormone* (CRH) (158). La potentialisation de la sécrétion d'insuline par les cellules α ne survient que lorsque les cellules β sont dépolarisées, donc en cas d'hyperglycémie (comme en condition postprandiale) (159). Le glucagon stimule la sécrétion d'insuline principalement via le récepteur du GLP1 exprimé sur les cellules β , alors qu'il stimule la néoglucogénèse au niveau du foie via le récepteur au glucagon (160,161). A noter que la CRH n'est retrouvée que chez les cellules α humaines et stimule la sécrétion d'insuline via le CRH-R1 présent sur les cellules

β (162). L'Ach permet essentiellement de sensibiliser les cellules β à l'action du glucose (163). Chez le rongeur la source majeure d'Ach provient de l'innervation parasympathique, alors que chez l'humain elle provient des cellules α (111,164,165).

Le glutamate co-sécrété avec le glucagon va agir par boucle autocrine positive sur la sécrétion de glucagon à bas glucose, par son action sur son récepteur ionotrope exprimé par les cellules α (166–168). Son action permet de contrebalancer les effets inhibiteurs des autres médiateurs sur la cellule α .

Au niveau de cellules isolées, il a été montré chez l'humain que le contact α - β potentialise la sécrétion d'insuline par rapport à une cellule β seule (143). Ce type d'expérience n'a pas été reproduit chez le rongeur.

L'action paracrine du glucagon sur la sécrétion d'insuline se questionne chez le rongeur. En effet, en présence d'anticorps anti-glucagon, aucune différence sur la sécrétion d'insuline n'est observée (169,170). De plus en cas de destruction de plus de 97% des cellules α du rongeur il n'y a pas de perturbation de l'homéostasie glucidique (171). Davantage d'exploration *in vitro* et *in vivo* sur la présence des cellules α dans les îlots et leur action sur la sécrétion d'insuline sont requises.

L'altération du dialogue α - β a été largement explorée. En effet, dans le cas du DT1 les cellules β sont majoritairement détruites et les sécrétions de la somatostatine et du glucagon sont altérées (172–174). Il n'y a pas d'augmentation de la sécrétion du glucagon en réponse à l'hypoglycémie (175), mais au contraire on observe une hyperglucagonémie en cas de jeûne ou en période post prandiale (176,177). Ce modèle d'îlots sans cellules β a pu être reproduit *in vitro*. On observe alors une augmentation de la sécrétion du glucagon

en cas d'augmentation du niveau de glucose (174). Les cellules α seules ne sont donc pas capables de moduler leur sécrétion de glucagon en réponse à une variation glycémique. De plus, au niveau de pseudo-îlots les cellules humaines α seules ne sont pas capables d'avoir une sécrétion du glucagon adaptée en réponse au glucose. Cette réponse n'est pas corrigée par l'ajout exogène d'insuline (178), elle est corrigée uniquement en présence de cellules β directement en contact avec les cellules α . Ces expériences suggèrent donc une importance des contacts directs entre les cellules α et β humaines afin d'avoir une sécrétion régulée du glucagon, mais également de l'insuline. Enfin, les cellules humaines α ont montré un effet potentialisateur sur la sécrétion d'insuline des cellules β (178), non exploré chez le rongeur.

5.3.4 Les interactions δ - β et δ - α

Les cellules δ productrices de somatostatine ont un effet inhibiteur sur les cellules α via le récepteur de la somatostatine de type 2 (SSTR 2) et sur les cellules β via les SSTR 1 et 5. Les cellules δ affectent donc l'homéostasie glucidique de manière indirecte (179,180). L'action de la somatostatine sécrétée par les cellules δ est localisée au niveau des îlots. En effet, en cas de pancréatectomie, il n'y a pas de réduction significative du taux de somatostatine circulant (181).

Concernant la communication δ - β : la coordination de la sécrétion d'insuline et de somatostatine passe par des jonctions GAP (182). De plus, l'urocortine 3, produite par la cellule β , va stimuler les cellules δ via le CRH-R2 qu'elles expriment spécifiquement (179,183). Les cellules δ sont également stimulées par

l'insuline et l'ATP sécrétées par la cellule β (184,185). Ces rétrocontrôles permettent d'éviter les hypoglycémies.

Concernant la communication δ - α : la faible sécrétion de glucagon en hyperglycémie, car inhibée par la somatostatine, permet une sécrétion adaptée de l'insuline en réponse au glucose (160,161,186). De plus, les cellules α stimulent les cellules δ via l'Ach, ce rétrocontrôle permet d'éviter les phénomènes d'hyperglycémies (164).

Par ailleurs, dans le développement du diabète, on observe une altération de la régulation paracrine des cellules β par la somatostatine (187,188). Récemment il a été montré que l'absence de cellules δ chez le rongeur induit un décès néonatal ou des hypoglycémies sévères par dérégulation de la synthèse et de la libération d'insuline (180). La somatostatine seule (sans la présence de cellules δ) a montré *in vitro*, à partir d'îlots de souris, un sur-effet inhibiteur sur la sécrétion de glucagon et d'insuline (189). Cela supporte l'hypothèse d'une inhibition tonique de la somatostatine sur les cellules α et β ; en absence de cellules δ , les sécrétions d'insuline et du glucagon sont donc anormalement élevées.

Quoiqu'il en soit c'est une coopération tripartite des cellules insulaires α , β et δ qui aboutit à l'homéostasie glucidique comme illustré sur la figure 5 (158). Les interactions cellulaires au sein des îlots et leurs impacts sur les sécrétions hormonales du glucagon et de l'insuline doivent encore être approfondies, que ce soit au niveau insulaire ou cellulaire. Des travaux futurs devront permettre d'approfondir la compréhension des interactions de cellules primaires de rat et leurs effets sur la sécrétion hormonale. Notamment, l'impact de ces interactions pourrait être évalué sur des pseudo-îlots, mais également sur des cellules isolées.

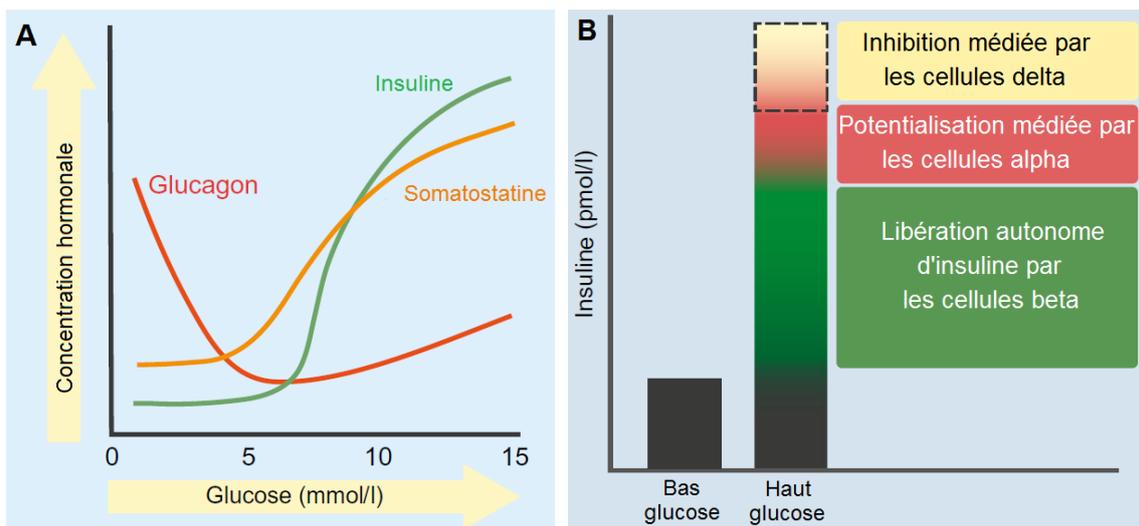


Figure 5. Collaboration tripartite des cellules α , β et δ

Partie 2 : L'article

Introduction

Les cellules α , β et δ sont des cellules excitables, étant dépolarisées par l'action du glucose et d'autres nutriments (190–192). Le dialogue tripartite entre les cellules insulaires (figure 1) permet le maintien de l'homéostasie glucidique.

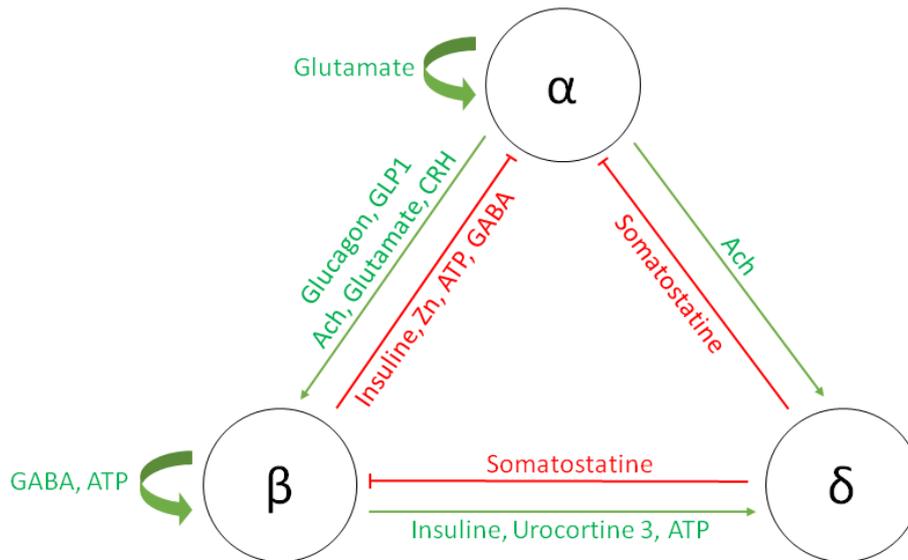


Figure 1. Résumé des interactions entre les cellules endocrines du pancréas
Ach : Acétylcholine, *ATP* : Adénosine triphosphate, *GABA* : Acide gammaaminobutyrique, *GLP1* : Glucagon like peptide 1 ; En vert : stimulation, en rouge : inhibition, les cellules α sont inhibées par les cellules β et δ mais les stimulent également, les cellules δ inhibent les cellules β et α

Ces interactions, complexes et nombreuses au niveau des îlots, ne sont pas retrouvées de manière homogène entre le rongeur et l'humain. Cela peut s'expliquer par la cytoarchitecture particulière des îlots chez le rongeur (un corps de cellules β et un manteau de cellules non β) non retrouvée chez l'humain. A noter également que les fréquences relatives des cellules insulaires diffèrent entre rongeurs et humains (20% de cellules α chez le rongeur contre 30-40% chez l'humain). Ces différents éléments font que les contacts homotypiques β - β

sont majoritaires chez le rongeur, alors que ce sont les contacts hétérotypiques β -non β qui sont majoritaires chez l'humain (122–127).

Il a été montré qu'après dissociation des îlots pancréatiques en cellules insulaires, celles-ci sont capables de se réagréger de manière spontanée en structure appelée pseudo-îlot (193). L'importance des contacts directs β - α pour obtenir une sécrétion régulée d'insuline et de glucagon est démontrée chez l'humain au niveau des pseudo-îlots (178). Nous avons souhaité pouvoir reproduire ces expériences avec différents types de pseudo-îlots obtenus à partir de cellules primaires de rat.

L'effet potentialisateur des cellules α sur la sécrétion d'insuline a été démontré chez l'humain au niveau de cellules isolées (143). Nous avons souhaité pouvoir reproduire ces expériences avec des cellules primaires de rat.

Matériel et méthode

Les animaux

Les rats mâles Sprague Dawley (RjHan:SD, 300-500g) sont commandés chez Janvier Labs (Le Genest St-Isle, France) puis sont hébergés à l'animalerie du Centre Médical Universitaire de Genève avec un accès libre en nourriture et en eau. Les protocoles d'expérimentation animale sont approuvés par le Comité étiq ue de la Direction Générale de la Santé du canton de Genève.

Isolement des îlots pancréatiques de rat

Les pancréas sont prélevés par chirurgie abdominale après injection d'une solution de 7mg/10ml de Collagénase V (Sigma-Aldrich, Buchs, Suisse) dans le canal pancréatique. Les pancréas réséqués sont digérés 10min à 37°C.

Les îlots sont purifiés par un triple gradient discontinu de Ficoll® PM400 (Sigma-Aldrich) selon la méthode précédemment décrite (194) (Annexe 1).

Dissociation des îlots pancréatiques et méthodes de tri cellulaire

Après purification, les îlots sont rincés deux fois avec du *Phosphate buffer saline* (PBS) sans calcium et sans magnésium. Puis ils sont re-suspendus dans 1mL de PBS + 650µL de trypsine-EDTA (Acide éthylènediaminetétraacétique) 0,25% (Gibco, Reinach, Switzerland), et incubés à 37°C en re-suspendant les îlots toutes les 45s. Après 4min, les îlots sont considérés comme complètement dissociés en cellules, et l'action de la trypsine est stoppée par ajout d'un tampon *Krebs-Ringer bicarbonate buffer* (KRB) (125mM NaCl, 4,74mM KCl, 1mM CaCl₂, 1,2mM KH₂PO₄, 1,2mM MgSO₄, 5mM NaHCO₃, 25mM HEPES, pH 7,4) supplémenté par 0,1% de *bovin serum albumin* (BSA) (p/v).

Après dissociation, les cellules en KRB sont triées par FACS sur l'appareil S3e™ Cell sorter (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis). Une première sélection des cellules est faite sur leurs propriétés de diffusion de la lumière à partir d'un laser émettant à 488nm. La diffusion de la lumière est mesurée par deux détecteurs optiques. Un détecteur mesure la dispersion le long du trajet du laser. Ce paramètre est appelé diffusion directe (*Forward Scatter*, FSC). L'autre détecteur mesure la dispersion à un angle de 90 degrés par rapport au laser. Ce paramètre est appelé diffusion latérale (*Side Scatter*, SSC). Puis la distinction entre cellules β et non β est faite sur une différence d'auto-fluorescence pour une émission entre 515 et 545nm suite à une excitation par le laser de 488nm (195). Afin de purifier les cellules α , parmi les cellules non β (les cellules les moins auto fluorescentes), une seconde sélection est faite basée sur leur diffusion en SSC, les cellules α étant les cellules les plus fortes en SSC (granulosité plus importante). Deux types de tri ont donc été réalisés : β et non β , ou β et α .

