

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE
Université Lille 2 Droit et Santé

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2
en physiologie et physiopathologie

**Rôle des acides biliaires et de leur récepteur TGR5
dans la régulation de la somatostatine pancréatique
et intestinale: conséquences fonctionnelles sur les îlots
pancréatiques humains**

Gurvan QUENIAT

Thèse dirigée par Madame la Professeure Julie Kerr-Conte
Soutenue le 9 septembre 2015

Devant le jury composé de :

Monsieur le Praticien Hospitalier Gaetan Prévost : Rapporteur
Monsieur le Professeur Patrick Gilon : Rapporteur
Monsieur le Docteur Pierre-Damien Denechaud : Examineur
Madame la Doctorante Caroline Bonner : Examineur
Madame la Professeure Anne Muhr-Tailleux : Examineur

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
REMERCIEMENTS	5
RESUME.....	8
ABSTRACT	11
ABBREVIATIONS	13
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	16
Introduction générale	17
Le pancréas: structure et fonction	19
I. Le pancréas et l'îlot de Langerhans	19
II. Syndrome métabolique et diabète	21
A. Le syndrome métabolique	21
B. Les diabètes.....	23
C. L'insulino-résistance.....	24
III. Plasticité pancréatique.....	25
A. Cas d'obésité.....	26
B. Cas de diabète de type 2	27
L'hormone somatostatine	29
I. Découverte et caractérisation	29
II. La somatostatine, un modulateur paracrine de la fonction endocrine pancréatique .	31
A. Les récepteurs de la somatostatine dans l'îlot de Langerhans	32
B. Sécrétion et action de l'hormone somatostatine.....	34
C. Sécrétion et action dans des conditions pathologiques	37
D. Traitement des diabètes	39
Les acides biliaires et leurs récepteurs.....	40
I. Synthèse et circulation entéro-hépatique	40
A. Acides biliaires primaires et secondaires	40
B. Circulation entéro-hépatique	42
II. Le récepteur membranaire aux acides biliaires TGR5	43
A. Structure.....	44
B. Expression du récepteur aux acides biliaires, TGR5	48
C. Ligands du récepteur TGR5	49
a. Ligands naturels.....	49
b. Ligands synthétiques et semi-synthétiques.....	50
D. Rôles du récepteur TGR5	52
a. TGR5 et inflammation.....	53
b. TGR5, homéostasie et métabolisme	55
c. TGR5 et pancréas	58
CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET HYPOTHESE DE TRAVAIL.....	60
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET MÉTHODES	62
Modèles utilisés.....	63
I. Ilots de Langerhans humains.....	63
A. Isolement des îlots de Langerhans humains.....	63
II. Les modèles murins.....	64
D. Souris C57B6j.....	64

E. Souris Knock-Out pour le gène de la somatostatine (Laboratoire du Professeur Gilon).....	64
F. Souris Knock-Out pour le gène du récepteur TGR5 (collaboration avec le Professeur Schoonjans)	64
G. Isolement et culture des îlots de Langerhans de souris.....	65
III. Lignées cellulaires.....	65
A. Cellules murines pancréatiques TGP52 (ATCC).....	65
B. Cellules murines pancréatiques MIN6 (collaboration avec le Professeur Abderrahmani).....	66
C. Cellules 804G	66
Tests fonctionnels et modulation de l'expression génique.....	67
I. Culture et évaluation des îlots de Langerhans isolés.....	67
II. Knock-down du gène de TGR5 (GPBAR1) par la technique des petits ARN interférences	69
III. Détermination de l'apoptose et de la nécrose dans une préparation d'îlots de Langerhans.....	70
IV. Détermination de l'efficacité des agonistes de TGR5 (collaboration avec le Professeur Staels).....	71
V. Sécrétions et contenus intracellulaires	72
Expression génique et protéique.....	74
I. Préparation tissulaire	74
II. Etude de l'expression transcriptionnelle (ARN).....	74
A. Lyse cellulaire.....	74
B. Extraction / purification des ARN messagers	75
C. RT-PCRq	75
III. Etude de l'expression protéique.....	76
A. Lyse cellulaire / conditionnement tissulaire.....	76
B. Extraction / purification des protéines.....	77
C. Western-blot.....	77
D. Dosages immunologiques	78
E. Immunohistochimie.....	78
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	80
Le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ pancréatiques et module l'activité endocrine pancréatique (papier soumis et révisé)	81
I. Le récepteur TGR5 est exprimé dans le pancréas endocrine	82
II. Le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ pancréatiques et intestinales	84
A. Le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ pancréatiques chez l'humain, la souris et le minipig.....	84
B. Le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ intestinales	88
C. Le récepteur aux acides biliaires TGR5 est exprimé dans des lignées cellulaires pancréatiques et intestinales	90
III. Les expressions de TGR5 et de la somatostatine sont corrélées dans des conditions pathologiques	93
A. Les expressions de TGR5 et de la somatostatine sont modulées et corrélées dans les îlots de Langerhans de sujets contrôles, obèses et diabétiques de type 2	93
B. Les diabétiques de type 2 présentent une augmentation de la proportion de cellules delta pancréatiques exprimant le récepteur TGR5	98
C. L'expression de TGR5 et de la somatostatine sont associées dans des modèles d'hyperglycémie	100

D. L'expression de TGR5 est augmentée dans les cas de somatostatine humaine	102
IV. La modulation de l'expression de TGR5 par siRNA dans les îlots de Langerhans humains et dans la lignée delta pancréatique TGP52 régule l'expression de la somatostatine.....	104
V. L'activation de TGR5 par des agonistes spécifiques module la sécrétion des hormones pancréatiques humaines.....	107
A. Optimisation des tests de sécrétions hormonaux avec des agonistes du récepteur TGR5 sur des îlots humains isolés.....	107
B. L'activation du récepteur TGR5 par différents agonistes spécifiques stimule la sécrétion de la somatostatine pancréatique.....	109
C. L'activation du récepteur TGR5 par un agoniste spécifique stimule la sécrétion de l'insuline.....	112
D. L'activation du récepteur TGR5 à long terme sur des îlots de Langerhans en culture n'a pas d'impact significatif sur l'expression transcriptionnelle des principales hormones pancréatiques.....	114
VI. Recherche d'un modèle d'étude du mécanisme impliquant le récepteur TGR5 dans la modulation de la somatostatine pancréatique.....	116
A. La lignée cellulaire murine TGP52 : un modèle delta pancréatique exprimant le récepteur TGR5.....	116
B. La lignée humaine Endoc cell line : un modèle bêta pancréatique exprimant le récepteur TGR5 (collaboration avec le Pr Scharfmann).....	117
C. Etude des souris Knock-out pour le gène de la somatostatine (SST KO) (Pr Gilon).....	119
D. Etude pancréatique des souris knock-out pour le gène du récepteur TGR5 (TGR5 KO) (collaboration Pr Schoonjans).....	122
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	125
CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	136
CHAPITRE 6 : PUBLICATIONS HORS SUJET DE THÈSE.....	139
Etude de la régulation et de l'expression du transporteur du zinc ZNT8 dans les îlots pancréatiques humains (PMID : 22582094).....	140
Etude de la régulation de la sécrétion d'insuline dans les cellules INS1-E par mTORC1 et mTORC2 via un mécanisme Akt dépendant (PMID : 23092880).....	142
Utilisation d'une méthode digitale automatique pour déterminer la masse des îlots pancréatiques dans le but d'améliorer l'efficacité et la reproductibilité des paramètres d'évaluation de la population d'îlots à but de greffe (PMID : 23635395).....	145
Etude de l'expression et du rôle du transporteur du glucose SGLT2 dans les cellules alpha pancréatique et sur la sécrétion du glucagon (PMID: 25894829).....	147
Fischer 344 Rat : A preclinical Model for Epithelial Ovarian Cancer Folate-Targeted Therapy (PMID : 26244757).....	149
BIBLIOGRAPHIE.....	151
ANNEXES.....	159

REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier l'unité de recherche, anciennement U859 biothérapies du diabète et nouvellement renommée UMR 1190 recherche translationnelle sur le diabète qui m'a accueilli, et cela depuis mon Master 2 recherche dans la réalisation de ma formation universitaire et de mon travail de thèse. Je remercie son directeur le Professeur François Pattou, pour son soutien, son aide et son expertise scientifique tout au long de mon travail malgré les difficultés rencontrées.

Je voudrais remercier mon directeur de thèse le Professeur Julie Kerr-Conte, de m'avoir encadré durant ces années de thèse et m'avoir permis de continuer mon travail de recherche après le départ de mon ancien directeur de thèse. Je la remercie pour son temps, son soutien et son support scientifique journalier ainsi que son aide dans l'obtention de collaborations scientifiques utiles à mon projet.

J'aimerais plus particulièrement remercier l'ingénieur de recherche Valéry Gmyr, pour son encadrement et son aide durant les 4 années passées dans ce laboratoire. Je le remercie de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et pour m'avoir formé à la quasi-totalité des techniques et des protocoles de recherches utilisés durant mon travail de thèse. Je le remercie de m'avoir épaulé pour un grand nombre d'expériences et pour m'avoir aidé à les interpréter et les comprendre. Je le remercie de m'avoir toujours soutenu tout au long de mon travail malgré les difficultés que nous avons rencontrées. Je le remercie aussi d'avoir toujours trouvé les mots pour m'aider à surmonter les moments difficiles et surtout pour sa légendaire bonne humeur.

Je remercie également mon encadrante durant ces derniers mois, Caroline Bonner, qui m'a épaulé, soutenu, aidé scientifiquement, dans le but de terminer mon travail de thèse dans les meilleures conditions. Je la remercie de m'avoir aidé dans la réflexion, la réalisation et la

rédaction de mon travail scientifique et de la publication qui en est née. Je la remercie de m'avoir permis de participer à l'aventure de son *Nature Medecine*, que nous avons publié cette année et qui m'a permis de goûter aux différentes phases psychologiques par lesquelles une équipe de recherche doit passer pour pouvoir publier dans de grandes revues scientifiques. Je la remercie pour son support humain et pour m'avoir aidé à surmonter les moments difficiles. Je voudrais également la remercier de m'avoir permis d'améliorer considérablement et significativement mon niveau d'anglais.

Je remercie également l'ensemble des personnels, techniciens, ingénieurs et les étudiants : Cédric, Julien, Nathalie, Ericka, Isanga, Bruno, Valérie, Sandrine, Rhimed, Audrey, Thomas, Laurence, Saska, Nicole, Laure, Raf et Raphy, Renée, Justine, Helene, Gregory, Medhi, Valéria, Sami, Nabil, pour leur soutien leur aide et les fous rires tout au long de ces années. Je remercie les équipes d'isolement d'îlots de Langerhans et d'évaluation de m'avoir formé puis aidé à la réussite de mes expériences basées sur l'isolement et l'utilisation des îlots de Langerhans humains. Je les remercie également pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la résolution des soucis quotidiens que le travail de recherche peut apporter.

Je tiens également à remercier mon premier directeur de thèse, le maître de conférences Bruno Lefebvre sans qui je n'aurais jamais pu commencer ce travail de thèse et qui m'a soutenu et encadré durant mon Master 2 recherche et les premiers mois de ma thèse. Je le remercie aussi pour son ouverture d'esprit et pour nos longues discussions scientifiques.

Je remercie pour son aide ainsi que pour son support scientifique le Professeur Bart Staels qui a participé par notre travail collaboratif, et par sa disponibilité, à la réalisation ainsi qu'à la rédaction de mon travail de thèse.

Je remercie également l'ensemble de nos collaborateurs en commençant par les Professeurs Amar Abderhammani, Anne Tailleux, Sophie Lestavel, Patrick Gilon, Thomas

Bouckenooghe, Kristina Schoonjans et Raphael Scharfmann, avec lesquels nous avons réalisé des collaborations indispensables à mon travail de thèse ainsi que l'ensemble des chercheurs qui m'ont aidé et transmis leur goût de la recherche tels qu'Oliver, Jean Sébastien et Medhi.

Finalement, je tiens à remercier toute ma famille et plus particulièrement ma fiancée, Élise, qui a toujours été là pour moi dans les bons et les moins bons moments et qui m'a apporté son aide dans la rédaction et la correction de mon manuscrit de thèse. Il n'y a pas assez de mots pour te dire à quel point t'avoir eu à mes côtés durant ces années m'a permis de garder la motivation et la foi en mon travail.

Ce travail de thèse et ces 4 années passées au sein de mon unité de recherche m'ont appris de nombreuses choses sur le monde la recherche et sur moi-même. Elles m'ont permis de me familiariser avec la recherche et le travail d'équipe. Elles m'ont fait vivre de bons et de moins bons moments que ce soit d'un point de vue scientifique ou d'un point de vue humain et m'ont permis de mieux me connaître et surtout de remettre mes projets en question. Ces 4 années auront eu un impact considérable sur ma vie et constitueront à jamais un grand changement dans ma façon d'être et de fonctionner et constitue une étape fondatrice de mes projets futurs.

RESUME

Le rôle des acides biliaires a évolué ces dernières années passant de simples molécules solubilisatrices des lipides à des composés à activité métabolique. En plus de leur fonction dans l'absorption des lipides post-repas, ils ont été montrés comme stimulant de nombreuses voies de signalisation modulant l'expression de gènes clefs du métabolisme et de nombreux mécanismes physiologiques via l'activation de récepteurs spécifiques tels que les récepteurs « Farnesoid X receptor » (FXR) et le récepteur membranaire couplé à une protéine G, TGR5.

La protéine TGR5 codée par le gène GPBAR1, aussi connue sous le nom de « G-protein-membrane-type receptor for bile acids » (M-BAR) est le premier récepteur couplé à une protéine G spécifique aux acides biliaires ayant été mis en évidence. Cette protéine est exprimée dans de nombreux tissus clefs du métabolisme énergétique tels que les cellules L intestinales, le tissu adipeux, les reins, le muscle squelettique et le pancréas. En réponse à la fixation des acides biliaires au récepteur TGR5, celui-ci va être internalisé et sa sous-unité $G\alpha S$ va être libérée. Ce mécanisme va ensuite activer l'adénylate cyclase et augmenter la production d'AMPc à l'origine de l'activation des voies de signalisations liées à la protéine kinase A (PKA). Une fois activée, la PKA va induire la phosphorylation des protéines « cAMP-response element-binding » (CREB) et permettre la modulation de l'expression de gènes cibles.

Ces dernières années de nombreux travaux ont eu pour but d'étudier le rôle du récepteur TGR5 dans le métabolisme. Chez la souris, l'activation du récepteur TGR5 stimule la dépense énergétique dans le tissu adipeux brun et dans le muscle squelettique et prévient le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance induites par un régime riche en graisses. Le récepteur TGR5 est également impliqué au niveau des cellules L intestinales sécrétrices du

GLP-1. Il y joue un rôle essentiel dans l'homéostasie glucidique via la régulation de l'activité pancréatique, des sécrétions de l'insuline et du glucagon, de l'inhibition de la vidange gastrique ou encore de la modulation des messages de satiété via des voies neuroendocrines. TGR5 présente également des fonctions immunologiques avec une expression connue dans les cellules de l'immunité telles que les monocytes, les macrophages alvéolaires ou encore les cellules de Kupffer. TGR5 a également été mis en évidence comme régulateur des mécanismes d'inflammations via les macrophages avec une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. A l'opposé, l'activation de TGR5 serait impliquée dans de nombreux processus pathologiques tels que, le développement de carcinomes gastro-intestinaux, les pancréatites, la lithiase biliaire, suggérant un rôle potentiel du récepteur TGR5 dans la régulation de voies de signalisation responsables de la prolifération et de la mort cellulaire.

Plusieurs études ont montré que les acides biliaires pouvaient moduler la fonction pancréatique via des mécanismes directs et indirects. En effet, le récepteur aux acides biliaires FXR est exprimé dans les cellules bêta pancréatiques et régule la production et la sécrétion de l'insuline [14]. Kumar et coll. [15] ont montré que le récepteur TGR5 est exprimé dans le pancréas et que son activation par des agonistes spécifiques (INT-777, acide oléanolique (OA)) régule la sécrétion de l'insuline. Néanmoins, l'expression et la localisation cellulaire du récepteur TGR5 dans le pancréas doivent être déterminées, ainsi que la détermination de son rôle précis dans l'îlot de Langerhans. De même, l'expression de TGR5 dans des conditions pathologiques telles que le diabète de type 2 reste inconnue.

Le but de mon travail de thèse a été de mettre en évidence l'expression du récepteur TGR5 dans le pancréas et les îlots de Langerhans isolés de sujets sains, de sujets diabétiques de type 2 et/ou obèse. Nous avons ensuite étudié l'impact de la modulation de l'expression et de l'activation de ce récepteur dans différents modèles cellulaires pour identifier le rôle de TGR5

dans la régulation de l'activité pancréatique et la modulation des sécrétions pancréatiques endocrines.

ABSTRACT

Bile acids (BAs) have evolved over the years from being considered as simple lipid solubilizers to metabolically active molecules. In addition to their function in dietary lipid absorption, they have also been shown to activate farnesoid X receptor (FXR) and TGR5 receptors to initiate signaling pathways and regulate metabolic gene transcription. TGR5 (encoded by the GPBAR1 gene), also known as G-protein-membrane-type receptor for bile acids (M-BAR) or G-protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1), was the first identified G-protein coupled receptor specific for bile acids. In normal individuals, the highest level of GPBAR1 mRNA expression was reported in the gallbladder, placenta and spleen, followed by moderate expression in other tissues including lungs, liver, stomach, small intestine and adipose tissue, with a relatively low level of expression in kidney, skeletal muscles and pancreas. In response to binding of BAs to the ligand-binding pocket of the TGR5 protein, the TGR5 receptor is internalized and the G α S subunit is released. This mechanism leads to activation of adenylate cyclase and an increase in cAMP production resulting in induction of the protein kinase A (PKA) pathway. Subsequently, PKA phosphorylates the cAMP-response element-binding protein (CREB) and enhances the transcription of its target genes in response to extracellular signals.

To date, extensive work has been done to investigate the role of TGR5 in metabolism. In rodents, BA-activated TGR5 receptor stimulates energy expenditure in brown adipose tissue and skeletal muscle and prevents obesity and insulin resistance induced by a high fat diet. TGR5 is also implicated in intestinal L-cells secreted GLP-1, which plays an essential role in glucose homeostasis through the stimulation of glucose-dependent-insulin-secretion and

inhibition of glucagon secretion, inhibition of gastric emptying and increasing satiety through neuroendocrine pathways. In terms of the immunological function of TGR5, it is now known that TGR5 is expressed in several immune cells such as monocytes, alveolar macrophages and Kupffer cells. The beneficial effects of TGR5 on macrophage-driven inflammation include reduced proinflammatory cytokine expression, thus protecting against atherosclerosis and liver steatosis. On the contrary, TGR5 activation has also been implicated in itch and analgesia, gastrointestinal-tract cell carcinogenesis, pancreatitis, and cholelithiasis, suggesting a potential role for TGR5 as a regulator of signal transduction pathways responsible for cell proliferation and apoptosis.

BAs may also influence islet function via both direct and indirect mechanisms as recent studies have shown that Farnesoid X receptor (FXR) is expressed by pancreatic beta cells, and regulates insulin signaling in cultured cell lines. Kumar et al., [15] also reported that the TGR5 agonists INT-777 + oleanolic acid (OA) stimulated glucose-mediated insulin release via TGR5 activation, also in cultured cells. Still, little is known about the regulation of TGR5 expression or its involvement in pancreatic hormone secretion in response to physiological or pathological conditions such as T2D, as these studies have been performed mainly in cultured cell lines. In these contexts, the biological function of TGR5 remains enigmatic.

The aim of the present study was first to establish the specific expression of TGR5 in human pancreatic islet cell subtypes. Then, a cross-sectional cohort of human islets isolated from individuals with various degrees of insulin resistance was exploited to determine if TGR5 expression and function was modified in T2D. Finally to determine if targeting TGR5 is clinically relevant, human islets were treated in-vitro with a specific agonist of TGR5 or with siRNA directed against TGR5 and hormone secretion assessed to establish whether TGR5 activation or inhibition modulate pancreatic hormone secretion.

ABBREVIATIONS

1722-5	Agoniste commercial de TGR5 fourni par Biovision
6 α -ethyl-23 (S)-cholic acid	S-EMCA / INT-777
ABCB11	ATP-binding cassette B11
ABCB4	ATP-binding cassette B4
ABCG5	ATP-binding cassette G5
ABCG8	ATP-binding cassette G8
AC	Adenylyl cyclase
AHA	American Heart Association
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ASBT	Sodium-dependent bile salt transporter
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
ATP III	Adult treatment panel III
BACS	Bile acid:CoA synthase
BAR	Récepteurs aux acides biliaires
BaT	Bile acid:amino transferase
BSEP	Bile salt export protein
C ₂₇ 3 β -HSD	3 β -hydroxy- Δ 5-C ₂₇ steroid oxidoreductase
CA	Acide cholique
CCK	Cholécystokinine
CDCA	Acide chénodésoxycholique
CST	Cortistatine
CYP27A1	Sterol 27-hydroxylase
CYP7A1	Cholesterol 7 α -hydroxylase
DCA	Acide déoxycholique
DID	Diabète insulino-dépendant
DNID	Diabète non insulino-dépendant
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
FFA	Acide gras libre (Free fatty acid)

FSH	Hormone folliculo-stimulante
FXR / RIP-14	Farnesoid X receptor / RXR-interacting protein 14
<i>GCG</i>	Gène humain du glucagon
<i>Gcg</i>	Gène murin du glucagon
GCG	Glucagon
GH	Growth hormone
GHIH	Growth hormone inhibiting hormone
GLP-1	Glucagon like petide-1
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
<i>GPBAR1</i>	Gène humain de TGR5
<i>Gpbar1</i>	Gène murin de TGR5
GSIS	Glucose Stimulated Insulin Secretion
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HGH	Hormone de croissance humaine (human growth hormone)
I-BABP	Intestinal bile acid binding protein
IDF	Fédération internationale du diabète
IE	Ilôt équivalent
IMC	Indice de masse corporelle
<i>INS</i>	Gène humain de l'insuline
<i>Ins</i>	Gène murin de l'insuline
INS	Insuline
IRS	Somatostatine immune-réactive circulante
LCA	Acide lithocholique
LH	Hormone lutéïnisante
MBAR / GP-BAR1 / TGR5	Récepteur membranaire couplé à une protéine G TGR5
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood institute
OA	Acide oléanolique
OMS	Organisation mondiale de la santé
PI-3-K	phosphoinositide-3-kinase
PLC	Phospholipase C
PSS1	Prepro-somatostatine 1
PSS2	Prepro- somatostatine 2

Rho-GEF	Rho-guanine nucleotide exchange factor
RXR	Retinoïd X Receptor
SRIF	Somatotropin-Release-Inhibiting Factor
SS-14	Somatostatine 14
SS-28	Somatostatine 28
SS1	Somatostatine 1
SS3	Somatostatine 2
<i>SST</i>	Gène humain de la somatostatine
<i>Sst</i>	Gène murin de la somatostatine
SST	Somatostatine
TSH	Hormone thyroïdo-stimulante
VIP	Vasoactive intestinal peptide

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Introduction générale

Le corps humain est composé de 10 principaux systèmes nous permettant de penser (système nerveux), de nous déplacer (systèmes squelettique et musculaire), d'alimenter, de drainer et d'activer nos tissus (systèmes circulatoires, lymphatiques, respiratoires, digestifs, excréteurs), de les faire communiquer entre eux (système endocrine) et également de transmettre notre patrimoine génétique et donc d'assurer notre descendance (système reproducteur). La dérégulation des mécanismes permettant le maintien de l'équilibre qui existe entre ces systèmes peut conduire au développement de pathologies. Les pathologies sont le plus souvent multisystémiques, touchant à la fonction de nombreux systèmes et peuvent mener à une dysfonction générale de l'organisme pouvant causer la mort.

Dans cette thèse nous nous sommes intéressés à la dérégulation de l'un de ces systèmes : le système endocrinien. Ce système est composé de nombreux organes sécréteurs (glandes) qui ont pour rôle de maintenir un équilibre physiologique interne en réponse aux modifications environnementales (homéostasie). Les glandes endocrines sont caractérisées par leur importante innervation et vascularisation. Les principales glandes endocrines du corps humain sont : l'hypothalamus, l'épiphyse (glande pinéale), l'hypophyse (glande pituitaire), la thyroïde, le système digestif, les reins, les glandes surrénales, le système reproducteur, les parathyroïdes, la peau et le pancréas.

Le système endocrinien a pour rôle la sécrétion de molécules appelées hormones. Les hormones ont de nombreuses fonctions spécifiques : la régulation de la croissance et du développement ; la régulation de la production de l'utilisation et du stockage de l'énergie ; le maintien de l'équilibre interne du corps et la régulation de la fonction de reproduction.

Les hormones sont des molécules chimiques agissant à distance via leur sécrétion dans

le sang et sont divisées en trois classes chimiques : les hormones peptidiques (exemples : insuline, glucagon, somatostatine), les hormones dérivées de lipides ou de phospholipides (exemples : testostérone, cortisol) et les hormones dérivées d'acides aminés aromatiques. La synthèse et la sécrétion de ces hormones sont régulées par différents mécanismes : l'action d'autres hormones, l'action du système nerveux et les modulations de concentrations en certains solutés dans le sang (exemples : ions, nutriments organiques).

Les hormones vont circuler dans le sang passivement diluées dans le plasma si elles sont hydrosolubles (hormones protéiques, peptidiques et catécholamines), ou transportées liées à des protéines de transport comme l'albumine ou les globulines si elles sont liposolubles (stéroïdiennes et thyroïdiennes). Elles vont agir sur des cellules dites cellules cibles par deux principaux mécanismes d'action:

- Via des récepteurs membranaires, pour les hormones hydrosolubles (peptidiques, protéiques et catécholamines) qui en réponse à la fixation d'une hormone va interagir avec d'autres molécules pour induire la formation de seconds messagers (l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), l'activité protéine kinase, le calcium et/ou les phosphoinositides).
- Via des récepteurs intracellulaires, pour les hormones liposolubles (stéroïdiennes et thyroïdiennes). Une fois dans la cellule et fixé à son récepteur, le complexe hormone-récepteur aura pour fonction de se fixer dans les régions promotrices de gènes cibles pour moduler leurs expressions et ainsi modifier le phénotype cellulaire.

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à l'interaction entre deux organes du système endocrinien qui sont le foie qui produit et sécrète les acides biliaires, et le pancréas qui régule par la production des hormones endocrines la production, l'utilisation et le stockage du glucose.

Le pancréas: structure et fonction

I. Le pancréas et l'îlot de Langerhans

Le pancréas est une glande digestive et neuroendocrine produisant des enzymes digestives (pancréas exocrine) et des hormones (pancréas endocrine). Le pancréas est divisé en lobules et est composé de deux principaux tissus, le tissu exocrine qui représente environ 99% du pancréas total et le pancréas endocrine qui représente environ 1% du pancréas.

À l'état embryonnaire, les tissus exocrine et endocrine sont formés à partir de la différenciation de deux bourgeons épithéliaux (dorsal et ventral) qui vont fusionner et former les différents types cellulaires pancréatiques (progéniteurs ductaux et acineux qui vont former les cellules ductales et acineuses; les progéniteurs endocriniens qui vont donner les cellules alpha/bêta/delta/PP pancréatiques) via la modulation de l'expression de différents facteurs de transcription [16, 17].

Le tissu endocrine pancréatique est composé de structures pluricellulaires hautement vascularisées et innervées, appelées îlots de Langerhans. Le pancréas humain contient entre 0,1 et 1 million d'îlots de Langerhans. Chaque îlot est composé d'approximativement 2500 cellules et de 5 principaux types cellulaires endocrines : les cellules bêta (β) sécrétant l'insuline, les cellules alpha (α) sécrétant le glucagon, les cellules delta (δ) sécrétant la somatostatine, les cellules PP sécrétant le polypeptide pancréatique et les cellules à ghréline sécrétant la ghréline (Figure 1). Chaque hormone produite par un type cellulaire endocrine pancréatique a un impact spécifique sur la régulation du métabolisme glucidique.

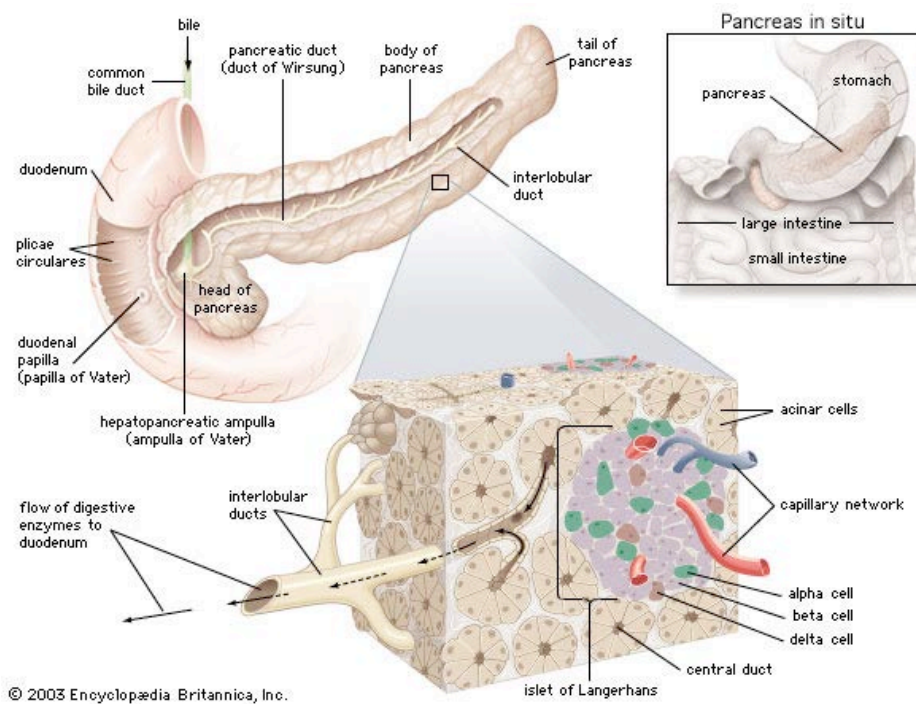


Figure 1 : structure du pancréas. Schéma présentant la localisation anatomique et la structure du pancréas (extrait du site Encyclopaedia Britannica).

Chaque îlot présente une structure spécifique, qui sera différente d'un îlot à un autre au sein d'un même pancréas (taille, répartition au niveau de la tête, du corps et de la queue du pancréas), différente entre deux pancréas d'une même espèce (hétérogénéité interindividuelle) et entre deux pancréas d'espèces différentes [13]. De plus, le contexte physiologique du sujet donneur du pancréas (indice de masse corporelle (IMC), âge, hémoglobine glyquée (HbA1c)) contribue à la variabilité architecturale de l'îlot [18]. La taille, la répartition (tête, corps, queue), la vascularisation ainsi que l'innervation des îlots sont d'autant plus de paramètres complexifiant la structure du pancréas [18, 19]. Pour illustrer cette complexité architecturale et pour montrer le paradoxe actuel de la recherche sur la physiologie de l'îlot, de nombreuses études ont montré des différences architecturales significatives entre l'îlot humain et murin. Plus précisément, l'îlot murin présente un corps composé de cellules β représentant 60 à 80% de la masse totale de l'îlot et un manteau externe composé de cellules α et δ pancréatiques qui

représentent respectivement 15 à 20% et moins de 10% de la masse de l'îlot. En comparaison à l'îlot murin, l'îlot humain présente une tout autre architecture avec une plus grande variabilité de la répartition et de la proportion des différentes populations pancréatiques : 54% de cellules β , 36% de cellules α et 10% de cellules δ . Ces différences en terme de structure vont au-delà de simples différences architecturales, mais impliquent des différences d'interactions cellules-cellules entre les populations endocrines et des mécanismes paracrines différents chez ces deux espèces. D'autre part, de nombreuses études ont montré une part très importante de l'innervation et de la vascularisation dans la régulation des sécrétions hormonales. Concernant la vascularisation, des études ayant cherché à déterminer le niveau d'irrigation de l'îlot ont montré que via le système sanguin artériel (petites artéioles passant à travers le manteau de l'îlot par des pores), l'irrigation se fait d'abord au niveau du corps de l'îlot régulant principalement l'activité des cellules β pancréatiques puis, via un système de capillaires sanguins, le sang ainsi que l'insuline sécrétée vont venir irriguer les cellules du manteau de l'îlot et ainsi moduler l'activité des cellules α et δ (majoritairement présentes à la périphérie de l'îlot) [20-22].

II. Syndrome métabolique et diabète

A. Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est un sujet de santé publique, du fait de sa forte prévalence et de l'importance de son dépistage aussi bien à l'échelle d'un pays, permettant la mise en place de programmes spécifiques, qu'à l'échelle individuelle dans le but de traiter un

patient en connaissant les facteurs de risques pouvant s'appliquer à son cas (prise en compte des paramètres environnementaux et familiaux). Le syndrome métabolique est le nom donné à un groupe de facteurs de risques liés entre eux et étant démontrés comme augmentant la prévalence des maladies coronaires, cardio-vasculaires et du diabète. Plusieurs définitions du syndrome métabolique ont été proposées. La première fut définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1998 dans le cadre d'une mise à niveau de la définition du diabète [23]. Celle-ci définissait le syndrome métabolique comme une association de marqueurs de l'insulino-résistance et d'au moins 2 autres marqueurs parmi lesquels l'obésité, l'hypertension, l'hypertriglycéridémie, une diminution du taux de HDL ou encore une microalbuminémie. En 2001, une étude effectuée par le « National Cholesterol Education Program » et nommée « Adult Treatment Panel III (ATP III) » a amené à la modification de cette première définition.

TABLE 1. ATP III Clinical Identification of the Metabolic Syndrome

Risk Factor	Defining Level
Abdominal obesity, given as waist circumference*†	
Men	>102 cm (>40 in)
Women	>88 cm (>35 in)
Triglycerides	≥150 mg/dL
HDL cholesterol	
Men	<40 mg/dL
Women	<50 mg/dL
Blood pressure	≥130/≥85 mm Hg
Fasting glucose	≥110 mg/dL‡

*Overweight and obesity are associated with insulin resistance and the metabolic syndrome. However, the presence of abdominal obesity is more highly correlated with the metabolic risk factors than is an elevated BMI. Therefore, the simple measure of waist circumference is recommended to identify the body weight component of the metabolic syndrome.

†Some male patients can develop multiple metabolic risk factors when the waist circumference is only marginally increased, eg, 94 to 102 cm (37 to 39 in). Such patients may have a strong genetic contribution to insulin resistance. They should benefit from changes in life habits, similarly to men with categorical increases in waist circumference.

‡The American Diabetes Association has recently established a cutpoint of ≥100 mg/dL, above which persons have either prediabetes (impaired fasting glucose) or diabetes.¹⁴ This new cutpoint should be applicable for identifying the lower boundary to define an elevated glucose as one criterion for the metabolic syndrome.

TABLE 2. WHO Clinical Criteria for Metabolic Syndrome*

Insulin resistance, identified by 1 of the following:
<ul style="list-style-type: none"> ● Type 2 diabetes ● Impaired fasting glucose ● Impaired glucose tolerance ● or for those with normal fasting glucose levels (<110 mg/dL), glucose uptake below the lowest quartile for background population under investigation under hyperinsulinemic, euglycemic conditions
Plus any 2 of the following:
<ul style="list-style-type: none"> ● Antihypertensive medication and/or high blood pressure (≥140 mm Hg systolic or ≥90 mm Hg diastolic) ● Plasma triglycerides ≥150 mg/dL (≥1.7 mmol/L) ● HDL cholesterol <35 mg/dL (<0.9 mmol/L) in men or <39 mg/dL (1.0 mmol/L) in women ● BMI >30 kg/m² and/or waist:hip ratio >0.9 in men, >0.85 in women ● Urinary albumin excretion rate ≥20 μg/min or albumin:creatinine ratio ≥30 mg/g

*Derived from Alberti et al.^{7,8}

Figure 2 : critères cliniques définissant le syndrome métabolique. La table 1 présente les critères cliniques permettant le diagnostic du syndrome métabolique selon l'ATPIII et la table 2 ces mêmes critères selon la WHO (extrait de [12]).

En effet cette étude a déterminé que le syndrome métabolique ne devait plus être défini sur la seule base de l'insulino-résistance, mais sur le diagnostic de la présence chez un patient de 3 des 5 facteurs suivants : obésité abdominale, hypertriglycémie, diminution du taux de lipoprotéine de haute densité (HDL), hypertension et hyperglycémie [24]. Finalement la définition actuelle du syndrome métabolique est venue d'un consensus trouvé par la fédération internationale du diabète (IDF) et du « American Heart Association / National Heart, Lung, and Blood institute (AHA / NHLBI) » (Figure 2). De ce consensus est ressorti en plus des critères définis par l'ATP III l'exclusion du paramètre insulino-résistance et l'obligation pour le patient de présenter une obésité abdominale.

B. Les diabètes

Il existe différents types de diabète dont les 3 principaux sont : (1) le diabète de type 2 (diabète insulino-indépendant, DNID, DT2) qui représente 90% des cas de diabète et qui est le résultat d'une diminution de la sécrétion de l'insuline et d'une insulino-résistance des tissus périphériques ; (2) le diabète de type 1 (diabète insulino-dépendant, DID, DT1) qui se caractérise par une insuffisance de la production de l'insuline devant être compensée par l'administration quotidienne de celle-ci dans le but de réguler la glycémie ; et (3) le diabète gestationnel résultant de l'apparition d'un état hyperglycémique décelé durant la grossesse.

Le diabète touchait près de 171 millions de personnes en 2000 et devrait toucher près de 366 millions de personnes d'ici 2030 (source : www.who.int). L'OMS prévoit qu'en 2030, le diabète sera la septième cause de décès dans le monde. L'OMS définit le diabète comme étant un désordre métabolique, caractérisé par une hyperglycémie et une dérégulation du métabolisme des carbohydrates, des lipides et des protéines [23]. Les effets à long terme du diabète se caractérisent par des dommages, la dysfonction et les défaillances de nombreux

systèmes organiques. Le diabète serait une pathologie à l'origine multifactorielle et à composante environnementale [25] et génétique [26]. Il est caractérisé par une glycémie à jeun supérieure à 7,0 mmol/l et une glycémie deux heures après un test oral au glucose (75 g de glucose) supérieure à 11,1 mmol/l [23].

C. L'insulino-résistance

L'insulino-résistance est caractérisée par une diminution de la réponse de certains tissus à l'insuline. Celle-ci mène alors par une diminution de la réponse biologique à l'action de l'insuline. La résistance à l'insuline va toucher les différents organes présentant une fonction clef dans le métabolisme du glucose qui sont le foie, le muscle, le tissu adipeux et le pancréas (pour revue : [25, 27]). Au niveau du tissu adipeux, il a été montré une augmentation de la production des acides gras libres, mécanisme connu pour amplifier l'insulino-résistance, mais également pour agir sur d'autres tissus clefs tels que le foie. L'augmentation de la production des acides gras libres (FFA) en association avec l'insulino-résistance va induire une dérégulation globale du métabolisme hépatique caractérisée par une augmentation de la production de glucose (néoglucogénèse), une inhibition des voies du stockage du glucose (glycolyse, glycogénèse, lipogénèse), la production de cytokines pro-inflammatoires et la modification du métabolisme des lipoprotéines [25]. D'autre part, l'obésité ainsi que l'insulino-résistance vont induire une restructuration de l'architecture de l'îlot de Langerhans.

III. Plasticité pancréatique

Des contextes physiologiques spécifiques tels que l'obésité ou encore le diabète peuvent moduler le nombre, la morphologie et l'architecture des îlots de Langerhans [28] (Figure 3). La littérature rapporte deux principaux groupes de modifications architecturales de l'îlot : les conditions physiologiques induisant une augmentation de la masse β pancréatique (obésité, grossesse) et celles induisant une diminution de cette population (diabète) [28]. Ces deux groupes reflètent la capacité et la limite d'adaptation de l'îlot à son environnement. Néanmoins, de nombreuses études ont également montré une modification de toute l'architecture de l'îlot dans ces mêmes conditions avec la modulation des deux autres principaux types cellulaires de l'îlot que sont les cellules α et δ , ainsi que des modifications d'interactions cellules-cellules [18, 28-34].

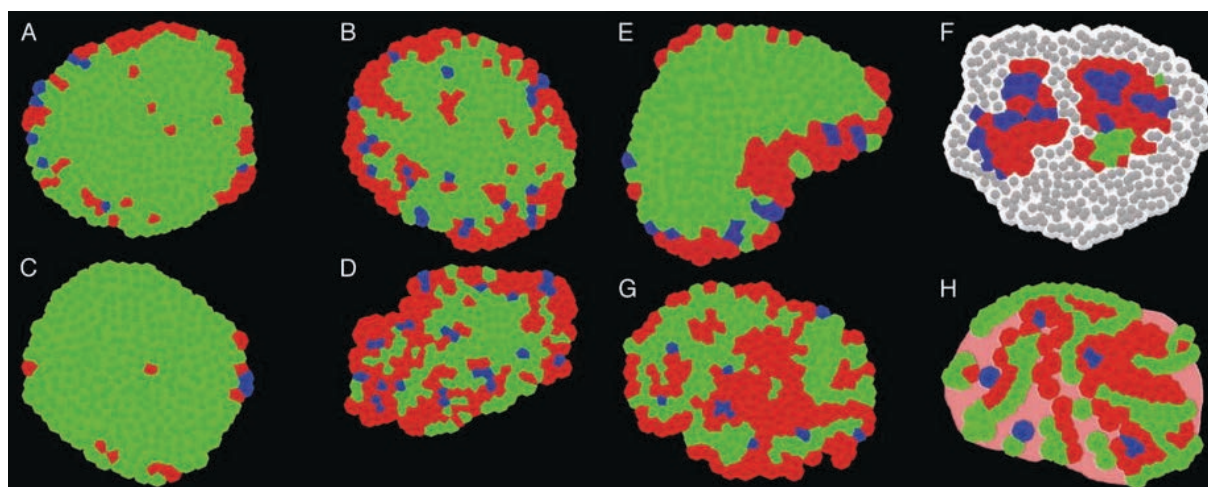


Figure 3 : comparaison de l'architecture des îlots de Langerhans humains et murins dans différentes conditions physiologiques. Pour l'ensemble des schémas les cellules bêta sont représentées en vert, les cellules alpha sont représentées en rouge et les cellules delta sont représentées en bleu. (A) Îlot de Langerhans d'une souris contrôlée (6 mois), (B) d'une souris enceinte (3 mois), (C) d'une souris *ob/ob* (15 semaines), (D) d'une souris *db/db* (15 semaines), (E) d'une souris nouveau-né, (F) d'une souris NOD (40 semaines) (à noter l'infiltration lymphocytaire schématisée par les cellules présentées en grises et blanches), (G) d'un humain « sain » (40 ans) et (H) d'un humain diabétique de type 2 (à noter les dépôts amyloïdes représentés en rose sur le schéma) (extrait de [13]).

