

Implication du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans l'apoptose de la cellule β pancréatique

Sandrine Cornali Cornali Lablanche

▶ **To cite this version:**

Sandrine Cornali Cornali Lablanche. Implication du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans l'apoptose de la cellule β pancréatique. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV009 . tel-00767105

HAL Id: tel-00767105
https://theses.hal.science/tel-00767105

Submitted on 19 Dec 2012

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

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

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par **Sandrine LABLANCHE**

Direction de la thèse : **Pr Eric FONTAINE**

Codirection : **Pr Pierre-Yves BENHAMOU**

Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
Unité INSERM 1055
École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Implication du PTP dans l'apoptose de la cellule β pancréatique

Thèse soutenue publiquement le **3 avril 2012**

Composition du jury :

Pr Bernard PORTHA
PU – Université Paris Diderot (Président)

Pr Thierry BERNEY
PU-PH – Université de Genève (Rapporteur)

Pr Laurent ARGAUD
PU-PH – Université Claude Bernard – CHU Lyon (Rapporteur)

Pr Eric FONTAINE
PU-PH – Université de Grenoble – CHU Grenoble (Directeur de thèse)

Pr Pierre-Yves BENHAMOU
PU-PH – Université de Grenoble – CHU Grenoble (Co-directeur de thèse)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier :

Pierre-Yves Benhamou : sans vous, je serai certainement une (heureuse ?) pédiatre libérale. Sachez que je vous tiens entièrement responsable de mon revirement d'intérêt pour la Diabétologie et le monde de la recherche et je vous en remercie. Je suis à cause de vous une jeune diabétologue bien (trop ?) occupée mais parfaitement épanouie dans son domaine d'exercice. Merci pour votre encadrement, votre oreille (sans mauvais jeu de mot…) attentive et vos conseils toujours avisés et bienveillants. Merci pour l'exemple que vous donnez à la jeune génération dont je fais partie.

Eric Fontaine : merci de m'avoir accueilli au LBFA et formé à la recherche fondamentale. Rien n'était gagné d'avance car la mitochondrie n'était qu'un souvenir imprécis et le PTP, un complet inconnu mais j'ai bénéficié d'un encadrement sur mesure qui m'a permis d'acquérir des compétences techniques et scientifiques solides (je pense…). Merci pour ta disponibilité sans limite : à chaque fois (et elles ont été nombreuses) que j'ai frappé à ton bureau pour une clarification, un coup de main ou un coup de blues, tu as toujours été présent malgré ta propre charge de travail. Merci pour nos échanges (à cause d'une de nos longues et passionnantes discussions, j'ai même oublié un soir de récupérer mes enfants, c'est dire…). Merci pour ta patience et pour les cours particuliers dispensés sur la mitochondrie : après me l'avoir expliqué en long, en large et en travers, le flux reverse et les autres subtilités du fonctionnement mitochondrial n'ont (presque) plus de secrets pour moi. Merci de m'avoir transmis ta passion pour la science. Je souhaite que ton encadrement et que notre collaboration se poursuivent bien au-delà de ce travail de thèse.

Olivier, mon mari : encore une fois à la hauteur! Merci pour ta confiance, ta patience, ton flegme légendaire et ta disponibilité sans limite malgré tes propres responsabilités professionnelles. Au-delà de l'aspect purement organisationnel, je te dois l'accomplissement de mon cursus : j'ai beau militer pour la liberté des femmes, rien n'aurait été possible sans ton soutien. Il nous reste à vivre l'expérience de l'étranger. Je mesure l'effort réalisé pour me suivre dans ce projet. Encore une belle preuve d'amour et de confiance. Je t'♡.

Baptiste et Emile, nos enfants : merci pour vos nuits blanches (surtout Emile!), vos fièvres, vos « gastro » et hospitalisation en tout genre qui pimentent notre vie professionnelle!!! Merci pour vos sourires, vos câlins, vos bons mots et les pétillants moments passés ensemble. Merci d'être

des enfants sages, faciles et épanouis ce qui m'autorise à être une Maman active complètement décomplexée. Ne changez rien, je vous ♡.

Cécile Cottet : que retenir de ces quatre années partagées avec toi ? Ton accueil polaire au début de mon M2 (mais non, je ne t'en veux pas, mais quand même, ce n'est pas une façon d'accueillir les sympathiques « jeunes » recrues...), ta langue bien pendue et ton sens de la diplomatie, nos kilos de chocolats engloutis au cours des longues périodes de quantifications d'images, nos après-midi de désespoir à essayer de comprendre les subtilités de la chaîne respiratoire, des navettes et du flux reverse, ta rigueur technique, scientifique et morale, notre différent sur le mode de cuisson de la fondue savoyarde et enfin ta présence à toutes les étapes difficiles de ma thèse : les difficultés de culture cellulaire, les mises au point difficiles en cytométrie, la chasse aux fuites sur le circuit d'ischémie-reperf', ma formation théorique et pratique en microscopie confocale et en cytométrie, les précieux îlots à soigner quand ils avaient la bonne idée d'arriver la veille des départs en congrès, les relectures orthographiques fastidieuses du master, de la thèse de médecine, de cette dernière thèse et surtout tes gentilles attentions, tes encouragements et ton soutien sans faille dans mes (rares mais mémorables) coup de blues!!!... De tout cela, est née une très belle amitié. Merci.

Bernard Portha et Laurent Argaud pour avoir accepté de juger mon travail.

Thierry Berney pour sa collaboration concernant l'approvisionnement en îlots humains et pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Marie-Jeanne Richard et Virginie Persoons pour l'approvisionnement en îlots humains.

L'association AGIR à dom pour la bourse allouée en vue du financement de deux années de thèse.

Tous les membres du LBFA pour leurs conseils scientifiques et techniques et plus particulièrement Christine et Karine pour leur soutien amical et nos expériences partagées sur le rude mais beau métier de maman active, Gérard, pour sa bonne humeur et son amitié, Christiane pour son expertise en culture cellulaire, Fred pour la mise au point de la cloche à hypoxie, Cécile Batandier pour son expertise sur ce satané flux reverse et Sarah H. pour l'assistance bibliographique.

Marine C. : merci pour tes gentilles attentions et ton amitié.

Pépé Minou et Josiane pour votre soutien et votre présence à nos côtés. Les enfants sont si bien avec vous…

Mamité, Loulou, Tatisa, Tonton Pit, Tatie et Tonton Guillaume : même si vous ne comprenez pas un traître mot à ce que je fais, merci pour votre soutien, l'intérêt que vous me portez et nos heureux moments partagés en famille qui sont de véritables pauses dans nos vies trépidantes.

Implication du PTP dans la mort cellulaire β pancréatique

L'hyperglycémie, l'hyperfructosémie et l'ischémie-reperfusion sont délétères pour la viabilité cellulaire β pancréatique, jouant un rôle majeur dans la perte de la masse cellulaire β. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) est un canal mitochondrial impliqué dans le déclenchement de la mort cellulaire. Des données récentes montrent l'implication du PTP et du stress oxydant dans la toxicité induite par l'ischémie-reperfusion sur cardiomyocytes et également dans la glucotoxicité induite sur cellules endothéliales.

La première partie de notre étude a visé à étudier l'implication de l'ouverture du PTP dans la mort cellulaire des cellules INS-1 et des îlots pancréatiques humains soumis à de fortes concentrations de glucose et de fructose. Nous démontrons que l'incubation des cellules INS-1 et des îlots pancréatiques humains en présence de 30 mM de glucose ou 2,5 mM de fructose déclenche une ouverture du PTP et induit la mort cellulaire. La metformine et la Cyclosporine A (CsA) préviennent l'ouverture du PTP et la mort cellulaire induite par le glucose et le fructose.

La deuxième partie de notre travail montre que l'exposition des INS-1 à une heure de carence en substrat concomitante d'une hypoxie, suivie d'une restauration des conditions basales conduit à l'ouverture du PTP et à une majoration drastique de la mort cellulaire. Ces deux évènements sont totalement prévenus par l'incubation préalable par la CsA et la metformine mais aussi par la N-Acétyl-Cystéine (NAC) ou par l'exposition à une anoxie, soulignant ainsi le rôle fondamental du stress oxydant dans le déclenchement de l'ouverture du PTP et de la mort cellulaire. Nous montrons qu'au cours de l'ischémie-reperfusion simulée, la production de superoxide est bi-phasique : nous décrivons un premier pic de production au cours de la carence en substrat, lié à un flux reverse d'électrons au sein du complexe I de la chaîne respiratoire. Ce premier pic est suivi d'un deuxième pic de production après la restauration du niveau de substrats et d'$O_{2,\ lié}$ à l'ouverture du PTP. La NAC, l'anoxie ou la metformine préviennent les deux pics de production de superoxide tandis que la CsA prévient seulement le second pic. Enfin, nous montrons que l'hypoxie seule n'induit ni stress oxydant, ni ouverture du PTP ni mortalité cellulaire.

L'ensemble de notre travail démontre le rôle central du PTP dans la gluco-fructotoxicité et dans la toxicité induite par l'ischémie-reperfusion sur la cellule β pancréatique. Ainsi, prévenir l'ouverture du PTP peut-être une approche intéressante pour préserver la viabilité cellulaire β.

Keywords : Transition de perméabilité, Glucotoxicité, Ischémie-reperfusion, Fructose, INS-1, îlots pancréatiques humains, Cyclosporine, Metformine, stress oxydant.

PTP involvement in β pancreatic cell death

Hyperglycemia, hyperfructosemia and ischemia-reperfusion play a major role in the progression of β cell loss in diabetes mellitus. The permeability transition pore (PTP) is a mitochondrial channel involved in cell death. PTP opening and oxidative stress have been shown to be involved in ischemia-reperfusion injury on cardiomyocytes and in hyperglycemia-induced cell death in endothelial cells.

In the first part of this work, we have examined the involvement of PTP opening in INS-1 cells and human pancreatic islets cell death induced by high levels of glucose or fructose. We first reported that Metformin and Cyclosporin A (CsA) prevented Ca^{2+}-induced PTP opening in permeabilized and intact INS-1 cells. We then shown that incubation of INS-1 cells and human islets in the presence of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose induced PTP opening and led to cell death. Because both Metformin and CsA prevented glucose and fructose induced PTP opening, and hampered glucose and fructose induced cell death, we conclude that PTP opening is involved in high glucose and high fructose induced INS-1 and human islets cell death. We therefore suggest that preventing PTP opening might be a new approach to preserve β cell viability. In the second part of the work, we demonstrate that the incubation of INS-1 cells in the absence of energy substrates in hypoxic condition for 1 hour followed by incubation in normal condition led to PTP opening and to a dramatic increase in cell death. Both events were totally prevented when PTP opening was inhibited by either Cyclosporin A (CsA) or Metformin or when the cells were incubated in the presence of the antioxidant N-acetyl-cystein (NAC), in anoxia, highlighting the implication of oxidative stress is the commitment of PTP opening. Superoxide production increased during the removal of energy substrates, due to reverse electron flux through complex I and again increased when normal energy substrate and O_2 were restored, due to PTP opening. NAC, anoxia or Metformin prevented the two phases of oxidative stress, while CsA prevented only the second one. Hypoxia alone did not induce oxidative stress, PTP opening or cell death.

Our work demonstrates the implication of PTP opening in ischemia-reperfusion injury and gluco-fructotoxicty in β pancreatic cells. We therefore suggest that preventing PTP opening might be a new approach to preserve β cell viability.

Keywords : Permeability transition, Glucotoxicity, Ischemia-reperfusion injury, Fructose, INS-1, human islet, Cyclosporin, Metformin, oxidative stress.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 2

ABREVIATIONS 11

INTRODUCTION 12

I. La mitochondrie 13

I.A. Organisation de la mitochondrie 13

I.B. Fonctions mitochondriales 13

I.B.1. L'oxydation phosphorylante 14

I.B.2. La mort cellulaire 16

I.B.2.1. La nécrose 16
I.B.2.2. L'apoptose 17
I.B.2.3. Mitochondrie et mort cellulaire 18

II. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale 20

II.A. Caractéristiques générales du PTP 20

II.B. Structure moléculaire du PTP 21

II.B.1. Le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) 22

II.B.2. La cyclophiline D (CyP-D) 22

II.B.3. Le Voltage-dependant anion chanel (VDAC) 23

II.B.4. Le récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) 23

II.B.5. La créatine kinase mitochondriale (CK) 24

II.C. La régulation du PTP 24

II.C.1. Les cations divalents : 24

II.C.2. Le potentiel de membrane mitochondrial 25

II.C.3. Le pH matriciel 25

II.C.4. Le phosphate inorganique (Pi) 26

II.C.5. Le stress oxydant 26

II.C.6. Le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale 27
II.C.7. Les ubiquinones 27

III. Le diabète de type 1 28

IV. La transplantation d'îlots de Langerhans 28

IV.A. Principes généraux de la transplantation d'îlots de Langerhans 29
IV.B. Résultats de la transplantation d'îlots de Langerhans 30
III.B.1.Résultats concernant l'obtention de l'insulino-indépendance 31
III.B.2.Résultats concernant la restauration d'une insulino-sécrétion 32
III.B.3.Résultats concernant l'équilibre glycémique 32
III.B.4.Résultats concernant l'instabilité glycémique et les hypoglycémies 33
IV.C. Les obstacles à la généralisation de la transplantation d'îlots 34

V. PTP et viabilité cellulaire β pancréatique 36

V.A. PTP et cellule β 36
V.B. PTP et toxicité du glucose et du fructose 36
V.C. PTP et ischémie-reperfusion 37

VI. Objectifs 37

MATERIEL ET METHODES 39

MATERIEL 40

I. Culture INS-1 40

I.A. Cellules INS-1 40
I.B. Conditions de culture 41

II. Isolement et culture d'îlots de Langerhans humains 41

METHODES..... 43

I. Etude de la régulation du PTP 43

I.A. La Capacité de Rétention Calcique.....43

I.A.1 Perméabilisation cellulaire.....43

I.A.2 Mesure de la capacité de rétention calcique.....43

I.B. Etude de la régulation du PTP par microscopie confocale 45

I.B.1 Principe de la Microscopie Confocale à Balayage Laser 45

I.B.2 Etude de la régulation du PTP par microscopie confocale.....46

I.B.3 Etude du statut du PTP des cellules soumises à stress.....48

I.B.3.1.Stress Glucose.....48
I.B.3.2.Stress Fructose 48
I.B.3.3.Ischémie-reperfusion simulée 48

II. Mesure de la production radicalaire..... 51

III. Etude de la mort cellulaire 52

III.A.Quantification de la mort cellulaire par cytométrie en flux 52

III.A.1. Principe de la cytométrie en flux 52

III.A.2. Stress cellulaire et traitement par les inhibiteurs du PTP 53

III.A.2.1.Stress Glucose.....53
III.A.2.2.Stress Fructose.....53
III.A.2.3.Stress de type ischémie-reperfusion 54

1. Les systèmes à hypoxie.....54
2. Stress Carence en substrat et carence en O_2 (3 % et 0% O_2) 54
3. Stress Carence isolée en substrat.....55
4. Stress Carence isolée en O_2 (3 % ou 0 % O_2).....55

III.A.3 Double marquage Annexin-V et Iodure de propidium.....56

IV. Analyse d'images 58

V. Analyse statistique..... 58

RESULTATS……57

Etude I.....60

Implication du PTP dans la mort cellulaire des cellules INS-1 induite par 30 mM de glucose et 2,5 mM de fructose 60

Etude II.....76

Implication du PTP dans la mort cellulaire des îlots pancréatiques humains induite par 30 mM de glucose et 2,5 mM de fructose 76

Etude III.....90

Effet de l'ischémie-reperfusion sur la viabilité cellulaire β - Implication du PTP et du stress oxydant 90

RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET PRELIMINAIRES 109

SYNTHESE DES RESULTATS 117

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 118

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....125

ABREVIATIONS

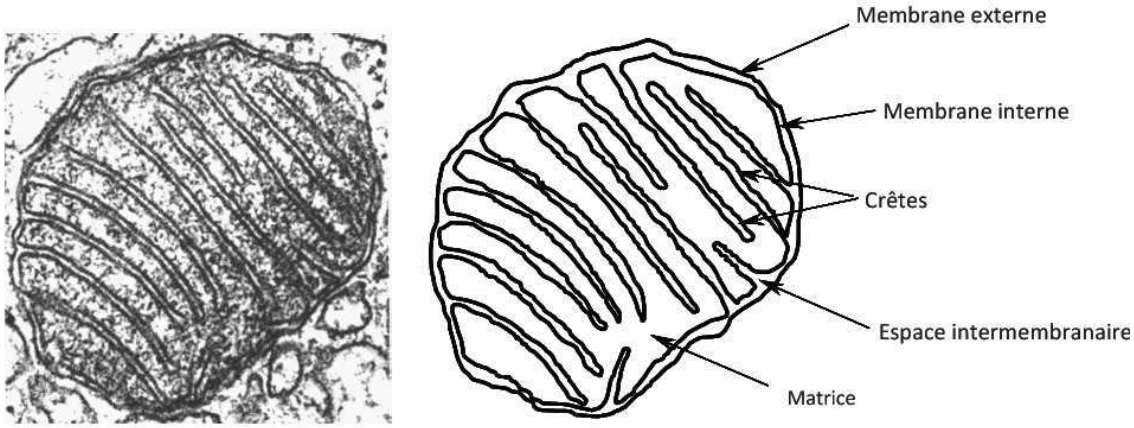
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
ANT	Transporteur de nucléotides adényliques
CK	Créatine kinase
CRC	Capacité de rétention calcique
CsA	Cyclosporine A
CyP-D	Cyclophiline D
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
FAD^+ / $FADH_2$	Flavine adénine dinucléotide oxydée / réduite
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HK	Hexokinase
Met	Metformine
Mops	Acide 3 (N-morpholino)-propane sulfonique
NAC	N-Acétyl-Cystéine
NAD^+ / NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé / réduit
PBR	Récepteur périphérique aux benzodiazépines
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Iodure de prodidium
Pi	Phosphate inorganique
PS	Phosphatidyl-sérine
PTP	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
Tris	Tris (hydroxyméthyl) amino méthane
TMRM	Tetraméthylrhodamine, méthyl ester
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel

INTRODUCTION

I. La mitochondrie

I.A. Organisation de la mitochondrie

Les mitochondries sont des organites intracellulaires situés dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Le diamètre mitochondrial est évalué à 1 µm et la mitochondrie est limitée par une enveloppe formée de deux membranes : la membrane interne et la membrane externe. Ces membranes varient quant à leur composition et délimitent un espace intermembranaire ainsi qu'un espace matriciel.



Structure de la mitochondrie

I.B. Fonctions mitochondriales

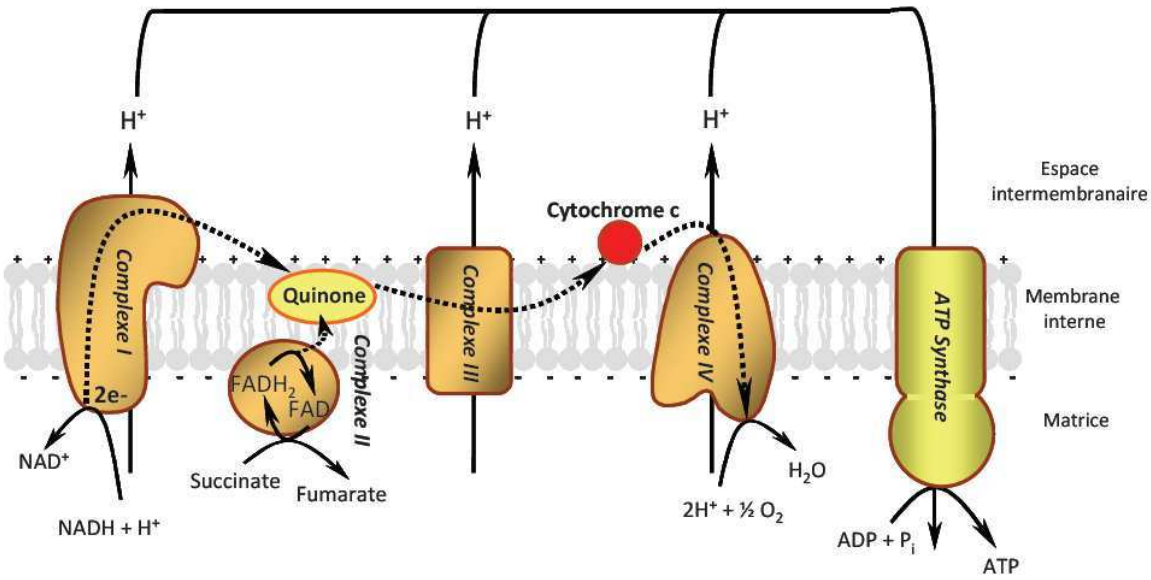
Les mitochondries participent à de nombreuses fonctions au sein des cellules dont, entre autres, l'oxydation phosphorylante et la mort cellulaire programmée.

I.B.1. L'oxydation phosphorylante

La mitochondrie est le siège de l'oxydation phosphorylante. L'oxydation phosphorylante joue un rôle majeur dans l'homéostasie énergétique de la cellule en assurant la coordination entre les besoins en ATP et la consommation des substrats énergétiques.

La chaîne respiratoire, située dans la membrane mitochondriale interne, utilise l'énergie fournie par l'oxydation d'équivalents réduits (NADH et $FADH_2$) pour expulser des protons (H^+) de l'espace matriciel vers l'espace intermembranaire. Ce gradient de protons sert par la suite de source d'énergie pour assurer la synthèse d'ATP par phosphorylation de l'ADP.

La chaîne respiratoire mitochondriale est formée de quatre complexes protéiques structurellement indépendants. Ces complexes peuvent être tour à tour accepteurs et donneurs d'électrons et forment une chaîne d'oxydo-réduction.



La chaîne respiratoire mitochondriale

- **Le complexe I** (NADH déshydrogénase) oxyde du NADH matriciel et transfère deux électrons sur l'ubiquinone permettant sa réduction en ubiquinol. Cette réaction d'oxydo-réduction est associée à une expulsion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

- **Le complexe II** (Succinate déshydrogénase) oxyde du succinate en fumarate pour réduire le FAD en $FADH_2$. Ce $FADH_2$ est à son tour oxydé pour permettre le transfert de deux électrons sur l'ubiquinone.

- **Le complexe III** (bc1 complexe) réalise l'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone. Les électrons sont alors transférés sur le cytochrome c. Cette réaction d'oxydo-réduction est également associée à une expulsion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

- **Le complexe IV** (Cytochrome oxydase) catalyse la dernière réaction d'oxydo-réduction en transférant deux électrons du cytochrome c sur l'oxygène. Cette étape est également couplée à un flux de protons de la matrice vers l'espace matriciel.

Ces trois complexes (I, III, IV) utilisent l'énergie générée par le transfert des électrons pour la translocation active de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Ce mouvement de protons, de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne, crée la force protomotrice (Δp).

Cette force protomotrice se constitue d'une part d'un gradient de pH (ΔpH) (le compartiment intermembranaire étant plus acide que la matrice), d'autre part d'une différence de potentiel électrique transmembranaire ($\Delta\Psi$) (l'espace intermembranaire étant positif et la matrice négative).

Selon la théorie chimio-osmotique de Mitchell (2), cette force protomotrice fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. L'ATP synthase couple l'énergie du

gradient de protons à la synthèse d'ATP. Ce phénomène est réversible car l'ATP synthase est également capable d'expulser des protons vers l'espace intermembranaire en hydrolysant de l'ATP. Son sens d'action dépend de la force promotrice et du rapport ATP/ADP. Ainsi, une chute majeure de la force protomotrice ou une augmentation du rapport ATP/ADP peut aboutir à une hydrolyse de l'ATP par l'ATP synthase associée à une expulsion de protons vers l'espace intermembranaire.

Si le flux d'électrons au travers de la chaîne respiratoire mitochondriale progresse classiquement du complexe I vers le complexe IV, l'existence d'un flux reverse au travers du complexe I de la chaîne respiratoire est décrit : sur mitochondries isolées, lorsque le succinate est le seul substrat énergétique de la chaîne respiratoire, un flux reverse d'électrons au travers du complexe I peut être observé et permettre la réduction du NAD en NADH. Les facteurs contrôlant le flux reverse sont la force protomotrice, le rapport NADH/NAD et le statut d'oxydoréduction des quinones (3).

I.B.2. La mort cellulaire

La mort cellulaire est un processus physiologique qui conduit à la cessation de l'activité biologique cellulaire. La mort cellulaire permet le maintien de l'homéostasie tissulaire par l'élimination sélective des cellules superflues ou anormales. Contrairement à la quiescence cellulaire qui est aussi caractérisée par une diminution de nombreuses activités biologiques, les modifications qui accompagnent la mort cellulaire sont irréversibles. Historiquement, deux types de mort cellulaire s'opposent : la nécrose et l'apoptose.

I.B.2.1. La nécrose

La nécrose a longtemps été considérée comme une mort cellulaire accidentelle non régulée survenant suite à un traumatisme cellulaire important. Le processus de nécrose débute par une augmentation du volume cellulaire, une rupture et une destruction de la membrane

cytoplasmique. Le contenu cellulaire relargué dans l'espace extra-cellulaire déclenche, i*n vivo*, une réaction inflammatoire (4).

I.B.2.2. L'apoptose

L'apoptose, aussi appelée « **mort cellulaire programmée** », est avant tout un phénomène physiologique : l'apoptose est impliquée dans le développement embryonnaire (où elle participe à la sculpture des organes et des tissus) ou encore dans le contrôle de l'homéostasie du système immunitaire. Des dérégulations de l'apoptose sont associées à de nombreuses pathologies : l'inhibition de l'apoptose est impliquée dans le développement de cancers ou de syndromes lymphoprolifératifs. Son exacerbation est responsable par exemple, de la mort neuronale dans les pathologies neurodégénératives.

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

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

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

Ce modèle historique différenciant nécrose et apoptose apparaît aujourd'hui trop simpliste. L'apoptose et la nécrose semblent être des mécanismes liés l'un à l'autre : le relargage de cytochrome *c* mitochondrial, un évènement majeur de l'apoptose, peut être également observé au cours de la nécrose (5).

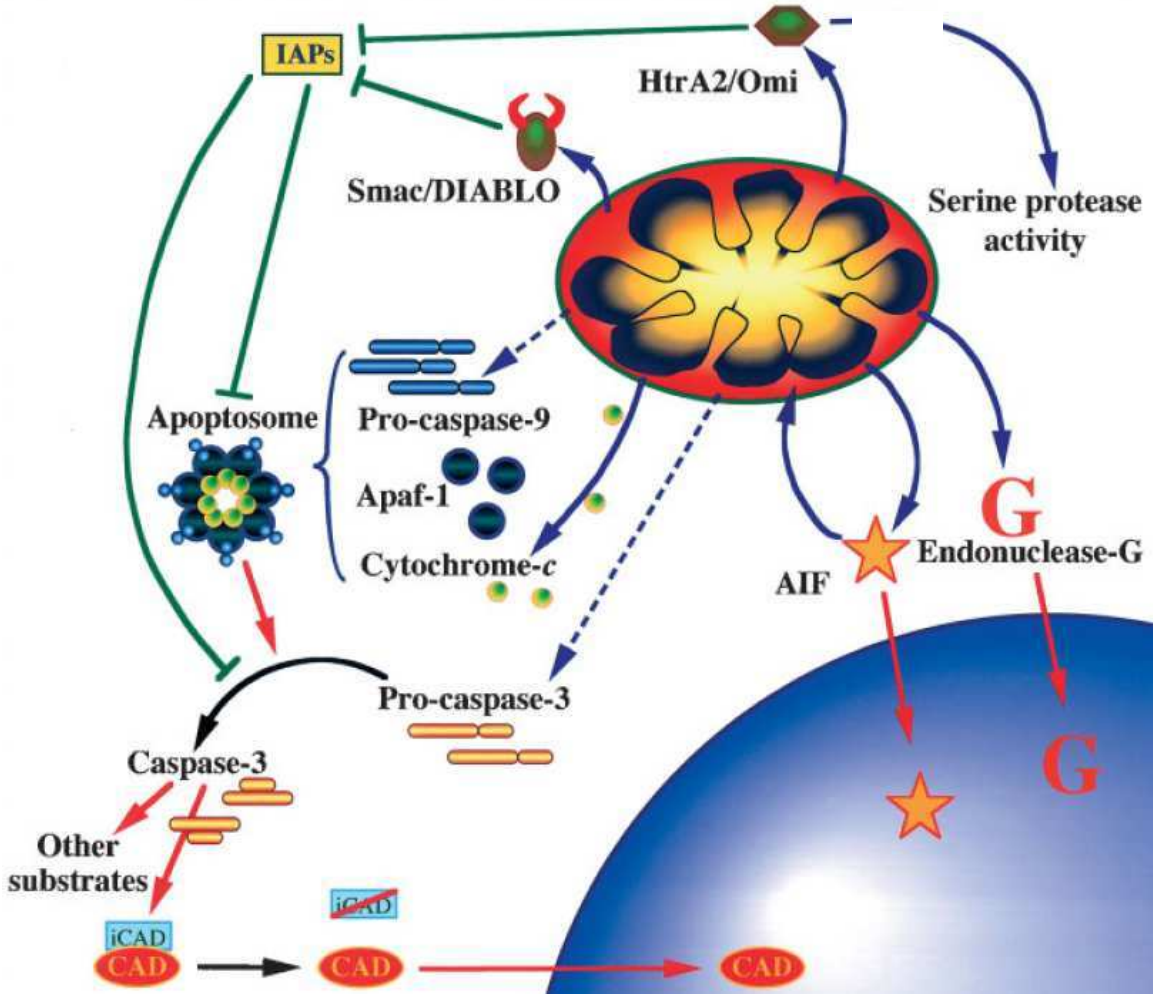
I.B.2.3. Mitochondrie et mort cellulaire

A côté de leur rôle fondamental dans le métabolisme énergétique, les mitochondries occupent une place majeure dans le processus de mort cellulaire programmée (6). L'espace inter-membranaire contient de nombreuses protéines pro-apoptotiques dormantes qui, une fois libérées dans le cystosol, vont déclencher le mécanisme d'apoptose. Parmi ces protéines pro-apoptotiques, sont décrites :

- **Le cytochrome *c*** : c'est un composant essentiel de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il est localisé dans l'espace intermembranaire, faiblement fixé à la surface de la membrane mitochondriale interne (7). Sa présence dans le cytosol est essentielle à l'induction de l'apoptose. Une fois libéré dans le cytosol par la mitochondrie, le cytochrome *c* se complexe avec Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor) et la procaspase 9 (caspase initiatrice) pour conduire en présence d' ATP à l'activation de celle-ci (8). La caspase 9 clive ensuite la procaspase 3 en caspase 3 active (caspase effectrice) initiant la dégradation de substrats intracellulaires spécifiques (9, 10).

- **L'AIF (Apoptose Inducing Factor) et l'endonucléase G** : une fois relarguées par la mitochondrie, ces protéines se transloquent au niveau du noyau et dégradent l'ADN via leur activité nucléasique (11).

- **Smac/DIABLO et Htr2/Omi** déclenchent l'activation des caspases par fixation inhibitrice sur les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), inhibiteurs cytoplasmiques des caspases-3 et -9 (11).



