

Mémoire de Maîtrise en médecine No 1724

« Rôle et variations de l'expression de la superfamille des protéines IGFBP par les cellules bêta des îlots pancréatiques, notamment en cas d'atteinte pancréatique comme celle induite par le diabète »

Etudiant

Cyril Neftel

Tuteur

Prof. Bernard Thorens
Centre Intégréatif de Génomique (CIG), UNIL

Expert

Prof. Romano Regazzi
Département des neurosciences fondamentales, UNIL

Lausanne, le 15 décembre 2014

Introduction:

L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules bêta des îlots pancréatiques, qui joue un rôle majeur dans le métabolisme du glucose, notamment en régulant l'augmentation de la glycémie suite à la prise alimentaire. Sa sécrétion est principalement stimulée par l'augmentation du glucose dans le sang, qui joue un rôle direct sur les cellules bêta du pancréas.

En parallèle, les gluco-incrélines, GLP-1 et GIP, sécrétées par l'intestin en réponse à la prise alimentaire, jouent également un rôle important dans la sécrétion de l'insuline. Elles agissent en potentialisant l'effet du glucose sur la sécrétion de l'insuline par les cellules bêta pancréatiques, tout en favorisant leur prolifération et leur protection contre l'apoptose. Il a d'ailleurs été estimé qu'environ 50% de la sécrétion d'insuline en réponse à un repas était lié à l'effet des incrélines (M. Vially *et al.*, 2008).

Il a alors été montré que le rôle de GLP-1 sur la prolifération et la protection contre l'apoptose des cellules bêta du pancréas était en grande partie assuré par une boucle autocrine médiée par IGF2. En effet, GLP-1 stimule l'expression de récepteurs à IGF à la surface des cellules bêta et l'activation de ces récepteurs est assurée par une sécrétion autocrine d'IGF-2, sécrété en concomitance avec l'insuline dans les granules de sécrétion (M. Cornu *et al.*, 2009).

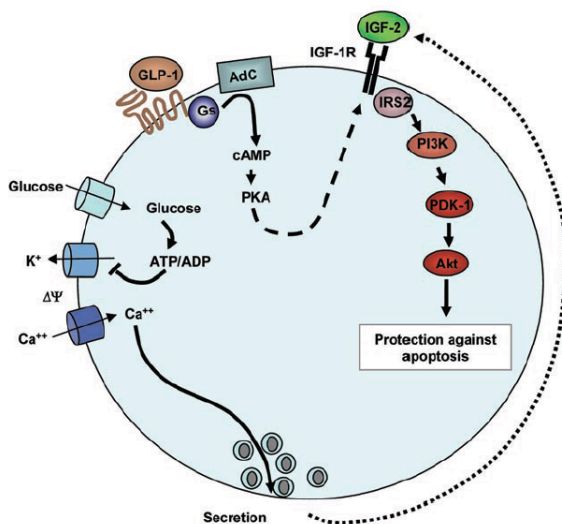


Schéma d'après Marion Cornu and Bernard Thorens, « GLP-1 protects beta-cells against apoptosis by enhancing the activity of an IGF-2/IGF1-receptor autocrine loop », *Islets* 1:3, 280-282; November/December 2009

Les IGF, plus précisément IGF-1 et IGF-2, sont des hormones principalement sécrétées par le foie qui influencent le métabolisme cellulaire via leur récepteur spécifique IGF1-R. Elles sont connues pour agir comme stimulateur de la croissance, de la prolifération et de la différenciation des cellules normales ainsi que des cellules malignes. La majeure partie des IGF circulantes dans le plasma se trouve lié à des protéines de liaison, au

nombre de 6, IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Protein) 1 à 6, qui augmentent leur stabilité et ainsi leur demi-vie mais diminuent également leur biodisponibilité. C'est ainsi que ces protéines IGFBP assurent une régulation de l'activité des IGF en régulant leur disponibilité pour leurs récepteurs spécifiques.

Pour finir, il a été montré que les protéines IGFBP pouvaient avoir une action intrinsèque, indépendante de l'IGF. Même si leur rôle est encore mal défini, certaines données ont montré l'existence d'une action intrinsèque, en particulier pour IGFBP3 et IGFBP5 (*Vivian HWA et al., 1999*).

Le but de mon travail consiste alors à étudier si les cellules bêta pancréatiques expriment elles-mêmes des protéines IGFBP, et si c'est le cas, d'essayer d'identifier les mécanismes qui régulent leur expression en imaginant que leur sécrétion pourrait soit jouer un rôle sur la voie de signalisation des gluco-incrétines et la boucle autocrine qu'elles induisent en agissant sur la biodisponibilité d'IGF-2, soit agir de manière intrinsèque indépendamment de l'IGF-2.

Pour cela, après avoir montré que les cellules bêta pancréatiques expriment des protéines IGFBP, nous étudierons l'effet des gluco-incrétines sur leur expression, puis les variations susceptibles d'être induites par les mécanismes responsables de la diminution de la masse cellulaire bêta observée dans les îlots pancréatiques des patients diabétiques.

Rappel des mécanismes responsables de la dysfonction et de la diminution des cellules bêta observées dans les îlots pancréatiques des patients diabétiques:

Dans le diabète de type 2, nous savons que la haute concentration de glucose dans le sang est responsable d'une inflammation chronique qui touche différents organes, dont le pancréas et les cellules bêta, mais également les reins et le foie. Cette toxicité est en partie à l'origine du développement de l'insulino-résistance et de la diminution de la masse cellulaire bêta que l'on retrouve chez les patients diabétiques.

Chez l'humain, il a été montré que les cytokines INF- γ , TNF- α et IL1- β étaient plus fortement exprimées chez les diabétiques, ce qui laisse supposer que ces cytokines pourraient être, au moins en partie, à l'origine de cette inflammation chronique. Cette observation a d'ailleurs inspiré le développement de nouvelles thérapies, aujourd'hui en phase 3, dont le rôle est de moduler la voie IL1 β - NF- κ B dans le but de diminuer l'inflammation responsable du développement de la dysfonction des cellules bêta observée dans le diabète de type 2 (*M.Y. Donath, 2013*).

En effet, l'inflammation induite au niveau du pancréas est responsable de changements inflammatoires que l'on retrouve dans les îlots pancréatiques des patients atteints d'un diabète de type 2, caractérisés par la présence de cytokines, de macrophages et de tissu fibrotique secondaire à une destruction tissulaire. Ces changements sont à l'origine d'une détérioration de la fonction des cellules bêta par une baisse de leur capacité de sécrétion d'insuline mais aussi par une diminution de leur prolifération et une augmentation de leur apoptose.

De plus, nous savons que l'obésité est l'un des facteurs de risque principal pour le développement d'un diabète de type 2. Une des explication est que le tissu adipeux

chez les patients obèses sécrète moins d'adipokines (cytokines spécifiques du tissu adipeux) anti-inflammatoires, telles que l'adiponectine, et plus d'adipokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et TNF- α (K. Eguchi et al., 2013). Pour finir, il a été montré que le relâchement d'acides gras libres dans la circulation, qui est plus important chez les patients obèses, pouvait également stimuler l'inflammation. Ceci nous laisse donc imaginer que l'obésité pourrait favoriser le développement d'un diabète de type 2, du moins en partie, par son effet pro-inflammatoire.

Plan et objectifs:

La première étape de mon travail sera de déterminer par PCR si les cellules bêta expriment les gènes des protéines IGFBP et si oui, d'identifier par PCR quantitative lesquelles sont les plus fortement exprimés.

En partant de l'hypothèse que si les cellules bêta sécrètent des protéines IGFBP, ces dernières pourraient jouer un rôle sur la biodisponibilité d'IGF-2 et donc moduler son activité dans la boucle autocrine qu'il induit, la deuxième étape sera d'essayer d'identifier si il existe des mécanismes régulateurs de l'expression des protéines IGFBP.

Comme nous savons que cette boucle autocrine est induite par les gluco-incrétines, nous étudierons tout d'abord si celles-ci jouent un rôle sur l'expression des protéines IGFBP, en imaginant qu'elles pourraient soit la stimuler comme mécanisme de régulation, soit l'inhiber pour augmenter l'action d'IGF-2. Pour ce faire, nous réaliserons des traitements in-vitro de cellules bêta en culture avec de l'exendine-4, un analogue des gluco-incrétines, pour étudier son effet sur l'expression des protéines IGFBP.

De plus, comme nous savons que cette boucle autocrine est responsable d'une stimulation de la prolifération des cellules bêta des îlots pancréatiques ainsi que d'une protection contre leur apoptose, l'étape suivante sera d'identifier si les mécanismes responsables de la diminution de la masse cellulaire bêta observée dans les îlots pancréatiques des patients diabétiques pouvaient agir sur l'expression des protéines IGFBP, dans le but de réguler la biodisponibilité d'IGF-2. Pour y répondre, nous évaluerons d'après ce qui a été dit précédemment, l'effet de l'incubation in-vitro de cellules bêta en culture avec des cytokines pro-inflammatoires sur l'expression des protéines IGFBP. A noter que l'incubation in-vitro avec des cytokines pro-inflammatoires représente un traitement aigu, contrairement aux conditions in vivo qui correspondent à un état chronique, mais il a déjà été montré in-vitro que l'incubation d'îlots pancréatiques avec des cytokines, dont l'IL1- β , stimulait la même voie de l'inflammation médiée par NF- κ B que l'on retrouve in-vivo dans les îlots pancréatiques des patients diabétiques (M.Y. Donath, 2013). Nous évaluerons également l'effet de l'incubation in-vitro de cellules bêta en culture avec des acides gras libres sur l'expression des protéines IGFBP, dans le but de mimer in-vitro la haute concentration d'acides gras libres que l'on retrouve in-vivo dans le sang des patients obèses, connue pour favoriser le développement du diabète de type 2. A noter qu'il a été démontré que le palmitate était un acide gras particulièrement néfaste pour les cellules bêta, induisant leur apoptose. Cependant, il a été observé qu'en condition aigu le palmitate pouvait stimuler la

sécrétion d'insuline avant de la diminuer lorsqu'il est incubé trop longtemps et qu'il devient alors toxique (S.C. Collins et al., 2008).