A. Cas d'obésité

L'obésité est caractérisée par une hyperinsulinémie chronique. Cet hyperinsulinisme résulte d'une demande accrue en insuline dans le but de compenser l'hyperglycémie chronique et est également corrélé au développement d'une insulino-résistance. L'obésité est connue pour induire une modification de l'architecture de l'îlot en terme de ratio entre les différents types cellulaires et en terme d'architecture globale. La réorganisation de la population β pancréatique est le mécanisme le plus connu. Des études effectuées sur des souris *ob/ob* (souris mutante pour le gène de la leptine) ont montré une augmentation de la masse et de l'aire β pancréatique avec des proportions de cellules à insuline passant de 85% chez les souris contrôles à 92% chez les souris *ob/ob* [18]. Ces mêmes études ont montré une réorganisation de l'îlot avec une modification des interactions intercellulaires. Plus précisément, l'îlot de souris *ob/ob* présente une architecture plus proche de celle de l'humain avec des cellules α et δ plus présentes au niveau du corps de l'îlot [18]. Chez l'humain, la même augmentation de la masse β a été reportée. En utilisant les pancréas de 167 patients non diabétiques (53 minces, 61 obèses), l'équipe de Saisho a montré une augmentation de 30% de la surface β pancréatique et une augmentation de 50% de la masse β pancréatique. Dans la même étude, ils ont montré une corrélation entre masse β et l'IMC chez les sujets non diabétiques. Concernant les populations non β , peu de modifications ont été rapportées chez l'obèse (humain ou modèle murin), seule une modification du ratio $\beta/\alpha\text{-}\delta$ a été observée [18] [29].

B. Cas de diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une pathologie se caractérisant par une diminution progressive de la sensibilité à l'insuline (augmentation progressive de l'insulino-résistance) et une augmentation de l'intolérance au glucose. Contrairement à ce qu'il a été montré chez l'obèse et la femme enceinte, deux contextes physiologiques dans lesquels l'îlot développe des mécanismes d'adaptation à un nouvel environnement, le diabète constitue un état physiologique dans lequel l'îlot perd cette capacité d'adaptation. De nombreuses études chez les modèles murins et l'homme ont montré une réorganisation complète de l'îlot dans des conditions diabétogènes en terme d'architecture et de proportion des différentes populations pancréatiques. Malgré les résultats contradictoires rapportés dans la littérature en fonction du modèle murin utilisé (souris *ob/ob*, *db/db*), de la population humaine décrite (α , β , δ) ou de l'interprétation faite par les auteurs, il est possible de décrire de façon globale l'impact du diabète sur l'architecture de l'îlot. Concernant la proportion et la fonction de la population β pancréatique durant le diabète de type 2, il a été montré une diminution progressive de la réponse de l'insuline au glucose avec une diminution associée de la production et de la sécrétion de cette hormone. Les mécanismes menant à cette dysfonction de la cellule β restent encore débattus (mort des cellules, trans-différentiation des cellules β). Néanmoins ce phénomène est accompagné d'une diminution globale de l'aire des cellules β dans l'îlot (30 à 50% de diminution), ceci ayant été observé chez des modèles murins et chez l'humain. Les études effectuées sur la modulation des populations α et δ sont moins nombreuses. Néanmoins il a été montré une augmentation globale de la proportion de cellules α et δ en comparaison à la population β indépendamment du modèle murin étudié (souris *db/db*, souris *ob/ob*, souris diabétique non obèse, rat traité à la streptozotocine) et chez le sujet humain diabétique. L'étude menée par l'équipe d'Iki a montré une augmentation du pourcentage de cellules α (40%

d'augmentation) et δ (58% d'augmentation) chez les sujets diabétiques (n=4) en comparaison aux sujets non diabétiques (n=6) [33]. L'équipe de Kilimnik a quant à elle observé en comparant les pancréas de 14 sujets non diabétiques et de 12 sujets diabétiques une augmentation des ratios α et δ en comparaison au ratio de cellules β [31]. Egalement, l'équipe de Orci a montré une augmentation de la proportion des cellules α et δ chez les sujets diabétiques (n=4) en terme de pourcentage de cellules en comparaison à des sujets non diabétiques (n=2) (68,8% versus 24% pour les cellules α , 23,8% versus 9,2% pour les cellules δ) [34]. De plus il a été montré par Kim et ses collègues que les souris *db/db* présentent des ratios des différentes populations endocrines pancréatiques et une architecture de l'îlot comparable à celle du sujet humain non diabétique (60-40% de cellules β ; 40-20% de cellules α ; 20-10% de cellules δ) [18]. D'autre part en plus de la modification des proportions des différentes populations endocrines, de nombreuses publications ont montré une réorganisation de l'architecture de l'îlot avec une modification des contacts cellules cellules avec une diminution des contacts β/β et une augmentation des contacts β/α .

L'hormone somatostatine

I. Découverte et caractérisation

La somatostatine a été identifiée pour la première fois par Brazeau et son équipe en 1972 et publiée pour la première fois en 1973 [35]. Ce travail montrait la découverte dans un extrait total de cerveau de bovin d'un petit peptide de 14 acides aminés ayant des effets inhibiteurs sur la sécrétion de l'hormone de croissance. A l'époque ce composé fut nommé SRIF pour « Somatotropin-Release-Inhibiting Factor » [36]. Quelques années plus tard, la somatostatine fut démontrée comme ayant des effets sur les sécrétions de l'insuline et du glucagon dans le pancréas [37, 38]. De plus, ce peptide ayant une courte demi-vie et étant détecté à de faibles concentrations dans le sang périphérique du rat, de nombreuses équipes ont émis comme hypothèse que celui-ci pouvait être produit directement par des cellules pancréatiques. Cette hypothèse fut vérifiée et démontrée en 1974 par l'équipe de Luft et al [39]. De nombreux travaux ont maintenant montré que la somatostatine est un régulateur de la fonction endocrine pancréatique, ceci dépendamment des paramètres physiologiques et de l'état de santé global du sujet [21, 32, 37, 38, 40-42]. Ainsi l'insuline et le glucagon ont une action directe sur leurs tissus cibles dans le but de réguler l'homéostasie glucidique. La somatostatine a quant à elle pour principale fonction d'agir directement sur les cellules β (insuline) et α (glucagon) dans le but de réguler leurs expressions et leurs sécrétions [32, 37, 38, 40, 41, 43-45].

Les cellules δ ou cellules D sont les noms communs pour les cellules exprimant et sécrétant la somatostatine ou des dérivés de la somatostatine. Ces cellules sont des cellules neuroendocrines présentes dans des organes clefs de l'organisme et ayant un rôle de régulateur

de fonctions physiologiques spécifiques. Les cellules δ sont des cellules à morphologie neuronale avec de nombreuses extensions cytoplasmiques. Elles sont polarisées avec un pôle contenant le noyau et un pôle contenant les expansions cytoplasmiques renfermant les granules de sécrétion de somatostatine [46]. La formation dendritique constitue une extension cellulaire permettant une connexion et une communication entre les cellules d'un même groupement cellulaire (connexions δ/β et δ/α dans le pancréas). Ce sont ces extensions cytoplasmiques qui participent aux effets paracrines médiés par la somatostatine.

Les Vertébrés présentent différents gènes de la somatostatine, chacun produisant des variants différents de ce peptide. Les deux principaux gènes sont le gène Somatostatine 1 et le gène Somatostatine 2 aussi appelé gène Cortistatine (CST) [47].

Le gène Somatostatine 1 est le gène le plus conservé chez les Vertébrés [47]. Il existe deux principaux peptides dérivés de ce gène qui sont les somatostatine-14 (SS-14) et somatostatine-28 (SS-28). Ces deux peptides sont produits à partir du même précurseur, la prepro-SS1 (PSS1), mais proviennent de voies différentes du processus de maturation de ce précurseur. Ces deux peptides sont exprimés dans différents tissus avec des formes préférentiellement produites dans des organes spécifiques : cerveau (SS-14), estomac (SS-14), pancréas (SS-14) et intestin (SS-28).

Certains vertébrés vont exprimer un gène supplémentaire de la somatostatine, le gène Somatostatine 2 aussi appelé SS3 chez les espèces non mammifères et Cortistatine chez les mammifères. Les gènes SS3 et CST sont exclusivement exprimés dans le cerveau en comparaison au gène SS1 [48, 49].

II. La somatostatine, un modulateur paracrine de la fonction endocrine pancréatique

La concentration plasmatique de somatostatine est principalement issue de la sécrétion de SS-28 (intestinale), la SS-14 (pancréas) ayant été montrée chez des sujets pancréatectomisés comme participant très faiblement à la proportion de somatostatine circulante [50]. Cette concentration de l'ordre de la picomole double après le repas [51]. Comme décrit précédemment, l'étude de la physiologie de l'îlot de Langerhans s'est principalement focalisée sur les mécanismes modulant les sécrétions d'insuline et de glucagon laissant ceux modulant la sécrétion de la somatostatine encore peu et mal connus. En effet en comparaison aux modèles de lignées cellulaires β (Endoc1, INS1, MIN6) et α (alpha TC1.9), très peu de modèles et de lignées cellulaires δ existent et sont caractérisés. Actuellement une seule lignée utilisée en tant que modèle delta pancréatique est commercialisée. Celle-ci, nommée lignée TGP52 est issue d'un insulinome de souris et constitue un modèle de sécrétion de la somatostatine variable et peu reproductible [42]. D'autre part la faible proportion de ces cellules dans l'îlot et le peu d'outils disponibles permettant la purification de ces cellules en fait une cellule encore difficilement étudiable en dehors de son contexte physiologique. [32, 52]. Les cellules δ pancréatiques ont été montrées comme exprimant des canaux Na^+ , Ca^{2+} et K^+ voltage dépendant rendant ces cellules électriquement excitables [53]. Le modulateur le plus connu et le plus étudié de la somatostatine est le glucose. De nombreuses études ont montré que comme l'insuline, la somatostatine est stimulée par une augmentation de la concentration de glucose avec des seuils de stimulation plus faibles que ceux de l'insuline [32, 42, 54]. D'autre part en plus du glucose, l'insuline et la somatostatine présentent d'autres sécrétagogues communs et

répondent à des agents de dépolarisation membranaires que sont l'arginine, le tolbutamide (bloqueur des canaux K⁺ ATP dépendants), les sulfonylurées, des neurotransmetteurs tels que le glutamate et le GABA, le glucagon like peptide 1 (GLP-1) et des analogues du GLP-1 tels que l'exendin-4 [42, 54-60]. A l'inverse la noradrénaline a été montrée comme inhibant la sécrétion de somatostatine [40]. De plus ces cellules exprimant les récepteurs de l'insuline, du glucagon et de la somatostatine (nommés SSTRs), des mécanismes paracrines impliquant ces hormones sont à l'origine de la régulation de la sécrétion de la somatostatine [43, 44, 61, 62]. Cette complexité des mécanismes paracrines impliquant la somatostatine dans la fonction de l'îlot est également amplifiée par la modulation de ces processus par les conditions physiologiques et le modèle étudié.

A. Les récepteurs de la somatostatine dans l'îlot de Langerhans

La somatostatine est une hormone ayant des actions paracrines sur ses cellules cibles via sa liaison spécifique à l'un de ses récepteurs SSTRs. Il a été identifié 5 SSTRs nommés SSTR 1 à 5 et codés par différents gènes (SSTR 1 à 5) [63-66]. Les deux principales formes de somatostatine (SS-14 ; SS-28) ainsi que les analogues de la somatostatine (octréotide, lanréotide, pasiréotide) se fixent à l'ensemble des récepteurs de la somatostatine avec des affinités de l'ordre du nanomolaire et des récepteurs ayant plus d'affinité pour certaines formes de SST (SSTR1-4 pour SS-14 ; SSTR5 pour SS-28) [67]. Les SSTRs sont des récepteurs de la famille des récepteurs couplés à des protéines Gi/o présentant une structure à 7 domaines transmembranaires [64]. Ils peuvent être présents sous forme de monomère, homodimère ou hétérodimère et peuvent également interagir avec d'autres GPCRs [68, 69]. De nombreux travaux ont eu pour but d'étudier et de comparer les profils d'expression des SSTRs dans les

différentes populations endocrines chez l'humain et les modèles murins. Deux points majeurs ressortent de ces travaux : une expression relativement ubiquitaire des récepteurs SSTRs de la somatostatine dans toutes les populations endocrines, ceci présument d'un rôle paracrine et autocrine de cette hormone sur la sécrétion de l'îlot de Langerhans [32] ; et la relative hétérogénéité de l'expression de chaque récepteur au niveau des populations endocrines présument d'une certaine spécificité d'un type de récepteur pour une action sur la sécrétion d'une hormone endocrine [67]. L'étude la plus complète sur le modèle murin provient de l'équipe de Ludvigsen qui a eu pour objectif d'étudier l'expression des 5 récepteurs de la somatostatine dans chaque population endocrine (bêta, alpha, delta et PP). Ils ont montré que, pas toutes les cellules, mais tous les types cellulaires expriment tous les SSTRs [70]. Deux études des équipes de Kumar et de Portela-Gomes ont montré les mêmes observations chez l'humain [71, 72].

Comme chez les rongeurs, de nombreuses études ont eu pour but de déterminer par quels récepteurs la somatostatine agissait sur les cellules β et α pancréatiques humaines. Il est communément admis que la cellule β du rongeur et de l'homme répond à la somatostatine via des récepteurs différents, préférentiellement le SSTR2, les récepteurs SSTR5 et 1 étant également impliqués. Dans ces études utilisant des agonistes spécifiques des différents SSTRs, ils ont montré que la plus forte inhibition de la sécrétion d'insuline et de l'ensemble des voies cellulaires connues pour être impliquées dans l'effet médié par la somatostatine était obtenue avec des agonistes du SSTR2 [44, 45, 73]. Concernant l'impact de la somatostatine sur les cellules α pancréatiques, il a été montré que comme chez le rongeur l'action de la somatostatine passe préférentiellement par le récepteur SSTR2 même s'il semble qu'en comparaison à ce qui a été montré chez le rongeur d'autres récepteurs tels que SSTR1 et 5 sont également impliqués [45].

B. Sécrétion et action de l'hormone somatostatine

L'une des principales limitations de l'étude de l'action de la somatostatine in vivo (chez l'homme et le modèle murin) est la mesure de la somatostatine immuno réactive circulante (IRS). En effet, la somatostatine est sécrétée par de nombreux tissus (intestin, cerveau, pancréas) et présente différents variants (SS-14 et SS-28) rendant les résultats difficilement interprétables et expliquant pourquoi la connaissance précise de l'action de la somatostatine in vivo reste mal connue [74].

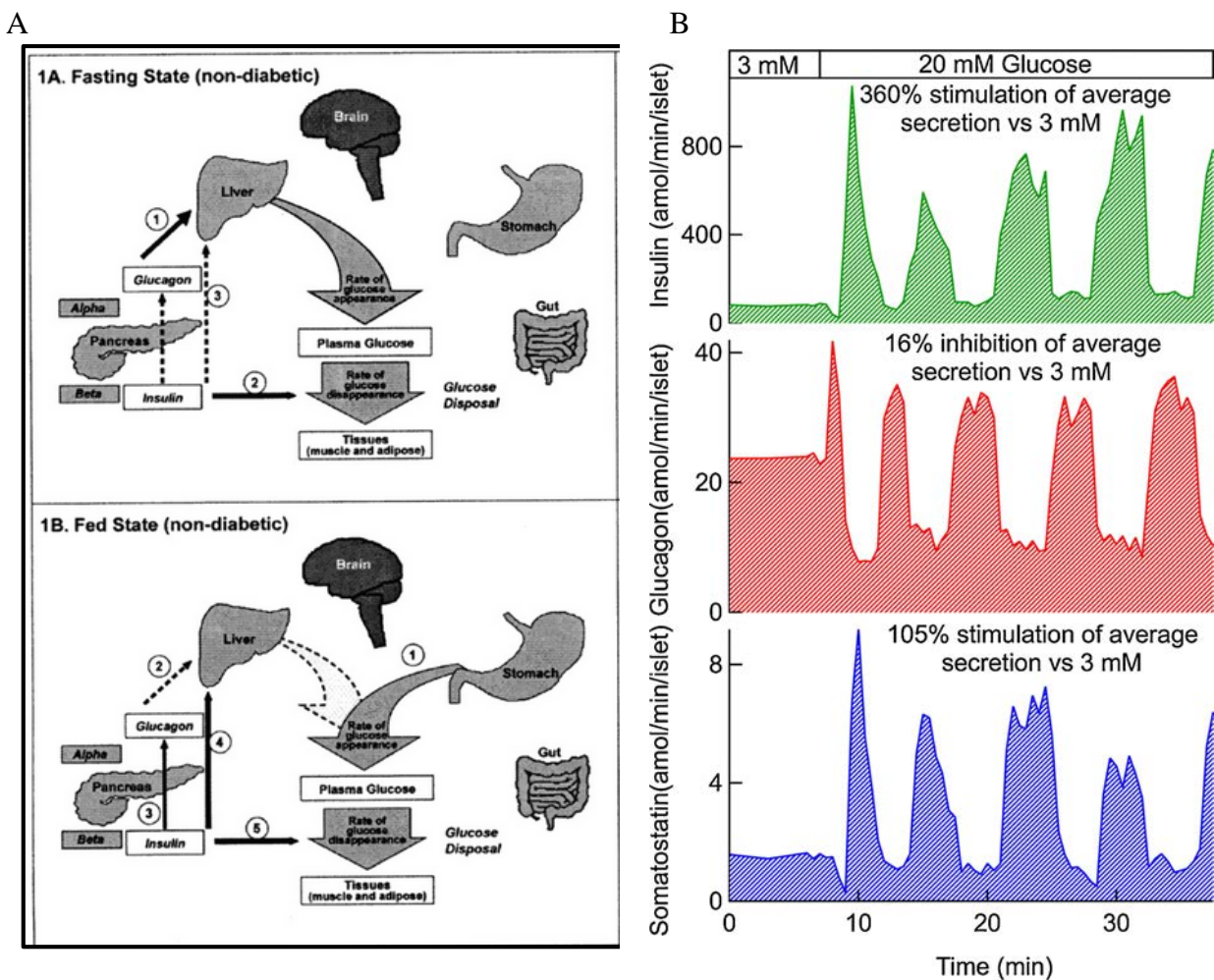


Figure 4 : sécrétions et actions de l'insuline et du glucagon chez le sujet sains. (A) impacts et (B) sécrétions des 3 principales hormones pancréatiques (insuline, glucagon et somatostatine) chez un sujet sain, à jeun et durant un repas (extrait de : Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon ; spectrum diabetes journals, 2004 et de [11]).

L'insuline et le glucagon sont les deux principales hormones régulatrices de la concentration en glucose. Elles sont sécrétées par le pancréas et vont interagir et agir au niveau d'organes cibles tels que le foie via leurs récepteurs respectifs, dans le but de maintenir un équilibre glycémique en modulant le stockage (insuline) ou la néo-production de molécules dérivées du glucose (glucagon) (Figure 4).

Le glucose est le principal sécrétagogue des cellules endocrines. Sa concentration régule les sécrétions d'insuline, de glucagon et de somatostatine (Aronoff S.L ; Glucose Metabolism and Regulation : Beyond Insulin and Glucagon ; spectrum diabetes journals, 2004). Deux études menées par le groupe de Hellman ont montré que l'îlot murin et humain malgré leurs différences d'architecture présentent des profils de sécrétions hormonales semblables [75, 76]. Des expériences de périfusion infusant des îlots de Langerhans avec des basses puis des hautes concentrations en glucose ont montré deux phases distinctes de sécrétion des hormones pancréatiques. En bas glucose, les sécrétions d'insuline et de somatostatine sont à des niveaux dits basaux sans variations significatives. L'insuline et la somatostatine sont sécrétées dans ces conditions à approximativement 10% de leur capacité maximale de sécrétion. Dans ces mêmes conditions, le glucagon est lui sécrété à 50% de sa capacité maximum de sécrétion, de façon constante (Figure 4) [11]. Quand la concentration en glucose augmente, les profils de sécrétion de ces 3 hormones changent. Les sécrétions deviennent pulsatiles, périodiques et asynchrones entre l'insuline/la somatostatine et le glucagon avec un pulse rapide et maximal (100% de la capacité de sécrétion) pour l'ensemble des hormones, suivi par des pulses constants, mais de plus faibles intensités (Figure 4) [75, 76]. Egalement, des études ont montré que si la somatostatine présente un effet inhibiteur de la sécrétion d'insuline en haut glucose (20 mM glucose) ou en présence d'autres sécrétagogues de l'insuline (exendin-4 ou isobutylmethylxanthine), la mise en contact d'îlots de Langerhans humains isolés avec de la

somatostatine exogène n'altère pas la sécrétion d'insuline en bas glucose (2,8-3 mM glucose), concentration de glucose en deçà du niveau de stimulation de la sécrétion de l'insuline [45, 77].

L'action inhibitrice de la somatostatine sur la sécrétion de l'insuline et du glucagon passe par l'inhibition de l'adénylate cyclase et une réduction du niveau d'AMPC intracellulaire induite par l'activation de la protéine Gi/o associée aux SSTRs. Plus récemment a été mis en évidence par l'équipe de Kailey, 3 mécanismes additionnels par lesquels la SST agit sur ces cellules : (1) une hyperpolarisation de la membrane des cellules et une inhibition de l'activité électrique de la membrane par l'activation de canaux « G-protein gated inwardly rectifying K⁺ » (GIRK); (2) l'inhibition du flux de calcium à travers les canaux P/Q; et (3) l'inhibition de l'exocytose des granules de sécrétion, mécanisme AMPC dépendant [73].

Chez le rongeur, des études ont été effectuées utilisant un modèle knockout pour la somatostatine (SST^{-/-}, SST KO). Malgré le fait que ces souris SST^{-/-} ne présentent pas de modification significative de la structure pancréatique, de l'architecture de l'îlot, des sécrétions basales d'insuline et de glucagon, des expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré une augmentation significative des concentrations plasmatiques d'insuline et de glucagon après infusion intraveineuse de glucose et/ou d'arginine [54]. D'autres études *in vitro* ont montré une dérégulation des mécanismes de suppression de la sécrétion du glucagon par le glucose chez ces souris SST^{-/-}. Dans ces mêmes études, aucun impact n'a été observé sur la régulation de la sécrétion d'insuline par le glucose [54]. L'ensemble de ces résultats supporte l'idée d'un haut niveau de régulation des sécrétions de l'insuline et du glucagon par la somatostatine. Egalement, il a été montré, utilisant la caractérisation des récepteurs [78, 79], des agonistes spécifiques de ces récepteurs [80] et des modèles transgéniques (souris KO pour SSTR2 ou SSTR5) [81, 82], que la SS-28 est le meilleur inhibiteur de l'insuline et que la SS-14 est le meilleur inhibiteur du glucagon, ces effets étant principalement médiés par le SSTR5 pour les

cellules β et le SSTR2 pour les cellules α [78, 79, 83].

Une étude très intéressante de l'équipe de Brunicardi a montré, utilisant une technique d'immunoneutralisation (blocage spécifique via l'utilisation d'un anticorps monoclonal d'une isoforme de la somatostatine ou de l'un de ses récepteurs), qu'à l'image du rongeur la somatostatine joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'insuline et du glucagon chez l'humain. Ils ont observé après immunoneutralisation de la somatostatine par des anticorps monoclonaux spécifiques, une augmentation significative de la sécrétion d'insuline en bas et haut glucose. Ils ont également observé, dans les mêmes conditions expérimentales, une augmentation significative de la sécrétion du glucagon en bas glucose [43].

C. Sécrétion et action dans des conditions pathologiques

Un ensemble de travaux réalisés il y a 30 ans a montré une altération des mécanismes impliquant la somatostatine sur la régulation de la sécrétion de l'insuline chez la souris *db/db*. Ces souris présentaient une augmentation des sécrétions de somatostatine en bas et haut glucose associée avec une augmentation de la sécrétion d'insuline en bas glucose et une perte du premier pic d'insuline induit par le glucose [84, 85]. La même équipe a montré plusieurs années plus tard qu'en plus d'un impact direct de la somatostatine sur l'insuline, la restauration du premier pic d'insuline (par administration d'insuline) induit une restauration partielle du contrôle de l'insuline par la somatostatine démontrant ainsi un haut niveau de régulation entre ces deux hormones [86]. Egalement, d'autres travaux ont montré chez ce même modèle de souris *db/db* rendue génétiquement diabétique, une dérégulation des mécanismes d'inhibition de la sécrétion du glucagon par la somatostatine, induisant une dysfonction globale du pancréas endocrine. Néanmoins les mécanismes spécifiques menant à cette désensibilisation des cellules β et α et plus globalement de l'îlot à la somatostatine sont encore mal connus et restent à être étudiés [87].

Les premiers travaux étudiant la variation de la somatostatine totale circulante (SS-14, SS-28) ont montré une augmentation de la somatostatine circulante dans les conditions basales avec une réponse des cellules δ au tolbutamide diminuée chez les sujets diabétiques de type 1 en comparaison aux sujets sains [88]. Une étude réalisée chez des sujets diabétiques de type 2 a montré une concentration plasmatique de la somatostatine totale inchangée avec une concentration de SS-28 diminuée [51]. De plus il a été observé comme chez les diabétiques de type 1 une diminution de l'impact du tolbutamide sur la sécrétion de somatostatine [88]. De façon plus intéressante, il a été montré que la stimulation de la sécrétion de somatostatine induite par le glucose est significativement diminuée chez les sujets diabétiques [74, 89]. Plus qu'une dérégulation de l'expression et de la sécrétion de la somatostatine, il a été montré une modulation de la sensibilité des cellules endocrines à la somatostatine. L'équipe de Portela-Gomes a montré une diminution de l'expression des récepteurs de la somatostatine pouvant expliquer cette perte de sensibilité de l'îlot à la somatostatine [90]. Ce phénomène a également été observé chez l'humain [90]. Ceci est en corrélation avec une progressive perte de production et d'action de l'insuline au sein de l'îlot présentant ainsi l'insuline comme un régulateur important de l'expression et de la sécrétion de la somatostatine. Il a en effet été montré que des patients diabétiques présentant une dysfonction du phénomène d'induction de la sécrétion d'insuline par le glucose présentent également une perte de sécrétion de la somatostatine dans les mêmes conditions. Ce phénomène n'est pas observé chez les sujets diabétiques ayant des niveaux d'insuline normaux. De plus, un traitement à base d'insuline des sujets présentant une dysfonction de l'insuline semble restaurer cette sensibilité de la somatostatine au glucose [86].

D. Traitement des diabètes

Le diabète se caractérise par une hyperglycémie chronique induite par une perte de production (diabète de type 1) ou une perte de sensibilité des tissus (diabète de type 2) à l'insuline et par une perte d'efficacité des mécanismes de régulation du stockage et de la production du glucose au niveau des organes clefs du métabolisme glucidique. Due à sa courte demi-vie, la somatostatine doit être administrée de façon continue pour avoir une action. Pour cela différents analogues de la SST ont été développés présentant des demi-vies plus longues et une durée d'action après injection plus importante. Trois analogues de la somatostatine sont aujourd'hui utilisés en cliniques : l'octréotide (SMS201-995, sandostatine), le lanréotide (BIM23014, somatuline) et le pasiréotide (SOM, signifor).

L'octréotide est l'analogue ayant été le plus étudié et ayant montré les résultats les plus prometteurs et intéressants. Outre son utilisation thérapeutique dans le cadre du traitement de l'acromégalie [91] et des tumeurs neuro-endocrines [92], cet analogue a été montré comme étant plus affiné pour les récepteurs SSTR2-3 et 5 [93]. Il améliore le contrôle glycémique en agissant sur la fonction intestinale (ralentissement de la vidange gastrique) [94], sur la sécrétion de la Growth Hormone (GH) (diminution de la sécrétion) [95], sur l'absorption du glucose par la muqueuse intestinale [96] et en inhibant la sécrétion d'insuline et de glucagon diminuant ainsi la néo-production de glucose hépatique [97, 98]. L'octréotide pourrait également être utilisé en tant que traitement des hypoglycémies du fait de son implication dans la régulation de la sécrétion du glucagon [99].

Les acides biliaires et leurs récepteurs

I. Synthèse et circulation entéro-hépatique

A. Acides biliaires primaires et secondaires

Les acides biliaires sont avec le cholestérol, les phosphatidylcholines et la bilirubine les principaux constituants de la bile, substance sécrétée par les hépatocytes dans le canal biliaire et stockée dans la vésicule biliaire en attente d'une sécrétion dans le duodénum lors d'un repas. Les acides biliaires sont des molécules amphipatiques. Il a été estimé que 400mg des 800mg de cholestérol synthétisés par le corps humain sont utilisés à la synthèse des acides biliaires ce qui fait de cette voie de synthèse la voie principale de catabolisme du cholestérol chez l'homme. Les acides biliaires sont synthétisés à partir de deux principales voies : la voie dite classique et la voie dite alternative. Ces deux voies vont à partir d'un composé hydrophobe membranaire constituer un composé amphipatique possédant de nombreuses propriétés physiologiques.

Chez l'homme, la voie classique amène à la production d'une quantité équivalente de deux acides biliaires primaires qui sont l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA), représentant 90% de la production totale des acides biliaires primaires. Elle est initiée par l'enzyme limitante nommée cholesterol 7α -hydroxylase (CYP7A1).

La voie alternative également connue sous le nom de voie acide ne représente que 10% de la production totale des acides biliaires primaires et amène principalement à la production de l'acide biliaire CDCA. L'enzyme à l'origine de l'initiation de cette voie est la sterol 27-hydroxylase (CYP27A1), enzyme exprimée au niveau de la membrane mitochondriale et catalysant également la production d'intermédiaires de la voie classique.

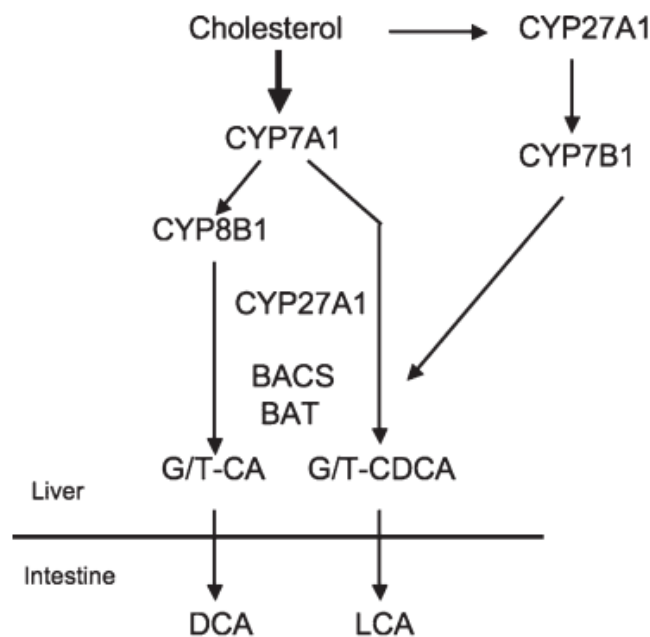


Figure 5 : les voies classique et alternative de la synthèse des acides biliaires. Le cholestérol est transformé par l'action des enzymes clés des voies classique et alternative en acides biliaires primaires CA et CDCA. Ces acides biliaires sont ensuite conjugués à des acides aminés via l'action d'autres enzymes pour être sécrétés dans l'intestin où ils seront déconjugués par la flore intestinale pour former des acides biliaires secondaires DCA et LCA (extrait de : [10]).

Une fois sécrétés dans l'intestin après vidange de la vésicule biliaire, les acides biliaires primaires vont agir sur leurs cellules cibles puis seront réabsorbés au niveau de l'iléon distal et le côlon (95% du pool total d'acides biliaires). Une partie des acides biliaires primaires (5%) circulant le long de l'intestin pourront subir une dé-conjugaison suivie par une réabsorption ou une conversion en acides biliaires dits secondaires (Figure 5). Cette modification des acides biliaires primaires par les bactéries intestinales comprend deux grandes voies de biotransformations des acides biliaires primaires : (1) la voie amenant à une 7-dehydroxylation des acides biliaires primaires produisant des acides biliaires 7-deoxy tels que l'acide déoxycholique (DCA) produit à partir du CA et l'acide lithocholique (LCA) produit à partir du CDCA ; et (2) la voie amenant à une épimérisation des acides biliaires primaires pour former des acides biliaires secondaires « iso », «oxo » ou encore « hydroxy-oxo »[100, 101].

B. Circulation entéro-hépatique

La bile est un fluide constitué de différents composés à action digestive (absorption des lipides) et excrétrice (actions physiologiques). Elle est composée d'eau, d'acides biliaires (issus du métabolisme du cholestérol), de phospholipides (phosphatidylcholine formant des micelles avec les acides biliaires), de bilirubine (issue de la voie du métabolisme des hèmes), de cholestérol (cholestérol en excès devant être éliminé), de métaux lourds (fer, cuivre) et d'autres minéraux et vitamines. Elle constitue une voie excrétrice de composés à action physiologique tels que des drogues ou des métabolites spécifiques (IgA, immunoglobuline). La bile est formée après sécrétion de l'ensemble de ces composés par les hépatocytes constituant les lobules hépatiques (unité fonctionnelle du foie) [102]. Ces hépatocytes sont hautement vascularisés par la veine porte hépatique et l'artère hépatique et sont traversés par des canaux biliaires collectant l'ensemble des solutés nécessaires à la formation de la bile. La bile stockée dans la vésicule biliaire sera sécrétée via le canal cholédoque au niveau du duodénum durant le repas. Le mécanisme à l'origine de cette vidange de la vésicule biliaire implique une hormone, la Cholécystokinine (CCK), hormone intestinale sécrétée par des cellules de la muqueuse intestinale présentes dans la région proximale de l'intestin (duodénum et jéjunum proximal) [103]. Le pool d'acide biliaire contenu dans la bile comprend des acides biliaires primaires synthétisés par les hépatocytes et des acides biliaires secondaires issus des acides biliaires primaires modifiés par les bactéries intestinales présentes dans le colon. Ce pool d'acide biliaire comprend 2 à 4 grammes d'acides biliaires. Il est recyclé à hauteur de 95% via la circulation entéro-hépatique six à dix fois dans la journée avec une synthèse d'acides biliaires *de novo* de 0,2 à 0,6 gramme. Une fois leur action au niveau de la muqueuse intestinale remplie, les acides biliaires déconjugués et/ou modifiés par les bactéries intestinales vont être réabsorbés à hauteur de 95% par les entérocytes puis seront redirigés vers le foie via la circulation porte pour y être

recyclés. Une partie des acides biliaires non réabsorbés au niveau de l'iléon pourra l'être de façon passive au niveau du côlon et/ou sera éliminée dans les fèces.

II. Le récepteur membranaire aux acides biliaires TGR5

Les acides biliaires sont historiquement connus pour être impliqués dans des processus physiologiques variés que sont : (1) l'élimination du cholestérol excédant par l'excrétion des acides biliaires (5% par jour) dans les fèces ; (2) la facilitation de la digestion des triacyclicérols par leur action émulsifiante permettant la digestion des graisses par les lipases pancréatiques ; et (3) la facilitation de l'absorption des vitamines solubles par la muqueuse intestinale [101]. En plus de ces rôles directs des acides biliaires dans la digestion et la solubilisation des métabolites contenus dans le bolus alimentaire, d'autres rôles impliquant la fixation de ces acides biliaires sur des récepteurs spécifiques ont été mis en évidence et constituent une part importante de la recherche sur les acides biliaires actuellement. En effet il est désormais connu que via leur liaison à des récepteurs tels que FXR et TGR5, les acides biliaires agissent sur le métabolisme des lipides, sur le métabolisme du glucose, sur l'homéostasie ainsi que sur l'inflammation. Depuis leur mise en évidence respective par Forman en 1995 pour FXR [104] et par Maruyama en 2002 pour TGR5 [105], ces deux récepteurs aux acides biliaires ont été montrés comme ayant de nombreuses implications dans des processus physiologiques variés et comme pouvant constituer de potentielles cibles thérapeutiques. Mon travail de thèse ayant essentiellement porté sur l'étude du récepteur aux acides biliaires TGR5, je ne présenterai ni ne discuterai des connaissances actuelles sur le récepteur nucléaire aux acides biliaires FXR (pour revue : [106]).

A. Structure

Chez les mammifères, toutes les cellules présentent des protéines sensibles de leur environnement. Ces protéines ont pour rôle de déclencher des systèmes de signalisation permettant à ces cellules de s'adapter à des stimuli extérieurs. Les mécanismes par lesquels les cellules détectent ces modifications impliquent des systèmes de signalisation transmembranaires composés de récepteurs (senseurs) et d'effecteurs (produisent les signaux intracellulaires).

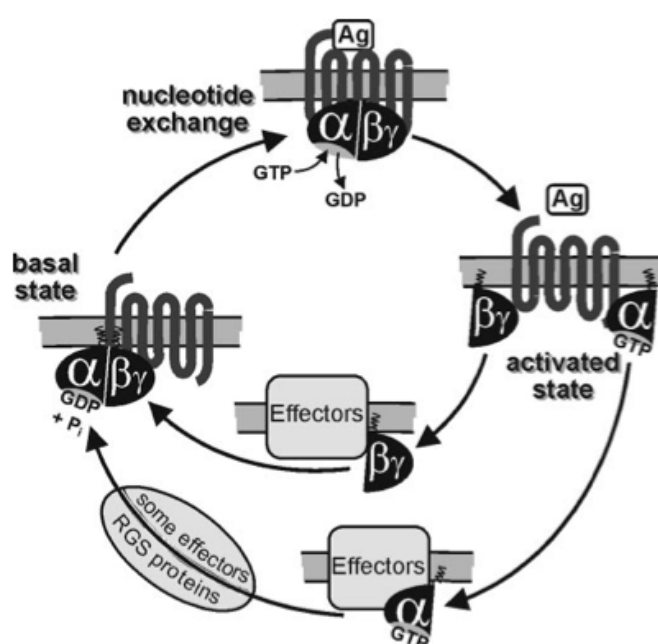


Figure 6 : cycle d'activation des protéines membranaires couplées à une protéine G. La fixation de l'agoniste (Ag) induit la libération du GDP et la formation de GTP au niveau de la sous-unité alpha de la protéine G. Dans cette configuration la protéine G est dans son état activé. L'action de la sous-unité alpha sur les protéines effectrices et les voies de signalisations intracellulaires va produire une hydrolyse du GTP en GDP ramenant ainsi la protéine G à son état basal inactive (extrait de [9]).

Les récepteurs couplés à des protéines G aussi appelés récepteurs à 7 domaines transmembranaires représentent la famille de récepteurs membranaires la plus importante dans le génome humain. En comparaison à de nombreux autres systèmes de signalisation transmembranaires qui présentent une protéine constituée d'un récepteur et d'un effecteur, les protéines couplées à des protéines G sont des structures relativement complexes composées

d'un récepteur et d'un système de signalisation couplé à une protéine G hétérotrimérique et d'un système effecteur [9]. Cette complexité de structure des protéines G présume d'une grande variété de fonctions cellulaires et de voies de signalisation intracellulaires et fait de cette famille de récepteur des cibles clés de la modulation des processus physiologiques. Il a été mis en évidence plus de 800 GPCRs.

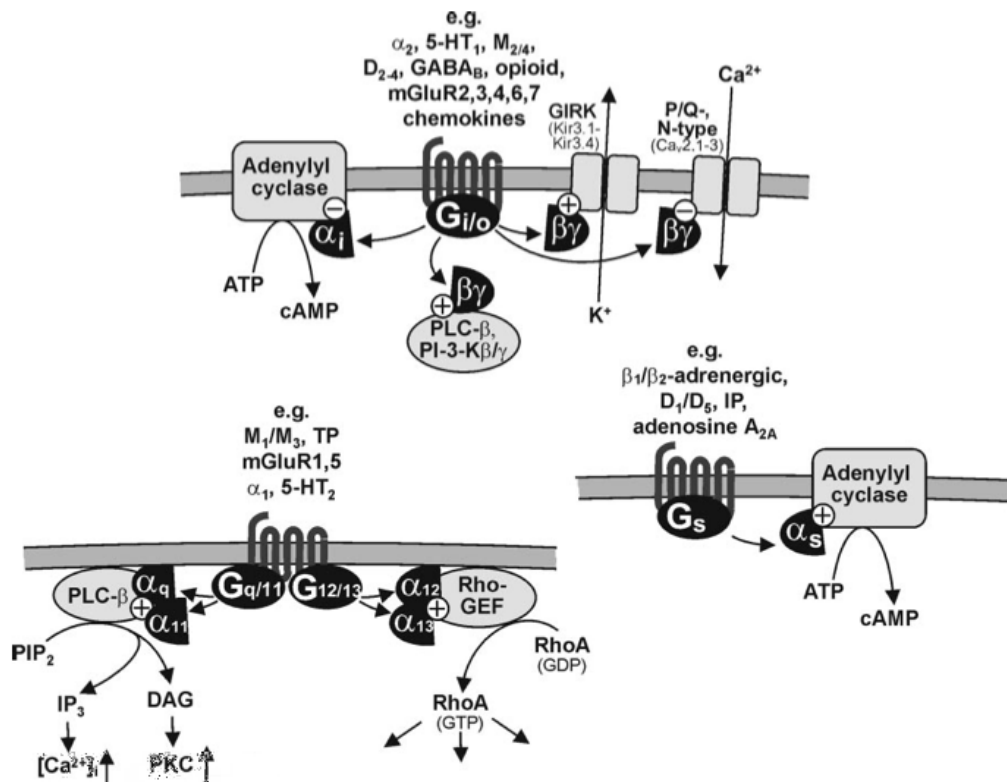


Figure 7 : principales voies de signalisations induites par les récepteurs couplés à des protéines Gi/o, Gs et Gq. GIRK : « G protein-regulated inward rectifier potassium channel » ; 5-HT_{1,2} : récepteur à la sérotonine 1 et 2 ; M₁₋₅ : récepteur muscarinique type 1 à 5 ; mGluR1-7 : « metabotropic glutamate receptor subtypes 1 to 7 » ; PLC- β : phospholipase C- β ; PI-3-K : phosphoinositide-3-kinase ; PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; IP₃ : inositol 1,4,5-trisphosphate ; DAG : diacylglycérol ; PKC : protéine kinase C ; Rho-GEF : « Rho-guanine nucleotide exchange factor » ; TP : « thromboxane A₂ receptor » ; IP : « prostacyclin receptor » (extrait de [9]).

Historiquement, ces récepteurs ont été classifiés en six grandes familles (A-F) sur la base de leurs structures et sur leurs propriétés de liaisons à leurs ligands [107]. Plus récemment, une nouvelle classification de ces récepteurs a été adoptée, basée sur leurs propriétés phylogénétiques. Ainsi, actuellement les GPCRs sont regroupés en cinq grandes familles

nommées glutamate (15 membres), rhodopsine (701 membres, dont fait parti le récepteur TGR5), adhesion, frizzled/taste2 (frizzled hereafter) (24 membres) et sécrétine (GRAFS) (15 membres) [108] [109]. La grande diversité de fonction des GPCRs provient des nombreux sous-types de protéines G. La protéine G couplée au récepteur est composée de deux sous-unités formant un hétérodimère (Figure 6). La sous-unité alpha (α) peut être divisée en 4 familles ($G\alpha$, $G\alpha_i/G\alpha_o$, $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ et $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$), chaque famille étant composée de différents membres présentant des profils d'expression tissulaire spécifiques, mais des structures similaires. La sous-unité bêta gamma ($\beta\gamma$) de la protéine G peut être elle composée de 5 sous-unités β et de 12 sous-unités γ différentes. Un récepteur une fois activé par un ligand pourra moduler l'activité d'une ou plusieurs protéines G induisant la transduction de signaux via les sous-unités $\alpha\beta\gamma$ (Figure 7). Il est communément admis qu'un ou plusieurs récepteurs modulant des mécanismes cellulaires semblables activent des familles de G protéines identiques. Egalement, il est démontré que certains mécanismes cellulaires spécifiques sont dépendants de signaux médiés par des récepteurs et des protéines G spécifiques.