Test de sécrétion en réponse au glucose réalisé par incubation statique

Après tri, deux populations de cellules sont récupérées : β et non β ou, β et α . Les cellules sont lavées et centrifugées à trois reprises avant d'être recomptées. Puis, les cellules sont placées dans des plaques à micro-puits (256 puits) d'agarose (Annexe 2A) pour permettre la formation des pseudo-îlots, selon les combinaisons de cellules suivantes (figure 2) :

- 1 plaque avec 51 200 cellules β (environ 200 cellules par micro-puits)
- 1 plaque avec 25 600 cellules non β ou α (environ 100 cellules par micro-puits)

- 1 plaque avec 51 200 cellules β et 25 600 cellules non β ou α , soit 33% de cellules non β ou α (environ 300 cellules par micro-puits)
- 1 plaque avec 51 200 cellules β et 12 800 cellules non β , soit 20% de cellules non β (condition non réalisée avec le tri β/α)
- 1 pétri avec 1 plaque de 51 200 cellules β + 1 plaque de 25 600 cellules non β qui ont partag e le même milieu de culture (condition non réalisée avec le tri β/α)

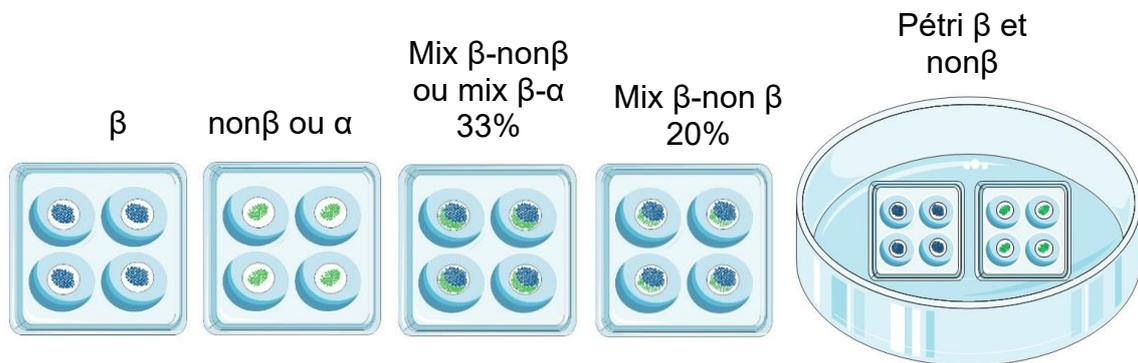


Figure 2. Formation des pseudo-îlots

De gauche à droite on observe : 4 plaques d'agarose permettant la formation de pseudo-îlots β , non β ou α , mix β -non β ou β - α 33% et mix β -non β 20% puis 1 pétris qui contient deux plaques d'agarose : 1 avec des 51 200 cellules β pour la formation de pseudo-îlots β + 1 avec 25 600 cellules non β pour la formation de pseudo-îlots non β

Ces cellules sont maintenues en culture durant 5 jours avec un changement du milieu de culture à 48h de l'isolement. La culture est faite à 37 C, 5% CO₂, dans 4mL de DMEM (ThermoFisher Scientific, Reinach, Switzerland) suppl ement e avec 10% (v/v) de sérum de veau foétale (FBS; Merk Millipore, Zug, Suisse), 1mM sodium pyruvate, 11,2mM glucose, 2mM L-glutamine, 100U/mL pénicilline et 0,1mg/mL streptomycine. Ces conditions de culture vont permettre la r eagr egation des cellules en pseudo-îlots. Les pseudo-îlots form es après 5 jours sont r ecup er es par centrifugation et plac es une nuit dans des inserts avec pores de 12 m (Millicell, Darmstadt, Germany), selon les objectifs et conditions suivants

(une condition est répartie dans trois inserts afin de réaliser des triplicatas de mesure pour chaque expérience) :

- Etudier l'impact des contacts cellulaires directs avec différents pseudo-îlots : β , non β ou α , mix β -non β (33% de cellules non β) ou mix β - α , et mix β -non β (20% de cellules non β)
- Etudier l'impact des interactions indirectes entre β et non β : pseudo-îlots β + pseudo-îlots non β partageant le même milieu de culture durant 5 jours en pétri, puis regroupés lors de la mise en insert pour le test de sécrétion (pseudo-îlots β + non β)

Le test de sécrétion en réponse au glucose réalisé par incubation statique (Annexe 2B) est fait à J+6, en DMEM + 0,1% BSA (p/v) selon le protocole suivant : lavage en 2,8mM glucose, pré-incubation 1h à 37°C en 2,8mM glucose, incubation 1h à 37°C en 2,8mM glucose (condition basale) et incubation 1h à 37°C en 16,7mM de glucose (condition stimulée). Les hormones contenues dans les cellules sont extraites par incubation 1h à température ambiante en solution d'acide éthanol (375mL éthanol absolu + 7,5mL HCl 12,7M + 117,5mL eau distillée). La mesure de ce contenu en hormones permet de normaliser les résultats de sécrétion par le contenu total en hormones. Les surnageants d'incubation sont récupérés et congelés pour réaliser les analyses ultérieurement.

Les dosages hormonaux sont faits sur les surnageants d'incubation des conditions basales, stimulées et des extraits en acide-éthanol. Les dosages sont faits par *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (MercoDIA, Uppsala, Sweden). Pour chaque hormone, les résultats sont exprimés en pourcentage d'hormone sécrétée par rapport au total (contenue et sécrétée).

Liste des anticorps utilisés

Les anticorps utilisés sont regroupés dans le tableau 1 avec comme indicatif pour chaque technique : s'il s'agit d'un anticorps primaire ou secondaire, l'espèce hôte chez qui a été fait l'anticorps, l'espèce cible chez qui l'anticorps va pouvoir agir, le fournisseur et la dilution.

Exp	Type d'Ac (1re ou 2dre)	Ac 1re Protéine ciblée Ac 2dre Fluorochrome	Espèce hôte	Espèce cible	Fournisseurs	Dilution	
RHPA	Ac 1re	Anti-insuline	Cobaye	Rat	Fabrication(196)	1/300	
RHPA IF	Ac 1re	Anti-insuline	Cobaye	Rat	Ventrex*	1/300	
	Ac 2dre	FITC (vert)	Chèvre	Cobaye	Jackson	1/400	
	Ac 1re	Anti-glucagon	Souris	Rat	Sigma-Aldrich	1/4000	
	Ac 2dre	TRITC (rouge)	Âne	Souris	Jackson	1/200	
Morphologie des pseudo-flots	Ac 1re	Anti-insuline	Cobaye	Rat	Fabrication	1/300	
	Ac 2dre	Coumarin (bleu)	Ane	Cobaye	Jackson	1/250	
	Ac 1re	Anti-glucagon	Souris	Rat	Sigma-Aldrich	1/4000	
	Ac 2dre	FITC (vert)	Ane	Souris	Jackson	1/500	
	Ac 1re	Anti-somatostatine	Lapin	Rat	Dako	1/100	
	Ac 2dre	TRITC (rouge)	Ane	Lapin	Jackson	1/750	
Pureté du FACS	Lame non β ou α	Ac 1re	Anti-insuline	Cobaye	Rat	Fabrication	1/300
		Ac 2dre	Coumarin (bleu)	Ane	Cobaye	Jackson	1/250
		Ac 1re	Anti-glucagon	Souris	Rat	Sigma-Aldrich	1/4000
		Ac 2dre	FITC (vert)	Ane	Souris	Jackson	1/500
		Ac 1re	Anti-somatostatine	Lapin	Rat	Dako	1/100
		Ac 2dre	TRITC (rouge)	Ane	Lapin	Jackson	1/750
	Lame β	Ac 1re	Anti-insuline	Cobaye	Rat	Fabrication	1/300
		Ac 2dre	FITC (vert)	Ane	Cobaye	Jackson	1/500
		Ac 1re	Anti-glucagon	Souris	Rat	Sigma-Aldrich	1/4000
		Ac 2dre	Coumarine (bleu)	Ane	Souris	Jackson	1/200
		Ac 1re	Anti-somatostatine	Lapin	Rat	Dako	1/100
		Ac 2dre	TRITC (rouge)	Ane	Lapin	Jackson	1/750

Tableau 1. Liste des anticorps utilisés durant les expériences

Ac : Anticorps ; CRH-R2 : Corticotropin Releasing Hormone Receptor 2, Exp : Expérience ; FACS : Fluorescence-activated cell sorting ; FITC : Fluorescein isothiocyanate ; IF : Immunofluorescence ; RHPA : « revers hemolytic plaque assay », TRITC : Tetramethyl rhodamine isothiocyanate ; * le laboratoire n'existe plus

Préparation des chambres de Cunningham

Tout d'abord les lames de microscopie sont traitées avec 0,1mg/mL de poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) afin de faciliter l'adhésion des cellules. Ensuite les lames sont recouvertes d'une lamelle afin d'obtenir des chambres d'un volume de 60 à 70 μ L (Annexe 3) (142,143,197,198).

Préparation des globules rouges pour le RHPA

Les globules rouges de mouton (ThermoScientific) sont incubés 1h à 30°C, en agitant toutes les 15min, dans un mélange de 0,1mg/mL chlorure de chrome (Sigma-Aldrich) et de 0,5mg/mL protéine A (Sigma-Aldrich) (142,143,197,199).

Quantification de la sécrétion d'insuline par RHPA

Les cellules dissociées par trypsine sont mises 24h en DMEM (supplémenté comme précédemment) en condition non adhérente. Elles sont ensuite re-suspendues dans un tampon KRB + 0,1% de BSA (p/v), puis mélangées avec 5% (v/v) de la préparation de globules rouges traités à la protéine A. Le mélange de globules rouges et de cellules est introduit dans les chambres de Cunningham et incubé 1h à 37°C afin de permettre l'attachement des cellules. Puis, les lames sont rincées avec une solution de KRB (2,8 ou 16,7mM glucose) et la sécrétion d'insuline est stimulée pendant 1h à 37°C par différentes conditions en présence d'anticorps anti-insuline (196). Les conditions suivantes sont testées en 2,8 et 16,7mM glucose : contrôle, 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 0,5mM (Sigma-Aldrich) un stimulateur de la protéine kinase A (PKA), ou glucagon 1nM ou 10nM (Sigma-Aldrich), soit huit lames par expérience (Annexe 4). Ensuite, les lames

sont rincées avec une solution de KRB 2,8mM glucose, puis les plaques de sécrétion sont révélées par incubation 1h à 37°C des lames en présence d'une solution de KRB 2,8mM glucose + complément (1:40, Dabe Behring, Deerfield, Illinois). Enfin les lames sont rincées avec une solution de KRB 2,8mM glucose, puis incubées 5min à température ambiante dans une solution de bleu Trypan 0,04% (p/v), rincées et fixées au liquide de Bouin (Sigma-Aldrich), puis sont conservées en PBS + azide 0,1% (p/v) à 4°C en vue d'une immunofluorescence (IF) à distance.

IF et analyse des lames de RHPA

Les lames sont rincées en PBS, puis une perméabilisation des membranes est réalisée par une succession de bains d'alcool (30% → 50% → 70% → 90% → 70% → 50% → 30%), ce traitement est également nécessaire pour éliminer correctement le fixateur (liquide de Bouin) des lames. Les lames sont ensuite incubées 15min en PBS + 0,1% BSA (p/v) afin de bloquer les sites aspécifiques de fixation des anticorps. Puis les lames sont incubées 2h, à température ambiante avec les anticorps primaires : anti-insuline et anti-glucagon (tableau 1). Les lames sont ensuite rincées en PBS et incubées 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière avec les anticorps secondaires marqués : FITC (vert) pour l'insuline et TRITC (rouge) pour le glucagon (tableau 1). Enfin, les lames sont rincées en PBS et montées dans un milieu contenant du 4',6-Diamidino-2-phénylindole (DAPI) (fluorescence en bleu pour les noyaux) puis analysées par microscopie à fluorescence et contraste de phase au grossissement 400 (objectif 40 et oculaire 10). Pour chaque lame, les cellules étudiées sont celles positives en IF : cellules β positives (vertes) et

cellules α positives (rouges). Les cellules mortes positives à la coloration bleu Trypan sont exclues de l'analyse, de même que les groupes de plus de deux cellules. Pour chaque cellule ou doublets de cellules, il est pris en compte l'existence ou non d'une plaque de lyse. La plaque de lyse est définie comme étant une surface circulaire centrée sur une cellule ou un doublet de cellule contenant les globules rouges lysés par l'action du complément et visibles en contraste de phase. Enfin, le diamètre de la plaque de lyse, permettant d'extrapoler la surface, est mesuré grâce à une réglette micrométrique présente dans l'oculaire du microscope.

Pour chaque condition, différents paramètres sont évalués :

- Le pourcentage de cellules formant une plaque de lyse
- La taille moyenne des plaques de lyse
- La taille totale des plaques de lyse autour de 100 cellules (*Total plaque development TPD*), ce qui correspond au produit de la taille moyenne des plaques de lyse et le pourcentage de cellules formant une plaque de lyse

Au total sur les 4 expériences, 16 949 cellules β seules, 3 736 doublets β - β et 1 667 doublets α - β ont été analysées.