La dernière étape de mon travail sera d'étudier l'effet d'un « knock down » d'IGFBP sur la prolifération des cellules bêta des îlots pancréatiques. Selon une étude GWAS (Genome Wide Association Study) mené en endocrinologie sur des souris, il semblerait que les cellules bêta des îlots pancréatiques de souris diabétiques exprimeraient plus fortement IGFBP5 que celles de souris non diabétiques, ce pourquoi nous nous concentrerons pour ce travail sur la protéine IGFBP5. Pour son inhibition nous utiliserons un ARNsi spécifique pour IGFBP5 et la quantification de la prolifération sera assurée grâce au marquage par immunofluorescence de la protéine Ki67, qui est une protéine que l'on retrouve spécifiquement dans les cellules qui prolifèrent.

Matériel et méthodes:

-Culture cellulaire

Nous avons utilisé 2 lignées de cellules pancréatiques bêta, MIN6 et β Tc-Tet.

Les cellules MIN6 sont maintenues dans un milieu de culture DMEM (Gibco N° 31966) + 15% FBS (Fetal Bovine Serum, FBS Euroclone N° ECS 0180L) + Sodium-Pyruvate (Gibco N° 11360) 1mM + Glutamine (Sigma G 7513) 2mM + β -Mercaptoethanol (Gibco N° 31350-010) 80uM

Les cellules β Tc-Tet sont maintenues dans un milieu de culture DMEM (Gibco N° 31966) + 15% Horse sérum (HS Amimed N°2-05F00) + 2,5% FBS + Hepes (Sigma H-0087) 10 mM + Sodium-Pyruvate 1 mM.

-Amorces

Les séquences des amorces pour l'analyse par PCR des IGFBP 1 et 3 sont celles décrites dans l'article « A quantitative RT-PCR study of the mRNA expression profile of the IGF axis during mammary gland development » - M. Boutinaud, J. H. Shand, M. A. Park, K. Phillips, J. Beattie, D. J. Flint and G. J. Allan - Journal of Molecular Endocrinology (2004) 33, 195–207, Society for Endocrinology.

La séquence des autres amorces a été établie grâce au programme NCBI/ Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

	FORWARD	REVERSE
IGFBP1	5'-CCGCCACGAGCACCTTGTTCA-3'	5'-TGTTGGGCTGCAGCTAATCTCT-3'
IGFBP2	5'-GCCGGTACAACCTTAAGCAG-3'	5'-CCTCCATTCTGCTGGTGTT-3'
IGFBP3	5'-AACATCAGTGAGTCCGAGG-3'	5'-AACTTTGTAGCGCTGGCTG-3'
IGFBP4	5'-CGGAGCTGTCCGAAATCGAA-3'	5'-AAGAGGTCTTCGTGGGTACG-3'
IGFBP5	5'-AAAGAGCTACGGCGAGCAA-3'	5'-TCTGCGGTCCTTCTCACAG-3'
IGFBP6	5'-GGTCTACAGCCCTAAGTGCG-3'	5'-CCGGTCTCTGGTTTGTGT-3'

-Isolation et culture d'îlots pancréatiques

Souris de type sauvage C57Bl6 entre 10 et 12 semaines.

Extraction des îlots par injection de collagénase dans le canal pancréatique avant d'exciser le pancréas et de finir la digestion en transférant le pancréas dans un tube contenant de la collagénase. Après digestion les îlots sont prélevés avec une pipette sous la loupe binoculaire et transférés dans du milieu de culture.

La culture des îlots se fait en suspension dans du milieu RPMI 1640 avec Glucose 11,1M (Gibco N° 31870-025) auquel on ajoute du FBS 10%, du Glutamax (Gibco N° 35050-038) 1% et de la Penicillin/Streptomycine (Gibco N° 15140-122).

Environ 50-70 îlots par plaque.

-Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN des cellules MIN6 et β Tc-Tet (10^6 à 10^8 cellules) est effectuée en utilisant le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen Cat. N° 74104).

Extraction d'ARN des îlots pancréatiques ($< 5 \cdot 10^5$ cellules) grâce au kit RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen Cat. N° 74034).

-Transcription inverse pour LightCycler

Après dénaturation de 2 μ g d'ARN dans 11 μ L d'H₂O, la réaction de transcription inverse est obtenue grâce à un mélange à base de 5X First-Strand Buffer, 0.1 M DTT, Random Hexamers (Invitrogen 8080127) et un mix de nucléotides A,C,G et T et l'utilisation du réactif SuperScript 2 Reverse Transcriptase (Invitrogen 18064-014) et RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega N211A).

-Analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative

Amplification grâce au programme standard SYBR® Green Real-Time PCR sur l'appareil 7500 Fast Real-Time PCR System. Mix de 10 μ L pour chaque échantillon avec 5 μ L du réactif SYBR Green Master Mix (Invitrogen 4385612), 0,5 μ L des amorces Forward et Reverse du gène à amplifier et 2 μ L d'H₂O.

Toutes nos Q-PCR ont été normalisées par rapport à l'expression de la protéine β -actine (sauf exception précisée dans le texte) et ont été réalisées avec des dupli- ou triplicata pour chaque échantillon.

-Knock down d'IGFBP5 par un siRNA spécifique

Nous avons commandé un « stealth siRNA » de souris, spécifique pour IGFBP5, auprès de la compagnie Life Technologies (siRNA ID MSS275047)

-Transfection inverse de cellules β Tc-Tet

Nous avons réalisé la transfection sur des plaques de 6 puits (Corning Costar cell culture plates, SIGMA/CLS3506) avec transfection dans chaque puits d'un million de cellules libres.

Notre protocole consiste à incuber pendant 20 minutes à température ambiante 500 μ L de serum free medium DMEM (Gibco N° 31966) avec 100pmol de siRNA et 7 μ L de Lipofectamine 2000 (Invitrogen N° 11668-027) avant d'ajouter un million de cellules en suspension dans 2,5 mL de medium complet pour cellules β Tc-Tet.

L'incubation totale est de 72 heures avec changement de milieu à 8h et 48h après la transfection.

-Immunofluorescence avec Ki67

Protocole standard d'immunofluorescence sur cellules en culture.

L'immunofluorescence est réalisée sur des cellules en culture sur des lamelles de verre préalablement préparées avec de la poly-L-lysine (dilution 1:10 dans de l'eau).

La fixation cellulaire est assurée grâce à l'utilisation d'une solution de Paraformaldéhyde 3% avec 0.1M de NaPi.

Le marquage immunologique est assurée grâce à l'utilisation d'un Anticorps anti-Ki67 comme premier Anticorps (Ki67 étant un marqueur de la prolifération, présent au niveau des noyaux des cellules qui prolifèrent) et un Anticorps IgG (H+L) Alexa Fluor 488 de chèvre anti-lapin (Lifetechnologies N° A11008) comme deuxième Anticorps pour la fluorescence.

Le comptage des cellules a été réalisé grâce au programme ITCN (Image-based Tool for Counting Nuclei) sur ImageJ.

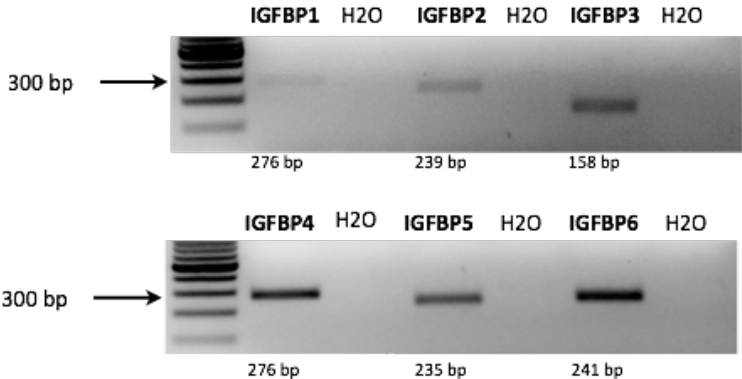
Expériences et résultats:

Expression des protéines IGFBP par les cellules bêta des îlots pancréatiques:

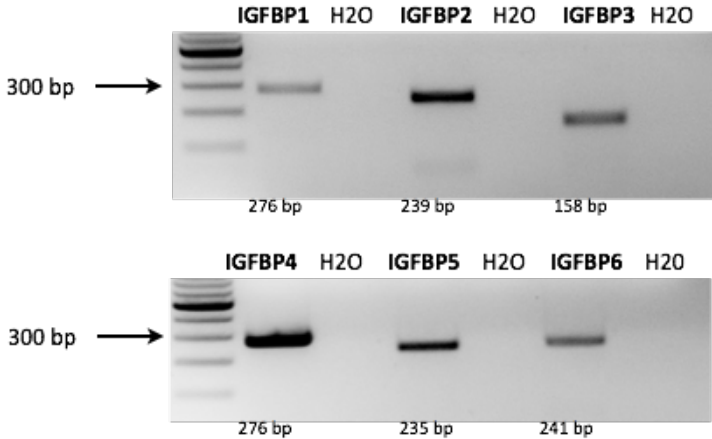
Avant de pouvoir réaliser nos PCR pour étudier l'expression des protéines IGFBP, nous avons tout d'abord dû nous assurer de l'efficacité de nos amorces. Nous avons donc réalisé des PCR quantitatives à partir d'échantillons à différentes dilutions (6 échantillons avec 1^{ère} dilution à 0,05ug/uL puis dilution à 1/3 -> 1/3 -> ... -> 1/3) qui nous ont permis d'obtenir pour chaque amorce une « melt curve », pour nous assurer que l'amorce était bien spécifique pour le gène d'intérêt, et une « standard curve », pour vérifier son efficacité. C'est ainsi que nous avons sélectionné les amorces qui apparaissent dans le tableau ci-dessus.