Protéines mitochondriales pro-apoptotiques (11)

Deux théories différentes permettent d'expliquer la libération de ces protéines pro-apoptotiques :

La première et plus largement répandue de ces théories implique la formation, par la polymérisation de protéines de la famille Bcl-2, de larges canaux au sein de la membrane mitochondriale externe (12, 13). La seconde théorie repose sur la perméabilisation de la membrane mitochondriale interne par l'ouverture d'un canal de la membrane mitochondriale interne dénommé **PTP (Permeability Transition Pore).** Si ces deux théories ont longtemps été

opposées, de nombreux éléments semblent indiquer qu'elles sont en fait intriquées et complémentaires : Bax et Bcl-$_{XL}$ sont capables de se lier à VDAC et à l'ANT (14, 15). Bax augmente et Bcl-$_{XL}$ diminue la perméabilité des canaux VDAC inclus dans des protéoliposomes (15). Bax et l'ANT peuvent former des canaux perméabilisant la membrane mitochondriale interne, ce complexe étant inhibé par la Cyclosporine A (CsA), Bcl-2 et l'ATP (16, 17). Les protéines de la famille de Bcl-2 apparaissent ainsi comme de véritables partenaires régulateurs du PTP.

II. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale

II.A. Caractéristiques générales du PTP

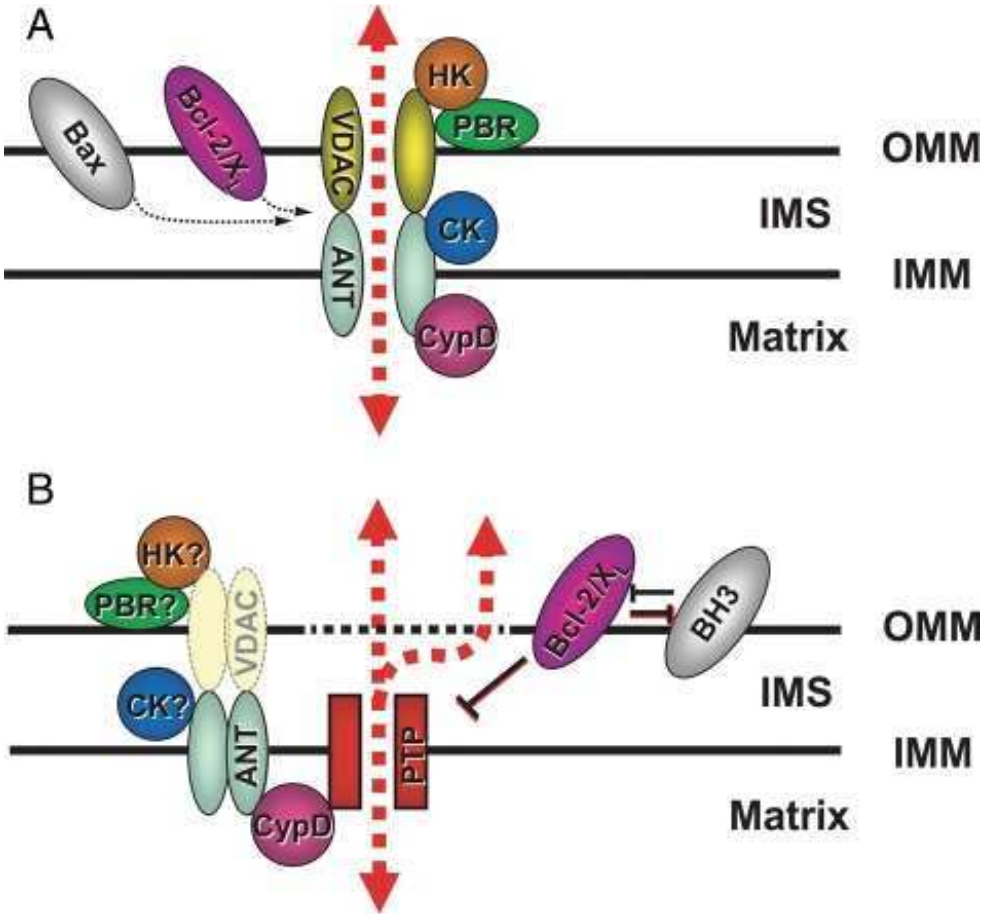
En condition basale, la membrane mitochondriale interne est imperméable aux molécules électriquement chargées, les échanges ne se faisant que par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques hautement régulés. Le gonflement massif des mitochondries isolées de foie de rat par la surcharge calcique a été observé à partir des années 60 (18, 19). L'ensemble des études montre que ce phénomène est dû à l'ouverture d'un canal non spécifique de la membrane mitochondriale interne, le Pore de Transition de Perméabilité (**PTP**), laissant passer tous les composés dont le poids moléculaire est inférieur à 1.5 kDa.

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

- Un gonflement de la matrice mitochondriale (dû à la force osmotique des protéines restant dans la matrice) qui aboutit à la rupture de la membrane externe et à la libération de molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome c.
- Un découplage de l'oxydation phosphorylante entraînant un effondrement du potentiel de membrane mitochondriale et une hydrolyse de l'ATP.
- Une forte production de radicaux libres de l'oxygène (20).

II.B. Structure moléculaire du PTP

La structure moléculaire exacte du PTP fait encore l'objet de débat. Il est admis que le PTP est un complexe multi-protéique régulé, entre autre, par des interactions protéines-protéines. Dans la conception traditionnelle, le PTP est formé par le transporteur des nucléotides adényliques (ANT), la cyclophiline D (CyP-D), le voltage-dependant anion chanel (VDAC), la créatine kinase (CK), l'hexokinase (HK), le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR). Cependant, ces dernières années, un certain nombre d'études utilisant des modèles animaux « knock out », ont remis en doute l'organisation architecturale classique du PTP.



Architecture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. (A) Vue classique. Le PTP est formé par le complexe VDAC-ANT-CyP-D. L'hexokinase (HK), la créatine kinase mitochondriale (CK), le récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) sont inclus dans les composants régulateurs. **(B) Vue actuelle.** Les composants essentiels du PTP restent inconnus, mais ils pourraient être régulés par les molécules adjacentes comme indiqué dans le schéma.

II.B.1. Le transporteur des nucléotides adényliques (ANT)

L'ANT est une protéine abondante de la membrane mitochondriale interne qui assure l'échange réversible d'ADP contre de l'ATP. L'implication de l'ANT dans la structure du PTP est basée initialement sur la constatation que l'ouverture du PTP est inhibée par l'ATP et l'ADP (21). L'implication de l'ANT dans la structure du PTP a été confirmée par des approches pharmacologiques : l'actractyloside qui stabilise l'ANT dans sa conformation c « cytosolique » induit l'ouverture du PTP tandis que l'acide bongkrékique qui stabilise l'ANT dans sa conformation m « matricielle » inhibe l'ouverture du PTP (22). Tikhonova et *al.* ont montré que l'ANT purifié a les caractéristiques d'un canal non spécifique (23). L'ensemble de ces études avait imposé l'ANT comme un élément structurel majeur du PTP. Cependant, récemment, la persistance de l'ouverture du PTP calcium- et Cyclosporine A-sensible sur des mitochondries isolées de foie de souris « knock-out » de l'ANT1 et l'ANT2 (24), montre que l'ANT n'est pas un élément structurel majeur du PTP. L'ANT est plutôt à considérer comme un facteur de régulation du PTP.

II.B.2. La cyclophiline D (CyP-D)

L'identification de la Cyclosporine A comme inhibiteur de l'ouverture du PTP a conduit à rechercher sa cible mitochondriale identifiée par Halestrap et Davindson comme étant la CyP-D (25). La perte de l'activité inhibitrice de la CsA sur le PTP de mitochondries de foie de souris « knock-out » pour la CyP-D, confirme que cette protéine est bien la cible de la CsA (26). Cependant, la transition de perméabilité est conservée chez les souris « knock-out » pour la CyP-D (26). La cyclophiline D, malgré son rôle régulateur évident, ne peut être reconnue comme élément structurel majeur du PTP.

II.B.3. Le Voltage-dependant anion chanel (VDAC)

Le VDAC, protéine transmembranaire la plus abondante de la membrane mitochondriale externe, est composé de 19 feuillets β formant des canaux protéiques traversant la bicouche lipidique. Ces canaux lipidiques sont perméables à toutes les molécules hydrophiles de poids moléculaire inférieur à 5 kDa. Le VDAC pourrait interagir au sein de complexes multiprotéiques au point de jonction des membranes mitochondriales : un de ces complexes, constitué par VDAC, l'ANT et la CyP-D, a été décrit comme pouvant être le cœur du complexe (27). De plus, suivant le type cellulaire, le PBR (28), la CK (29), HK (30), ou les protéines de la famille Bcl-2 (27) pourraient intervenir dans ces complexes et participer à la formation du PTP. Cependant, là encore, la conservation de la perméabilité de transition de mitochondries isolées de souris « Knock-out » de VDAC1-3 (31), remet en cause le rôle structurel de VDAC dans la composition du PTP.

II.B.4. Le récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR)

Le PBR est une protéine de 18 kDa située dans la membrane mitochondriale externe. L'implication du PBR dans la constitution du PTP a été suggérée après que le PBR ait été isolé au sein des complexes formés par l'ANT et VDAC (28). Des études de patch clamp ont montré qu'un canal mitochondrial de multi-conductance, présumé être le PTP, est sensible à la fois à la CsA et aux ligands du PBR comme le Ro5-4846 (32). Une protection de cœurs isolés contre l'ischémie-reperfusion par le Ro5-4846 renforce l'implication du PBR dans la constitution du PTP (33). Cependant, des études suggèrent que les ligands du PBR peuvent réguler l'apoptose et la prolifération cellulaire indépendamment de leur action sur le PBR (34, 35). Ainsi, la relation entre PBR et PTP demande à être clarifiée.

II.B.5. La créatine kinase mitochondriale (CK)

La créatine kinase mitochondriale est une enzyme située dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Elle catalyse réversiblement le transfert du groupe phosphorylé de la phospho-créatine à l'ADP. Il a été montré que la CK peut fait partie d'un complexe incluant VDAC et l'ANT (29). La CK semble jouer un rôle dans la régulation du PTP : la forme octamérique de la CK entraîne une fermeture du PTP tandis que sa forme dimérique favorise l'ouverture du PTP (29, 36). Le modèle le plus communément reconnu quant au mécanisme de régulation de la CK sur le PTP voudrait que la CK en transformant la créatine en phosphocréatine, consomme de l'ATP pour produire de l'ADP qui doit être transporté dans la matrice par l'ANT. Au cours de ce transport, l'ANT prend sa conformation « m » inhibitrice du PTP. Ainsi, l'effet inhibiteur de la CK sur l'ouverture du PTP apparaît comme un mécanisme indirect faisant intervenir l'ANT (37). Notons par ailleurs que le foie est dépourvu de CK : la CK ne peut pas être considérée comme une protéine indispensable au fonctionnement du PTP.

II.C. La régulation du PTP

A défaut d'avoir identifié la nature moléculaire du PTP, sa régulation est relativement bien connue.

II.C.1. Les cations divalents

- **Le calcium** est l'inducteur majeur de l'ouverture du PTP (38). La quantité de calcium nécessaire à l'ouverture du PTP varie en fonction du type cellulaire et de la présence de cofacteurs agissant soit comme activateurs (moins de calcium étant alors requis pour ouvrir le pore), soit comme inhibiteurs (plus de calcium étant requis pour ouvrir le pore). En réalité, l'effet du calcium sur le PTP est plus complexe : Bernardi et *al.* ont démontré l'existence de deux sites d'action indépendants sensibles au calcium et à d'autres cations divalents. Le premier site est

matriciel : la fixation du calcium sur ce site induit une ouverture du PTP tandis que le $Mg^{2+,}$ le Mn^{2+}, le Ba^{2+} et le Sr^{2+} ont un effet inhibiteur par compétition avec le calcium sur ce site matriciel (39). Le second site est externe et tourné vers l'espace intermembranaire : les cinq cations divalents (Ca^{2+},$Mg^{2+,}$ le Mn^{2+}, le Ba^{2+} et le Sr^{2+}) entraînent une inhibition de l'ouverture du PTP (40).

Le calcium matriciel est donc l'inducteur majeur du PTP, les autres régulateurs ne faisant qu'intensifier ou modérer le processus induit par le calcium.

II.C.2. Le potentiel de membrane mitochondrial

L'ouverture du PTP induit un effondrement du potentiel de membrane mitochondriale. Si la dépolarisation mitochondriale est la conséquence de l'ouverture du PTP, elle peut également en être la cause : Bernardi et *al.* ont montré que la dépolarisation mitochondriale pouvait induire une ouverture du PTP sous réserve que l'acidification de la matrice mitochondriale et que l'uniport du calcium soit inhibés. En effet, la dépolarisation mitochondriale est responsable d'une acidification de la matrice et d'un efflux de calcium de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire via l'uniport, deux situations favorisant la fermeture du PTP (40, 41).

II.C.3. Le pH matriciel

L'acidose matricielle diminue la probabilité d'ouverture du PTP alors que l'alcalose l'augmente (42). L'ouverture du PTP est optimale à pH physiologique et inhibée à pH inférieur à 7,2 (39). L'inhibition du PTP par l'acidose matricielle passe par une protonation de résidus histidine situés du côté matriciel (43). L'acidification de la matrice entraînant un détachement de la CyP-D (44), il a été proposé que l'effet inhibiteur du pH acide sur le PTP passe par une modulation de l'interaction de la CyP-D avec le reste du complexe. Cependant, cette hypothèse a été récemment infirmée par la persistance de l'effet inhibiteur du pH acide sur le PTP de souris « knock-out » de la CyP-D (26).

II.C.4. Le phosphate inorganique (Pi)

Le Pi est depuis longtemps considéré comme un puissant inducteur de l'ouverture du PTP (21, 45). Son mécanisme d'action est incomplètement connu. L'effet inducteur pourrait passer par la diminution de la concentration de Mg^{2+} (46), inhibiteur de l'ouverture du PTP. Outre ce rôle inducteur du PTP, le Pi joue un rôle parfois inhibiteur. En effet, il a récemment été montré que le Pi désensibilise le PTP à la surcharge de calcium en présence de CsA ou en l'absence de CyP-D (Souris KO pour la CyP-D). De plus, en l'absence de Pi, la CsA et la déplétion de la CyP-D perdent leur effet inhibiteur sur le PTP. Les auteurs suggèrent que la Cyclophiline D masque l'action inhibitrice du Pi en bloquant son site régulateur inhibiteur sur le PTP (47).

II.C.5. Le stress oxydant

Le stress oxydant est décrit comme inducteur de l'ouverture du PTP**.** Le stress oxydant induit par divers pro-oxydants tels que le t-butyl-hydroperoxide (tBH), le diamide ou le phénylarsine oxide (PhAsO) rend le PTP plus sensible à la surcharge calcique (48, 49). De plus, l'effet de ces oxydants sur la sensibilité du pore à la dépolarisation membranaire est inhibé par le N-éthylmaléimide (NEM), le dithiothréitol (DTT) ou le monobromobimane (MBM) qui réduisent ou alkylent les groupements thiols (50, 51). Deux sites de régulation du PTP par oxydation ont été décrits : un site S et un site P (52, 53). Le site S correspond au double groupement thiol, activé par l'AsO (arsine oxide) et le PhAsO et bloqué par le NEM (52, 53). Halestrap et *al.* ont montré que les espèces radicalaires de l'oxygène augmentent la probabilité d'ouverture du PTP en affectant la liaison de la CyP-D à l'ANT(48) suggérant que ce site S se situe sur l'ANT (48). Le site P est un autre site de régulation redox-sensible mais dépendant de l'état d'oxydo-réduction du pool de nucléotides pyrimidiques (NAD(P)H/NAD(P)+). L'oxydation de ces nucléotides entraîne une augmentation de la sensibilité du pore aux variations de potentiel membranaire (52, 53).

II.C.6. Le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale

Le flux d'électron à travers le complexe I régule le PTP (54). En effet, dans le muscle squelettique, la probabilité d'ouverture du PTP est plus élevée en présence de substrats du complexe I qu'en présence de substrats du complexe II de la chaîne respiratoire (54). La roténone, un inhibiteur direct du complexe I et la metformine, inhibiteur indirect du complexe I, préviennent l'ouverture du PTP et la mort cellulaire dans de nombreux types cellulaires (55, 56) . Il existe néanmoins une spécificité tissulaire concernant ce mode de régulation du PTP par le flux d'électrons au travers du complexe I : ainsi, la roténone n'a aucun effet sur le PTP de foie de rat.

II.C.7. Les ubiquinones

L'étude de la régulation du PTP par le flux d'électrons a été l'origine de la découverte d'une classe de régulateurs : les ubiquinones. Il a été suggéré que l'ubiquinone 0 inhibe l'ouverture du PTP en se fixant sur un des sites d'action de l'ubiquinone endogène du complexe I, bloquant ainsi le flux d'électrons (54). Même si leur régulation est variable selon les tissus, les ubiquinones sont classiquement classées en trois groupes en fonction de leur mode d'action sur le PTP :

- Le groupe I constitué de l'Ub_0, la dUb et l'Ub_{10} correspond aux ubiquinones inhibitrices de l'ouverture du PTP.

- Le groupe II constitué de l'OH-decylUb et de la DOH-undecylUb correspond aux quinones inductrices de l'ouverture du PTP.

- Le groupe III constitué de l'Ub_5 et la TMOH-Ub_5 n'ont aucun effet sur la régulation du PTP.

III. Le diabète de type 1

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

Le diabète de type 1 est une maladie métabolique chronique résultant de la destruction sélective, par le système immunitaire, des cellules β des îlots de Langerhans. La destruction des cellules β aboutit à une déficience insulino-sécrétoire totale responsable de l'apparition d'une hyperglycémie chronique exposant le patient à des risques de complications métaboliques, macroangiopathiques et microangiopathiques (57-59). Cette déficience insulino-sécrétoire impose la mise en route d'une insulinothérapie exogène, à la fois vitale sur le plan métabolique et essentielle pour la prévention des complications dégénératives (60).

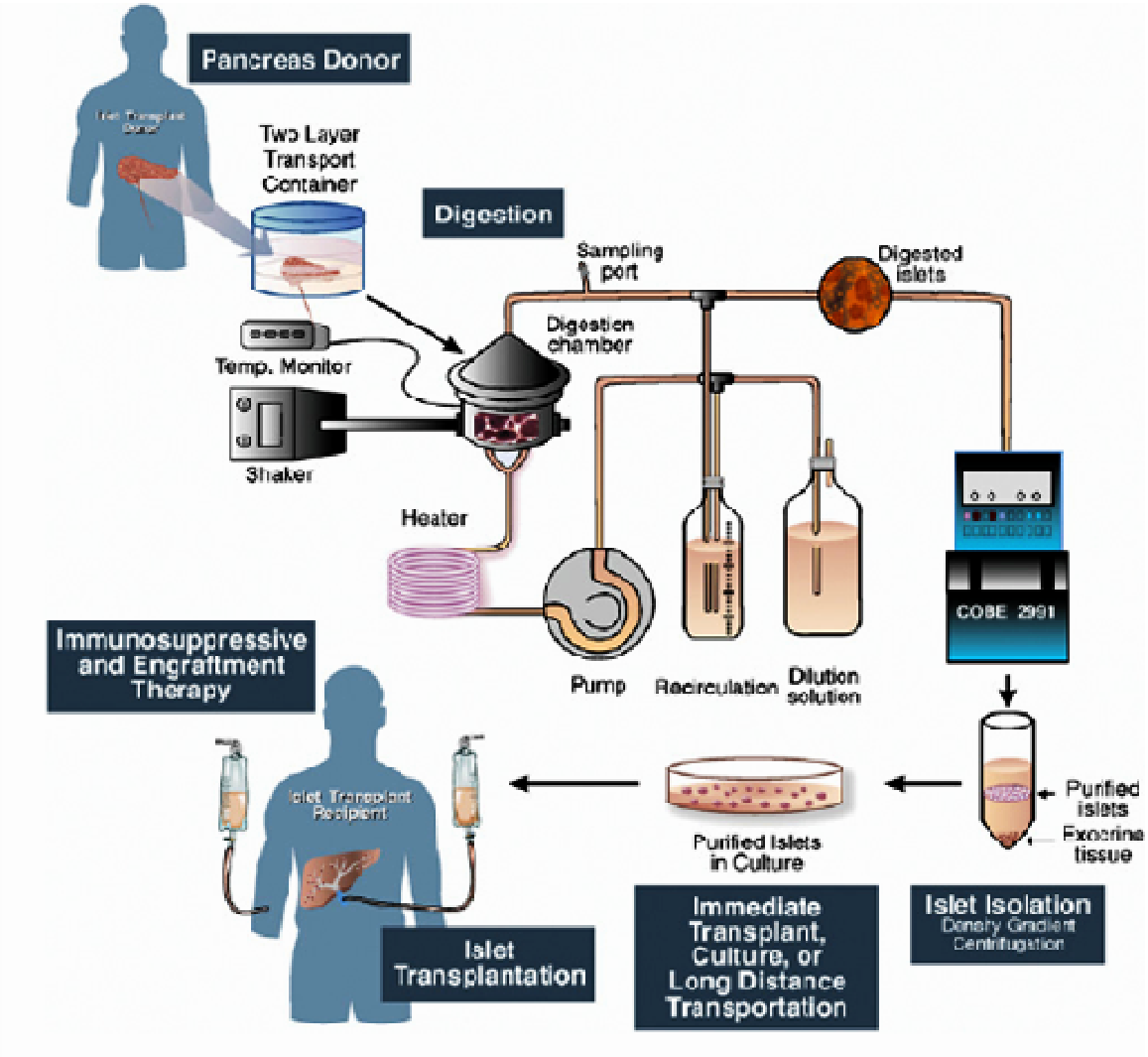
IV. La transplantation d'îlots de Langerhans

La recherche thérapeutique en matière de diabète de type 1 vise le même objectif général : prévenir les complications chroniques et invalidantes de la maladie en restaurant une glycémie la plus normale possible, le plus tôt possible et le plus longtemps possible. Parmi les principales pistes de recherche moderne dans le domaine du diabète de type 1, s'est développée depuis une quinzaine d'années, la greffe d'îlots de Langerhans. Cette technique consiste à transplanter au patient diabétique de type 1 un tissu endocrine capable de sécréter de l'insuline : les îlots de Langerhans.

IV.A. Principes généraux de la transplantation d'îlots de Langerhans

La technique de transplantation d'îlots de Langerhans (1) débute par le prélèvement minutieux (sans effraction de la capsule pancréatique) du pancréas d'un donneur cadavérique dans le cadre d'un prélèvement multi-organes. Le pancréas est acheminé dans les plus brefs délais vers le laboratoire d'isolement dans un liquide de conservation réfrigéré. Le pancréas est ensuite soumis à une digestion enzymatique (collagénase). Le digestat est purifié par une centrifugation en gradient de densité de façon à séparer les îlots de Langerhans du reste du pancréas exocrine. On obtient une préparation constituée de 90% d'îlots pancréatiques qui peut être maintenue en culture pendant 2 à 3 jours. Après 48h de culture, le greffon ainsi obtenu est transplanté par infusion directe dans la veine porte du receveur, par voie transcutanée, sous contrôle échographique. Les îlots (50 à 500 µm) sont arrêtés par leur taille au niveau du parenchyme hépatique. Une revascularisation propre se développe dans les quinze jours suivant la transplantation.

Concernant la morbidité de la transplantation d'îlots, l'équipe d'Edmonton rapporte 13,6% de complications hémorragiques (61) et 3,7 % de thromboses portales (62). Le taux de mortalité après transplantation d'îlots est évalué à 1,3 % (63).



La transplantation d'îlots de Langerhans (64)

IV.B. Résultats de la transplantation d'îlots de Langerhans

La transplantation d'îlots de Langerhans a pris un élan en 2000 avec la publication des résultats de l'équipe canadienne d'Edmonton (65). Ce groupe a appliqué un traitement par greffe itérative d'îlots allogéniques, chez des patients diabétiques de type 1 présentant un diabète instable avec hypoglycémies sévères, en utilisant un nouveau protocole d'immunosuppression dit d'Edmonton (Eviction des corticostéroïdes, induction immunosuppressive par un anticorps anti récepteur de l'interleukine 2, maintenance par

l'association de sirolimus et de tacrolimus à faible dose, augmentation significative de la masse d'îlots greffée).

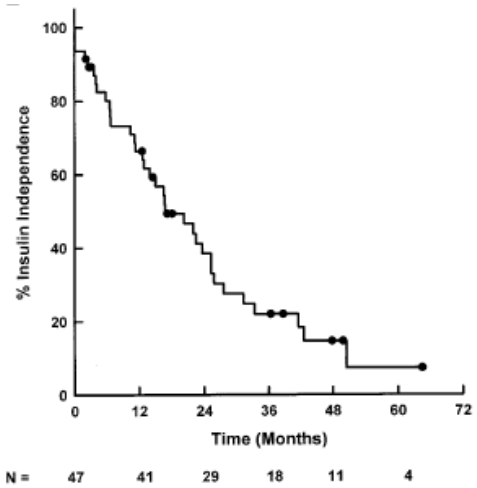
Ryan et *al.* d'Edmonton ont récemment publié les résultats d'une série de 65 cas de transplantation d'îlots (66). Ces données canadiennes sont corroborées par l'expérience grenobloise et du réseau GRAGIL (67).

III.B.1. Résultats concernant l'obtention de l'insulino-indépendance

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

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

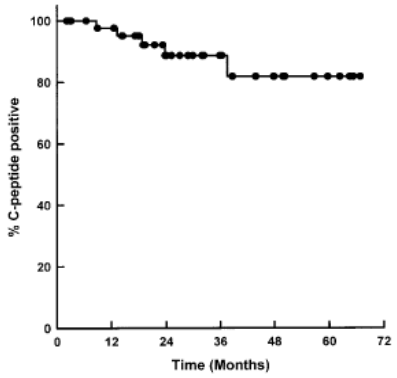
- 94 % des patients ont connus une période d'insulino-indépendance d'au moins 1 mois.
- 80 % des patients restent insulino-indépendants à 1 an.
- 10 % des patients demeurent insulino-indépendants à 5 ans.



Evolution de l'insulino-indépendance en fonction du temps après greffe d'îlots de Langerhans (66).

III.B.2. Résultats concernant la restauration d'une insulino-sécrétion

Tous les patients transplantés restaurent un C-Peptide positif (>0,35 nmol/L) en post-greffe. 80% des patients conservent un C-Peptide positif 5 ans après la greffe d'îlots ; ce C-Peptide positif n'étant cependant pas suffisant pour maintenir une insulino-indépendance chez la majorité des patients.



Evolution du C-Peptide en fonction du temps après greffe d'îlots de Langerhans(66).

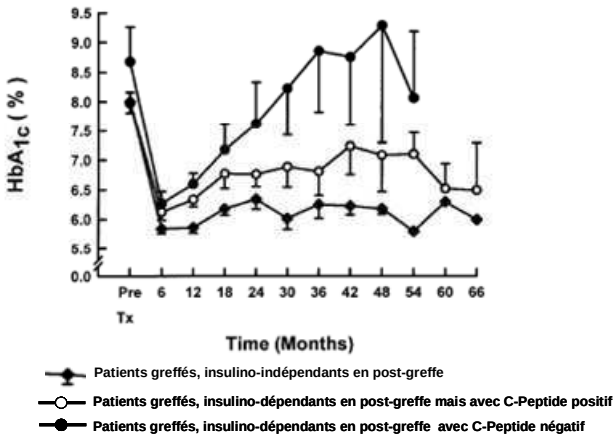
III.B.3. Résultats concernant l'équilibre glycémique

L'équilibre glycémique varie considérablement en fonction du succès de la greffe :

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

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

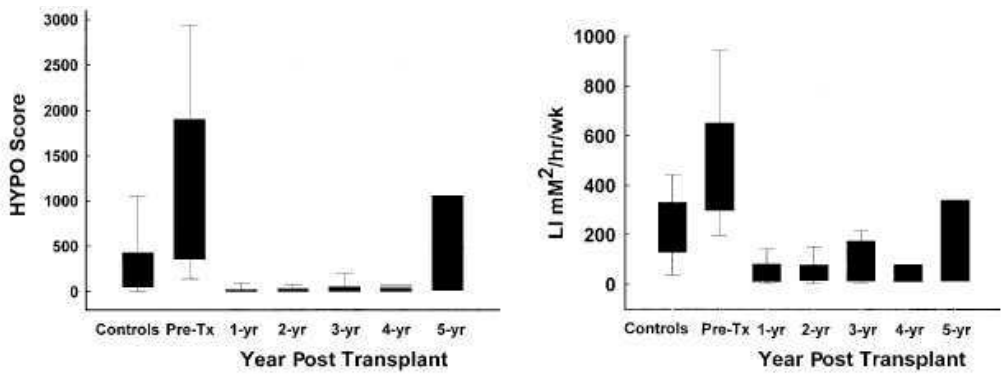
- Les patients ayant dû reprendre une insulinothérapie exogène en post-greffe et présentant un C-Peptide indosable n'améliorent pas leur équilibre glycémique. (HbA1c = 9 %)



Évolution de l'hémoglobine glyquée au cours du temps après greffe d'îlots de Langerhans (66)

III.B.4. Résultats concernant l'instabilité glycémique et les hypoglycémies

La survenue d'hypoglycémies est évaluée par ce groupe par l'HYPO score : l'HYPO score est un score composite d'évaluation des hypoglycémies basé sur la mesure de la fréquence, de la sévérité et du degré de perception des hypoglycémies par le patient. L'HYPO score est nettement diminué grâce à la transplantation d'îlots. L'instabilité glycémique, évaluée par le LI score, est également nettement améliorée au cours de la transplantation d'îlots.



Evolution de l'HYPO Score et du LI Score en fonction du temps après greffe d'îlots de Langerhans (66)

IV.C. Les obstacles à la généralisation de la transplantation d'îlots

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

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

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

- Ceux liés à des phénomènes non spécifiques affectant la viabilité et la fonctionnalité endocrine des îlots. En effet, on considère que près de la moitié de la masse d'un greffon d'îlots est perdue dans les premières semaines suivant la greffe en raison de ces phénomènes non spécifiques. Outre l'exposition aux cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β) et au NO (68, 69), les îlots pancréatiques implantés au niveau du foie doivent faire face à un microenvironnement métabolique et pharmacologique extrêmement différent de leur

environnement systémique habituel : les îlots implantés au niveau du foie bénéficient d'une vascularisation essentiellement portale. Les concentrations portales des immunosuppresseurs, du glucose et du fructose entre autres, sont entre 2 à 5 fois plus élevées que leurs concentrations systémiques. Or, il est clairement établi que de fortes concentrations de glucose altèrent la viabilité des îlots murins (70, 71) et humains (72, 73). Enfin, les îlots transplantés sont exposés à des phénomènes de type ischémie-reperfusion: les îlots, habituellement vascularisés par un réseau capillaire extrêmement dense (74), vont être complètement dépouillés de leur vascularisation au cours de la procédure d'isolement. Une fois implantés dans le parenchyme hépatique, les îlots ne vont être suppléés en oxygène et nutriments que par diffusion à partir des territoires hépatiques adjacents jusqu'au rétablissement d'une revascularisation efficace. La revascularisation des îlots s'initie entre le deuxième et le quatrième jour post-greffe et devient pleinement fonctionnelle aux alentours du quatorzième jour post-greffe (74, 75). Néanmoins, la revascularisation des îlots transplantés reste imparfaite avec une densité capillaire et un débit sanguin capillaire nettement inférieur à ceux observés au niveau des îlots natifs (76, 77). De plus, les études montrent que la PaO_2 des îlots à 1 mois et 9 mois (78, 79) post-transplantation reste basse (PaO_2 5 mmHg pour les îlots transplantés vs PaO_2 40 mmHg pour îlots natifs). Ainsi, au cours de cette période, les îlots transplantés ont à faire face, à la fois à des phénomènes d'ischémie-reperfusion mais également à une hypoxie chronique, les deux situations étant délétères pour la viabilité cellulaire β (80).