Une fois activées les protéines G induiront des cascades de signalisation impliquant des systèmes de seconds messagers tels que l'adenylyl cyclase (AC), la phospholipase C (PLC), la phosphoinositide-3-kinase (PI-3-K), la Rho-guanine nucleotide exchange factor (Rho-GEF), seconds messagers qui seront à l'origine de réponses cellulaires spécifiques. Ainsi plusieurs récepteurs et couples de protéines G différents pourront être impliqués dans des processus cellulaires semblables [9] (Figure 7).

Le récepteur membranaire aux acides biliaires (M-BAR) TGR5 aussi nommé GP-BAR1 (nom du gène humain) [1] a été mis en évidence par Maruyama et son équipe en 2002 [105]. Le gène GP-BAR1 est situé sur le chromosome 2q35 chez l'humain. Il est composé de 993 paires de bases et est à l'origine de la synthèse d'une protéine à sept domaines transmembranaires de 330 acides aminés. Le gène humain présente une haute homologie de séquence et de structure (>80%) avec les séquences d'autres espèces telles que celles des bovins, le lapin et les modèles murins. La structure 3D de ce récepteur n'est pas encore connue et les représentations faites actuellement sont issues de modèles comparatifs d'autres GPCRs [7] (Figure 8).

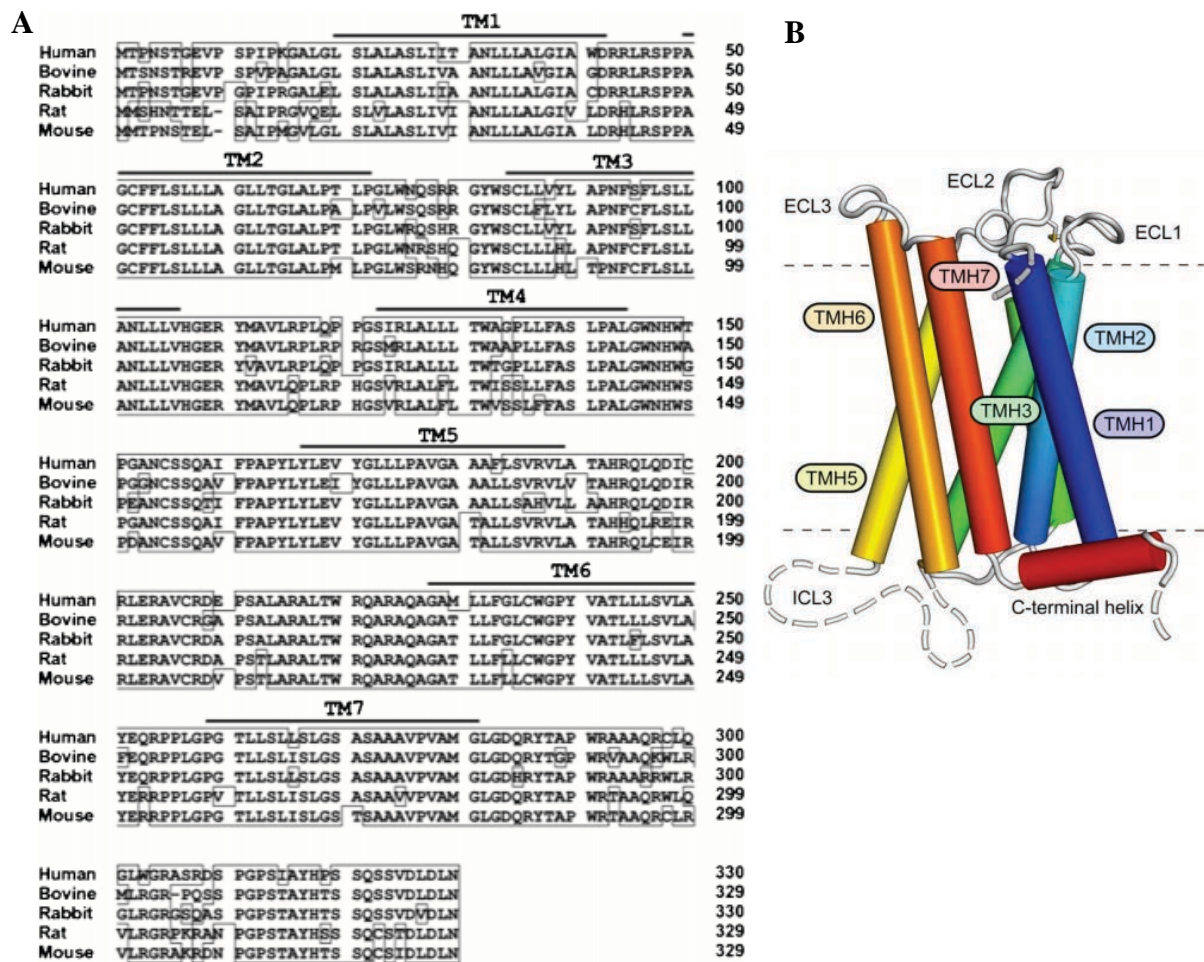


Figure 8 : structure et conservation de la séquence de la protéine à 7 domaines transmembranaires, TGR5. (A) Séquence des aminoacides de la protéine TGR5 chez l'humain, le bovin, le lapin, le rat et la souris. L'ensemble des séquences identiques chez au moins deux espèces sont encadrées (extrait de [1]). (B) Représentation 3D de la structure de la protéine TGR5 avec ses 7 domaines transmembranaires (TMH1-7), ses 3 boucles extracellulaires (ECL1-3) impliquées dans la liaison du ligand et ses 3 boucles intracellulaires (ICL1-3) impliquées dans le recrutement des protéines de signalisations induites par TGR5 (extrait de [7]).

B. Expression du récepteur aux acides biliaires, TGR5

Le récepteur couplé à une protéine G, TGR5 est un récepteur spécifique des acides biliaires. Il est exprimé de façon ubiquitaire dans de très nombreux tissus chez l'homme et la souris et est connu pour moduler l'activation de nombreuses voies de signalisations spécifiques de ces tissus (Figure 9). Chez l'humain, TGR5 est très fortement exprimé dans le placenta, la rate et les poumons [108]. Il est exprimé de façon modérée dans des tissus tels que le foie, l'estomac, l'intestin, l'utérus, le tissu adipeux, les reins et les cellules sanguines (les leucocytes, les monocytes et les macrophages). D'autres tissus présentent une expression faible du récepteur TGR5 tel que le pancréas, le cerveau, la prostate et la glande thyroïde [1, 110]. L'expression de TGR5 est faible dans le pancréas en comparaison avec d'autres organes cibles des acides biliaires. Cette faible expression présume d'une relative spécificité de TGR5 pour certaines sous-populations cellulaires pancréatiques. TGR5 a premièrement été mis en évidence dans les cellules acineuses [111], puis plus récemment dans les îlots de Langerhans sans détermination spécifique des sous-populations dans lesquelles il est exprimé [15].

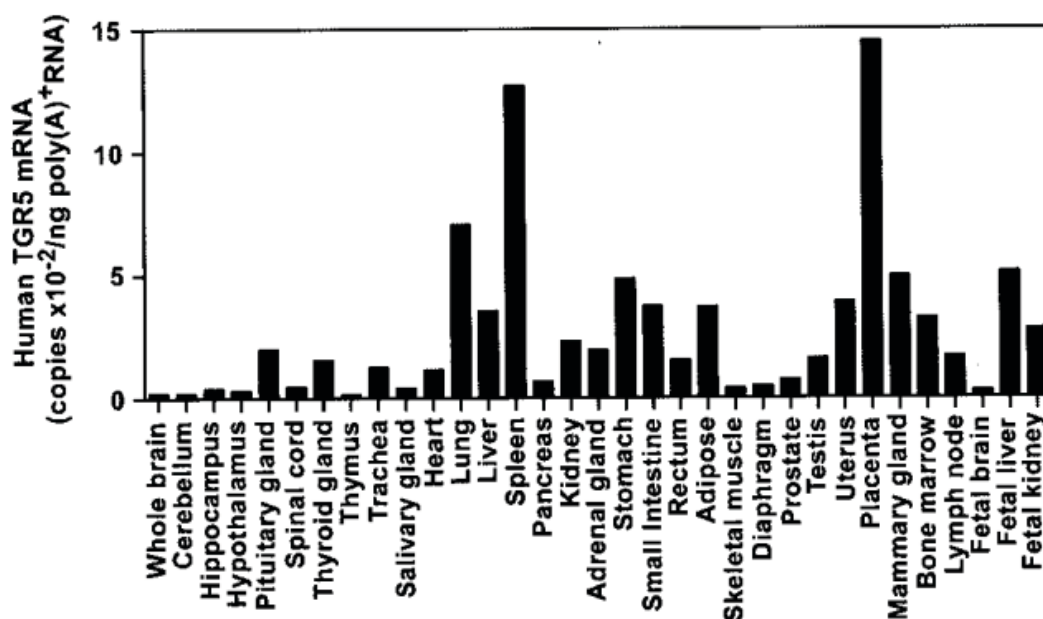


Figure 9 : niveaux et profils d'expression de l'ARN messager du récepteur TGR5 dans différents tissus humains (extrait de [1]).

Mon travail de thèse a eu pour but de mettre en évidence la ou les populations pancréatiques dans lesquelles TGR5 est exprimé au niveau de l'îlot de Langerhans.

C. Ligands du récepteur TGR5

TGR5 est un récepteur membranaire aux acides biliaires, ligands naturels de ce récepteur. Son intérêt thérapeutique en a fait une cible pharmacologique et a permis le développement de nombreux agonistes semi-synthétiques et synthétiques ayant une sélectivité, une spécificité et une efficacité élevées en comparaison des agonistes naturels de ce récepteur.

a. Ligands naturels

Les ligands de TGR5 peuvent être classés en 2 grandes catégories, les composés stéroïdes et non stéroïdes, basé sur leur structure chimique. Les premiers ligands de TGR5 ayant été mis en évidence sont les acides biliaires qui sont des ligands stéroïdes.

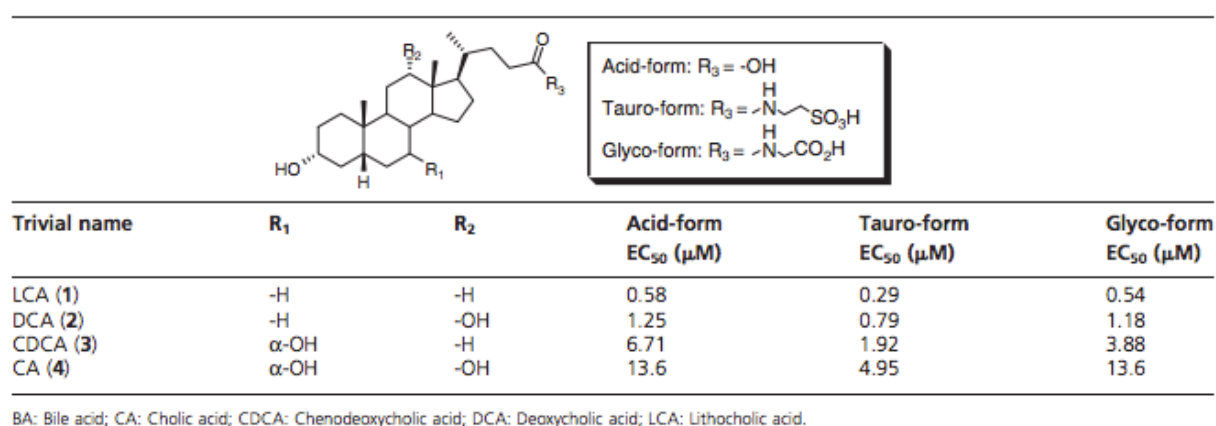


Figure 10 : pouvoir activateur (EC₅₀) des différents acides biliaires naturels (LCA, DCA, CDCA et CA) et de leurs formes conjuguées pour le récepteur TGR5 (extrait de [4]).

Ceux-ci ont été montrés comme activateur TGR5 sur des modèles cellulaires surexprimant la protéine native de TGR5. Les différents acides biliaires sécrétés dans la bile vont avoir un pouvoir d'activation sensiblement différent sur TGR5. Ce phénomène peut être mesuré par

observation et mesure de la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), second messager des voies de signalisation de TGR5. Il a été montré que les agonistes naturels les plus puissants pour TGR5 sont les acides biliaires conjugués à la taurine et à la glycine. De plus, il existe une dose réponse de TGR5 à ces acides biliaires avec pour ordre croissant de pouvoir d'activation : l'acide lithocholique (LCA), l'acide déoxycholique (DCA), l'acide chénodéoxycholique (CDCA) et l'acide cholique (CA) [105] (Figure 10). En plus de ces ligands naturellement sécrétés par l'organisme, d'autres molécules naturellement présentes dans nos aliments pourront venir activer le récepteur TGR5. L'une d'entre elles, l'acide oléanolique (OA), est un triterpène (non stéroïde) extrait des feuilles de l'olivier. L'OA a été montré comme présentant un pouvoir d'activation de TGR5 similaire à celui de l'acide biliaire LCA [112]. D'autres composés issus de la même famille (tri-terpènes penta-cycliques) tels que les acides ursolique et bétulinique ont été mis en évidence comme ayant un pouvoir activateur du récepteur TGR5 [113].

b. Ligands synthétiques et semi-synthétiques

Les ligands naturels sont peu spécifiques, agissant de façon plus ou moins affine sur l'ensemble des récepteurs aux acides biliaires présent sur les tissus.

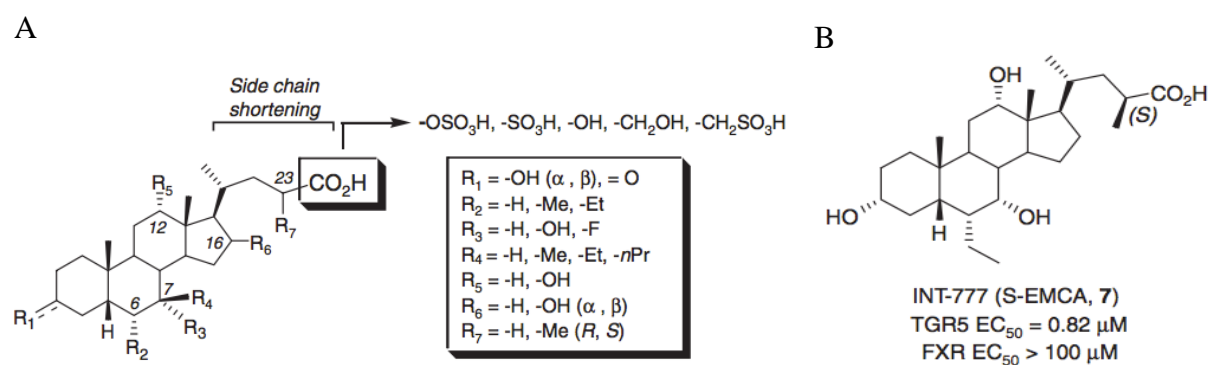


Figure 11 : structures des différents agonistes du récepteur TGR5. (A) Structure primaire des agonistes du récepteur TGR5. (B) Structure chimique du ligand synthétique de TGR5 INT-777 (extrait de [4]).

Pour cela de nombreux groupes de recherches publiques et pharmaceutiques ont eu pour objectif ces dernières décennies de développer des agonistes plus puissants et plus sélectifs de TGR5 dans le but d'étudier les implications physiologiques et le potentiel thérapeutique de ce récepteur. Pour la plupart, ces ligands ont été obtenus par modification architecturale de composés déjà connus pour leur capacité de liaison et d'activation de TGR5.

L'ensemble des composés synthétiques et semi-synthétiques faisant partie de la famille des ligands stéroïdes correspond à des dérivés des acides biliaires. La modification ou l'ajout de groupements sur la structure de ces acides biliaires ont été montrés comme pouvant moduler la spécificité, l'efficacité ainsi que l'absorption, la toxicologie, la distribution et l'élimination du composé synthétisé. A partir de ce principe, de nombreux ligands ont été mis en évidence, présentant des affinités plus ou moins importantes pour FXR et TGR5. D'un point de vue de l'affinité pour TGR5 et du potentiel d'activation, le ligand synthétisé ayant montré le plus fort intérêt se nomme INT-777. Celui-ci a été obtenu par l'ajout de deux groupements, un 6 α -éthyle et un 23 (S)-méthyle-cholique sur la structure de l'acide biliaire CA formant le 6 α -ethyl-23 (S)-cholic acid (S-EMCA, INT-777). INT-777 montre un pouvoir d'activation de FXR nul rendant ce ligand très intéressant dans le but d'étudier les mécanismes liés au récepteur TGR5 (Figure 11).

Les ligands semi-synthétiques de TGR5 ont été obtenus pour leur majorité par modification de la structure des ligands triterpénoïdes décrits précédemment (acides oléanolique, ursolique et bétulinique). Concernant les ligands synthétiques de TGR5, de nombreuses librairies ont été formées par de nombreux groupes de recherche, principalement pharmaceutiques. Le premier de ces groupes à avoir produit un ligand synthétique de TGR5 fut le groupe pharmaceutique Takeda avec la découverte du 6-methyl-2-oxo-4-thiophen-2-yl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylic acid benzyl ester. Depuis cette découverte, de

nombreuses autres banques de ligands ont été mises en évidence par d'autres groupes pharmaceutiques (pour revue [4]).

Nous avons principalement utilisé durant ce travail de thèse le ligand 3-(2-Chlorophenyl)-N-(4-chlorophenyl)-N,5-dimethylisoxazole-4-carboxamide (1722-5, Biovision, Milpitas, USA), qui était le seul agoniste de TGR5 commercialisé au commencement de ce projet, et molécule montrée comme stimulant la sécrétion de glucagon like peptide-1 par des cellules primaires intestinales.

D. Rôles du récepteur TGR5

Les GPCRs ont de nombreux rôles décrits dans la littérature. Ils régulent des mécanismes allant de l'embryogenèse, de l'apprentissage (mémoire), des sens (vue, odorat, gout) en passant par la régulation de l'homéostasie de nombreux systèmes physiologiques.

Tissue or cell line expressing TGR5	TGR5 intracellular actions	TGR5 biological action	Potential implications to human disorder
Brown adipocytes/skeletal myocytes	Iodothyronine deiodinase activation	Conversion of inactive T4 in active T3	Enhance basal metabolism
Arterial	Suppress Inflammation	Reduce development of atheroma plaques	Decreased atherosclerosis
Enteroendocrine cell	Mitochondrial oxidative phosphorylation	GLP-1 release	Multiple GLP-1 actions: improved diabetes control
Monocytes/macrophages	Decrease expression of NFkB induced genes	Reduction of IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α	Inflammatory diseases improvement
Brain neurons	Increases intracellular calcium	Production of reactive nitrogen and oxygen species	Hepatic encephalopathy (Deleterious?)
Liver Sinusoid Endothelial cell	Phosphorylation of endothelial-NO-synthase	NO synthesis and release in liver	Increased hepatic blood flow
Biliary epithelium	CFTR activation	HCO ₃ ⁻ secretion in biliary tree	Protection against fibrosing cholangiopathies
Enteric nervous system	-	Intestinal secretion and intestinal motility	Exacerbation of irritable bowel syndrome
Gut dendritic cells	-	Intestinal permeability and immune response	Improvement of inflammatory bowel diseases
Gallbladder smooth muscle	K ATP channels	Gallbladder filling	Gallstone formation
Pancreatic acinar cells	Intra acinar cell calcium transients	Activation of digestive zymogens in acini	Aggravation of acute pancreatitis
Gastric carcinoma cells	EGFR	Activation of mitogen protein kinases	Upper GI tract carcinogenesis?
Oesophageal adenocarcinoma cells	NADPH oxydase NOX5-S expression	Reactive oxygen species production	
Liver carcinoma cells	Decrease STAT 3 phosphorylation	Reduces tumorigenesis and cell growth	Protection against hepatocellular carcinoma

Figure 12 : tableau présentant l'ensemble des tissus connus pour exprimer TGR5, les voies de signalisations, les impacts biologiques ainsi que les implications cliniques potentielles de la modulation de l'activité du récepteur TGR5 (extrait de [5]).

Les GPCRs et donc le récepteur TGR5 sont connus pour être impliqués dans de nombreux processus physiologiques. TGR5 est impliqué dans la régulation de processus clés tels que la régulation de la circulation entéro-hépatique, de l'homéostasie énergétique et de processus inflammatoires. Ce récepteur présente de nombreuses implications dans la régulation des processus inflammatoires, la modulation de l'activité hépatique et de la vésicule biliaire, la modulation de la motilité et de la sécrétion intestinale, la régulation du métabolisme et de l'homéostasie énergétique et la régulation de la survie cellulaire (prolifération, apoptose) (Figure 12) [5]. De ce fait et de façon plus intéressante pour nos recherches, TGR5 est impliqué dans de nombreux processus anti ou prodiabétogènes. C'est avec cet intérêt et ce focus de l'étude de l'impact de TGR5 dans la pathologie du diabète que seront détaillés quelques-uns des principaux rôles de ce récepteur.

a. TGR5 et inflammation

Le récepteur TGR5 a été historiquement mis en évidence dans les monocytes (précurseurs des macrophages). L'ensemble des mécanismes connus à ce jour impliquant TGR5 dans des processus inflammatoires est résumé dans le tableau ci-dessous (Figure 13) extrait de [8] (pour revue [8]). L'activation de TGR5 et de ses voies de signalisation est à l'origine de l'inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, de l'inhibition de l'activité des macrophages et des cellules dendritiques (inhibition des processus de phagocytose) et protège certaines cellules de la mort cellulaire. Dans un modèle cellulaire monocyttaire (THP-1), l'expression et l'activation de TGR5 ont été associées à une inhibition de la production de TNF α (tumor necrosis factor α), mécanisme AMPc dépendant [1]. L'activation de TGR5 réduit l'expression des interleukines IL-1alpha, IL-1b β , IL-6 et TNF-alpha induite par un traitement au lipopolysaccharides dans les macrophages pulmonaires (macrophages alvéolaires) et du foie (cellules de Kupffer) [1]. TGR5 module également l'activation des macrophages murins et

humains (macrophages, cellules de Kupffer), mécanisme AMPc dépendant [114] [115]. L'activation de TGR5 est aussi impliquée dans la modulation de l'activité des cellules dendritiques (production d'interleukines), cellules issues de la différenciation et de la spécialisation des monocytes [116]. Le récepteur TGR5 est également exprimé dans d'autres types cellulaires à activité immunitaire telles que les cellules endothéliales (murines et humaines) dans lesquelles son activation module le transport et l'adhésion des monocytes via un mécanisme oxyde nitrique dépendant [117]. De par ses fonctions anti-inflammatoires, TGR5 constitue une cible prometteuse dans le cadre du traitement de certaines pathologies liées à l'inflammation telles que l'athérosclérose, le diabète, la colite ou encore d'hépatite pour lesquelles les propriétés anti-inflammatoires de TGR5 pourraient constituer une voie thérapeutique prometteuse [8].

Cell type	Observation
Rabbit alveolar macrophages	Inhibition of cytokine mRNA and TNF α secretion \dagger , reduced phagocytosis of yeast \ddagger
Human THP-1 cells	Inhibition of TNF α secretion*
Mouse and rat Kupffer cells	Inhibition of cytokines \ddagger
Mouse peritoneal macrophages	Inhibition of cytokines \ddagger , decreased scavenger receptor expression \ddagger , reduced phagocytosis of oxLDL \ddagger
Mouse RAW macrophages	Inhibition of NF- κ B activity, inhibition of cytokine mRNA \ddagger
Mouse bone-marrow-derived macrophages	Inhibition of cytokines \ddagger , inhibition of NF- κ B \ddagger
Mouse spleen-derived monocytes	Inhibition of TNF α mRNA \ddagger
Human macrophage subsets	Inhibition of cytokine production \ddagger , inhibition of phagocytosis \ddagger , inhibition of NF- κ B activity \ddagger
Dendritic cells	Decrease in IL-12 expression \ddagger
Endothelial cells	Protection from cell death \ddagger , reduced eNOS activity and NO production \ddagger , decreased monocyte adhesion \ddagger

*As shown by THP-1 cells overexpressing TGR5 compared with untransfected THP-1 cells in combination with TGR5 agonists.
 \dagger As shown by TGR5 agonists.
 \ddagger As shown by TGR5-deletion models with or without the use of TGR5 agonists.

Figure 13 : tableau récapitulatif des types cellulaires et des actions cellulaires impliquant le récepteur TGR5 dans les processus inflammatoires (extrait de [8]).

b. TGR5, homéostasie et métabolisme

Le récepteur TGR5 est exprimé dans les tissus clefs du métabolisme et de l'homéostasie corporelle que sont le foie, la vésicule biliaire, l'intestin, le muscle, le tissu adipeux et le pancréas [1]. Le rôle clef de TGR5 dans la modulation de ces processus a été montré dans de nombreuses études, principalement chez le modèle murin. Les deux principales fonctions physiologiques modulées par TGR5 et ayant montré un impact significatif sur le métabolisme et l'homéostasie sont la stimulation de la dépense énergétique dans le tissu adipeux blanc et le muscle squelettique et la stimulation de la sécrétion du GLP-1 par les cellules L intestinales (Figure 14).

En 2006 l'équipe de Watanabe a montré pour la première fois un effet des acides biliaires sur la dépense énergétique [110]. Ils ont montré que des souris soumises à un régime riche en graisse supplémenté avec des acides biliaires (CA) étaient préservées de la prise de masse grasse induite par ce régime (diminution du tissu adipeux blanc épидidymal, du tissu adipeux blanc mésentérique, du tissu adipeux brun intra scapulaire et du tissu adipeux brun) [110] [6]. D'autre part, ils ont montré que des souris soumises à un régime riche en graisse et dont le régime était modifié pour un régime supplémenté en acides biliaires présentaient une réversion significative des effets induits par le régime riche en graisses. La modulation de la prise de masse grasse chez ces souris soumises à un régime riche en graisse supplémenté en acides biliaires a été montrée comme étant liée à une augmentation de la dépense énergétique (augmentation de la production de CO₂ et augmentation de la consommation d'O₂) [6, 110]. Par étude croisée de l'expression de différents gènes connus pour être impliqués dans la dépense énergétique, ils ont montré une augmentation significative de l'expression des enzymes « iodothyronine déiodinase type 2 » (D2), « some-proliferator-activated-receptor γ coactivator » (PGC-1 α), PGC-1 β et « uncoupling protein 1 » (UCP-1) et UCP-3, dans le tissu adipeux brun

chez les souris traitées avec un régime riche en graisse supplémenté avec des acides biliaires [110]. Les protéines D2 et TGR5 sont fortement exprimées dans le tissu adipeux brun chez la souris et dans le muscle squelettique chez l'humain. La mise en contact de ces deux types de tissus avec des acides biliaires a été montrée comme induisant une augmentation du niveau d'AMPc corrélée à une augmentation de l'expression et de l'activité de l'enzyme D2. Utilisant des modèles de souris déficientes pour le gène de l'enzyme D2, ils ont montré que le phénotype des souris décrit précédemment est spécifiquement dépendant de cette protéine. Finalement cet effet a été montré comme étant indépendant de FXR (pas d'effet de l'agoniste de FXR, le GW4064 sur la prise de graisse sous régime riche en graisse) [110].

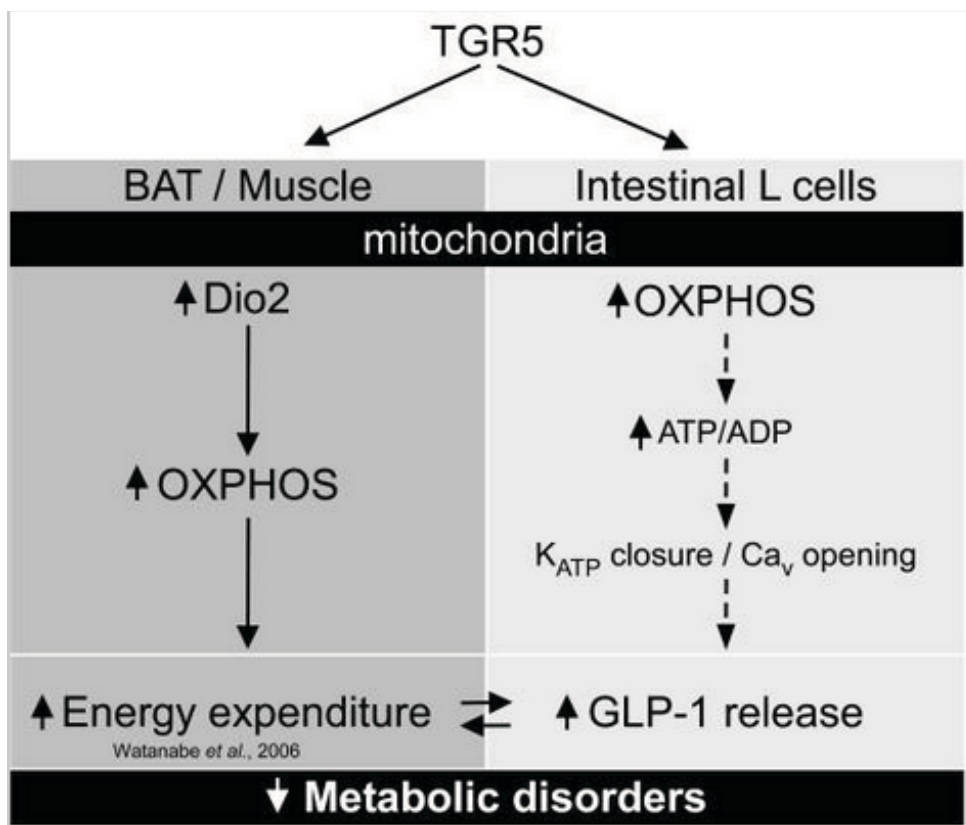


Figure 14 : rôles connus du récepteur TGR5 dans l'homéostasie énergétique. Impacts de l'activation du récepteur TGR5 dans le tissu adipeux brun et dans le muscle squelettique, stimulant la dépense énergétique (iodothyronine déiodinase type 2 dépendant) et dans les cellules L intestinales stimulant la sécrétion du GLP-1 (ATP/ADP, K_{ATP} et Ca_v dépendant) (extrait de [6]).

A la suite de la mise en évidence qu'une activation de TGR5 par des acides biliaires module la sécrétion du « Glucagon-Like Peptide-1 » (GLP-1) dans une lignée murine intestinale (lignée cellulaire murine STC-1), mécanisme AMPc dépendant [118], de nombreuses études se sont intéressées à l'intérêt de cette fonction du récepteur TGR5 dans le cadre du traitement du syndrome métabolique. La publication rapportant les résultats les plus intéressants concernant ce processus est celle publiée par l'équipe de Thomas et ses collègues [6]. Ils ont montré *in vitro* sur des lignées murines (STC-1) et humaines (NCI-H716) que l'activation de TGR5 par des agonistes spécifiques (CA et INT-777) stimule la production d'AMPc ce qui se traduit par la stimulation de l'expression de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire telles que les cytochromes c oxydases (Cox) impliquées dans la consommation d'oxygène et la production d'ATP. D'autre part, il a été montré que l'expression de TGR5 est corrélée à l'expression d'un canal calcium voltage dépendant CAV2.2, canal connu pour être impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline par le pancréas et également exprimé dans les cellules entéro-endocrines. Thomas et son équipe ont montré dans leur travail que la stimulation du récepteur TGR5 par un agoniste dans les cellules NCI-H716 et STC-1 amenait à la modulation des flux calciques, mécanisme associé avec une modulation de la sécrétion du GLP-1 par ces cellules [6]. D'autres expériences *in vivo* utilisant des souris surexprimant TGR5 ou knock-out (TGR5-KO) pour TGR5, soumises à des régimes différents et stimulées ou non par des agonistes de TGR5, ont montré que la sécrétion de GLP-1 induite par l'activation de TGR5 est corrélée au niveau d'expression de TGR5, mais aussi à la présence d'acides biliaires au contact des cellules productrices de GLP-1. D'autre part, ces expériences ont montré que l'expression de TGR5 est corrélée à la réponse des souris à un régime riche en graisse, avec des souris surexprimant TGR5 présentant une meilleure réponse à un régime riche en graisse en comparaison à des souris TGR5-KO qui elles développent une intolérance au glucose [6].

c. TGR5 et pancréas

De nombreux GPCRs sont actuellement connus comme étant exprimés dans les îlots de Langerhans et ayant un impact sur la régulation des sécrétions pancréatiques endocrines (pour revue : [119] et G-Protein-Coupled-Receptors, Pancreatic Islets, and Diabetes ; Layden B.T ; Nature Education ; 2010). Plus précisément, de nombreux GPCRs sont connus pour avoir un impact direct sur la sécrétion de l'insuline, du glucagon et de la somatostatine, les plus connus étant les GPCRs Gcgr (récepteur du glucagon), GIPR (récepteur du GIP), GLP-1R (récepteur du GLP-1), SSTR2 (récepteur de la somatostatine), GPR119 et GPR120 [120]. TGR5 est impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique et du métabolisme du glucose par la modulation de la dépense énergétique dans le muscle et le tissu adipeux et par la modulation de la sécrétion du GLP-1 par les cellules L intestinales rendant le développement de thérapeutiques ciblant ce récepteur une voie potentielle de traitement du diabète et des pathologies associées [6]. Sur la base de ces résultats et de la littérature, Thomas et son équipe émettaient l'hypothèse d'une action possible et directe des acides biliaires sur le pancréas, celui-ci exprimant certains récepteurs aux acides biliaires tel que le GPR119 (pour revue : [121]). De plus, les résultats de son équipe montraient que le traitement de souris obèses et/ou diabétiques avec des agonistes de TGR5 améliore la tolérance au glucose ainsi que la stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose chez ces souris, avec des taux de glucose et d'insuline ainsi que des tolérances au glucose et à l'insuline semblables à ceux observés chez les souris contrôles [6]. C'est en 2012 que la première étude visant à étudier le rôle de TGR5 dans le pancréas a été publiée. Cette étude de Kumar et son équipe montrait que TGR5 est exprimé dans le pancréas (îlots de Langerhans murins et humains) et dans des modèles de lignées bêta pancréatiques (INS1, 823/13, MIN6). Même si l'étude de l'expression de TGR5 dans les différentes fractions cellulaires pancréatiques n'a pas été réalisée, il a été montré que l'activation de TGR5 par les

agonistes OA et INT-777 stimulait la sécrétion d'insuline (mécanisme AMPc dépendant) dans les différents modèles cellulaires étudiés (MIN6 et îlots de Langerhans) [15]. Néanmoins une étude plus précise de l'expression de TGR5 dans le pancréas reste à être réalisée, ce qui constitue le principal objectif de ce travail de thèse.

CONTEXTE DE L'ETUDE ET HYPOTHESE DE TRAVAIL

Les études réalisées durant ces dernières décennies ont montré une implication des acides biliaires dans le métabolisme glucidique et en ont fait des cibles thérapeutiques dans le traitement des maladies métaboliques. Le système des acides biliaires est aujourd'hui étudié en tant que régulateur du métabolisme et de l'homéostasie énergétique. L'action des acides biliaires sur leurs tissus cibles passe par des récepteurs membranaires et nucléaires tels que le récepteur couplé à une protéine G TGR5 et le récepteur nucléaire farnesoid X receptor (FXR). L'action et le rôle du récepteur TGR5 sont connus dans certains tissus clefs de ces processus physiologiques, et la modulation de son activité serait impliquée dans l'amélioration globale du syndrome métabolique.

En collaboration avec l'équipe du professeur Bart Staels, des études menées au laboratoire ont mis en évidence l'expression et le rôle du récepteur nucléaire aux acides biliaires FXR dans le pancréas. Fort de ces résultats nous avons émis l'hypothèse que les acides biliaires pouvaient également avoir un impact direct sur l'activité pancréatique via le récepteur membranaire TGR5. Pour cela nous nous sommes intéressés à l'étude de son expression et de son rôle dans la régulation de l'expression et de la sécrétion des hormones pancréatiques.

Pour notre étude, nous avons principalement utilisé la banque de tissus issus des isolements d'îlots de Langerhans à partir de pancréas humains. Nous avons étudié l'expression transcriptionnelle et protéique de TGR5 à partir de pancréas de sujets ayant différents profils physiologiques (minces, obèses) et/ou pathologiques (diabétique de type 2).

A partir d'îlots de Langerhans humains isolés, nous avons également étudié l'effet de la

modulation de l'expression du gène *GPBAR1* ainsi que les effets d'agonistes spécifiques du récepteur TGR5 sur l'expression du récepteur TGR5 et sur l'expression et la sécrétion des hormones pancréatiques.

Afin de mettre en évidence les mécanismes pouvant impliquer le récepteur TGR5 dans la modulation de l'activité de l'îlot de Langerhans nous avons développé et étudié différents modèles : la lignée cellulaire TGP52 ou des modèles murins (souris knock-out pour le gène de la somatostatine ; souris knock-out pour le gène *Gpbar1*). Ces dernières études ont été réalisées en collaboration avec les équipes du professeur Patrick Gilon (souris knock-out pour le gène de la somatostatine) et du professeur Kristina Schoonjans (souris knock-out pour le gène *Gpbar1*), équipes reconnues pour leurs études sur la modulation des sécrétions pancréatiques (Pr Gilon) et sur les implications métaboliques du récepteur TGR5 chez la souris (Pr Schoonjans).

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

Modèles utilisés

I. Îlots de Langerhans humains

A. Isolement des îlots de Langerhans humains

L'ensemble des pancréas utilisés dans ce travail a été obtenu de sujets morts cérébraux. Ils ont été obtenus au cours de prélèvements multiorganes organisés par l'établissement français des greffes en agrément avec la réglementation française et le comité institutionnel de l'éthique. Les îlots ont été isolés en utilisant une version modifiée de la méthode automatisée de Ricordi précédemment décrite [122]. Brièvement, le pancréas a été digéré par distension avec une solution contenant de la collagénase ou de la libérase. Après distension, le pancréas a été coupé en morceaux, mis dans une chambre de digestion (chambre de Ricordi) puis digéré à 37°C. Une fois la digestion estimée comme suffisante (contrôle de la digestion à des intervalles de temps réguliers), le digestat a été lavé dans une solution réfrigérée. Les îlots ont ensuite été purifiés par séparation isopycnique par centrifugation dans un gradient d'Euro-ficoll à l'aide d'un séparateur de cellules (COBE 2991, Lakewood, USA). Une fois purifiée et lavée la fraction endocrine a été mise en culture dans du milieu CMRL complet (CMRL, 10% sérum AB humain, 1% Penicillin-Streptomycin, 5,5 mM de glucose) jusqu'à évaluation et utilisation.

Après isolement, la fraction endocrine a été cultivée en CMRL complet durant 18 à 36 heures avant d'être évaluée par l'équipe d'évaluation, puis les îlots ont été remis aux utilisateurs pour la réalisation des expériences.

II. Les modèles murins

D. Souris C57B6j

Les souris contrôles utilisées tout au long de ce travail ont été obtenues de l'élevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). L'ensemble des expériences effectuées l'a été en appliquant l'ensemble des lois d'éthique applicables à ce type d'expérimentation.

E. Souris Knock-Out pour le gène de la somatostatine

(Laboratoire du Professeur Gilon)

Les souris Knock-Out pour le gène de la Somatostatine (*SST*^{-/-}, *SST* KO) ainsi que les expériences réalisées sur ce modèle ont été effectuées par le laboratoire du Professeur Gilon dans le cadre d'une collaboration (Université Catholique de Louvain, EDIN, Woluwe-Saint-Lambert, Belgique).

F. Souris Knock-Out pour le gène du récepteur TGR5

(collaboration avec le Professeur Schoonjans)

Les souris Knock-Out pour le gène *Gpbar1* (*TGR5*^{-/-}, *TGR5*-KO) ont été obtenues auprès du laboratoire du Professeur Schoonjans et ont été utilisées et étudiées dans notre laboratoire, dans le cadre d'une collaboration (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Suisse).

G. Isolement et culture des îlots de Langerhans de souris

Le protocole d'isolation des îlots de Langerhans de souris est à quelques détails près le même que celui utilisé pour l'isolation des îlots de Langerhans humains. La différence fondamentale se retrouve dans le processus de distension du pancréas. En effet, après euthanasie de la souris, l'enzyme de digestion du pancréas a été injectée via la vésicule biliaire pour perfuser uniformément l'ensemble du pancréas. Une fois distendu le pancréas a été disséqué puis la suite de la digestion s'effectuait non pas dans une chambre de Ricordi, mais dans un tube eppendorf sous agitation manuelle, à 37°C. Suivant la qualité, la pureté et l'utilisation voulue de la préparation d'îlots de Langerhans, celle ci pouvait être soit purifiée via l'utilisation de gradients d'Euro-ficoll (détaillé dans le protocole d'isolation des îlots de Langerhans humain) ou pouvait être « handpickée », les îlots de Langerhans étant dans ce cas purifiés manuellement.

III. Lignées cellulaires

A. Cellules murines pancréatiques TGP52 (ATCC)

La lignée cellulaire TGP52 est une lignée épithéliale murine dérivée d'une tumeur bêta pancréatique (insulinome) et possédant une morphologie de cellule de l'îlot de Langerhans [42]. Ces cellules en culture expriment et sécrètent de l'insuline et de la somatostatine ce qui en fait l'un des seuls modèles cellulaires permettant l'étude de la sécrétion de la somatostatine [42]. Cette lignée cellulaire a été cultivée en accord avec les recommandations du fournisseur ATCC dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, New York, USA) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal inactivé et 1% de pénicilline (100 µg/ml) et streptomycine (100 µg/ml).

B. Cellules murines pancréatiques MIN6 (collaboration avec le Professeur Abderrahmani)

La lignée MIN6 est une lignée cellulaire murine issue d'une tumeur bêta pancréatique (insulinome). Nous avons obtenu cette lignée cellulaire MIN6 auprès du laboratoire du professeur Amar Abderrahmani. Les cellules ont été cultivées en routine dans du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contenant 25 mM glucose et supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, 2 mM de L-glutamine, 25 mM HEPES, 285 μ M 2-mercaptoethanol et 1% de pénicilline (100 μ g/ml) et streptomycine (100 μ g/ml). Cette lignée a été cultivée en accord avec ce qui est décrit dans la littérature [123].

C. Cellules 804G

La lignée cellulaire 804G est dérivée d'une tumeur de la vessie de rat. Cette lignée cellulaire a été cultivée en accord avec ce qui est décrit dans la littérature, dans du milieu MEM F12 supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal inactivé et 1% de pénicilline (100 μ g/ml) et streptomycine (100 μ g/ml) [124]. Cette lignée cellulaire a été utilisée en tant que cellule productrice d'une matrice extracellulaire améliorant l'adhésion des îlots de Langerhans en culture.

Tests fonctionnels et modulation de l'expression génique

I. Culture et évaluation des îlots de Langerhans isolés

Le processus d'évaluation comporte différentes techniques ayant pour but d'évaluer la qualité de la préparation.

Le comptage est la première étape de l'évaluation. Elle permet d'estimer la pureté (rapport endocrine versus exocrine), la taille et d'observer la morphologie des îlots de Langerhans après au moins 18 heures de culture. Le comptage se fait par coloration de la préparation d'îlots à la dithizone, chélateur du zinc présent dans les cristaux d'insuline et permettant de différencier le tissu exocrine du tissu endocrine qui se colore en rouge. De plus le comptage du nombre d'îlots contenus dans un échantillon de volume donné et leur classification par diamètre permettent d'exprimer le nombre d'îlots en îlot-équivalent (IE = îlot de 150 µm de diamètre).