Ensuite, nous avons réalisé une électrophorèse sur gel d'agarose après amplification par RT-PCR des 6 protéines IGFBP, à partir de l'ADN de cellules MIN6 et β Tc-Tet, ainsi que, directement, de l'ADN d'îlots extraits de souris C57Bl6.

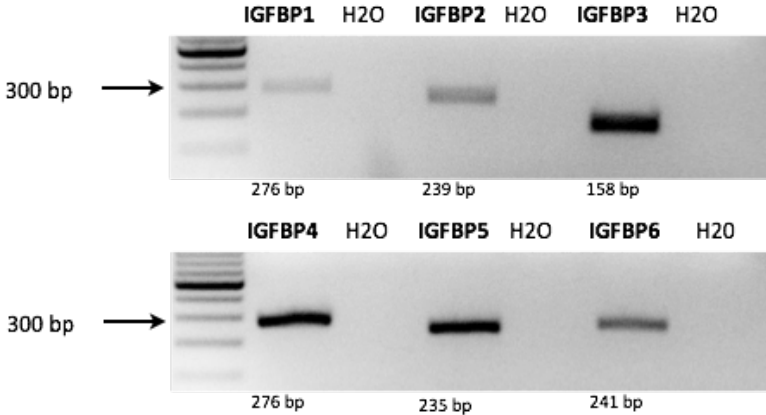
Expression of IGFBP family members in **Min6B1** cell line
(by RT-PCR)



Expression of IGFBP family members in **BTCTET** cell line
(by RT-PCR)



Expression of IGFBP family members in **islets**
(by RT-PCR)



Graphique 1 – Electrophorèse après amplification par PCR des 6 protéines IGFBP à partir de l'ARN extrait de cellules MIN6, β Tc-Tet et îlots pancréatiques de souris

C'est ainsi que nous pouvons voir, d'après ces images, que les différentes protéines de la superfamille des IGFBP semblent être exprimées dans les 2 lignées cellulaires étudiées ainsi que dans les îlots extraits de souris, avec des signaux d'intensité différente.

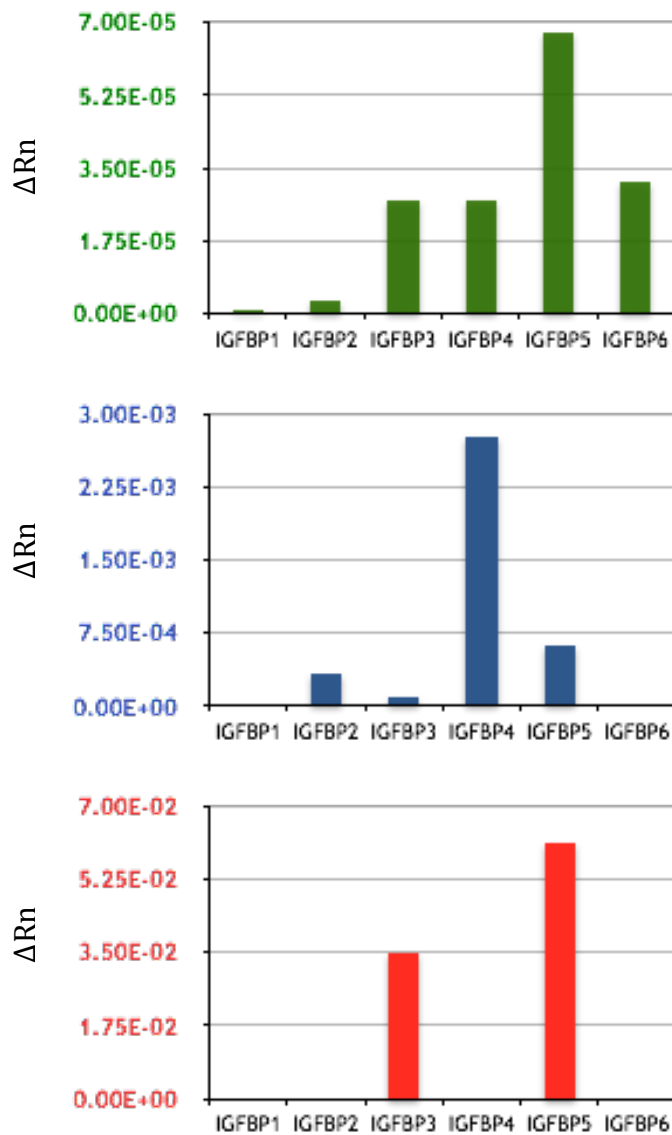
Nous avons donc décidé de réaliser des PCR quantitatives pour quantifier leur niveau d'expression (celles-ci ont été normalisées par rapport à l'expression de l'ARNm de GAPDH).

A noter que les valeurs représentent une quantification relative de l'expression de l'ARNm du gène d'intérêt par rapport à l'expression de l'ARNm d'un gène de référence (GAPDH ou B-actine). Ceux-ci ont été obtenus d'après la formule $2^{-\Delta Ct}$ dans laquelle ΔCt représente la différence entre le Ct (Cycle threshold) du gène de référence et le Ct du gène d'intérêt.

	MIN6B1	β TC-TET	ISLETS
IGFBP1	5.96E-07	3.21E-06	
IGFBP2	3.37E-06	3.41E-04	7.84E-06
IGFBP3	2.71E-05	9.17E-05	3.51E-02
IGFBP4	2.70E-05	2.77E-03	2.59E-04
IGFBP5	6.76E-05	6.32E-04	6.10E-02
IGFBP6	3.14E-05	1.59E-05	2.12E-05

Expression relative de l'ARNm des différentes protéines IGFBP par rapport à l'expression de l'ARNm de GAPDH (ΔRn)

ATTENTION : PAS A LA MEME ECHELLE



Graphique 2 – PCR quantitative pour quantifier les niveaux d'expression des ARNm des différentes protéines IGFBP dans les cellules MIN6, β Tc-Tet et îlots pancréatiques de souris.

Après avoir eu la confirmation que l'ARN des protéines IGFBP était bien exprimé dans les cellules bêta, nous pouvons déduire de ces premiers résultats que les niveaux d'expression des ARNm des différentes protéines IGFBP sont très différents entre les 3 types de cellules étudiées (MIN6, β Tc-Tet et îlots pancréatiques extraits de souris).

En effet, nous pouvons constater que l'expression des protéines IGFBP semble être beaucoup plus importante dans les îlots pancréatiques extraits de souris que dans les 2 modèles cellulaires étudiés, en particulier les MIN6, et que dans les îlots pancréatiques les ARNm pour IGFBP3 et IGFBP5 sont les plus fortement exprimées.

D'après ces résultats, nous avons donc décidé de garder les cellules β Tc-Tet comme modèle d'étude, qui expriment plus fortement les ARNm des différentes protéines que les cellules MIN6, et de nous concentrer sur IGFBP3 et IGFBP5.

Effet des gluco-incrétones sur l'expression des protéines IGFBP et variations de leur expression en cas d'atteinte pancréatique:

Nous avons ensuite expérimenté différents traitements in vitro sur des cellules β Tc-Tet en culture, dans le but de voir si ceux-ci pouvaient avoir un effet sur l'expression d'IGFBP3 et IGFBP5.

Le premier traitement cellulaire que nous avons réalisé a été l'incubation de cellules β Tc-Tet avec de l'acide palmitique et de l'acide oléique à différentes concentrations et avec deux temps différents de traitement.

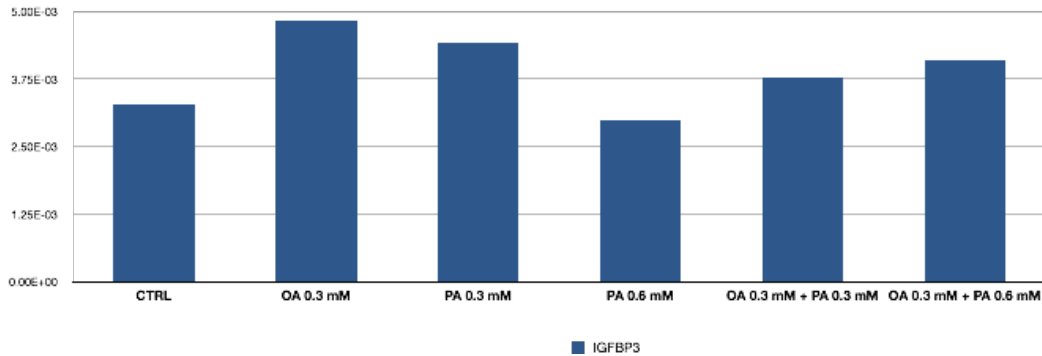
Comme c'est le cas pour toutes les expériences qui suivent, nous avons quantifié les niveaux d'expression des ARNm d'IGFBP3 et IGFBP5 par PCR quantitatives, normalisées par rapport à l'expression de l'ARNm de la β -actine.