L'apoptose des cellules β pancréatiques au cours de la greffe d'îlots de Langerhans apparaît donc comme un obstacle fondamental de cette technique et la préservation de la viabilité cellulaire β comme un enjeu majeur pour garantir le succès de la transplantation.

V. PTP et viabilité cellulaire β pancréatique

V.A. PTP et cellule β

La littérature concernant le PTP dans la cellule β est assez pauvre. Koshkin *et al.* (81) ont étudié la régulation du PTP dans les cellules MIN6 et INS-1 (des modèles cellulaires murins correspondant aux cellules β) retrouvant bien un effet inhibiteur de la CsA sur le PTP. La mort cellulaire β induite par le PK11195 (un ligand du récepteur périphérique des benzodiazépines) ou par la déficience en PdX1 (facteur de transcription impliqué dans la prolifération cellulaire β) est inhibée respectivement par l'acide bonkrékique (82) et la CsA (83), deux inhibiteurs du PTP.

V.B. PTP et toxicité du glucose et du fructose

Aucune étude n'a décrit, de façon directe, un lien entre toxicité du glucose sur la cellule β pancréatique et ouverture du PTP. Néanmoins, un certain nombre de travaux décrivent des mécanismes pouvant faire suspecter une mise en jeu du PTP : l'apoptose induite par le glucose et le fructose est accompagnée d'une augmentation du stress oxydant (70, 84) et il est clairement décrit que le stress oxydant est un puissant activateur du PTP (85). Federici *et al.*(72) et Maedler *et al*. (73) ont décrit une activation des caspases 9, 8, 3, une augmentation de l'expression de Bax, Fas et une diminution de l'expression de Bcl-2 sur des cellules β *in vitro* exposées à de fortes concentrations de glucose. Enfin, le PTP est impliqué dans la toxicité du glucose sur des cellules vasculaires (86). Ainsi, l'ensemble de ces données peut suggérer une implication du PTP dans la toxicité du glucose et du fructose sur la cellule β pancréatique.

V.C. PTP et ischémie - reperfusion

Le lien entre altération de la viabilité cellulaire β induite par l'ischémie-reperfusion et ouverture du PTP n'a jamais été étudié. En revanche, dans des types cellulaires autres que la cellule β pancréatique, l'ischémie-reperfusion a largement été étudiée. L'ischémie-reperfusion est à l'origine d'un certain nombre de désordres métaboliques tels que la surcharge calcique, la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, la consommation des nucléotides adényliques, l'accumulation de phosphate, autant d'éléments favorables à l'ouverture du PTP (87, 88). La CsA, le NIM811 et la metformine (trois inhibiteurs du PTP) préviennent la mort cellulaire des cardiomyocytes soumis à l'ischémie-reperfusion et/ou réduisent la taille de l'infarctus de cœurs isolés, confortant ainsi le rôle du PTP dans la mort cellulaire induite par l'ischémie-reperfusion.

VI. OBJECTIFS

La première partie de ce travail a consisté à étudier la régulation du PTP sur une lignée de cellules β, les INS-1 afin de valider ou d'infirmer l'action des inhibiteurs connus du PTP sur ce type cellulaire. Dans un second temps, nous avons étudié l'effet du glucose et du fructose sur la viabilité cellulaire et le statut du pore de transition de perméabilité mitochondriale des cellules INS-1 et des îlots humains. Nous avons testé l'effet de la Cyclosporine A et de la Metformine sur la viabilité cellulaire et le statut du pore de transition de perméabilité mitochondriale des INS-1 et des îlots humains.

La seconde partie de notre travail s'est attachée à préciser la place du PTP dans la mort cellulaire β induite par l'ischémie-reperfusion. Nous avons étudié l'effet de l'ischémie-reperfusion sur la viabilité cellulaire β et le statut du PTP des cellules INS-1. Nous avons testé l'effet de la Cyclosporine A et de la Metformine sur la viabilité cellulaire et le statut du pore de transition de perméabilité mitochondriale des INS-1 soumises à l'ischémie-reperfusion. Dans un

second temps, nous nous sommes interrogés sur les déterminants de l'ouverture du PTP au cours de l'ischémie-reperfusion. Pour cela, nous avons étudié la cinétique de production radicalaire et son implication dans l'ouverture du PTP et préciser la part de la carence en substrat par rapport à la carence en oxygène dans le déclenchement de l'ouverture du PTP.

MATERIEL ET METHODES

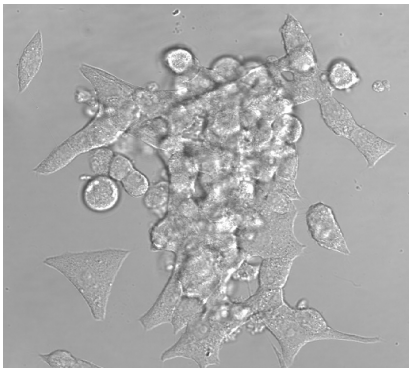
MATERIEL

I. Culture INS-1

I.A. Cellules INS-1

Compte tenu de la rareté des îlots humains, il s'est imposé le choix d'une lignée de cellules β. Une majorité de nos expériences ont été réalisées sur cellules INS-1, généreusement offertes par Mme le Dr F. De Fraipont (CHU de Grenoble).

Les INS-1 sont des lignées cellulaires issues d'insulinome de rat. Leur index de prolifération est relativement bas (temps de doublement proche de 100 h). Les INS-1 présentent des caractéristiques morphologiques typiques de cellules β natives (granules de sécrétion à centre dense et halo périphérique clair) (89).



INS-1 (Lumière transmise)

I.B. Conditions de culture

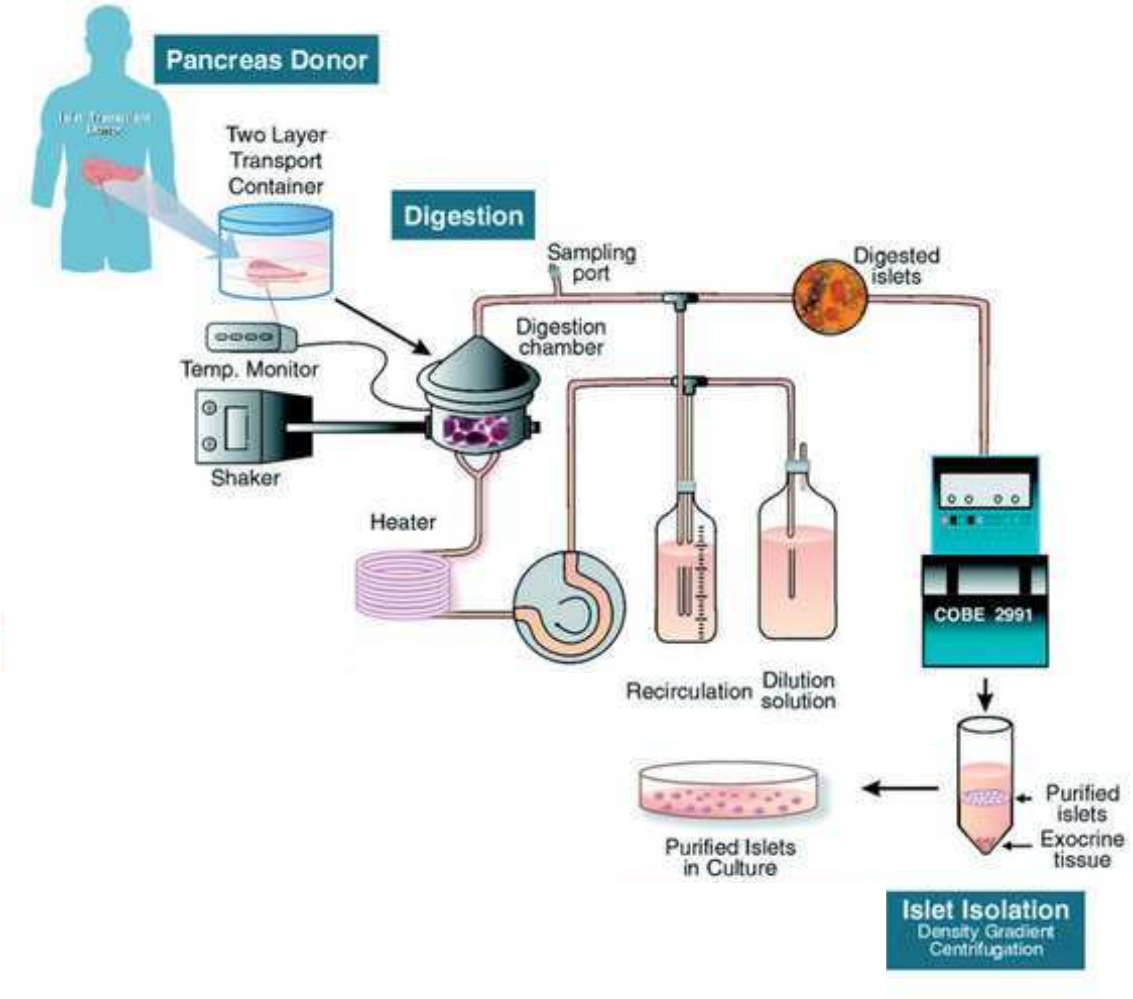
Les INS-1 sont cultivées en milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 mM d'HEPES, 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 2 mM de L-Glutamine, 100 UI/ml de Pénicilline, 100 µg/ml de Streptomycine et 50 µM de 2-Mercaptoéthanol. Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence à 37℃ dans une atmosphère humide compre nant 21% d'O_2 et 5% de CO_2. A confluence, les cellules sont récoltées après trypsination (0,05 % Trypsine - 0,02 % EDTA, 1 ml pour 5-15 millions de cellules) par centrifugation à 100 *g* à 4℃ pendant 5 min puis comptées à l'aide d'une cellule de Mallassez (89) .

II. Isolement et culture d'îlots de Langerhans humains

La technique d'isolement d'îlots de Langerhans débute par le prélèvement minutieux (sans effraction de la capsule pancréatique) du pancréas d'un donneur dans le cadre d'un prélèvement multi-organes. Le pancréas est acheminé dans les plus brefs délais vers le laboratoire d'isolement dans un liquide de conservation réfrigéré. Les îlots sont ensuite isolés selon la méthode modifiée de Ricordi (90, 91). Brièvement, le canal pancréatique est cathétérisé et le pancréas est distendu par l'infusion d'une solution de collagénase (Collagenase NB1, Serva Gmbh Heidelberg, Allemagne). Après digestion (37℃), la suspension cellulaire est purifiée par centrifugation en gradient continu Biocoll (Biochrom AG, Berlin, Germany) sur séparateur cellulaire réfrigéré (Cobe 2991 cell processor, Caridian BCT, France). Les préparations d'îlots de Langerhans qui n'ont pu être transplantées (Pureté ou quantité insuffisante) ont été utilisées pour la réalisation de nos expériences. Les îlots ont été fournis par le centre d'isolement de Genève (Suisse) et le centre d'isolement de St-Ismier (France). La pureté des préparations d'îlots utilisées dans nos expériences varie entre 30 et 70 %.

Après isolement, les îlots humains sont cultivés à 37℃ dans une atmosphère humide comprenant 21 % d'O_2 et 5 % de CO_2 en milieu CMRL 1066 (Sigma Aldrich)

supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, 25 mmol/L HEPES, 1 mM de Sodium Pyruvate, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.



Procédure d'isolement d'îlots (1)

METHODES

I. Etude de la régulation du PTP

I.A. La Capacité de Rétention Calcique

I.B.1 Perméabilisation cellulaire

La Capacité de Rétention Calcique (CRC) est basée sur l'analyse de la capacité de rétention de calcium par la mitochondrie. L'entrée de calcium dans les cellules intactes est un processus hautement régulé ne permettant le passage que de petites quantités de calcium. De plus, certains composés utilisés dans la technique de CRC comme substrat de la chaine respiratoire mitochondriale (succinate), ne franchissent pas la membrane plasmique. Ainsi, la technique de CRC sur cellules entières nécessite une étape de perméabilisation membranaire à l'aide d'un détergent : la digitonine. Cette substance se complexe au cholestérol et induit sa précipitation. La membrane plasmique étant plus riche en cholestérol que la membrane mitochondriale, l'ajout de faibles concentrations de digitonine (50 µg/ml de digitonine) au milieu d'incubation permet la perméabilisation de la membrane plasmique tout en garantissant un maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale.

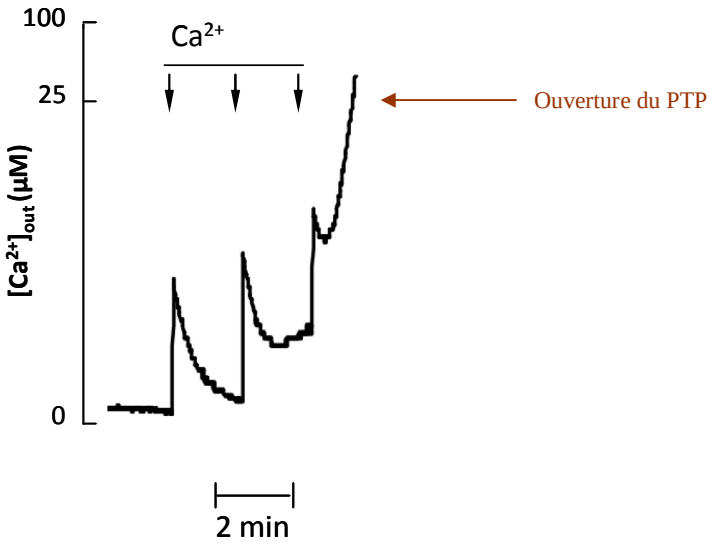
I.B.2 Mesure de la capacité de rétention calcique

La capacité de rétention calcique correspond à la quantité du calcium nécessaire à l'induction de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale après additions successives et régulières de calcium. La mesure de la CRC est réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre PTI Quantamaster C61, thermostaté et muni d'un agitateur électromagnétique. Les mouvements de calcium extra-mitochondrial sont détectés grâce à une

sonde, le Calcium Green-5N (0,25 µM), qui émet de la fluorescence en présence de calcium (Molecular Probes, Eugene, OR, Excitation max 506 nm – Emission max 527 nm).

Les cellules INS-1, récoltées par trypsination, sont reprises à la concentration de 10. 10^6 cellules/ml dans un tampon de rétention calcique contenant 10 mM de Tris Mops (pH 7,4), 250 mM de sucrose, 1 mM de Pi, 5 mM de Succinate ou 5 mM de Glutamate/2,5 mM de Malate. Les cellules sont placées dans une cuve (3.10^6 cellules / cuve) et perméabilisées par incubation 2 min en présence de 50 µg/ml de digitonine. Les mesures sont réalisées à 25°C sous agitation pendant toute la durée de l'expérience dans un volume final de 1 ml. Pour tester l'effet des inhibiteurs connus du PTP sur les cellules, 1 µM de Cyclosporine A ou 1,25 µM de Roténone sont ajoutés au tampon. Pour tester l'effet de la Metformine sur l'ouverture du PTP, les INS-1 sont préalablement incubées 24h en présence de 100 µM de Metformine.

L'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale est induite par l'addition régulière toutes les deux minutes de pulses de 12,5 µM de calcium dans le tampon contenant les cellules perméabilisées. Sous ce protocole, chaque pulse de calcium est associé à un pic de fluorescence dans le milieu extra-mitochondrial. Le calcium est rapidement capté par les mitochondries permettant un retour de la fluorescence à l'état basal. Lorsque la concentration de calcium intra-mitochondrial nécessaire à l'induction de la perméabilité de transition est atteinte, on assiste à une ouverture du PTP matérialisée par un relargage massif de calcium dans le milieu extra-mitochondrial. Cette technique permet la mesure et la quantification de l'action de composés susceptibles d'activer ou d'inhiber l'ouverture du PTP. Ainsi, une molécule inhibitrice du PTP augmente la capacité de rétention calcique des cellules tandis qu'une molécule inductrice de l'ouverture du PTP diminue la CRC.

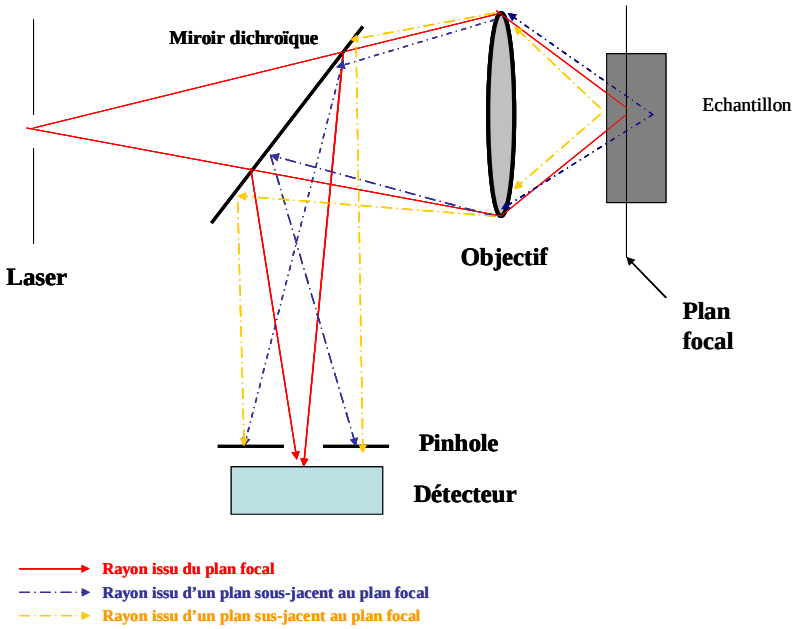


Capacité de rétention calcique des INS-1

I.B. Etude de la régulation du PTP par microscopie confocale

I.B.1 Principe de la Microscopie Confocale à Balayage Laser

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



Principe de la microscopie confocale

I.B.2 Etude de la régulation du PTP par microscopie confocale

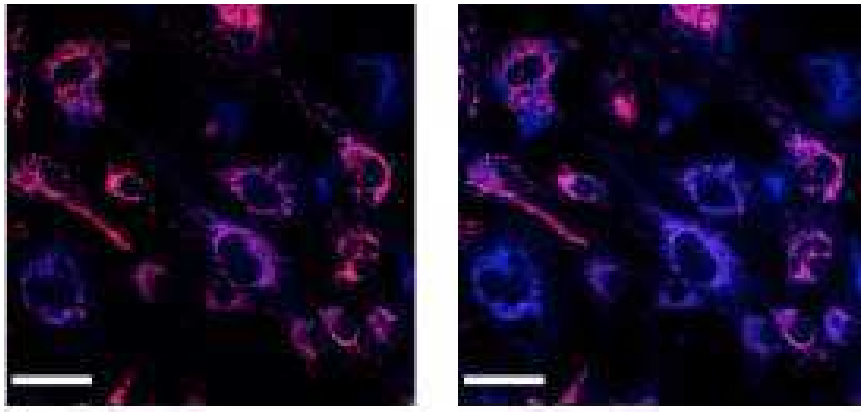
La régulation du PTP sur cellules INS-1 et sur îlots humains vivants a été étudiée selon la méthode décrite par Dumas et *al*.(92) : les cellules sont observées à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SP2 AOBS, LEICA Microsystems Heidelberg, Germany) équipé d'une chambre d'incubation (21 % O_2 - 5 % CO_2 - 37°C, PeCom, Erbach, Germany). Cette chambre d'incubation permet le maintien de conditions thermiques et gazométriques optimales garantissant le maintien en vie des cellules pendant toute la durée de l'observation sous microscope.

Les cellules sont incubées pendant une heure en présence de 10 nM de TMRM (Tétra Méthyl Rhodamine Méthyl Ester) (Excitation max 549 nm - Emission 573 nm (Signal de Fluorescence rouge)). Le TMRM est une sonde fluorescente cationique lipophile diffusant librement au travers des membranes. Compte tenu de sa charge, le TMRM s'accumule fortement au sein de la matrice mitochondriale et permet ainsi le marquage des mitochondries polarisées. En cas de dépolarisation mitochondriale, le TMRM diffuse hors de la matrice mitochondriale ; on assiste alors à

une diminution de l'intensité de fluorescence des mitochondries. Le principe de la technique décrite par Dumas *et al.* consiste à étudier la fluorescence et la localisation du NAD(P)H (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) par rapport au signal TMRM : le NADH, substrat du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, est majoritairement localisé au niveau intra-mitochondrial. Le NAD(P)H est auto fluorescent en lumière ultra-violette (Excitation max 360 nm - Emission max 460 nm (Signal de fluorescence bleu)). Lorsque le PTP est fermé, le NAD(P)H majoritairement intra-mitochondrial, est co-localisé avec le signal TMRM.

L'ouverture permanente du PTP se traduit en microscopie confocale par :

- une augmentation de l'intensité du NAD(P)H.
- une sortie du NAD(P)H de la mitochondrie matérialisée par une délocalisation du signal NAD(P)H par rapport au signal TMRM.
- une dépolarisation mitochondriale.



Ouverture du PTP des cellules HMEC-1 en microscopie confocale. D'après Dumas et al. (92)

Pour autoriser la superposition des images de NAD(P)H et de TMRM, les deux canaux de fluorescence sont observés avec la même ouverture du pinhole (Airy 2.03). L'acquisition des images a nécessité une ouverture de pinhole Airy 2.03 compte tenu du faible signal d'auto fluorescence du NAD(P)H.

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

I.B.3 Etude du statut du PTP des cellules soumises à stress

I.B.3.1. Stress Glucose

Les INS-1 ou les îlots incubés pendant 24h en présence de 11 mM (contrôle) ou 30 mM de D-Glucose, en présence ou non de Cyclosporine A 1 µM ou de Metformine 100 µM sont analysés en microscopie confocale selon la technique exposée ci-dessus.

I.B.3.2. Stress Fructose

Les INS-1 ou les îlots incubés pendant 24h en présence ou non de 2,5 mM de D-Fructose (équivalent à la concentration portale humaine de fructose) et en présence ou non de Cyclosporine A 1 µM ou de Metformine 100 µM sont analysés en microscopie confocale selon la technique exposée ci-dessus.

I.B.3.3. Ischémie-reperfusion simulée

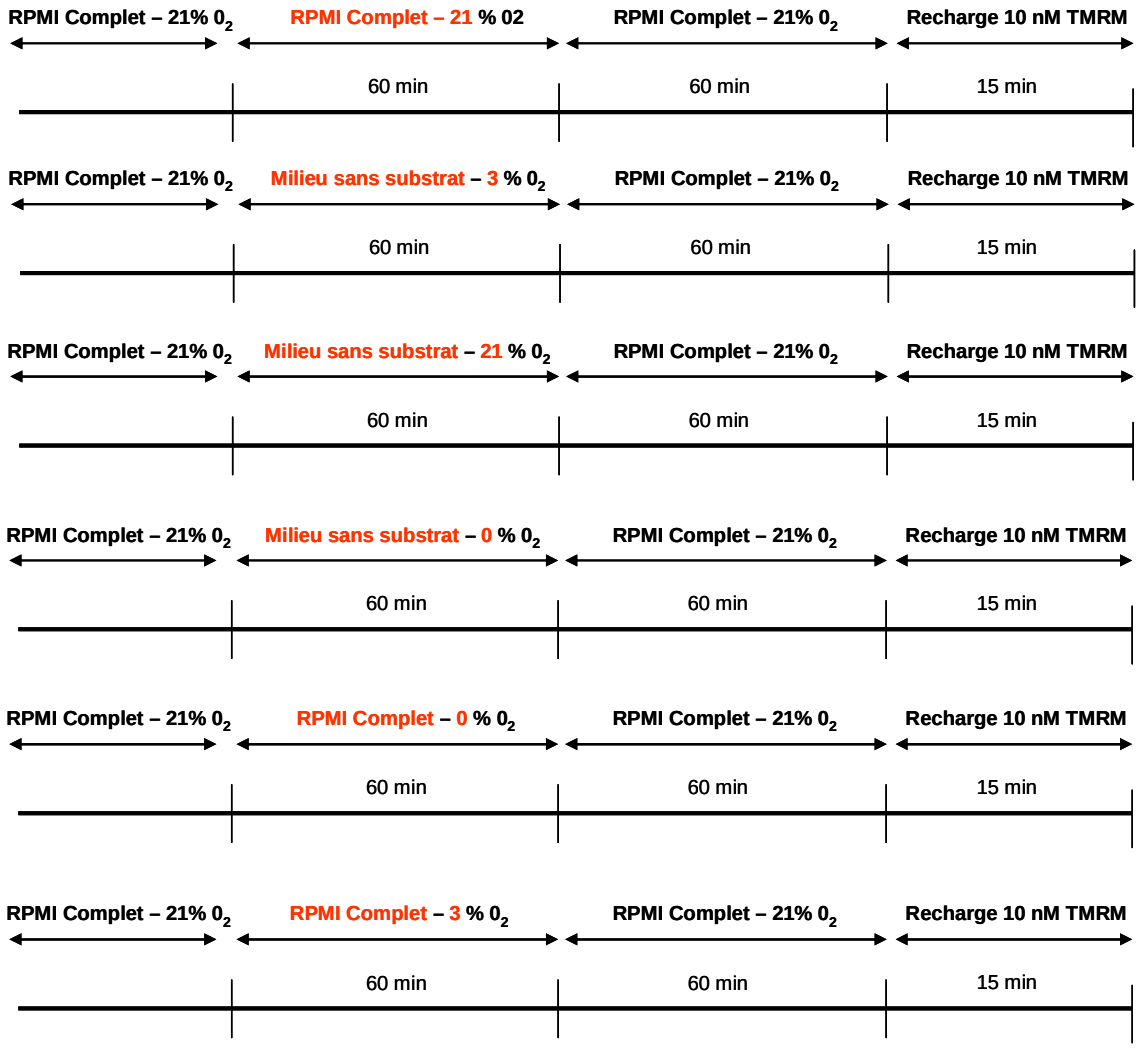
Les cellules INS-1, ensemencées sur des lamelles en verre (10^6 cellules/lamelle), incubées une heure en présence de 10 nM TMRM, sont installées dans la chambre d'incubation du microscope confocal. En situation basale, les cellules INS-1 sont observées dans leur milieu RPMI 1640 complet habituel sous conditions gazométriques et thermiques habituelles (37°C, 21 % O_2, 5 % CO_2). Pour simuler une ischémie, le milieu RPMI 1640 complet est retiré de la lamelle et remplacé par un milieu sans substrat contenant NaCl (102,7 mM), KCl (5,36 mM), $NaHCO_3$ (23 mM), $MgSO_4$, $7H_2O$ (0,83 mM), Na_2HPO_4 (5,65 mM), $Ca(NO_3)_2 4H_2O$ (0,42 mM), HEPES (10 mM), Glutathion

réduit (3,2 µM) préalablement bullé avec un mélange 95 % N_2 – 5 % CO_2 pendant 20 min. La teneur en O_2 de la chambre d'incubation est abaissée à 3 %. La teneur en CO_2 de la chambre d'incubation est contrôlée par un CTI-Controller (LEICA). La teneur en O_2 de la chambre d'incubation est quant à elle contrôlée par un O_2-Controller (LEICA) qui permet de moduler la teneur en O_2 de la chambre d'incubation de 0% à 20.8%. La concentration en oxygène est régulée par injection par l'O2-Controller d'azote pur dans la chambre d'incubation. Au terme de la période d'ischémie simulée, le milieu sans substrat est retiré et du milieu RMPI 1640 complet est appliqué sur la lamelle. La teneur en O_2 de la chambre d'incubation est restaurée à 20.8 %. Sous ce protocole, une acquisition d'image de la fluorescence du NAD(P)H et du TMRM est réalisée toutes les 10 min.

La procédure d'ischémie-reperfusion simulée nécessite deux changements de milieux (un à l'initiation de l'ischémie simulée et un à la reperfusion). Ces deux changements de milieux peuvent conduire à une perturbation de l'équilibre du TMRM avec « effet de lavage » du TMRM aboutissant à une diminution de fluorescence totalement indépendante d'une dépolarisation mitochondriale. Pour s'affranchir de ce problème lié à la technique et restaurer une concentration de TMRM garantissant un marquage fiable du potentiel mitochondrial, 10 nM de TMRM sont ajoutés au RMPI 1640 complet au terme de l'heure de reperfusion.

Pour analyser la part de la carence en substrat versus la carence en oxygène dans le déclenchement de l'ouverture du PTP, différentes associations de conditions ont été testées sur les cellules INS-1.

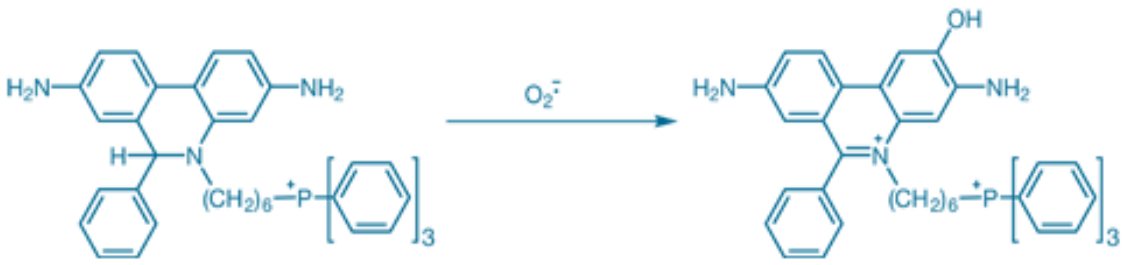
L'ensemble des conditions testées est résumé sur la figure ci-dessous :



Afin d'étudier l'effet des inhibiteurs potentiels du PTP sur les INS-1, les cellules sont incubées pendant une heure en présence de 1 µM de Cyclosporine A ou 100 µM de Metformine 24 heures avant la soumission au protocole d'ischémie-reperfusion simulée. De même, afin de déterminer l'impact du stress oxydant dans le déclenchement de l'ouverture du PTP, les cellules sont incubées une heure en présence de 5 mM N-Acétyl-Cystéine avant la soumission au protocole ischémie-reperfusion simulée.

II. Mesure de la production radicalaire

Au cours des expériences d'ischémie-reperfusion simulée, la mesure semi-quantitative de la production radicalaire a été réalisée à l'aide d'une sonde fluorescente, le Mitosox^{TM} Red (Molecular Probes. Excitation max 510 nm – Emission max 580 nm). Cette sonde est un dérivé de l'hydroethidine sur lequel est fixé de façon covalente un groupe triphosphonium (TPP+). Le groupe TPP^+ est entouré de trois groupes phényles lipophiles. La charge positive et la nature lipophilique du groupe TPP^+ permettent la libre diffusion du Mitosox^{TM} Red au travers des membranes phospholipidiques et l'accumulation de la sonde au sein de la matrice mitochondriale. Une fois dans la mitochondrie, le Mitosox^{TM} Red peut être oxydé par le superoxide en 2-hydroxy-5-(triphenylphosphonium)hexylethidium, fluorescent dans le rouge. La fixation du 2-hydroxy-5-(triphenylphosphonium)hexylethidium à l'ADN intensifie l'émission de fluorescence (93).