En plus de l'estimation visuelle de la quantité d'insuline contenue dans les îlots par coloration de la préparation à la dithizone (rapport intensité de la couleur, quantité d'insuline), le contenu intracellulaire en insuline des îlots est déterminé utilisant une partie de la préparation tissulaire mise en contact avec du tampon acétique puis soniqué. Le lysat cellulaire obtenu est ensuite congelé à -20°C jusqu'à dosage.

Egalement, afin d'évaluer la viabilité des îlots de Langerhans dans la préparation, un

double marquage des îlots à la dithizone et au bleu trypan (composé ne passant pas la barrière plasmique des cellules vivantes et ne colorant donc que les cellules mortes présentant une membrane plasmique poreuse) a été réalisé. La viabilité est estimée visuellement et est obtenue à partir du calcul suivant :

$$\frac{(n_1 \times 100) + (n_2 \times 90) + (n_3 \times 75) + (n_4 \times 50) + (n_5 \times 30) + (n_6 \times 10)}{N_{\text{total}}}$$

N_{total}

Une évaluation fonctionnelle des îlots est également réalisée. Elle permet de mesurer la sécrétion d'insuline d'une préparation d'îlots humains en réponse à différents sécrétagogues. Celle-ci est réalisée en plaque de 96 puits multiscreen (Millipore) possédant une membrane poreuse permettant par aspiration de récupérer le surnageant des îlots en culture durant les différentes phases de l'incubation statique. Les sécrétions sont réalisées en quintuplicates avec 40 IE par puits. Les îlots sont cultivés en RPMI durant toute la durée de l'expérience. Ils sont dans un premier temps préincubés pendant 1 heure à 37°C et 5% CO₂ en RPMI bas glucose (2,8 mM glucose). A la fin de ce temps d'incubation le milieu est aspiré et les îlots sont remis en contact avec du milieu RPMI bas glucose pendant 1 heure à 37°C et 5% CO₂. Au bout d'une heure, le milieu est aspiré, récupéré dans une plaque puis congelé à -20°C pour dosage. Les îlots sont alors mis en contact avec du milieu RPMI haut glucose (20 mM glucose) pendant 1 heure à 37°C et 5% CO₂. Au bout de cette dernière heure le milieu est aspiré et les surnageants sont congelés à -20°C dans l'attente de leur dosage.

II. Knock-down du gène de TGR5 (GPBAR1) par la technique des petits ARN interférences

Pour moduler (diminuer) l'expression du récepteur TGR5 dans nos modèles d'études nous avons utilisé la technique de knock-down par l'utilisation de petits oligonucléotides nommés siRNA. Dans un premier temps les îlots de Langerhans humains et/ou les cellules murines TGP52 ont été mis en contact avec une surface adhérente. Pour les îlots de Langerhans, suivant la qualité et la morphologie des îlots isolés, la préparation a été préalablement soumise à une courte prédissociation à l'acutase optimisant son adhésion en plaque de culture. Egalement, pour une meilleure adhésion les îlots de Langerhans ont été cultivés pour ce type d'expérience dans des boîtes de culture prétraitées avec des cellules tumorales épithéliales 804G sécrétant une matrice extracellulaire. Après culture durant 24 heures pour obtenir une adhésion totale, les cellules ont été lavées puis mises en contact avec une solution de transfection composée de KRH (4.74 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgCl₂·6H₂O, 119 mM NaCl, 2.54 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES), de lipofectamine (Lipofectamine 2000, Life Technologies, Saint Aubin, France) et de siRNA (siControl ou siRNA d'intérêt) (Fisher Scientific, Illkirch Cedex, France) en suivant les recommandations des fournisseurs que se soit pour la lipofectamine ou pour les concentrations de siRNA à utiliser. Après 6 heures en présence du milieu de transfection celui-ci a été enlevé et remplacé par un milieu de culture spécifique du modèle transfecté : pour les îlots de Langerhans du CMRL 1066 medium (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, New York, USA) contenant 0.6% sérum de veau foetal inactivé (Roche, Boulogne-Billancourt, France), pénicilline (100 µg/ml) et streptomycine (100 µg/ml) ; pour les cellules TGP52 du DMEM F:12 Glutamax, (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, New York, USA) supplémenté avec 10% sérum de veau foetal inactivé (Eurobio Abcys, Courtaboeuf, France), pénicilline (100 µg/ml) et streptomycine (100 µg/ml). Après 48

heures de culture en condition de transfection l'ARN a été récupéré pour observer l'impact du siRNA au niveau transcriptionnel (PCRq). Après 72 heures de transfection, les protéines ont été récupérées pour observer l'impact sur l'expression protéique (western blot).

III. Détermination de l'apoptose et de la nécrose dans une préparation d'îlots de Langerhans

Ces expériences avaient pour but de déterminer le niveau de toxicité de l'agoniste du récepteur de TGR5 utilisé dans notre étude. Dans cet objectif, les îlots de Langerhans humains ont été traités durant 2 heures comme lors des incubations statiques avec l'agoniste spécifique du récepteur TGR5 (1722-5, Biovision, Milpitas, United States) ou avec du diméthylsulfoxyde (DMSO, solubilisateur des agonistes). Après incubation les îlots ont été traités à l'acutase jusqu'à dissociation totale (observation de la préparation au microscope pour évaluer le niveau de dissociation) puis les cellules ont été passées sur un tamis 40 µm pour enlever les cellules non dissociées. Les cellules ont ensuite été comptées puis traitées en suivant les recommandations du kit Annexin V-FITC (MACS, Miltenyi Biotec, Paris, France). Brièvement les cellules ont été mises en présence successivement avec un anticorps anti Annexine V couplé à une FITC (apoptose précoce) puis avec du propidium iodide (nécrose) et ceci juste avant l'analyse. L'analyse des différentes populations cellulaires (vivantes, apoptotique, nécrotiques) a ensuite été effectuée utilisant l'analyseur de cellule BD FACSCanto II et le logiciel DIVA (BD Biosciences, Rungis, France). Les taux de cellules viables, apoptotiques et nécrotiques ont été exprimés en pourcentage (%).

IV. Détermination de l'efficacité des agonistes de TGR5 (collaboration avec le Professeur Staels)

Ces expériences ont été réalisées par le Laboratoire U1011 du Professeur Bart Staels. L'activation de TGR5 par les agonistes de TGR5 et l'induction d'une augmentation de la production de l'AMPc induite ont été évaluées via un gène rapporteur couplé à une luciférase. Des cellules humaines embryonnaires de reins nommées HEK 293 ont été co-transfectées de façon temporaire avec un plasmide d'expression pCMV tag4b-TGR5h et un plasmide rapporteur pCRE TA-Luciferase utilisant le réactif JET PEI (Polyplus transfection). Une fois transfectées les cellules ont été placées dans des plaques 96 puits et incubées toute la nuit avec le composé à tester. L'acide lithocholique (LCA) a été utilisé en tant que composé contrôle (10 μ M). L'expression du gène rapporteur couplé à la luciférase induite par l'AMPc a été déterminée utilisant le réactif BrightGlo et en regard des instructions du fabricant (Promega). La luminescence a été mesurée utilisant un lecteur de plaque Mithras (Berthold). Les résultats ont été exprimés en pourcentage et en rapport aux valeurs obtenues avec le LCA. Les EC50 ont été calculées en utilisant deux logiciels XL fit 5 software ou GraphPad Prism 5. Dans ce test l'agoniste commercial 1722-5 de chez Biovision présentait une EC₅₀ de 0,11 μ M.

V. Sécrétions et contenus intracellulaires

Durant ce travail de thèse, de nombreuses expériences visant à déterminer l'impact de composés sur la sécrétion des hormones pancréatiques ont été effectuées et ceci sur différents modèles. Les techniques ayant été utilisées durant ce travail sont celles développées et utilisées en routine au laboratoire.

Concernant les expériences de sécrétion sur les îlots de Langerhans humains (somatostatine, insuline, glucagon), celles-ci ont été effectuées selon deux techniques différentes: incubation statique en plaque aspirante et incubation statique en plaque classique. Concernant l'incubation statique en plaque aspirante, 40 IE ont été dispatchés dans une plaque 96 puits présentant un fond poreux (plaque à filtre EMD millipore Multiscreen 96 puits, Merck Chimie SAS, Fontenay sous bois, France) pouvant être adaptée sur un support millipore permettant par aspiration de récupérer les surnageants sans aspirer les cellules. Les îlots ont été tout d'abord mis en contact avec un milieu bas glucose (2,8 mM glucose) durant 1 heure ce qui constituait la phase de stabilisation. Ensuite le milieu a été aspiré et l'incubation statique a été lancée. Celle-ci se divisait en deux incubations de 1 heure chacune, l'une en bas glucose (2,8 mM glucose), l'autre en haut glucose (20 mM glucose). A la fin de chaque heure le surnageant de chaque puit a été collecté et congelé à -20°C en attente de dosage. Pour ces expériences au moins 5 puits de 40 IE ont été utilisés par condition et les surnageants bas et haut glucose d'un même puit ont été comparés. La sécrétion est normalisée au nombre d'îlots équivalents par puit (40 IE) et à la durée d'incubation (1 heure). Concernant l'incubation statique en plaque de culture classique, le protocole été celui utilisé dans notre étude ayant cherché à étudier l'expression et le rôle du transporteur du glucose SGLT2 dans l'îlot de Langerhans humain et murin [125]. Brièvement, 40 IE ont été dispatchés dans chacun des puits dépendamment du

nombre de conditions et en quadruplicats. Ils ont été tout d'abord mis en contact avec un milieu bas glucose (1 mM glucose) durant 1 heure ce qui constituait la phase de stabilisation. Au bout d'une heure le milieu était enlevé et remplacé par le milieu d'intérêt à différentes concentrations de glucose (1-6-15 mM Glucose) et avec différentes concentrations d'agoniste du récepteur TGR5 (agoniste 1722-5 à 0-1-10-50 μ M). Ces différents milieux étaient laissés au contact des îlots pendant une heure avant d'être prélevés et congelés pour dosage des hormones sécrétées. Les îlots étaient eux recueillis et congelés selon les recommandations données par les kits de dosages pour détermination des contenus hormonaux intracellulaires.

Pour les expériences de sécrétions effectuées sur les îlots de Langerhans murins et sur les lignées cellulaires (TGP52), celles-ci étaient basées sur une publication de notre laboratoire [3]. Brièvement, après culture durant 24 heures pour permettre l'adhésion des cellules dans une plaque, le milieu de culture a été enlevé et remplacé pendant 2 heures par du milieu « Krebs-Ringer Bicarbonate buffer (KRB ; 133 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0,4 mM K₂HPO₄, 20 mM HEPES) » à 2 mM de glucose, ce qui constituait la période de récupération et de stabilisation des cellules. Après ce temps de récupération, le milieu a été enlevé et l'incubation statique commençait. Celle-ci se composait de 2 incubations successives de 45 minutes avec premièrement du KRB bas glucose (2 mM) puis du KRB haut glucose (20 mM). Les surnageants ont été récupérés à la fin des 2 périodes de 45 minutes et congelés à -20°C en attendant d'être dosés. Les cellules étaient elles récupérées, lavées en PBS, mises en contact de PBS supplémenté avec 0,5% de Triton X100, soniquées puis congelées à -20°C pour dosage des contenus hormonaux intracellulaires.

Expression génique et protéique

I. Préparation tissulaire

Les différents tissus humains, murins et porcins ont été obtenus de sujets morts cérébraux (humains) et de sujets euthanasiés (souris, minipig). Ils ont été prélevés dans le contexte de traçabilité de notre programme de transplantation (ClinicalTrials.gov NCT 01123i87). Les tissus ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4% (w/v) puis inclus en paraffine. Des coupes de 4 μm ont été coupées via l'utilisation d'un microtome Leica RM 2165 (Leica; Copenhagen, Denmark). En plus des tissus utilisés pour réaliser les immunomarquages, d'autres tissus congelés instantanément en azote liquide ont été utilisés pour l'ensemble des études transcriptionnelles.

II. Etude de l'expression transcriptionnelle (ARN)

A. Lyse cellulaire

Après culture dans les conditions expérimentales déterminées, les cellules ou tissus étaient lavés en PBS froid puis mis en contact avec un tampon de lyse. Durant l'ensemble de ce travail de thèse un kit commercial a été utilisé (QIAGEN RNeasy Mini kit, Courtaboeuf, France) dans le but d'extraire et de purifier les ARN de préparations cellulaires et tissulaires. Concernant les volumes de tampon de lyse à ajouter, les recommandations du fabricant ont été

suivies. Une fois le tampon de lyse ajouté aux cellules ou tissus ceux-ci étaient homogénéisés (OMNI EZ Connect en acier inox, Dominique Dutscher, Brumoth, France) ou directement congelés jusqu'à extraction et purification.

B. Extraction / purification des ARN messagers

Comme expliqué précédemment l'extraction et la purification des ARN de l'ensemble des cellules et tissus effectuées durant ce projet ont été réalisées en utilisant le RNeasy Mini kit de chez Qiagen. Les extractions et purifications ont été réalisées en suivant le protocole fourni par le fabricant du kit. Brièvement, les échantillons ont été mélangés à de l'éthanol, passés sur colonne (fournies dans le kit), lavés (solutions fournies dans le kit) et enfin élués (solution d'éluion fournie dans le kit). Une fois élués, les échantillons ont été dosés en utilisant la technique du nanodrop (Thermo scientific, Wilmington, USA). D'autre part la qualité des ARN a été vérifiée par analyse et visualisation des ARN ribosomiaux 18S et 28S en utilisant le kit d'analyse « Experion RNA StdSens » couplé au bioanalyseur Experion de chez Biorad (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France). Seuls les ARN ayant un indicateur de qualité (RQI) supérieur à 7,6 (RIN = 7,3) ont été utilisés.

C. RT-PCRq

Après dosage et détermination de la qualité, les ARN ont été rétrotranscrits. La rétrotranscription a été réalisée sur la même quantité d'ARN pour l'ensemble des échantillons avec pour base 500 ng d'ARN. Un mix de rétrotranscription (tampon de la réaction, amorces, dNTP, enzyme de transcriptase inverse) a été préparé à partir du kit « High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life technologies, Saint Aubin, France) en suivant les recommandations données par le fabricant. Une fois la transcription inverse effectuée en suivant les recommandations du fabricant, le niveau d'expression a été déterminé par

quantification d'une réaction de polymérase en chaîne (PCRq). Celle-ci a été réalisée via l'utilisation du kit « TaqMan PCR master mix » (Life technologies, Saint Aubin, France) en suivant les recommandations fournies par le fabricant. Les différentes sondes ont été obtenues du site Applied Biosystems (Life technologies, Saint Aubin, France). La PCRq a été réalisée en utilisant le système de détection "BioRad MyiQ Single-Color Real-Time PCR". L'expression des gènes a été corrigée en utilisant le gène de ménage, ribosomal protein, large, P0 (RPLP0).

III. Etude de l'expression protéique

A. Lyse cellulaire / conditionnement tissulaire

Après culture dans les différentes conditions expérimentales déterminées, les cellules ou tissus ont été lavés en PBS froid puis mis en contact avec un tampon de lyse RIPA contenant 40M d'HEPES (ph 7,5), 120 mM NaCl, 1 mM d'EDTA, 10 mM de pyrophosphate, 10 mM de Glycerophosphate, 50 mM NaF, 1,5 mM de sodium orthovanadate, 10 µM d'acide okadaic, 10 µg/ml d'aprotinine et 10 µg/ml leupeptine.

Les tissus ou les culots cellulaires à la base de nos expériences histologiques (immunohistochimie, immunohistofluorescence) ont été inclus en biocolle (kit Tissucol IMMUN AG, Vienne, Autriche), fixés en paraformaldéhyde à 4%, puis envoyés au service histologique de la faculté de médecine pôle recherche pour paraffinage et conditionnement sur lames. Pour les cytopins, les cellules décollées de leur support ont été fixées par centrifugation (1000 rpm, 1 min, Cytospin 3, Shandom Scientific limited, Cheshire UK) sur lame. Les lames ont ensuite été séchées 24 heures à température ambiante avant d'être stockées à -20°C.

B. Extraction / purification des protéines

La lyse des cellules et le broyage des tissus ont été effectués dans un tampon de lyse spécifique. Après ajout du tampon de lyse les cellules ont été mises sur glace pour 30 minutes avec homogénéisation à la pipette toutes les 10 minutes. Pour les tissus une étape de broyage utilisant le OMNI EZ Connect en acier inox (Dominique Dutscher, Brumoth, France) a été effectuée puis le lysat a été mis sur glace pour lyse complète. Après lyse cellulaire l'ensemble du matériel non soluble a été enlevé par centrifugation à 12000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Une fois la lyse complète les échantillons ont été conservés à -20°C ou le Western blot a été directement effectué.

C. Western-blot

La concentration protéique de chaque échantillon a été déterminée en utilisant la technique de Bradford (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Une quantité égale de protéine (30 µg de protéine) a été dénaturée à 95°C pendant 5 minutes. Les différentes préparations protéiques ont été ensuite déposées sur un gel SDS-PAGE de 12% puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (Proten BA 85, Schleicher & Shucell, Dassel, Germany). Les membranes ont été bloquées pendant au moins 1 heure à température ambiante avec du PBS contenant 0,1% (v/v) de Tween-20 (TBS-T) et 5% de lait écrémé. L'anticorps primaire lapin anti TGR5 (ab72608, Abcam, Paris, France), souris anti bêta-actine (A3854, SIGMA) et souris anti tubuline alpha (T5168, SIGMA) ont été dilués au 1/1000e dans du T-BST contenant 5% de lait et ont été incubés toute la nuit à 4°C. Les membranes ont été ensuite lavées en TBST-T puis les anticorps secondaires chèvre anti lapin et chèvre anti souris couplés à une Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (GE Healthcare Life sciences, Velizy-Villacoublay, France) ont été dilués au 1/5000^e en TBST-T contenant 5% de lait et incubés sur les membranes. Les

membranes ont ensuite été lavées en T-BST puis révélées en utilisant le kit de révélation ECL prime (GE Healthcare Life sciences, Velizy-Villacoublay, France). La quantification des western-blots a été effectuée utilisant le logiciel ImageJ.

D. Dosages immunologiques

Concernant les îlots de Langerhans humains et la lignée TGP52, l'évaluation des sécrétions de somatostatine, d'insuline et de glucagon ont été effectuées utilisant des dosages spécifiques immuno-enzymatiques (somatostatin-28 et Glucagon, Phoenix Pharmaceuticals, inc, Strasbourg, France) et radios immunologiques (kit BI-INSULIN IRMA, Sanofi, France). Concernant les îlots de Langerhans murins les dosages ont été effectués en utilisant le kit de dosage « anti-mouse ultrasensitive insulin ELISA kit » (Mercodia, Paris, France). L'ensemble des dosages a été réalisé en suivant les recommandations des fournisseurs.

E. Immunohistochimie

Les lames de cellules et de tissus (pancréas, intestin) récupérées du service d'histologie ont été déparaffinées. Un démasquage spécifique des antigènes a été effectué. Elles ont ensuite été traitées au « Protein Block » dans le but de bloquer les protéines a-spécifiques des lames et diminuer ainsi les phénomènes de fixations a-spécifiques des anticorps. Les premiers anticorps primaires ont ensuite été incubés toute la nuit à 4°C aux concentrations recommandées par les fournisseurs. Les lames ont été lavées et mises en présence d'un anticorps anti-espèce de l'anticorps primaire et couplé à un fluorophore. Durant ce travail de nombreux doubles immunomarquages ont été effectués entre la protéine TGR5 et les trois principales hormones pancréatiques (insulin, glucagon, somatostatine), ainsi que des marquages endocrines utilisant le marqueur pan-endocrine chromogranine A. D'autres doubles immunomarquages intestinaux ont été effectués contre TGR5 et la somatostatine et/ou glucagon like peptide 1 (GLP-1). Ces

marquages ont été effectués sur des coupes tissulaires ou de cellules humaines, murines et de minipig. Les références des anticorps utilisés durant ce travail sont regroupées dans le tableau présent ci-dessous (Figure 15).

Protein name	Manufacturer	Reference	Species
TGR5	Abcam	ab72608	Rabbit
TGR5	Genetex	GTX100026	Rabbit
Chromogranin A	Abcam	ab715/LK3H10	Mouse
Somatostatin	Santa-cruz	sc-25262	Mouse
Insulin	Monosan	Mon5021	Mouse
Glucagon	Sigma-Aldrich	G2654	Mouse
Glucagon-like peptide-1	Santa-cruz	sc-57167	Mouse
Alexa fluor 488	Life-technologies	A21206	Rabbit
Alexa fluor 594	Life-technologies	A11032	Mouse
Actin	Sigma-Aldrich	A3854	Mouse
Tubulin	Sigma-Aldrich	T5168	Mouse
Horseradish peroxidase IgG	GE healthcare	NXA931	Mouse
Horseradish peroxidase IgG	GE healthcare	NA934V	Rabbit

Figure 15 : présentation des différents anticorps utilisés dans ce travail de thèse, leur espèce, leur fournisseur et leur référence.

CHAPITRE 3 : RESULTATS

Le récepteur TGR5 est exprimé dans les
cellules δ pancréatiques et module
l'activité endocrine pancréatique
(papier soumis et révisé)

I. Le récepteur TGR5 est exprimé dans le pancréas endocrine

Notre laboratoire possédant une banque de tissus paraffinés et congelés de pancréas (biopsies réalisées lors des prélèvements avant isolation des îlots de Langerhans) et d'îlots de Langerhans isolés de différentes espèces (humain, souris minipig), nous avons tout d'abord entrepris d'étudier l'expression de TGR5 dans les tissus pancréatiques endocrine et exocrine chez l'humain. Nous avons réalisé l'étude de l'expression de la protéine TGR5 dans les lysats de trois préparations différentes de tissus endocrines et exocrines humains par western-blot.

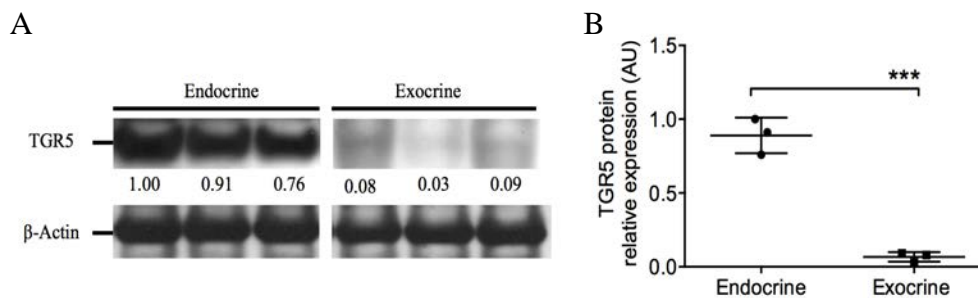


Figure 16 : expression de la protéine TGR5 dans le pancréas endocrine et exocrine. (A) Western blot montrant l'expression du récepteur TGR5 dans le pancréas endocrine et exocrine humain. (B) Quantification du western blot effectuée utilisant le logiciel ImageJ. *** $P < 0,001$. T-test Mann-Whitney.

Nous avons montré par cette première expérience que TGR5 est préférentiellement exprimé dans le tissu endocrine pancréatique et donc dans les îlots de Langerhans chez l'humain (Figure 16). Dans un second temps et dans le but de valider nos premières observations, nous avons à partir d'ARN extrait de tissus exocrines et endocrines de 3 différents pancréas humains étudié l'expression transcriptionnelle de l'ARN issu du gène *GPBAR1*. Comme montré précédemment au niveau protéique, *GPBAR1* est préférentiellement exprimé dans le tissu endocrine pancréatique (Figure 17).

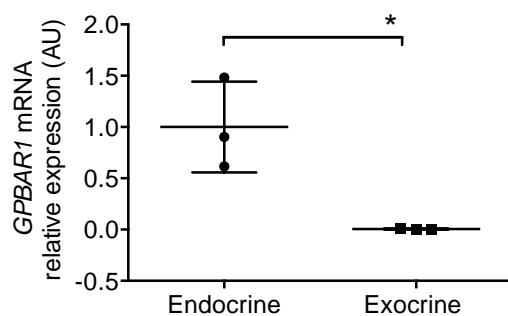


Figure 17 : expression de l'ARN de TGR5 (*GPBAR1*) dans le tissu endocrine et exocrine humain. PCRq de l'expression transcriptionnelle de *GPBAR1* dans 3 échantillons de tissus endocrines et exocrines humains. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage, RPLP0. *** $p < 0,001$. T test Mann-Whitney.

De plus et pour consolider les résultats obtenus en western-blot, nous avons effectué des immunomarquages de coupes de tissus pancréatiques humains. Plus précisément, nous avons réalisé un double immunomarquage entre la protéine TGR5 et la protéine chromogranine A. La protéine chromogranine A est une protéine acide soluble localisée dans les granules de sécrétion des cellules neuroendocrines permettant ainsi l'immunomarquage de l'îlot de Langerhans dans le pancréas et de distinguer le tissu endocrine du tissu exocrine. Il apparaît dans nos expériences que l'ensemble des cellules TGR5 positives sont chromogranine A positives, validant l'hypothèse d'une expression préférentielle de TGR5 dans le tissu endocrine (Figure 18).

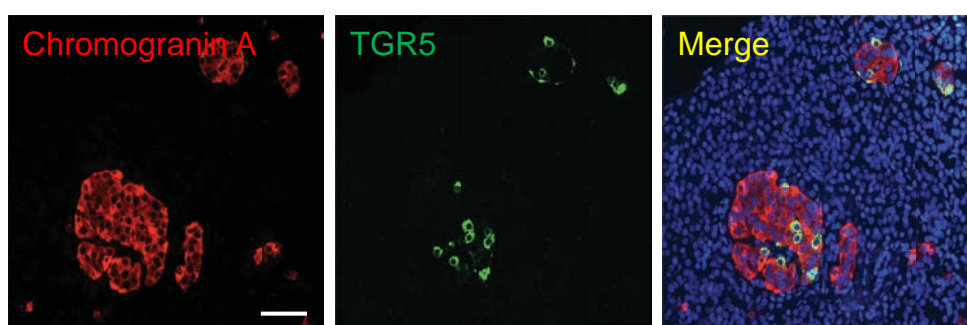


Figure 18 : expression de la protéine TGR5 dans le tissu endocrine humain. Double immunomarquage entre la protéine ubiquitaire neuro-endocrine chromogranine A (rouge) et le récepteur TGR5 (vert) réalisé sur des coupes histologiques de pancréas humain. Le Merge présente la superposition des deux premières photos (les cellules doubles immunomarquées apparaissent en jaune) et le contre marquage de la lame au DAPI qui colore les noyaux en bleu. Echelle : 100 μ M.

II. Le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ pancréatiques et intestinales

A. Le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ pancréatiques chez l'humain, la souris et le minipig

Une fois l'expression préférentielle de la protéine TGR5 dans le pancréas endocrine mise en évidence, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'expression de TGR5 dans les différentes populations de l'îlot de Langerhans humain. Nous nous sommes focalisés sur les 3 populations préférentiellement présentes dans l'îlot de Langerhans qui sont les cellules β , α et δ pancréatiques. Dans le but de déterminer dans quelle sous-population pancréatique le récepteur TGR5 est exprimé, nous avons réalisé un ensemble de doubles immunomarquages entre TGR5 et les 3 hormones sécrétées par les 3 grandes populations cellulaires endocrines que sont : l'insuline (INS) (β), le glucagon (GCG) (α) et la somatostatine (SST) (δ). Pour cela nous avons utilisé un certain nombre d'anticorps spécifiques de ces différentes protéines listés dans le tableau de la Figure 15.

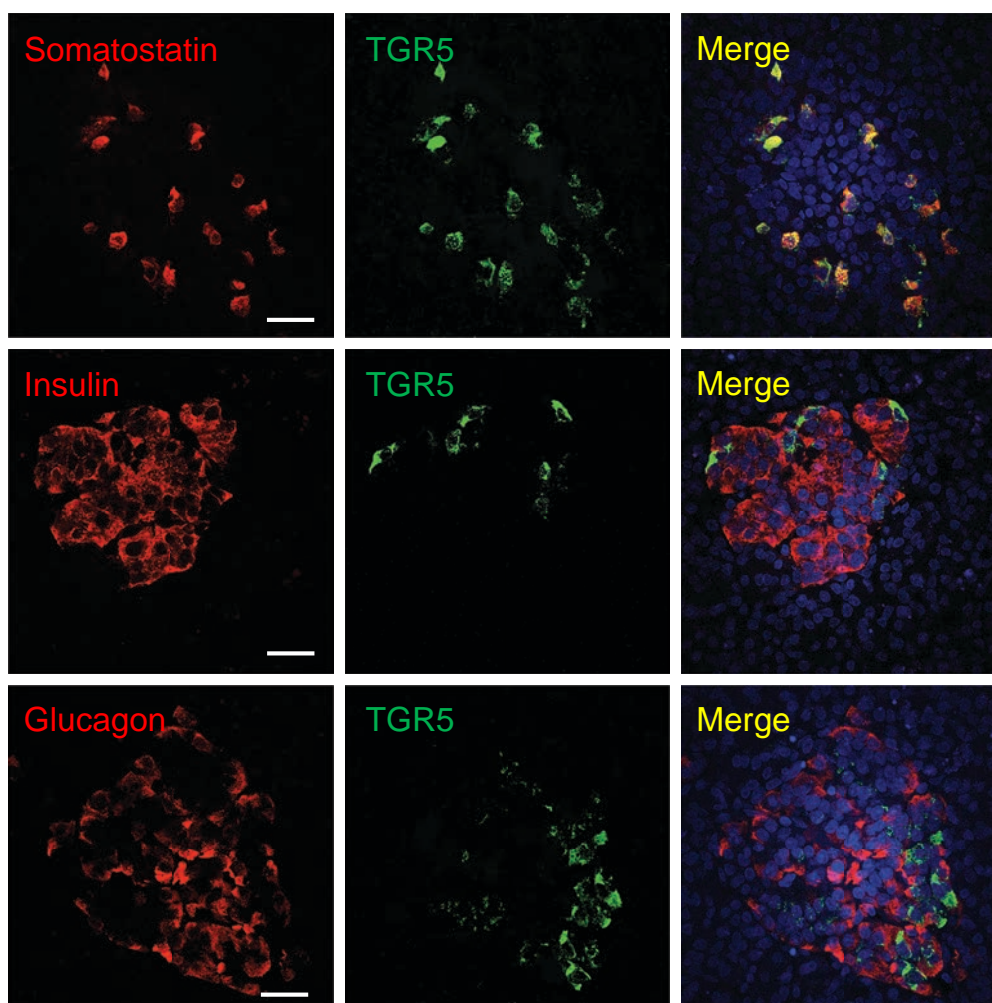


Figure 19 : le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ pancréatiques sécrétrices de la somatostatine. Doubles immunomarquages réalisés entre les trois principales hormones pancréatiques, la somatostatine (rouge), l'insuline (rouge) et le glucagon (rouge), et le récepteur TGR5 (anticorps Abcam ab72608) (vert), sur des coupes histologiques de pancréas humain. Le Merge présente la superposition des deux premières photos (les cellules doubles immunomarquées apparaissent en jaune) et le contre marquage de la lame au DAPI qui colore les noyaux en bleu. Echelle : 100 μ M.

Nous avons mis en évidence une expression de TGR5 spécifiquement dans les cellules sécrétrices de la SST (cellules δ) (Figure 19). En effet le double immunomarquage entre la SST en rouge et TGR5 en vert est parfaitement superposable donnant des cellules jaunes (observable sur le « Merge » issu de la superposition des deux marquages effectués contre la somatostatine et TGR5). D'autre part nous n'avons pas observé de cellules doubles immunomarquées pour l'INS / le GLG et TGR5 présumant d'une expression exclusive de TGR5 dans les cellules δ pancréatiques (Figure 19).

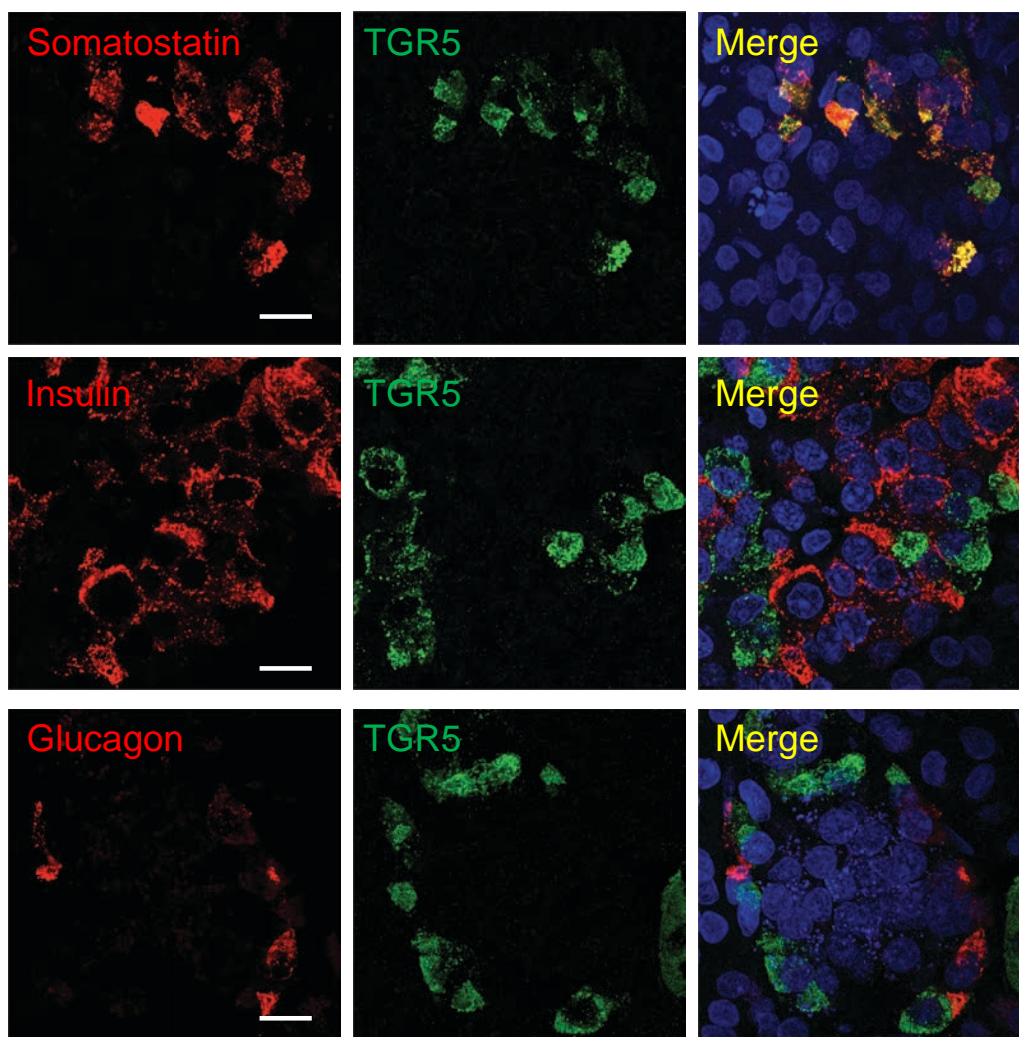


Figure 20 : le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ pancréatiques humaines sécrétrices de la somatostatine utilisant un second anticorps anti récepteur TGR5. Doubles immunomarquages réalisés entre les trois principales hormones pancréatiques, la somatostatine (rouge), l'insuline (rouge), le glucagon (rouge) et TGR5 (anticorps Genetex, GTX100026) (vert) sur des coupes histologiques de pancréas humain. Le Merge présente la superposition des deux premières photos (les cellules doubles immunomarquées apparaissent en jaune) et le contre marquage de la lame au DAPI qui colore les noyaux en bleu. Echelle : 100 μ M.

Nous avons par la suite réalisé un ensemble de seconds doubles immunomarquages utilisant les mêmes anticorps dirigés contre les hormones pancréatiques, mais un anticorps différent dirigé contre la protéine TGR5, ceci dans le but de reproduire les observations faites précédemment en utilisant un anticorps d'un fournisseur différent et dirigé contre des épitopes différents. L'utilisation d'un second anticorps primaire spécifiquement dirigé contre TGR5 nous a permis de reproduire et de valider les premiers doubles immunomarquages effectués et décrits précédemment (Figure 20).

D'autre part possédant une banque de tissus issus d'autres espèces telles que la souris ou encore le minipig et sachant que TGR5 est hautement conservé chez les mammifères, nous avons réalisé un ensemble d'immunomarquages dans le but d'étudier l'expression de TGR5 dans le pancréas de ces deux espèces. Nous avons retrouvé une expression de TGR5 uniquement dans les cellules δ pancréatiques sécrétrices de la somatostatine dans les tissus pancréatiques de ces deux espèces (Figure 21).

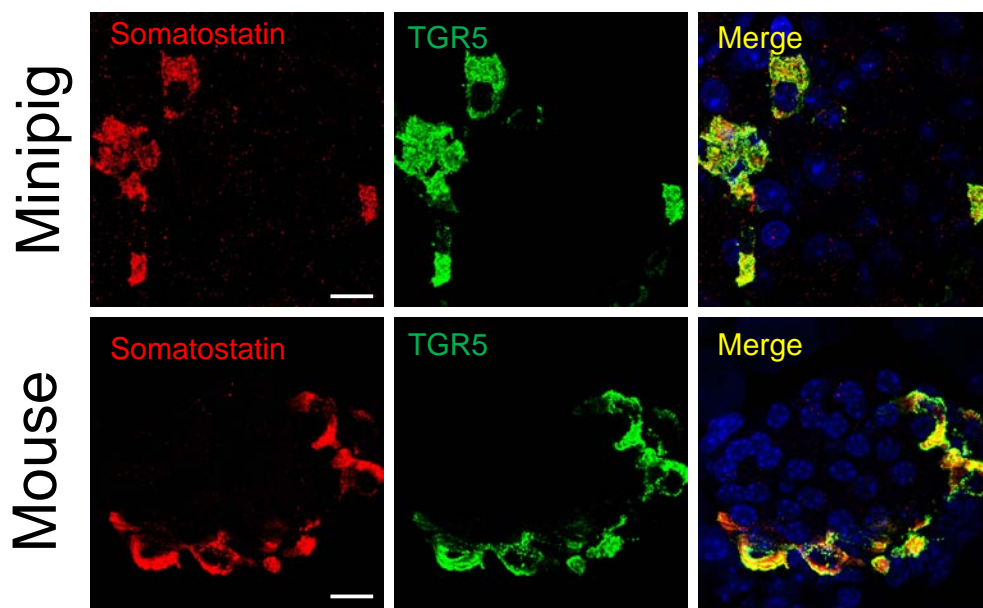


Figure 21 : le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ pancréatiques chez le minipig et la souris. Doubles immunomarquages réalisés entre la somatostatine (rouge) et le récepteur TGR5 (anticorps Abcam, ab72608) (vert) sur des coupes histologiques de pancréas de minipig et de souris. Le Merge présente la superposition des deux premières photos (les cellules doubles immunomarquées apparaissent en jaune) et le contre marquage de la lame au DAPI qui colore les noyaux en bleu. Echelle : 100 μ M.

B. Le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ intestinales

La somatostatine est une hormone exprimée et sécrétée au niveau de nombreuses zones de l'organisme. L'une des structures sécrétant le plus de somatostatine est l'intestin qui présente comme le pancréas des cellules δ . Dans cette partie de mon travail de thèse, nous avons voulu montrer que TGR5 n'est pas seulement exprimé dans les cellules L intestinales au niveau de l'intestin, mais que comme dans le pancréas on le retrouve exprimé dans les cellules δ intestinales. Pour cela nous avons dans un premier temps effectué un ensemble de doubles immunomarquages ciblant le GLP-1 (marqueur spécifique des cellules L intestinales) et TGR5, sur des coupes d'intestin humain. Nous avons observé que les cellules GLP-1 positives sont toutes positives pour TGR5, mais que certaines cellules TGR5 positives sont elles négatives pour le GLP-1, présumant d'une expression de cette protéine dans une autre sous population intestinale (Figure 22).

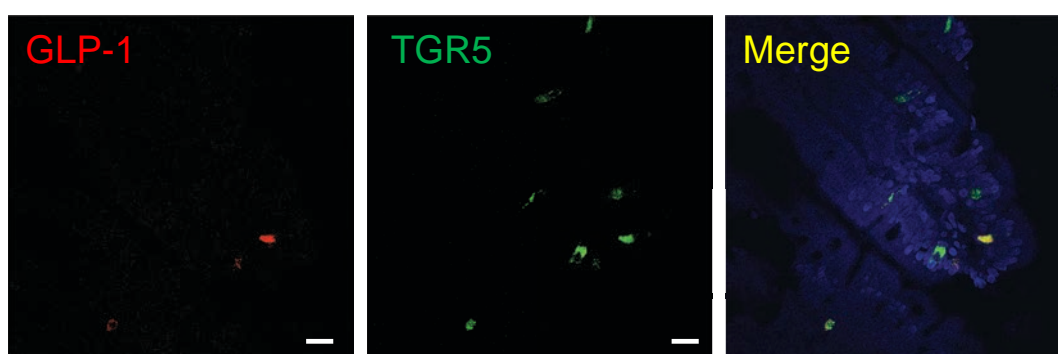


Figure 22 : le récepteur TGR5 n'est pas exclusivement exprimé dans les cellules L intestinales chez l'humain. Double immunomarquage réalisé entre le GLP-1 (rouge) et TGR5 (anticorps Abcam, ab72608) (vert) sur des coupes histologiques d'intestin humain. Le Merge présente la superposition des deux premières photos (les cellules doubles immunomarquées apparaissent en jaune) et le contre marquage de la lame au DAPI qui colore les noyaux en bleu. Echelle : 100 μ M.

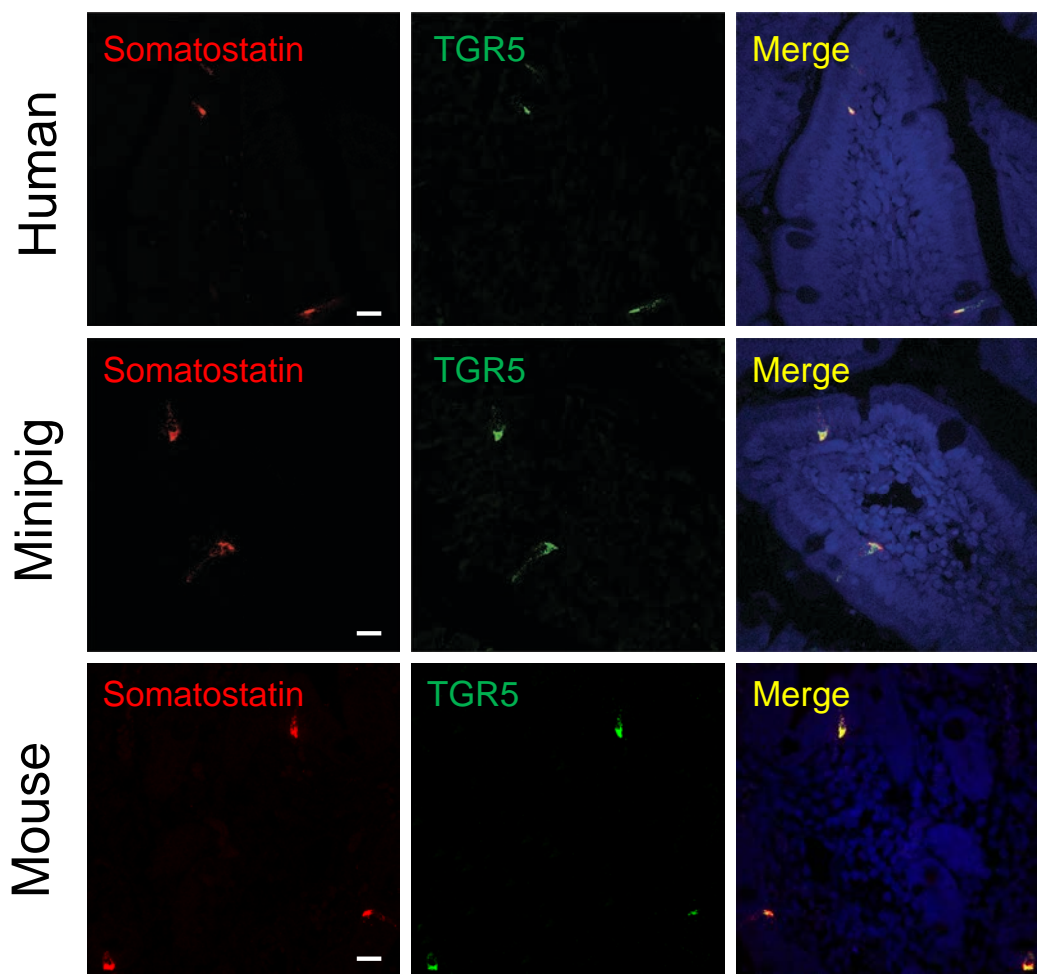


Figure 23 : le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ intestinales chez l'humain, le minipig et la souris. Doubles immunomarquages réalisés entre la somatostatine (rouge) et TGR5 (anticorps Abcam, ab72608) (vert) sur des coupes histologiques d'intestin humain, de minipig et de souris. Le Merge présente la superposition des deux premières photos (les cellules doubles immunomarquées apparaissent en jaune) et le contre marquage de la lame au DAPI qui colore les noyaux en bleu. Echelle : 100 μ M.