TRAITEMENTS :	1	CTRL	7	CTRL
	2	OA 0.3 mM (6h)	8	OA 0.3 mM (24h)
	3	PA 0.3 mM (6h)	9	PA 0.3 mM (24h)
	4	PA 0.6 mM (6h)	10	PA 0.6 mM (24h)
	5	OA 0.3 mM + PA 0.3 mM (6h)	11	OA 0.3 mM + PA 0.3 mM (24h)
	6	OA 0.3 mM + PA 0.6 mM (6h)	12	OA 0.3 mM + PA 0.6 mM (24h)

Traitement cellules β Tc-Tet avec Acide Palmitique et Acide Oléique pendant 6heures

	CTRL	OA 0.3 mM	PA 0.3 mM	PA 0.6 mM	OA 0.3 mM + PA 0.3 mM	OA 0.3 mM + PA 0.6 mM
IGFBP3	3.27E-03	4.83E-03	4.41E-03	2.99E-03	3.77E-03	4.10E-03

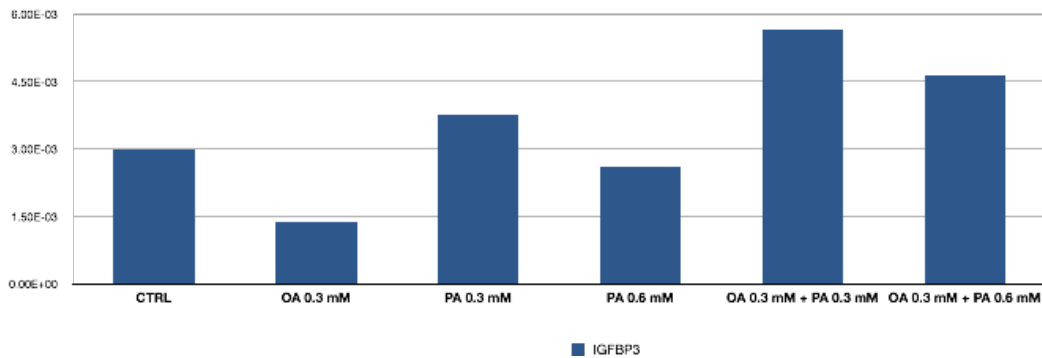
Traduction IGFBP3 dans cellules β Tc-Tet 1 à 6 (avec ttt 6h)



Traitement cellules β Tc-Tet avec Acide Palmitique et Acide Oléique pendant 24heures

	CTRL	OA 0.3 mM	PA 0.3 mM	PA 0.6 mM	OA 0.3 mM + PA 0.3 mM	OA 0.3 mM + PA 0.6 mM
IGFBP3	3.00E-03	1.37E-03	3.75E-03	2.60E-03	5.65E-03	4.64E-03

Traduction IGFBP3 dans cellules β Tc-Tet 7 à 12 (avec ttt 24h)



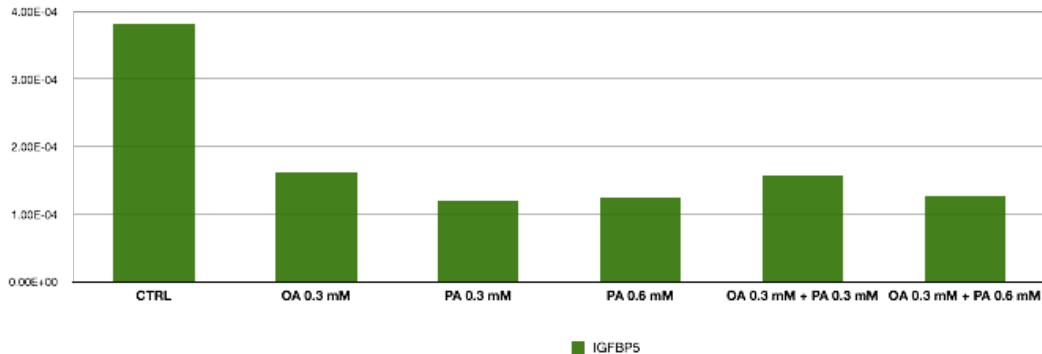
Graphique 3 – PCR quantitatives, à partir de l'ARN extrait de cellules β Tc-Tet traitées avec de l'acide palmitique et oléique à différentes concentrations, pour étudier l'effet des acides gras sur l'expression de l'ARNm d'IGFBP3

D'après ces résultats, il semble difficile d'interpréter l'effet que l'acide oléique et l'acide palmitique pourraient avoir sur l'expression d'IGFBP3, étant donné que les résultats sont très aléatoires.

Traitement cellules β Tc-Tet avec Acide Palmitique et Acide Oléique pendant 6heures

	CTRL	OA 0.3 mM	PA 0.3 mM	PA 0.6 mM	OA 0.3 mM + PA 0.3 mM	OA 0.3 mM + PA 0.6 mM
IGFBP5	3.82E-04	1.61E-04	1.20E-04	1.23E-04	1.57E-04	1.26E-04

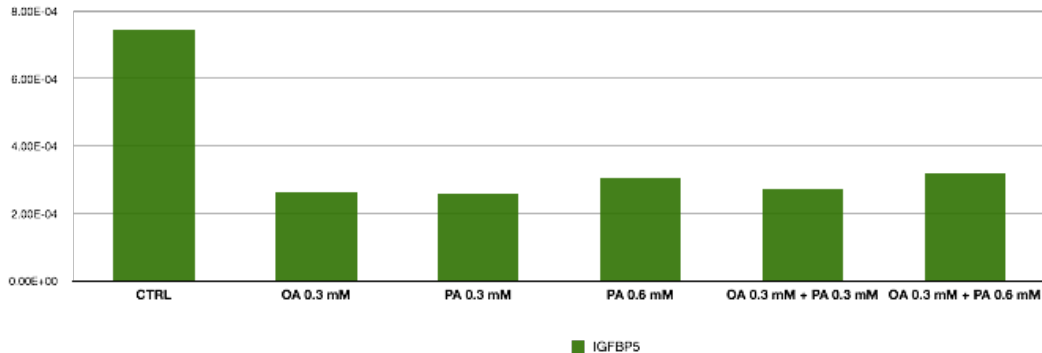
Traduction IGFBP5 dans cellules β Tc-Tet 1 à 6 (avec ttt 6h)



Traitement cellules β Tc-Tet avec Acide Palmitique et Acide Oléique pendant 24heures

	CTRL	OA 0.3 mM	PA 0.3 mM	PA 0.6 mM	OA 0.3 mM + PA 0.3 mM	OA 0.3 mM + PA 0.6 mM
IGFBP5	7.46E-04	2.62E-04	2.58E-04	3.05E-04	2.71E-04	3.19E-04

Traduction IGFBP5 dans cellules β Tc-Tet 7 à 12 (avec ttt 24h)



Graphique 4 – PCR quantitatives, à partir de l'ARN extrait de cellules β Tc-Tet traitées avec de l'acide palmitique et oléique à différentes concentrations, pour étudier l'effet des acides gras sur l'expression de l'ARNm d'IGFBP5

En revanche, il semble que l'acide oléique et l'acide palmitique jouent un rôle important sur l'expression d'IGFBP5 puisqu'on observe une nette diminution de l'expression de ses ARNm en leur présence.

L'étape suivante de mon travail a été de simuler le même type de traitements directement sur des îlots pancréatiques extraits de souris, conservés en culture.

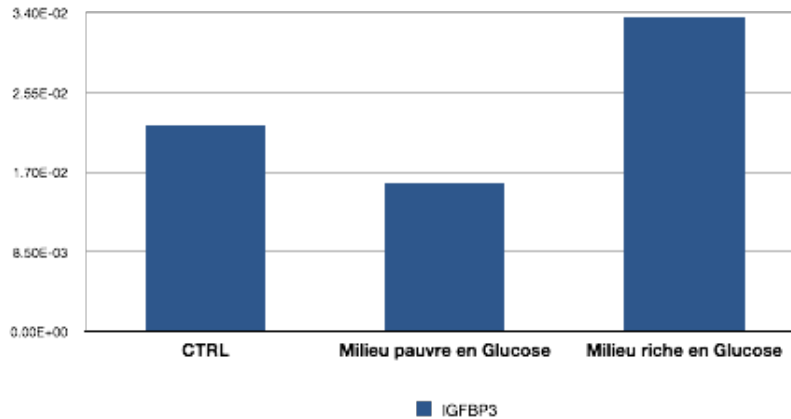
Comme nous savons que le glucose stimule la sécrétion d'insuline et donc potentiellement aussi la sécrétion d'IGF-2 et l'activation de la boucle autocrine qui en découle, nous avons tout d'abord voulu étudier l'effet que la concentration de glucose avait sur l'expression d'IGFBP3 et IGFBP5. Notre réflexion était basée sur l'idée qu'une augmentation de l'activité de la boucle autocrine médiée par IGF-2 pouvait nécessiter un mécanisme de régulation assuré par l'augmentation de l'expression d'IGFBP.

TRAITEMENTS :	1	CTRL avec RPMI Normal (11,1 mM de glucose)
	2	RPMI bas glucose (2,8mM de glucose)
	3	RPMI haut glucose (25 mM de glucose)

Traitements avec basse et haute concentration de Glucose

	CTRL	Milieu pauvre en Glucose	Milieu riche en Glucose
IGFBP3	2.20E-02	1.59E-02	3.36E-02

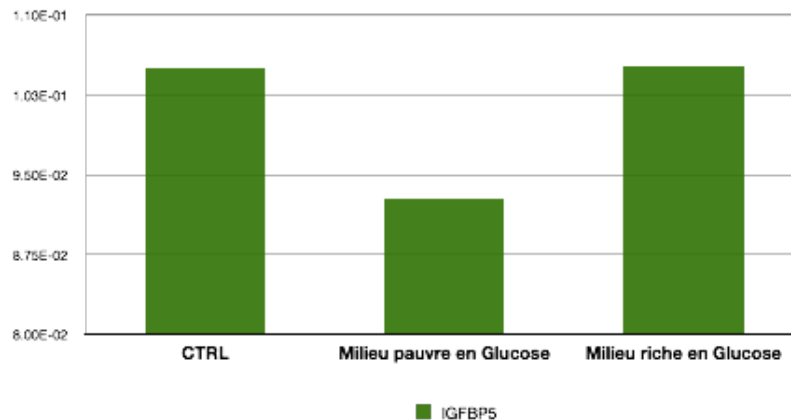
Traduction IGFBP3 dans les îlots pancréatiques selon la concentration de Glucose



Traitements avec basse et haute concentration de Glucose

	CTRL	Milieu pauvre en Glucose	Milieu riche en Glucose
IGFBP5	1.05E-01	9.28E-02	1.05E-01

Traduction IGFBP5 dans les îlots pancréatiques selon la concentration de Glucose



Graphique 5 – PCR quantitatives, à partir de l'ARN extrait d'îlots pancréatiques de souris conservés en culture dans du milieu avec différentes concentrations de glucose, pour étudier l'effet du glucose sur la traduction d'IGFBP3 et IGFBP5

Comme nous l'avions imaginé, le glucose stimule l'expression d'IGFBP3 et IGFBP5. En effet, comme nous pouvons le voir sur les graphiques, les niveaux d'expression des ARNm d'IGFBP3 et IGFBP5 sont diminués en présence d'une basse concentration de

glucose (2,8 mM) alors qu'ils sont augmentés en présence d'une haute concentration de glucose (25 mM).