Mitosox ^{TM} Red **2-OH-5-(triphenylphosphonium)hexylethidium**

Les cellules ensemencées sur lamelle (10^6 cellules / lamelles) incubées en présence de Mitosox^{TM} Red (1 µM pendant 20 min) en présence ou non de N-Acétyl–Cystéine (5 mM, incubation une heure) sont installées dans la chambre d'incubation du microscope confocal. La cinétique d'évolution de la fluorescence du Mitosox^{TM} Red au cours des différentes conditions d'ischémie-reperfusion / carence en substrat / carence en oxygène est déterminée par l'acquisition d'une image toutes les 10 min durant toute la procédure.

III. Etude de la mort cellulaire

III.A. Quantification de la mort cellulaire par cytométrie en flux

III.B.1 Principe de la cytométrie en flux

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

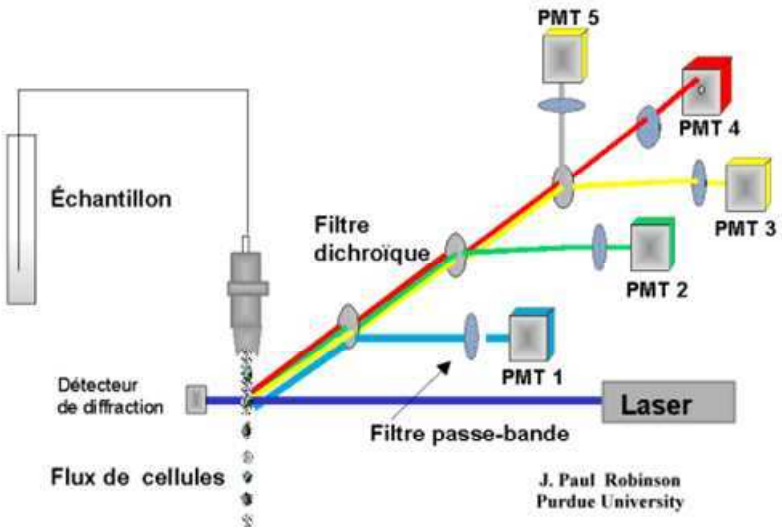
La cytométrie en flux consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

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

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

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

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.



Principe général de la cytométrie en flux.

III.B.2 Stress cellulaire et traitement par les inhibiteurs du PTP

III.A.2.1. Stress Glucose

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

III.A.2.2. Stress Fructose

Les INS-1 ou les îlots humains sont incubés pendant 72 h en présence ou non de 2,5 mM de D-Fructose et en présence ou non de Cyclosporine A 1 µM (Incubation 1h) ou de Metformine 100 µM (Incubation 24h)

III.A.2.3. Stress de type ischémie-reperfusion

1. Les systèmes à hypoxie

Deux systèmes ont été utilisés pour induire une hypoxie cellulaire :

- Utilisation d'une étuve à hypoxie HAERUS BB6220 qui permet la variation de la concentration en O_2 à l'intérieur de l'étuve entre 3 % et 21 %. L'abaissement de la teneur en O_2 se fait grâce à l'injection d'azote pur dans l'enceinte de l'étuve.

- Mise au point d'une « cloche » à hypoxie : les cellules INS-1 ensemencées dans une Labteck^{TM} sont disposées sur un support placé dans une cuve remplie d'eau en son fond. Une cloche vient recouvrir les cellules, maintenue par un poids de 1 Kg. Une fine tubulure reliée à une bonbonne de 95 % N_2 et 5 % CO_2 est introduite sous la cloche. L'ouverture du manomètre de la bonbonne conduit à un bullage de 95 % N_2 et 5 % CO_2 dans l'enceinte de la cloche et l'obtention d'une concentration en O_2 de 0 %.

2. Stress Carence en substrat et carence en O_2 (3 % et 0% O_2)

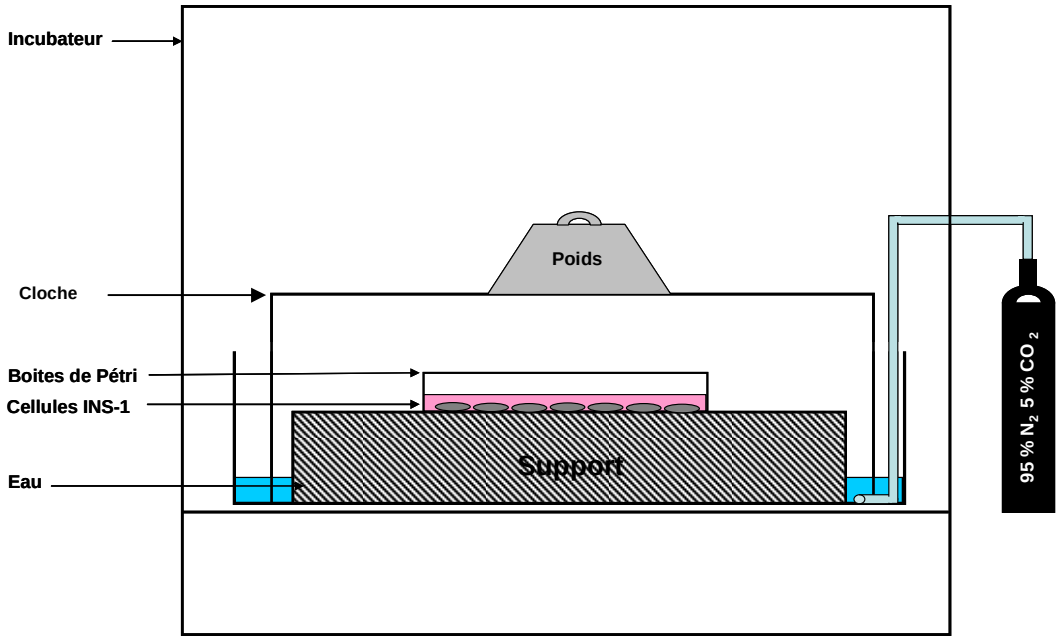
Au début de l'ischémie simulée, le RPMI 1640 complet des INS-1, préalablement incubées ou non en présence de Cyclosporine A 1 µM (Incubation 1h) ou de Metformine 100 µM (Incubation 24h) ou N-Acétyl-Cystéine 5mM (Incubation 1h), est retiré et remplacé par le milieu sans substrat précédemment décrit. Les cellules INS-1 sont placées pendant une heure dans une étuve à hypoxie HAERUS BB6220 (3 % O_2 – 5 % CO_2) ou dans une cloche à hypoxie (Cf. Schéma ci-dessous) (0 % O_2– 5 % CO_2). Au terme de l'heure d'ischémie simulée, le milieu sans substrat est retiré et remplacé par du milieu RPMI 1640 complet. Les cellules INS-1 sont replacées dans leur étuve pendant 48 heures (21 % O_2– 5 % CO_2).

3. Stress Carence isolée en substrat

Au début de la procédure, le RPMI 1640 complet des INS-1, préalablement incubées ou non en présence de Cyclosporine A 1 µM (Incubation 1h) ou de Metformine 100 µM (Incubation 24h), est retiré et remplacé par le milieu sans substrat précédemment décrit. Les cellules INS-1 sont placées pendant une heure dans leurs conditions gazométriques habituelles (21 % O_2 – 5 % CO_2). Au terme de l'heure de carence isolée en substrat, le milieu sans substrat est retiré et remplacé par du milieu RPMI 1640 complet. Les cellules INS-1 sont replacées dans leur étuve pendant 48 heures (21 % O_2– 5 % CO_2).

4. Stress Carence isolée en O_2 (3 % ou 0 % O_2)

Au début la procédure, les cellules INS-1 sont conservées dans leur milieu RPMI 1640 complet et placées une heure dans une étuve à hypoxie HAERUS BB6220 (3 % O_2–5 % CO_2) ou une cloche à hypoxie (0 % O_2– 5 % CO_2). Au terme de l'heure de carence isolée en O_2, les cellules INS-1 sont replacées dans leur étuve pendant 48 heures (21 % O_2 – 5 % CO_2).



Cloche à hypoxie

III.B.3 Double marquage Annexin-V et Iodure de propidium

Pour la détection de l'apoptose par cytométrie en flux, nous avons utilisé un double marquage des cellules par l'Annexin-V couplée au FluoProbes 488 (Excitation 490 nm - Emission 520 nm) et l'Iodure de Propidium (Excitation max 535 nm – Emission max 617 nm) (MolecularProbes, Interchim) (94, 95).

Le principe de détection de l'apoptose par l'Annexin-V est basé sur la variation de localisation des résidus phosphatidylsérines dans la membrane plasmique des cellules. Normalement exposées vers l'intérieur de la cellule, les résidus phospatydilsérines sont externalisés à la surface de la membrane plasmique au cours de la phase précoce de l'apoptose. Ainsi exposés, les résidus phosphatidylsérines peuvent être aisément fixés par l'Annexin-V. L'Iodure de Propidium (IP) se lie sélectivement et quantitativement au niveau de l'ADN en s'intercalant entre les paires de bases nucléotidiques. L'IP ne traverse pas la membrane des cellules vivantes. Au cours de l'apoptose tardive, il existe une fragmentation de la membrane cellulaire permettant l'accès de l'IP à l'ADN. L'IP permet donc le marquage des cellules en cours d'apoptose tardive ou au cours de la nécrose.

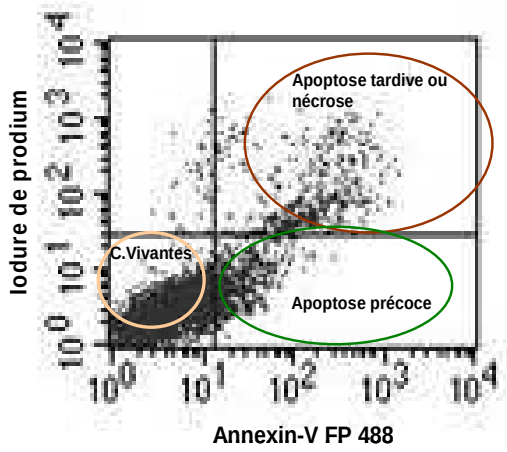
Pour l'analyse des cellules par cytométrie en flux, les cellules INS-1 ou les îlots humains exposés aux différentes conditions d'induction de la mort cellulaire (30 mM glucose, 2,5 mM fructose, ischémie-reperfusion) sont récoltés par trypsination et centrifugés. Le culot cellulaire est repris dans 100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

L'acquisition des données concernant les cellules INS-1 pour les expériences de stress glucose et fructose (≈ 5 000 cellules/point) est réalisée à l'aide d'un cytomètre en flux FACSCAN (Becton-Dickinson Biosciences, San José, CA) équipé d'un laser argon (15 mW-488 nm).

Le logiciel d'acquisition utilisé est CellquestPro (Becton-Dickinson Biosciences). L'acquisition des données concernant les îlots humains et les cellules INS-1 pour les expériences d'ischémie-reperfusion (≈ 5 000 cellules/point) est réalisée à l'aide d'un cytomètre en flux BD LSRFortessa^{TM} (Becton-Dickinson Biosciences) équipé d'un laser Coherent Compass (532 nm) et d'un laser Coherent Saphire (488 nm). Le logiciel d'acquisition utilisé est BD FACsDiva^{TM} (Becton-Dickinson Biosciences).

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

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



Cytogramme des cellules INS-1 témoins

IV. Analyse d'images

L'analyse d'image s'est faite à l'aide des logiciels Image J® (logiciel gratuit du NIH Image) et Volocity® (Improvision, France). Le programme Image J permet de réduire le bruit de fond et d'attribuer la valeur zéro au bruit de fond. Ceci permet par la suite de fixer facilement un seuil d'analyse pour les intensités de fluorescence du NAD(P)H et du TMRM : toute valeur différente de zéro sera ainsi prise en compte pour l'analyse des intensités de fluorescence par le logiciel Volocity®. L'intensité de fluorescence étant dépendante du nombre de cellules présentes dans le champ analysé, nous avons arbitrairement rapporté l'intensité de fluorescence basale à 100 de façon à pouvoir comparer les variations d'intensités de fluorescence de cellules différentes.

V. Analyse statistique

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

RESULTATS

Etude I

Régulation du PTP sur cellules INS-1

Implication du PTP dans la mort cellulaire des cellules INS-1 induite par 30 mM de glucose et 2,5 mM de fructose

RESUME

L'hyperglycémie est délétère pour la viabilité cellulaire β pancréatique, jouant un rôle majeur dans la perte de la masse cellulaire β. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) est un canal mitochondrial impliqué dans le déclenchement de la mort cellulaire. Des données récentes sur des cellules endothéliales humaines suggèrent que les inhibiteurs du PTP préviennent la mort cellulaire induite par l'hyperglycémie. Dans ce travail, nous avons exploré l'implication de l'ouverture du PTP dans la mort cellulaire de cellules INS-1 induite par de fortes concentrations de glucose et de fructose. La régulation du PTP a été étudiée par mesure de la capacité de rétention calcique sur cellules INS-1 perméabilisées et par microscopie confocale sur cellules INS-1 intactes. La mort cellulaire est analysée par cytométrie en flux. Nous montrons que la Metformine et la Cyclosporine A (CsA) préviennent l'ouverture du PTP induite par le calcium sur INS-1 perméabilisées et intactes. Nous démontrons que l'incubation des INS-1 en présence de 30 mM de glucose ou 2,5 mM fructose déclenche une ouverture du PTP et induit la mort cellulaire. Comme la Metformine et la CsA préviennent l'ouverture du PTP et réduisent la mort cellulaire induite par le glucose et le fructose, nous concluons que l'ouverture du PTP est impliquée dans la gluco-fructotoxicité. Prévenir l'ouverture du PTP peut être une approche intéressante pour préserver la viabilité cellulaire β.

Protection of pancreatic INS-1 beta cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting Mitochondrial Permeability Transition with Cyclosporin A or Metformin

Running title : INS-1 cells death via mitochondrial pathway

Sandrine Lablanche[1], Cécile Cottet-Rousselle[1], Fréderic Lamarche[1], Pierre-Yves Benhamou[2], Serge Halimi[3], Xavier Leverve[2†] & Eric Fontaine[2*]

[1]Inserm U1055, Grenoble; Joseph Fourier University, Grenoble, F-38041, France

[2]Inserm U1055, Grenoble; Joseph Fourier University; Grenoble University Hospital, Grenoble, F-38043, France

[3]Grenoble University Hospital, Grenoble, F-38043, France

† Prof Xavier Leverve (1950-2010), in memoriam

* Corresponding author :

Professor Eric Fontaine, MD PhD

INSERM U1055 – LBFA, Joseph Fourier University, BP 53, 38041 Grenoble Cedex, France

Phone: +33 476 635601

Fax: +33 476 514218

eric.fontaine@ujf-grenoble.fr

Publié dans Cell Death and Disease (2011); doi:10.1038/cddis.2011.15

ABSTRACT

Hyperglycemia is detrimental to β cell viability, playing a major role in the progression of β cell loss in diabetes mellitus. The permeability transition pore (PTP) is a mitochondrial channel involved in cell death. Recent evidence suggests that PTP inhibitors prevent hyperglycemia-induced cell death in human endothelial cells. In this work, we have examined the involvement of PTP opening in INS-1 cell death induced by high levels of glucose or fructose. PTP regulation was studied by measuring the Calcium retention capacity in permeabilized INS-1 cells and by confocal microscopy in intact INS-1 cells. Cell death was analyzed by flow cytometry. We first reported that Metformin and Cyclosporin A (CsA) prevented Ca^{2+}-induced PTP opening in permeabilized and intact INS-1 cells. We then shown that incubation of INS-1 cells in the presence of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose induced PTP opening and led to cell death. Because both Metformin and CsA prevented glucose and fructose induced PTP opening, and hampered glucose and fructose induced cell death, we conclude that PTP opening is involved in high glucose and high fructose induced INS-1 cell death. We therefore suggest that preventing PTP opening might be a new approach to preserve β cell viability.

Keywords : Permeability transition, Glucotoxicity, Fructose, INS-1, Cyclosporin, Metformin.

Abreviations : **PTP** : permeability transition pore ; **CsA** : Cyclosporin A ; **CyD** : cyclophilin D, **CRC** : Ca2+ retention capacity ; **TMRM** : tetramethylrhodamine methyl ester.

INTRODUCTION

Under physiological condition, glucose serum concentration fluctuates between 3.6 and 7 mM (96), while fructose serum concentration remains below the limit of detection by enzymatic methods (97). Under diabetic conditions, fructose serum concentration increases, most probably because glucose is converted into fructose via the polyol pathway (98, 99). Moreover, the splanchnic territory is physiologically exposed to high concentrations of glucose and fructose during the postprandial period (100). Therefore, β-cells can face hyperglycemia or hyperfructosemia in type 2 diabetes or when pancreatic islets are transplanted into the splanchnic territory.

The permeability transition pore (PTP) is a Ca^{2+}-sensitive mitochondrial inner membrane channel (85, 101). Normally closed in order to allow ATP synthesis, the PTP leads to mitochondrial depolarization and cell death after extended opening (6). Ca^{2+} is the single most important factor for PTP opening. The amount of Ca^{2+} required to open the pore varies according to a number of factors. “PTP-inhibitors” and so-called “PTP-inducers” refer to factors that increase and decrease the amount of Ca^{2+} required to induce PTP opening (102). Cyclosporin A (CsA) is the reference PTP inhibitor, whereas oxidative stress is well recognized as favoring PTP opening (85). In several cell types, direct or indirect inhibition of respiratory chain complex 1 inhibits PTP opening (55, 56, 86). In such cells, the antidiabetic drug metformin inhibits PTP opening via a mild inhibition of complex 1 (86).

Chronic exposure to elevated glucose or fructose concentrations impairs β-cells survival (70, 103) by a mechanism that may involve oxidative stress (70, 84, 104). Hyperglycemia-induced oxidative stress has been shown to induce mitochondrial permeability transition and subsequent cell death in human endothelial cells (86). Concerning pancreatic-derived cells, CsA has been shown to inhibit Ca^{2+}-induced PTP opening in permeabilized INS-1 and MIN-6 cells (105). It has been proposed that cytokine-induced apoptosis may be due to PTP opening in

pancreatic RINm5F cells (106) while CsA has been reported to prevent PK11195-induced cell death in isolated human pancreatic islets (82). Finally, it has recently been shown that CsA protects MIN-6 cells against Pdx1 insufficiency-induced cell death while genetic ablation of the endogenous PTP-inducers CyD prevents diabetes in $Pdx1^{+/-}$ mice (107). Whether metformin regulates PTP opening in β-cells and whether hyperglycemia or hyperfructosemia induces PTP opening in pancreatic-derived cells has not been studied yet.

MATERIEL ET METHODS.

Cell culture.

Isolated insulinoma cell lines INS-1, a generous gift of Dr. F. De Fraipont (CHU-Grenoble), were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 10 % heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, and 50 mM 2-mercaptoethanol. Cells were incubated at 37℃ in a humidified atmosphere (95 % air – 5 % CO_2).

Calcium retention capacity assessment.

Cells were permeabilized immediately before experiment by incubation for 2 min at 25℃ in a buffer containing 10 mM MOPS (pH 7.35), 250 mM sucrose, 1 mM Pi–Tris, 5 mM succinate and 100 µg/mL digitonin. The calcium retention capacity was measured fluorimetrically using a PTI Quantamaster C61 spectrofluorimeter in the presence of 0.25 µM Calcium Green (Molecular Probes) with excitation and emission wavelengths set at 506 and 527 nm, respectively.

Imaging.

INS-1cells set on a Lab-Tek^{TM}-Chamber Slide ^{TM} System were studied by time-lapse laser confocal microscopy at 37 ℃ in a humidified atmosp here (95% air, 5% CO_2) using a microscope equipped with a perfusion chamber (POC chamber, LaCom, Erbach, Germany) and an incubation system (O_2-CO_2-℃, PeCom, Erbach, Germany). Images were collected with a Leica TCS SP2 AOBS inverted laser scanning confocal microscope equipped with a Coherent 351–364 UV laser using a 63X oil immersion objective (HCX PL APO 63.0 X 1.40 W Corr). Laser excitation was 351–364 nm for NAD(P)H, and 543 nm for TMRM. Fluorescence emission adjusted with AOBS was 390–486 nm for NAD(P)H, and 565–645 nm for TMRM. In order to allow overlay of NAD(P)H and TMRM signals, image acquisition was set with the same pinhole aperture (Airy 2.03), necessarily increased because of the low signal of NAD(P)H autofluorescence. Each experiment was performed on a randomly chosen field containing 15–25 cells. Background noise of NADH autofluorescence was removed by fine filter (Kernel 3x3) using Volocity software. Image quantification was performed using the ImageJ (NIH images) and Volocity (Improvision) softwares as described in (92).

Cell death induction and drug treatments.

For glucose-induced cell death, cells were incubated for 72 h in complete RPMI 1640 medium supplemented with 19 mM D-glucose (final concentration, 30 Mm D-Glucose). Osmotic control was performed supplementing RPMI 1640 medium with 19 mM Mannitol. For fructose-induced cell death, cells were exposed for 72 h to 2.5 mM D-fructose. Before these treatments, INS-1 cells were incubated in the presence -or not- of 1 µM CsA for 1 h or 100 µM metformin for 24 h.

Quantification of Cell Death by Flow Cytometry.

Apoptosis analyses were performed with a double-stain system using Annexin V (Interchim) combined with FluoProbes 488 and Propidium Iodide (PI) (Sigma Aldrich). INS-1 cells were detached by trypsination, washed by centrifugation, and incubated with 100 µl of Annexin-V buffer 1X (10 mM HEPES NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ and 1.8 mM $CaCl_2$). Cells were then incubated for 15 min at room temperature in the dark in the presence of 5 µl of AnnexinV-FP488. Labeled cells were transferred in a 5 ml propylene tube containing 900 µl PBS. 10 µl from a 1mg/ml stock solution of PI were added to the suspension and immediately analyzed.

Data acquisition (~5 000 cells) was carried out using a FACSCAN flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences) equipped with a 15-mW argon ion laser tuned at 488 nm, using the Cell Quest Pro software (Becton-Dickinson Biosciences). Data were plotted as a function of fluorescence intensity on FL-1 (530 nm/30nm band–pass filter) (Annexin V) and FL-3 channels (PI) (585-42 nm band pass filter). The Annexin V−/PI− population was regarded as normal healthy cells.

Statistics.

Results are presented as means ± SE. The statistical significance of differences was analyzed using Student *t* test. Values were considered to be different from one another when *p* values were lower than 0.05.

RESULTS.

CsA and metformin inhibit PTP opening in permeabilized INS-1 cells.

The Ca^{2+} retention capacity (CRC) represents the minimum Ca^{2+} load required to induce PTP opening in an entire population of mitochondria. Therefore, CRC measurement represents a suitable method to quantify and compare the potency of different PTP regulators. CRC is measured by loading mitochondria with a train of Ca^{2+} pulses until a rapid Ca^{2+} release occurs as illustrated in Figure 1A. As shown in Figure 1B, CsA increased CRC (i.e. inhibited PTP opening) in permeabilized INS-1 cells. Interestingly, complex 1 inhibitor rotenone also inhibited PTP opening in that cell line. Accordingly, metformin also inhibited PTP opening but to a lower extent, which was expected because metformin is less potent than rotenone in complex 1 inhibition (108).

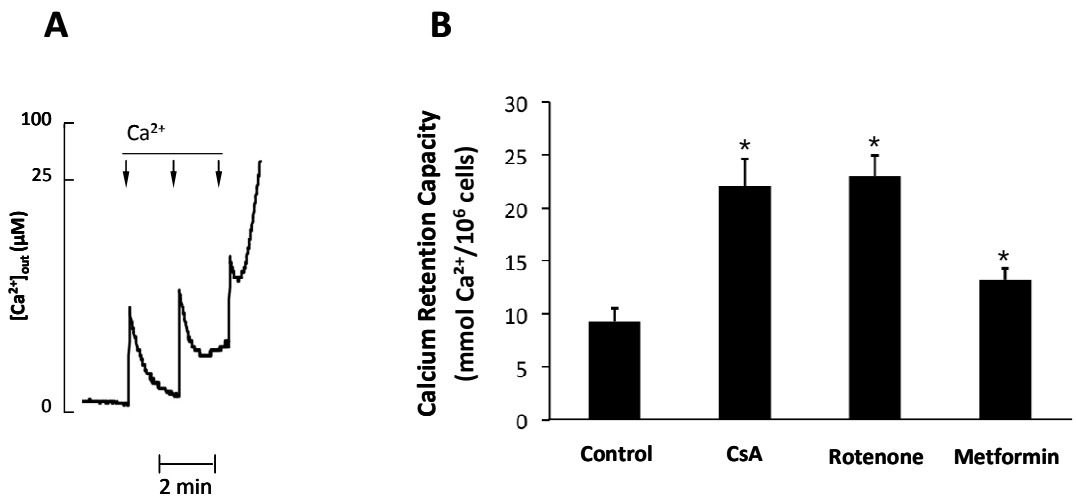


Figure 1. Effect of CsA, rotenone and metformin on the Ca^{2+} retention capacity of digitonin-permeabilized INS-1 cells. *Panel A*. The incubation medium contained 250 mM sucrose, 1 mM Pi, 10 mM Tris-MOPS, 5 mM succinate, 0.25 µM Calcium Green-5N and 50 µg/ml digitonin. The final volume was 1 ml (pH 7.35) at 25°C. Experiments were started by the addition of 3.10^6 INS-1 cells. Where indicated, 12.5 µM Ca^{2+} pulses were added (*arrows*). *Panel B* represents cumulative data of three different experiments performed as described in panel A, in control cells, in the presence of 1 µM CsA or 1.25 µM rotenone or in cells incubated overnight in the presence of 100 µM metformin. Results are mean ± SE; *, $p<0.05$ versus control, unpaired Student's *t* test.

CsA and metformin prevent PTP opening in intact INS-1 cells.

We next checked that CsA and metformin inhibited PTP opening in intact INS-1 cells. PTP status was assessed by double channel imaging of NAD(P)H autofluorescence and mitochondrial electrical membrane potential (i.e. TMRM fluorescence) as recently described (92), while Ca^{2+}-induced PTP opening was triggered off by exposing INS-1 cells to the Ca^{2+} ionophore A23187. As shown in Figure 2 (left panels), A23187-induced PTP opening was followed by an increase in NAD(P)H autofluorescence both in terms of intensity and surface distribution. On the contrary, TMRM fluorescence decreased in term of intensity but not in term of surface distribution, resulting in an increase in NAD(P)H/TMRM surface distribution ratio. No change in the NAD(P)H and TMRM fluorescence was observed in the absence of A23187 (data not shown). As shown in Figure 2 (middle and right panels), A23187 did not affect NAD(P)H and TMRM signals when PTP opening was prevented by either CsA or Metformin.

These data indicate that PTP opening increases the NAD(P)H/TMRM surface distribution ratio in INS-1 cells, as previously shown in human endothelial cells (92).

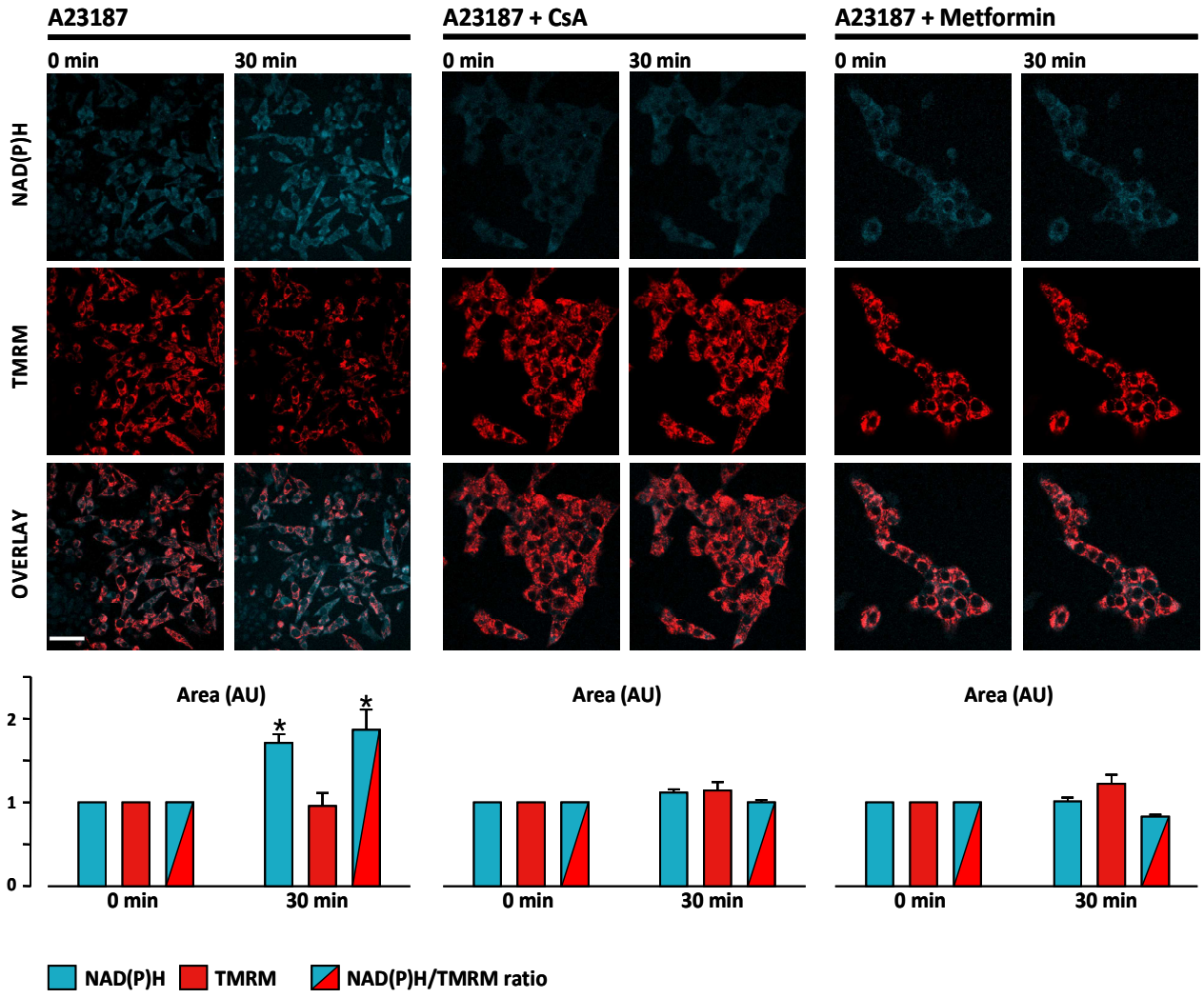


Figure 2. Double channel imaging of NAD(P)H autofluorescence and mitochondrial electrical membrane potential. INS-1 cells incubated in the absence (control) or presence of 1 µM CsA or incubated overnight in the presence of 100 µM metformin were loaded with 10 nM TMRM and exposed to 150 nM A23187. The fluorescence of NAD(P)H (blue) and TMRM (red) was imaged simultaneously every 5 minutes. TMRM and NAD(P)H quantification was calculated with Volocity software using a threshold value of 3 and 50, which corresponded to the highest fluorescence outside cells for TMRM and NAD(P)H, respectively. "Area" represents the sum of all the pixels above the threshold. For easier comparisons, areas were normalized (divided by the corresponding area before A23187 addition) before NAD(P)H/ TMRM ratios were calculated. Histograms represent the results of three different experiments. Results are mean ± SE; *, $p<0.05$ versus 0 min, paired Student's *t* test. Scale bar, 47 µm.