Dans le but de déterminer si TGR5 est également exprimé dans les cellules δ intestinales, nous avons effectué des doubles immunomarquages ciblant la somatostatine et TGR5 sur des coupes de tissus intestinaux humains, de minipig et murins. Nous avons observé que l'ensemble des cellules δ intestinales (somatostatines positives) sont également immunomarquées pour TGR5 chez l'humain, le minipig et la souris (Figure 23) comme observé dans les pancréas de ces mêmes espèces (Figures 19-21)

C. Le récepteur aux acides biliaires TGR5 est exprimé dans des lignées cellulaires pancréatiques et intestinales

Durant mon travail de thèse nous avons utilisé de nombreux modèles cellulaires, que se soit pour étudier les mécanismes impliquant TGR5 dans la régulation de l'activité pancréatique ou également pour valider nos hypothèses et nos expériences. Au niveau protéique, nous avons montré par western blot que TGR5, en plus d'être exprimé dans les îlots de Langerhans humains, est exprimé dans les cellules TGP52 (modèle cellulaire issu d'un insulinome et utilisé en tant que modèle cellulaire pancréatique sécrétant de la somatostatine) et dans la lignée cellulaire β pancréatique MIN6 (Figure 24). Par analyse PCRq d'ARN d'îlots de Langerhans, de cellules TGP52 et de MIN6 nous avons observé que, comme montré précédemment, *GPBAR1* est exprimé dans ces trois modèles (Figure 25).



Figure 24 : le récepteur TGR5 est exprimé dans les îlots humains et dans les lignées cellulaires murines TGP52 et MIN6. Western blot montrant l'expression du récepteur TGR5 dans les îlots de Langerhans humains et dans les lignées cellulaires pancréatiques murines TGP52 et MIN6. Pour chaque type cellulaire deux préparations différentes ont été utilisées.

Nous avons également montré qu'en plus de l'expression de *Gpbar1*, la lignée cellulaire β pancréatique MIN6 exprime également la somatostatine (Sst). Néanmoins nos résultats montrent une expression plus faible de ces deux gènes en comparaison à leur expression dans les îlots de Langerhans humains. D'autre part nous avons montré cette même expression de TGR5 par immunomarquage dans les cellules TGP52 avec une colocalisation avec la somatostatine connue pour être également exprimée par ces cellules (Figure 26).

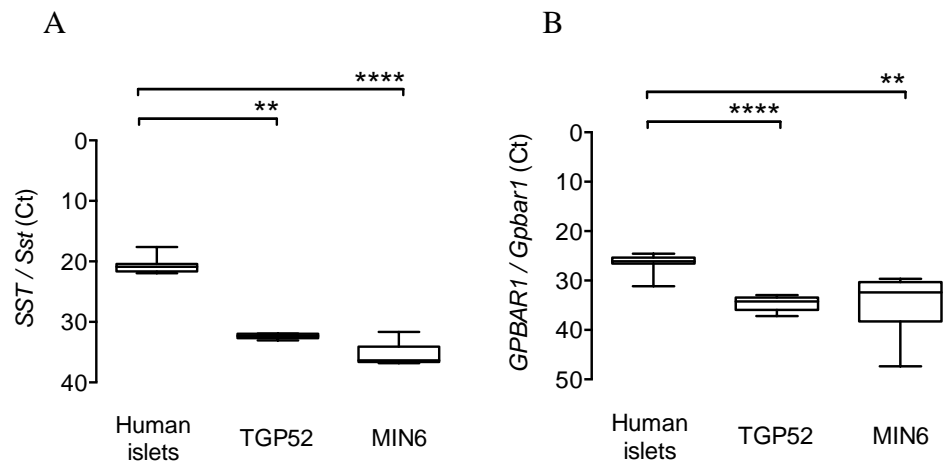


Figure 25 : le récepteur TGR5 est exprimé au niveau transcriptionnel dans les îlots de Langerhans humains et dans les lignées pancréatiques murines TGP52 et MIN6. PCRq de l'expression de la *SST/Sst* (A) et de *GPBAR1/Gpbar1* (B) dans les îlots de Langerhans humains et dans les lignées cellulaires murines TGP52 et MIN6. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage RPLP0. **p<0,01, ****p<0,0001. Les résultats ont été analysés utilisant un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's.

Dans le but de valider notre anticorps dirigé contre TGR5, nous avons réalisé des immunomarquages contrôles sur des lignées cellulaires connues pour exprimer la protéine TGR5 tels les modèles cellulaires L intestinaux NCIH716 (humain) et GluTag (murin) (Figure 26). Ces cellules ont également été doubles immunomarquées avec une protéine spécifiquement exprimée par ce type cellulaire, le GLP-1 (Figure 26).

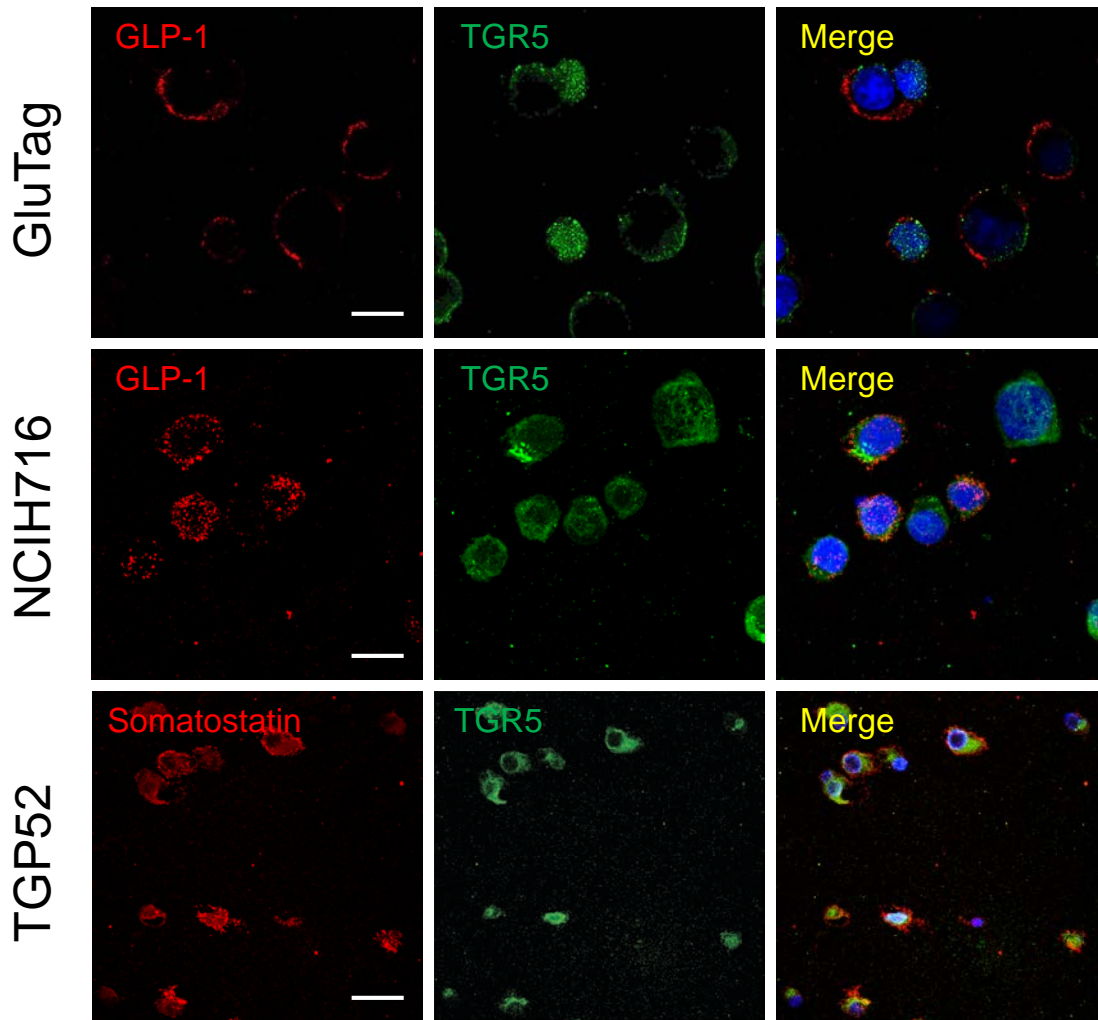


Figure 26 : le récepteur TGR5 est exprimé dans les lignées cellulaires intestinales GluTag et NCIH716 et dans la lignée cellulaire pancréatique TGP52. Doubles immunomarquages réalisés entre le GLP-1 (GluTag et NCIH716) (rouge), la somatostatine (TGP52) (rouge) et TGR5 (anticorps Abcam ab72608) (vert) réalisés sur des cellules intestinales (GluTag, NCIH716) et pancréatiques (TGP52) fixées en bio-colle. Le Merge présente la superposition des deux premières photos (les cellules doubles immunomarquées apparaissent en jaune) et le contre marquage de la lame au DAPI qui colore les noyaux en bleu. Echelle : 100 μ M.

III. Les expressions de TGR5 et de la somatostatine sont corrélées dans des conditions pathologiques

A. Les expressions de TGR5 et de la somatostatine sont modulées et corrélées dans les îlots de Langerhans de sujets contrôles, obèses et diabétiques de type 2

	Lean (NG)	Obese (NG)	T2D (GI)
Donor no (n)			
n	15	20	7
Age (years)			
mean	38.3	54.9	57.0
sem	12.0	7.7	4.3
BMI (Kg/m²)			
mean	21.7	32.0	30.3
sem	1.8	1.8	5.3
p value (lean vs.)	1	<0.0001	0.0057
HbA1c (%)			
mean	5.7	5.7	7.5
sem	0.2	0.3	1.0
p value (lean vs.)	1	0.0029	0.0014

Figure 27 : paramètres physiologiques (nombre de donneurs n, Age (année), BMI (Kg/m²) et HbA1c (%)) des 3 groupes de pancréas utilisés pour l'étude transcriptionnelle du récepteur TGR5 chez les sujets sains (Lean, normaux glycémiques (NG)), obèses (normaux glycémiques) et T2D (glucose intolérant (GI)). Les résultats ont été analysés utilisant un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's.

Après avoir mis en évidence une expression de TGR5 dans le pancréas endocrine et plus précisément dans les cellules δ pancréatiques, nous avons cherché à étudier le profil d'expression de TGR5 chez des sujets présentant des profils métaboliques différents. Pour cela nous avons, à partir de la banque de tissus pancréatiques que nous possédons au laboratoire,

constitué 3 groupes de patients : sujets minces et normaux glycémiques (lean (NG)), sujets obèses normaux glycémiques (Obese (NG)) et sujets diabétiques de type 2 (T2D), en fonction de différents paramètres physiologiques (Age, Indice de masse corporelle (BMI) et hémoglobine glyquée (HbA1c)) (Figure 27).

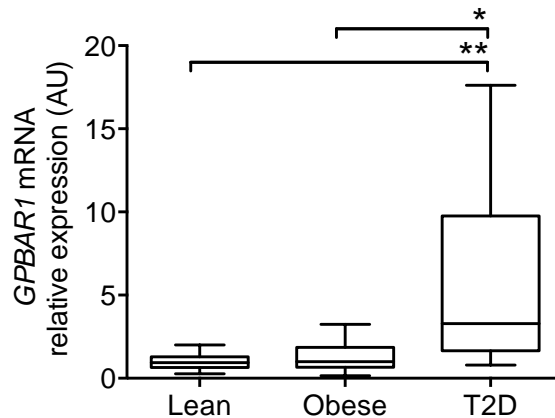


Figure 28 : expression du gène *GPBAR1* déterminée par PCRq chez les sujets minces (lean), obese et diabétiques de type 2 (T2D). Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage RPLP0.*p<0,05, **p<0,01. Les résultats ont été analysés utilisant un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's.

En se basant sur ces trois groupes, nous avons réalisé une étude de l'expression transcriptionnelle de TGR5 (gène humain : *GPBAR1*) et de la somatostatine (gène humain: *SST*) ainsi que des corrélations possibles entre ces gènes et les différents paramètres physiologiques de ces profils métaboliques. Nous avons regardé l'expression au niveau transcriptionnel et avons montré dans nos trois groupes de patients que *GPBAR1* est significativement plus exprimé chez les sujets T2D en comparaison avec les sujets « Lean » (minces, normaux glycémiques) et les sujets « obese » (obèses, normaux glycémiques) (Figure 28). Egalement, nous avons observé une augmentation déjà sensible de l'expression de *GPBAR1* chez les sujets obèses (non significative) en comparaison avec les sujets « lean » (Figure 28).

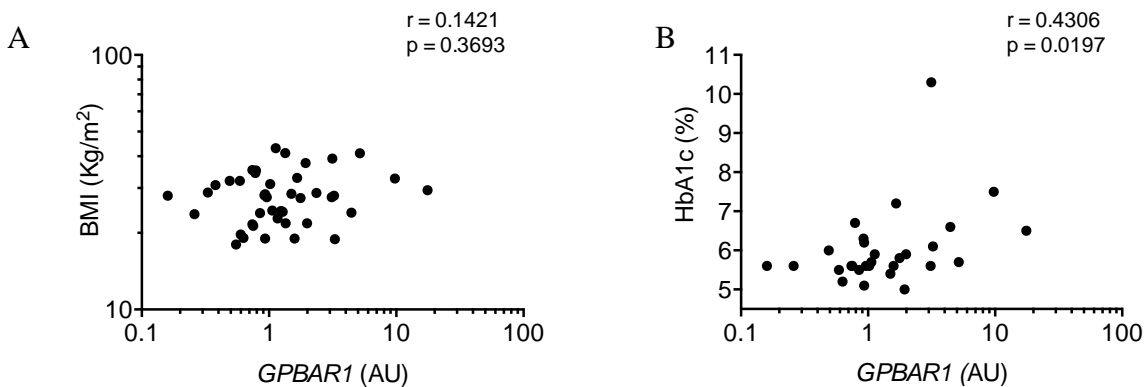


Figure 29: étude de la corrélation de l'expression du gène *GPBAR1* (AU) avec le BMI (Kg/m²) (A) et l'HbA1c (%), dans nos différents groupes de pancréas (B). Les résultats ont été analysés en utilisant un test de régression linéaire.

De plus, voulant trouver le paramètre physiologique pouvant être corrélé à cette augmentation de l'expression de *GPBAR1* chez les sujets T2D, nous avons à partir des résultats d'expression et des données des patients (BMI, HbA1c) réalisé des études de corrélation entre ces différents paramètres. L'augmentation de l'expression de *GPBAR1* est positivement corrélée à l'HbA1c (Figure 29 A) et non au BMI (Figure 29 B). Par la suite, ayant montré que TGR5 est exprimé spécifiquement dans les cellules δ sécrétrices de la somatostatine, nous avons cherché à étudier l'expression de la somatostatine dans ces mêmes populations de patients.

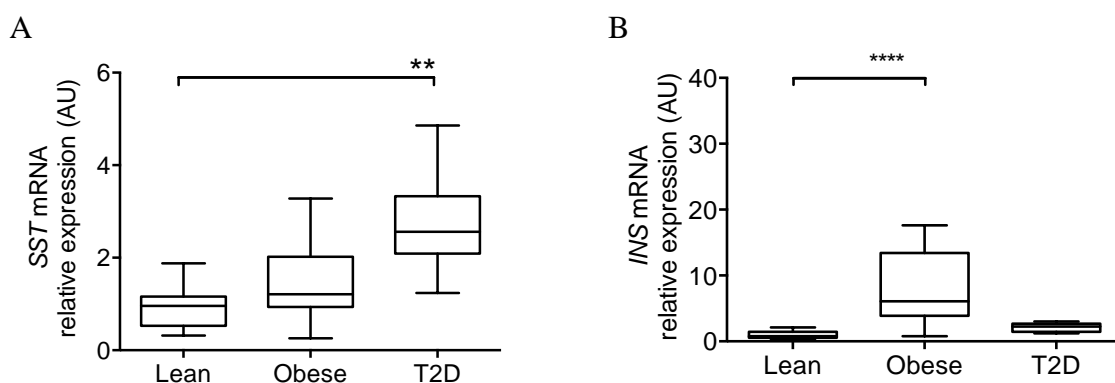


Figure 30 : expression des gènes *SST* (A) et *INS* (B) déterminée par PCRq chez les sujets minces (lean), obese et T2D. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage RPLP0. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Les résultats ont été analysés utilisant un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's.

L'expression de la *SST* est significativement augmentée chez les sujets T2D (Figure 30 A). De plus, la différence significative observée entre les sujets minces et les sujets T2D n'est plus observée chez les obèses avec néanmoins une augmentation sensible (non significative) de l'expression de la *SST* chez ces sujets (Figure 30 A). Comme réalisée pour *GPBAR1*, une étude de corrélation a été effectuée entre le niveau d'expression de *SST*, le BMI et l'HbA1c des patients des différents groupes étudiés. L'expression de la *SST* n'est pas corrélée au BMI, mais elle est comme pour *GPBAR1* corrélée à l'HbA1c (Figure 31 A et B). Nous avons également cherché à étudier l'expression du gène de l'INS (gène humain : *INS*) dans les trois groupes de patients.

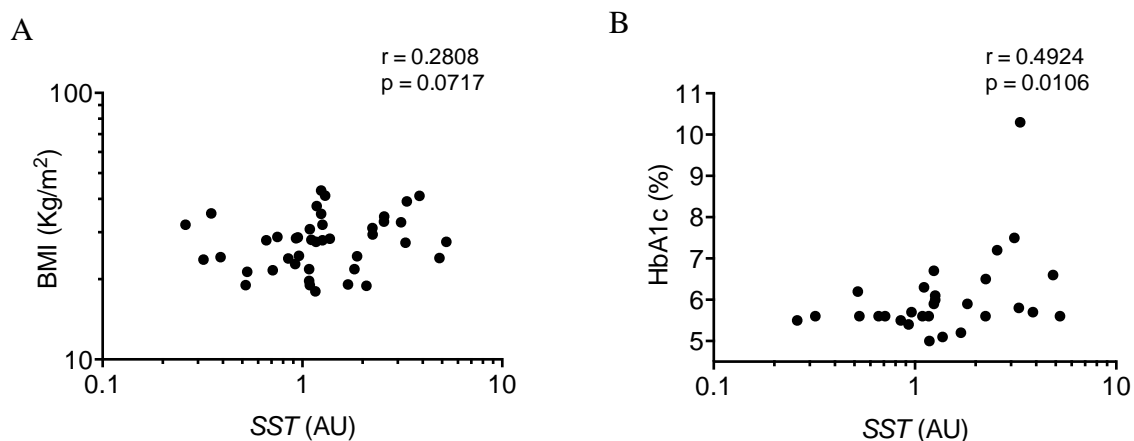


Figure 31 : étude de la corrélation de l'expression de la *SST* (AU) avec le BMI (Kg/m²) (A) et l'HbA1c (%), dans nos différents groupes de pancréas (B). Les résultats ont été analysés utilisant un test de régression linéaire.

Nous avons observé une augmentation significative de l'expression de *INS* chez les sujets obèses non diabétiques puis une diminution de cette expression chez les sujets diabétiques de type 2 (Figure 30 B). Finalement, nous basant sur nos premiers résultats (expression de *TGR5* dans les cellules δ et profils d'expression de *GPBAR1* et de la *SST* corrélés à l'HbA1c) nous avons effectué une analyse de la corrélation de l'expression des gènes *GPBAR1* et de la *SST*

dans nos différents groupes de patients. Nous avons observé que l'expression de ces deux gènes est positivement corrélée dans notre cohorte de pancréas (Figure 32).

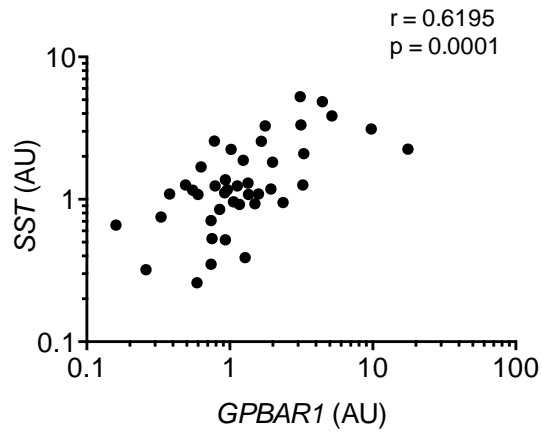


Figure 32 : étude de la corrélation de l'expression de la *SST* (AU) et de *GPBAR1* (AU), dans nos différents groupes de pancréas. Les résultats ont été analysés utilisant un test de régression linéaire.

B. Les diabétiques de type 2 présentent une augmentation de la proportion de cellules delta pancréatiques exprimant le récepteur TGR5

Ayant montré que TGR5 est spécifiquement exprimé dans les cellules δ pancréatiques et que les expressions transcriptionnelles des gènes *GPBAR1* et *SST* sont significativement augmentées et corrélées chez des sujets diabétiques de type 2, nous nous sommes intéressés à l'évolution de la population δ pancréatique chez les sujets diabétiques de type 2.

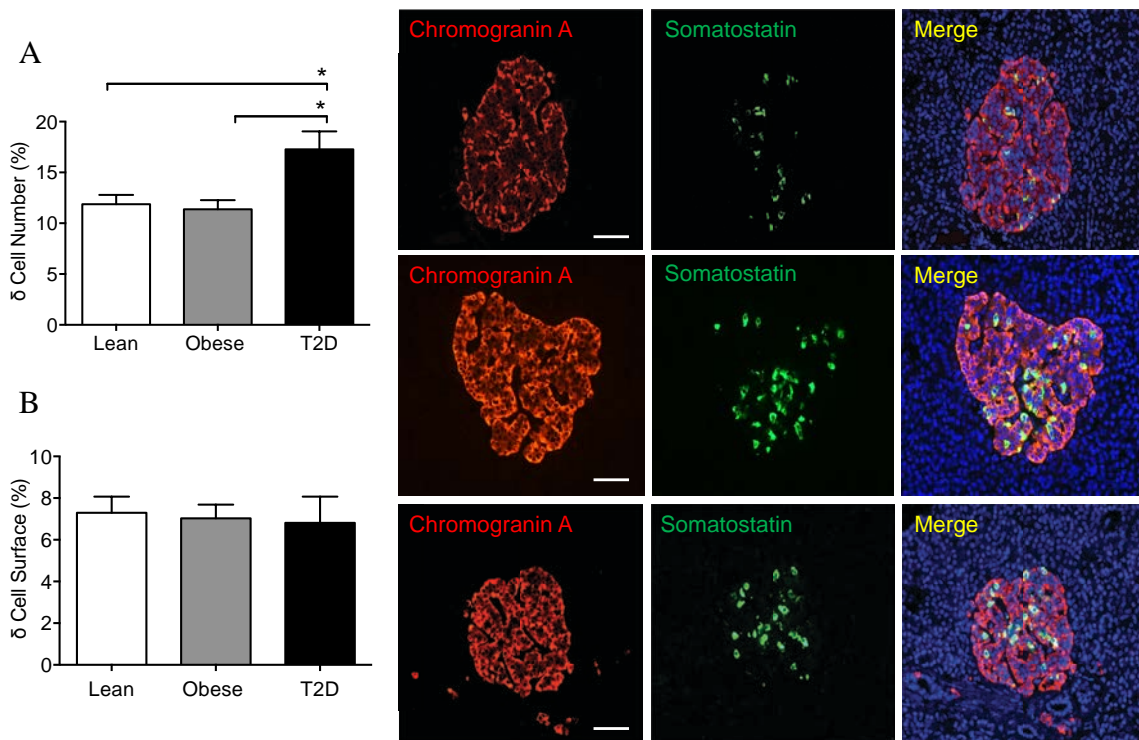


Figure 33 : évolution de la population δ endocrine chez les sujets contrôles (Lean), obèses et T2D. (A) Pourcentage (%) de cellules δ pancréatiques déterminé après immunomarquage de lames histologiques de sujets contrôles (Lean), obèses et T2D avec deux anticorps anti chromogranine A (rouge) et anti SST (vert). * $p < 0,05$. Les résultats ont été analysés utilisant un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's. (B) Mesure de la surface δ pancréatique (%) en comparaison à la surface totale endocrine déterminée après immunomarquage de lames histologiques de sujets contrôles (Lean), obèses et T2D avec deux anticorps anti chromogranine A et anti SST. Echelle : 100 μ M.

Pour cela, nous nous sommes basés sur des études préliminaires ayant cherché à étudier la – trophie (taille des cellules) et la –plasie (taille du tissu) de la population δ pancréatique chez des sujets contrôles (Lean), obèses et T2D. Nous avons réalisé un ensemble de doubles immunomarquages entre la somatostatine et la chromogranine A, un marqueur neuro endocrinien. Après marquage, deux types d’analyses ont été effectuées : un comptage des cellules δ pancréatiques pour déterminer le pourcentage (%) de cellules δ sur la population pancréatique endocrine totale ; et la détermination de la surface totale δ pancréatique en rapport avec la surface totale pancréatique endocrine. Nous avons observé une augmentation significative de la proportion de cellules δ pancréatiques chez les sujets diabétiques de type 2 (hyperplasie) (Figure 33 A), augmentation non associée à une augmentation de la surface totale δ pancréatique chez ces mêmes sujets (figure 33 B).

C. L'expression de *TGR5* et de la somatostatine sont associées dans des modèles d'hyperglycémie

Ayant montré une modulation de l'expression de *GPBAR1* et de la *SST* dans des conditions diabétogènes, nous nous sommes intéressés à la modulation de l'expression de ces deux gènes dans différentes conditions pro-diabétogènes. Pour cela, nous avons dans un premier temps cultivé des îlots de Langerhans humains en bas (5 mM) et en haut (15 mM) glucose durant 24, 48 et 72 heures. Nous avons ensuite étudié l'expression des gènes *GPBAR1* et *SST* dans ces conditions. Nous avons observé une augmentation de l'expression de *GPBAR1* et de la *SST* avec le temps et dans des conditions hyperglycémiques (Figure 34 A et B).

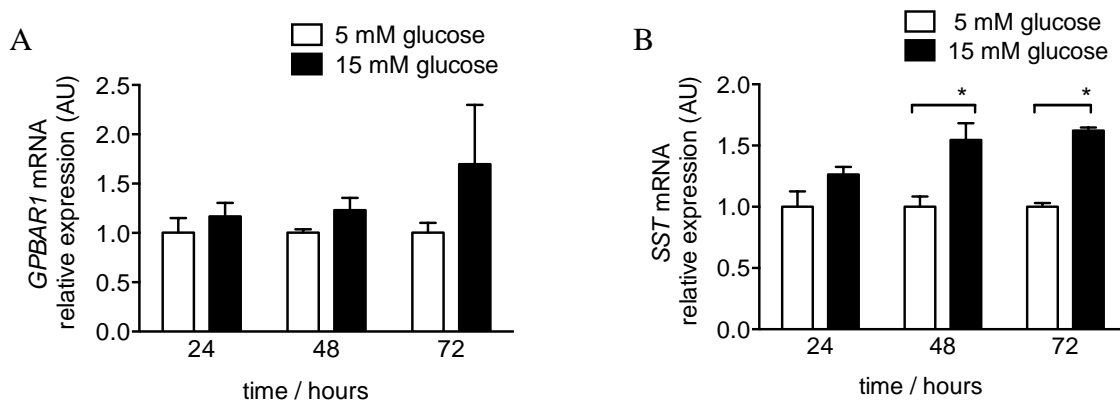


Figure 34 : expressions des gènes *GPBAR1* et de la *SST* dans des îlots de Langerhans humains cultivés dans des conditions hyperglycémiques. Expressions des gènes *GPBAR1* (A) et *SST* (B), déterminées par PCRq dans des îlots de Langerhans humains traités durant 24, 48 et 72h avec 5 mM ou 15 mM de glucose. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage RPLP0. * $p < 0,05$. Les résultats ont été analysés utilisant un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's.

D'autre part, possédant au laboratoire des souris *ob/ob* (souris mutantes pour le gène de la leptine) présentant une prise de poids significative et une hyperglycémie chronique (Figure 35 A et B), et pour lesquelles des prélèvements pancréatiques ont été effectués à différents temps (5, 8 et 15 semaines). Nous avons étudié l'expression de TGR5 (gène murin : *Gpbar1*) et de la SST (gène murin : *Sst*) dans ce modèle de souris. Nous avons observé chez les souris *ob/ob* une augmentation de l'expression de ces deux gènes en comparaison avec les souris contrôles (CTL) et cela à différents stades de leur développement et du développement de la pathologie (Figure 35 C et D).

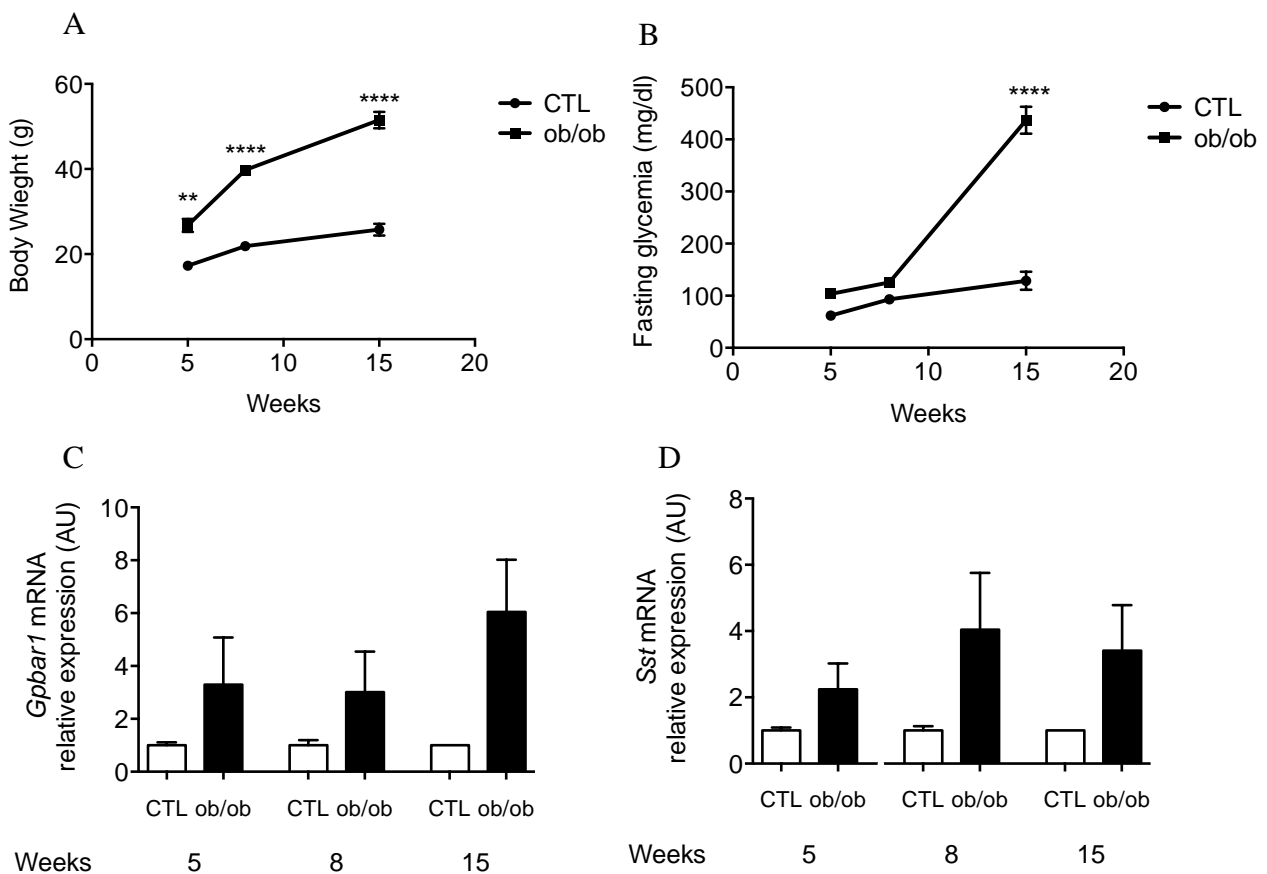


Figure 35 : expressions des gènes *Gpbar1* et de la *Sst* dans des îlots de Langerhans isolés de souris *ob/ob*. Poids (g) (A) et glycémie à jeun (mg/dl) (B) des souris contrôles et *ob/ob* à 5, 8 et 15 semaines. Expressions des gènes *Gpbar1* (C) et *Sst* (D), déterminées par PCRq chez des îlots de Langerhans de souris CTL ou *ob/ob* âgées de 5, 8 et 15 semaines. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage, RPLP0. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Les résultats ont été analysés utilisant un two way anova test et un post test Dunn's.

D. L'expression de TGR5 est augmentée dans les cas de somatostatinoïme humain

Nous avons cherché à montrer la corrélation d'expression de TGR5 et de la SST dans d'autres pathologies. Dans ce but et pour se focaliser sur une pathologie impliquant spécifiquement les cellules δ pancréatiques, nous nous sommes intéressés à l'expression du récepteur TGR5 dans les cas de somatostatinoïme, pathologie issue d'un mécanisme tumoral δ pancréatique spécifique.

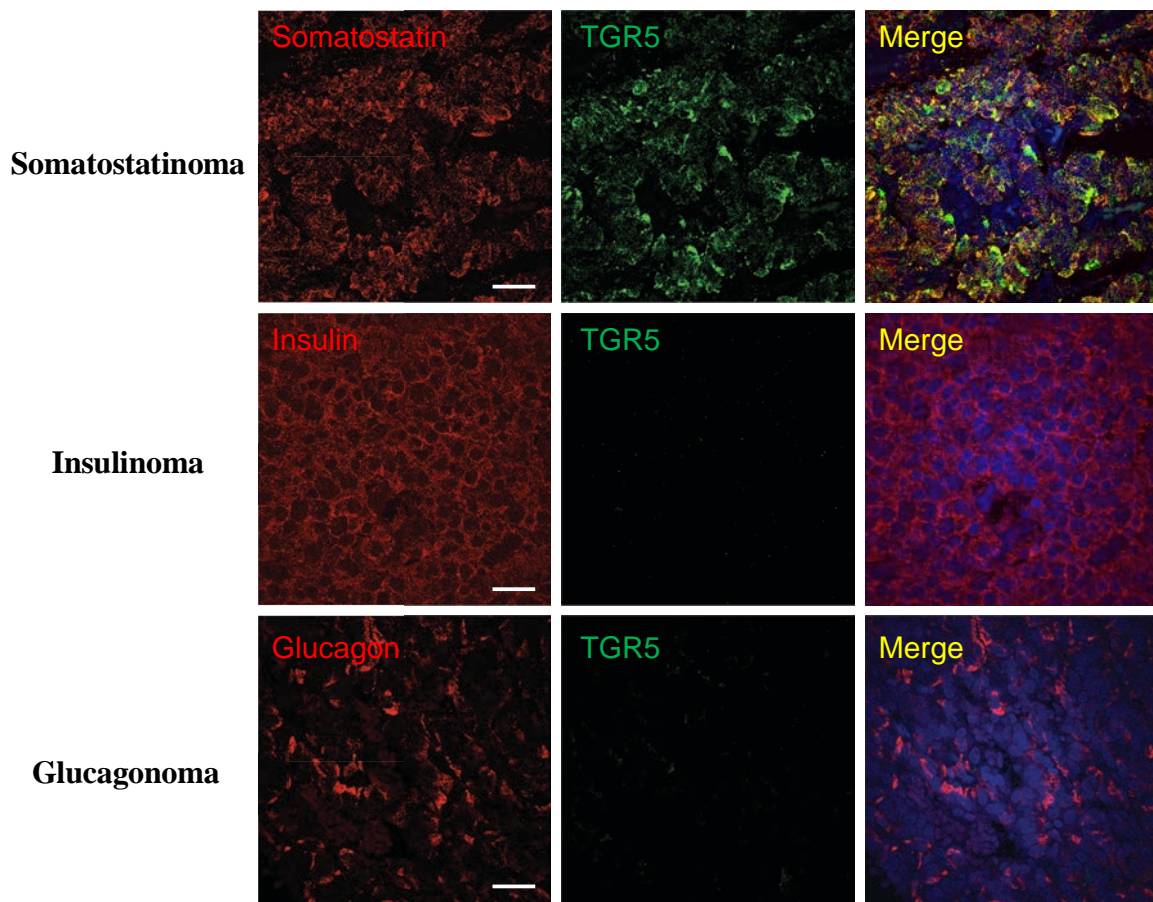


Figure 36 : le récepteur TGR5 est spécifiquement exprimé dans les somatostatinoïmes, tumeurs δ pancréatiques. Doubles immunomarquages entre la protéine TGR5 (vert), la somatostatine (rouge), l'insuline (rouge) et le glucagon (rouge), sur des coupes histologiques de somatostatinoïme, d'insulinome et de glucagonoma humains. Le Merge présente la superposition des deux premières photos (les cellules doubles immunomarquées apparaissent en jaune) et le contre marquage de la lame au DAPI qui colore les noyaux en bleu. Echelle : 100 μ M.

Nous possédons au laboratoire une banque de coupes histologiques humaines de tissus issus de tumeurs des trois grandes populations pancréatiques que sont les insulinomes (insuline, β), les glucagonomes (glucagon, α) et les somatostatинomes (somatostatine, δ), ces tissus ayant été montré histologiquement comme étant des tissus exclusivement insuline, glucagon ou somatostatine positifs (voir ANNEXE 1). Nous avons réalisé sur ces coupes histologiques des doubles immunomarquages entre TGR5 et les trois principales hormones pancréatiques. Nous avons observé une expression de TGR5 uniquement dans les coupes de tissus issues des somatostatинomes et non sur les coupes histologiques issues d'insulinomes ou de glucagonomes (Figure 36).

IV. La modulation de l'expression de TGR5 par siRNA dans les îlots de Langerhans humains et dans la lignée delta pancréatique TGP52 régule l'expression de la somatostatine

Dans le but de montrer en utilisant une autre approche expérimentale que les expressions du récepteur TGR5 et de l'hormone SST sont associées, nous avons mis au point le Knock-down de TGR5 via l'utilisation d'un siRNA spécifiquement dirigé contre *GPBAR1* et *Gpbar1*.

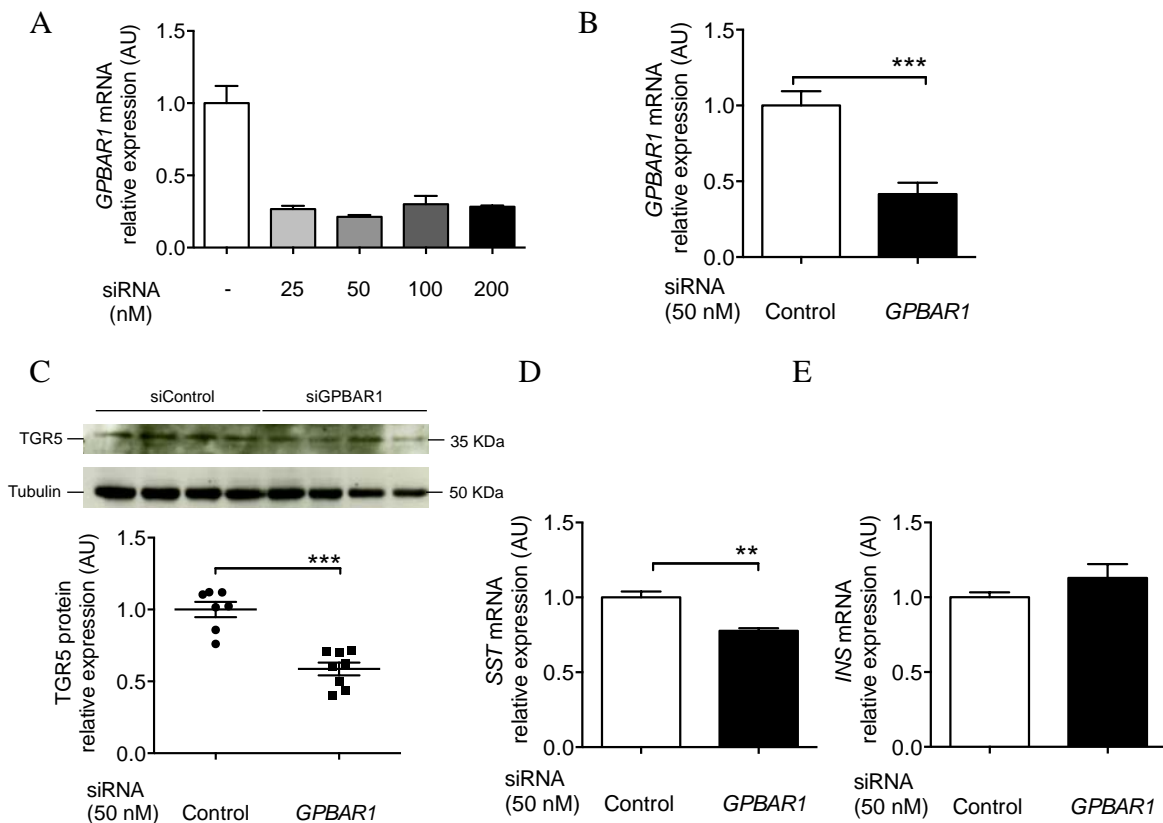


Figure 37 : expressions du récepteur TGR5 et des gènes *GPBAR1*, *SST* et *INS* dans les îlots humains transfectés avec un siRNA dirigé contre *GPBAR1*. (A) Expression de *GPBAR1* déterminée par PCRq dans des îlots humains traités avec 25, 50, 100 et 200 nM de siRNA dirigé contre *GPBAR1*. Expressions de *GPBAR1* (B), *SST* (D) et *INS* (E) déterminés par PCRq dans des îlots transfectés 48H avec un siRNA dirigé contre *GPBAR1*. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage RPLP0. (C) Western blot et quantification de l'expression de TGR5 dans des îlots humains transfectés pendant 72H avec un siRNA dirigé contre TGR5. **p<0,01, ***p<0,001. Les résultats ont été analysés utilisant un T-test Mann-Whitney.