Immunofluorescence

Afin de s'assurer de la pureté des populations de cellules triées par FACS un prélèvement de chaque type de population a été réalisé. Ces cellules sont introduites dans une chambre de Cunningham traitée par poly-L-lysine et incubées 1h à 37°C afin de permettre leur attachement (198). Puis les cellules sont fixées au formol 10% (v/v) durant 20min et conservée en PBS + azide 0,1% (p/v) à 4°C en vue d'une IF ultérieure. L'IF est réalisée à distance après perméabilisation des cellules par incubation des lames 15min dans une solution de Tryton X100 (AppliChem, Darmstadt, Allemagne) 0,5% (v/v). L'IF est réalisée selon la méthodologie précédemment décrite et les anticorps utilisés sont listés dans le tableau 1. Pour le tri β -non β un échantillon de 678 cellules (total de 3 expériences) de la population β a été analysé et un échantillon de 486 cellules (total de 3 expériences) de la population non β a été analysé. Pour le tri β - α un échantillon de 886 cellules (total de 3 expériences) de la population α a été analysé.

Afin d'étudier la morphologie des pseudo-îlots β , non β et mix β -non β formés par la technique précédemment décrite, des pseudo-îlots de chaque type sont récupérés après 5 jours de culture. Les pseudo-îlots sont fixés 1h en formol 10% (v/v) puis mis en Histogel (Termo Scientific). Les pseudo-îlots sont ensuite déshydratés par des bains d'alcool puis enrobés en paraffine ; enfin les coupes histologiques sont réalisées à l'aide d'un microtome. Après avoir déparaffiné les coupes, une IF est réalisée avec les anticorps listés dans le tableau 1 selon la méthodologie précédemment décrite. Les photos sont prises en microscopie à fluorescence.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en valeur moyenne +/- SEM (écart type de la moyenne = écart type estimé de l'échantillon / $\sqrt{\text{taille de l'échantillon}}$). L'ensemble des tests statistiques sont réalisés par le logiciel Prism 7.02. Les tests réalisés sont : l'analyse de variance à 2 facteurs (two-way ANOVA) suivi d'un test des étendus de Tukey ou t-test. Une valeur est considérée comme significative si $p < 0,05$.

Résultats

Les cellules insulaires de rat β et non β triées par FACS forment des pseudo-îlots d'architecture comparable à des îlots natifs

La population β triée par FACS a été analysée par IF pour la présence de cellules positives à l'insuline. Une contamination par les cellules non β inférieure à 0,1% a été observée. Parmi la population non β , seulement 4,5% des cellules ont été positives pour l'insuline (cellules β) alors que 43,4% des cellules ont été positives pour le glucagon (cellules α). Le tri par FACS a donc été considéré comme très satisfaisant sur la purification des cellules β . Concernant les cellules non β , le tri a permis un net appauvrissement en cellules β et un enrichissement en cellules α .

Sont illustrés sur les figures 3A et 3B un exemple de pseudo-îlots β composés uniquement de cellules β et un exemple de pseudo-îlots non β contenant quelques cellules β . Sur la figure 3C, des pseudo-îlots mix β -non β sont illustrés. Leur architecture a été comparable à celle des îlots natifs de rat précédemment décrite, à savoir un corps de cellules β entouré d'un manteau de cellules non β .

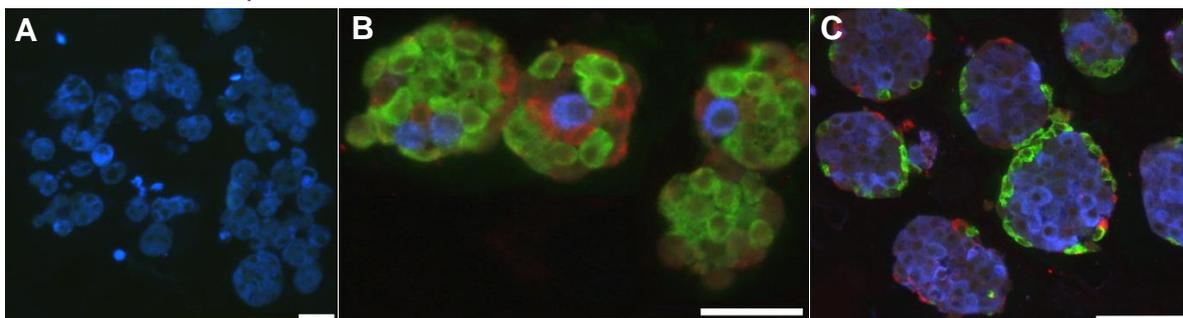


Figure 3. Photos en microscopie à fluorescence des pseudo-îlots β / non β et mix β -non β

A : Pseudo-îlots de cellules β obtenues après tri des cellules par FACS, insuline en bleu ; B : Pseudo-îlots de cellules non β obtenues après tri des cellules par FACS, insuline en bleu, glucagon en vert, somatostatine en rouge ; C : Pseudo-îlots mix de cellules β et non β obtenues après tri des cellules par FACS, insuline en bleu, glucagon en vert, somatostatine en rouge ; les pseudo-îlots sont obtenus après 5 jours de culture ; les barres représentent 50 μ m

La sécrétion d'insuline est affectée par les contacts cellulaires directs β -non β

Comme illustré sur la figure 4, il n'y a pas eu de différence de sécrétion d'insuline, en condition basale (2,8mM glucose) entre les différents types de pseudo-îlots. En condition stimulée (16,7mM glucose), la sécrétion d'insuline des pseudo-îlots mix β -non β 33% (11,9% +/- 2,0) a été significativement inférieure à celle des pseudo-îlots β (19,1% +/- 1,7 ; $p = 0,0003$) et des pseudo-îlots $\beta + non\beta$ regroupés après culture en pétri (16,1 +/- 2,2 ; $p = 0,04$). En revanche, la sécrétion d'insuline en condition stimulée n'a pas été différente entre les pseudo-îlots β et les pseudo-îlots $\beta + non\beta$ regroupé après culture en pétri.

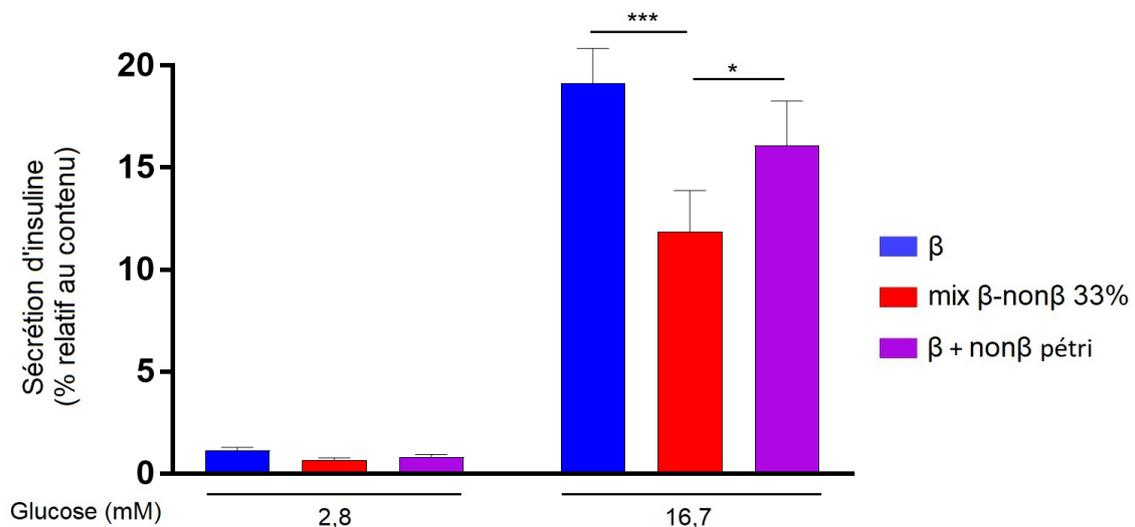


Figure 4. Résultats du test de sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par le glucose pour les pseudo-îlots du tri $\beta / non\beta$

Les colonnes représentent la moyenne des sécrétions d'insuline normalisées par rapport au contenu total +/- SEM, $n = 6$, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Afin de se rapprocher des proportions cellulaires retrouvées chez le rat, la quantité de cellules non β a été modifiée sur trois expériences avec une nouvelle proportion 20%, soit un mix de 51 200 cellules β et 12 800 cellules non β . Les résultats sont présentés dans la figure 5. Il n'y a pas eu de différence de sécrétion d'insuline en condition basale entre les différents pseudo-îlots. En condition stimulée, la sécrétion d'insuline des pseudo-îlots β (20,9 +/- 2,8) a été significativement supérieure à celle des pseudo-îlots mix β -non β 33% (13,8 +/- 2,3 ; $p = 0,004$) et des pseudo-îlots mix β -non β 20% (17,1 +/- 1,6 ; $p = 0,03$).

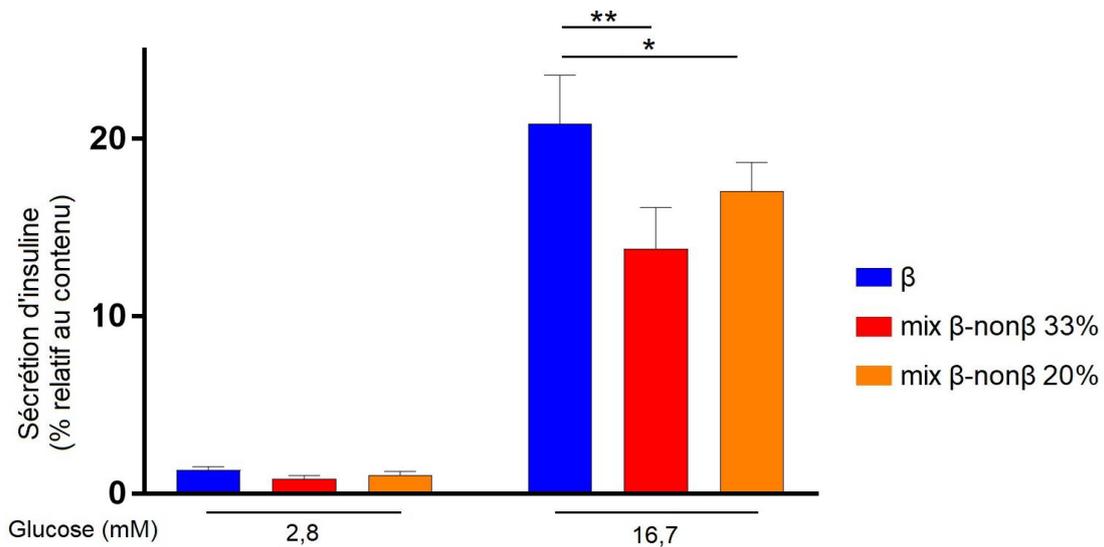


Figure 5. Résultats du test de sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par le glucose en modifiant la proportion des cellules non β des pseudo-îlots du tri β / non β
 Les colonnes représentent la moyenne des sécrétions d'insuline normalisées par rapport au contenu total +/- SEM, $n = 3$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

La sécrétion du glucagon ne semble pas affectée par les contacts intercellulaires β -non β directs ou paracrines

Comme illustré sur la figure 6, il n'y a pas eu de différence de sécrétion de glucagon, en condition basale ou stimulée, entre les différents types de pseudo-îlots. Ces mesures ont été effectuées sur les mêmes échantillons que ceux des expériences précédentes avec l'insuline.

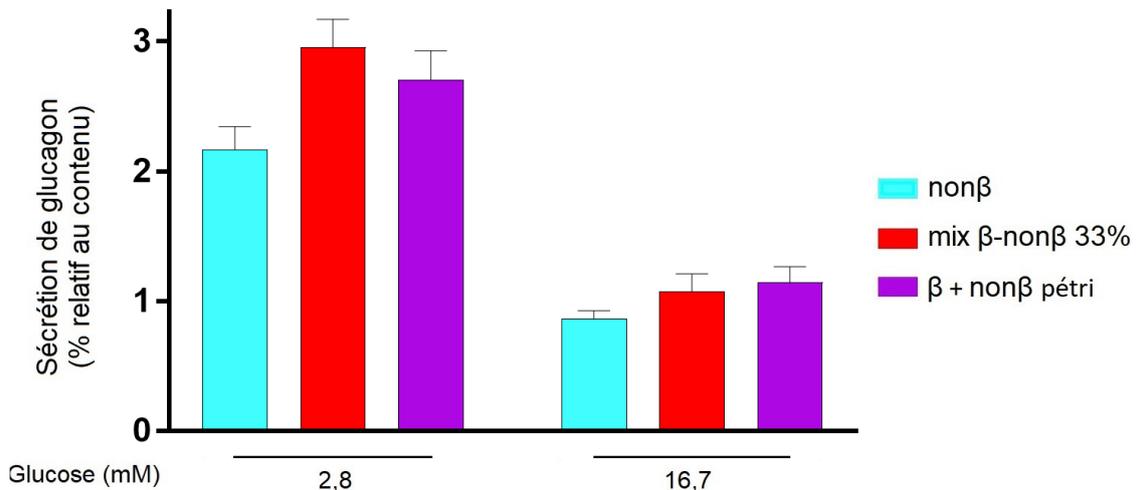


Figure 6. Résultats du test de sécrétion du glucagon en réponse à une stimulation par le glucose pour les pseudo-îlots du tri β et non β
Les colonnes représentent la moyenne des sécrétions de glucagon normalisées par rapport au contenu total +/- SEM, n = 6

Enrichissement satisfaisant en cellules α effectué avec la deuxième méthode de tri par FACS

Parmi la population α , obtenu par la deuxième méthode de tri par FACS, 96% ont été des cellules positives pour le glucagon après IF. La deuxième méthode de tri par FACS a donc été considérée comme satisfaisante concernant la purification des cellules α . Les quantités de cellules obtenues ont été suffisantes pour permettre de réaliser les expériences de sécrétion mais malheureusement insuffisantes pour effectuer des analyses histologiques des pseudo-îlots.