Ainsi, l'idée serait que la sécrétion d'insuline, associée à la sécrétion d'IGF-2, stimulerait la boucle autocrine médiée par IGF-2 qui en découle, dont un mécanisme de régulation pourrait être assuré par l'augmentation de l'expression d'IGFBP.

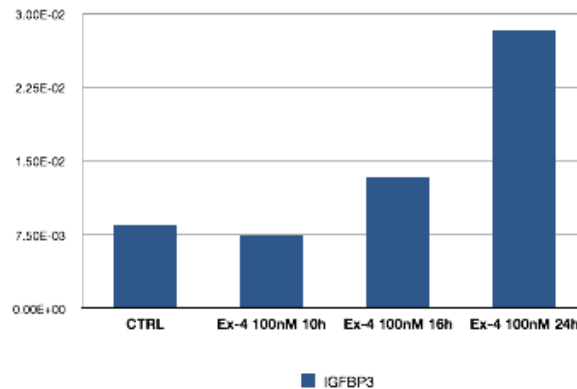
Comme dit précédemment, les gluco-incrélines potentialisent la sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques en réponse au glucose, mais sont également responsables d'une stimulation de leur prolifération et d'une protection contre leur apoptose, notamment grâce à la boucle autocrine médiée par IGF-2 qu'elles activent. L'exendine-4 étant un analogue de GLP-1, nous avons décidé d'incuber in-vitro des îlots pancréatiques extraits de souris avec cette molécule, dans le but de voir si cette stimulation avait le même effet qu'une haute concentration de glucose sur l'expression d'IGFBP, puisque nous savons que les gluco-incrélines potentialisent la sécrétion d'insuline, et donc également celle d'IGF-2 (*S. Klinger et al., 2008*).

TRAITEMENTS :	1	CTRL
	2	Exendine-4 100nM 10h
	3	Exendine-4 100nM 16h
	4	Exendine-4 100nM 24h

Traitements avec Exendine-4

	CTRL	Ex-4 100nM 10h	Ex-4 100nM 16h	Ex-4 100nM 24h
IGFBP3	8.59E-03	7.51E-03	1.34E-02	2.83E-02

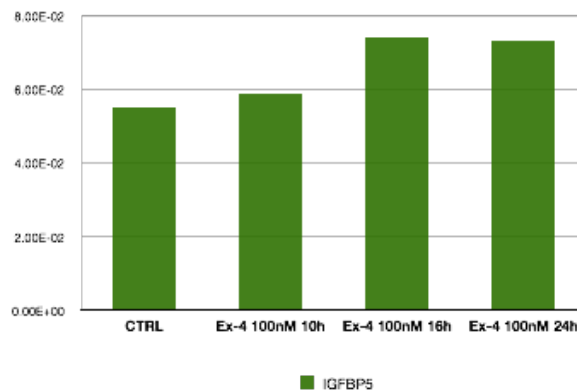
Traduction IGFBP3 dans îlots pancréatiques traités avec Ex-4



Traitements avec Exendine-4

	CTRL	Ex-4 100nM 10h	Ex-4 100nM 16h	Ex-4 100nM 24h
IGFBP5	5.53E-02	5.88E-02	7.41E-02	7.34E-02

Traduction IGFBP5 dans îlots pancréatiques traités avec Ex-4

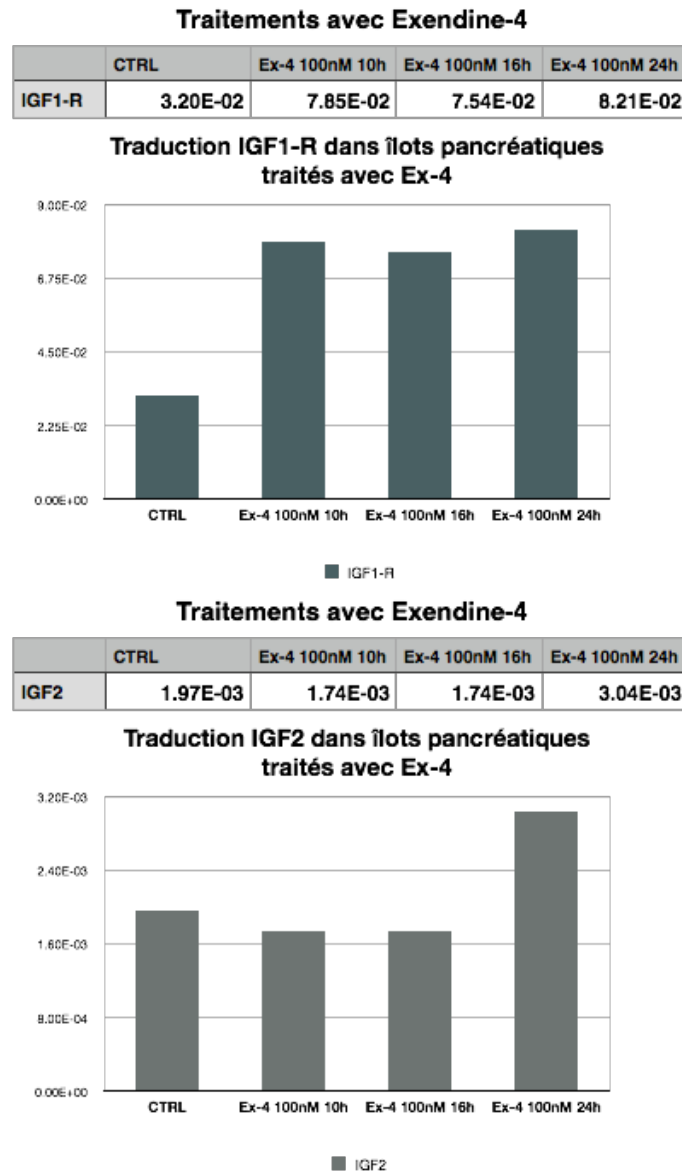


Graphique 6 – PCR quantitatives, à partir de l'ARN extrait d'îlots pancréatiques de souris conservés en culture avec de l'exendine-4, pour étudier l'effet des gluco-incrélines sur l'expression des ARNm d'IGFBP3 et IGFBP5

D'après nos résultats, il semble que l'exendine-4 ait un effet stimulateur sur l'expression d'IGFBP3. Ceci appuie donc notre hypothèse que l'expression d'IGFBP pourrait être stimulée en réponse à la sécrétion d'IGF-2 comme mécanisme de contrôle, pour réguler sa biodisponibilité et ainsi son activité dans la boucle autocrine qu'il induit.

En revanche, cette observation est moins flagrante pour IGFBP5 dont l'expression semble être moins influencée par l'exendine-4.

Pour mieux pouvoir faire le lien entre la voie de signalisation induite par l'exendine-4 et la boucle autocrine médiée par IGF-2, nous avons décidé, à partir de l'ARN des mêmes îlots, d'étudier l'effet de l'exendine-4 sur l'expression des ARNm d'IGF1-R et d'IGF-2, deux médiateurs de la cascade de signalisation induite par les gluco-incrélines et directement impliqués dans cette boucle autocrine.



Graphique 7 – PCR quantitatives, à partir de l'ARN extrait d'îlots pancréatiques de souris conservés en culture avec de l'exendine-4, pour étudier l'effet des gluco-incrélines sur l'expression des ARNm d'IGF1-R et IGF-2

Nous pouvons constater, comme attendu, que l'exendine-4 semble stimuler l'expression d'IGF1R et, plus tardivement, également celle d'IGF-2.

C'est ainsi que nous pouvons faire le lien entre la stimulation de l'expression d'IGFBP3 et l'augmentation de l'expression d'IGF1-R et d'IGF-2, et donc de l'activité de la boucle autocrine qui en découle.

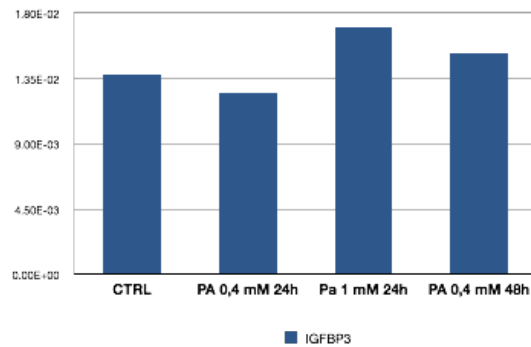
Nous avons ensuite reproduit sur des îlots pancréatiques extraits de souris, les traitements que nous avons réalisé sur les cellules β Tc-Tet, dans le but de confirmer ce que nous avons observé.