High glucose and high fructose open PTP in INS-1 cells.

We next measured the NAD(P)H and TMRM fluorescence of INS-1 cells incubated in control conditions or in the presence of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose for 24 h. Note that comparisons were performed only between images acquired the same day with exactly the same microscope settings and the same load of TMRM. As shown in Figure 3, the NAD(P)H/TMRM surface distribution ratio was dramatically increased when cells were incubated in the presence of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose, as compared with the control conditions. As expected, when PTP opening was prevented by either CsA or metformin, the NAD(P)H/TMRM surface distribution ratio did not increase (figure 3). These data indicate PTP was opened in INS-1 cells exposed to 30 mM glucose or 2.5 mM fructose for 24 h.

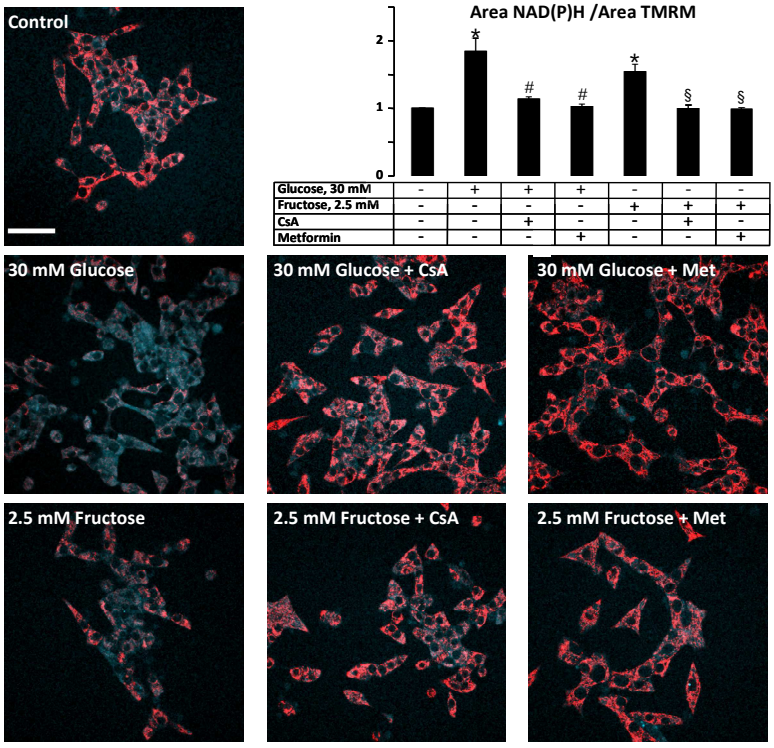


Figure 3. Effect of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose on NAD(P)H autofluorescence and mitochondrial electrical membrane potential. INS-1 cells incubated in RPMI 1640 medium supplemented or not with 1 µM CsA for 1 h or 100 µM metformin for 24 h were then incubated in complete RPMI 1640 medium supplemented or not (control) with glucose (30 mM, final concentration) or 2.5 mM Fructose during 24 h. Cells were then loaded with 10 nM TMRM for 30 minutes and the fluorescence of NAD(P)H (blue) and TMRM (red) were imaged and quantified as in figure 2. Results are mean ± SE of at least five different experiments. For each experiment, the four conditions were imaged with exactly the same microscope setting. To facilitate day to day comparisons, NAD(P)H/TMRM surface distribution ratio were normalized (i.e., in order that the NAD(P)H/TMRM surface distribution ratio in control condition was 1); * $p<0.05$ versus control, # $p<0.05$ versus 30 mM Glucose, § $p<0.05$ versus 2.5 mM Fructose, unpaired Student's *t* test. Scale bar, 47 µm.

High glucose- and high fructose-induced PTP opening leads to cell death.

We finally studied the effect of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose on the viability of INS-1 cells. As shown in Figure 4, approximately 80% of the cells were alive (i.e. Annexin V-/PI-) in control conditions. The viability of INS-1 cells was not affected by osmotic change (exposure to mannitol), whereas it was dramatically affected by 30 mM glucose or 2.5 mM fructose. Importantly, 30 mM glucose-induced toxicity was hampered by CsA or metformin, while 2.5 mM fructose-induced toxicity was totally prevented by CsA or metformin, indicating that PTP opening was involved in high glucose and high fructose induced cell death.

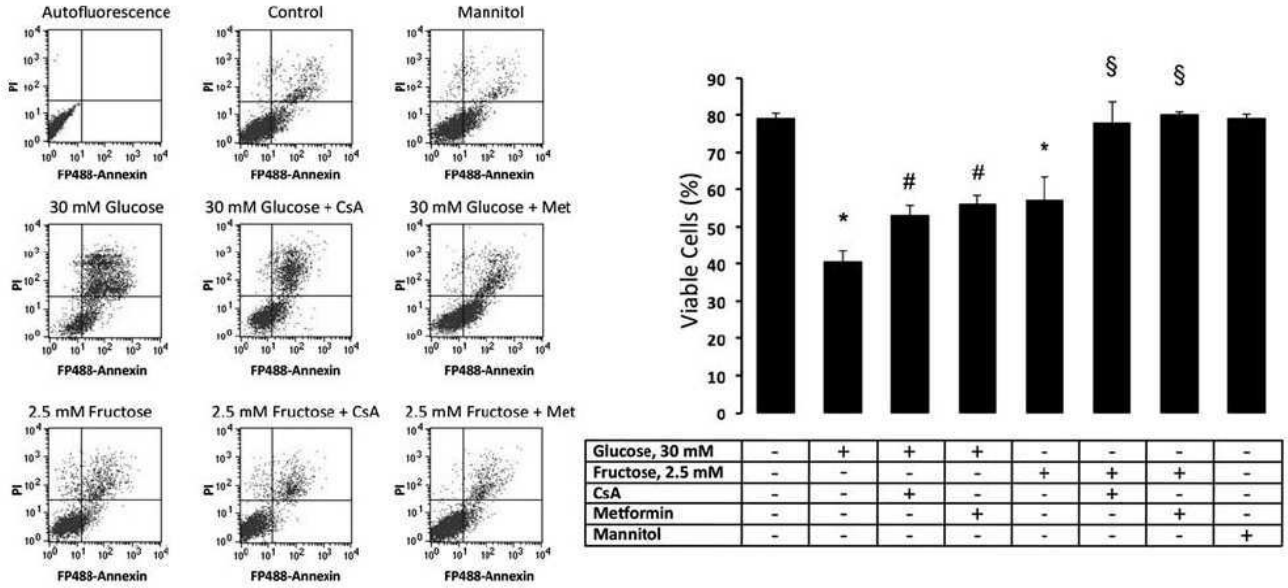


Figure 4. Effects of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose on INS-1 viability. INS-1 cells incubated in RPMI 1640 medium supplemented or not with 1 µM CsA for 1 h or 100 µM Metformin for 24 h were then incubated in complete RPMI 1640 medium supplemented or not (control) with mannitol (osmotic control for glucose 30 mM), glucose (30 mM, final concentration) or 2.5 mM fructose for 72 h. Cell viability was assessed by double labeling as described in Material and Methods. Histograms represent the results of three different experiments. Results are mean ± SE; * $p<0.05$ versus control, # $p<0.05$ versus Glucose 30 mM 24 h, § $p<0, 05$ versus Fructose 2.5 mM 24h, unpaired Student's *t* test.

DISCUSSION

In this work, we have reported that in INS-1 insulinoma cells (i) both CsA and metformin inhibited PTP opening; (ii) high glucose and high fructose led to PTP opening; (iii) PTP inhibitors hampered high glucose and high fructose induced cell death. Note that we have used a concentration of glucose that can be observed in clinical practice, while 30 mM glucose or 2.5 mM fructose are physiologically reached in the splanchnic territory during the postprandial period (100).

Glucotoxicity (i.e. high glucose induced cell death) on β cell lines or islets is now well documented (70, 103). A very high concentration of fructose (i.e. > 50 mM) has been shown to induce cell death in hamster pancreatic β-cell-derived cell line HIT (70). Hyperglycemia or hyperfructosemia have been shown to increase ROS production (70, 84, 104). As pancreatic β cells express a low level of antioxidants (109, 110), this increased ROS production probably results in an oxidative stress that may affect the survival of β cells. Supporting this scenario, several antioxidants have been proved to prevent hyperglycemia-induced cell death (104). It is well acknowledged that oxidative stress triggers PTP opening (85). Whether or not high glucose and high fructose led to PTP opening in INS-1 insulinoma cell because they increased ROS production is not demonstrated in this work, but this hypothesis is in agreement with the literature.

Alternatively, it has been shown that high glucose concentrations modulate the balance of proapoptotic and antiapoptotic Bcl proteins in cultured human pancreatic islet by overexpressing Bad and Bid (72). Note however, that among different effects, Bcl proteins are able to regulate PTP opening (111-113). Therefore, the observed overexpression of Bad and Bid, which may favor PTP opening (112, 113), remains consistent with our results. High glucose concentration has also been shown to activate the hexosamine pathway, resulting in an impaired activation of PI 3-kinase/Akt survival pathway (114). Because the activation of the

survival PI 3-kinase/Akt pathway has been shown to prevent PTP opening (115), the activation of the hexosamine pathway may indirectly favor PTP opening. Therefore, high glucose concentration may (i) induce oxidative stress, (ii) modulate the Bcl proteins, and (ii) prevent the activation of the PI 3-kinase/Akt pathway. These phenomena are known to favor PTP opening and might act synergistically.

In vitro studies have suggested that sulfonylurea may induce apoptosis of pancreatic ß-cell via a Ca^{2+}-dependent process (116). Assuming that (i) sulfonylurea-induced apoptosis involves PTP opening and (ii) secondary failure to sulfonylurea is due to β cell death, one may hypothesize that metformin would prevent or delay the risk for secondary failure to sulfonylurea. To the best of our knowledge, such a study has not been performed yet. However, it has been shown that the cumulative incidence of monotherapy failure is higher with sulfonylurea than with metformin (117). In a prospective human observational study measuring the risk for secondary failure to sulfonylurea, the same percentage of patients receiving sulfonylurea plus metformin was found in the group well controlled with oral treatment and in the group with secondary failure (118). Note however that metformin seems to have been added either after glucose rose over 300 mg/dl or after patients developed hyperglycemic symptoms (118), i.e., after pancreatic ß-cells apoptosis has occurred.

By reducing the mitochondria-related toxicity of high glucose and high fructose level in β cells, pharmacological inhibition of PTP opening may soon represents a new strategy to prevent β cell loss during diabetes mellitus in its various aspects. Islet transplantation could represent a credible application. Although substantial progress has occurred regarding islet isolation and immunosuppression protocols (1), obstacles still compromise islet transplant success. 50 to 70% of islets are estimated to be destroyed in the immediate post transplant period (119), making β cell apoptosis a crucial issue that prevents islet transplantation from spreading. Among several factors, this work suggests that islet exposure to high glucose and fructose levels might play a relevant role in graft death. Therefore preventing PTP opening during the

islet transplant procedure (either by engraftment outside the splanchnic territory or by pharmacological inhibition of PTP opening) may enhance β survival and improve islet transplant outcomes. Confirmatory studies with human islets are needed before proposing such a strategy in clinical trials.

Conflict of Interest.

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgments.

This work was supported by Grants from INSERM and the Ministère de l'Enseignement de la Recherche et de la Technologie (MERT). SL was supported and by fellowships from AGIR. We also thank Christophe Cottet for the English corrections to this paper.

Etude II

Implication du PTP dans la mort cellulaire des îlots pancréatiques humains induite par 30 mM de glucose et 2,5 mM de fructose

Metformin protects human islets of Langerhans against high glucose- and fructose-induced cell death

Sandrine Lablanche[1,2,3], Cécile Cottet-Rousselle[1,2], Marie-Jeanne Richard[4], Thierry Berney[5], Pierre-Yves Benhamou[1,2,3], Eric Fontaine[1,2 *]

[1]INSERM, U1055, F-38041, Grenoble, France

[2]Joseph Fourier University, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics, F-38041, Grenoble, France

[3]Grenoble University Hospital, Department of Endocrinology, Grenoble, F-38043, France

[4]Cellular therapy unit (EFS Rhône-Alpes, Grenoble University Hospital)

[5]Cell Isolation and Transplant Center, University of Geneva, Level R, 1 rue Michel Servet, CH-1211, GENEVA 4, Switzerland

* eric.fontaine@ujf-grenoble.fr

Soumis à Diabetes.

RESUME

OBJECTIFS : La perte du greffon d'îlots pendant la période post-transplantation immédiate est un obstacle majeur au succès de la transplantation d'îlots de Langerhans. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale est un canal mitochondrial impliqué dans le déclenchement de la mort cellulaire. Des données récentes suggèrent que les inhibiteurs du PTP préviennent la mort cellulaire induite par l'hyperglycémie et l'hyperfructosémie des cellules INS-1. Dans ce travail, nous avons étudié le statut du PTP et la viabilité d'îlots pancréatiques humains isolés, exposés à des concentrations de glucose et de fructose mimant les concentrations portales post-prandiales de glucose et de frutose.

MATERIEL ET METHODES : Le statut du PTP a été analysé par microscopie confocale. La mort cellulaire a été étudiée par cytométrie en flux.

RESULTATS : L'incubation des îlots pancréatiques humains en présence de 30 mM de glucose ou de 2.5 mM de fructose induit une ouverture du PTP et la mort cellulaire des îlots. La metformine et la cyclosporine A inhibent l'ouverture du PTP induite par le glucose et le fructose et préviennent la mort cellulaire des îlots pancréatiques humains soumis à de fortes concentrations de glucose ou de fructose.

CONCLUSIONS : L'ouverture du PTP est impliquée dans la mort cellulaire des îlots pancréatiques humains soumis à de fortes concentrations de glucose ou de fructose. Prévenir l'ouverture du PTP peut-être une approche prometteuse pour préserver la viabilité du greffon d'îlots au cours de la transplantation d'îlots de Langerhans.

Keywords : Perméabilité de transition, Glucotoxicité, Fructose, îlot humain, Cyclosporine A, Metformine.

ABSTRACT

OBJECTIVE : The loss of islet graft during the post-transplant period is one of the major limitations to islet transplantation. The permeability transition pore (PTP) is a mitochondrial channel involved in cell death. Recent evidence suggests that PTP inhibitors prevent hyperglycemia and hyperfructosemia-induced cell death in INS-1 cells. In this work, we studied the islet viability and the PTP state in isolated human pancreatic islets exposed to glucose and fructose levels mimicking postprandial splanchnic concentrations.

RESEARCH DESIGN AND METHODS : The PTP state was studied by confocal microscopy. Cell death was analyzed by flow cytometry.

RESULTS : The incubation of human pancreatic islets in the presence of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose induced PTP opening and (then) led to cell death. Both Metformin and Cyclosporin A inhibited high glucose and high fructose-induced PTP opening and prevented high-glucose and high fructose-induced cell death.

CONCLUSIONS : PTP opening is involved in high glucose and high fructose-induced human islet death. We suggest that preventing PTP opening might be a promising approach to preserve graft viability during islet transplantation in the splanchnic territory.

Keywords : Permeability transition, Glucotoxicity, Fructose, human islet, Cyclosporin, Metformin.

INTRODUCTION

Islet transplantation is a treatment to consider for selected type 1 diabetic patients. The amount of engrafted islets is essential to islet transplantation success but unfortunately, significant proportions of transplanted islets fail to engraft and therefore fail to become functional. It has been estimated that 50 to 70% of the transplanted β-cell mass is destroyed in the early post transplant period (120). This graft loss is due to immunological and non immunological events, including hypoxia as well as hyperglycemia or fructosemia when islets are injected in the portal vein (121). Indeed, the splanchnic territory is physiologically exposed to variable concentrations of glucose and fructose that can reach up to 30 mM and 2.5 mM during the post-prandial period, respectively. It is well established than high glucose concentrations are detrimental to human islet viability (72, 73). High fructose levels, as for them, have been shown to induce β cell death in hamster pancreatic β cells line HIT (70), in rat pancreatic β cells INS-1 (122) and in rodent islets (71).

Mitochondria are involved in numerous physiological processes including energy metabolism, calcium homeostasis and programmed cell death (6, 123, 124). Several mitochondrial proteins like cytochrome *c* or AIF, which have no pro-apoptotic activity when they remain inside mitochondria, promote cell death once released into the cytosol (125, 126). The permeability transition pore (PTP) is a Ca^{2+}-sensitive mitochondrial inner membrane channel (85, 101). Normally closed in order to allow ATP synthesis, permanent PTP opening leads to a drastic ATP synthesis inhibition through the collapse of the proton-motive force, a dramatic increase in ROS production and a release of the mitochondrial pro-apoptotic proteins which results in cell death. (6). Ca^{2+} is the most important factor for PTP opening. The amount of Ca^{2+} required to open the pore varies according to a number of factors. “PTP-inhibitors” and so-called “PTP-inducers” refer to factors that increase and decrease the amount of Ca^{2+} required to induce PTP opening (102). Cyclosporin A (CsA) is the reference PTP inhibitor, whereas oxidative stress is well recognized to favor PTP opening (85). In several cell types, direct or indirect inhibition of respiratory chain

complex 1 inhibits PTP opening (55, 56, 86). In such cells, the antidiabetic drug Metformin inhibits PTP opening via a mild inhibition of complex 1 (86).

Regarding pancreatic-derived cells, it has been proposed that cytokine-induced apoptosis may be due to PTP opening in pancreatic RINm5F cells (106). CsA has been shown to inhibit Ca^{2+}-induced PTP opening in permeabilized INS-1 (122) and MIN-6 cells (105), to prevent PK11195-induced cell death in isolated human pancreatic islets (82), to protect MIN-6 cells against Pdx1 insufficiency-induced cell death (107) while genetic ablation of the endogenous PTP-inducers Cyclophilin D prevents diabetes in $Pdx1^{+/-}$ mice (107). Finally, we have recently shown that in INS-1 cells, (i) PTP opening is involved in high glucose and high fructose-induced cell death; (ii) both Metformin and CsA prevent PTP opening; and (iii) PTP opening inhibition hampers high glucose and high fructose-induced cell death (122). The involvement of PTP opening in human islet death has never been studied. In the present study, we tested whether high glucose and high fructose levels induced PTP opening and cell death or not in cultured human pancreatic islets, and whether CsA and Metformin preserved the viability of cultured human islet incubated in the presence of high glucose and high fructose.

MATERIAL AND METHODS

Islet isolation and culture

Islets from pancreas of brain-dead multiorgan donors were isolated as previously described according to a modified Ricordi method (90, 91). Briefly, the pancreatic duct was catheterized and the pancreas was distended by infusion of a cold collagenase solution (Collagenase NB1, Serva Gmbh Heidelberg, Germany). After digestion (37℃), a purification of cell suspension was performed in a continuous Biocoll gradient (Biochrom AG, Berlin, Germany) using a refrigerated cell separator (Cobe 2991 cell processor, Caridian BCT, France). Islet preparations that could not be used for clinical islet transplantation were handled in our experiments. (Islets) They were provided by Geneva (Switzerland) or Grenoble - Saint Ismier (France) cellular therapy centers and

(The islet preparations used in this study) exhibited a purity ranging from 30 to 70% as determined by dithizone staining. After isolation, human islets were cultured at 37°C, in a 5% CO_2 atmosphere, in Connaught's Medical Research Labs (CMRL 1066-based medium - Sigma Aldrich) supplemented with 10% decomplemented Fetal Calf Serum, 25 mmol/L HEPES, 1mM Sodium Pyruvate, 100 UI/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin.

Cell death induction and drug treatments.

For hyperglycemia-induced cell death, human islets were incubated for 72 h in a complete CMRL 1066 medium supplemented with 26.5 mM D-glucose (final concentration, 30 mM D-Glucose). For fructose-induced cell death, human islets were exposed for 72 h to 2.5 mM D-fructose. Before these treatments, human islets were incubated in the presence -or not- of 1 µM CsA for 1 h or 100 µM Metformin overnight.

Quantification of Cell Death by Flow Cytometry.

Apoptosis analyses were performed with a double-stain system using Annexin V (Interchim) combined with FluoProbes 488 and Propidium Iodide (PI) (Sigma Aldrich). Cultured human islets were dissociated by incubating aliquots of 1500 islets equivalents (IEQ) in 1 ml Accutase® solution (Sigma-Aldrich) at 37°C for 15 min, followed by gen tle pipetting. Cell suspension was then diluted 1:10 in CMRL 1066 supplemented with 10% FCS and centrifuged for 1 min at 800 X *g*; cell pellets were resuspended in complete CMRL 1066 medium and incubated with 100 µl of Annexin-V buffer 1X (10 mM HEPES NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ and 1.8 mM $CaCl_2$). Cells were then incubated for 15 min at room temperature in the dark in the presence of 5 µl of AnnexinV-FP488. Labeled cells were transferred in a 5 ml propylene tube containing 900 µl PBS. 10 µl from a 1mg/ml stock solution of PI were added to the suspension and labeled islet cells were immediately analyzed.

Data acquisition (~5,000 cells) was carried out using a BD LSRFortessa™ cell analyzer (Becton Dickinson Biosciences) equipped with a 150 mW Coherent Compass laser (532 nm) and a 100

mW Coherent Sapphire laser (488 nm), using the BD FACsDiva™ software (Becton-Dickinson Biosciences). Data were plotted as a function of fluorescence intensity on 525/50 nm band pass filter detector for Annexin V-FluoProbes 488 and 585/15 nm band pass filter detector for PI. The Annexin V^-/PI^- population was regarded as normal healthy cells.

Imaging.

For imaging, human islet cells were dissociated using Accutase® as described above. 10^6 cells/chamber set on a Lab-Tek™-Chamber Slide™ System were studied by time-lapse laser confocal microscopy at 37 °C in a humidified atmosphere (95% air, 5% CO_2) using a microscope equipped with a perfusion chamber (POC chamber, LaCom®, Erbach, Germany) and an incubation system (O_2-CO_2-°C, PeCom®, Erbach, Germany). Images were collected with a Leica TCS SP2 AOBS inverted laser scanning confocal microscope equipped with a Coherent 351–364 UV laser using a 63X oil immersion objective (HCX PL APO 63.0 X 1.40 W Corr). Laser excitation was 351-364 nm for NAD(P)H and 543 nm for TMRM. Fluorescence emission adjusted with AOBS was 390-486 nm for NAD(P)H and 565-645 nm for TMRM. In order to allow the overlay of NAD(P)H and TMRM signals, image acquisition was set with the same pinhole aperture (Airy 3.55), necessarily increased because of the low signal of NAD(P)H autofluorescence. Each experiment was performed on a randomly chosen field containing 15 to 25 cells. The background noise of NADH autofluorescence was removed by fine filter (Kernel 3x3) using Volocity® (Improvision) software. Image quantification was performed using the ImageJ (NIH images) and Volocity® (Improvision) software as described in (92).

Statistics.

Results are presented as means ± SE. The statistical significance of differences was analyzed using paired Student *t* test or Mann-Whitney test as indicated. Values of $p<0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

High glucose and high fructose levels cause human pancreatic islet cell death.

To investigate whether physiologically observed post-prandial glucose and fructose concentrations can be detrimental to human pancreatic islets, we studied the effect of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose on human islet viability. As shown in Figure 1, human islets cultured for 3 days in the presence of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose showed a dramatic alteration of viability as compared to the proper control (i.e. the same donor). These results further confirm the glucotoxicity to human pancreatic islets (72, 73) and are in agreement with the fructotoxicity previously observed on β cell lines (122).

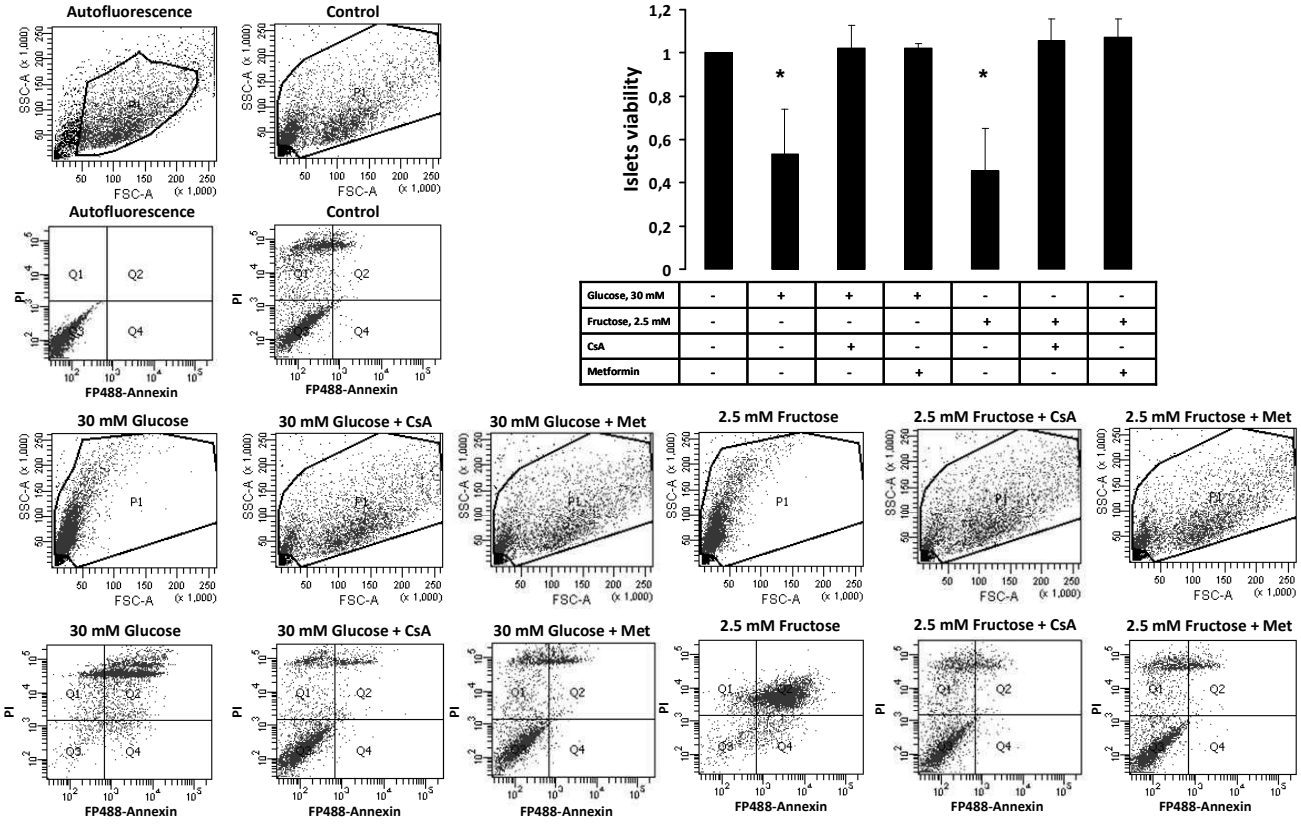


Figure 1. Effects of 30 mM glucose, 2.5 mM fructose, Cyclosporine A and Metformin on human islets viability. Human islet cells incubated in complete CMRL 1066 medium supplemented or not with 1 µM CsA for 1 h or 100 µM Metformin for 24 h were incubated in complete CMRL 1066 medium supplemented or not (control) with glucose (30 mM, final concentration) or 2.5 mM fructose for 72 h. Cell viability was assessed by double labeling as described in Material and Methods. The presented data is representative of 3 different experiments. * p<0, 05 *vs.* control (Mann-Whitney Test)

High glucose and high fructose levels induce PTP opening in human pancreatic islets.

To evaluate whether PTP opening was involved in high glucose or fructose-induced islet cell death, the PTP status was assessed by double channel imaging of NAD(P)H autofluorescence and mitochondrial electrical membrane potential (i.e. TMRM fluorescence) as recently described (92). Briefly, when PTP is closed, NAD(P)H is mainly localized within mitochondria and co-localizes with TMRM fluorescence (which accumulates in polarized mitochondria). Transient PTP opening leads to an increase in NAD(P)H autofluorescence in terms of both intensity and surface distribution while mitochondrial membrane potential remains unaffected. Permanent PTP opening leads to the same change in NAD(P)H autofluorescence but is associated with a dramatic collapse in membrane potential.

Using this method, we measured the NAD(P)H and TMRM fluorescence of human islets incubated in control conditions or in the presence of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose for 24 h. Note that the comparisons were performed only between images acquired on the same day, with exactly the same microscope settings, the same load of TMRM and with islets coming from the same donor. As compared with control conditions, when islets were incubated in the presence of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose, (i) the NAD(P)H-area/TMRM-area ratio dramatically increased, suggesting that more NAD(P)H was localized outside polarized mitochondria; (ii) the NAD(P)H-fluorescence/NAD(P)H-area ratio increased by over 30 % suggesting that the total concentration of NAD(P)H had increased; and (iii) the TMRM-fluorescence/TMRM-area ratio significantly decreased, indicating that the mean mitochondrial membrane potential had decreased (See figure 2). Together, these data strongly suggested that 30 mM glucose or 2.5 mM fructose induced permanent PTP opening in human pancreatic islets, particularly in the cells with a high NADH fluorescence and low TMRM fluorescence (i.e. the cells that appear in blue in the overlay).