La sécrétion d'insuline n'est pas affectée par les contacts cellulaires directs β - α

Comme illustré sur la figure 7, il n'y a pas eu de différence de sécrétion d'insuline en condition basale, entre les pseudo-îlots β et les pseudo-îlots mix β - α . Contrairement aux expériences précédentes avec les pseudo-îlots non β , il n'y a pas eu non plus de différence de sécrétion d'insuline en condition stimulée entre les pseudo-îlots β et les pseudo-îlots mix β - α (11,8 +/- 2,1 vs 11,0 +/- 1,7).

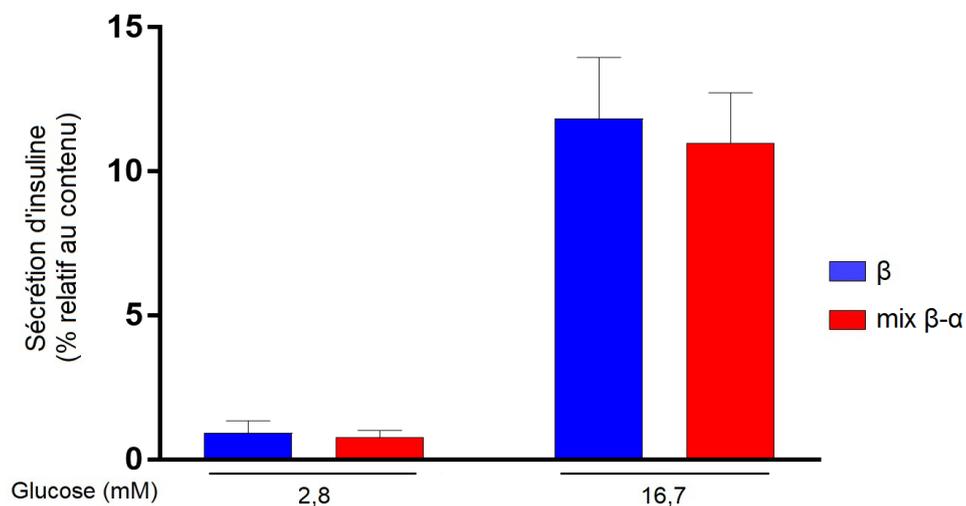


Figure 7. Résultats du test de sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par le glucose pour les pseudo-îlots du tri β et α
Les colonnes représentent la moyenne des sécrétions d'insuline normalisées par rapport au contenu total +/- SEM, n = 3

Les effets des contacts α - β sur la sécrétion du glucagon sont incertains

Comme illustré sur la figure 8, il n'y a pas eu de différence de sécrétion du glucagon, en condition basale ou stimulée, entre les différents types de pseudo-îlots. Pour chaque expérience, que ce soit en haut ou bas glucose, une sécrétion plus faible du glucagon a été observée pour les pseudo-îlots β - α par rapport aux pseudo-îlots α , mais statistiquement non significative ($p > 0.05$).

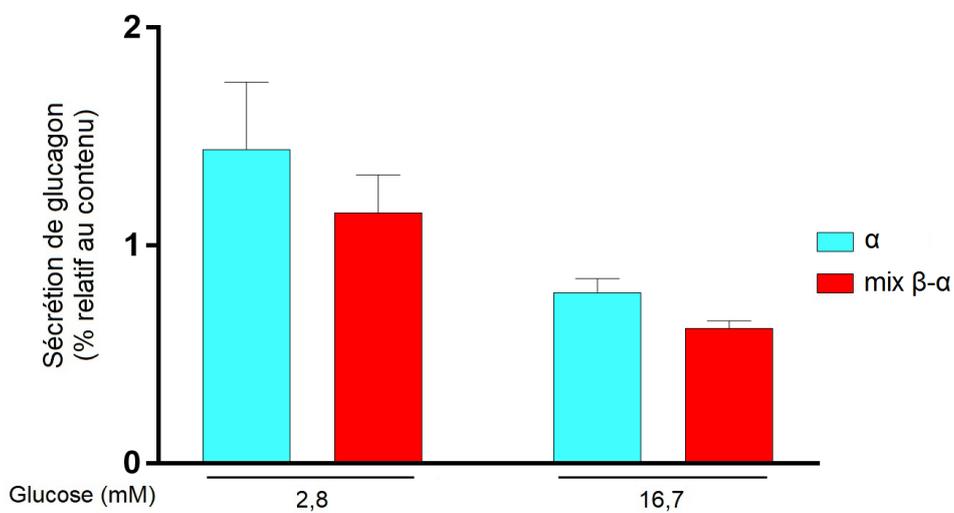


Figure 8. Résultats du test de sécrétion du glucagon en réponse à une stimulation par le glucose pour les pseudo-îlots du tri β et α

Les colonnes représentent la moyenne des sécrétions de glucagon normalisées par rapport au contenu \pm SEM, $n = 3$

Effet des contacts cellulaires directs sur la sécrétion d'insuline par RHPA

L'objectif a été de voir si le contact direct entre une cellule β et α (doublet β - α) favoriserait la sécrétion d'insuline par rapport à une cellule β seule (figure 9). La technique de RHPA a permis d'évaluer la sécrétion d'insuline en estimant la surface des plaques de lyse autour des cellules.

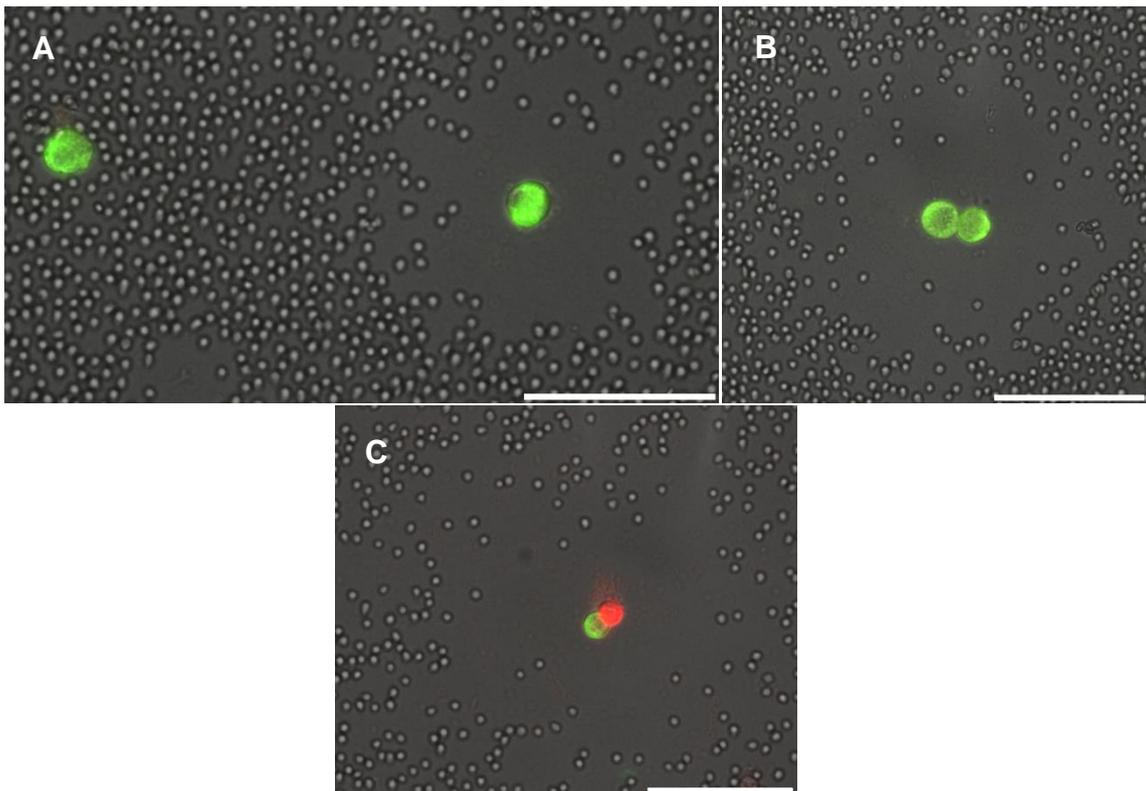


Figure 9. Photos en microscopie à fluorescence de cellules formant des plaques de lyse par RHPA

A : A gauche une cellule β isolée ne formant pas de plaque de lyse, à droite une cellule β isolée formant une plaque de lyse ; B : Un doublet β - β formant une plaque de lyse ; C : Un doublet α - β formant une plaque de lyse (Insuline en vert et glucagon en rouge) ; les barres représentent $50\mu\text{m}$

La stimulation de la sécrétion d'insuline à haut glucose (16,7mM) par rapport à une stimulation à bas glucose (2,8mM) a augmenté le pourcentage de cellules β formant des plaques de lyse, ainsi que la taille des plaques de lyse et par voie de conséquence le TPD.

En comparant les cellules β seules et les doublets β - β en cas de stimulation à haut glucose (condition contrôle) il a été observé que :

- Les doublets β - β ont formé davantage de plaques de lyse que les cellules β seules (92,0 +/- 1,0 vs 69,6 +/- 3,4 ; $p < 0,0001$) (figure 10A)
- La taille des plaques de lyse des doublets β - β a semblé être plus importante que celle des cellules β seules (résultat non significatif) (figure 10B)
- Le TPD des doublets β - β a été plus important que celui des cellules β seules (569 409 +/- 73 967 vs 299 306 +/- 35 956 ; $p = 0,0495$) (figure 10C)

En revanche, en comparant les doublets β - α et les cellules β seules et en cas de stimulation à haut ou bas glucose (condition contrôle), aucune différence n'a été observée sur les différents paramètres étudiés (figure 10).

La sécrétion d'insuline a été étudiée aussi en présence de glucagon exogène et d'IBMX (stimulateur de la voie de la PKA). Ceci a été fait en prévision d'un effet potentialisateur de la cellule α sur la sécrétion d'insuline et afin de démontrer que ces effets passeraient par le glucagon et l'activation de la PKA. L'ajout exogène d'IBMX a permis de stimuler la sécrétion d'insuline, ce qui montre une voie de la PKA fonctionnelle au niveau de la cellule β . En revanche, aucune différence n'a été observée entre les doublets β - α et les cellules β seules sur les différents paramètres étudiés (figure 10).

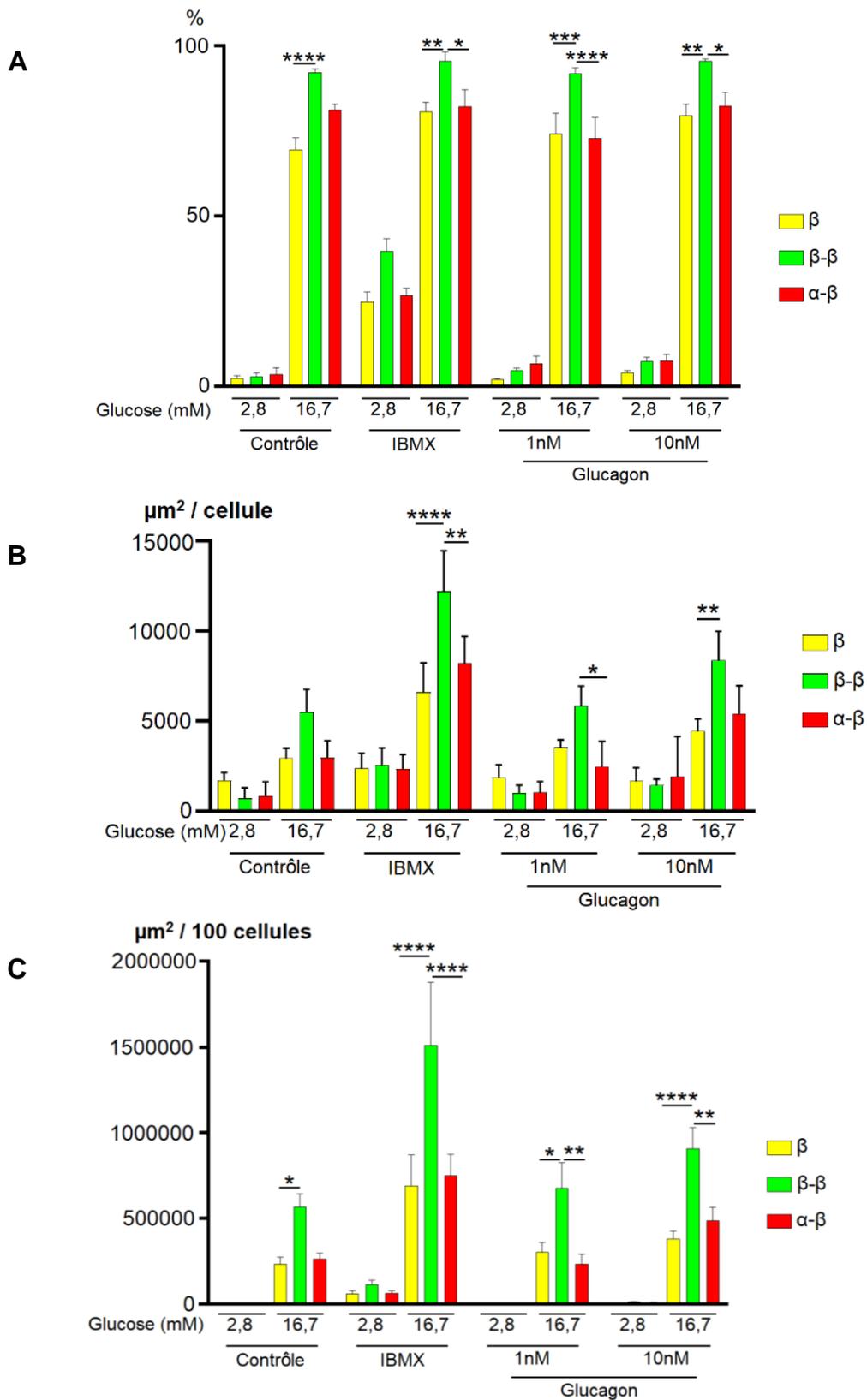


Figure 10. Evaluation de la sécrétion d'insuline par RHPA de cellules isolées
 A : Pourcentage de cellules d'îlots de rat formant des plaques de lyse ; B : Taille moyenne des plaques de lyse C : Taille totale des plaques de lyse autour de 100 cellules (TPD) ; Les colonnes représentent les moyennes des expériences +/- SEM. En jaune : les cellules β seules, en vert les doublets β - β , en rouge les doublets α - β . Pour chaque condition (contrôle, IBMX, glucagon 1nM et 10nM) il y a eu une lame en condition basale 2,8mM glucose et une lame en condition stimulée 16,7mM glucose ; n = 4, * p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001 ; **** p <0,0001

Discussion

Les expériences menées ont permis de confirmer l'importance des contacts et de la communication entre les cellules des îlots pancréatiques pour une sécrétion hormonale régulée. Cependant les résultats obtenus chez le rat diffèrent de ceux disponibles chez l'humain.