Ce Knock-down par siRNA a été mis au point sur deux modèles : les îlots de Langerhans humains, et le modèle cellulaire murin delta pancréatique TGP52. Après mise au point du siRNA sur les îlots humains et détermination de la concentration optimale à utiliser pour ce modèle d'étude (50 nM de siRNA, Figure 37 A), nous avons effectué un ensemble d'expériences visant à diminuer l'expression de *GPBAR1* et à déterminer l'impact de cette diminution d'expression sur l'expression d'autres gènes tels que la *SST / Sst* et l'*INS / Ins*. Nous avons observé qu'une diminution significative de l'expression du gène *GPBAR1* (Figure 37 B) et de sa protéine TGR5 (Figure 37 C) est associée à une diminution de l'expression du gène *SST* (Figure 37 D) sans impact sur l'expression du gène *INS* (Figure 37 E).

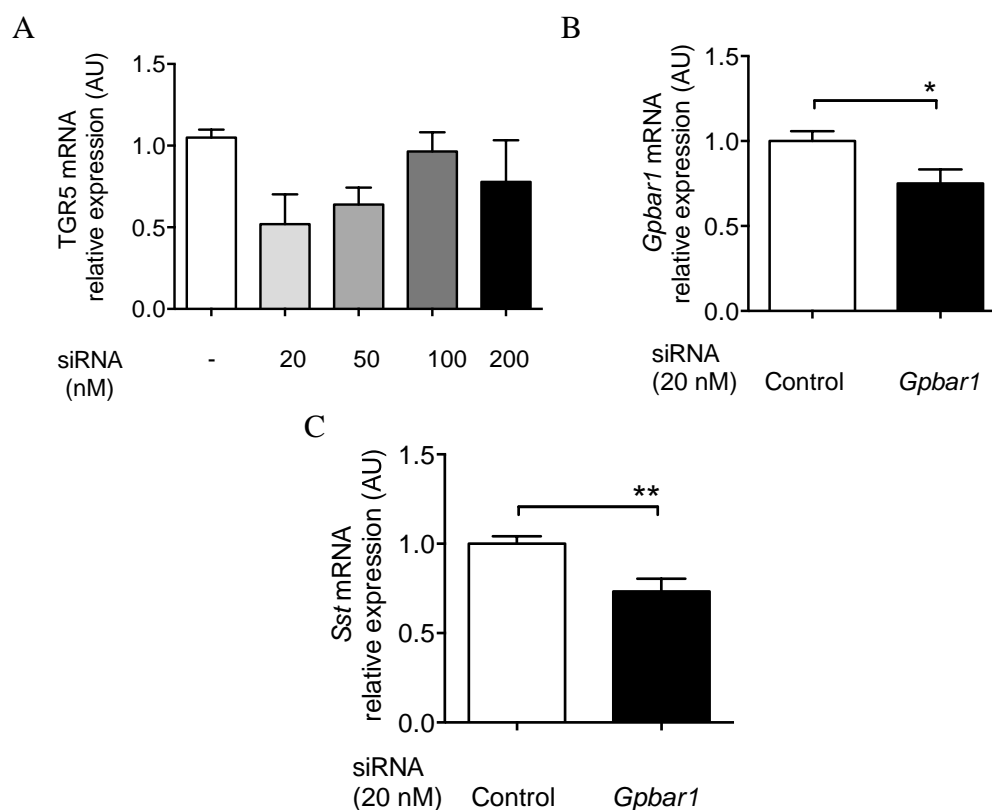


Figure 38 : expression des gènes *Gpbar1* et *Sst* dans des cellules TGP52 transfectées avec un siRNA dirigé contre *Gpbar1*. (A) Expression de *Gpbar1* déterminée par PCRq dans des cellules TGP52 traitées avec 20, 50, 100 et 200 nM de siRNA dirigé contre *Gpbar1*. Expressions transcriptionnelles des gènes *Gpbar1* (B) et *Sst* (C) déterminées par PCRq dans des cellules TGP52 transfectées 48H avec un siRNA dirigé contre *Gpbar1*. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage, RPLP0. *p<0,05, **p<0,01. Les résultats ont été analysés utilisant un T-test Mann-Whitney.

Par la même technique, nous avons cherché à valider les observations faites dans l'îlot humain en utilisant la lignée murine TGP52, modèle delta pancréatique. Après avoir mis au point le siRNA contre *Gpbar1* et avoir déterminé la concentration optimale à utiliser pour ce modèle d'étude (20 nM de siRNA, Figure 38 A), nous avons réalisé un ensemble d'expériences de transfections visant à étudier l'impact de la diminution de l'expression du gène *Gpbar1* sur l'expression d'autres gènes tels que la *Sst*. Nous avons observé comme pour les îlots humains qu'une diminution de l'expression du gène *Gpbar1* (Figure 38 B) est associée à une diminution significative de l'expression du gène *Sst* (Figure 38 C) sans impact sur l'expression du gène *Ins*.

V. L'activation de TGR5 par des agonistes spécifiques module la sécrétion des hormones pancréatiques humaines

Après avoir montré que le récepteur TGR5 est exprimé dans les cellules δ pancréatiques et intestinales sécrétrices de la SST, nous nous sommes intéressés à l'impact de la modulation de l'activité de ce récepteur sur le fonctionnement de l'îlot de Langerhans. Dans cette partie de mon étude, nous avons utilisé successivement et en réponse aux commentaires de nos reviewers, deux techniques différentes d'incubations des îlots de Langerhans humains. Pour cela il sera détaillé deux groupes d'expériences issus de deux protocoles d'expériences différents : (1) incubations statiques en plaque aspirante (Cf : matériels et méthodes) ; (2) incubations statiques en plaque classique (Cf : [125]).

A. Optimisation des tests de sécrétions hormonaux avec des agonistes du récepteur TGR5 sur des îlots humains isolés

Dans un premier temps nous avons cherché à déterminer l'agoniste que nous allions utiliser pour nos expériences et la concentration optimale et non toxique que nous allions appliquer. Il n'existe qu'un seul agoniste synthétique (non nature) du récepteur TGR5 commercialisé. Il a pour dénomination l'agoniste 3-(2-Chlorophenyl)-N-(4-chlorophenyl)-N,5-dimethylisoxazole-4-carboxamide et est également nommé agoniste 1722-5. Pour cela et en collaboration avec les laboratoires des professeurs Bart Staels et Benoit Deprez, nous avons déterminé la concentration de l'agoniste 1722-5 donnant 50 % de sa réponse maximum ou EC₅₀ ainsi que sa possible toxicité.

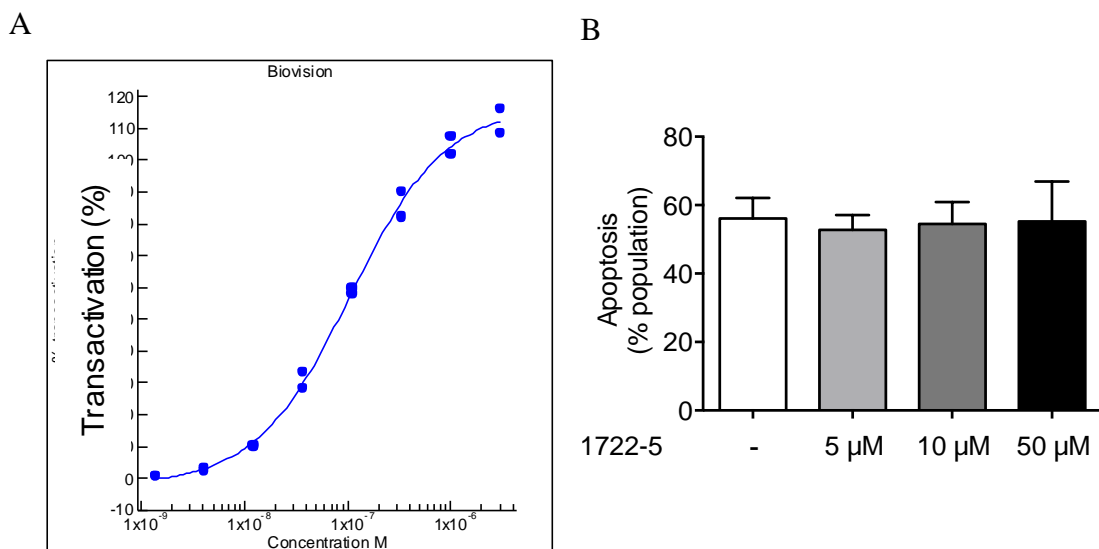


Figure 39 : efficacité et cytotoxicité de l'agoniste de TGR5 biovision, 1722-5. (A) Détermination de l' EC_{50} du composé 1722-5 par détermination de la transactivation d'un gène rapporteur couplé à une luciférase. (B) Détermination de la cytotoxicité (% d'apoptose dans la population totale) du composé 1722-5 sur les îlots de Langerhans humain.

Ce composé était déjà publié en tant qu'agoniste de TGR5 [126] et présentait une EC_{50} de 0,11 μ M (Figure 39 A). D'autre part la toxicité de ce composé sur les îlots humains a été déterminée par cytométrie en utilisant un kit de détection de l'apoptose et de la nécrose (Cf : matériel et méthode). Ce composé ne présentait pas de toxicité pour les îlots de Langerhans humains à la concentration utilisée (Figure 39 B). L'équipe du professeur Bart Staels nous a également fourni un second agoniste issu d'une librairie d'agonistes particuliers et ayant été nommé compound X dans ma thèse. Ce composé, testé par l'équipe du Professeur Staels a présenté une EC_{50} de 0,58 μ M.

B. L'activation du récepteur TGR5 par différents agonistes spécifiques stimule la sécrétion de la somatostatine pancréatique

Le modèle d'étude de notre laboratoire étant le pancréas, nous nous sommes focalisés sur l'impact de la modulation de l'activation du récepteur TGR5 sur l'activité pancréatique. Dans un premier temps, ayant montré une expression spécifique du récepteur TGR5 dans les cellules δ pancréatiques, nous avons cherché à étudier l'impact d'une activation de TGR5 sur la sécrétion de la SST. Les résultats présentés ci-dessous sont divisés en deux figures obtenues de protocoles expérimentaux différents. Les premières expériences réalisées consistaient en la mise en présence des îlots de Langerhans humains isolés placés dans des plaques 96 puits aspirantes avec un composé et à une concentration donnée (Cf : matériels et méthodes).

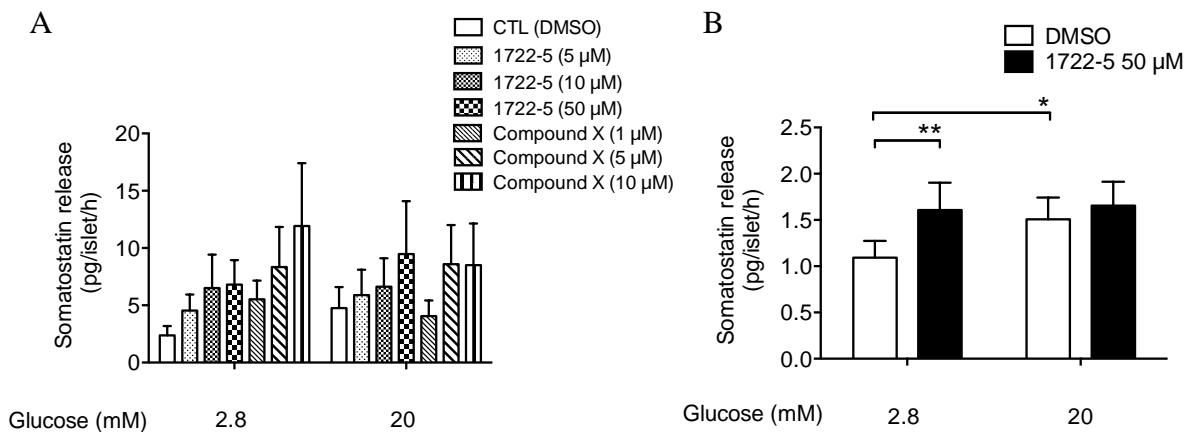


Figure 40 : l'activation du récepteur TGR5 stimule la sécrétion de somatostatine par des îlots de Langerhans humains. (A) Mise au point de deux agonistes de TGR5, le 1722-5 (5, 10 et 50 μ M) et le compound X (1, 5 et 10 μ M) sur des îlots humains isolés, par détermination de la sécrétion de la somatostatine (pg/islet/h) après incubation statique successivement en bas (2,8 mM) puis en haut glucose (20 mM) (n=3 pancréas). (B) Sécrétion de la somatostatine (pg/islet/h) en bas (2,8 mM) et haut (20 mM) glucose sur des îlots de Langerhans humains traités par incubation statique sans (DMSO) ou avec un agoniste spécifique du récepteur TGR5, le biovision 1722-5 à 50 μ M (n=8 pancréas). *p<0,05, **p<0,01. Les résultats ont été analysés utilisant un Two-Way Anova test de comparaison des moyennes.

Après avoir mis au point les agonistes 1722-5 et compound X et déterminé la concentration optimale, nous avons décidé d'utiliser l'agoniste 1722-5 à une concentration de 50 μM pour l'ensemble de nos expériences (Figure 40 A). A partir de ces premiers résultats, nous avons réalisé des incubations statiques sur 8 pancréas différents. Premièrement, nous avons observé une stimulation significative de la sécrétion de la SST induite par le haut glucose (Figure 40 B). D'autre part, nous avons observé une augmentation significative de la sécrétion de SST en bas glucose induite par la mise en présence des îlots de Langerhans humains avec notre agoniste du récepteur TGR5, 1722-5 (Figure 40 B). Egalement, nous n'avons pas observé de potentialisation de la sécrétion de SST en haut glucose avec l'agoniste du récepteur TGR5 (Figure 40 B).

En réponse aux commentaires formulés par les reviewers à la suite de la soumission de mon article, et en se basant sur les modifications apportées à notre protocole d'incubation statique, nous avons décidé de reproduire nos expériences à partir d'un protocole expérimental jugé plus robuste et statistiquement plus relevant (Cf : matériels et méthodes).

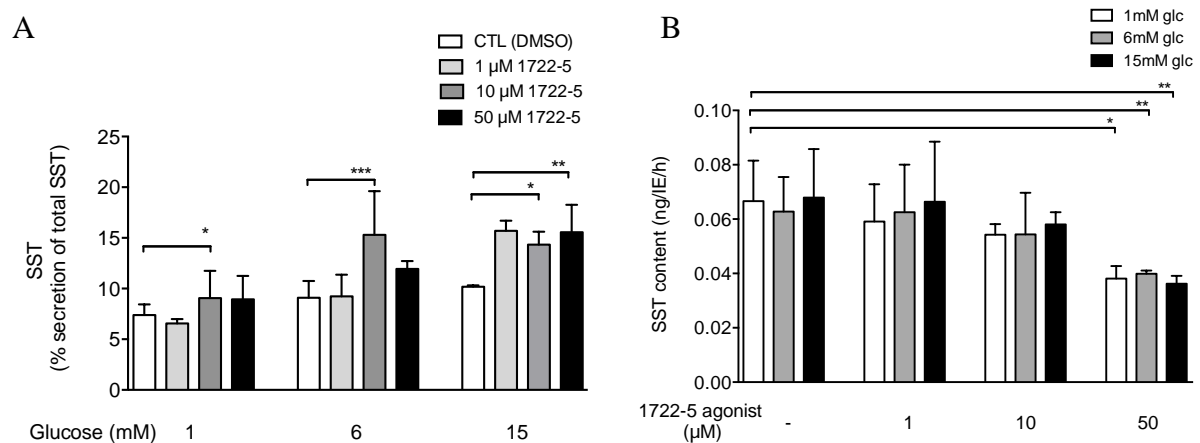


Figure 41 : l'activation du récepteur TGR5 stimule la sécrétion de somatostatine par des îlots de Langerhans humains. (A) Sécrétion de la somatostatine (% de sécrétion du contenu total) par des îlots de Langerhans humains traités par incubation statique avec 1, 6 ou 15 mM de glucose sans (CTL (DMSO)) ou avec un agoniste spécifique du récepteur TGR5 (biovision 1722-5) à 1, 10 ou 50 μM (n=2 pancréas). (B) Somatostatine intracellulaire (SST content : ng/IE/h) mesurée pour chaque condition expérimentale (n=2 pancréas), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Les résultats ont été analysés utilisant un Two-Way Anova test de comparaison des moyennes.

Comme observé dans nos premières expériences, la mise en présence des îlots de Langerhans humains avec des concentrations croissantes en glucose (1, 6 ou 15 mM glucose) augmente significativement (* $p < 0,05$) la sécrétion de somatostatine. De plus, comme montré précédemment, la mise en présence de ces îlots de Langerhans humains avec un agoniste de TGR5 (Biovision, 1722-5, à 1, 10 ou 50 μM), quelle que soit la concentration de glucose, tend à augmenter significativement la sécrétion de somatostatine (Figure 41 A). Finalement, le traitement des îlots de Langerhans humains avec 50 μM d'agoniste de TGR5 diminue significativement le contenu intracellulaire en somatostatine, ce qui est en association avec l'augmentation significative de la sécrétion de somatostatine dans ces mêmes conditions expérimentales (Figure 41 B). A noter que les graphiques de la figure 41 présentent les résultats de seulement deux expériences issus de deux préparations d'îlots de Langerhans humains différents, expériences devant encore être reproduites.

C. L'activation du récepteur TGR5 par un agoniste spécifique stimule la sécrétion de l'insuline

Comme décrit dans l'introduction, la SST pancréatique est une hormone agissant localement sur les sécrétions des autres hormones endocrines (INS et GCG). Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'impact que pouvait avoir l'activation de TGR5 et l'observation faite que celle-ci induit une augmentation de la sécrétion de SST, sur la sécrétion de l'INS. Dans ce but, nous avons dosé l'INS sécrétée par des îlots de Langerhans humains dans les mêmes surnageants que ceux utilisés pour la détermination de la sécrétion de la SST (Figure 41 A). Ainsi, nous pouvions à partir d'une même expérience observer l'impact global de l'activation de TGR5 par un agoniste sur la sécrétion de l'ensemble des hormones. Comme attendu, nous avons observé une augmentation significative de la sécrétion de l'INS induite par une augmentation de la concentration en glucose, à 6 mM glucose (**p<0,001) et à 15 mM glucose (**p<0,001) en comparaison avec la concentration basale de 1 mM glucose (Figure 42 A). Nous avons observé qu'une incubation des îlots de Langerhans humains avec l'agoniste de TGR5 à 10 et 50 µM, quelle que soit la concentration en glucose (1, 6 ou 15 mM), a stimulé significativement la sécrétion de l'INS (Figure 42 A). Egalement et de façon très intéressante, l'impact de l'agoniste sur la sécrétion de l'insuline est potentialisé en haut glucose (15 mM), condition connue pour être la plus stimulatrice de la sécrétion de cette hormone. Aucun impact significatif sur l'index de stimulation de la sécrétion de l'INS induite par le glucose (GSIS, fold increase), dans nos différentes conditions expérimentales (Figure 41 C), n'a été mis en évidence. Finalement, nous n'avons pas observé d'impact de l'incubation des îlots de Langerhans humains avec l'agoniste 1722-5 sur le contenu intracellulaire en INS (Figure 42 C).

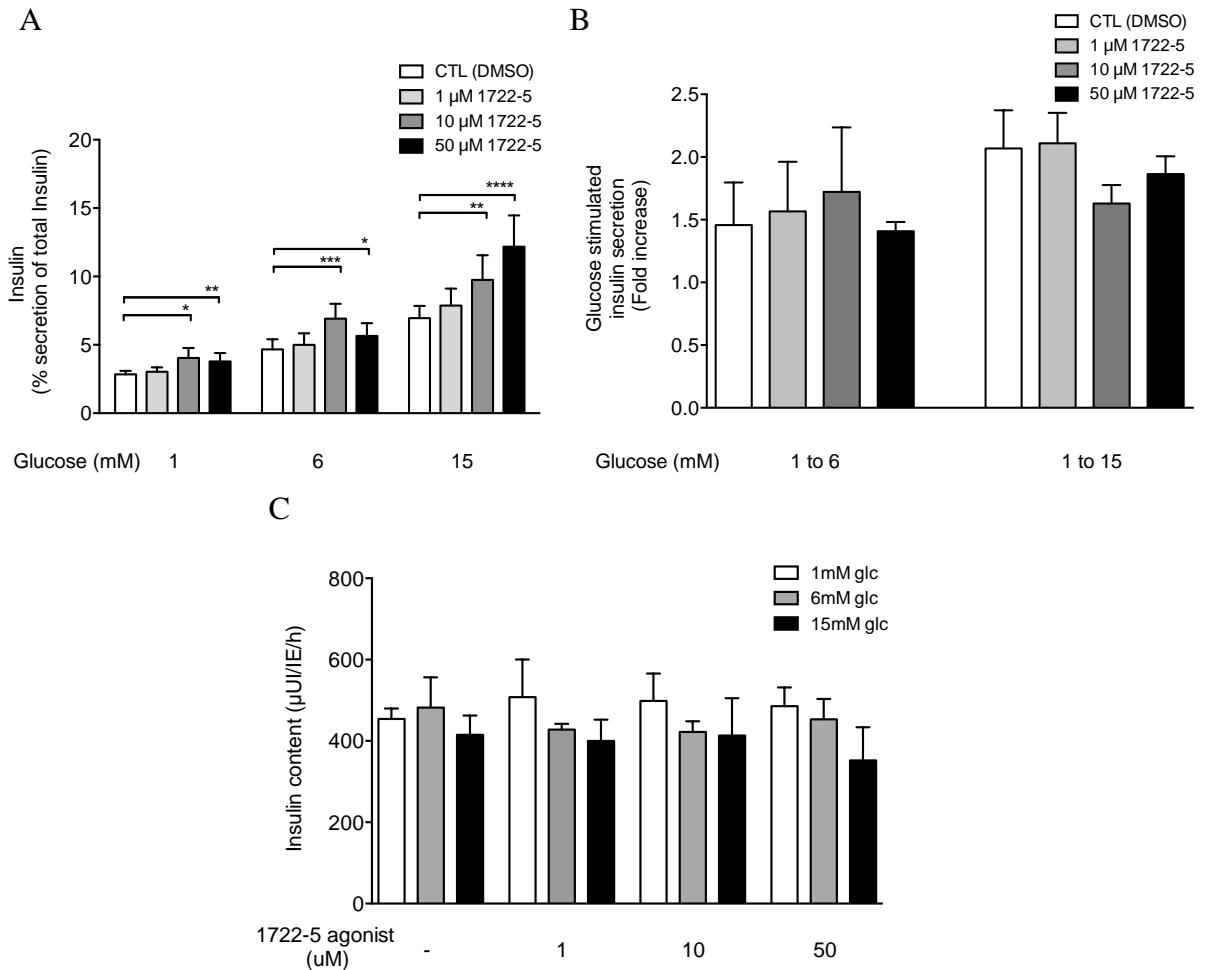


Figure 42 : l'activation de TGR5 stimule la sécrétion de l'insuline par les îlots de Langerhans humains. (A) Sécrétion de l'insuline (% de sécrétion du contenu total) par des îlots de Langerhans humains traités par incubation statique avec 1, 6 ou 15 mM de glucose sans (CTL (DMSO)) ou avec un agoniste spécifique du récepteur TGR5 (biovision 1722-5) à 1, 10 ou 50 μ M (n=3 pancréas), * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001. (B) Détermination de l'index de stimulation de l'insuline (fold increase) induite par un passage du glucose de 1 à 6 mM de glucose ou de 1 à 15 mM glucose, sur des îlots de Langerhans humains traités ou non avec l'agoniste biovision 1722-5 à 1, 10 ou 50 μ M (n=3 pancréas). (C) Détermination de l'insuline intracellulaire (μ UI/IE/h) d'îlots traités ou non avec différentes concentrations de glucose (1, 6 ou 15 mM glucose) et sans ou avec l'agoniste 1722-5 à 1, 10 ou 50 μ M (n= 3 pancréas). Les résultats ont été analysés utilisant un Two-Way Anova test de comparaison des moyennes.

D. L'activation du récepteur TGR5 à long terme sur des îlots de Langerhans en culture n'a pas d'impact significatif sur l'expression transcriptionnelle des principales hormones pancréatiques

Après avoir montré des effets à court terme de l'activation du récepteur TGR5, nous avons cherché à étudier si cette activation de TGR5 pouvait également avoir des effets à long terme sur l'activité transcriptionnelle de l'îlot de Langerhans.

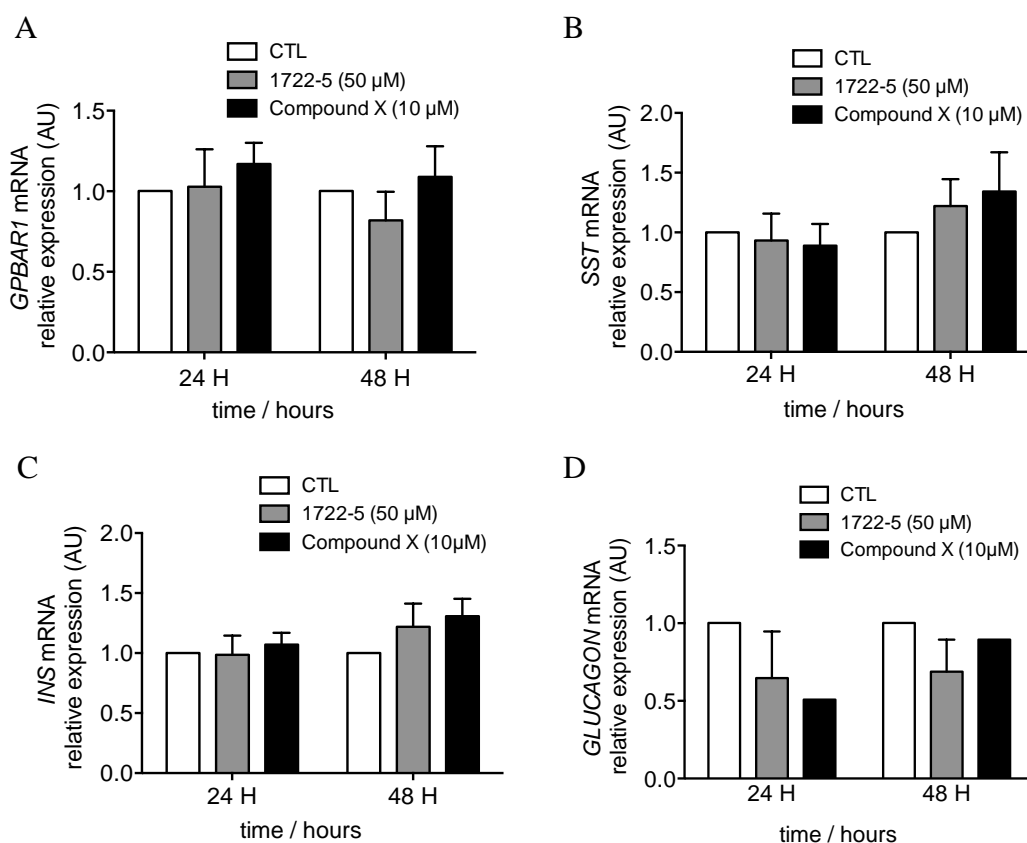


Figure 43 : expression transcriptionnelle des gènes *GPBAR1*, *SST*, *INS* et du *GLUCAGON* dans des îlots de Langerhans humains traités durant 24 et 48h avec ou sans deux différents agonistes du récepteur TGR5. Expressions des gènes *GPBAR1* (A), *SST* (B), *INS* (C) et *GLUCAGON* (D) déterminées par PCRq dans des îlots de Langerhans humains traités durant 24 et 48H avec ou sans un des deux agonistes (biovision 1722-5 50 μM ; compound X 10 μM) du récepteur TGR5. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage, RPLP0.

Pour cela, nous avons utilisé des îlots de Langerhans humains isolés que nous avons cultivé durant 24 et 48 heures avec ou sans l'un des deux agonistes spécifiques du récepteur TGR5 que sont les agonistes biovision 1722-5 (50 μ M) et le compound X (10 μ M). Après culture, les îlots de Langerhans ont été récupérés puis l'expression transcriptionnelle de TGR5 (*GPBAR1*) ainsi que celle des trois principales hormones pancréatiques que sont la SST (*SST*), l'insuline (*INS*) et le GCG (*GCG*) a été déterminée. Nous n'avons pas observé d'impact significatif de l'activation du récepteur TGR5 par l'un des deux agonistes sur l'expression transcriptionnelle des différents gènes étudiés et pour les différents temps de cultures appliqués aux îlots de Langerhans humains (Figure 43).

VI. Recherche d'un modèle d'étude du mécanisme impliquant le récepteur TGR5 dans la modulation de la somatostatine pancréatique

A. La lignée cellulaire murine TGP52 : un modèle delta pancréatique exprimant le récepteur TGR5

Après avoir réalisé l'ensemble de nos expériences en utilisant le modèle de l'îlot humain et dans le but d'étudier plus spécifiquement un modèle cellulaire δ pancréatique, nous avons cherché à mettre au point nos expériences sur la lignée cellulaire murine TGP52. Cette lignée cellulaire avait déjà été publiée en tant que modèle de sécrétion de la SST et décrite comme étant une lignée difficile à cultiver, donnant des résultats peu reproductibles et présentant une sécrétion de SST faible [42]. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de cette lignée cellulaire dans le but de mettre en évidence l'expression de l'ensemble des protéines étudiées dans notre travail. Egalement, nous avons cherché à mettre en évidence les niveaux d'expressions de ces protéines dans notre lignée cellulaire. Nous avons précédemment montré par immunomarquage une expression protéique de TGR5 et de la SST dans ces cellules (Figure 26). De plus, comme montré précédemment, nous avons mis en évidence une expression transcriptionnelle faible des ARNs issus des gènes de *Gpbar1* et de la *Sst* dans cette lignée cellulaire en comparaison avec les îlots de Langerhans humains isolés (Figure 25). D'autre part, nous avons montré que les niveaux d'expression de ces deux gènes sont comparables à ceux observés dans la lignée cellulaire murine bêta pancréatique MIN6 (Figure 25). Nous avons ensuite réalisé des expériences d'incubations statiques en nous basant sur les protocoles expérimentaux déjà utilisés dans les travaux ayant caractérisé cette lignée

cellulaire. De ces expériences est ressorti un niveau de sécrétion et de contenu en SST faible avec une faible réponse voire une non-réponse de ces cellules à des sécrétagogues connus que sont le glucose et la forskoline (Figure 44). De plus, nous avons mis en évidence une non-reproductibilité de ces résultats avec des grandes variabilités et une perte de sécrétion et de contenus en SST au fur et à mesure des passages cellulaires.

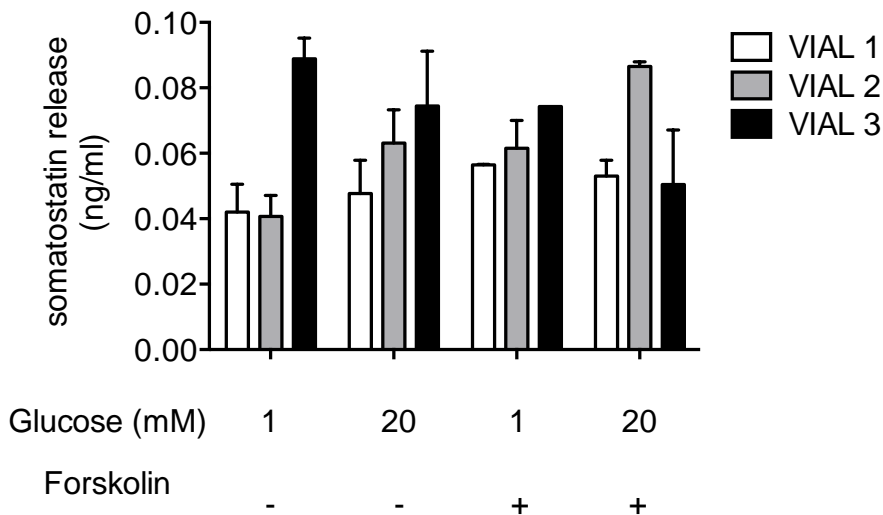


Figure 44 : les cellules murines TGP52 expriment et sécrètent de faibles quantités de somatostatine. Détermination de la sécrétion de somatostatine (ng/ml) par des cellules TGP52 issues de trois ampoules (vial1-2-3) différentes et cultivées en présence de basses (1mM) et hautes (20 mM) concentrations de glucose et/ou avec ou sans Forskolin.

*B. La lignée humaine Endoc cell line : un modèle bêta
pancréatique exprimant le récepteur TGR5
(collaboration avec le Pr Scharfmann)*

Dans le but de valider notre hypothèse d'une modulation de la sécrétion hormonale chez l'humain induite par la stimulation du récepteur TGR5, nous avons cherché un modèle cellulaire humain pancréatique exprimant notre récepteur. Pour cela nous avons eu la possibilité d'utiliser une lignée cellulaire β pancréatique humaine, Endoc cell line.

Cette lignée développée par le Pr Scharfmann a la particularité d'exprimer TGR5 (données fournies par le laboratoire du Pr Scharfmann). Nous avons effectué en collaboration avec le professeur Scharfmann une expérience préliminaire d'incubation statique de ces cellules en présence ou non de l'agoniste 1722-5 du récepteur TGR5 et à différentes concentrations. Nous avons observé une augmentation significative et globale de la sécrétion d'INS rapportée au contenu intracellulaire en INS (% du contenu) lorsque les cellules sont mises en présence de l'agoniste, avec une diminution de l'effet en association avec une augmentation de la concentration en agoniste (Figure 45).

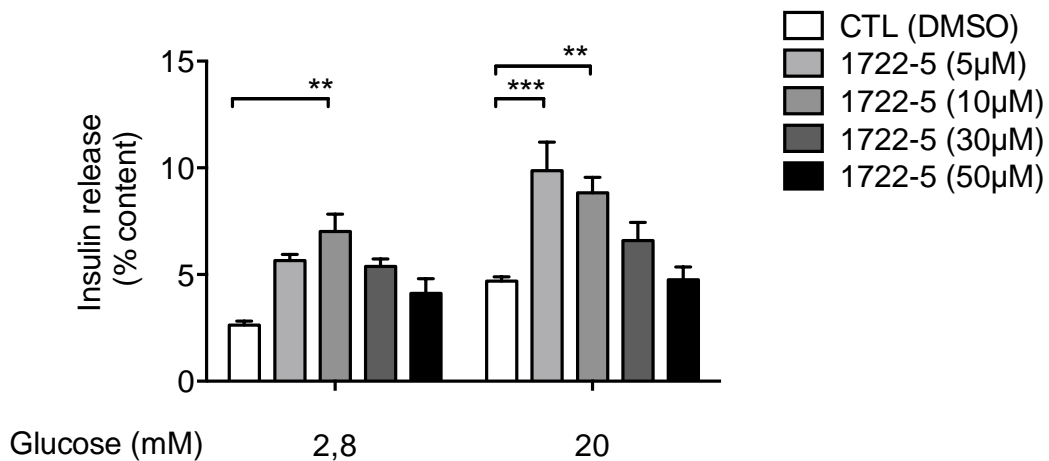


Figure 45 : la culture des cellules humaines Endoc cell line avec un agoniste de TGR5 (1722-5) stimule la sécrétion d'insuline. Dosage de l'insuline (% du contenu) sécrétée par des cellules Endoc cell line traitées ou non avec l'agoniste biovision 1722-5 (5, 10, 30 et 50 μM) en bas (2,8 mM) et en haut (20 mM) glucose. **p<0,01, ***p<0,001. Les résultats ont été analysés utilisant un Two-Way Anova test de comparaison des moyennes.

C. Etude des souris Knock-out pour le gène de la somatostatine (SST KO) (Pr Gilon)

Notre hypothèse étant que la modulation de la sécrétion de l'INS dans les îlots de Langerhans humains est dépendante de l'impact de l'agoniste sur la sécrétion de la SST nous avons cherché un modèle présentant une déficience dans l'un des deux mécanismes impliqués dans ce processus : l'activation du récepteur TGR5 ou la sécrétion de la SST. Pour cela et en collaboration avec le Pr Gilon, nous avons réalisé un ensemble d'expériences sur des souris knock-out (KO) pour le gène de la somatostatine (SST KO).

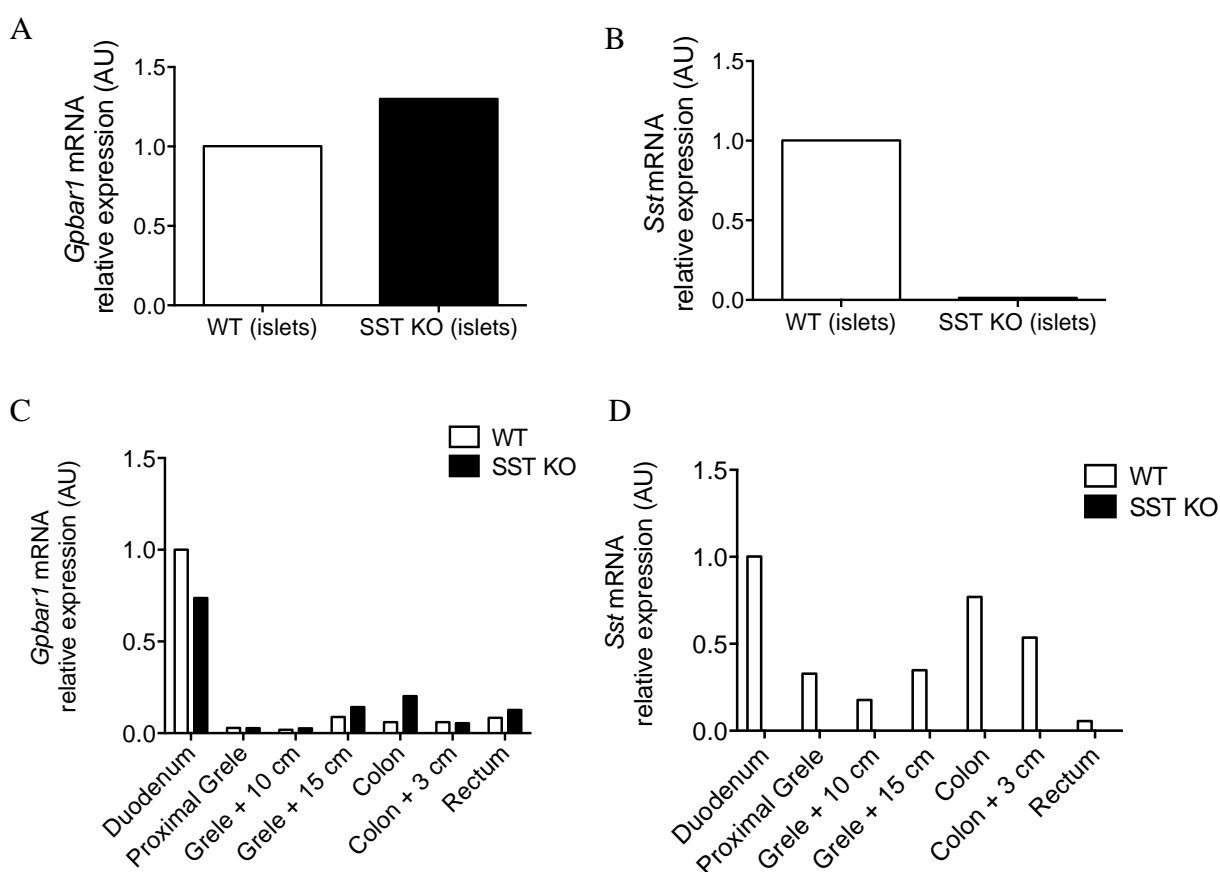


Figure 46 : profils d'expressions des gènes *Gpbar1* et *Sst* dans le pancréas endocrine et dans différentes zones de l'intestin de souris WT et SST KO. Expressions des gènes *Gpbar1* (A) et *Sst* (B) déterminées par PCRq dans le tissu endocrine des souris WT et SST KO. Expressions des gènes *Gpbar1* (C) et *Sst* (D) déterminées par PCRq dans les prélèvements tissulaires de différentes zones de l'intestin des souris WT et SST KO. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage, RPLP0.

Dans un premier temps, nous avons effectué une analyse transcriptionnelle (PCRq) et protéique (immunofluorescences) de l'expression de TGR5 et de la SST dans l'intestin et le pancréas de ces souris SST KO en comparaison avec des souris contrôles (WT). Nous avons montré que le KO était effectif dans ce modèle au niveau transcriptionnel (Figure 46 B et D) et protéique dans le pancréas (Figure 47 A) et l'intestin en comparaison aux souris contrôle (WT). D'autre part, nous avons montré que l'expression de TGR5 était maintenue chez ces souris KO pour la somatostatine (Figure 46 A et C). Après caractérisation, ayant mis en évidence une expression de TGR5 chez les souris SST KO, nous avons réalisé des expériences d'incubations statiques sur les îlots de Langerhans isolés de souris WT et SST KO en collaboration avec le Pr Gilon. Ces îlots ont été mis ou non en contact avec un agoniste de TGR5 (agoniste 1722-5 de chez Biovision) et la sécrétion d'INS a été mesurée chez les deux groupes de souris. Nous n'avons pas observé d'effet significatif de l'agoniste sur la sécrétion d'INS chez les souris WT et les souris SST KO (Figure 47 B et C).