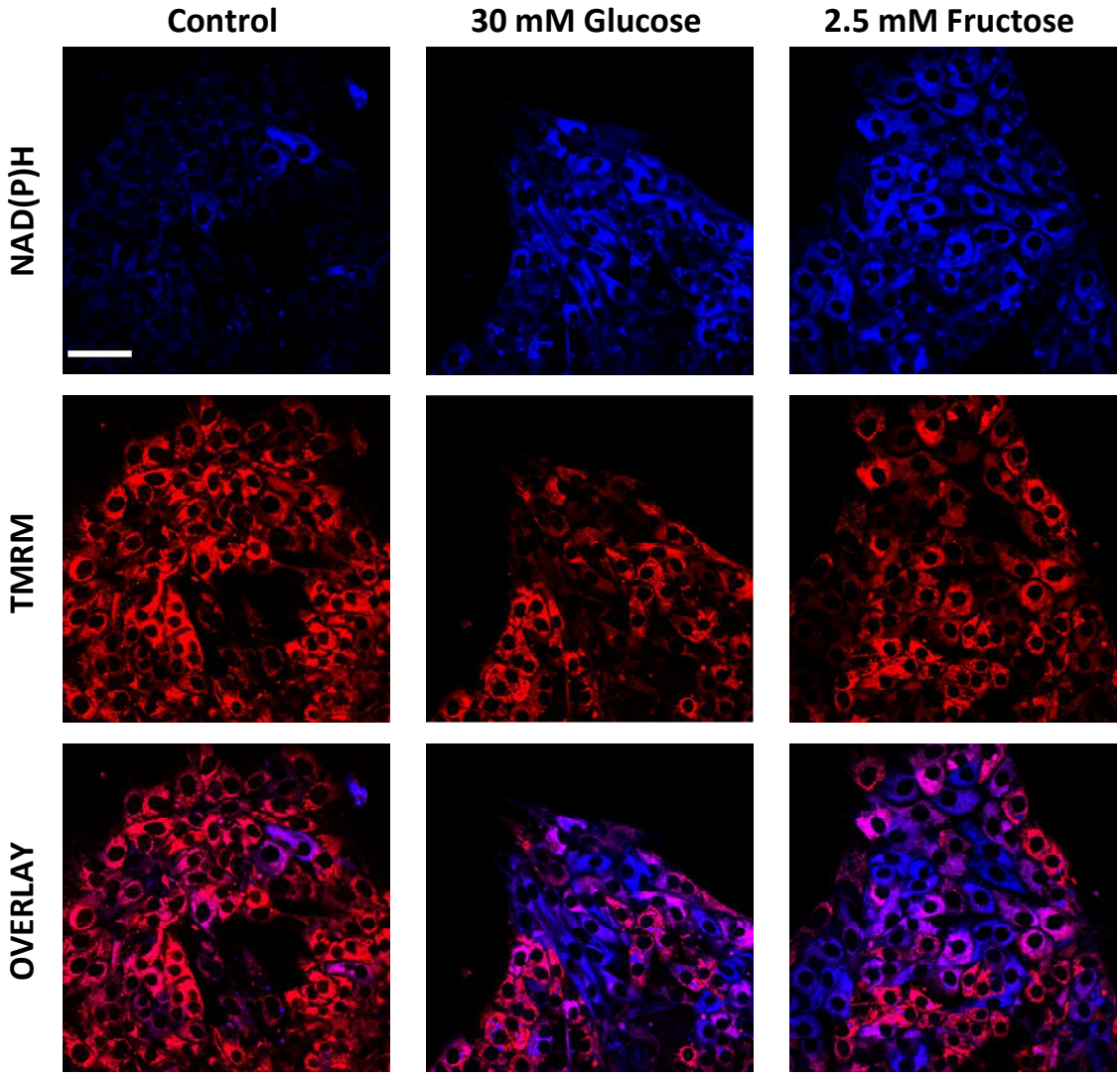


Figure 2. Effect of 30 mM glucose or 2.5 mM fructose on NAD(P)H autofluorescence and mitochondrial electrical membrane potential. Human pancreatic islets were incubated in CMRL 1066 supplemented or not (control) with glucose (30 mM, final concentration) or 2.5 mM Fructose for 24 h. Cells were then loaded with 10 nM TMRM for one hour and the fluorescence of NAD(P)H (blue) and TMRM (red) were imaged.

Cyclosporin A and Metformin prevent high-glucose and high-fructose cell death through PTP opening inhibition. Hypothesizing that high glucose and fructose-induced PTP opening were directly responsible for the observed gluco- and fructo-toxicity, one would expect that PTP inhibition prevents high glucose- and fructose-induced cell death. To test this hypothesis, human islets were incubated in the absence or presence of 1 µM CsA for 1 h or 100 µM Metformin overnight and then exposed to 30 mM glucose or 2.5 mM fructose. As shown in Figure 3, both CsA and Metformin totally prevented PTP opening in human pancreatic islets exposed to 30 mM glucose or 2.5 mM fructose. Moreover, both CsA and Metformin totally hampered the mortality induced by 30 mM glucose or 2.5 mM fructose in human pancreatic islets (See Figure 1), confirming that gluco- and fructo-toxicity was due to PTP opening.

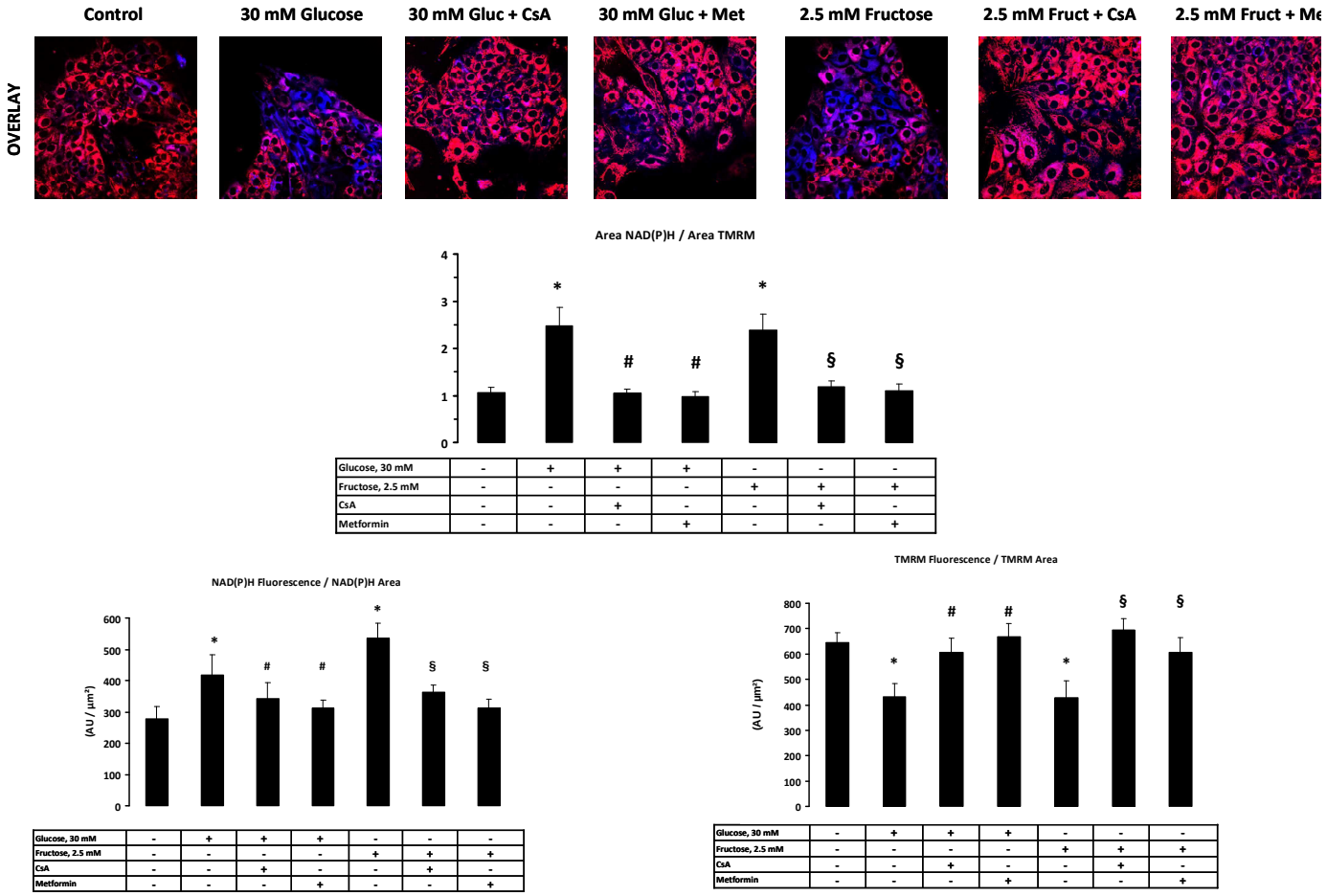


Figure 3. Effect of CsA and Metformin on high-glucose and high-fructose-induced PTP opening. Human islets incubated in complete CMRL 1066 medium supplemented or not with 1 µM CsA for 1 h or 100 µM Metformin for 24 h were incubated in CMRL 1066 supplemented with glucose (30 mM, final concentration) or 2.5 mM fructose for 24 h. Cells were then loaded with 10 nM TMRM for one hour and the fluorescence of NAD(P)H (blue) and TMRM (red) were imaged. For each experiment, the three conditions (Glucose ± Csa ± Metformin, or Fructose ± Csa ± Metformin) were imaged with exactly the same microscope setting. * p<0.05 versus control, # p<0.05 versus 30 mM Glucose, § p<0.05 versus 2.5 mM Fructose, paired Student's *t* test.

DISCUSSION

In this work, we have reported that in isolated human pancreatic islets (i) high glucose and high fructose led to islet cell death; (ii) high glucose and high fructose induced PTP opening; (iii) CsA and Metformin inhibited PTP opening and prevented high glucose and fructose-induced cell death. These results are in total agreement with our previous work using INS-1 cells (122).

Several in vivo and in vitro studies on rodent islets have suggested that hyperglycemia induces cell death (70, 103). Because of the intrinsic scarcity of pancreatic specimens, only two studies have reported glucotoxicity in human islets (72, 73). Our results are in agreement with the literature. On the contrary, a high fructose level has been shown to induce cell death in rodent cells (70, 122) but to the best of our knowledge, this work is the first demonstration of fructotoxicity in isolated human pancreatic islets.

Hyperglycemia and hyperfructosemia have been shown to induce ROS production in β cells (70, 84, 104). As pancreatic β cells express low antioxidant levels (109, 110), this increased ROS production probably results in an oxidative stress that may affect β cell survival. Supporting this scenario, several antioxidants have proved to prevent hyperglycemia-induced cell death (104, 127). As it is well acknowledged that oxidative stress triggers PTP opening (85), we hypothesize that hyperglycemia or hyperfructosemia lead to an oxidative stress that induces PTP opening, which in turn induces cell death. Because of the above mentioned scarcity of human pancreatic specimens again, this hypothesis has not been tested here. However, supporting this proposal, we performed experiments using INS-1 cells and found that the antioxidant N-acetyl cystein prevented hyperglycemia and hyperfructosemia-induced cell death (data not shown).

It has been shown that high glucose concentrations modulate the balance of proapoptotic and antiapoptotic Bcl proteins in isolated human islets through an overexpression of Bad and Bid

(72). Note that Bid has been shown to favor PTP opening through a probable functional interaction with a component of the PTP (113), while oxidative stress has been shown to induce Bid cleavage and its subsequent mitochondrial translocation (128, 129).

By reducing the mitochondria-related toxicity of high glucose and high fructose levels in β cells, pharmacological inhibition of PTP opening may soon represent a new strategy to prevent β cell loss. Islet transplantation could emerge as a credible application. Although substantial progress has been made on islet isolation and immunosuppression protocols (1), obstacles still compromise islet transplant success. 50 to 70% of islets are estimated to be destroyed in the immediate post transplant period (120), making β cell death a crucial issue that prevents islet transplantation from spreading. Among several factors, this work suggests that islet exposure to high glucose and fructose levels in the splanchnic territory might play a relevant role in graft death. Therefore, preventing PTP opening during the islet transplant procedure (either by engraftment outside the splanchnic territory or by pharmacological inhibition of PTP opening) may enhance β survival and improve islet transplant outcome. Further in vivo studies are necessary to confirm the benefits of the prevention of PTP opening to islet survival and islet graft success.

Acknowledgments.

This work was supported by Grants from INSERM and the Ministère de l'Enseignement, de la Recherche et de la Technologie (MERT). SL was supported by fellowships from AGIRaDom. Human islets were obtained thanks to grant # 31-2008-416 from the Juvenile Diabetes Research Foundation.

Etude III

Effet de l'ischémie-reperfusion sur la viabilité cellulaire β

Implication du PTP et du stress oxydant

Respective effects of hypoxia and energy substrates deprivation on INS-1 cell viability

Sandrine Lablanche[1,2,3], Laurent Argaud[4,5], Cécile Cottet-Rousselle[1,2], Frédéric Lamarche[1,2], Pierre-Yves Benhamou[1,2,3], Eric Fontaine[1,2 *]

[1]INSERM, U1055, F-38041, Grenoble, France

[2]Joseph Fourier University, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics, F-38041, Grenoble, France

[3]Grenoble University Hospital, Department of Endocrinology, Grenoble, F-38043, France

[4]INSERM, U886-Cardioprotection, Lyon, France.

[5]Emergency and Intensive Care Department, Edouard Herriot Hopsital, Lyon, France.

* eric.fontaine@ujf-grenoble.fr

RESUME

OBJECTIFS : La perte du greffon d'îlots pendant la période post-transplantation immédiate est un obstacle majeur au succès de la transplantation d'îlots de Langerhans. L'exposition des îlots humains aux phénomènes d'ischémie-reperfusion joue un rôle majeur dans la perte de la masse du greffon. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) est un canal mitochondrial impliqué dans le déclenchement de la mort cellulaire. Dans notre étude, nous avons étudié l'impact de l'ischémie-reperfusion simulée sur la viabilité cellulaire β et l'implication du stress oxydant et de l'ouverture du PTP dans la mort cellulaire induite par l'ischémie-reperfusion sur cellules INS-1.

MATERIEL ET METHODES : La mort cellulaire a été étudiée par cytométrie en flux. Le statut du PTP et la production de superoxide ont été analysés par microscopie confocale.

RESULTATS : Une heure d'incubation des INS-1 en l'absence de substrats énergétiques en conditions hypoxiques suivie de la restauration des conditions basales induit une ouverture du PTP et une augmentation drastique de la mort cellulaire. Ces deux évènements sont totalement prévenus par l'incubation préalable par la CsA et la metformine mais aussi par la N-Acétyl-Cystéine (NAC) ou par l'exposition à une anoxie. Nous montrons qu'au cours de l'ischémie-reperfusion simulée, la production de superoxide est bi-phasique : nous décrivons un premier pic de production au cours de la carence en substrat et un deuxième pic de production après la restauration du niveau de substrats et d'O_2. La NAC, l'anoxie ou la metformine préviennent les deux pics de production de superoxide tandis que la CsA prévient seulement le second pic. L'hypoxie seule n'induit ni stress oxydant, ni ouverture du PTP ni mortalité cellulaire.

CONCLUSION : L'exposition des cellules INS-1 à une heure de carence en substrat induit un stress oxydant conduisant à l'ouverture du PTP, cette dernière étant responsable à son tour d'une forte production de radicaux libres de l'oxygène.

ABSTRACT

OBJECTIVE : The loss of islet graft during post-transplant period is one of major limitations to islet transplantation. Ischemia-reperfusion (I/R) injury is a factor of importance in the β cell loss during post-transplant period. The permeability transition pore (PTP) is a mitochondrial channel involved in cell death. Here, we studied the impact of simulated I/R on cell viability and the involvement of oxidative stress and PTP opening during I/R in INS-1 cells.

RESEARCH DESIGN AND METHODS : Cell death was analyzed by flow cytometry. The open/closed PTP state and the superoxide production were studied by confocal microscopy.

RESULTS : The incubation of INS-1 cells in the absence of energy substrates in hypoxic condition for 1 hour followed by an incubation in normal condition led to PTP opening and to a dramatic increase in cell death. Both event were totally prevented when the cells were incubated in the presence of the antioxidant N-acetyl cystein (NAC), in anoxia, or when PTP opening was inhibited by either Cyclosporin A (CsA) or Metformin. Superoxide production increased during the removal of energy substrates and again increased when normal energy substrate and O_2 were restored. NAC, anoxia or Metformin prevented the two phases of oxidative stress, while CsA prevented only the second one. Hypoxia alone did not induce oxidative stress, PTP opening or cell death.

CONCLUSIONS : A one-hour removal of energy substrates in INS-1 cells led to an oxidative stress followed by PTP opening, this latter being responsible for a secondary and robust oxidative stress.

INTRODUCTION

Islet transplantation is a treatment to consider for selected type 1 diabetic patient. The amount of engrafted islets is essential for islet transplantation outcome but unfortunately, 50-70% of the transplanted β-cell mass is lost in the early post transplant period (120). Among factors responsible for poor islet graft, islet exposition to ischemia-reperfusion phenomenon is important to consider. Normally, pancreatic islets have a dense glomerular-like capillary network that is ideal for the delivery of oxygen and nutrients (130, 131). During the isolation process and in vitro culture, islets vasculature dedifferentiates or degenerates (132, 133). Immediately after transplantation, islets are supplied in oxygen and nutrients only by diffusion from the surrounding tissues. The revascularization process is initiated within a few days, and islets are generally thought to be fully revascularized by 15 days post transplant (75, 134). During this period, islets inevitably endure some restriction in oxygen and nutrients.

Tissue ischemia is characterized by severe hypoxia, acidosis, energy depletion and cell death. Excessive oxidative stress is well accepted as an important component of ischemia-reperfusion injury (135): ROS production begins early in ischemia and is followed by a large burst of oxidative stress during the first few minutes of reperfusion (136-138). Although many of details regarding the sources and the targets of oxidant stress during I/R injury are not known, a consensus regarding the importance of ROS in I/R injury has emerged, based on studies showing cell death protection during I/R by pretreatment with anti-oxydants (139, 140).

Others studies implicated the mitochondrial permeability transition pore (PTP) in I/R induced cell death. The PTP is a Ca^{2+}-sensitive mitochondrial inner membrane channel which on opening causes cell death (85, 101). Normally closed in order to allow ATP synthesis, permanent PTP opening leads to a drastic ATP synthesis inhibition through the collapse of the proton-motive force, a dramatic increase in ROS production and a release of the mitochondrial pro-apoptotic proteins (cytochrome C or AIF) which results in cell death (6, 125, 126). It has been proposed that

PTP remains closed during ischemia and only opens at reperfusion (141) when the conditions for its opening are present : ROS production, high mitochondrial [Ca^{2+}], adenine nucleotide depletion and accumulation of inorganic phosphate (142, 143). Supporting a central role of PTP in ischemia-reperfusion injury, several PTP inhibitors (i.e., Cyclosporin A (CsA), NIM811 or Metformin) have been shown to reduced cardiomyocytes I/R-induced cell death or infarctus size both in animal models and in human (144-149).

Regarding pancreatic-derived cells, PTP opening has been shown to be involved in cytokine (27), high glucose and high fructose-induced apoptosis (122). CsA has been shown to inhibit Ca^{2+}-induced PTP opening in INS-1 (122) and MIN-6 cells (105), to prevent PK11195-induced cell death in isolated human pancreatic islets (82), to protect MIN-6 cells against Pdx1 insufficiency-induced cell death (31) while genetic ablation of the endogenous PTP-inducers Cyclophilin D prevents diabetes in $Pdx1^{+/-}$ mice (107). The negative impact of I/R injury on human or dog islets viability is well described (80, 150). However, the involvement of oxidative stress and PTP opening in pancreatic I/R-induced β cell death has never been studied. In the present study, we tested the effect of an O_2 and energy substrate deprivation on INS-1 cell viability. We next examined whether PTP opening was involved in O_2 and substrate deprivation-induced cell death; and whether CsA and Metformin prevented INS-1 cell viability after an O_2 and energy substrates deprivation. Finally, we clarified the relationship between oxidative stress and PTP opening during O_2 and energy substrates deprivation.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture conditions.

INS-1 cell lines were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 10 % heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, and 50 mM 2-mercaptoethanol. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere (95 % air – 5 % CO_2). (89)

O_2 and energy substrate deprivation procedure.

O_2 and energy substrates deprivation was achieved in a perfusion chamber (POC chamber, LaCom®, Erbach, Germany) and an incubation system (O_2-CO_2-°C, PeCom ®, Erbach, Germany). The O_2 environment of the chamber was controlled by an O_2 Controller (LEICA) allowing variation of O_2 from 0 % to 21 % thanks to N_2 bubbling. The chamber was mounted on a Leica TCS SP2 AOBS inverted laser scanning confocal microscope. During baseline conditions, cells incubated in the absence or presence of 1 µM CsA for 1 h, 5 mM N-acetyl-L cystein (NAC) for 1 h or 100 µM Metformin overnight, were incubated in the standard complete RPMI 1640 under controlled O_2 and CO_2 conditions (21 % O_2 - 5 % CO_2). Energy substrates deprivation was achieved by replacing the normal complete medium by a medium without substrate (NaCl 102.7 mM, KCl 5.36 mM, $NaHCO_3$ 23 mM, $MgSO_4 7H_2O$ 0.83 mM, Na_2HPO_4 5.65 mM, $Ca(NO_3)_2 4H_2O$ 0.42 mM, HEPES 10 mM). O_2 deprivation was achieved by equilibrating the incubation media with either 3 % O_2, 5 % CO_2 and 92 % N_2 (hypoxia) or 5 % CO_2 and 95 % N_2 (anoxia). After 1 hour, basal conditions were restored by replacing the tested medium by the normal complete medium equilibrated with 21 % O_2 - 5 % CO_2. Cells undergoing two changes of complete RPMI 1640 medium equilibrated with 21 % O_2 - 5 % CO_2 were used as control.

Determination of PTP state by confocal microscopy.

The open/closed PTP state was assessed by double channel imaging of NAD(P)H autofluorescence and mitochondrial electrical membrane potential (i.e. TMRM fluorescence) as recently described (92). INS-1 cells set on collagen I coated coverslip were studied by time-lapse laser confocal microscopy at 37 °C in a humidified atmosphere (95 % air, 5 % CO_2) using a microscope equipped with a perfusion chamber (POC chamber, LaCom®, Erbach, Germany) and an incubation system (O_2-CO_2-°C, PeCom ®, Erbach, Germany). Images were collected with a Leica TCS SP2 AOBS inverted laser scanning confocal microscope equipped with a Coherent 351–364 UV laser using a 63X oil immersion objective (HCX PL APO 63.0 X 1.40 W Corr). Laser excitation was 351-364 nm for NAD(P)H and 543 nm for TMRM. Fluorescence emission adjusted with AOBS was 390-486 nm for NAD(P)H and 565-645 nm for TMRM. In order to allow overlay of NAD(P)H and TMRM signals, image acquisition was set with the same pinhole aperture (Airy 3.55), necessarily increased because of the low signal of NAD(P)H autofluorescence. To follow PTP status, NAD(P)H and TMRM fluorescence images were acquired every 10 min during simulated ischemia-reperfusion procedure. Note that the changes of medium led to the removal of TMRM outside of the cells. This led to a release of TMRM from mitochondria even when the electrical membrane potential remained constant. To discriminate this normal decrease in TMRM fluorescence to a real decrease in mitochondrial electrical membrane potential, cells were reloaded with 10 nM TMRM, 15 minutes before the end of the experiment.. Experiments were performed on a randomly chosen field containing 15-25 cells. The background noise of NAD(P)H autofluorescence was removed by fine filter (Kernel 3x3) using Volocity® (Improvision) software, while the other images (TMRM and MitoSox) were not electronically manipulated. Image quantification was performed using the ImageJ (NIH images) and Volocity® (Improvision) software as described in (92).

Quantification of Cell Death by Flow Cytometry.

Cell viability analyses were performed with a double-stain system using Annexin V (Interchim) combined with FluoProbes 488 and Propidium Iodide (PI) (Sigma Aldrich). 48h after O_2 and energy substrates deprivation, collected supernatant and INS-1 cells detached by trypsination were centrifuged. The cells were then incubated in 100 µl of Annexin-V buffer 1X (10 mM HEPES NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ and 1.8 mM $CaCl_2$) for 15 min at room temperature in the dark in the presence of 5 µl of AnnexinV-FP488. Cells were then transferred in a 5 ml propylene tube containing 900 µl PBS and 10 µl of a 1 mg/ml stock solution of PI and immediately analyzed. Data acquisition (~5,000 cells) was carried out using a BD LSRFortessa™ cell analyzer (Becton Dickinson Biosciences) equipped with a 150 mW Coherent Compass laser (532 nm) and a 100 mW Coherent Sapphire laser (488 nm), using the BD FACsDiva™ software (Becton-Dickinson Biosciences). Data were plotted as a function of fluorescence intensity on 525/50 nm band pass filter detector for Annexin V-FluoProbes 488 and 585/15 nm band pass filter detector for PI. The Annexin V^-/PI^- population was regarded as normal healthy cells.

Assessment of oxidative stress

INS-1 cells incubated in the absence or presence of 1 µM CsA for 1 h, 5 mM N-acetyl- L cysteine for 1 h or 100 µM Metformin overnight, were loaded for 15 min with 1 µM Mito-Sox™ Red (Molecular Probes™), a cationic probe distributing to mitochondrial matrix by virtue of the mitochondrial transmembrane potential. The probe becomes highly fluorescent after oxidation by superoxide in the presence of DNA. To follow mitochondrial oxidative stress, Mito-Sox™ Red fluorescence images were acquired every 10 min during the procedure.

Statistics

Results are presented as mean ± SE. The statistical significance of differences was analyzed using Student t test. Values were considered to be different from one another when p values were lower than 0.05.

RESULTS

Effect of energy substrates removal on INS-1 cell viability.

Assuming that oxygen may diffuse better than the energy substrates inside the islets once they are embolised in a capillary, INS-1 cells were exposed for 1 hour in a medium without energy substrates (see material and methods) with either 3% O_2 (hypoxia) or no O_2 (anoxia). As shown in Figure 1, 48 h after such a procedure, INS-1 cells incubated without energy substrates in the presence of 3% O_2 exhibited a dramatic alteration in viability as compared with control. Surprisingly, the same removal of energy substrates in the absence of O_2 did not induce cell death. However, incubation of INS-1 cells in hypoxia alone (in the presence of 3 % O_2 but in the presence of energy substrates) did not induce cell death, suggesting that hypoxia was not toxic per se. Moreover, in agreement with data obtained with other models of I/R, cell death was also prevented by PTP inhibition (CsA or metformin) and by the antioxidant NAC.

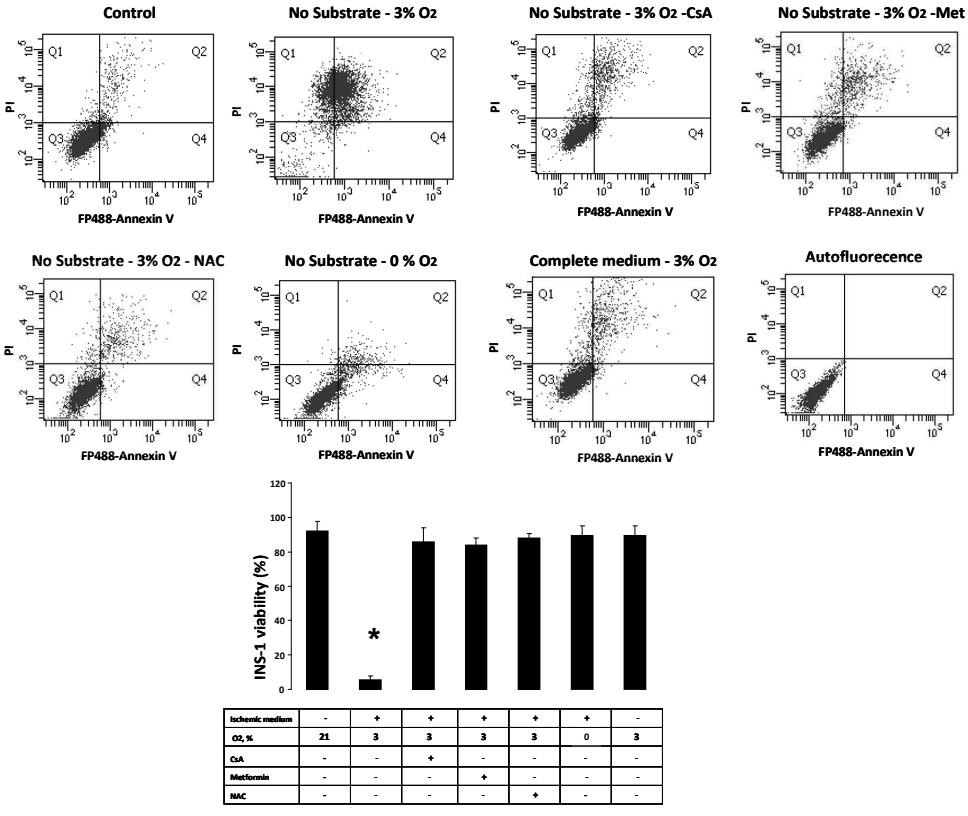


Figure 1. Respective effects of oxygen and energy substrates deprivation on INS-1 cell viability. INS-1 cells incubated in the absence or presence of either 1 µM CsA for 1 h, 5 mM NAC for 1 h or 100 µM Metformin overnight were submitted to the indicated condition of incubation for 1 h and then incubated in normal conditions for 48 h. Cell viability was assessed by double labeling as described in Material and Methods. Results are mean ± SEM, of at least 3 different experiments. * p<0, 05 vs. control (paired Student's t test).

Effect of energy substrates removal on PTP state.

To confirm that the removal of energy substrates in hypoxia led to PTP opening, PTP status was assessed by double channel imaging of NAD(P)H autofluorescence and mitochondrial electrical membrane potential (i.e., TMRM fluorescence) as recently described (35). Briefly, when PTP is closed, NAD(P)H is mainly localized within mitochondria and co-localizes with TMRM fluorescence (which accumulates in polarized mitochondria). Transient PTP opening leads to an increase in NAD(P)H autofluorescence both in terms of intensity and surface distribution while mitochondrial membrane potential remains unaffected. Permanent PTP opening leads to the same change in NAD(P)H autofluorescence but is associated with a dramatic collapse in membrane potential.

Using this method, we measured every 10 min, the INS-1 NAD(P)H and TMRM fluorescence submitted to control condition or to O_2 and energy substrates deprivation procedure. Note that the same microscope settings were conserved during the entire procedure. Under control conditions, NAD(P)H remained stable while TMRM fluorescence slightly decreased due to TMRM dilution caused by medium changes but increased after TMRM reload at the end of reperfusion. As shown in figure 2, after the removal of energy substrates in hypoxia, both NAD(P)H area and intensity drastically diminished (most probably due to endogenous substrates consumption) then slightly increased (but remained lower than control), while TMRM fluorescence slightly decreased in a way not significantly different of that observed in the control condition (see also Fig. 3). After the restoration of O_2 and energy substrates, NAD(P)H area and fluorescence continuously increased, reaching values more than twice the control, whereas TMRM fluorescence dramatically decreased, with no recovery after TMRM reload.