TRAITEMENTS :	1	CTRL
	2	PA 0.4 mM (24h)
	3	PA 1 mM (24h)
	4	PA 0.4 mM (48h)

Traitements avec Acide Palmitique

	CTRL	PA 0,4 mM 24h	Pa 1 mM 24h	PA 0,4 mM 48h
IGFBP3	1.38E-02	1.25E-02	1.70E-02	1.53E-02

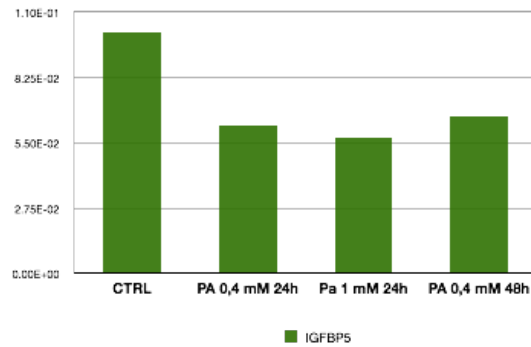
Traduction IGFBP3 dans îlots pancréatiques traités avec Acide Palmitique



Traitements avec Acide Palmitique

	CTRL	PA 0,4 mM 24h	Pa 1 mM 24h	PA 0,4 mM 48h
IGFBP5	1.01E-01	6.24E-02	5.74E-02	6.62E-02

Traduction IGFBP5 dans îlots pancréatiques traités avec Acide Palmitique



Graphique 8 – PCR quantitatives, à partir de l'ARN extrait d'îlots pancréatiques de souris conservés en culture avec de l'acide palmitique, pour étudier l'effet des acides gras sur la traduction d'IGFBP3 et IGFBP5

Nous pouvons faire les mêmes observations sur ces îlots pancréatiques que sur les cellules β Tc-Tet, c'est-à-dire que l'acide palmitique n'aurait pas d'effet défini sur l'expression d'IGFBP3 alors qu'il semblerait diminuer de manière importante l'expression d'IGFBP5.

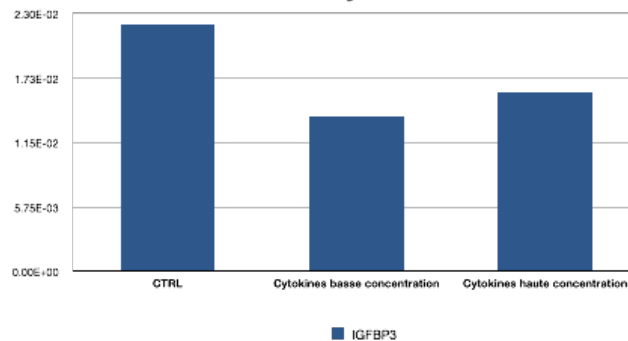
Par la suite, nous avons décidé de traiter in-vitro des îlots pancréatiques extraits de souris avec des cytokines inflammatoires (IFN- γ , TNF- α et IL1- β) à différentes concentrations, toujours dans le but d'essayer de reproduire l'état inflammatoire observé chez les diabétiques.

TRAITEMENTS :	1	CTRL
	2	Cytokines basse concentration (IFNγ 2ng/mL, TNFa 5ng/mL, IL-1b 2ng/mL)
	3	Cytokines haute concentration (IFNγ 10ng/mL, TNFa 25ng/mL, IL-1b 10ng/mL)

Traitements avec Cytokines (IFN- γ , TNF- α et IL1- β)

	CTRL	Cytokines basse concentration	Cytokines haute concentration
IGFBP3	2.20E-02	1.39E-02	1.59E-02

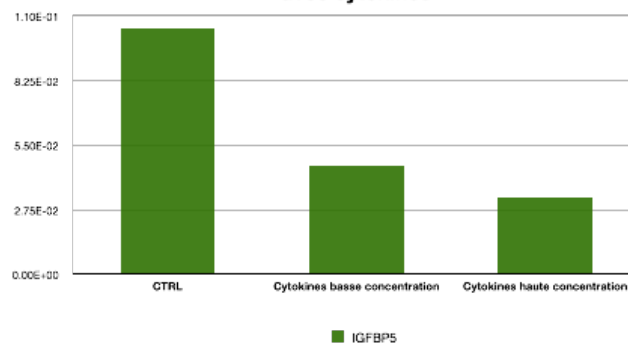
Traduction IGFBP3 dans îlots pancréatiques traités avec cytokines



Traitements avec Cytokines (IFN- γ , TNF- α et IL1- β)

	CTRL	Cytokines basse concentration	Cytokines haute concentration
IGFBP5	1.05E-01	4.65E-02	3.27E-02

Traduction IGFBP5 dans îlots pancréatiques traités avec cytokines



Graphique 9 – PCR quantitatives, à partir de l'ARN extrait d'îlots pancréatiques de souris conservés en culture avec des cytokines pro-inflammatoires, pour étudier l'effet de l'inflammation sur la traduction d'IGFBP3 et IGFBP5

D'après ces résultats, nous observons que l'expression des ARNm d'IGFBP3 et d'IGFBP5 est diminuée en présence de cytokines. Ceci est d'autant plus flagrant pour les ARNm d'IGFBP5 dont l'expression est divisée par 3 en présence d'une haute concentration de cytokines.

Ceci nous laisse donc imaginer, comme avec les résultats que nous avons obtenus suite aux traitements réalisés avec des acides gras libres, que l'expression d'IGFBP3 et IGFBP5 pourrait être diminuée chez les patients diabétiques.

Notre hypothèse serait qu'une baisse de l'expression des protéines IGFBP par les cellules bêta pancréatiques pourrait être induite lorsque celles-ci sont soumises à une situation de stress, ceci afin d'augmenter la biodisponibilité d'IGF-2 et ainsi l'activité de la boucle autocrine qu'il induit puisque, comme dit précédemment, cette dernière assure une stimulation de la prolifération des cellules bêta ainsi qu'une protection contre leur apoptose.

Effet de la diminution de l'expression d'IGFBP par les cellules bêta pancréatiques sur leur prolifération:

La dernière étape de mon travail a été d'essayer de voir ce qu'un « knock down » d'IGFBP pouvait avoir comme effet sur la prolifération des cellules bêta pancréatiques. Comme dit précédemment, nous avons décidé de nous concentrer pour ce travail sur la protéine IGFBP5 et nous avons utilisé à un ARNsi spécifique pour IGFBP5 pour inhiber son expression.

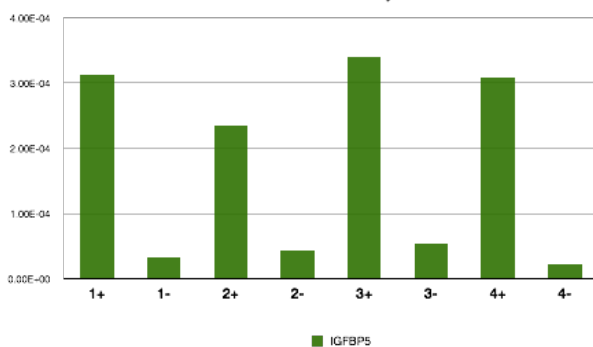
Nous avons tout d'abord dû vérifier l'efficacité de notre ARNsi. Pour cela, nous avons réalisé des PCR quantitatives pour quantifier le niveau d'expression des ARNm d'IGFBP5 avant et après transfection de cellules β Tc-Tet avec notre ARNsi.

	1	2	3	4
Expression IGFBP5 avant transfection (+)	3.13E-04	2.34E-04	3.39E-04	3.08E-04
Expression IGFBP5 après transfection (-)	3.22E-05	4.44E-05	5.30E-05	2.25E-05
Pourcentage de l'expression après la transfection	9.74 %	5.26 %	6.40 %	13.66 %

Transfection de cellules β Tc-Tet avec ARNsi pour IGFBP5

	1+	1-	2+	2-	3+	3-	4+	4-
IGFBP5	3.13E-04	3.22E-05	2.34E-04	4.44E-05	3.39E-04	5.30E-05	3.08E-04	2.25E-05

Traduction IGFBP5 dans cellules β Tc-Tet avant et après transfection avec ARNsi pour IGFBP5



Graphique 10 – PCR quantitatives, à partir de l'ARN extrait de cellules β Tc-Tet transfectées avec un ARNsi pour IGFBP5, pour étudier l'efficacité de notre ARNsi sur l'inhibition d'IGFBP5

D'après ces résultats, nous pouvons voir que l'inhibition d'IGFBP5 avec notre ARNsi est efficace puisque l'on mesure une diminution de l'expression des ARNm d'IGFBP5 après transfection d'environ 8 à 10 fois.

Ainsi, nous avons décidé d'étudier l'effet que cette inhibition pouvait avoir sur la prolifération des cellules β Tc-Tet.

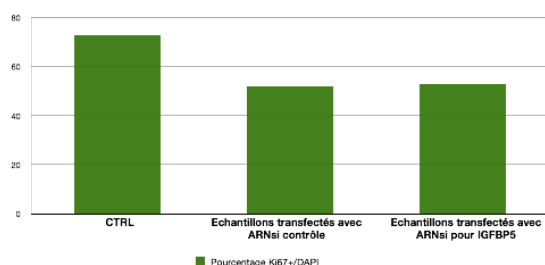
Pour quantifier la prolifération, nous avons étudié l'expression de Ki67 (protéine utilisée comme marqueur de la prolifération puisqu'elle n'est exprimée que dans les noyaux des cellules qui prolifèrent) par immunofluorescence.

Nous avons mené l'expérience sur 15 échantillons de cellules β Tc-Tet avec 3 échantillons contrôles sans transfection et 12 échantillons avec une transfection inverse, dont la moitié avec une transfection par un ARNsi contrôle et l'autre moitié par notre ARNsi pour IGFBP5. De plus, nous voulions voir l'effet que pouvait avoir l'inhibition d'IGFBP5 sur la prolifération induite par l'exendine-4, ce pourquoi nous avons incubé la moitié des échantillons avec de l'exendine-4 100nM que nous avons ajouté après 48h et que nous avons laissé en présence pendant les 24h restantes d'incubation (le temps total d'incubation a été de 72h pour tous les échantillons).