La réagrégation des cellules insulaires après dissociation aboutit à la formation de structures appelées pseudo-îlots. Ces pseudo-îlots, chez le rat et l'humain, ont une capacité de sécrétion d'insuline en réponse au glucose comparable à celle des îlots natifs correspondants (200–202). De plus, l'architecture des pseudo-îlots est comparable à leur homologue natif chez le rat. Il en va de même pour d'autres espèces, comme la souris ou le cochon notamment (201,203), mais apparemment pas pour l'humain (127). Notre technique de formation des pseudo-îlots après 5 jours de culture en plaque de 256 micro-puits d'agarose a permis d'obtenir des pseudo-îlots avec un nombre de cellules fixes selon les conditions (100, 200 ou 300 cellules par pseudo-îlot), et d'architecture comparable aux îlots natifs de rats, à savoir un corps de cellules β entouré d'un manteau de cellules non β (204,205).

Nous supposons que les pseudo-îlots mix β -non β auraient une meilleure sécrétion d'insuline que les pseudo-îlots β . Cette hypothèse reposait notamment sur deux arguments. Tout d'abord, les îlots natifs de rats contiennent plusieurs types cellulaires (126) comme les pseudo-îlots mix β -non β . Puis, les cellules α sont connues chez l'humain pour améliorer la sécrétion d'insuline des cellules β (178), nous pensions donc obtenir le même effet avec notre population non β enrichies en cellules α (43,4%). Cependant, ce n'est pas ce qui a été observé. En effet, les pseudo-îlots mix β -non β ont sécrété moins d'insuline que les

pseudo-îlots β (11,9% vs 19,1%). Cette diminution de la sécrétion d'insuline est particulièrement observée en cas de contacts directs entre les cellules β et non β , et n'est pas retrouvée en cas d'interactions uniquement paracrines (pseudo-îlots β + non β cultivés en pétri). Ces résultats suggèrent que la sécrétion d'insuline est régulée, et proche des données de sécrétion obtenues à partir d'îlots natifs de rat (129), uniquement en cas de contact direct entre les cellules β et non β . Afin d'approfondir ces résultats, nous avons décidé d'étudier plus spécifiquement le rôle des cellules α en améliorant l'enrichissement de la population non β en cellules α . Cela a été possible lors du second type de tri effectué par FACS où plus de 96% de cellules α sont obtenues après tri. Cette fois-ci les pseudo-îlots mix β - α n'ont pas montré de différence de sécrétion d'insuline en réponse au glucose par rapport aux pseudo-îlots β . Ces résultats sont par ailleurs concordant avec d'autres résultats déjà obtenus chez le rongeur où il a été démontré qu'en présence d'anticorps anti-glucagon bloquant, il n'y avait pas d'altération de la sécrétion d'insuline (122,170).

De plus, l'absence d'effet de la cellule α sur la sécrétion d'insuline par la cellule β obtenue lors de nos expériences avec des pseudo-îlots, a été retrouvée lors de nos expériences menées par RHPA. En effet, il n'y a pas eu de différence sur le pourcentage de formation de plaques de lyse ou sur leur taille entre les doublets β - α et les cellules β seules.

Ces résultats permettent de suggérer que d'autres cellules que les α , comme les cellules δ , joueraient un rôle important pour la régulation de la sécrétion d'insuline. Afin d'approfondir les effets des interactions cellulaires sur la sécrétion d'insuline, des expériences visant à isoler les cellules δ devront être envisagées, notamment pour étudier l'impact des interactions β - δ . Les cellules δ

expriment de manière spécifique le CRH-R2 qui une fois marqué pourrait permettre leur isolement (179,183).

Les résultats obtenus sur la sécrétion d'insuline à partir de cellules primaires de rats sont en accord avec de précédents résultats publiés chez le rongeur, mais ceux-ci sont différents de ce qui est observé à partir de cellules humaines. En effet, au niveau des pseudo-îlots humains la présence de cellules α permet de potentialiser la sécrétion d'insuline (178). De manière similaire, il a été démontré par RHPA avec des cellules humaines, que les doublets β - α forment davantage de plaques de lyse et de plus grandes tailles que les cellules β seules (143). Cette discordance d'effets observés entre le rongeur et l'humain, semble être en phase avec la diversité de composition cellulaire des îlots : davantage de cellules α chez l'humain, un corps de cellules β et manteau de cellules non β chez le rongeur, et une organisation en sous-unité cellulaire tri-laminaire dans les îlots humains (123,124). En conséquence, les contacts hétérotypiques sont favorisés chez l'humain, alors que ce sont les contacts homotypiques qui sont favorisés chez le rongeur (126,127). Cette différence conduit donc à une probabilité plus faible d'interactions juxtacrine et paracrine entre les cellules α et β chez le rat (122).

Concernant maintenant les résultats obtenus sur la sécrétion du glucagon, aucune différence n'a été observée entre les différents pseudo-îlots de cellules β et non β . En effet, le premier type de tri par FACS n'a pas permis d'isoler spécifiquement les cellules α qui représentaient moins de 45% de la population non β . En revanche, le second type de tri par FACS a abouti à l'obtention de population β et α , permettant ainsi d'étudier la sécrétion du glucagon. Aucun effet significatif n'a été observé pour l'instant de la cellule β sur la sécrétion du

glucagon par la cellule α . Seule une tendance à une sécrétion plus faible du glucagon des pseudo-îlots mix β - α par rapport aux pseudo-îlots α a été observée. Davantage d'expériences sont requises pour confirmer ces résultats.

L'effet inhibiteur de l'insuline sur la sécrétion du glucagon a déjà été décrit de différentes manières que ce soit chez le rongeur ou chez l'humain. Tout d'abord, les cellules α expriment le récepteur de l'insuline (147) et en cas d'ajout d'insuline exogène, il y a une inhibition de la sécrétion du glucagon des pseudo-îlots humains (178). De plus, chez le rongeur, la stimulation du métabolisme des cellules β inhibe la sécrétion du glucagon (145). L'effet inhibiteur de la cellule β sur la cellule α ne semble pas uniquement être médié par l'insuline, mais passerait également par d'autres médiateurs comme le zinc (150) (uniquement chez le rongeur), l'ATP (146) ou le GABA (148). Enfin, chez l'humain, il a été prouvé au niveau de pseudo-îlots que la présence des cellules β est nécessaire à la régulation de la sécrétion du glucagon en réponse au glucose (178). Ce constat est également valable chez les patients DT1 (qui n'ont plus ni de cellules β , ni de sécrétion d'insuline) qui présentent une altération de la sécrétion du glucagon en réponse au glucose (175,177).

Conclusion et perspectives

Pour conclure, l'ensemble de mes expériences menées avec des pseudo-îlots de rats *in vitro* montrent que la sécrétion d'insuline régulée par le glucose est diminuée à partir de pseudo-îlots composés de cellules β et non β par rapport à des pseudo-îlots composés uniquement de cellules β . En revanche, la présence de cellules α avec les cellules β dans les pseudo-îlots ne semble pas affecter la sécrétion d'insuline.

Ces résultats sont concordants avec les données obtenues par RHPA, où la cellule α ne potentialise pas la sécrétion d'insuline par la cellule β contrairement à ce qui a été démontré chez l'humain. Les divergences observées entre l'humain et le rongeur sont de faites en accord avec les différences de proportions cellulaires, d'architecture et de types d'interactions cellulaires (homotypiques / hétérotypiques). Il conviendra donc d'étudier l'impact d'autres types de cellules insulaires, comme les cellules δ , sur la sécrétion d'insuline avec le même type d'expériences.

Concernant la sécrétion du glucagon, les données préliminaires ne permettent pas de conclure à un effet inhibiteur des cellules β sur la sécrétion du glucagon par les cellules α chez le rongeur. Il conviendra de répéter les expériences et le cas échéant d'investiguer le mode d'inhibition des cellules β de rat sur les cellules α . L'impact des cellules δ sur la sécrétion du glucagon devra par la suite être exploré.

Enfin, pour poursuivre l'exploration des interactions paracrines et juxtacrines des cellules insulaires, il conviendra de répéter ces expériences avec des cellules humaines avant d'envisager une approche *in vivo*.

THESE SOUTENUE PAR : Quentin PERRIER

**TITRE : RÔLE DES INTERACTIONS CELLULAIRES SUR LES
SECRETIONS HORMONALES DANS LES ÎLOTS PANCREATIQUES**

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Genève le 05 Février 2021



Le Directeur de Thèse
Pr. Domenico BOSCO

Grenoble le Février 2021



Le Doyen
Pr. Michel SEVE

Pour la Présidence
et par délégation
Le Doyen de Pharmacie
Pr. Michel SEVE

Références

1. Leung PS. Overview of the pancreas. *Adv Exp Med Biol.* 2010;690:3-12.
2. IDF_Diabetes_Atlas_9e_FR.pdf [Internet]. [cité 20 oct 2020]. Disponible sur: https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133352_2406-IDF-ATLAS-FRENCH-BOOK.pdf
3. WHO | Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 20 oct 2020]. Disponible sur: https://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/
4. Writing Group for the SEARCH for Diabetes in Youth Study Group, Dabelea D, Bell RA, D'Agostino RB, Imperatore G, Johansen JM, et al. Incidence of diabetes in youth in the United States. *JAMA.* 27 juin 2007;297(24):2716-24.
5. Kahaly GJ, Hansen MP. Type 1 diabetes associated autoimmunity. *Autoimmun Rev.* juill 2016;15(7):644-8.
6. Ilonen J, Lempainen J, Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15(11):635-50.
7. Atkinson MA. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 nov 2012;2(11).
8. Thomson G, Valdes AM, Noble JA, Kockum I, Grote MN, Najman J, et al. Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. *Tissue Antigens.* août 2007;70(2):110-27.
9. Roivainen M, Ylipaasto P, Savolainen C, Galama J, Hovi T, Otonkoski T. Functional impairment and killing of human beta cells by enteroviruses: the capacity is shared by a wide range of serotypes, but the extent is a characteristic of individual virus strains. *Diabetologia.* mai 2002;45(5):693-702.
10. Sioofy-Khojine A-B, Lehtonen J, Nurminen N, Laitinen OH, Oikarinen S, Huhtala H, et al. Coxsackievirus B1 infections are associated with the initiation of insulin-driven autoimmunity that progresses to type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2018;61(5):1193-202.
11. Rewers M, Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet.* 4 juin 2016;387(10035):2340-8.
12. Brunton S. Pathophysiology of Type 2 Diabetes: The Evolution of Our Understanding. *J Fam Pract.* avr 2016;65(4 Suppl).
13. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyotylainen T, Nielsen T, Jensen BAH, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature.* 21 2016;535(7612):376-81.
14. Avery AR, Duncan GE. Heritability of Type 2 Diabetes in the Washington State Twin Registry. *Twin Res Hum Genet.* 2019;22(2):95-8.
15. Carlsson S, Ahlbom A, Lichtenstein P, Andersson T. Shared genetic influence of BMI, physical activity and type 2 diabetes: a twin study. *Diabetologia.* mai 2013;56(5):1031-5.
16. Umpierrez G, Korytkowski M. Diabetic emergencies - ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia. *Nat Rev Endocrinol.* avr 2016;12(4):222-32.
17. Marcovecchio ML, Lucantoni M, Chiarelli F. Role of chronic and acute hyperglycemia in the development of diabetes complications. *Diabetes Technol Ther.* mars 2011;13(3):389-94.
18. Winocour PH. Diabetes and chronic kidney disease: an increasingly common multi-morbid disease in need of a paradigm shift in care. *Diabet Med.* mars 2018;35(3):300-5.
19. Sabanayagam C, Banu R, Chee ML, Lee R, Wang YX, Tan G, et al. Incidence and progression of diabetic retinopathy: a systematic review. *The Lancet Diabetes & Endocrinology.* févr 2019;7(2):140-9.
20. Zakin E, Abrams R, Simpson DM. Diabetic Neuropathy. *Semin Neurol.* oct 2019;39(5):560-9.
21. Zhang P, Lu J, Jing Y, Tang S, Zhu D, Bi Y. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine.* 17 févr 2017;49(2):106-16.
22. Yamazaki D, Hitomi H, Nishiyama A. Hypertension with diabetes mellitus complications. *Hypertens Res.* mars 2018;41(3):147-56.
23. Henning RJ. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* nov 2018;14(6):491-509.
24. Palau V, Riera M, Soler MJ. The reno-cardiovascular connection in the patient with Diabetes mellitus: What's new? *Endocrinol Diabetes Nutr.* mai 2017;64(5):237-40.
25. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J.* mars 1922;12(3):141-6.
26. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 30 1993;329(14):977-86.
27. Hanaire H, Franc S, Borot S, Penfornis A, Benhamou P-Y, Schaepeelynck P, et al. Efficacy of the DiabeLoop closed-loop system to improve glycaemic control in patients with type 1 diabetes exposed to gastronomic dinners or to sustained physical exercise. *Diabetes Obes Metab.* mars 2020;22(3):324-34.
28. Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC. Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery.* juin 1967;61(6):827-37.