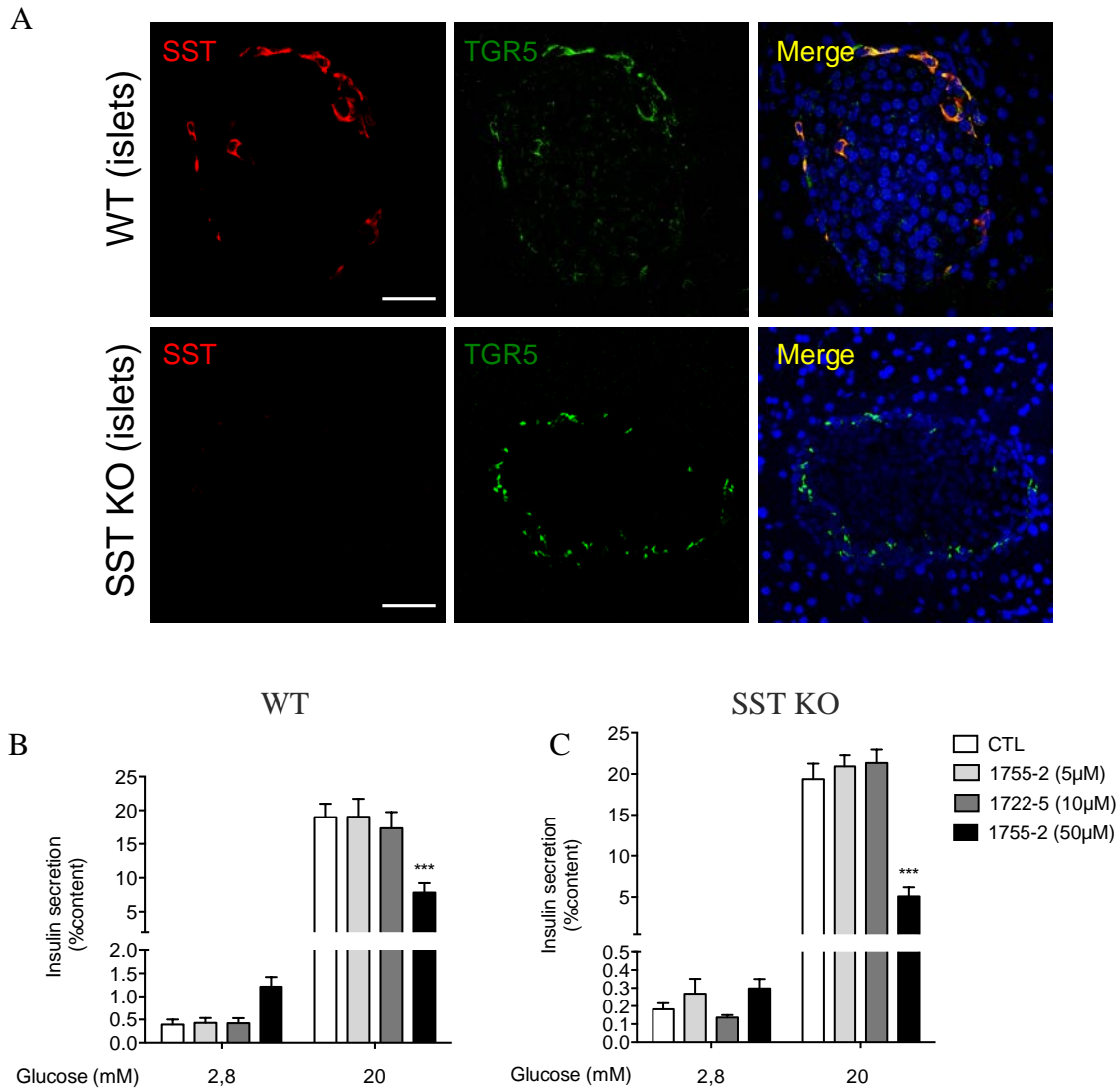


Figure 47 : expressions de la somatostatine et de TGR5 et impact du traitement avec un agoniste (1722-5) de TGR5 sur des îlots de Langerhans de souris WT et SST KO. (A) Doubles immunomarquages réalisés entre la somatostatine (rouge) et TGR5 (vert) sur des coupes de tissu pancréatique de souris WT et SST KO. Le Merge présente la superposition des deux premières photos (les cellules doubles immunomarquées apparaissent en jaune) et le contre marquage de la lame au DAPI qui colore les noyaux en bleu. Echelle : 100 µM. Insuline sécrétée par les îlots de Langerhans de souris issus de souris contrôles (WT) (B) et de souris KO pour la SST (C) traités ou non par l'agoniste biovision 1722-5 (5, 10 et 50 µM) et cultivés en bas (2,8 mM) ou haut (20 mM) glucose. *** $p < 0,001$. Les résultats ont été analysés utilisant un Two-Way Anova test de comparaison des moyennes.

D. Etude pancréatique des souris knock-out pour le gène du récepteur TGR5 (TGR5 KO) (collaboration Pr Schoonjans)

Les souris knock-out pour le gène du récepteur TGR5 (TGR5-KO) sont un modèle murin déjà bien caractérisé, utilisé et publié par l'équipe du Pr Schoonjans [6].

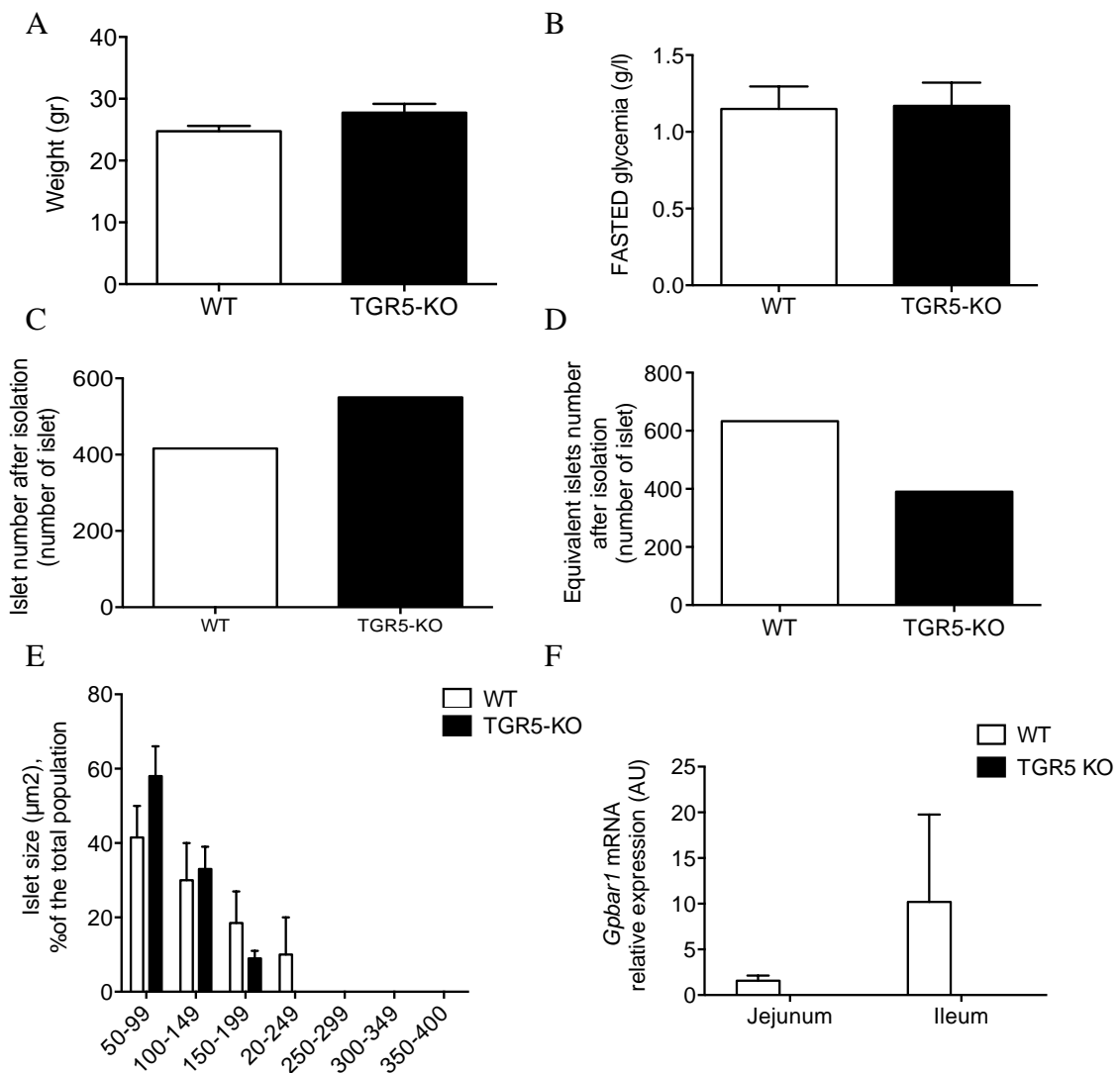


Figure 48 : paramètres physiologiques et caractéristiques des îlots isolés des souris WT et TGR5 KO. Mesure du poids (g) (A) et de la glycémie à jeun (g/l) (B) des souris WT et TGR5 KO. Détermination du nombre d'îlots (C) et îlots équivalents (D) obtenus après isolation des îlots de Langerhans issus des souris WT et TGR5 KO. (E) Organisation des îlots de Langerhans isolés des souris WT et TGR5 KO en fonction de leur taille (µm). (F) Expression de *Gpbar1* (AU) déterminée par PCRq sur des échantillons de tissus intestinaux issus des souris WT et TGR5 KO. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage, RPLP0.

Voulant vérifier que l'effet observé sur les îlots de Langerhans humains est dépendant de TGR5, nous avons en collaboration avec l'équipe du Pr Schoonjans réalisé des expériences sur des souris KO pour TGR5 en comparaison avec des souris contrôles (WT). Dans un premier temps, nous avons caractérisé le modèle d'étude en terme de caractéristiques physiologiques. Nous n'avons pas observé de différences en terme de poids (g) ou de glycémie à jeun entre les groupes WT et TGR5 KO pour des souris sous régime alimentaire classique (Figure 48 A et B). Un ensemble de paramètres a été déterminé à la suite de l'isolation des îlots de Langerhans de ces deux groupes. Nous avons observé un nombre d'îlots de Langerhans après isolation augmenté chez les souris TGR5 KO (Figure 48 C) avec un nombre d'îlots équivalent plus faible chez ces souris (Figure 48 D), se traduisant par une augmentation du nombre d'îlots de Langerhans dans les classes de tailles correspondantes aux petits îlots (Figure 48 E). Egalement, nous avons montré par PCRq que l'expression du gène de TGR5, *Gpbar1* est éteinte dans les tissus des souris TGR5 KO en comparaison aux souris WT (Figure 48 F). Après caractérisation, les îlots de Langerhans isolés ont été utilisés dans le cadre d'expériences d'incubations statiques. De ces expériences ressortent certaines observations telles que la diminution significative observée du contenu intracellulaire en SST dans les îlots isolés des souris TGR5 KO (Figure 49 A).

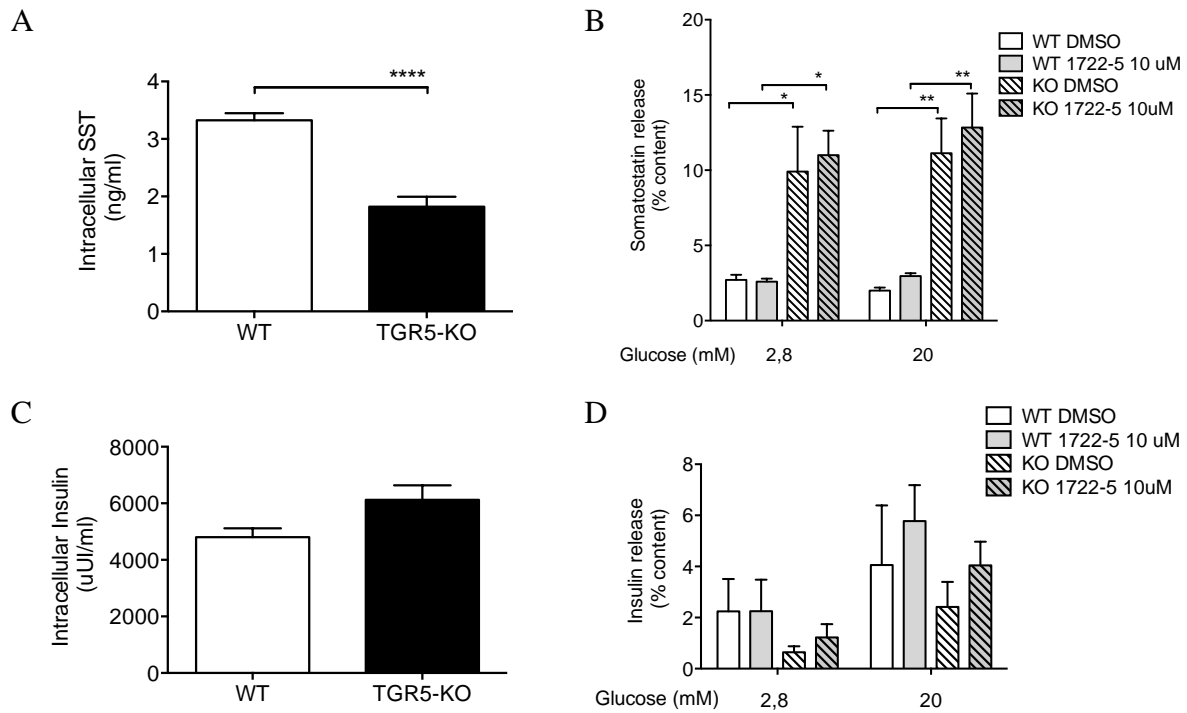


Figure 49 : contenus et sécrétions hormonales des îlots de Langerhans isolés de souris contrôles (WT) et TGR5 KO cultivés avec ou sans agoniste du récepteur TGR5. Détermination des contenus intracellulaires en somatostatine (ng/ml) (A) et en insuline (uUI/ml) (C) des îlots humains isolés des souris contrôles (WT) et TGR5 KO. *** $p < 0,0001$. Les résultats ont été analysés utilisant un T-test Mann-Whitney. Dosages des sécrétions de somatostatine (% du contenu) (B) et de l'insuline (% du contenu) (D) des îlots de Langerhans isolés des souris contrôles (WT) et TGR5 KO traités avec ou sans l'agoniste 1722-5 (10 μ M) et en bas (2,8 mM) et haut (20 mM) glucose. ** $p < 0,01$. Les résultats ont été analysés utilisant un Two-Way Anova test de comparaison des moyennes.

Egalement nous avons observé une augmentation significative et globale de la sécrétion de la SST par les îlots de Langerhans isolés des souris TGR5 KO (Figure 49 B). Nous n'avons pas observé d'impact de l'agoniste de TGR5, le 1722-5 sur la sécrétion de la SST pour chaque groupe WT et TGR5 KO (Figure 49 B). Aucun impact sur l'INS intracellulaire et sur la sécrétion d'INS n'a été observé dans les différentes conditions de culture et chez les deux groupes de souris WT et TGR5 KO (Figure 49 C et D). Néanmoins il est important de noter que ces expériences ont été effectuées sur un nombre d'individus par groupe faible et reste donc à être reproduites pour validation et vérification.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Le diabète de type 2 est caractérisé par une hyperglycémie chronique. Par son association à l'obésité qui est également une des causes du syndrome métabolique, cette pathologie est devenue un enjeu de santé publique à travers le monde. La dérégulation de la sécrétion et de l'action de l'INS est un paramètre clef de la pathologie du diabète, néanmoins depuis de nombreuses années des altérations des sécrétions des autres hormones endocrines telles que le GCG et la SST ont été montrées comme pouvant être impliquées dans la pathologie. Le glucose est le principal régulateur de la sécrétion endocrine pancréatique ayant été étudié dans le cadre du développement de la pathologie du diabète, néanmoins d'autres facteurs extracellulaires locaux ou périphériques ont été montrés comme pouvant avoir un rôle clef dans cette pathologie. De plus en plus de molécules à fonction hormonale, possédant des récepteurs sur des cellules clefs de la fonction endocrine pancréatique et impliquant des voies intracellulaires de signalisations, sont présentées comme régulant les sécrétions endocrines. Les acides biliaires et leurs récepteurs tels que FXR et TGR5 font partie de ces nouveaux régulateurs du métabolisme du glucose ayant un rôle dans la fonction pancréatique et ayant été montrés comme impliqués dans les désordres métaboliques observés chez les patients diabétiques de type 2 [106, 127]. Le récepteur FXR étant exprimé dans les cellules β pancréatiques, les recherches concernant l'impact des acides biliaires sur l'activité pancréatique se sont historiquement focalisées sur les cellules β [128]. Pour cela peu d'éléments sont aujourd'hui connus concernant le rôle des acides biliaires sur les deux autres principales populations pancréatiques (α et δ) et sur la modulation des deux autres principales hormones pancréatiques (GCG et SST). L'expression du gène TGR5 dans le pancréas est historiquement peu renseignée avec des études ayant montré pas ou peu d'expression de ce gène dans le tissu pancréatique [1, 129, 130]. Récemment, une étude a mis en évidence une expression de TGR5 dans le pancréas endocrine et dans des lignées cellulaires β pancréatiques différenciées [15]

[131, 132].

La première partie de mon travail de thèse a eu pour but de mettre en évidence l'expression précise de TGR5 dans le pancréas humain. Pour cela, en utilisant des îlots de Langerhans humains, murins et porcins ainsi que des outils de biologie moléculaire (PCRq et western blot) et d'immunofluorescence, nous avons montré une expression de TGR5 préférentielle dans le tissu endocrine pancréatique et plus précisément dans les cellules δ pancréatiques sécrétrices de la SST. Ceci est en adéquation avec les études ayant observé une faible expression de TGR5 dans le pancréas total, les cellules δ pancréatiques représentant un très faible pourcentage de la population cellulaire pancréatique totale [13]. Nous avons confirmé cette expression en utilisant un second anticorps dirigé contre un autre épitope de la protéine TGR5. Nous avons également observé cette expression dans les cas de somatostatine, où l'expression de TGR5 était largement augmentée. Cette pathologie cancéreuse est exclusivement composée de cellules tumorales homogènes somatostatine positives ce qui constitue un modèle d'étude permettant de valider nos premières observations d'une expression exclusive de TGR5 dans la population δ pancréatique. Nos résultats sont en contradiction avec ceux publiés par l'équipe de Kumar et ses collègues. En effet cette équipe a montré une expression protéique de TGR5 dans les îlots de Langerhans humains et murins et dans le modèle cellulaire β pancréatique murin MIN6. L'étude de l'expression de TGR5 dans l'îlot de Langerhans faite durant mon travail de thèse est basée sur une étude protéique par les techniques du western-blot et d'immunofluorescence. L'immunofluorescence est une technique courante en biologie et permet une visualisation précise de l'expression d'une protéine dans une cellule donnée et permet de déterminer son compartiment cellulaire d'expression (cytosol, noyau). Nous avons montré une expression spécifique de TGR5 dans le cytoplasme et sur la membrane des cellules δ pancréatiques. Ces deux localisations cellulaires sont spécifiques d'un

récepteur membranaire transitant par le cytosol lors de sa maturation (de gène à protéine) et étant exprimé à la membrane lorsque la cellule est mise en présence de ligands de celui-ci. Mon travail de thèse a également montré que les modèles cellulaires β pancréatiques utilisés couramment en biologie de nos jours sont des modèles dédifférenciés pouvant exprimer des gènes normalement exprimés dans d'autres populations endocrines pancréatiques tel le récepteur TGR5, ce qui peut expliquer les résultats publiés par l'équipe de Kumar et ses collègues et les différences observées par rapport à nos résultats. Il aurait été intéressant de pouvoir étudier l'expression de TGR5 (protéique et transcriptionnelle) dans une population δ pancréatique pure. Il n'a pas été développé ici nos expériences ayant tenté de purifier la population δ pancréatique via l'utilisation d'un anticorps anti-TGR5 en tant que marqueur spécifique. En effet il n'existe pas de marqueur spécifique des cellules δ pancréatiques à ce jour développé en routine permettant de purifier cette population cellulaire. Nous n'avons pas obtenu de résultat probant en terme d'efficacité de notre anticorps en tant que marqueur spécifique de la population δ pancréatique et en terme de viabilité de la population purifiée (forte mortalité dans la fraction purifiée). Nous avons également montré dans cette partie une expression du récepteur TGR5 dans les cellules à somatostatine intestinales. Nous n'avons pas donné suite à ces observations néanmoins nous pouvons penser qu'une expression de TGR5 dans ces cellules pourrait constituer un mécanisme régulateur de la sécrétion des incrétines intestinales (le GLP-1 par les cellules L intestinales par exemple). Des expériences visant à valider ces premières observations, ainsi qu'à mettre en évidence la répartition des cellules à somatostatine intestinales le long du tube digestif et à déterminer l'impact de l'activation du récepteur TGR5 sur l'activité de ces cellules à somatostatine intestinales et sur les sécrétions intestinales seraient une première étape à la caractérisation de la population à somatostatine intestinale et à la mise en évidence du rôle du récepteur TGR5 dans cette population et son impact sur l'activité

intestinale.

Chez le sujet non diabétique, la sécrétion de la SST par les cellules δ pancréatiques régule les sécrétions de l'INS et du GCG par une action paracrine et locale sur les cellules β et α , dans le but d'aider au maintien de l'équilibre glycémique [133, 134]. Chez les patients obèses et diabétiques de type 2, l'expression et la sécrétion des différentes hormones pancréatiques sont dérégulées et/ou ineffectives ce qui conduit à une dérégulation de l'homéostasie glucidique [135, 136]. De nombreuses études ont montré la dérégulation de l'expression et de la sécrétion de la SST chez les sujets diabétiques de type 2 et dans les modèles murins de diabète, avec une augmentation observée pour certains pancréas de sujets diabétiques de type 2 du nombre de cellules δ pancréatiques, de l'expression de la SST et de la sécrétion de la SST. Il a également été mis en évidence une altération des mécanismes paracrines impliquant la somatostatine au niveau de l'activité pancréatique [34, 137, 138]. Cette modulation de l'action de la SST en association avec la déficience de l'action de l'INS [138, 139] et l'hypersécrétion de GCG [34], pourraient être à l'origine du développement de l'hyperglycémie chronique observée chez les sujets diabétiques de type 2.

Après avoir montré une expression de TGR5 spécifiquement dans les cellules δ pancréatiques, nous nous sommes intéressés au profil d'expression et à la modulation de l'expression de TGR5 dans les conditions amenant au développement du syndrome métabolique. Nous nous sommes également intéressé à l'expression de l'hormone, la SST, et la modulation de la population endocrine pancréatique montrée comme exprimant TGR5, la population δ pancréatique, dans ces mêmes conditions. Pour cette étude nous nous sommes basés sur notre banque de pancréas humains issus de sujets morts cérébraux et de notre protocole de greffe d'îlots de Langerhans humains chez les sujets diabétiques de type 1. Nous avons formé trois groupes de sujets : (1) non obèses et présentant une glycémie normale ; (2)

obèses et normoglycémiques ; (3) obèses et hyperglycémiques. Nous avons montré que l'expression transcriptionnelle du gène TGR5 (*GPBARI*) était significativement augmentée chez les sujets diabétiques de type 2. D'autre part, nous avons observé que l'augmentation de l'expression du gène de TGR5 chez les sujets intolérants au glucose était associée avec une augmentation de l'expression de gène de la SST. Plus encore, nous avons montré dans nos trois groupes d'études, une corrélation positive entre l'expression des gènes *GPBARI* et *SST*. Ceci est également en adéquation avec une corrélation de l'expression de ces deux gènes avec l'HbA1c. Ces résultats concernant l'expression transcriptionnelle de TGR5 chez les sujets diabétiques de type 2 sont en accord avec une étude récente ayant montré une corrélation positive entre le pool d'acide biliaire excrété, dont TGR5 est un de leur récepteur, et le taux d'HbA1c, sans implication de l'IMC, chez les sujets diabétiques de type 2 [127]. La corrélation d'expression de TGR5 et de la SST avec l'HbA1c est également en adéquation avec nos résultats montrant une augmentation de l'expression de ces gènes après culture d'îlots de Langerhans humains dans des conditions hyperglycémiques. De plus, une augmentation de l'expression de TGR5 chez les diabétiques de type 2 dans notre banque tissulaire est associée à une augmentation du nombre de cellules δ chez ces mêmes sujets, augmentation du nombre de cellules δ déjà décrite dans la littérature [32]. Dans notre étude, cette augmentation du nombre de cellules δ n'est pas associée à une augmentation de la surface δ pancréatique totale, présumant d'une hyperplasie et non d'une hypertrophie de la population δ pancréatique chez les sujets diabétiques de type 2. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment publiés par l'équipe de Kilimnik [140]. Néanmoins nos résultats ne nous permettent pas à ce jour de déterminer des mécanismes précis à l'origine de l'augmentation de l'expression transcriptionnelle du récepteur TGR5 chez les sujets diabétiques de type 2. Cette augmentation pourrait être en relation directe avec une augmentation du nombre de cellules δ pancréatiques

exprimant notre récepteur et donc augmentant son expression totale dans l'îlot de Langerhans. Il serait intéressant d'étudier de façon plus précise les mécanismes liant les expressions des gènes *GPBARI/Gpbar1* et *SST/Sst* dans un modèle d'étude de la population δ pancréatique. Ceci nous ramène au développement d'un modèle δ pancréatique isolé des autres populations pancréatiques endocrine dans le but d'étudier précisément les mécanismes liant les expressions de TGR5 et de la SST hors contexte des modulations paracrines endocrines.

Après avoir montré que l'expression du récepteur TGR5 est spécifique des cellules δ pancréatiques et que son expression transcriptionnelle est corrélée à l'expression de la SST et à l'HbA1c, nous nous sommes posé la question du rôle de cette protéine dans la cellule δ pancréatique. Dans un premier temps, nous avons mis au point le knock-out de *GPBARI* par siRNA dans les îlots de Langerhans humains. Nous avons observé qu'une diminution significative de l'expression du gène de TGR5 (*GPBARI*) était associée à une diminution significative de l'expression du gène de la somatostatine (*SST*). Cette observation est en adéquation avec les résultats ayant montré une corrélation entre les expressions de *GPBARI* et de la *SST* dans la cohorte d'îlots de Langerhans humains que nous possédons au laboratoire. D'autre part, nous n'avons pas observé d'impact de la diminution de l'expression de *GPBARI* sur l'expression de l'*INS*. Cette modulation de l'expression du gène de la SST via l'expression de TGR5 induite par la technique de siRNA a également été observée dans un modèle cellulaire δ pancréatique murin, la lignée TGP52. Il est à noter que cette lignée cellulaire murine issue d'un insulinoïde, seul modèle δ pancréatique commercialisé, caractérisé et utilisé durant mon travail de thèse, a constitué un modèle présentant des profils d'expression et de sécrétion fluctuants en culture. Seules les expériences de modulation de l'expression du gène de TGR5 ont montré des résultats reproductibles. Cette lignée a montré une faible expression et sécrétion de la SST en culture dans des conditions basales de sécrétion (bas versus haut glucose par

eemple) ou en présence de sécrétagogues de la sécrétion de la SST (glucose, arginine, forskoline). Nous avons également durant mon travail de thèse étudié deux modèles murins, les souris knock-out pour le gène *Gpbar1* (laboratoire du Professeur Kristina Shoonjans), les souris Knock-out pour le gène *Sst* (laboratoire du Professeur Patrick Gilon) et également un modèle cellulaire β pancréatique humain, la lignée Endoc cell line (laboratoire du professeur Raphael Scharfmann). Ces modèles constituaient des pistes d'étude des mécanismes précis pouvant impliquer TGR5 et la population endocrine l'exprimant dans la modulation de l'activité pancréatique. Les résultats obtenus ont été difficiles à interpréter avec des phénotypes des souris en adéquation avec nos attentes, mais des effets médiés par la modulation de l'activité de TGR5 non reproductibles ou difficilement interprétables. Pour cela ces résultats ont plus été une façon de créer des contacts dans l'optique de futures collaborations et dans le but de créer des liens entre notre unité et des équipes de recherche à la pointe de leur spécialité.

Nous avons ensuite étudié l'impact de la modulation de l'activité du récepteur TGR5 sur la sécrétion des hormones pancréatiques et plus particulièrement de la SST. En utilisant des îlots de Langerhans humains isolés de différents patients non diabétiques, nous avons réalisé des expériences d'incubations statiques, expériences réalisées en routine au laboratoire en vue d'évaluer les préparations d'îlots de Langerhans à but de greffe [2]. La littérature rapporte une sécrétion de la SST préférentiellement en haut glucose [42] ce que nous retrouvons dans l'ensemble de nos expériences. Comme expliqué dans ma partie Résultats, nous avons utilisé au cours de ma thèse deux types de protocoles d'incubations statiques. Nous avons montré, en utilisant ces deux techniques d'incubations statiques, que l'activation du récepteur TGR5 par un agoniste spécifique (biovision, 1722-5) à différentes concentrations est associée à une augmentation de la sécrétion de SST. Nous avons néanmoins observé des différences entre nos deux protocoles. Avec le premier protocole, nous avons observé une potentialisation de l'effet

de l'agoniste de TGR5 sur la sécrétion de somatostatine uniquement en bas glucose (2,8 mM). En revanche, une potentialisation de cet effet a été mise en évidence à 6 et 15 mM glucose avec le second protocole. Ces différences peuvent venir du fait que les deux protocoles utilisés sont foncièrement différents. Le premier protocole implique 2 incubations successives d'une heure, d'un même puit d'îlots de Langerhans humains, avec deux concentrations de glucose différentes (2,8 mM puis 20 mM Glucose) et avec une concentration déterminée de l'agoniste du récepteur TGR5. Le second protocole consiste en une incubation d'une heure à une seule concentration de glucose et d'agoniste pour chaque batch d'îlots de Langerhans humains. En effet, outre le glucose et l'impact de l'agoniste sur la sécrétion de la somatostatine, de nombreux processus paracrines impliquant les hormones insuline et glucagon ainsi que les temps d'incubations peuvent expliquer ces différences de sécrétions [141]. Il est tout à fait possible de penser que pour le 1^{er} protocole les mécanismes de saturation du récepteur TGR5 et les mécanismes paracrines modulant la sécrétion des hormones endocrines seront différents de ceux appliqués aux îlots de Langerhans humains traités en suivant le 2^e protocole. Ces mécanismes pourraient être à l'origine des sécrétions hormonales sensiblement différentes. Nous avons également observé dans nos expériences une modulation de la sécrétion de l'insuline en présence de l'agoniste de TGR5, 1722-5. Ainsi, nous avons observé une augmentation de la sécrétion de l'insuline en présence de l'agoniste de TGR5, quelle que soit la concentration de glucose appliquée aux îlots de Langerhans humains, mais avec une potentialisation de l'effet à 6 et 15 mM glucose. La littérature rapporte des stimulations des sécrétions de l'insuline et du glucagon respectivement en haut et bas glucose [75, 76]. Au cours de nos expériences, nous avons observé un effet direct de l'agoniste sur la sécrétion de la SST, indépendamment de la concentration en glucose ainsi qu'un effet sur la sécrétion de l'INS. Ceci semble être en adéquation avec ce que rapporte la littérature. En effet, l'équipe de Kumar et ses collègues a

montré que l'activation du récepteur TGR5 avec un agoniste spécifique (INT777) stimulait la sécrétion de l'INS par une lignée cellulaire murine MIN6 et par des îlots de Langerhans *in vitro* [15]. Néanmoins, si l'on considère que TGR5 agirait sur la sécrétion de l'INS via un mécanisme paracrine médié par la SST, nos observations seraient en contradiction avec le rôle connu de la SST dans l'îlot de Langerhans humain. La SST est connue en tant que régulateur des sécrétions de l'INS et du GCG lorsque celles-ci sont stimulées [43-45]. Plus précisément, la SST est connue pour inhiber les sécrétions des hormones pancréatiques (INS en haut glucose et GCG en bas glucose) dans le but de stopper leur action une fois l'équilibre glycémique rétabli (éviter une hypoglycémie pour l'INS ou une hyperglycémie pour le GCG), et cela via son action sur ses récepteurs SST1-5 exprimés par les différentes populations endocrines pancréatiques [43-45]. Sachant que nous ne sommes pas dans des conditions physiologiques, et que l'ajout d'une molécule chimique (agoniste de TGR5) dans le milieu de culture des îlots de Langerhans peut moduler de façon directe ou indirecte les mécanismes paracrines, de plus amples investigations restent à être entreprises. Pour cela, l'étude de la modulation de la sécrétion du glucagon dans nos expériences reste à être réalisée. Il serait également intéressant d'effectuer des expériences de périfusion, celles-ci pouvant nous permettre d'étudier de façon précise les cinétiques de sécrétion des trois principales hormones pancréatiques (SST, INS, GCG) dans le contexte d'une activation du récepteur TGR5. Egalement, d'autres agonistes synthétiques et naturels du récepteur de TGR5 devront être étudiés dans le but de valider et de conforter nos résultats.

Nos résultats impliquent donc le récepteur TGR5 dans la régulation du métabolisme du glucose (corrélation *GPBARI/SST* et HbA1c dans les îlots de Langerhans humains) et dans la modulation de la fonction endocrine pancréatique (activation du récepteur TGR5 modulant les sécrétions des 3 principales hormones endocrines). Néanmoins, le rôle précis du récepteur TGR5 et ses mécanismes d'action sur l'expression et la sécrétion de la SST dans l'îlot de

Langerhans d'un sujet sain ou diabétique de type 2 n'ont pas pu être déterminés au cours de ce travail de thèse. La faible proportion des cellules δ dans l'îlot de Langerhans humains (10%) et surtout murins (<5%) est une des principales explications à la limitation de l'étude de ces mécanismes [19, 142]. Le contexte de l'îlot de Langerhans, sa structure complexe (différentes populations endocrines) et les effets paracrines connus pour moduler son activité rendent l'étude de ces mécanismes dépendant du développement d'un modèle δ pancréatique pur et reproductible. La non-existence de marqueurs extracellulaires spécifiques aux cellules δ en fait une population cellulaire difficile à purifier [52]. De plus, l'architecture et les mécanismes sécrétoires des îlots de Langerhans murins significativement différents de ceux des îlots de Langerhans humains, a rendu nos études comparatives difficiles à interpréter.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de mes travaux de thèse a permis de mettre en évidence l'expression spécifique du récepteur aux acides biliaires TGR5 dans le pancréas et de déterminer l'impact de sa régulation et de son activation sur la fonction endocrine.

Dans ce but, nous avons dans un premier temps cherché à étudier l'expression du récepteur TGR5 dans le pancréas humain. Pour cela, utilisant notre banque de tissus pancréatiques et des outils de biologie moléculaire et immunohistologiques, nous avons mis en évidence une expression du récepteur TGR5 spécifiquement dans le tissu endocrine pancréatique et plus précisément dans une sous population endocrine, la population δ pancréatique.

L'étude de différents groupes de pancréas classés par BMI et HbA1c a montré une augmentation significative des expressions des gènes *GBPAR1* et de la *SST* chez les sujets diabétiques de type 2 avec une association de cette augmentation de l'expression de TGR5 avec une hyperplasie du tissu δ pancréatique chez ces mêmes sujets. Plus qu'une augmentation de l'expression transcriptionnelle de TGR5 et de la *SST*, des corrélations positives ont été démontrées entre ces deux gènes, et entre ces deux gènes et l'HbA1c des patients. Egalement cette corrélation d'expression entre TGR5 et la *SST* a été montrée en utilisant des modèles d'inhibition de l'expression de TGR5 par la méthode du siRNA et chez les souris KO pour le gène du récepteur aux acides biliaires TGR5.

L'étude de l'impact de l'activation du récepteur TGR5 sur les îlots de Langerhans humains par des agonistes spécifiques a montré une modulation de la sécrétion de la somatostatine (stimulation), phénomène pouvant réguler par des mécanismes paracrines la sécrétion de l'insuline (stimulation). La mise en évidence de la modulation de la physiologie de l'îlot de Langerhans par le récepteur TGR5 constitue une potentielle voie thérapeutique dans le but de moduler les dysfonctions physiologiques observées chez les sujets diabétiques.

Néanmoins la complexité de l'îlot de Langerhans et l'ensemble des mécanismes paracrines modulant l'expression et la sécrétion des hormones pancréatiques, ainsi que l'impact d'agonistes naturels du récepteur TGR5 (LCA, DCA) à des concentrations physiologiques sont des mécanismes devant encore être étudiés. Ce sont autant d'expériences à réaliser dans le but de valider nos premières observations et de préciser les mécanismes par lesquels le récepteur TGR5 module la physiologie de l'îlot de Langerhans.

Mes travaux de thèse ont également mis en avant les limitations actuelles d'étude de la population delta pancréatique. Que se soit par la faible proportion de cellules delta dans les îlots de Langerhans humains et murins, par la différence d'architecture de l'îlot observée entre les îlots humains et murins, par la non-possibilité de purifier les cellules delta pour les étudier séparément des autres populations pancréatiques, mais aussi par la limitation observée durant mon travail du principal modèle delta pancréatique commercialisé à ce jour, la lignée cellulaire murine TGP52, nous avons montré la nécessité de mettre au point des modèles delta pancréatiques utilisables et reproductibles.

CHAPITRE 6 : PUBLICATIONS HORS SUJET DE THESE

Etude de la régulation et de l'expression du transporteur du zinc ZNT8 dans les îlots pancréatiques humains (PMID : 22582094).

Ce travail avait pour but d'étudier le rôle du zinc et du transporteur du zinc ZNT8 dans des conditions diabétogènes en présence ou non de zinc (Figure 50). Premièrement, nous avons montré que le traitement d'îlot de Langerhans humains avec un chélateur du zinc TPEN induit une diminution significative de l'expression du transporteur du zinc ZNT8, une diminution du niveau d'ATP dans les îlots, une augmentation de l'apoptose et une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (GSIS) [2].

225

Regulation and functional effects of ZNT8 in human pancreatic islets

Bruno Lefebvre^{1,2}, Brigitte Vandewalle^{1,2}, Anne-Sophie Balavoine^{1,2}, Gurvan Queniat^{1,2}, Ericka Moerman^{1,2}, Marie-Christine Vantyghem^{1,2,4}, Olivier Le Bacquer^{1,2}, Valery Gmyr^{1,2}, Valérie Pawlowski^{1,2}, Julie Kerr-Conte^{1,2} and Francois Pattou^{1,2,3}

¹Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

²UMR859, Biotherapies for Diabetes, F-59000 Lille, France

³CHU Lille, Department of Endocrine Surgery, F-59000 Lille, France

⁴CHU Lille, Endocrinology and Metabolism, F-59000 Lille, France

(Correspondence should be addressed to B Lefebvre who is now at Faculty of Medicine, Univ Lille Nord de France/INSERM U859, 1 place de Verdun, F59045 Lille, France; Email: bruno.lefebvre@inserm.fr)

Abstract

Zinc ions are essential for the formation of insulin crystals in pancreatic β cells, thereby contributing to packaging efficiency of stored insulin. Zinc fluxes are regulated through the SLC30A (zinc transporter, ZNT) family. Here, we investigated the effect of metabolic stress associated with the prediabetic state (zinc depletion, glucotoxicity, and lipotoxicity) on ZNT expression and human pancreatic islet function. Both zinc depletion and lipotoxicity (but not glucotoxicity) downregulated ZNT8 (*SLC30A8*) expression and altered the glucose-stimulated insulin secretion index (GSIS). ZNT8 overexpression in human

islets protected them from the decrease in GSIS induced by tetrakis-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine and palmitate but not from cell death. In addition, zinc supplementation decreased palmitate-induced human islet cell death without restoring GSIS. Altogether, we showed that ZNT8 expression responds to variation in zinc and lipid levels in human β cells, with repercussions on insulin secretion. Prospects for increasing ZNT8 expression and/or activity may prove beneficial in type 2 diabetes in humans.

Journal of Endocrinology (2012) **214**, 225–232

Figure 50 : abstract de l'article de Lefebvre et collègues, : regulation and functional effects of ZNT8 in human pancreatic islet (extrait de l'article [2]).

Nous avons également montré que ces effets induits pas une déplétion en zinc pouvaient être contrés par une surexpression de ZNT8 dans les îlots. Finalement nous avons étudié l'impact de conditions diabétogènes telles que la lipotoxicité (traitement des îlots avec du

palmitate) et l'inflammation (traitement des îlots avec des cytokines pro-inflammatoires) dans des conditions de supplémentation ou non en zinc sur la fonction de l'îlot. Nous avons montré que le traitement des îlots de Langerhans humains avec du palmitate diminue significativement l'expression de ZNT8 ce qui est associée avec une diminution du niveau en ATP, du contenu en insuline des îlots ainsi que de la Glucose Stimulated Insulin Secretion (GSIS) et une augmentation du niveau d'apoptose. Egalement nous avons montré qu'une supplémentation en zinc des îlots traités au palmitate réduit le niveau d'apoptose et qu'une surexpression de ZNT8 dans ces îlots traités au palmitate restaure la GSIS [2].

Ma contribution à ce travail a constitué en la participation à la réalisation de certaines des expériences présentées dans cette publication. Celles-ci concernent les expériences de surexpression de la protéine ZNT8 dans les îlots humains isolés par la technique de microporation, technique ayant été utilisée dans mon projet de thèse. Egalement ma participation à ce projet m'a permis de me familiariser avec les techniques de mesure de l'apoptose et de la réalisation des GSIS sur les îlots humains in vitro, techniques ayant été utilisées pour mon projet de thèse.

Etude de la régulation de la sécrétion d'insuline dans les cellules INS1-E par mTORC1 et mTORC2 via un mécanisme Akt dépendant (PMID : 23092880).

mTOR pour « mammalian target of rapamycin » est un complexe multiprotéique connu pour être impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération cellulaire.

Research	O LE BACQUER and others	Raptor and insulin secretion in INS-1 cells	216:1	21-29
----------	-------------------------	---	-------	-------

mTORC1 and mTORC2 regulate insulin secretion through Akt in INS-1 cells

Olivier Le Bacquer^{1,2}, Gurvan Gueniat^{1,2}, Valery Gmyr^{1,2}, Julie Kerr-Conte^{1,2}, Bruno Lefebvre^{1,2,3} and François Pattou^{1,2,4}

¹UMR859, Faculty of Medicine, Université Lille Nord de France, 1 Place de Verdun, F-59000 Lille, France
²INSERM UMR859, Biotherapies for Diabetes, F-59000 Lille, France
³INSERM UMR837, F-59000 Lille, France
⁴CHU Lille, Department of Endocrine Surgery, F-59000 Lille, France

Correspondence should be addressed to O Le Bacquer
Email olivier.le-bacquer@dermont.inra.fr

Abstract

Regulated associated protein of mTOR (Raptor) and rapamycin-insensitive companion of mTOR (riCTOR) are two proteins that delineate two different mTOR complexes, mTORC1 and mTORC2 respectively. Recent studies demonstrated the role of rictor in the development and function of β -cells. mTORC1 has long been known to impact β -cell function and development. However, most of the studies evaluating its role used either drug treatment (i.e. rapamycin) or modification of expression of proteins known to modulate its activity, and the direct role of raptor in insulin secretion is unclear. In this study, using siRNA, we investigated the role of raptor and rictor in insulin secretion and production in INS-1 cells and the possible cross talk between their respective complexes, mTORC1 and mTORC2. Reduced expression of raptor is associated with increased glucose-stimulated insulin secretion and intracellular insulin content. Downregulation of rictor expression leads to impaired insulin secretion without affecting insulin content and is able to correct the increased insulin secretion mediated by raptor siRNA. Using dominant-negative or constitutively active forms of Akt, we demonstrate that the effect of both raptor and rictor is mediated through alteration of Akt signaling. Our finding shed new light on the mechanism of control of insulin secretion and production by the mTOR, and they provide evidence for antagonistic effect of raptor and rictor on insulin secretion in response to glucose by modulating the activity of Akt, whereas only raptor is able to control insulin biosynthesis.

Key Words

- ▶ Raptor
- ▶ rictor
- ▶ mTORC1
- ▶ mTORC2
- ▶ insulin secretion

Journal of Endocrinology (2013) 216, 21–29

Figure 51 : abstract de l'article de Le Bacquer et collègues : mTORC1 and mTORC2 regulate insulin secretion through Akt in INS-1 cells, (extrait de l'article [3]).

Deux de ces complexes appartenant à cette famille mTOR, mTORC1 composé entre autres de la protéine raptor pour « regulated associated protein of mTOR » et mTORC2 composé entre autres de la protéine rictor pour « rapamycin-insensitive companion of mTOR », ont été récemment mis en évidence comme ayant un rôle dans le développement et la fonction des cellules β pancréatiques. La littérature montrant qu'une inhibition du complexe mTORC1 (par la rapamycine par exemple) induit une perte de fonction et une mort des cellules β et de l'îlot, et qu'une augmentation de son expression augmente la masse bêta pancréatique. Notre étude avait pour but de mettre en évidence les mécanismes cellulaires à l'origine du contrôle de la sécrétion de l'INS par le complexe mTORC1 et d'étudier les interactions entre les complexes mTORC1 et mTORC2 dans un modèle de cellule β pancréatique (modèle cellulaire β pancréatique INS-1). Dans ce travail nous avons montré que la régulation de l'expression de la protéine raptor (mTORC1) module la sécrétion d'INS avec une diminution de l'expression de raptor induisant une augmentation de la sécrétion d'INS (abstract : Figure 51) [3]. De plus nous avons montré que la diminution de l'expression de raptor est associée à une augmentation de l'INS produite par les cellules β pancréatiques, elle-même associée à une augmentation de l'expression des gènes clefs de la modulation de l'expression de l'INS que sont Foxo1, Pdx1 et Mafa. D'autre part nous avons montré que l'induction d'une diminution de l'expression de rictor (mTORC2) inhibe l'activité de la protéine Akt ainsi que la sécrétion d'INS. L'inhibition de l'expression de rictor par siRNA est aussi à l'origine d'une réversion de l'effet induit par une diminution de l'expression de raptor par siRNA sur la sécrétion d'INS, mécanisme faisant intervenir la modulation de l'activité d'une troisième protéine, Akt [3].