	Pourcentage Ki67+/DAPI	Déviati on Standard
CTRL sans transfection	72.6 %	1.7
Echantillons transfectés avec ARNsi contrôle	51.8 %	3.4
Echantillons transfectés avec ARNsi pour IGFBP5	52.6 %	3.2

Effet de la transfection par un ARNsi pour IGFBP5 sur la prolifération des cellules β Tc-Tet

	CTRL	Echantillons transfectés avec ARNsi contrôle	Echantillons transfectés avec ARNsi pour IGFBP5
Pourcentage Ki67+/DAPI	72.6	51.8	52.6

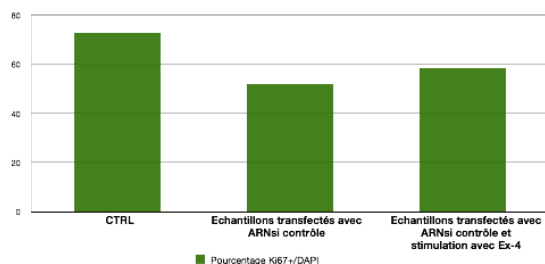


Graphique 11 – Effet de la transfection de cellules β Tc-Tet par notre ARNsi pour IGFBP5 sur la prolifération cellulaire

	Pourcentage Ki67+/DAPI	Déviati on Standard
CTRL sans transfection	72.6 %	1.7
Echantillons transfectés avec ARNsi contrôle	51.8 %	3.4
Echantillons transfectés avec ARNsi contrôle et stimulation avec Ex-4	58.4 %	1.8

Effet de l'Ex-4 sur la prolifération de cellules β Tc-Tet transfectées avec un ARNsi contrôle

	CTRL	Echantillons transfectés avec ARNsi contrôle	Echantillons transfectés avec ARNsi contrôle et stimulation avec Ex-4
Pourcentage Ki67+/DAPI	72.6	51.8	58.4

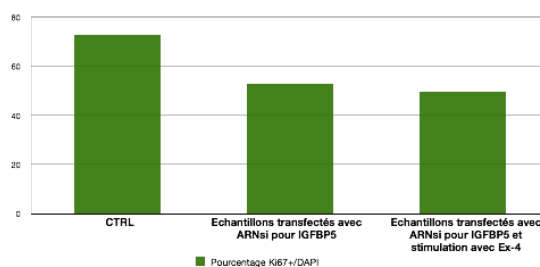


Graphique 12 – Effet de l'exendine-4 sur la prolifération de cellules β Tc-Tet transfectées avec un ARNsi contrôle

	Pourcentage Ki67+/DAPI	Déviati on Standard
CTRL sans transfection	72.6 %	1.7
Echantillons transfectés avec ARNsi pour IGFBP5	52.6 %	3.2
Echantillons transfectés avec ARNsi pour IGFBP5 et stimulation avec Ex-4	49.6 %	3.0

Effet de l'Ex-4 sur la prolifération de cellules β Tc-Tet transfectées avec un ARNsi pour IGFBP5

	CTRL	Echantillons transfectés avec ARNsi pour IGFBP5	Echantillons transfectés avec ARNsi pour IGFBP5 et stimulation avec Ex-4
Pourcentage Ki67+/DAPI	72.6	52.6	49.6



Graphique 13 – Effet de l'exendine-4 sur la prolifération de cellules β Tc-Tet transfectées avec notre ARNsi pour IGFBP5

Tout d'abord, il est important de préciser que la différence de prolifération que l'on observe entre les cellules β Tc-Tet contrôle sans transfection et les cellules β Tc-Tet transfectées avec un ARNsi contrôle est probablement liée à la toxicité de la lipofectamine utilisée lors de la transfection, qui a diminué considérablement le nombre de cellules après transfection. Cette différence avait déjà pu être observée au microscope après 24h post transfection, puisque le taux de mort cellulaire était beaucoup plus important pour les cellules transfectées que pour les cellules non transfectées.

La mort cellulaire a été d'autant plus importante pour cette expérience que celle-ci a nécessité la culture des cellules sur des lamelles de verre que nous avons déposé au fond des puits des plaques de culture cellulaire, étape nécessaire pour pouvoir par la suite monter ces lames pour observer la fluorescence au microscope. Or, nous savons que, malgré le traitement préalable des lamelles par poly-L-lysine que nous avons fait, celles-ci sont moins adéquates pour l'adhésion et la croissance cellulaire.

D'après les résultats obtenus dans le graphique 11, nous n'observons malheureusement pas d'effet direct de l'inhibition d'IGFBP5 sur le pourcentage de prolifération des cellules β Tc-Tet. En effet, nous remarquons que le pourcentage des cellules β Tc-Tet qui prolifère est le même dans les échantillons transfectés avec un ARNsi contrôle que dans les échantillons transfectés avec notre ARNsi pour IGFBP5.

En revanche, ce que nous remarquons d'après les graphiques 12 et 13, c'est que l'effet de l'exendine-4 est diminué suite à l'inhibition d'IGFBP5.

Comme attendu, nous pouvons voir d'après le graphique 12 que l'exendine-4 stimule la prolifération cellulaire, malgré la transfection avec un ARNsi contrôle.

Cependant, contrairement à ce que nous imaginions, nous pouvons observer d'après le graphique 13 que l'exendine-4 perd son effet sur la stimulation de la prolifération des cellules β Tc-Tet lorsque celles-ci sont transfectées avec notre ARNsi pour IGFBP5, soit « knock down » pour ce gène. Ceci suggère donc que l'effet de l'exendine-4 sur la prolifération cellulaire pourrait être dépendant d'IGFBP5, ou du moins qu'IGFBP5 pourrait potentialiser l'effet de l'exendine-4 sur la prolifération cellulaire. Ainsi, IGFBP5 n'agirait pas seulement en modulant la biodisponibilité d'IGF-2 pour son récepteur, mais pourrait avoir un effet intrinsèque potentialisateur de la prolifération cellulaire.

Discussion:

Si nous reprenons nos résultats sur les variations de l'expression d'IGFBP3 et IGFBP5 dans les îlots pancréatiques traités avec exendine-4 (graphique 6), il semblerait que les gluco-incrélines aient un effet beaucoup moins marqué sur l'augmentation de l'expression d'IGFBP5 que d'IGFBP3. Ceci nous laisse donc imaginer que ça pourrait être principalement IGFBP3 qui serait impliqué dans le mécanisme de rétrocontrôle dont nous avons parlé. Il a d'ailleurs été observé par N. Palau et al. en 2012, que l'obésité provoquait des changements du pattern d'expression des protéines des cellules adipeuses, spécifiquement au niveau du tissu adipeux péri-pancréatique. En effet, il a été montré que le milieu environnant du tissu adipeux péri-pancréatique de souris obèses était moins riche en IGFBP3 que celui de souris maigre et que cette inhibition participait, via un mécanisme paracrine dépendant de l'IGF, à la stimulation de la prolifération des cellules bêta et ainsi à l'augmentation de la masse cellulaire bêta que l'on observe chez les patients obèses. Ceci renforce alors notre hypothèse que la sécrétion d'IGFBP3 par les cellules bêta pancréatiques pourrait agir par un mécanisme autocrine dépendant de l'IGF, en régulant sa biodisponibilité et ainsi son effet sur la prolifération des cellules bêta.

En revanche, si nous revenons à IGFBP5, nous pouvons imaginer d'après nos derniers résultats de l'effet de son inhibition sur la prolifération des cellules bêta pancréatiques (graphiques 11 à 13), que son effet principal pourrait être un effet intrinsèque indépendant de l'IGF-2, qui, contrairement à IGFBP3 qui agirait comme régulateur de la prolifération, pourrait stimuler la prolifération. A noter que plusieurs études ont déjà montré qu'IGFBP5 pouvait avoir un effet intrinsèque indépendant de l'IGF et qu'il pouvait notamment agir comme facteur de croissance, par exemple sur les ostéoblastes (S. Mohan et al., 2002).

Pour finir, comme nous l'avons observé précédemment à partir des résultats que nous avons obtenu des traitements cellulaires que nous avons réalisé avec des acides gras et des cytokines (graphique 8 et 9), il semblerait que l'expression d'IGFBP5 par les cellules bêta pancréatiques soit fortement diminuée lorsque celles-ci sont soumises à une situation de stress. Nous avons émis l'hypothèse que cette diminution pouvait être induite dans le but d'augmenter la biodisponibilité d'IGF-2 et ainsi son activité dans la

boucle autocrine qu'il induit, puisque celle-ci assure une stimulation de la prolifération des cellules bêta ainsi qu'une protection contre leur apoptose. Cependant, si nous imaginons d'après nos dernières observations qu'IGFBP5 avait un effet intrinsèque positif sur la prolifération cellulaire, une autre hypothèse serait que la diminution de l'expression d'IGFBP5 par les cellules bêta pancréatiques, lorsque celles-ci sont soumises à une situation de stress, pourrait au contraire participer à la diminution de la masse cellulaire bêta observée notamment chez les patients diabétiques.

La prochaine étape serait de confirmer l'effet intrinsèque d'IGFBP5, par exemple en utilisant un anticorps spécifique pour IGF1-R capable de bloquer son activité pour voir si IGFBP5 avait toujours un effet positif sur la prolifération malgré l'inhibition de la voie de signalisation de l'IGF.

Il faudrait également réaliser nos dernières expériences avec un ARNsi spécifique pour IGFBP3 pour voir si l'inhibition d'IGFBP3 avait l'effet attendu, soit d'augmenter la prolifération cellulaire grâce à l'augmentation de la biodisponibilité d'IGF-2.

Limitations de mon travail:

La première limitation de mon travail a été de n'avoir travaillé que sur les niveaux d'expression des ARNm et non sur l'expression des protéines.