29. Kandaswamy R, Stock PG, Gustafson SK, Skeans MA, Curry MA, Prentice MA, et al. OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Pancreas. *American Journal of Transplantation*. 2018;18(S1):114-71.
30. Gruessner RWG, Gruessner AC. The current state of pancreas transplantation. *Nat Rev Endocrinol*. sept 2013;9(9):555-62.
31. Niclauss N, Meier R, Bédât B, Berishvili E, Berney T. Beta-Cell Replacement: Pancreas and Islet Cell Transplantation. *Endocr Dev*. 2016;31:146-62.
32. Lablanche S, Vantyghem M-C, Kessler L, Wojtuszczyz A, Borot S, Thivolet C, et al. Islet transplantation versus insulin therapy in patients with type 1 diabetes with severe hypoglycaemia or poorly controlled glycaemia after kidney transplantation (TRIMECO): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(7):527-37.
33. Rafael E, Ryan EA, Paty BW, Oberholzer J, Imes S, Senior P, et al. Changes in liver enzymes after clinical islet transplantation. *Transplantation*. 15 nov 2003;76(9):1280-4.
34. Bhargava R, Senior PA, Ackerman TE, Ryan EA, Paty BW, Lakey JRT, et al. Prevalence of hepatic steatosis after islet transplantation and its relation to graft function. *Diabetes*. mai 2004;53(5):1311-7.
35. Casey JJ, Lakey JR, Ryan EA, Paty BW, Owen R, O'Kelly K, et al. Portal venous pressure changes after sequential clinical islet transplantation. *Transplantation*. 15 oct 2002;74(7):913-5.
36. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. avr 1988;37(4):413-20.
37. Najarian JS, Sutherland DE, Matas AJ, Steffes MW, Simmons RL, Goetz FC. Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplant Proc*. mars 1977;9(1):233-6.
38. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 27 juill 2000;343(4):230-8.
39. Gołębiewska JE, Bachul PJ, Wang L, Matusz S, Basto L, Kijek MR, et al. Validation of a New North American Islet Donor Score for Donor Pancreas Selection and Successful Islet Isolation in a Medium-Volume Islet Transplant Center. *Cell Transplant*. 1 févr 2019;28(2):185-94.
40. Wassmer C-H, Perrier Q, Combescure C, Pernin N, Parnaud G, Cottet-Dumoulin D, et al. Impact of ischemia time on islet isolation success and post transplantation outcomes: a retrospective study of 452 pancreas isolations. *Am J Transplant*. 28 sept 2020;
41. Andres A, Kin T, O'Gorman D, Bigam D, Kneteman N, Senior P, et al. Impact of adverse pancreatic injury at surgical procurement upon islet isolation outcome. *Transpl Int*. nov 2014;27(11):1135-42.
42. Niclauss N, Wojtuszczyz A, Morel P, Demuylder-Mischler S, Brault C, Parnaud G, et al. Comparative impact on islet isolation and transplant outcome of the preservation solutions Institut Georges Lopez-1, University of Wisconsin, and Celsior. *Transplantation*. 15 avr 2012;93(7):703-8.
43. Brandhorst H, Johnson PR, Mönch J, Kurfürst M, Korsgren O, Brandhorst D. Comparison of Clostripain and Neutral Protease as Supplementary Enzymes for Human Islet Isolation. *Cell Transplant*. févr 2019;28(2):176-84.
44. Brandhorst D, Brandhorst H, Johnson PRV. Enzyme Development for Human Islet Isolation: Five Decades of Progress or Stagnation? *Rev Diabet Stud*. 2017;14(1):22-38.
45. Chadwick DR, Robertson GS, Contractor H, Swift S, Rose S, Thirdborough ST, et al. Human islet purification: a prospective comparison of Euro-Ficoll and bovine serum albumin density gradients. *Acta Diabetol*. 1993;30(1):57-9.
46. Shimoda M, Itoh T, Iwahashi S, Takita M, Sugimoto K, Kanak MA, et al. An effective purification method using large bottles for human pancreatic islet isolation. *Islets*. déc 2012;4(6):398-404.
47. Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Kurima K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, et al. Islet Culture/Preservation Before Islet Transplantation. *Cell Med*. 17 déc 2015;8(1-2):25-9.
48. Berney T. Islet culture and counter-culture. Commentary on: Effect of short-term culture on functional and stress-related parameters in isolated human islets by Ihm et al. *Transpl Int*. mai 2009;22(5):531-3.
49. Murdoch TB, McGhee-Wilson D, Shapiro AMJ, Lakey JRT. Methods of Human Islet Culture for Transplantation. *Cell Transplant*. sept 2004;13(6):605-18.
50. Rickels MR, Robertson RP. Pancreatic Islet Transplantation in Humans: Recent Progress and Future Directions. *Endocr Rev*. 01 2019;40(2):631-68.
51. Lablanche S, Borot S, Wojtuszczyz A, Bayle F, Tétaz R, Badet L, et al. Five-Year Metabolic, Functional, and Safety Results of Patients With Type 1 Diabetes Transplanted With Allogenic Islets Within the Swiss-French GRAGIL Network. *Diabetes Care*. sept 2015;38(9):1714-22.
52. Lablanche S, David-Tchouda S, Margier J, Schir E, Wojtuszczyz A, Borot S, et al. Randomised, prospective, medico-economic nationwide French study of islet transplantation in patients with severely unstable type 1 diabetes: the STABILOT study protocol. *BMJ Open*. 20 2017;7(2):e013434.
53. Perrier Q, Lavallard V, Pernin N, Wassmer C, Cottet-Dumoulin D, Lebreton F, et al. Failure mode and effect analysis in human islet isolation: from the theoretical to the practical risk. 2021. « sous presse ».
54. Nano R, Kerr-Conte J, Scholz H, Engelse M, Karlsson M, Saudek F, et al. Heterogeneity of Human Pancreatic Islet Isolation Around Europe: Results of a Survey Study. *Transplantation*. janv 2020;104(1):190-6.

55. Lau J, Carlsson P-O. Low revascularization of human islets when experimentally transplanted into the liver. *Transplantation*. 15 févr 2009;87(3):322-5.
56. Giuliani M, Moritz W, Bodmer E, Dindo D, Kugelmeier P, Lehmann R, et al. Central necrosis in isolated hypoxic human pancreatic islets: evidence for postisolation ischemia. *Cell Transplant*. 2005;14(1):67-76.
57. Llacua A, de Haan BJ, Smink SA, de Vos P. Extracellular matrix components supporting human islet function in alginate-based immunoprotective microcapsules for treatment of diabetes. *J Biomed Mater Res A*. 2016;104(7):1788-96.
58. Onaca N, Takita M, Levy MF, Naziruddin B. Anti-inflammatory Approach With Early Double Cytokine Blockade (IL-1 β and TNF- α) Is Safe and Facilitates Engraftment in Islet Allotransplantation. *Transplant Direct*. mars 2020;6(3):e530.
59. Toso C, Zaidi H, Morel P, Armanet M, Andres A, Pernin N, et al. Positron-emission tomography imaging of early events after transplantation of islets of Langerhans. *Transplantation*. 15 févr 2005;79(3):353-5.
60. Nilsson B, Ekdahl KN, Korsgren O. Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment. *Curr Opin Organ Transplant*. déc 2011;16(6):620-6.
61. Makhlof L, Kishimoto K, Smith RN, Abdi R, Koulmanda M, Winn HJ, et al. The role of autoimmunity in islet allograft destruction: major histocompatibility complex class II matching is necessary for autoimmune destruction of allogeneic islet transplants after T-cell costimulatory blockade. *Diabetes*. nov 2002;51(11):3202-10.
62. Perrier Q, Tetaz R, Baudrant M, Lepelley M, Berney T, Benhamou P-Y, et al. Severe acute hepatitis after thymoglobulin induction before islet transplantation. *Thérapie*. déc 2018;73(6):545-6.
63. Peters A, Olateju T, Deschenes J, Shankarnarayan SH, Chua N, Shapiro AMJ, et al. Posttransplant Lymphoproliferative Disorder After Clinical Islet Transplantation: Report of the First Two Cases. *Am J Transplant*. sept 2017;17(9):2474-80.
64. Senior PA, Zeman M, Paty BW, Ryan EA, Shapiro AMJ. Changes in renal function after clinical islet transplantation: four-year observational study. *Am J Transplant*. janv 2007;7(1):91-8.
65. Thompson P, Badell IR, Lowe M, Cano J, Song M, Leopardi F, et al. Islet xenotransplantation using gal-deficient neonatal donors improves engraftment and function. *Am J Transplant*. déc 2011;11(12):2593-602.
66. Hawthorne WJ, Salvaris EJ, Phillips P, Hawkes J, Liuwantara D, Burns H, et al. Control of IBMIR in neonatal porcine islet xenotransplantation in baboons. *Am J Transplant*. juin 2014;14(6):1300-9.
67. Goto M, Johansson H, Maeda A, Elgue G, Korsgren O, Nilsson B. Low molecular weight dextran sulfate prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction induced by adult porcine islets. *Transplantation*. 15 mars 2004;77(5):741-7.
68. Dieckhoff B, Petersen B, Kues WA, Kurth R, Niemann H, Denner J. Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation*. févr 2008;15(1):36-45.
69. Valdés-González RA, Dorantes LM, Garibay GN, Bracho-Blanchet E, Mendez AJ, Dávila-Pérez R, et al. Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. *Eur J Endocrinol*. sept 2005;153(3):419-27.
70. Matsumoto S, Tan P, Baker J, Durbin K, Tomiya M, Azuma K, et al. Clinical porcine islet xenotransplantation under comprehensive regulation. *Transplant Proc*. août 2014;46(6):1992-5.
71. Wynyard S, Nathu D, Garkavenko O, Denner J, Elliott R. Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand. *Xenotransplantation*. août 2014;21(4):309-23.
72. Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 4 déc 2008;3(6):595-605.
73. Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res*. avr 2009;19(4):429-38.
74. Russ HA, Parent AV, Ringler JJ, Hennings TG, Nair GG, Shveygert M, et al. Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells in vitro. *EMBO J*. 2 juill 2015;34(13):1759-72.
75. Shahjalal HM, Abdal Dayem A, Lim KM, Jeon T-I, Cho S-G. Generation of pancreatic β cells for treatment of diabetes: advances and challenges. *Stem Cell Res Ther*. 29 2018;9(1):355.
76. Halme DG, Kessler DA. FDA regulation of stem-cell-based therapies. *N Engl J Med*. 19 oct 2006;355(16):1730-5.
77. Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol*. août 2009;27(8):743-5.
78. Basford CL, Prentice KJ, Hardy AB, Sarangi F, Micallef SJ, Li X, et al. The functional and molecular characterisation of human embryonic stem cell-derived insulin-positive cells compared with adult pancreatic beta cells. *Diabetologia*. févr 2012;55(2):358-71.
79. Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, et al. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res*. avr 2007;17(4):333-44.
80. Chen S, Borowiak M, Fox JL, Maehr R, Osafune K, Davidow L, et al. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat Chem Biol*. avr 2009;5(4):258-65.
81. Kunisada Y, Tsubooka-Yamazoe N, Shoji M, Hosoya M. Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. mars 2012;8(2):274-84.

82. Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, et al. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol.* mars 2008;26(3):313-5.
83. Tateishi K, He J, Taranova O, Liang G, D'Alessio AC, Zhang Y. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* 14 nov 2008;283(46):31601-7.
84. Grapensparr L, Christoffersson G, Carlsson P-O. Bioengineering with Endothelial Progenitor Cells Improves the Vascular Engraftment of Transplanted Human Islets. *Cell Transplant.* juin 2018;27(6):948-56.
85. Jiao A, Li F, Zhang C, Lv W, Chen B, Zhang J. Simulated Cholinergic Reinnervation of β (INS-1) Cells: Antidiabetic Utility of Heterotypic Pseudoislets Containing β Cell and Cholinergic Cell. *Int J Endocrinol.* 2018;2018:1505307.
86. Lebreton F, Bellofatto K, Wassmer CH, Perez L, Lavallard V, Parnaud G, et al. Shielding islets with human amniotic epithelial cells enhances islet engraftment and revascularization in a murine diabetes model. *Am J Transplant.* 2020;20(6):1551-61.
87. Lebreton F, Lavallard V, Bellofatto K, Bonnet R, Wassmer CH, Perez L, et al. Insulin-producing organoids engineered from islet and amniotic epithelial cells to treat diabetes. *Nat Commun.* 03 2019;10(1):4491.
88. Farina M, Alexander JF, Thekkedath U, Ferrari M, Grattoni A. Cell encapsulation: Overcoming barriers in cell transplantation in diabetes and beyond. *Adv Drug Deliv Rev.* 15 2019;139:92-115.
89. Gholipourmalekabadi M, Zhao S, Harrison BS, Mozafari M, Seifalian AM. Oxygen-Generating Biomaterials: A New, Viable Paradigm for Tissue Engineering? *Trends Biotechnol.* 2016;34(12):1010-21.
90. White JC, Stoppel WL, Roberts SC, Bhatia SR. Addition of perfluorocarbons to alginate hydrogels significantly impacts molecular transport and fracture stress. *J Biomed Mater Res A.* févr 2013;101(2):438-46.
91. Abdi SIH, Ng SM, Lim JO. An enzyme-modulated oxygen-producing micro-system for regenerative therapeutics. *Int J Pharm.* 16 mai 2011;409(1-2):203-5.
92. Ernst AU, Bowers DT, Wang L-H, Shariati K, Plessner MD, Brown NK, et al. Nanotechnology in cell replacement therapies for type 1 diabetes. *Adv Drug Deliv Rev.* 15 janv 2019;139:116-38.
93. Cañibano-Hernández A, Sáenz Del Burgo L, Espona-Noguera A, Ciriza J, Pedraz JL. Current advanced therapy cell-based medicinal products for type-1-diabetes treatment. *Int J Pharm.* 30 mai 2018;543(1-2):107-20.
94. Open-label Investigation of the Safety and Efficacy of DIABECCELL in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus - No Study Results Posted - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 25 oct 2020]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01736228>
95. Desai T, Shea LD. Advances in islet encapsulation technologies. *Nat Rev Drug Discov.* mai 2017;16(5):338-50.
96. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* janv 2003;52(1):102-10.
97. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia.* oct 2010;53(10):2167-76.
98. Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab.* mai 2003;88(5):2300-8.
99. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* nov 2008;10 Suppl 4:32-42.
100. Tokumoto S, Yabe D, Tatsuoka H, Usui R, Fauzi M, Botagarova A, et al. Generation and Characterization of a Novel Mouse Model That Allows Spatiotemporal Quantification of Pancreatic β -Cell Proliferation. *Diabetes.* nov 2020;69(11):2340-51.
101. Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Pancreatic β Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. *Cell Metab.* 09 2018;27(1):57-67.
102. Thorel F, Népoté V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature.* 22 avr 2010;464(7292):1149-54.
103. Hellman B, Salehi A, Gylfe E, Dansk H, Grapengiesser E. Glucose generates coincident insulin and somatostatin pulses and antisynchronous glucagon pulses from human pancreatic islets. *Endocrinology.* déc 2009;150(12):5334-40.
104. Salehi A, Qader SS, Grapengiesser E, Hellman B. Pulses of somatostatin release are slightly delayed compared with insulin and antisynchronous to glucagon. *Regul Pept.* 4 déc 2007;144(1-3):43-9.
105. Hellman B, Salehi A, Grapengiesser E, Gylfe E. Isolated mouse islets respond to glucose with an initial peak of glucagon release followed by pulses of insulin and somatostatin in antisynchrony with glucagon. *Biochem Biophys Res Commun.* 27 janv 2012;417(4):1219-23.
106. Lang DA, Matthews DR, Peto J, Turner RC. Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *N Engl J Med.* 8 nov 1979;301(19):1023-7.
107. Rorsman P, Ashcroft FM. Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiol Rev.* 01 2018;98(1):117-214.
108. Ahrén B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia.* avr 2000;43(4):393-410.