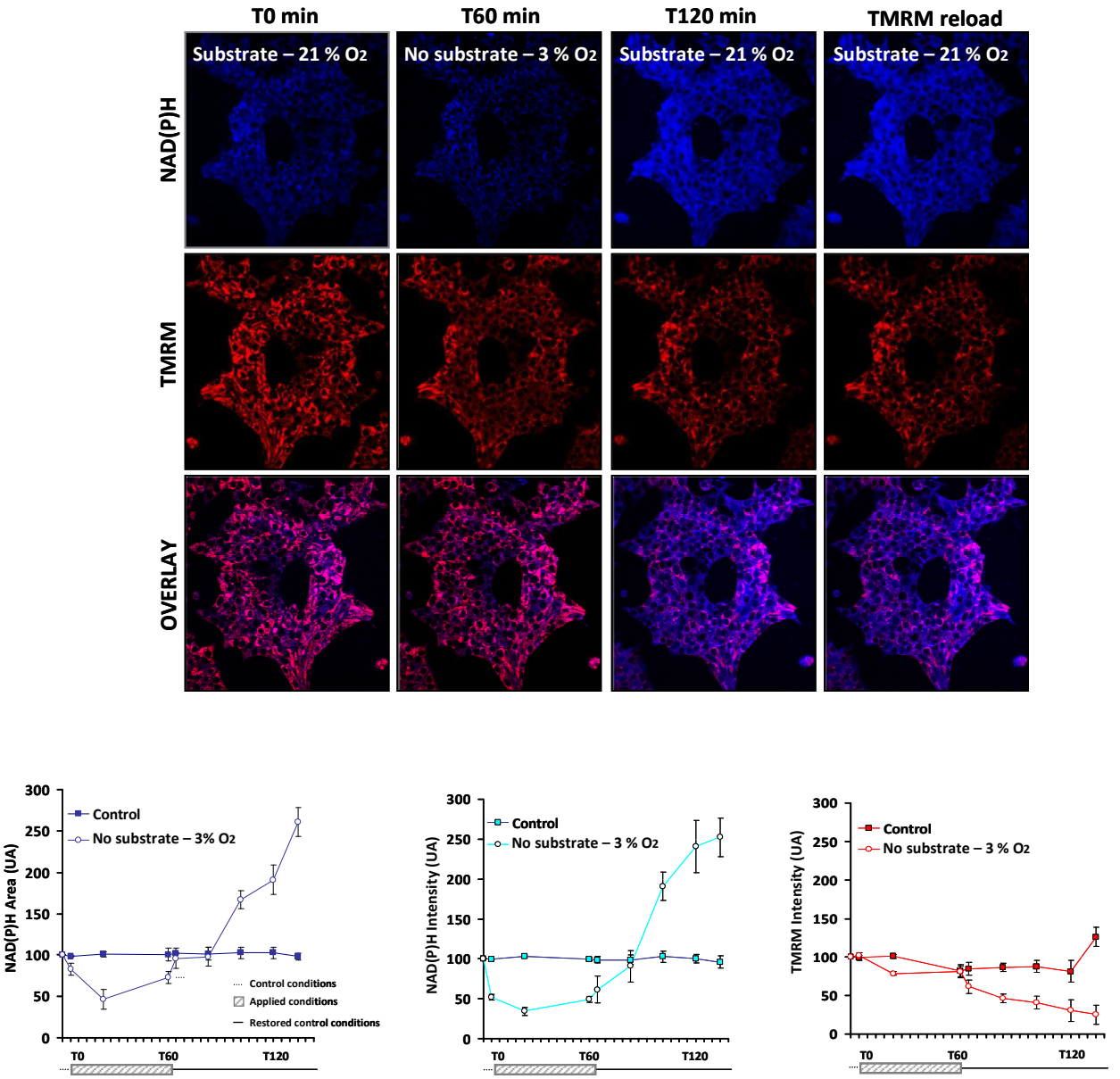


Figure 2. Respective effects of oxygen and energy substrates deprivation on NAD(P)H autofluorescence and mitochondrial electrical membrane potential. INS-1 cells loaded with 10 nM TMRM for one hour were incubated in normal condition (control) or submitted to hypoxia without energy substrates for 60 min, followed by the restoration of normal conditions of incubation for 60 min. The fluorescence of NAD(P)H (blue) and TMRM (red) were imaged each 10 min during the simulated ischemia-reperfusion procedure. Results are mean ± SEM, of at least 3 different experiments.

As shown in figure 3A, the same stress did not induce such a dramatic increase and decrease in NAD(P)H and TMRM fluorescence, respectively, when PTP opening was prevented by either CsA or metformin. Together, these data strongly suggested that the removal of energy substrates in the presence of 3% O_2 led to permanent PTP opening after O_2 and energy substrates restoration in INS-1 cells. As shown in figure 3B, the antioxidant NAC also prevented PTP opening, suggesting that PTP opening was triggered by an oxidative stress during our experimental protocol.

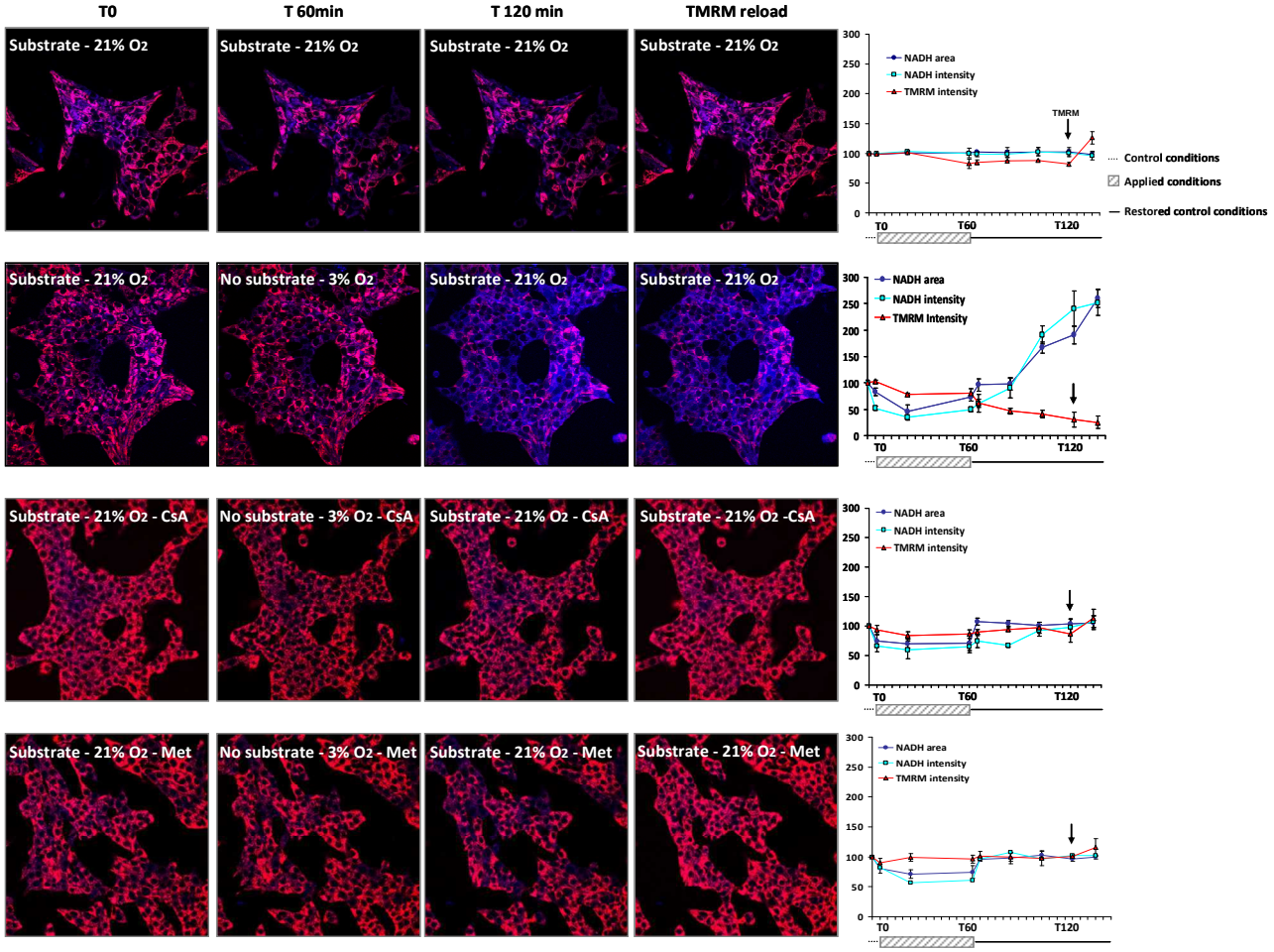


Figure 3A. Effect of CsA and Metformin on energy substrates deprivation-induced PTP opening. INS-1 cells incubated in the absence or presence of either 1 µM CsA for 1 h or 100 µM Metformin overnight, loaded with 10 nM TMRM for one hour, were submitted to the indicated condition for 60 min, followed by the restoration of normal conditions of incubation for 60 min. The fluorescence of NAD(P)H (blue) and TMRM (red) were imaged every 10 min during the procedure. Results are mean ± SEM, of at least 3 different experiments.

As shown in figure 3B, the NAD(P)H remained stable when cells were incubated in anoxia in the absence of energy substrates (most probably due to a lack of O_2 which prevented the consumption of endogenous substrates). After O_2 and energy substrates restoration, the NAD(P)H fluorescence slightly increased but remained lower than that observed when the removal of energy substrates was performed in hypoxia, while TMRM fluorescence was as in control condition after TMRM reload. This data indicated that the presence of O_2 during the removal of energy substrates was mandatory to induce PTP opening.

When cells were incubated in hypoxia alone (i.e., in the presence of energy substrates) (figure 3B), no change in NAD(P)H intensity and area were observed, while TMRM fluorescence was as in control condition after TMRM reload. This data indicated that hypoxia alone did not induce PTP opening suggesting that the absence of energy substrates was mandatory to induce PTP opening.

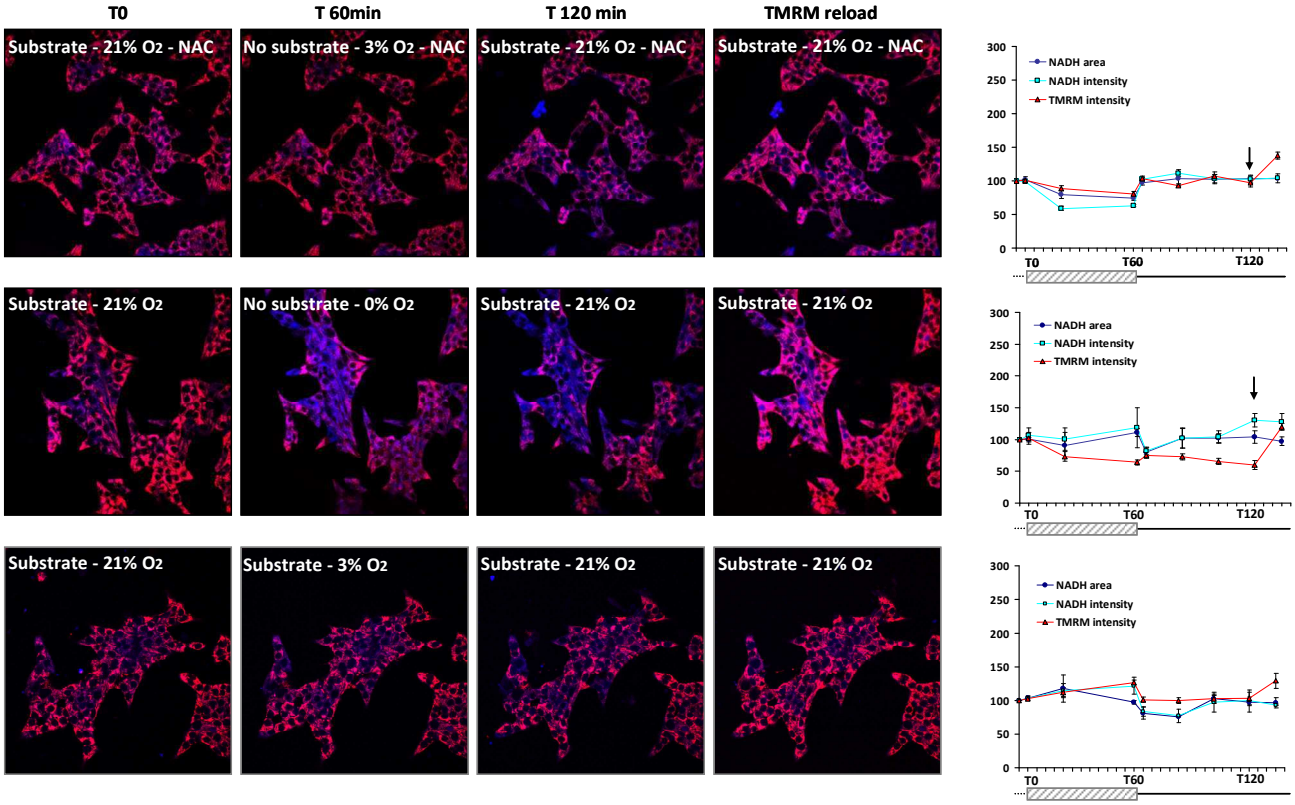


Figure 3B. Effect of NAC and anoxia on energy substrates deprivation-induced PTP opening. INS-1 cells incubated in the absence or presence of 5 mM NAC for 1 h loaded with 10 nM TMRM for one hour were submitted to the indicated condition for 60 min, followed by the every 10 min during the procedure. Results are mean ± SEM, of at least 3 different experiments.

Relationship between PTP opening and oxidative stress during O_2 and energy substrate deprivation procedure.

To assess superoxide production during O_2 and energy substrate deprivation procedure, INS-1 cells loaded 15 min with Mitosox^{TM} Red were imaged every 10 min. After the removal of energy substrates in hypoxia, a significant increase in oxidative stress was detected as compared with the control condition (figure 4). This first oxidative stress was followed by a burst in ROS production observed after O_2 and energy substrates restoration. Note however that the second oxidative stress was delayed and therefore was not synchronous with the normalization of O_2 concentration.

The second oxidative stress was totally prevented by all the conditions that prevented PTP opening (namely, CsA, metformin, NAC, incubation in anoxia without energy substrates, or incubation in hypoxia alone), indicating that the second oxidative stress was due to PTP opening. As expected, CsA (which is not an antioxidant) did not prevent the first oxidative stress, whereas NAC, anoxia without energy substrates or hypoxia alone prevented the first oxidative stress. Surprisingly, metformin also prevented the first oxidative stress.

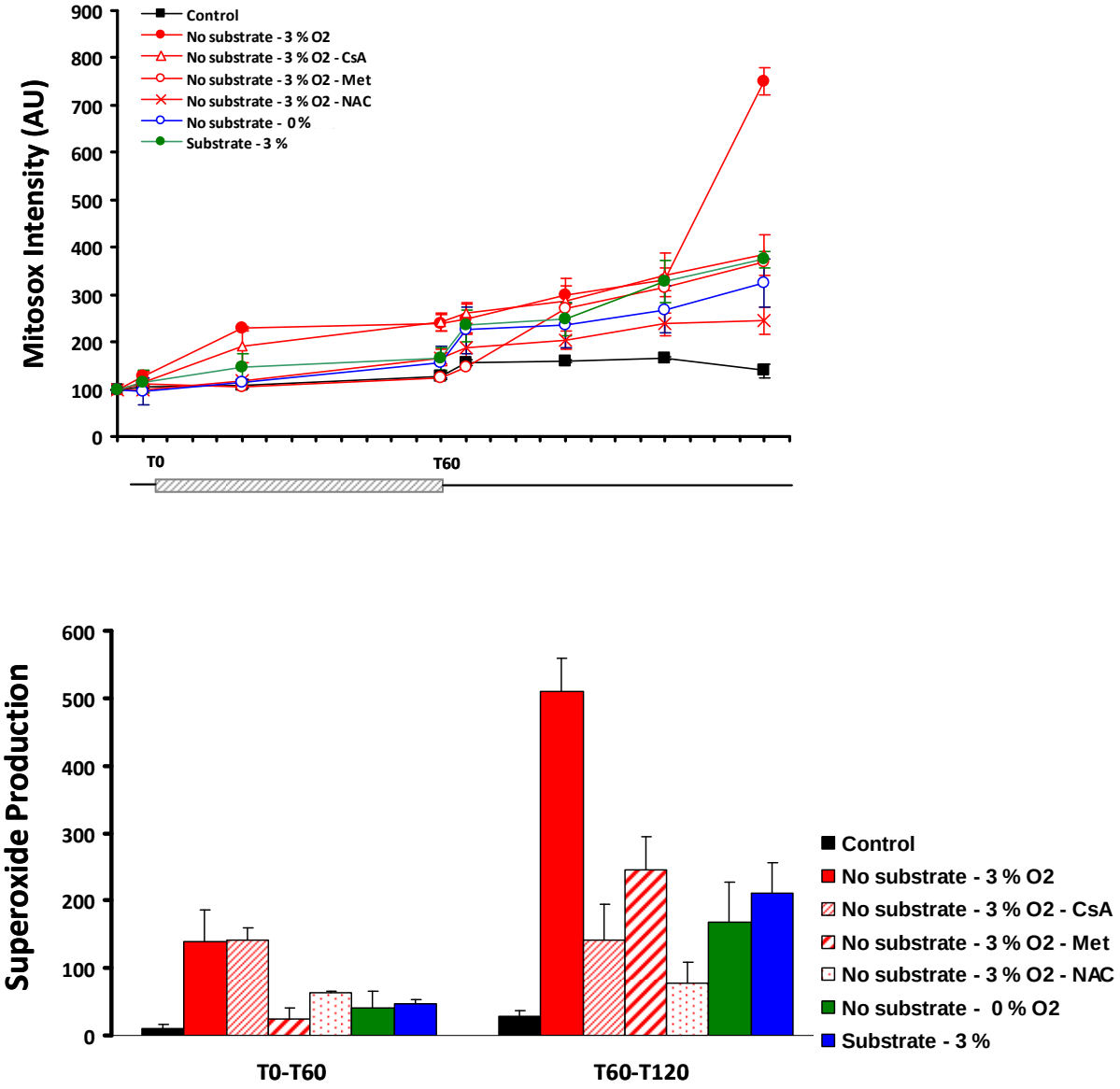


Figure 4. Effect of oxygen, energy substrates, CsA, Metformin and NAC on superoxide production. INS-1 overnight, loaded with 1 µM Mito-Sox™ Red for 15 min were submitted to the indicated condition for 60 min, followed by the restoration of normal conditions of incubation for 60 min. The fluorescence of Mito-Sox™ Red was imaged each 10 min during the procedure. Results are mean ± SEM, of at least 3 different experiments.

DISCUSSION

In this work, we have reported that a one-hour removal of energy substrates in INS-1 cells led to cell death via PTP opening only if an oxidative stress occurs during the deprivation of energy substrates. In agreement with what is generally reported, we also observed a robust oxidative stress after the restoration of O_2 and energy substrates, yet this was not the cause but the consequence of PTP opening.

The involvement of PTP opening in I/R is sustained by a large number of studies that have reported a beneficial effect of PTP inhibition on infarct size. However, none of these studies have directly visualized PTP opening during I/R or have analyzed the respective effect of substrates or O_2 deprivation. Here we indisputably show that the deprivation of energy substrates but not the deprivation of O_2 was responsible for PTP opening in INS-1 cells.

It has been previously shown that the deprivation of O_2 and energy substrates causes a first oxidative stress during deprivation (136, 138, 151), followed by a second one after O_2 and energy substrates restoration. However, the origin of these two oxidative stresses remains elusive. Mitochondria are the main source of oxidative stress in cells. Superoxide can be generated both at respiratory chain complexes I and III (152, 153). Complex I is a reversible proton pump that can generate superoxide during forward and reverse electron flux (154, 155). Complex I inhibitors increase superoxide production driven by forward electron flux, whereas they decrease superoxide production driven by reverse electron flux. Metformin, which partly inhibits complex I, has been shown to decrease superoxide production driven by reverse electron flux (3).

The observation that metformin dramatically decreased the superoxide production during energy substrates deprivation in hypoxia (see figure 4) strongly suggests that the oxidative stress during the deprivation procedure was due to a reverse electron flux at complex I.

Thermodynamically, the direction of electron flux through complex I relies on two forces: the difference in redox potential across complex I and the protonmotrice force. In INS-1 cells, the NAD(P)H decreased after the removal of energy substrates in hypoxia but not in anoxia (figure 2), suggesting that the endogenous substrates were consumed when O_2 was present. Therefore the observed decrease in NAD(P)H was most probably due to a decrease in mitochondria NADH, which is a main contributor of the difference in redox potential across complex I. In other words, reverse electron flux at complex I occurred after the removal of energy substrates most probably because of a decrease in mitochondrial NADH. In agreement with this proposal, we did not observe superoxide production when NAD(P)H remained normal (i.e., when cells were incubated in the presence of energy substrates (regardless of O_2 concentration) or in anoxia).

Theoretically, the production of superoxide is impossible in the total absence of O_2, while antioxidants are expected to hamper oxidative stresses. As shown in Figure 4, superoxide production after the removal of energy substrate was prevented by incubating cells either in anoxia or in the presence of NAC (see figure 4). The fact that the prevention of superoxide production during energy substrates removal totally prevented PTP opening and cell death strongly suggests that the oxidative stress during energy substrates deprivation was critical for PTP opening and cell death.

Whether or not PTP opening occurs during ischemia or only at reperfusion remains debated. In the present work, mitochondrial depolarization occurred during the simulated reperfusion (after the restoration of O_2 and energy substrates), suggesting that permanent PTP opening occurred at reperfusion in our model. Although oxidative stress is well known to favor PTP opening (85), the exact mechanism by which an oxidative stress during simulated ischemia is a prerequisite for PTP opening after simulated reperfusion remains unknown.

Note that mitochondrial depolarization and the increase in NAD(P)H fluorescence (i.e., PTP opening) preceded the second oxidative stress (compare Figures 3 and 4). It has been

reported that PTP opening stimulates ROS production in intact cells (156), and we have shown in isolated mitochondria that such production occurs at complex I and depends on NADH concentration (3). Assuming that the same mechanism occurs in intact cells, and taking into account that NAD(P)H concentration was low just after PTP opening but increased with time (figure 3), it is expected that PTP opening does not induce superoxide production until NADH concentration increases.

Although substantial progress has been made on islet isolation and immunosuppression protocols (1), obstacles still compromise islets transplant success. A waste of islets occurs during isolation procedure while 50 to 70% of islets are estimated to be destroyed in the immediate post transplant period (120), making β cell death a crucial issue that prevents islet transplantation from spreading. Among several factors, this work suggests that islets viability may be compromised through a lack of energy substrates during isolation procedure or after engraftment.

Since a lack of energy substrates leads to cell death due to PTP opening, preventing PTP opening during the entire islet transplant procedure may enhance β survival and improve islet transplant outcomes. Further in vivo studies are necessary to confirm that prevention of PTP opening improves islets survival and islets graft success.

Acknowledgments.

This work was supported by Grants from INSERM and the Ministère de l'Enseignement de la Recherche et de la Technologie (MERT). SL was supported and by fellowships from AGIRaDom.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET PRELIMINAIRES

En complément des résultats présentés dans l'étude III, nous avons testé deux conditions supplémentaires.

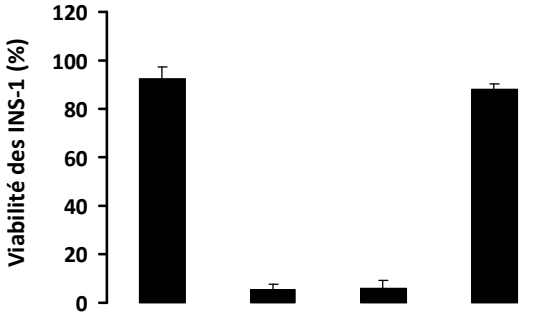
1. Carence en substrat en présence d'oxygène ($Fi0_2$ 21%)

Nous avons démontré que la carence en substrats est une condition obligatoire pour induire une ouverture du PTP et la mort cellulaire des INS-1. Nous avons de plus montré que l'anoxie complète associée à une carence en substrats prévient l'ouverture du PTP et la mort cellulaire via une réduction du stress oxydant au cours de l'anoxie.

Nous avons ici cherché à préciser le statut du PTP et la viabilité cellulaire des INS-1 exposées à une carence en substrats associée à une FiO_2 à 21 %. Nous montrons que dans cette condition, il persiste une altération sévère de la viabilité cellulaire. Le traitement des INS-1 par la Cyclosporine A prévient cette mortalité cellulaire (figure 5). Nous montrons que cette mortalité cellulaire est due à une ouverture du PTP, cette ouverture du PTP étant inhibée par la Cyclosporine A (figure 6). Concernant la production de superoxide, nous montrons que la carence en substrats en présence de 21 % d'O_2 induit un premier pic de production de superoxide au cours de la carence en substrats et un deuxième pic de production de superoxide après la restauration du niveau de substrats. Ce deuxième pic de production de superoxide est prévenu par la CsA confirmant que ce deuxième pic de production de superoxide est lié à l'ouverture du PTP (figure 7).

Ainsi, de façon surprenante, la complète disponibilité en oxygène ne protège aucunement de l'ouverture du PTP et de la mort cellulaire. L'ensemble de nos données suggère qu'un certain niveau d'oxygène est requis pour autoriser la production de superoxide au cours de la carence en substrats et déclencher l'ouverture du PTP (l'anoxie complète protège de l'ouverture du PTP et de la mort cellulaire). Cela étant, les INS-1 sont exposées à de petites quantités d'oxygène, le

facteur déterminant de la production de superoxide et de l'ouverture du PTP est la disponibilité en substrats.



Milieu complet	+	-	-	-
O2, %	21	3	21	21
CsA	-	-	-	+

Figure 5. Effet de la carence isolée en substrat en présence de 21 % d'O_2 sur la viabilité cellulaire. Les INS-1, incubées ou non en présence de 1 µM CsA, soumises à une heure de carence en substrat (FiO_2 21 %) sont analysées par cytométrie en flux après double marquage Annexin-IP.

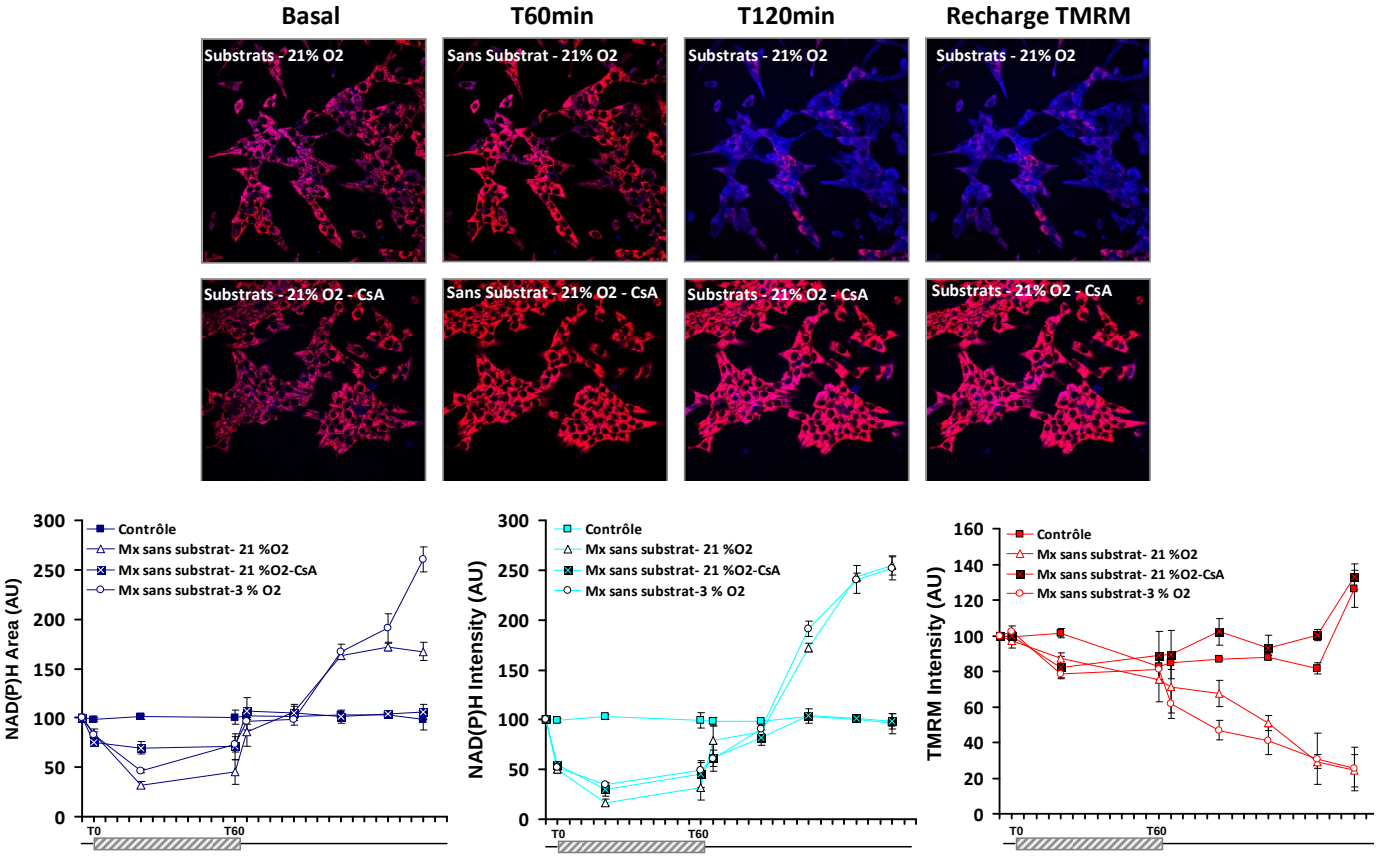


Figure 6. Effet de la carence isolée en substrat sur le PTP. Les INS-1, incubées en présence ou non de 1 µM CsA, chargées par 10 nM de TMRM pendant une heure, sont exposées une heure à une carence isolée en substrat (FiO_2 21 %). La fluorescence du NAD(P)H (bleue) et du TMRM (rouge) est acquise toutes les dix minutes pendant 2h.

2. Anoxie en présence de substrats

Pour finir, nous avons étudié la viabilité cellulaire, le statut du PTP et la production de superoxide des cellules INS-1 incubées en présence de substrats et soumises à une heure d'anoxie complète (FiO_2 0 %).

Concernant la viabilité cellulaire, une heure d'anoxie complète en présence de substrats n'altère pas la viabilité cellulaire des INS-1 (figure 7). Concernant le statut du PTP, nous décrivons une augmentation drastique de l'intensité du NAD(P)H au cours de l'anoxie. Cette augmentation de NAD(P)H est probablement le reflet de l'accumulation des substrats énergétiques par défaut de consommation par la chaîne respiratoire du fait de l'absence complète d'oxygène. Cette augmentation de NAD(P)H est complètement réversible dès la restauration d'une FiO_2 à 21 %. Concernant le potentiel de membrane mitochondriale, nous décrivons une baisse majeure de l'intensité de fluorescence du TMRM au cours de l'anoxie, une stabilité de l'intensité du TMRM après restauration d'une FiO_2 à 21 % avec une restauration complète du niveau d'intensité de fluorescence du TMRM après recharge en TMRM. A noter que l'incubation des cellules en présence de Cyclosporine A prévient partiellement la majoration d'intensité du NAD(P)H et la baisse d'intensité du TMRM (figure 8). L'ensemble de ces données suggère une ouverture du PTP au cours de l'anoxie, réversible à la restauration d'une FiO_2 à 21%.

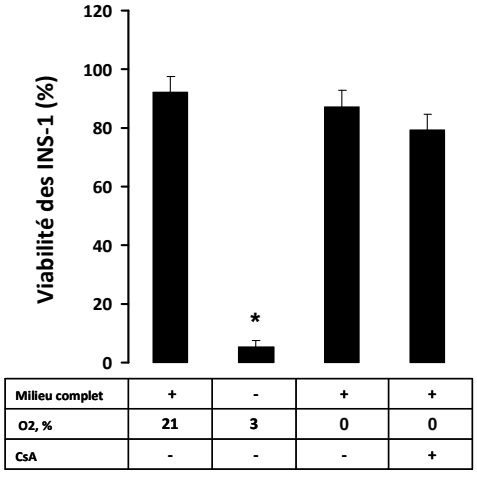


Figure 7. Effet de l'anoxie isolée sur la viabilité cellulaire. Les INS-1, incubées ou non en présence de 1 µM CsA, soumises à une heure d'anoxie en présence de substrats (FiO_2 0%) sont analysées par cytométrie en flux après double marquage Annexin-IP.