Ma contribution à ce travail a constitué en la participation à la réalisation de certaines des expériences présentées dans cette publication. Celles-ci concernent les expériences de diminution de l'expression des gènes rictor et raptor dans le modèle cellulaire bêta INS-1 par la

technique de la lipofectamine, technique ayant été utilisée dans mon projet de thèse. Egalement ma participation à ce projet m'a permis de me familiariser avec les techniques de culture, de mesure de l'apoptose et de la réalisation des GSIS sur des lignées cellulaires pancréatiques in vitro, techniques ayant été utilisées pour mon projet de thèse.

Utilisation d'une méthode digitale automatique pour déterminer la masse des îlots pancréatiques dans le but d'améliorer l'efficacité et la reproductibilité des paramètres d'évaluation de la population d'îlots à but de greffe (PMID : 23635395).

Le but de cette publication était de reporter le développement d'une nouvelle technique de comptage et d'estimation de la qualité d'une préparation d'îlots de Langerhans humains isolés dans le but d'optimiser les paramètres de greffe chez le sujet diabétique de type 1 (abstract : Figure 52). Cette technique était comparée à la méthode manuelle standard de comptage. Cette technique est basée sur l'analyse de la préparation d'îlots humains par microscopie (microscope inverse Nikon Eclipse Ti) associée à l'analyse par un logiciel de traitement d'image (NIS-ElementsAdvanced Research (AR)). Cette technique nommée ADIA pour automated digitalimage analysis a été montrée comme augmentant le nombre de préparations pouvant être greffées avec une meilleure reproductibilité des comptages et une plus faible variabilité interindividuelle.

Automated Digital Image Analysis of Islet Cell Mass Using Nikon's Inverted Eclipse Ti Microscope and Software to Improve Engraftment May Help to Advance the Therapeutic Efficacy and Accessibility of Islet Transplantation Across Centers

Valery Gmyr,^{*,†} Caroline Bonner,^{*,†} Bruno Lukowiak,^{*,†} Valerie Pawlowski,^{*,†} Nathalie Dellaleau,^{*,†} Sandrine Belaich,^{*,†} Isanga Aluka,^{*,†} Ericka Moermann,^{*,†} Julien Thevenet,^{*,†} Rimed Ezzouaoui,^{*,†} Gurvan Queniat,^{*,†} Francois Pattou,^{*,†,‡,§} and Julie Kerr-Conte^{*,†}

*European Genomic Institute for Diabetes (EGID), Lille, France

†INSERM UMR U859, Lille, France

‡UNIV LILLE 2, Lille, France

§SCHULille, Lille, France

Reliable assessment of islet viability, mass, and purity must be met prior to transplanting an islet preparation into patients with type 1 diabetes. The standard method for quantifying human islet preparations is by direct microscopic analysis of dithizone-stained islet samples, but this technique may be susceptible to inter-/intraobserver variability, which may induce false positive/negative islet counts. Here we describe a simple, reliable, automated digital image analysis (ADIA) technique for accurately quantifying islets into total islet number, islet equivalent number (IEQ), and islet purity before islet transplantation. Islets were isolated and purified from $n=42$ human pancreata according to the automated method of Ricordi et al. For each preparation, three islet samples were stained with dithizone and expressed as IEQ number. Islets were analyzed manually by microscopy or automatically quantified using Nikon's inverted Eclipse Ti microscope with built-in NIS-Elements Advanced Research (AR) software. The ADIA method significantly enhanced the number of islet preparations eligible for engraftment compared to the standard manual method ($p<0.001$). Comparisons of individual methods showed good correlations between mean values of IEQ number ($r^2=0.91$) and total islet number ($r^2=0.88$) and thus increased to $r^2=0.93$ when islet surface area was estimated comparatively with IEQ number. The ADIA method showed very high intraobserver reproducibility compared to the standard manual method ($p<0.001$). However, islet purity was routinely estimated as significantly higher with the manual method versus the ADIA method ($p<0.001$). The ADIA method also detected small islets between 10 and 50 μm in size. Automated digital image analysis utilizing the Nikon Instruments software is an unbiased, simple, and reliable teaching tool to comprehensively assess the individual size of each islet cell preparation prior to transplantation. Implementation of this technology to improve engraftment may help to advance the therapeutic efficacy and accessibility of islet transplantation across centers.

Key words: Human islets; Automated digital image analysis (ADIA); Standard manual method; Islet surface area; Transplantation centers

Figure 52 : abstract de l'article de Gmyr et collègues : Automated Digital Image Analysis of islet cell mass using Nikon's inverted Eclipse Ti microscope and software to improve engraftment may help to advance the therapeutic efficacy and accessibility of islet transplantation across centers, (Cell transplantation, 2013).

La participation à ce projet m'a permis de me familiariser avec deux points clefs de l'évaluation des préparations d'îlots de Langerhans humains isolés, qui sont le comptage des îlots de Langerhans transcrit en îlots équivalents (IE) et la pureté de la préparation d'îlots (rapport % de tissu endocrine en comparaison du tissu exocrine). Ces deux paramètres ont été déterminés et constituent des points clefs de chaque préparation d'îlot de Langerhans utilisée durant mon projet de thèse.

Etude de l'expression et du rôle du transporteur du glucose SGLT2 dans les cellules alpha pancréatique et sur la sécrétion du glucagon (PMID: 25894829).

Le diabète de type 2 est une pathologie caractérisée par une hyperglycémie chronique résultant d'une résistance à l'INS et d'une déficience des mécanismes insuline dépendants.

Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion

Caroline Bonner^{1,2,3,4}, Julie Kerr-Conte^{1,2,3,4}, Valéry Gmyr^{1,2,3}, Gurvan Queniat^{1,2,3}, Ericka Moerman^{1,2,3}, Julien Thévenet^{1,2,3}, Cédric Beaucamps^{1,2,3}, Nathalie Delalleau^{1,2,3}, Iuliana Popescu⁵, Willy J Malaisse⁵, Abdullah Sener⁵, Benoit Deprez^{2,6,7}, Amar Abderrahmani^{1, 2,8}, Bart Staels*^{1, 2,7,9}, and François Pattou*^{1,2,3}.

¹ European Genomic Institute for Diabetes (EGID), Lille, France; ² Université de Lille, Lille, France; ³ INSERM UMR 1190, Lille, France; ⁴ Centre Hospitalier Régional Universitaire, Lille, France; ⁵ Laboratory of Physiology and Pharmacology, Medical School, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium; ⁶ INSERM UMR 1177, Lille, France; ⁷ Institut Pasteur de Lille, Lille, France; ⁸ CNRS UMR 8199, Lille, France; ⁹ INSERM UMR 1011, Lille, France

*Share senior authorship

Figure 53 : abstract de l'article de Bonner C et collègues : Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion (Nature medicine, 2015).

Egalement cette pathologie est caractérisée par une hyperglucagonémie associée à une augmentation de la production de glucose endogène par le foie. Dans les nombreuses voies thérapeutiques explorées dans le cadre du traitement du diabète une nouvelle classe de composés oraux appelés gliflozines a été développée. Ces composés sont des inhibiteurs de l'activité du transporteur du glucose SGLT2 (sodium glucose cotransporter-2).

Historiquement SGLT2 a été montré comme étant exprimé dans le rein. Au niveau du rein les gliflozines vont bloquer l'action du transporteur SGLT2 et donc la réabsorption du glucose au niveau du rein, ceci conduisant à l'élimination du glucose dans les urines. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'étude du transporteur du glucose SGLT2 et l'impact de son inhibition par une nouvelle classe de composés appelés gliflozines (dapagliflozin) au niveau pancréatique (abstract : Figure 53). Nous avons montré que le transporteur SGLT2 est exprimé dans le pancréas et plus précisément dans les cellules α pancréatiques sécrétrices du GCG. Nous avons observé dans notre banque de tissus pancréatiques une diminution significative de l'expression du transporteur SGLT2 chez les sujets diabétiques de type 2 ainsi qu'une augmentation associée de l'expression du GLG. De plus et en adéquation avec ce que rapportait déjà la littérature nous avons montré qu'un traitement avec de la dapagliflozine d'îlots de Langerhans humains isolés ou in vivo chez la souris amène à une augmentation de la sécrétion du GCG. Nos résultats ont démontré un rôle direct du transporteur du glucose SGLT2 et de la modulation de son activité (gliflozine) sur la sécrétion du GCG par les cellules α pancréatiques.

J'ai durant ce travail apporté mes connaissances techniques dans le but de réaliser certaines expériences. J'ai participé aux expériences ayant pour but de déterminer le niveau d'expression et la modulation de l'expression du transporteur du glucose SGLT2 dans le pancréas humain, mais également dans les différents modèles de souris utilisés durant ce travail. Egalement j'ai participé à la réalisation des expériences de modulation de l'expression du transporteur du glucose SGLT2 dans les îlots de Langerhans humains par l'utilisation des RNA interférences.

Fischer 344 Rat : A preclinical Model for Epithelial Ovarian Cancer Folate-Targeted Therapy (PMID : 26244757)

Ce travail a eu pour but de déterminer si le modèle de rat Fisher 344 est un bon modèle d'étude préclinique pour l'étude des cancers ovariens.

Fischer 344 Rat A Preclinical Model for Epithelial Ovarian Cancer Folate-Targeted Therapy

Henri Azaïs, MD,*† Gurvan Queniat, PhD,‡ Caroline Bonner, PhD,‡ Olivier Kerdraon, MD,§ Meryem Tardivel, PhD,|| Gulim Jetpishbayeva, PhD,¶ Céline Frochot, PhD,¶ Nacim Betrouni, PhD,* Pierre Collinet, MD, PhD,*† and Serge Mordon, PhD*

Objective: Ovarian cancer prognosis remains dire after primary therapy. Recurrence rates are disappointingly high as 60% of women with advanced epithelial ovarian cancer considered in remission will develop recurrent disease within 5 years. Special attention to undetected peritoneal metastasis and residual tumorous cells during surgery is necessary as they are the main predictive factors of recurrences. Folate receptor α (FR α) shows promising prospects in targeting ovarian cancerous cells. Our aim was to determine if the Fischer model described by Rose et al could be used to evaluate folate-targeted therapies in preclinical studies.

Methods: NuTu-19 epithelial ovarian cancer cell line was used to induce peritoneal carcinomatosis in female Fischer 344 rats. FR α expression by NuTu-19 cells was assessed in vitro by immunofluorescence using "Cytospin®" protocol. In vitro folate-targeted compound uptake by NuTu-19 cells was evaluated by incubation of FR α -positive ovarian cancer cell lines (NuTu-19/SKOV-3/OVCAR-3/IGROV-1) with or without (control) a folate-targeted photosensitizer. Intracellular incorporation was assessed by confocal microscopy. Determination of in vivo FR α tissue expression by several organs of the peritoneal cavity was studied by immunohistochemistry.

Results: NuTu-19 cells express FR α which allows intracellular incorporation of folate-targeted compound by endocytosis. FR α is expressed in tumor tissue, ovary, and liver. Peritoneum, colon, small intestine, and kidney do not express the receptor.

Conclusions: Female Fischer 344 rat is an inexpensive reproducible and efficient pre-clinical model to study ovarian peritoneal carcinomatosis folate-targeted therapies.

Figure 54 : abstract de l'article de Azaïs H et collègues : Fisher 344 Rat : A preclinical model for epithelial ovarian cancer folate-targeted therapy (International Journal of Gynecological Cancer, 2015).

Ma contribution à ce travail a constitué en la participation à la réalisation de certaines des expériences présentées dans cette publication. Celles-ci concernent principalement les expériences d'immunomarquages, techniques ayant été utilisées dans mon projet de thèse. J'ai également pu durant se projet évaluer ma capacité d'adaptation à un sujet qui n'était pas du tout

dans mon domaine d'investigation initial (cancer ovarien). Egalement j'ai apporté mon support technique et scientifique à l'auteur principal de ce travail, monsieur Henri Azaïs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kawamata, Y., et al., *A G protein-coupled receptor responsive to bile acids*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9435-40.
2. Lefebvre, B., et al., *Regulation and functional effects of ZNT8 in human pancreatic islets*. J Endocrinol, 2012. **214**(2): p. 225-32.
3. Le Bacquer, O., et al., *mTORC1 and mTORC2 regulate insulin secretion through Akt in INS-1 cells*. J Endocrinol, 2013. **216**(1): p. 21-9.
4. Gioiello, A., et al., *Patented TGR5 modulators: a review (2006 - present)*. Expert Opin Ther Pat, 2012. **22**(12): p. 1399-414.
5. Duboc, H., Y. Tache, and A.F. Hofmann, *The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application*. Dig Liver Dis, 2014. **46**(4): p. 302-12.
6. Thomas, C., et al., *TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis*. Cell Metab, 2009. **10**(3): p. 167-77.
7. Hoy, J.R., et al., *Mutational characterization of the bile acid receptor TGR5 in primary sclerosing cholangitis*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12403.
8. Pols, T.W., *TGR5 in inflammation and cardiovascular disease*. Biochem Soc Trans, 2014. **42**(2): p. 244-9.
9. Wettschureck, N. and S. Offermanns, *Mammalian G proteins and their cell type specific functions*. Physiol Rev, 2005. **85**(4): p. 1159-204.
10. Chiang, J.Y., *Bile acids: regulation of synthesis*. J Lipid Res, 2009. **50**(10): p. 1955-66.
11. Gylfe, E. and P. Gilon, *Glucose regulation of glucagon secretion*. Diabetes Res Clin Pract, 2014. **103**(1): p. 1-10.
12. Grundy, S.M., et al., *Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(2): p. e13-8.
13. Steiner, D.J., et al., *Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition*. Islets, 2010. **2**(3): p. 135-45.
14. Popescu, I.R., et al., *The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic beta-cells and protects human islets from lipotoxicity*. FEBS Lett, 2010. **584**(13): p. 2845-51.
15. Kumar, D.P., et al., *Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic beta cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **427**(3): p. 600-5.
16. O'Dowd, J.F. and C.J. Stocker, *Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 170.
17. Jennings, R.E., et al., *Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment*. Diabetes, 2013. **62**(10): p. 3514-22.
18. Kim, A., et al., *Islet architecture: A comparative study*. Islets, 2009. **1**(2): p. 129-36.
19. Cabrera, O., et al., *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2334-9.
20. Ahren, B., *Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease*. Diabetologia, 2000. **43**(4): p. 393-410.
21. Weir, G.C. and S. Bonner-Weir, *Islets of Langerhans: the puzzle of intraislet interactions and their relevance to diabetes*. J Clin Invest, 1990. **85**(4): p. 983-7.
22. Begg, D.P. and S.C. Woods, *Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective*. Adv Physiol Educ, 2013. **37**(1): p. 53-60.
23. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. **15**(7): p. 539-53.
24. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, E. and A. Treatment of High Blood Cholesterol in, *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report*. Circulation, 2002. **106**(25): p. 3143-421.

25. Kashyap, S.R. and R.A. Defronzo, *The insulin resistance syndrome: physiological considerations*. Diab Vasc Dis Res, 2007. **4**(1): p. 13-9.
26. Watanabe, R.M., *The genetics of insulin resistance: Where's Waldo?* Curr Diab Rep, 2010. **10**(6): p. 476-84.
27. Cornier, M.A., et al., *The metabolic syndrome*. Endocr Rev, 2008. **29**(7): p. 777-822.
28. Lee, Y.C. and J.H. Nielsen, *Regulation of beta cell replication*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **297**(1-2): p. 18-27.
29. Saisho, Y., et al., *Response to Comment on: Saisho et al. beta-cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging*. Diabetes Care 2013;36:111-117. Diabetes Care, 2013. **36**(7): p. e112.
30. Bonner-Weir, S. and T.D. O'Brien, *Islets in type 2 diabetes: in honor of Dr. Robert C. Turner*. Diabetes, 2008. **57**(11): p. 2899-904.
31. Kilimnik, G., et al., *Altered islet composition and disproportionate loss of large islets in patients with type 2 diabetes*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27445.
32. Strowski, M.Z. and A.D. Blake, *Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **286**(1-2): p. 169-79.
33. Iki, K. and P.M. Pour, *Distribution of pancreatic endocrine cells including LAPP-expressing cells in non-diabetic and type 2 diabetic cases*. J Histochem Cytochem, 2007. **55**(2): p. 111-8.
34. Orci, L., et al., *Hypertrophy and hyperplasia of somatostatin-containing D-cells in diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(4): p. 1338-42.
35. Ling, N., et al., *The use of mass spectrometry in deducing the sequence of somatostatin--a hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of growth hormone*. Biochem Biophys Res Commun, 1973. **50**(1): p. 127-33.
36. Brazeau, P., et al., *Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone*. Science, 1973. **179**(4068): p. 77-9.
37. Alberti, K.G., et al., *Inhibition of insulin secretion by somatostatin*. Lancet, 1973. **2**(7841): p. 1299-301.
38. Sakurai, H., R. Dobbs, and R.H. Unger, *Somatostatin-induced changes in insulin and glucagon secretion in normal and diabetic dogs*. J Clin Invest, 1974. **54**(6): p. 1395-402.
39. Luft, R., et al., *Immunohistochemical evidence for the localization of somatostatin--like immunoreactivity in a cell population of the pancreatic islets*. Med Biol, 1974. **52**(6): p. 428-30.
40. Hauge-Evans, A.C., et al., *A role for islet somatostatin in mediating sympathetic regulation of glucagon secretion*. Islets, 2010. **2**(6): p. 341-4.
41. Youos, J.G., *The role of alpha-, delta- and F cells in insulin secretion and action*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **93 Suppl 1**: p. S25-6.
42. Hauge-Evans, A.C., et al., *Delta cell secretory responses to insulin secretagogues are not mediated indirectly by insulin*. Diabetologia, 2012. **55**(7): p. 1995-2004.
43. Brunicardi, F.C., et al., *Immunoneutralization of somatostatin, insulin, and glucagon causes alterations in islet cell secretion in the isolated perfused human pancreas*. Pancreas, 2001. **23**(3): p. 302-8.
44. Brunicardi, F.C., et al., *Activation of somatostatin receptor subtype 2 inhibits insulin secretion in the isolated perfused human pancreas*. Pancreas, 2003. **27**(4): p. e84-9.
45. Singh, V., et al., *Characterization of somatostatin receptor subtype-specific regulation of insulin and glucagon secretion: an in vitro study on isolated human pancreatic islets*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(2): p. 673-80.
46. Leiter, E.H., et al., *Ultrastructural and morphometric studies of delta cells in pancreatic islets from C57BL/Ks diabetes mice*. Diabetologia, 1979. **17**(5): p. 297-309.
47. Tostivint, H., I. Lihmann, and H. Vaudry, *New insight into the molecular evolution of the somatostatin family*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **286**(1-2): p. 5-17.
48. Patel, Y.C., *Somatostatin and its receptor family*. Front Neuroendocrinol, 1999. **20**(3): p. 157-98.
49. Spier, A.D. and L. de Lecea, *Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions*. Brain Res Brain Res Rev, 2000. **33**(2-3): p. 228-41.

50. Gutniak, M., et al., *Basal and meal-induced somatostatin-like immunoreactivity in healthy subjects and in IDDM and totally pancreatectomized patients. Effects of acute blood glucose normalization.* Diabetes, 1987. **36**(7): p. 802-7.
51. D'Alessio, D.A. and J.W. Ensink, *Fasting and postprandial concentrations of somatostatin-28 and somatostatin-14 in type II diabetes in men.* Diabetes, 1990. **39**(10): p. 1198-202.
52. Dorrell, C., et al., *Transcriptomes of the major human pancreatic cell types.* Diabetologia, 2011. **54**(11): p. 2832-44.
53. Berts, A., et al., *Oscillatory Ca²⁺ signaling in somatostatin-producing cells from the human pancreas.* Metabolism, 1997. **46**(4): p. 366-9.
54. Hauge-Evans, A.C., et al., *Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function.* Diabetes, 2009. **58**(2): p. 403-11.
55. Sako, Y., et al., *Effect of glibenclamide on pancreatic hormone release from isolated perfused islets of normal and cysteamine-treated rats.* Metabolism, 1986. **35**(10): p. 944-9.
56. Guenifi, A., B. Ahren, and S.M. Abdel-Halim, *Differential effects of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide versus cholecystokinin on arginine-induced islet hormone release in vivo and in vitro.* Pancreas, 2001. **22**(1): p. 58-64.
57. Silvestre, R.A., et al., *Interrelationship among insulin, glucagon and somatostatin secretory responses to exendin-4 in the perfused rat pancreas.* Eur J Pharmacol, 2003. **469**(1-3): p. 195-200.
58. Fehmann, H.C., et al., *The effects of glucagon-like peptide-I (GLP-I) on hormone secretion from isolated human pancreatic islets.* Pancreas, 1995. **11**(2): p. 196-200.
59. Gros, L., et al., *Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide, oxyntomodulin, and glucagon interact with a common receptor in a somatostatin-secreting cell line.* Endocrinology, 1993. **133**(2): p. 631-8.
60. Braun, M., et al., *Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an autocrine excitatory transmitter in human pancreatic beta-cells.* Diabetes, 2010. **59**(7): p. 1694-701.
61. Muller, D., et al., *Gene expression heterogeneity in human islet endocrine cells in vitro: the insulin signalling cascade.* Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1239-42.
62. Murakami, K., et al., *Modulation of somatostatin release by endogenous glucagon and insulin: physiological relationship between A, B and D cells in rat pancreatic islets.* Endocrinol Jpn, 1982. **29**(5): p. 503-8.
63. Yamada, Y., et al., *Cloning, functional expression and pharmacological characterization of a fourth (hSSTR4) and a fifth (hSSTR5) human somatostatin receptor subtype.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. **195**(2): p. 844-52.
64. Yamada, Y., et al., *Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 251-5.
65. Yasuda, K., et al., *Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase.* J Biol Chem, 1992. **267**(28): p. 20422-8.
66. O'Carroll, A.M., et al., *Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28.* Mol Pharmacol, 1992. **42**(6): p. 939-46.
67. Braun, M., *The somatostatin receptor in human pancreatic beta-cells.* Vitam Horm, 2014. **95**: p. 165-93.
68. Barbieri, F., et al., *Peptide receptor targeting in cancer: the somatostatin paradigm.* Int J Pept, 2013. **2013**: p. 926295.
69. Park, S., et al., *Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(46): p. 19003-8.
70. Ludvigsen, E., et al., *Expression and distribution of somatostatin receptor subtypes in the pancreatic islets of mice and rats.* J Histochem Cytochem, 2004. **52**(3): p. 391-400.
71. Kumar, U., et al., *Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1-5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis.* Diabetes, 1999. **48**(1): p. 77-85.

72. Portela-Gomes, G.M., et al., *Expression of the five different somatostatin receptor subtypes in endocrine cells of the pancreas*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2000. **8**(2): p. 126-32.
73. Kailey, B., et al., *SSTR2 is the functionally dominant somatostatin receptor in human pancreatic beta- and alpha-cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **303**(9): p. E1107-16.
74. Gerich, J.E., *Role of somatostatin and its analogues in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus*. Metabolism, 1990. **39**(9 Suppl 2): p. 52-4.
75. Hellman, B., et al., *Glucose generates coincident insulin and somatostatin pulses and antisynchronous glucagon pulses from human pancreatic islets*. Endocrinology, 2009. **150**(12): p. 5334-40.
76. Hellman, B., et al., *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, 2012. **417**(4): p. 1219-23.
77. Henquin, J.C., D. Dufrane, and M. Nenquin, *Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3470-7.
78. Hunyady, B., et al., *Immunohistochemical localization of somatostatin receptor SST2A in the rat pancreas*. Endocrinology, 1997. **138**(7): p. 2632-5.
79. Mitra, S.W., et al., *Colocalization of somatostatin receptor sst5 and insulin in rat pancreatic beta-cells*. Endocrinology, 1999. **140**(8): p. 3790-6.
80. Rohrer, S.P. and J.M. Schaeffer, *Identification and characterization of subtype selective somatostatin receptor agonists*. J Physiol Paris, 2000. **94**(3-4): p. 211-5.
81. Strowski, M.Z., et al., *Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice*. Endocrinology, 2000. **141**(1): p. 111-7.
82. Strowski, M.Z., et al., *Somatostatin receptor subtype 5 regulates insulin secretion and glucose homeostasis*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(1): p. 93-106.
83. Mandarino, L., et al., *Selective effects of somatostatin-14, -25 and -28 on in vitro insulin and glucagon secretion*. Nature, 1981. **291**(5810): p. 76-7.
84. Basabe, J.C., et al., *A temporal study of somatostatin secretion and its inhibitory effect in genetically diabetic mice (C57BL/KsJ-db/db)*. Endocrinology, 1983. **113**(6): p. 1927-34.
85. Basabe, J.C., et al., *Secretion and effect of somatostatin in early stages of the diabetic syndrome in C57BL/KsJ-mdb mice*. Diabetologia, 1986. **29**(8): p. 485-8.
86. Karabatas, L.M., et al., *First phase of insulin secretion stimulated by glucose plus theophylline and inhibitory effect of somatostatin in genetically diabetic mice (C57BL/KsJ-mdb)*. Diabetologia, 1988. **31**(6): p. 375-8.
87. Karabatas, L.M., et al., *Glucagon secretion and alpha-cell sensitivity to somatostatin in genetically diabetic mice C57BL/KsJ-mdb*. Acta Physiol Pharmacol Latinoam, 1989. **39**(2): p. 145-52.
88. Segers, O., et al., *Basal and tolbutamide-induced plasma somatostatin in healthy subjects and in patients with diabetes and impaired glucose tolerance*. Diabet Med, 1989. **6**(3): p. 232-8.
89. Grill, V., et al., *A stimulating effect of glucose on somatostatin release is impaired in noninsulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 1984. **59**(2): p. 293-7.
90. Portela-Gomes, G.M., et al., *Somatostatin receptor subtypes in human type 2 diabetic islets*. Pancreas, 2010. **39**(6): p. 836-42.
91. Cuevas-Ramos, D. and M. Fleseriu, *Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas*. J Mol Endocrinol, 2014. **52**(3): p. R223-40.
92. Dogliotti, L., et al., *The clinical management of neuroendocrine tumors with long-acting repeatable (LAR) octreotide: comparison with standard subcutaneous octreotide therapy*. Ann Oncol, 2001. **12** Suppl 2: p. S105-9.
93. Bruns, C., et al., *SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile*. Eur J Endocrinol, 2002. **146**(5): p. 707-16.

94. Williams, G., et al., *Postprandial glycaemic effects of a long-acting somatostatin analogue (octreotide) in non-insulin dependent diabetes mellitus*. *Horm Metab Res*, 1988. **20**(3): p. 168-70.
95. Mazziotti, G., et al., *Effects of somatostatin analogs on glucose homeostasis: a metaanalysis of acromegaly studies*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(5): p. 1500-8.
96. Fery, F., et al., *Effect of somatostatin on duodenal glucose absorption in man*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(7): p. 4163-9.
97. Davies, R.R., et al., *Effects of somatostatin analogue SMS 201-995 in non-insulin-dependent diabetes*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1986. **25**(6): p. 739-47.
98. Di Mauro, M., et al., *Effect of octreotide on insulin requirement, hepatic glucose production, growth hormone, glucagon and c-peptide levels in type 2 diabetic patients with chronic renal failure or normal renal function*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2001. **51**(1): p. 45-50.
99. Gaisano, H.Y., P.E. Macdonald, and M. Vranic, *Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes*. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 349.
100. Hofmann, A.F., *Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly*. *News Physiol Sci*, 1999. **14**: p. 24-29.
101. Hofmann, A.F., *The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009. **14**: p. 2584-98.
102. Li, T. and J.Y. Chiang, *Bile Acid signaling in liver metabolism and diseases*. *J Lipids*, 2012. **2012**: p. 754067.
103. Grider, J.R., *Role of cholecystokinin in the regulation of gastrointestinal motility*. *J Nutr*, 1994. **124**(8 Suppl): p. 1334S-1339S.
104. Forman, B.M., et al., *Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites*. *Cell*, 1995. **81**(5): p. 687-93.
105. Maruyama, T., et al., *Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **298**(5): p. 714-9.
106. Lefebvre, P., et al., *Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(1): p. 147-91.
107. Kolakowski, L.F., Jr., *GCRDb: a G-protein-coupled receptor database*. *Receptors Channels*, 1994. **2**(1): p. 1-7.
108. Fredriksson, R., et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. *Mol Pharmacol*, 2003. **63**(6): p. 1256-72.
109. Katritch, V., V. Cherezov, and R.C. Stevens, *Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013. **53**: p. 531-56.
110. Watanabe, M., et al., *Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation*. *Nature*, 2006. **439**(7075): p. 484-9.
111. Perides, G., et al., *Biliary acute pancreatitis in mice is mediated by the G-protein-coupled cell surface bile acid receptor Gpbar1*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(2): p. 715-25.
112. Sato, H., et al., *Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea**. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**(4): p. 793-8.
113. Genet, C., et al., *Structure-activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes*. *J Med Chem*, 2010. **53**(1): p. 178-90.
114. Pols, T.W., et al., *TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading*. *Cell Metab*, 2011. **14**(6): p. 747-57.
115. Haselow, K., et al., *Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages*. *J Leukoc Biol*, 2013. **94**(6): p. 1253-64.
116. Ichikawa, R., et al., *Bile acids induce monocyte differentiation toward interleukin-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway*. *Immunology*, 2012. **136**(2): p. 153-62.
117. Kida, T., et al., *Bile acid receptor TGR5 agonism induces NO production and reduces monocyte adhesion in vascular endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(7): p. 1663-9.

118. Katsuma, S., A. Hirasawa, and G. Tsujimoto, *Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **329**(1): p. 386-90.
119. Amisten, S., et al., *An atlas and functional analysis of G-protein coupled receptors in human islets of Langerhans*. *Pharmacol Ther*, 2013. **139**(3): p. 359-91.
120. Stone, V.M., et al., *GPR120 (FFAR4) is preferentially expressed in pancreatic delta cells and regulates somatostatin secretion from murine islets of Langerhans*. *Diabetologia*, 2014. **57**(6): p. 1182-91.
121. Ohishi, T. and S. Yoshida, *The therapeutic potential of GPR119 agonists for type 2 diabetes*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012. **21**(3): p. 321-8.
122. Ricordi, C., et al., *Automated method for isolation of human pancreatic islets*. *Diabetes*, 1988. **37**(4): p. 413-20.
123. Cheng, K., et al., *High passage MIN6 cells have impaired insulin secretion with impaired glucose and lipid oxidation*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e40868.
124. Riddelle, K.S., K.J. Green, and J.C. Jones, *Formation of hemidesmosomes in vitro by a transformed rat bladder cell line*. *J Cell Biol*, 1991. **112**(1): p. 159-68.
125. Bonner, C., et al., *Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion*. *Nat Med*, 2015. **21**(5): p. 512-7.
126. Yoneno, K., et al., *TGR5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease*. *Immunology*, 2013. **139**(1): p. 19-29.
127. Taylor, D.R., et al., *Urine bile acids relate to glucose control in patients with type 2 diabetes mellitus and a body mass index below 30 kg/m²*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e93540.
128. Schittenhelm, B., et al., *Role of FXR in beta-cells of lean and obese mice*. *Endocrinology*, 2015. **156**(4): p. 1263-71.
129. Vassileva, G., et al., *Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation*. *Biochem J*, 2006. **398**(3): p. 423-30.
130. Maruyama, T., et al., *Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice*. *J Endocrinol*, 2006. **191**(1): p. 197-205.
131. Nakashima, K., et al., *MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones*. *Endocr J*, 2009. **56**(1): p. 45-53.
132. Skelin, M., M. Rupnik, and A. Cencic, *Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research*. *ALTEX*, 2010. **27**(2): p. 105-13.
133. Unger, R.H. and L. Orci, *Possible roles of the pancreatic D-cell in the normal and diabetic states*. *Diabetes*, 1977. **26**(3): p. 241-4.
134. Cejvan, K., D.H. Coy, and S. Efendic, *Intra-islet somatostatin regulates glucagon release via type 2 somatostatin receptors in rats*. *Diabetes*, 2003. **52**(5): p. 1176-81.
135. Abdel-Halim, S.M., et al., *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*, 1993. **148**(2): p. 219-26.
136. Shah, P., et al., *Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(11): p. 4053-9.
137. Inouye, K., et al., *Effects of recurrent hyperinsulinemia with and without hypoglycemia on counterregulation in diabetic rats*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. **282**(6): p. E1369-79.
138. Papachristou, D.N., et al., *Tissue-specific alterations in somatostatin mRNA accumulation in streptozocin-induced diabetes*. *Diabetes*, 1989. **38**(6): p. 752-7.
139. Rastogi, K.S., et al., *Paradoxical reduction in pancreatic glucagon with normalization of somatostatin and decrease in insulin in normoglycemic alloxan-diabetic dogs: a putative mechanism of glucagon irresponsiveness to hypoglycemia*. *Endocrinology*, 1990. **126**(2): p. 1096-104.
140. Kilimnik, G., et al., *Quantification of islet size and architecture*. *Islets*, 2012. **4**(2): p. 167-72.

141. Rutter, G.A., *Visualising insulin secretion. The Minkowski Lecture 2004*. Diabetologia, 2004. **47**(11): p. 1861-72.
142. Starich, G.H., et al., *A morphological and immunohistochemical investigation of endocrine pancreata from obese ob⁺/ob⁺ mice*. Acta Histochem, 1991. **90**(1): p. 93-101.

ANNEXES

ANNEXE 1

Prescripteur : Pr PATTOU

Correspondant(s) :

Monsieur le Professeur PATTOU
CHIR GENERALE ENDOCRINIENNE
3e Est
HOPITAL HURIEZ

• 10 Lames Notées :
0996 93C

Monsieur LAN [REDACTED] V [REDACTED]

Prélèvement reçu le 06/04/2009 n° **C0909693**

Né le 16/09/1985

Age : 23 ans

COPIE INTERNE 19/01/2011

Renseignements cliniques : **Insulinome sporadique** situé en corporéo-caudal.

PIECE DE RESECTION PANCREATIQUE

La pièce de résection remise à l'examen mesure 14x2x2,5 cm.

Les limites d'exérèse sont encrées en noir. La pièce est remise non orientée.

La petite taille de la tumeur n'a pas permis la congélation d'échantillons dans le cadre de la tumorothèque.

Après fixation formolée on repère en macroscopie, à 1,5 cm de l'une des extrémités, la présence d'une petite lésion tumorale mesurant 1,4 cm de grand axe de coloration jaune chamois arrondie.

Des prélèvements sont effectués sur la lésion tumorale (C, D, E) puis sur le parenchyme pancréatique à distance de la tumeur (F, G, H, I) et sur chacune des extrémités de la pièce (A et B).

En microscopie, on observe ainsi une tumeur endocrine bien différenciée infiltrante mesurant 1,4 cm, de topographie intra-pancréatique. Cette lésion présente une architecture trabéculaire et acineuse. Elle est constituée de cellules de taille moyenne au cytoplasme modérément abondant, éosinophile. Les cellules tumorales ont des noyaux arrondis ou discrètement allongés avec une chromatine fine d'aspect poussiéreux. Absence de mitose individualisée. Absence d'angio-invasion.

La tumeur arrive à proximité des limites d'exérèse repérées par l'encre de Chine (liseré de tissu sain mesurant moins de 1 mm interposé entre le fron d'invasion tumoral et la limite d'exérèse). **Les cellules tumorales sont positives en immunohistochimie avec les anticorps anti-chromogranine A, anti-synaptophysine et anti-insuline.** L'étude effectuée avec l'anticorps MIB1 met en évidence 1 % de cellules tumorales engagées dans le cycle cellulaire. Les autres prélèvements intéressant le parenchyme pancréatique ne mettent pas en évidence de lésion histopathologique significative. Certains îlots endocrines sont remaniés par une congestion vasculaire.

CONCLUSION :

Tumeur endocrine pancréatique bien différenciée, de comportement bénin selon la classification de l'OMS 2000, mesurant 1,4 cm infiltrante et intra-pancréatique. Stade pT1Nx et grade G1 selon les propositions de ENETS.

CR dicté le 11/04/09, saisi le 14/04/09

CR validé le 14/04/2009
Professeur E. LETEURTRE

ADICAP : OHFPS4Y0, OHFPS0T2

SVE

1/1

COTATION : P120 (0006) + P200 (0017) + PHN 100 Archi/Désarchi.B/dem ext + PHN 100 Archivage/Désarchiv.Lame + 8*PHN 100 Bloc sup. pièce simple + 7*PHN 200 Immuno paraffine sup.

CENTRE HOSPITALIER REGIONAL ET UNIVERSITAIRE DE LILLE
SERVICE D'ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES

Professeur GOSSELIN

Pôle Biologie – Pathologie – Parc Eurasanté

Avenue Oscar Lambret – 59037 LILLE Cedex

Secrétariat : ☎ : 03.20.44.49.85 – Fax : 03.20.44.47.27 – Email : bgosselin@chru-lille.fr

Prescripteur : Pr PROYE

• 10 Lames Notées:
00 62 99 H

Monsieur le Professeur PROYE
CHIRURGIE A :
GENERALE ET ENDOCRINIENNE
HOPITAL HURIEZ - 3eme EST

Monsieur **GEV** **P**

Prélèvement reçu le 07/09/2000 n°**H0006299**

Né le 26/12/1961

COPIE INTERNE 19/01/2011

Renseignements cliniques : patient âgé de 39 ans.

Glucagonome

PANCREATECTOMIE

La pièce de pancréatectomie remise à l'examen comporte une portion de parenchyme pancréatique caudal mesurant 6 x 3,5 x 2 cm avec une tumeur arrondie, mesurant 5 x 5 cm et dont le contenu apparaît hémorragique. La tumeur arrive macroscopiquement à 5 mm de la recoupe la plus proche. Une congélation ainsi qu'une fixation par la glutaraldéhyde sont effectuées sur la tumeur et le pancréas sain.

De multiples prélèvements sont effectués sur la tumeur (G à O), sur la recoupe pancréatique du côté de la tumeur (lame B), sur le parenchyme pancréatique caudal à distance de la tumeur (E et F), ainsi que sur l'extrémité pancréatique opposée à la tumeur (C et D).

Les différents prélèvements effectués sur la tumeur repérée macroscopiquement (G à O) montrent une prolifération tumorale limitée en périphérie par une capsule collagène. Cette prolifération tumorale présente un centre kystique. Plus en périphérie on observe une tumeur d'architecture trabéculaire et cordonnale avec parfois quelques formations micro et macro-acineuses. Les cellules tumorales sont de taille moyenne. Elles présentent un cytoplasme modérément abondant éosinophile. Les noyaux sont arrondis, ou le plus souvent allongés. Ces noyaux présentent un petit nucléole. Il n'est pas observé d'activité mitotique anormale. Le stroma tumoral est de type capillaire endocrine avec quelques lymphocytes matures. On observe parfois quelques travées de cellules tumorales interposées dans l'épaisseur de la capsule lésionnelle. Absence d'embolie vasculaire.

L'étude immunohistochimique effectuée sur cette tumeur montre une positivité pour les anticorps anti chromogranine A, anti NSE et anti synaptophysine. Il existe par ailleurs une positivité immunohistochimique pour l'anticorps anti glucagon, observée sur 20 % des cellules tumorales, ainsi qu'une positivité pour l'anticorps anti sérotonine également observée sur environ 20 % des cellules tumorales. Les anticorps anti insuline, anti somatostatine, anti polypeptide pancréatique, anti VIP et anti gastrine sont négatifs.

Sur certains prélèvements effectués sur la tumeur repérée macroscopiquement, on observe au sein du parenchyme pancréatique péri-tumoral, la présence de plusieurs micro-tumeurs (lame H une micro tumeur de 1 mm, lame I trois micro-tumeurs millimétriques, lame J deux micro-tumeurs mesurant 1 mm, lame K une micro-tumeur de 1 mm, lame L une micro-tumeur de 1 mm). L'une de ces micro-tumeur est étudiée sur le plan immunohistochimique (lame L). On observe à ce niveau une positivité

ADICAP : OHFPS4Y0, OHFPS7V0, OHEI6703

ADU

1/2

COTATION : P200 (0017) + P220 (0008) + PHN 100 Archi/Désarchi.B/dem ext + PHN 100 Archivage/Désarchiv.Lame + 3*PHN10 + 19*PHN100 + 22*PHN200 + 14*PHN50

Prescripteur : Pr PATTOU

Correspondant(s) : TUMOROTHEQUE

Monsieur le Professeur PATTOU
CHIR GENERALE ENDOCRINIENNE
3e Est
HOPITAL HURIEZ

• 20 Lames

Madame PR [REDACTED]
Epouse T [REDACTED]
Née le 18/04/1948
Age : 58 ans

Prélèvement reçu le 31/08/2006 n°C0621334

SOMATOSTATINE COPIE INTERNE 19/01/2011

Renseignements cliniques : lésion pancréatique de 57 x 42 mm d'allure neuro-endocrine avec lésion d'allure secondaire hépatique diffuse disséminée dans les deux lobes ainsi que des lésions pulmonaires droites de 22 mm d'allure secondaire.

PIECE DE SPLENOPANCREATECTOMIE CAUDALE

La pièce opératoire d'un poids de 296 g comporte une rate de 12 x 8 x 7 cm, une queue de pancréas de 7 cm de grand axe avec une recoupe pancréatique de 3 cm. A l'examen macroscopique on repère une tumeur de 4,3 x 4,4 x 4 cm d'aspect blanchâtre ferme au sein de la queue du pancréas. La tumeur siège à 2,8 cm de la recoupe pancréatique.

Des prélèvements ont été prélevés et congelés dans le cadre de la tumorothèque.

A l'examen microscopique on met en évidence une prolifération tumorale d'aspect plurinodulaire de nature endocrine sous la forme d'îlots et de travées serpentineuses. Les cellules sont cubo-cylindriques. Elles présentent un cytoplasme éosinophile ou plus pâle, granuleux et un noyau ovalaire avec une chromatine un peu hétérogène ponctuée d'un ou deux petits nucléoles. On compte au maximum une figure de mitose pour 10 champs au fort grandissement. Le stroma est grêle richement vascularisé de type endocrine. On n'observe pas de remaniement nécrotique. Dans certains secteurs il existe des remaniements hémorragiques voire des plages fibro-hyalines. La tumeur est responsable d'engainements péri nerveux. Quelques embolus tumoraux endo vasculaires sont notés. Dans certains secteurs la tumeur infiltre la graisse péri pancréatique. Elle reste néanmoins à distance des marges d'exérèse. La recoupe pancréatique est saine. Le pancréas à distance présente une lobulation conservée avec par endroits des îlots langerhansiens hyperplasiques.

La dissection de la pièce opératoire a permis la mise en évidence de 14 ganglions lymphatiques dont deux sont le siège d'un envahissement métastatique minime à massif.

La rate est sans particularité.

En immunohistochimie, les cellules tumorales sont positives pour les anticorps anti chromogranine A et anti somatostatine. Les marquages à l'aide des anticorps dirigés contre l'insuline, le glucagon, le polypeptide pancréatique et la sérotonine sont négatifs. Environ 5% des noyaux cellulaires sont marqués par le MIB-1.