109. Rodriguez-Diaz R, Speier S, Molano RD, Formoso A, Gans I, Abdulreda MH, et al. Noninvasive in vivo model demonstrating the effects of autonomic innervation on pancreatic islet function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 déc 2012;109(52):21456-61.
110. Jansson L, Hellerström C. Glucose-induced changes in pancreatic islet blood flow mediated by central nervous system. *Am J Physiol*. déc 1986;251(6 Pt 1):E644-647.
111. Rodriguez-Diaz R, Abdulreda MH, Formoso AL, Gans I, Ricordi C, Berggren P-O, et al. Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell Metab*. 6 juill 2011;14(1):45-54.
112. Rodriguez-Diaz R, Caicedo A. Neural control of the endocrine pancreas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. oct 2014;28(5):745-56.
113. Aamodt KI, Powers AC. Signals in the pancreatic islet microenvironment influence β -cell proliferation. *Diabetes Obes Metab*. 2017;19 Suppl 1:124-36.
114. Pénicaud L. Autonomic nervous system and pancreatic islet blood flow. *Biochimie*. déc 2017;143:29-32.
115. Hogan MF, Hull RL. The islet endothelial cell: a novel contributor to beta cell secretory dysfunction in diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(6):952-9.
116. Reinert RB, Cai Q, Hong J-Y, Plank JL, Aamodt K, Prasad N, et al. Vascular endothelial growth factor coordinates islet innervation via vascular scaffolding. *Development*. avr 2014;141(7):1480-91.
117. Brissova M, Shostak A, Shiota M, Wiebe PO, Poffenberger G, Kantz J, et al. Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor--a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes*. nov 2006;55(11):2974-85.
118. Stendahl JC, Kaufman DB, Stupp SI. Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplant*. 2009;18(1):1-12.
119. Almaça J, Caicedo A, Landsman L. Beta cell dysfunction in diabetes: the islet microenvironment as an unusual suspect. *Diabetologia*. oct 2020;63(10):2076-85.
120. Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M. Islet architecture: A comparative study. *Islets*. oct 2009;1(2):129-36.
121. Kilimnik G, Jo J, Periwál V, Zielinski MC, Hara M. Quantification of islet size and architecture. *Islets*. avr 2012;4(2):167-72.
122. Moede T, Leibiger IB, Berggren P-O. Alpha cell regulation of beta cell function. *Diabetologia*. oct 2020;63(10):2064-75.
123. Gilon P. The Role of α -Cells in Islet Function and Glucose Homeostasis in Health and Type 2 Diabetes. *J Mol Biol*. 6 mars 2020;432(5):1367-94.
124. Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M. Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*. mai 2010;2(3):135-45.
125. Roscioni SS, Migliorini A, Gegg M, Lickert H. Impact of islet architecture on β -cell heterogeneity, plasticity and function. *Nat Rev Endocrinol*. déc 2016;12(12):695-709.
126. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P-O, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 14 févr 2006;103(7):2334-9.
127. Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, Sgroi A, Muller YD, et al. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*. mai 2010;59(5):1202-10.
128. Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*. oct 2005;17(10):1183-93.
129. Unger RH, Orci L. Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 14 sept 2010;107(37):16009-12.
130. Rodriguez-Diaz R, Tamayo A, Hara M, Caicedo A. The Local Paracrine Actions of the Pancreatic α -Cell. *Diabetes*. avr 2020;69(4):550-8.
131. Caicedo A. Paracrine and autocrine interactions in the human islet: more than meets the eye. *Semin Cell Dev Biol*. janv 2013;24(1):11-21.
132. Jain R, Lammert E. Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab*. nov 2009;11 Suppl 4:159-67.
133. Meda P, Halban P, Perrelet A, Renold AE, Orci L. Gap junction development is correlated with insulin content in the pancreatic B cell. *Science*. 29 août 1980;209(4460):1026-8.
134. Meda P. Gap junction proteins are key drivers of endocrine function. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. janv 2018;1860(1):124-40.
135. Ravier MA, Guldenagel M, Charollais A, Gjinovci A, Caille D, Söhl G, et al. Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca²⁺ and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes*. juin 2005;54(6):1798-807.
136. Bavamian S, Klee P, Britan A, Populaire C, Caille D, Cancela J, et al. Islet-cell-to-cell communication as basis for normal insulin secretion. *Diabetes Obes Metab*. nov 2007;9 Suppl 2:118-32.
137. Jacques-Silva MC, Correa-Medina M, Cabrera O, Rodriguez-Diaz R, Makeeva N, Fachado A, et al. ATP-gated P2X₃ receptors constitute a positive autocrine signal for insulin release in the human pancreatic beta cell. *Proc Natl Acad Sci USA*. 6 avr 2010;107(14):6465-70.

138. Richards-Williams C, Contreras JL, Berecek KH, Schwiebert EM. Extracellular ATP and zinc are co-secreted with insulin and activate multiple P2X purinergic receptor channels expressed by islet beta-cells to potentiate insulin secretion. *Purinergic Signal*. déc 2008;4(4):393-405.
139. Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M, Clark A, Walker JN, Johnson PR, et al. Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an autocrine excitatory transmitter in human pancreatic beta-cells. *Diabetes*. juill 2010;59(7):1694-701.
140. Rothenberg PL, Willison LD, Simon J, Wolf BA. Glucose-induced insulin receptor tyrosine phosphorylation in insulin-secreting beta-cells. *Diabetes*. juill 1995;44(7):802-9.
141. Harbeck MC, Louie DC, Howland J, Wolf BA, Rothenberg PL. Expression of insulin receptor mRNA and insulin receptor substrate 1 in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes*. juin 1996;45(6):711-7.
142. Bosco D, Orci L, Meda P. Homologous but not heterologous contact increases the insulin secretion of individual pancreatic B-cells. *Exp Cell Res*. sept 1989;184(1):72-80.
143. Wojtuszczyz A, Armanet M, Morel P, Berney T, Bosco D. Insulin secretion from human beta cells is heterogeneous and dependent on cell-to-cell contacts. *Diabetologia*. oct 2008;51(10):1843-52.
144. Samols E, Harrison J. Intra-islet negative insulin-glucagon feedback. *Metab Clin Exp*. nov 1976;25(11 Suppl 1):1443-7.
145. Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera P-L, Wollheim CB. Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol*. avr 2003;5(4):330-5.
146. Tudurí E, Filiputti E, Carneiro EM, Quesada I. Inhibition of Ca²⁺ signaling and glucagon secretion in mouse pancreatic alpha-cells by extracellular ATP and purinergic receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. mai 2008;294(5):E952-960.
147. Franklin I, Gromada J, Gjinovci A, Theander S, Wollheim CB. Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes*. juin 2005;54(6):1808-15.
148. Wendt A, Birnir B, Buschard K, Gromada J, Salehi A, Sewing S, et al. Glucose inhibition of glucagon secretion from rat alpha-cells is mediated by GABA released from neighboring beta-cells. *Diabetes*. avr 2004;53(4):1038-45.
149. Rorsman P, Berggren PO, Bokvist K, Ericson H, Möhler H, Ostenson CG, et al. Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABA_A-receptor chloride channels. *Nature*. 21 sept 1989;341(6239):233-6.
150. Egefjord L, Petersen AB, Rungby J. Zinc, alpha cells and glucagon secretion. *Curr Diabetes Rev*. janv 2010;6(1):52-7.
151. Zhou H, Zhang T, Harmon JS, Bryan J, Robertson RP. Zinc, not insulin, regulates the rat alpha-cell response to hypoglycemia in vivo. *Diabetes*. avr 2007;56(4):1107-12.
152. Rodriguez-Diaz R, Molano RD, Weitz JR, Abdulreda MH, Berman DM, Leibiger B, et al. Paracrine Interactions within the Pancreatic Islet Determine the Glycemic Set Point. *Cell Metab*. 06 2018;27(3):549-558.e4.
153. Segerstolpe Å, Palasantza A, Eliasson P, Andersson E-M, Andréasson A-C, Sun X, et al. Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. 11 2016;24(4):593-607.
154. Marchetti P, Lupi R, Bugliani M, Kirkpatrick CL, Sebastiani G, Grieco FA, et al. A local glucagon-like peptide 1 (GLP-1) system in human pancreatic islets. *Diabetologia*. déc 2012;55(12):3262-72.
155. Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev*. oct 2001;22(5):565-604.
156. Bertrand G, Puech R, Loubatieres-Mariani MM, Bockaert J. Glutamate stimulates insulin secretion and improves glucose tolerance in rats. *Am J Physiol*. sept 1995;269(3 Pt 1):E551-556.
157. Storto M, Capobianco L, Battaglia G, Molinaro G, Gradini R, Riozzi B, et al. Insulin secretion is controlled by mGlu5 metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol*. avr 2006;69(4):1234-41.
158. Huisling MO. Paracrine regulation of insulin secretion. *Diabetologia*. oct 2020;63(10):2057-63.
159. Capozzi ME, Wait JB, Koech J, Gordon AN, Coch RW, Svendsen B, et al. Glucagon lowers glycemia when β -cells are active. *JCI Insight*. 23 juill 2019;5.
160. Capozzi ME, Svendsen B, Encisco SE, Lewandowski SL, Martin MD, Lin H, et al. β Cell tone is defined by proglucagon peptides through cAMP signaling. *JCI Insight*. 07 2019;4(5).
161. Svendsen B, Larsen O, Gabe MBN, Christiansen CB, Rosenkilde MM, Drucker DJ, et al. Insulin Secretion Depends on Intra-islet Glucagon Signaling. *Cell Rep*. 30 2018;25(5):1127-1134.e2.
162. Huisling MO, van der Meulen T, Vaughan JM, Matsumoto M, Donaldson CJ, Park H, et al. CRFR1 is expressed on pancreatic beta cells, promotes beta cell proliferation, and potentiates insulin secretion in a glucose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 janv 2010;107(2):912-7.
163. Rodriguez-Diaz R, Dando R, Jacques-Silva MC, Fachado A, Molina J, Abdulreda MH, et al. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat Med*. 19 juin 2011;17(7):888-92.
164. Molina J, Rodriguez-Diaz R, Fachado A, Jacques-Silva MC, Berggren P-O, Caicedo A. Control of insulin secretion by cholinergic signaling in the human pancreatic islet. *Diabetes*. août 2014;63(8):2714-26.