De plus, l'effet de l'inhibition d'IGFBP5 par transfection avec un ARNsi n'a été étudié que sur des cellules β Tc-Tet alors qu'il aurait été intéressant de pouvoir faire l'expérience directement sur des îlots pancréatiques extraits de souris, comme nous l'avons fait pour nos autres expériences. Cependant, la transfection d'îlots pancréatiques apparaît complexe étant donné leur configuration 3D en amas cellulaire ce qui rend l'accès difficile aux cellules qui se trouvent au centre des îlots. Il aurait été possible de séparer les cellules grâce à un « cell dissociation buffer » (Gibco n°13150-016) avant de les transfecter, mais cela signifie tout d'abord une perte de la structure 3D des îlots, mais également une toxicité supplémentaire à celle que représente déjà l'utilisation de la lipofectamine nécessaire pour la transfection.

Pour finir, mon travail s'est basé sur des expériences in vitro et il aurait été intéressant de pouvoir faire également des observations in vivo. Ainsi, une première expérience pourrait être de comparer l'expression d'IGFBP d'îlots extraits de souris saines et d'îlots extraits de souris diabétiques ou obèses dB/dB.

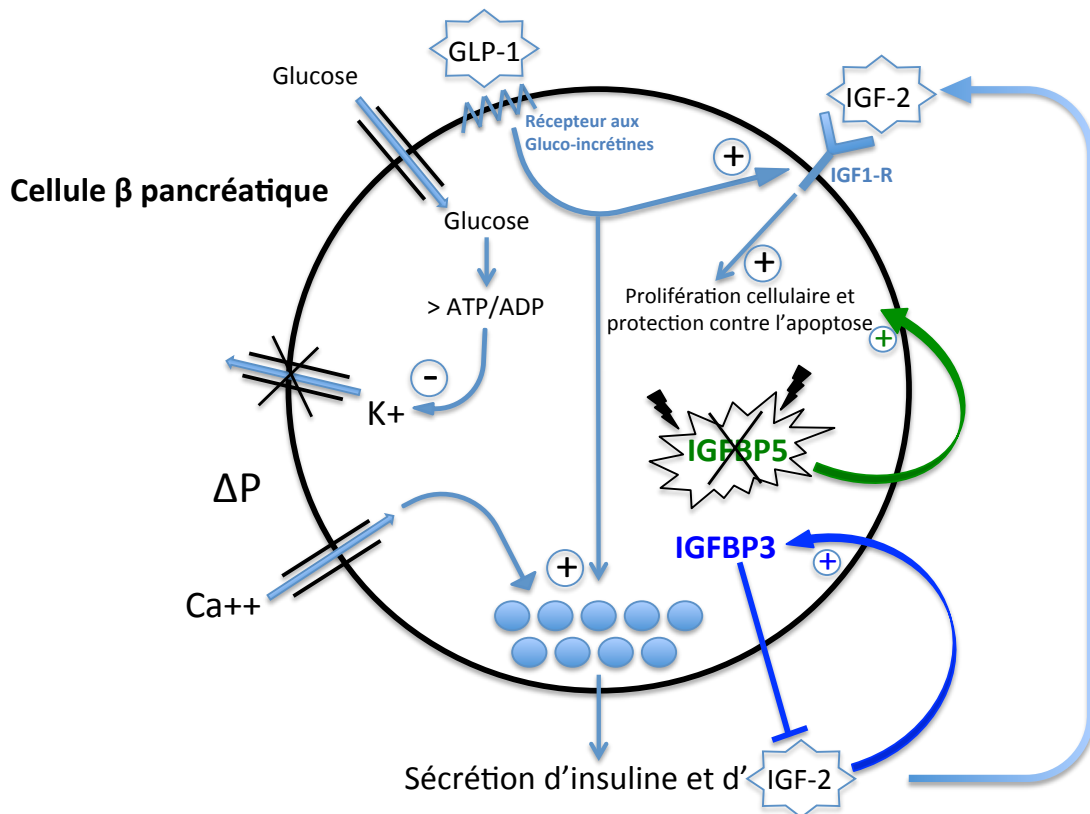
Conclusion:

En conclusion, après avoir pu démontrer que les cellules bêta pancréatiques exprimaient des protéines IGFBP, et de manière significativement plus importante IGFBP3 et IGFBP5, les résultats de nos expériences nous ont permis d'émettre deux hypothèses distinctes concernant le rôle que ces deux protéines pouvaient avoir dans la prolifération des cellules bêta et leur protection contre l'apoptose.

Concernant notre hypothèse de départ sur le rôle que la sécrétion de protéines IGFBP par les cellules bêta pancréatiques pouvait avoir dans la boucle autocrine médiée par IGF-2 qui est induite par les gluco-incrétones, il semblerait, comme nous l'avons imaginé, que la sécrétion d'IGFBP3 pourrait diminuer la biodisponibilité d'IGF-2 pour son récepteur, et ainsi diminuer son activité dans la boucle qu'il induit. Comme nous avons pu le voir d'après nos expériences sur l'effet de l'exendine-4 sur l'expression d'IGFBP3, il semblerait que les gluco-incrétones stimulent l'expression d'IGFBP3. Ainsi, notre hypothèse est que la sécrétion d'IGFBP3 serait stimulée par la sécrétion d'IGF-2, dans le but d'assurer un mécanisme de rétrocontrôle sur son activité.

En revanche, il semblerait, d'après nos expériences sur l'effet d'une inhibition d'IGFBP5 dans des cellules β Tc-Tet sur leur prolifération, qu'IGFBP5 aurait un effet stimulateur sur la prolifération. Plusieurs études ont montré que les protéines IGFBP pouvaient également avoir un effet intrinsèque indépendant de l'IGF, et notamment qu'IGFBP5 pouvait agir comme facteur de croissance. Ainsi, notre hypothèse est que la sécrétion d'IGFBP5 par les cellules bêta pancréatiques pourrait stimuler leur prolifération par un effet intrinsèque autocrine indépendant de l'IGF-2. D'après cette hypothèse, la diminution de l'expression d'IGFBP5 observée lors de l'incubation de cellules β Tc-Tet ou d'îlots pancréatiques extraits de souris avec des acides gras ou des cytokines pro-inflammatoires pourrait participer à la diminution de la masse cellulaire bêta observée lorsque celles-ci sont soumises à une situation de stress cellulaire, tel que chez les patients diabétiques dont les îlots pancréatiques sont soumis à une inflammation chronique induite par l'hyperglycémie.

En conclusion de quoi, nous pouvons proposer le schéma suivant:



Remerciements:

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Thorens qui m'a supervisé et guidé tout au long de mon travail ainsi que Sabrina Vollers, Eija Heikkila, Wanda Dolci, Guy Niederhauser et David Tarussio dont l'aide et le soutien m'ont été très précieux.

Références:

- 1) Thorens B, « Incrétines, sécrétion d'insuline et diabète », *M/S : médecine sciences*, vol. 19, n° 8-9, 2003, p. 860-863.
- 2) Marie Virally, Jean-Philippe Kevorkian et Pierre-Jean Guillausseau, « Incrétines, incrétinomimétiques et inhibiteurs de la DPP-4 : homéostasie glucidique et diabète de type 2 », Service de médecine interne B, AP-HP, hôpital Lariboisière, Paris, France, 2008
- 3) Marion Cornu, Jiang-Yan Yang, Evrim Jaccard, Carine Poussin, Christian Widmann, and Bernard Thorens, « Glucagon-like peptide-1 protects beta-cells against apoptosis by increasing the activity of an IGF-2/Igf-1 receptor autocrine loop », *Diabetes*, vol. 58, August 2009
- 4) Marion Cornu and Bernard Thorens, « GLP-1 protects beta-cells against apoptosis by enhancing the activity of an IGF-2/IGF1-receptor autocrine loop », *Islets* 1:3, 280-282; November/December 2009
- 5) Vivian HWA, Youngman Oh and Ron G. Rosenfeld, « The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily », *Endocrine Reviews* 20(6): 761-787, 1999, by The Endocrine Society
- 6) S. Mohan and D. J. Baylink, « IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms », *Journal of Endocrinology* (2002) 175, 19–31
- 7) M. Boutinaud, J. H. Shand, M. A. Park, K. Phillips, J. Beattie, D. J. Flint and G. J. Allan, « A quantitative RT-PCR study of the mRNA expression profile of the IGF axis during mammary gland development », *Journal of Molecular Endocrinology* (2004) 33, 195–207, Society for Endocrinology
- 8) Hjalti Kristinsson, David M. Smith, Peter Bergsten, and Ernest Sargsyan, « FFAR1 is involved in both, the acute and chronic effects of Palmitate on Insulin secretion », *Endocrinology*, November 2013, 154(11): 4078-4088
- 9) G. C. Yaney and B. E. Corkey, « Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells », *Diabetologia* (2003) 46: 1297-1312
- 10) S. C. Collins, A. Salehi, L. Eliasson, C. S. Olofsson and P. Rorsman, « Long-Term exposure of mouse pancreatic islets to oleate or palmitate results in reduced glucose-induced somatostatin and oversecretion of glucagon », *Diabetologia* (2008) 51: 1689-1693
- 11) K. Eguchi and I. Manabe, « Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes », *Diabetes, Obesity and Metabolism* 15 (Suppl. 3): 152-158, 2013.

- 12) M.Y. Donath, « Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes », *Diabetes, Obesity and Metabolism* 15 (Suppl. 3): 193-196, 2013
- 13) Sonia Klinger, Carine Poussin, Marie-Bernard Debril, Wanda Dolci, Philippe A. Halban, and Bernard Thorens, « Increasing GLP-1 induced cell proliferation by silencing the negative regulators of signaling cAMP response element modulator and DUSP14 », *Diabetes*, vol. 57, March 2008
- 14) Nuria Palau, Sandra A. Rebuffat, Jordi Altirriba, Sandra Piquer, Felicia A. Hanzu, Ramon Gomis and Albert Barbera, « Role of IGFBP-3 in the regulation of β -cell mass during obesity: adipose tissue/ β -cell cross talk », *Endocrinology*, January 2012, 153(1) : 177–187