165. Sørensen H, Winzell MS, Brand CL, Fosgerau K, Gelling RW, Nishimura E, et al. Glucagon receptor knockout mice display increased insulin sensitivity and impaired beta-cell function. *Diabetes*. déc 2006;55(12):3463-9.
166. Cabrera O, Jacques-Silva MC, Speier S, Yang S-N, Köhler M, Fachado A, et al. Glutamate is a positive autocrine signal for glucagon release. *Cell Metab*. juin 2008;7(6):545-54.
167. Cho J-H, Chen L, Kim M-H, Chow RH, Hille B, Koh D-S. Characteristics and functions of {alpha}-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors expressed in mouse pancreatic {alpha}-cells. *Endocrinology*. avr 2010;151(4):1541-50.
168. Bertrand G, Gross R, Puech R, Loubatières-Mariani MM, Bockaert J. Glutamate stimulates glucagon secretion via an excitatory amino acid receptor of the AMPA subtype in rat pancreas. *Eur J Pharmacol*. 11 juin 1993;237(1):45-50.
169. Samols E, Bonner-Weir S, Weir GC. Intra-islet insulin-glucagon-somatostatin relationships. *Clin Endocrinol Metab*. févr 1986;15(1):33-58.
170. Stagner JI, Samols E, Marks V. The anterograde and retrograde infusion of glucagon antibodies suggests that A cells are vascularly perfused before D cells within the rat islet. *Diabetologia*. mars 1989;32(3):203-6.
171. Thorel F, Damond N, Chera S, Wiederkehr A, Thorens B, Meda P, et al. Normal glucagon signaling and β -cell function after near-total α -cell ablation in adult mice. *Diabetes*. nov 2011;60(11):2872-82.
172. Abdel-Halim SM, Guenifi A, Efendić S, Ostenson CG. Both somatostatin and insulin responses to glucose are impaired in the perfused pancreas of the spontaneously noninsulin-dependent diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats. *Acta Physiol Scand*. juin 1993;148(2):219-26.
173. Guardado Mendoza R, Perego C, Finzi G, La Rosa S, Capella C, Jimenez-Ceja LM, et al. Delta cell death in the islet of Langerhans and the progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in non-human primates (baboon, Papio hamadryas). *Diabetologia*. août 2015;58(8):1814-26.
174. Le Marchand SJ, Piston DW. Glucose suppression of glucagon secretion: metabolic and calcium responses from alpha-cells in intact mouse pancreatic islets. *J Biol Chem*. 7 mai 2010;285(19):14389-98.
175. Cryer PE. Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology*. mars 2012;153(3):1039-48.
176. Wewer Albrechtsen NJ, Hartmann B, Veedfald S, Windeløv JA, Plamboeck A, Bojsen-Møller KN, et al. Hyperglucagonaemia analysed by glucagon sandwich ELISA: nonspecific interference or truly elevated levels? *Diabetologia*. sept 2014;57(9):1919-26.
177. Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest*. janv 2012;122(1):4-12.
178. Liu W, Kin T, Ho S, Dorrell C, Campbell SR, Luo P, et al. Abnormal regulation of glucagon secretion by human islet alpha cells in the absence of beta cells. *EBioMedicine*. déc 2019;50:306-16.
179. Rorsman P, Huising MO. The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(7):404-14.
180. Li N, Yang Z, Li Q, Yu Z, Chen X, Li J-C, et al. Ablation of somatostatin cells leads to impaired pancreatic islet function and neonatal death in rodents. *Cell Death Dis*. 07 2018;9(6):682.
181. Taborisky GJ, Ensinnck JW. Contribution of the pancreas to circulating somatostatin-like immunoreactivity in the normal dog. *J Clin Invest*. janv 1984;73(1):216-23.
182. Briant LJB, Reinbothe TM, Spiliotis I, Miranda C, Rodriguez B, Rorsman P. δ -cells and β -cells are electrically coupled and regulate α -cell activity via somatostatin. *J Physiol (Lond)*. 15 2018;596(2):197-215.
183. van der Meulen T, Donaldson CJ, Cáceres E, Hunter AE, Cowing-Zitron C, Pound LD, et al. Urocortin3 mediates somatostatin-dependent negative feedback control of insulin secretion. *Nat Med*. juill 2015;21(7):769-76.
184. Honey RN, Weir GC. Insulin stimulates somatostatin and inhibits glucagon secretion from the perfused chicken pancreas-duodenum. *Life Sci*. 7 mai 1979;24(19):1747-50.
185. Bertrand G, Gross R, Ribes G, Loubatières-Mariani MM. P2 purinoceptor agonists stimulate somatostatin secretion from dog pancreas. *Eur J Pharmacol*. 3 juill 1990;182(2):369-73.
186. Zhu L, Dattaroy D, Pham J, Wang L, Barella LF, Cui Y, et al. Intra-islet glucagon signaling is critical for maintaining glucose homeostasis. *JCI Insight*. 23 avr 2019;5.
187. van der Meulen T, Donaldson CJ, Cáceres E, Hunter AE, Cowing-Zitron C, Pound LD, et al. Urocortin3 mediates somatostatin-dependent negative feedback control of insulin secretion. *Nat Med*. juill 2015;21(7):769-76.
188. Zhang J, McKenna LB, Bogue CW, Kaestner KH. The diabetes gene Hhex maintains δ -cell differentiation and islet function. *Genes Dev*. 15 avr 2014;28(8):829-34.
189. Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D, Richardson CC, Robinson ICAF, Low MJ, et al. Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes*. févr 2009;58(2):403-11.
190. Henquin JC. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia*. mai 2009;52(5):739-51.
191. Ramracheya R, Ward C, Shigeto M, Walker JN, Amisten S, Zhang Q, et al. Membrane potential-dependent inactivation of voltage-gated ion channels in alpha-cells inhibits glucagon secretion from human islets. *Diabetes*. sept 2010;59(9):2198-208.

192. Wang Z, Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci.* 1 avr 2009;122(Pt 7):893-903.
193. Schröder D, Wegner U, Besch W, Zühlke H. Characterization of pseudo-islets formed from pancreatic islet cell suspensions of neonatal rats. *Mol Cell Endocrinol.* oct 1983;32(2-3):179-93.
194. Sutton R, Peters M, McShane P, Gray DW, Morris PJ. Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. *Transplantation.* déc 1986;42(6):689-91.
195. Van de Winkel M, Maes E, Pipeleers D. Islet cell analysis and purification by light scatter and autofluorescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 30 juill 1982;107(2):525-32.
196. Wright PH, Makulu DR, Posey JJ. Guinea pig anti-insulin serum. Adjuvant effect of H. pertussis vaccine. *Diabetes.* août 1968;17(8):513-6.
197. Bosco D, Meda P, Thorens B, Malaisse WJ. Heterogeneous secretion of individual B cells in response to D-glucose and to nonglucidic nutrient secretagogues. *Am J Physiol.* mars 1995;268(3 Pt 1):C611-618.
198. Cunningham AJ. Antibody formation studied at the single-cell level. *Prog Allergy.* 1973;17:5-50.
199. Goding JW. The chromic chloride method of coupling antigens to erythrocytes: definition of some important parameters. *J Immunol Methods.* 1976;10(1):61-6.
200. Hopcroft DW, Mason DR, Scott RS. Insulin secretion from perfused rat pancreatic pseudoislets. *In Vitro Cell Dev Biol.* août 1985;21(8):421-7.
201. Halban PA, Powers SL, George KL, Bonner-Weir S. Spontaneous reassociation of dispersed adult rat pancreatic islet cells into aggregates with three-dimensional architecture typical of native islets. *Diabetes.* juill 1987;36(7):783-90.
202. Hilderink J, Spijker S, Carlotti F, Lange L, Engelse M, van Blitterswijk C, et al. Controlled aggregation of primary human pancreatic islet cells leads to glucose-responsive pseudoislets comparable to native islets. *J Cell Mol Med.* août 2015;19(8):1836-46.
203. Hoang D-T, Matsunari H, Nagaya M, Nagashima H, Millis JM, Witkowski P, et al. A conserved rule for pancreatic islet organization. *PLoS ONE.* 2014;9(10):e110384.
204. Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M. Islet architecture: A comparative study. *Islets.* oct 2009;1(2):129-36.
205. Kilimnik G, Jo J, Periwal V, Zielinski MC, Hara M. Quantification of islet size and architecture. *Islets.* avr 2012;4(2):167-72.

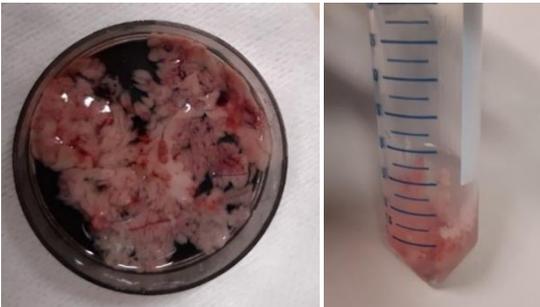
Annexes

Annexe 1. Procédure d'isolement d'îlots pancréatiques de rat

A : Chirurgie abdominale et injection de collagénase



B : Pancréas et digestion



C : Purification par un gradient discontinu de Ficoll®



- ← Phase : PBS, 5mL
- ← Débris cellulaires
- ← Phase Ficoll® 3 (densité = 1,068), 10mL
- ← Majorité des îlots
- ← Phase Ficoll® 2 (densité = 1,096), 10mL
- ← Gros îlots
- ← Phase Ficoll® 1 (densité = 1,108), 12mL

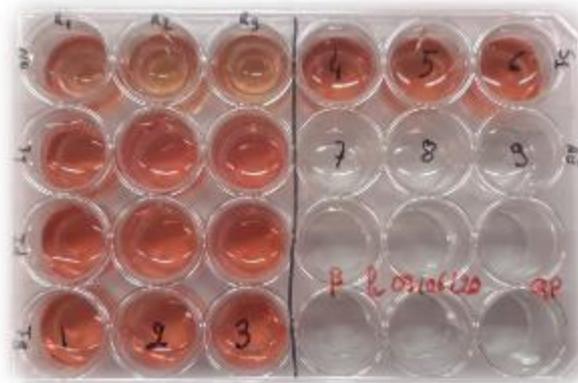
Annexe 2. Plaque d'agarose et tests d'incubation statique

A : Moules de micro-puits (à gauche) et plaque 256 micro-puits d'agarose (à droite)



Sur la gauche on observe le moule permettant de faire la plaque d'agarose avec 256 micro-puits présent sur la droite

B : Plaque d'incubation statique



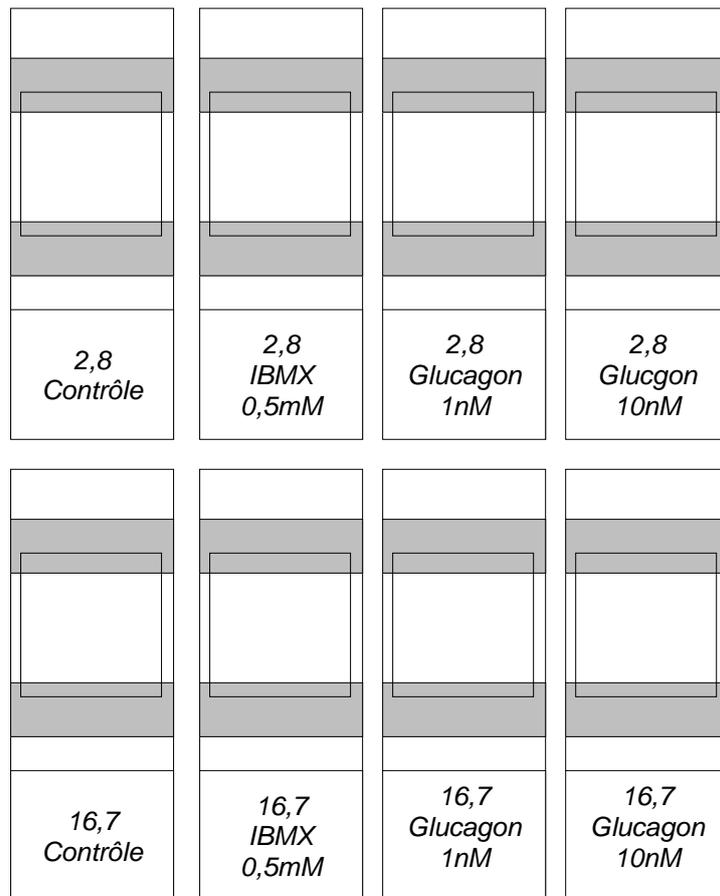
Les cellules sont mises dans les inserts durant la nuit au niveau de la 1^{ère} ligne, puis les inserts sont passés dans des bains successifs de concentration croissante de glucose pour enfin être placés dans la dernière ligne qui contient de l'éthanol absolu.

Annexe 3. Chambre de Cunningham



La lamelle est déposée entre 2 adhésifs double face afin d'obtenir une chambre d'un volume de 60 à 70 μ L

Annexe 4. Schématisation des conditions de RHPA



La première ligne de lame représente les conditions en 2,8mM glucose, la seconde ligne de lame représente les conditions en 16,7mM glucose



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Quentin PERRIER

RÔLE DES INTERACTIONS CELLULAIRES SUR LES SECRETIONS
HORMONALES DANS LES ÎLOTS PANCREATIQUES

RÉSUMÉ :

Introduction / Objectifs : Les cellules α , β et δ des îlots pancréatiques permettent la régulation de la glycémie via le glucagon, l'insuline et la somatostatine. Le but de ce travail est d'étudier l'impact des interactions cellulaires et paracrines sur la sécrétion hormonale de pseudo-îlots et cellules isolées. **Méthode** : Nous avons isolé des cellules de rat, qui ont été purifiées par FACS. Ensuite nous avons réalisé un test de sécrétion en réponse au glucose par incubation statique sur des pseudo-îlots, mais également évalué la sécrétion d'insuline de cellules isolées par un test de sécrétion par plaque (RHPA). **Résultats** : Il n'y a pas eu de différence de sécrétion du glucagon entre les différents pseudo-îlots. Pour l'insuline, il y a eu une sécrétion anormalement plus faible pour les pseudo-îlots mix β -non β par rapport aux pseudo-îlots β en haut glucose. En revanche, il n'y a pas eu de différence de sécrétion entre les pseudo-îlots mix β - α et β . Par RHPA, les doublets α - β n'ont pas formé davantage de plaque de lyse par rapport aux cellules β . **Discussion** : L'effet potentialisateur des cellules α sur la sécrétion d'insuline décrit chez l'humain, n'est pas retrouvé chez le rat. Cette divergence entre l'humain et le rongeur est concordante avec la différence de proportions cellulaires, d'architecture et de types d'interaction cellulaire (homotypique chez le rongeur vs hétérotypique chez l'humain). Afin de poursuivre l'exploration de l'impact des contacts cellulaires sur la sécrétion hormonale des îlots pancréatiques, il conviendra d'étudier l'impact de la cellule δ , puis de répéter ces expériences avec des cellules humaines avant d'envisager une approche *in vivo*.

MOTS CLÉS : Îlots pancréatique, Pseudo-îlots, RHPA, Interactions paracrines, Contact cellulaire, Tri cellulaire, Incubation statique

FILIÈRE : Pharmacie Hospitalière – Pratique et Recherche