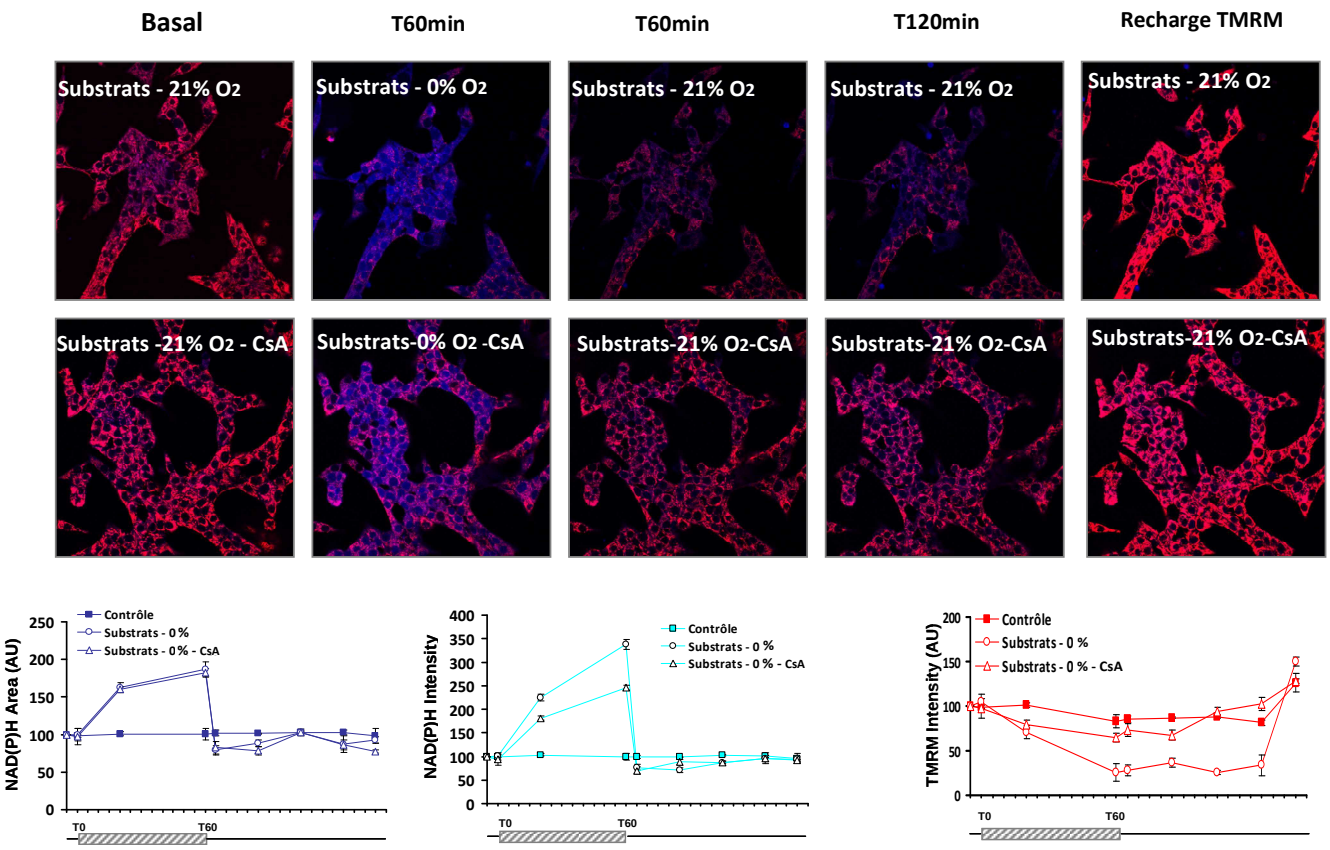


Figure 8. Effet de l'anoxie en présence de substrats sur le PTP. Les INS-1 incubées en présence ou non de 1 µM CsA, chargées par 10 nM de TMRM pendant une heure, sont exposées à une heure d'anoxie (FiO_2 0%) en présence de milieu RPMI 1640 complet. La fluorescence du NAD(P)H (bleue) et du TMRM (rouge) sont acquises toutes les dix minutes pendant 2h.

Concernant la production de superoxide, une heure d'anoxie complète en présence de substrat, induit un premier pic de production de superoxide, significativement supérieur au contrôle. Cette production de superoxide est par contre nettement inférieure à la production de superoxide induite par la carence en substrat en présence de 3 ou 21 % d'O_2. Dans cette condition d'anoxie complète restauration d'une FiO_2 à 21% après une heure d'anoxie complète en présence de substrat, il se produit un deuxième pic de production de superoxide nettement inférieur au pic de production de superoxide observée après carence en substrat en présence de 3 ou 21 % d'O_2. Au total, dans cette situation très particulière d'anoxie complète en présence de substrat, nous proposons qu'une ouverture réversible du PTP au cours de l'anoxie, en induisant une baisse du potentiel de membrane mitochondriale et en limitant le flux reverse, prévient la production de superoxide au cours de l'anoxie et l'ouverture définitive du PTP après restauration de la FiO_2 à 21%.

L'incubation des cellules en présence de CsA majore ce premier pic de production de superoxide (figure 9). Il semblerait ainsi que la CsA favorise la production de superoxide. La production de superoxide via le flux reverse d'électron au travers du complexe I de la chaîne respiratoire étant dépendante du potentiel de membrane mitochondriale et la CsA majorant à la fois le potentiel de membrane mitochondriale et la production de superoxide au cours de l'anoxie complète, nous faisons l'hypothèse que la production de superoxide au cours de cette période d'anoxie est elle aussi, liée à un flux reverse d'électrons au travers du complexe I de la chaîne respiratoire. Même si dans cette situation de complète disponibilité en substrats en anoxie, la quantité de NADH intra-mitochondrial et la dépolarisation mitochondriale observée sont deux conditions qui s'opposent au flux reverse d'électrons au travers du complexe I, nous faisons l'hypothèse que celui-ci est tout de même possible grâce à la complète réduction du pool des quinones induite par l'anoxie. Afin de progresser dans cette hypothèse, un dosage des quinones réduites pourra être réalisé. Toujours pour progresser dans l'hypothèse de l'existence d'un flux reverse d'électrons, cette même condition (anoxie complète en présence de substrats) devra être testée en présence de Metformine : une réduction de la production de superoxide en présence de Metformine confirmerait l'hypothèse. Pour finir, à la restauration d'une FiO_2 à 21% après une heure d'anoxie complète en présence de substrat, il se produit un deuxième pic de production de superoxide nettement inférieur au pic de production de superoxide observée après carence en substrat en présence de 3 ou 21 % d'O_2. Au total, dans cette situation très particulière d'anoxie complète en présence de substrat, nous proposons qu'une ouverture réversible du PTP au cours de l'anoxie, en induisant une baisse du potentiel de membrane mitochondriale et en limitant le flux reverse, prévient la production de superoxide au cours de l'anoxie et l'ouverture définitive du PTP après restauration de la FiO_2 à 21%.

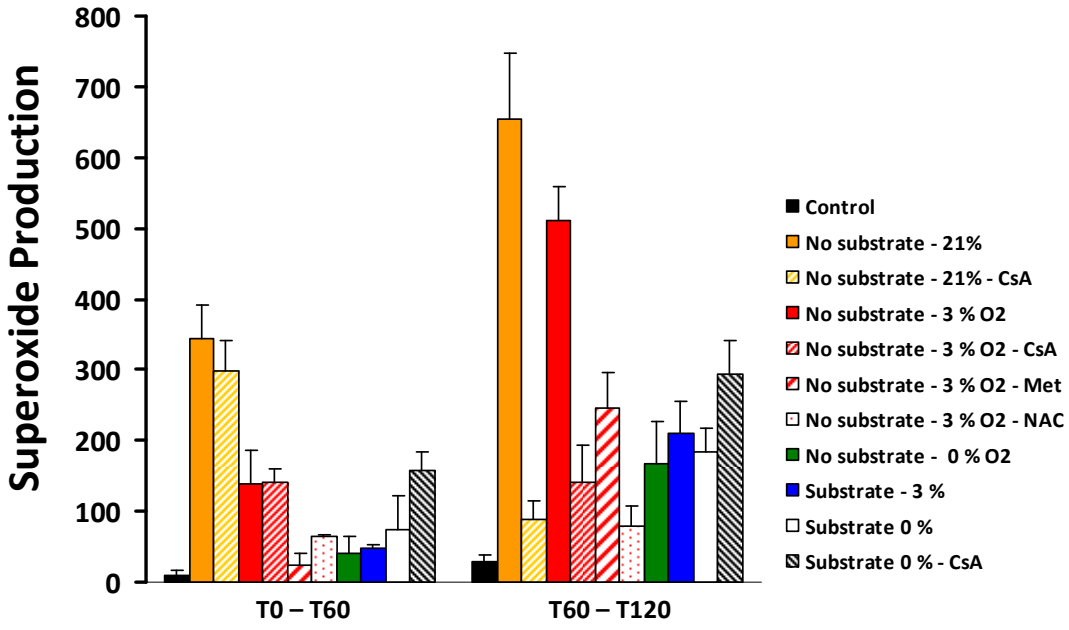


Figure 9. Effet des substrats, de l'oxygène, de la CsA, de la Met et de la NAC sur la production de superoxide
Les INS-1, incubées en présence ou non de 1µM de CsA, 100 µM de Met, 5 mM de NAC, chargées par 1 µM de Mito-Sox^{TM} Red pendant 15 min, sont soumises aux différents conditions indiquées pendant 1 heure puis les conditons basales sont restaurées. La fluorescence du Mito-Sox^{TM} Red est acquise toutes les dix minutes pendant toute la durée de la procédure.

3. Carence en substrat en présence de 3% d'oxygène sur îlots humains

Même si ces données sont préliminaires (n=2), non quantifiées et demandent à être confirmées par les expériences de viabilité cellulaire, il semblerait que la carence en substrat en présence de 3 % d'O_2 induise une ouverture du PTP sur l'îlot pancréatique humain de manière tout à fait superposable à ce qui est observé sur la cellule INS-1 (figure 10). Cette ouverture du PTP est prévenue par la CsA (figure 11).

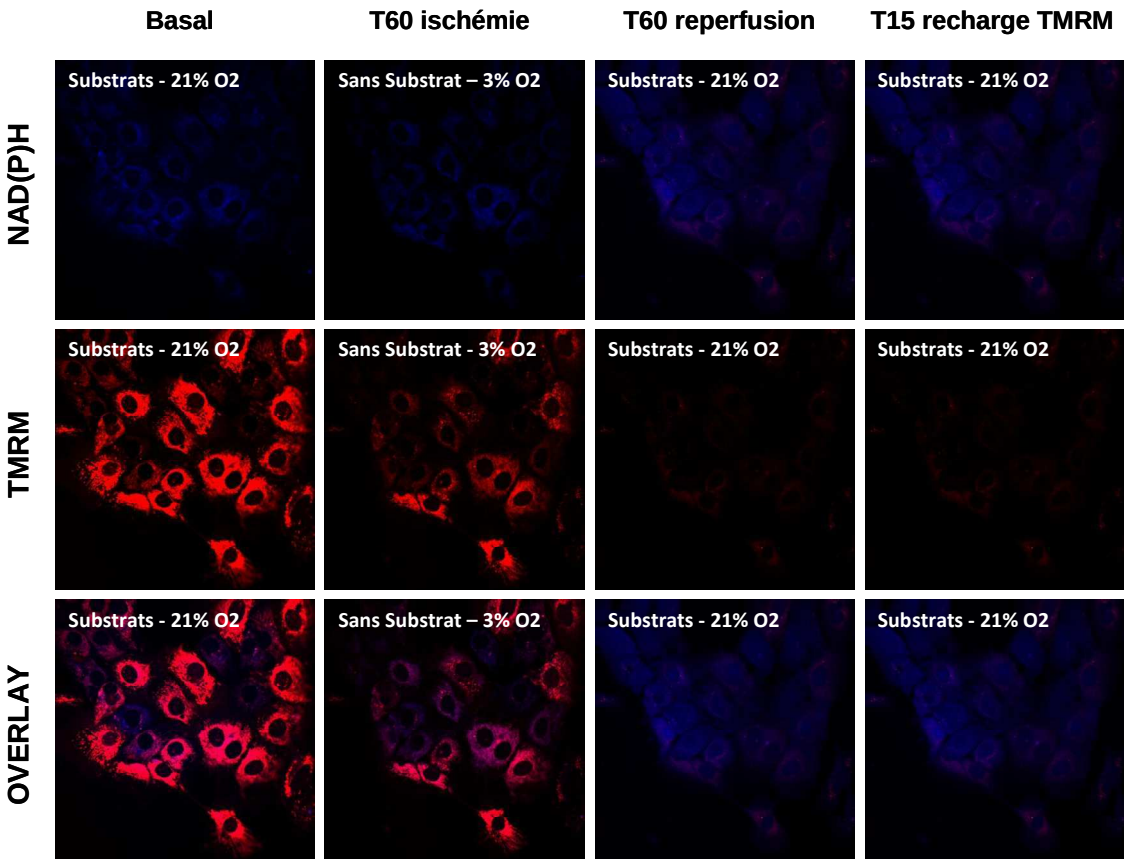


Figure 10. Effet de la carence en substrats et de la carence en O_2 (3%) sur le statut du PTP des îlots humains. Les îlots incubés chargés par 10 nM de TMRM pendant une heure, sont exposés à une heure d'hypoxie (FiO_2 3 %) en présence d'un milieu sans substrat. La fluorescence du NAD(P)H (bleue) et du TMRM (rouge) sont acquises toutes les dix minutes pendant 2h.

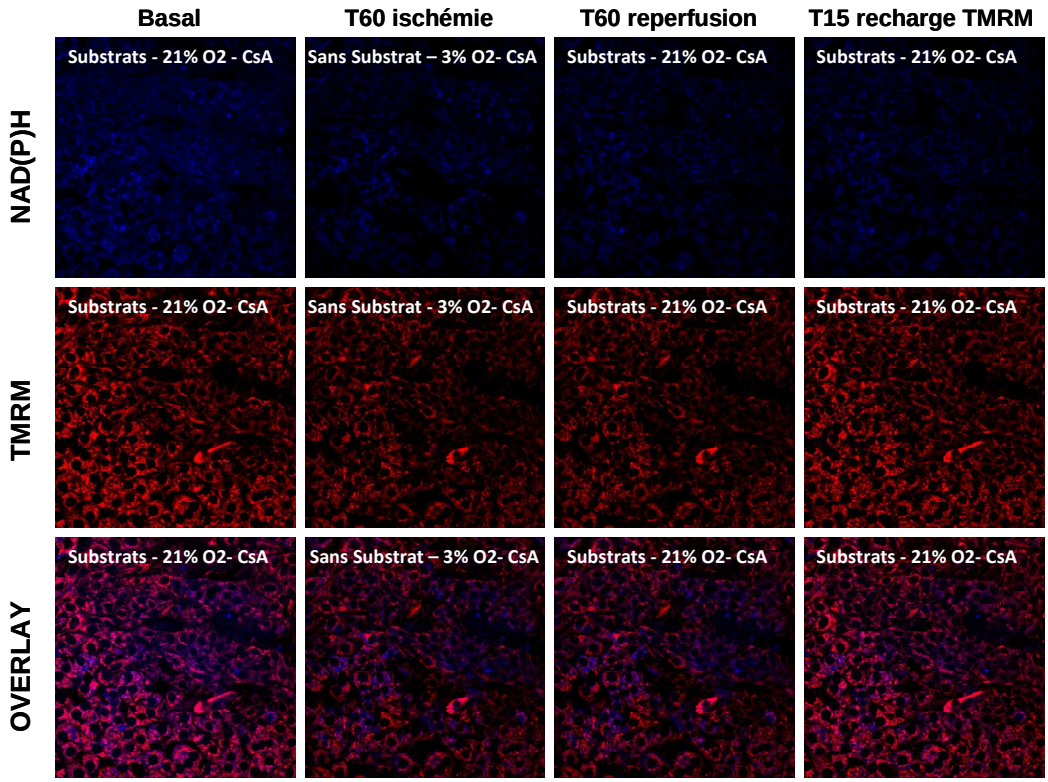


Figure 11. Effet de la carence en substrat et de la carence en O_2 (3%) sur le PTP des îlots humains. Les îlots incubés en présence de 1 µM CsA, chargés par 10 nM de TMRM pendant une heure, sont exposés à une heure d'hypoxie (FiO_2 3 %) en présence d'un milieu sans substrat. La fluorescence du NAD(P)H (bleue) et du TMRM (rouge) sont acquises toutes les dix minutes pendant 2h.

SYNTHESE DES RESULTATS

Nos résultats démontrent pour la première fois une implication du PTP dans la mort cellulaire des cellules béta pancréatiques murines et humaines, induite par l'hyperglycémie et l'hyperfructosémie. Nos données soulignent le bénéfice, sur la viabilité cellulaire β pancréatique, du ciblage pharmacologique du PTP via une inhibition directe (CsA) ou induite (metformine).

Concernant les données de carence en substrats et en oxygène, nos résultats montrent également pour la première fois l'implication du PTP dans la mort cellulaire, des cellules béta pancréatiques murines induite par la carence en substrats. La carence en substrat, en permettant le flux reverse d'électrons au sein du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, apparait comme un facteur fondamental dans la génération du stress oxydant, du déclenchement de l'ouverture du PTP et de la mort cellulaire. La carence en oxygène intervient au second plan comme un élément autorisant la production de stress oxydant : en présence d'une carence en substrat, l'anoxie complète protège de la production de superoxide, de l'ouverture du PTP et de la mort cellulaire tandis que la complète disponibilité en O_2 n'apporte aucun facteur de protection particulier contre l'ouverture du PTP et la mort cellulaire. La production de superoxide via le flux reverse d'électrons au sein du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, au cours de la carence en substrat est un élément déterminant pour le déclenchement de l'ouverture du PTP. Là encore, nos données soulignent le bénéfice, sur la viabilité cellulaire β pancréatique, du ciblage pharmacologique du PTP via une inhibition directe (CsA) ou induite (metformine) de l'ouverture du PTP, ou par une stratégie d'amont (par l'utilisation de stratégie anti-oxydante) prévenant le facteur causal de l'ouverture du PTP.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos données mettent évidence l'extrême sensibilité de la cellule β pancréatique au niveau des substrats exogènes auxquels elle peut être exposée. En effet, nous montrons une altération de la viabilité cellulaire aussi bien lorsque la cellule β est exposée à un excès de substrat (glucose ou fructose) que lorsqu'elle est exposée à une carence en substrat. Compte tenu des ses résultats, nous pouvons nous interroger sur les conditions métaboliques auxquels sont soumis les îlots pancréatiques au cours de chaque étape de la transplantation d'îlots de Langerhans.

De façon générale, la transplantation d'îlots de Langerhans se résume en cinq étapes :

- Prélèvement du pancréas ou explantation
- Stockage du pancréas et transport à froid
- Isolement des îlots
- Transport des îlots isolés vers le receveur
- Implantation

Dès l'explantation et jusqu'à la revascularisation (qui n'est pas synonyme d'implantation), le greffon est exposé à plusieurs périodes de privation partielle ou totale d'O_2 ou de substrat, délétère quant à la viabilité et à la fonctionnalité du greffon. On distingue le temps d'ischémie chaude et le temps d'ischémie froide. Le temps d'ischémie chaude correspond à la période où l'organe n'est plus perfusé par le sang du donneur mais où l'organe n'est encore pas réfrigéré. Le temps d'ischémie froide débute, pour le prélèvement d'organes solides, au moment de la réfrigération de l'organe jusqu'à la revascularisation chez le receveur. En ce qui concerne la transplantation d'îlots, l'organe subit une période d'ischémie froide qui prend fin avec le processus d'isolement d'îlots au cours duquel le pancréas est réchauffé à 37℃ au cours de l'étape de digestion par la collagénase.

Le temps d'ischémie chaude du pancréas est évalué à 44 min ± 22 (63). Au cours de cette période, le pancréas n'est plus perfusé : la suppléance en oxygène et en substrat n'est assurée que par simple diffusion à partir du sang restant dans les vaisseaux pancréatiques. Même s'il est difficile d'en préciser l'exacte proportion, il est licite de penser que le pancréas, au cours de cette période d'ischémie chaude, est soumis à la fois à une carence en oxygène mais également à une carence en substrats et d'en extrapoler les conséquences sur la viabilité cellulaire. A cette étape, pour préserver la viabilité du greffon pancréatique, plusieurs pistes d'amélioration peuvent être envisagées :

- Réduire le temps d'ischémie chaude en priorisant le prélèvement du pancréas compte tenu de son extrême sensibilité à la carence en substrat.

- Prévention pharmacologique directe de l'ouverture du PTP par l'utilisation des inhibiteurs du PTP : bolus de Cyclosporine A chez le donneur au moment du prélèvement multi-organes, traitement par Metformine du donneur.

- Prévention pharmacologique indirecte de l'ouverture du PTP : traitement par N-Acétyl cystéine du donneur pour prévenir la production de radicaux libres au niveau du pancréas.

- Prévention métabolique de l'ouverture du PTP en assurant un apport suffisant de substrats durant cette période d'ischémie chaude (Bolus de Glucose (11 mM) dans l'artère pancréatique après clampage de l'aorte).

Le temps d'ischémie chaude est suivi par un temps d'ischémie froide évalué à 7,3 heures (Range 1-27) (63) durant laquelle le pancréas est réfrigéré à 4°C en présence d'une solution de préservation d'organe. La réfrigération de l'organe vise à diminuer les besoins métaboliques (c-à-d en oxygène et en substrat) du greffon. Cela étant, même si les besoins énergétiques sont réduits par la réfrigération, ils ne sont jamais nuls et un métabolisme de base persiste. La solution

de préservation d'organe doit, entre autre, pouvoir garantir les besoins métaboliques minimums du greffon au cours de cette période. Lors de l'ischémie, la réduction de l'apport en oxygène et l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale induite par la réfrigération réduisent considérablement les possibilités de synthèse d'ATP via l'oxydation phosphorylante. La principale source d'ATP au cours de cette période est la glycolyse anaérobie. Les substrats présents dans les solutions de préservation d'organe autorisent-ils la glycolyse anaérobie, sur un plan strictement théorique ?

- La solution Celsior apporte comme unique substrat, le glutamate, substrat possible du Cycle de Krebs et donc de l'oxydation phosphorylante mais pas de la glycolyse anaérobie.

- La solution Eurocollins fournit du glucose, substrat de la glycolyse anaérobie mais à une concentration de 194 mmol/L. Compte tenu de la toxicité connue du glucose sur l'îlot humain à 37°C, l'utilisation de telles concentrations de glucose même à 4°C pose question quant aux conséquences sur la viabilité cellulaire β. Cette solution n'est d'ailleurs plus recommandée comme solution de préservation pour le pancréas.

- La solution HTK Custodiol fournit de l'α-cétoglutarate, substrat du Cycle de Krebs mais pas de la glycolyse anaérobie.

- Les solutions IGL-1® et UW n'apportent aucun substrat énergétique.

- Enfin, la solution SCOT 15® Macobiotech Transplant fournit 11 mM de glucose autorisant sur un plan strictement théorique la glycolyse anaérobie sans toxicité particulière sur la viabilité cellulaire β.

Composants mM	Celsior	Euro-Collins	HTK Custodiol	IGL-1	Macobiotech Tranplant	UW Belzer
Na+	100	10	15	125	143	28
K+	15	113.4	18	25	6	125
Ca2+	0.26		0.015		1.7	
Mg2+	13		4	5	1.2	5
Cl-	41.5	13.3	50		129	
SO42-	1.2		4	5		5
PO4		57.6	9	25		25
HCO3		10			25	
Histidine	30		180			
Histidine HCl			18			
Raffinose				30		30
Lactobionate	80			100		100
Mannitol	60		30			
HES						50 g/l
PEG (PM 20 000)					30 g/L	
PEG (PM 35 000)				1 g/L		
Allopurinol				1		1
Glutathion Red.	3			3		3
Adénosine						5
Glucose		194			11	
Glutamate	20					
Ketoglutarate			1			
Tryptophane			2			
pH	7.3	7.2 à 7.5		7.2/7.4	7.3	7.4
Osmolarité	320/360	355	290	320	330	320
Viscosité	1.15	1.18			1.822	3.156

Composition des principales solutions de conservation d'organe

Les solutions de préservation actuellement les plus largement utilisées pour la préservation du pancréas organe sont les solutions Celsior, UW Belzer et l'IGL-1 (63), solutions relativement pauvres en substrat énergétique. Giraud et al. (157) ont testé l'effet des solutions de préservation d'organe sur le rendement de l'isolation des îlots sur pancréas de souris soumis à 3,5 min d'ischémie chaude (équivalent à 30 min d'ischémie chaude chez l'homme). Cette équipe montre d'une part que la durée d'ischémie chaude altère le rendement de l'isolation d'îlot et la viabilité des îlots. L'utilisation de solution de préservation de type CMRL 1066 (5,5 mM Glucose) ou SCOT 15 (11 mM Glucose) double ou triple respectivement le rendement de l'isolement d'îlots par rapport à l'utilisation d'UW solution. L'effet bénéfique du SCOT 15 est habituellement expliqué par la présence d'un colloïde (PEG 20 kDa), limitant l'œdème cellulaire. Même si cet effet n'est bien entendu pas à négliger, la présence de 11 mM de Glucose dans cette solution de préservation tout comme la présence de 5,5 mM dans le CMRL 1066, assurant une suppléance correcte en substrat de la glycolyse anaérobie au cours de l'ischémie froide, peut tout à fait expliquer le bénéfice quant au rendement de l'isolation d'îlots. Ainsi, même si l'aspect métabolique ne peut

être considéré comme le seul élément à prendre en compte dans le choix de la solution de préservation, il demeure un élément d'importance à ne pas négliger.

La toxicité de la carence en substrat sur la cellule β pancréatique est indiscutable à 37°C mais reste à confirmer à 4°C. Nous prévoyons donc de reproduire nos expériences de carence en substrat à 4°C et de tester les différentes solutions de préservation sur la viabilité cellulaire β et le statut du PTP dans des situations d'hypoxie et d'hypothermie.

La période d'ischémie froide est suivie par l'étape d'isolement d'îlots : à cette étape le pancréas est soumis à une dissociation mécanique (agitation) et enzymatique (collagénase) à 37°C. Cette étape de digestion est réalisée en milieu CMRL 1066 à 37°C en atmosphère oxygénée. A cette étape, la suppléance en substrat apportée par le CMRL 1066 semble adaptée. Cette étape de digestion est suivie d'une étape de purification (séparation du tissu endocrine du tissu exocrine) et de lavage des îlots : le digestat lavé est conditionné au minimum 60 min dans du liquide de Belzer (UW solution). La séparation tissu endocrine / tissu exocrine est réalisée par centrifugation sur un gradient de densité dans une machine COBE 2991 réfrigérée. Au cours de cette étape, les îlots sont une nouvelle fois privés de substrat. Les îlots sont ensuite ensemencés en milieu CMRL 1066 et maintenus dans une étuve à CO_2 à 37°C pendant 24h. Au bout de ce laps de temps, les flacons sont exposés à une température comprise entre 25-30°C pendant 48h. Le transport des îlots vers le receveur a lieu en milieu CMRL 1066 à température contrôlée (25-30°C).

La dernière étape, et non la moindre, correspond à l'implantation des îlots isolés chez le receveur. Les îlots isolés, injectés dans la veine porte, vont être emportés par le flux sanguin hépatique et vont s'emboliser au niveau du foie. Contrairement aux transplantations d'organes solides où la réimplantation permet la revascularisation de l'organe, les premiers signes de revascularisation des îlots n'apparaissent que 2 à 4 jours après l'implantation. La revascularisation n'est complète qu'à partir du quinzième jour post-transplantation. Néanmoins, la revascularisation des îlots transplantés reste imparfaite avec une densité capillaire et un débit sanguin capillaire nettement

inférieurs à ceux observés au niveau des îlots natifs (76, 77). De plus, les études montrent que, la PaO_2 des îlots à 1 mois et 9 mois (78, 79) post-transplantation restent basses (PaO_2 5 mmHg pour les îlots transplantés vs PaO_2 40 mmHg pour îlots natifs). Ainsi, au-delà de la période de revascularisation, les îlots ont à faire face à une hypoxie chronique. Dans notre modèle, l'exposition des INS-1 une heure à une hypoxie isolée n'altère pas la viabilité cellulaire. Cependant, quelques études ont démontré une altération de la viabilité cellulaire de cellules MIN-6 et des îlots humains exposés à 24 heures d'hypoxie (FiO_2 2%) (150, 158). Ces données soulignent donc la toxicité de l'hypoxie chronique sur la viabilité cellulaire β.

Pendant les quinze premiers jours post-transplantation, la suppléance en oxygène et nutriments ne va se faire qu'à partir des territoires hépatiques adjacents. Le foie, bénéficiant d'une vascularisation portale, est soumis à une grande variabilité quant aux concentrations de substrats, dépendante de l'alimentation. En effet, les concentrations portales post-prandiales de glucose et de fructose sont entre 2 à 5 fois plus élevées que leurs concentrations systémiques. Ainsi, les îlots suppléés en nutriments par diffusion à partir du territoire portal, vont être exposés à des concentrations extrêmement variables de glucose (30 mM de glucose en post-prandial vs 5,5 mM à jeun) mais également de fructose (2,5 mM fructose en post-prandial) jusqu'au rétablissement de leur vascularisation artérielle propre. Même s'il est difficile de déterminer avec précision quelles concentrations de glucose diffusent réellement jusqu'aux îlots, nous pouvons tout à fait imaginer qu'à l'état post-prandial, les îlots sont exposés à des concentrations élevées de glucose donc délétères sur la viabilité cellulaire. De même, à jeun, si la concentration portale de glucose est évaluée à 5,5 mM, la concentration réelle de glucose diffusant aux îlots peut tout à fait être inférieure à 5,5 mM, exposant ainsi les îlots à une carence en substrats. Différentes pistes peuvent être proposées pour améliorer la viabilité du greffon à cette étape :

- La première consisterait à prévenir une fois de plus l'ouverture du PTP via un traitement du receveur par Cyclosporine A et/ou Metformine et/ou N–Acétyl Cystéine pendant les quinze premiers jours post-transplantation.

- La deuxième consisterait à limiter les variations portales de glucose et de fructose par une alimentation artificielle continue permettant un contrôle précis des apports glucidiques pendant les quinze premiers jours post-transplantation.

- La dernière piste consisterait à envisager un autre site de transplantation que le territoire hépatique de façon à s'amender des contraintes métaboliques inhérentes à la vascularisation portale. A ce jour, même si de multiples sites de transplantation ont été testés (rate, capsule rénale, muscle, thymus, péritoine, chambre pré vascularisée…), aucun n'a à ce jour démontré de supériorité par rapport au site hépatique.

La viabilité du greffon pancréatique et des îlots isolés est un enjeu crucial de la transplantation d'îlots de Langerhans. Notre travail a permis de souligner l'extrême sensibilité de la cellule β pancréatique au niveau des substrats énergétiques. Le pore de transition et le stress oxydant semblent être des acteurs clés dans l'altération de la viabilité cellulaire β. Ainsi, garantir un niveau de substrats énergétiques optimal à la cellule β et /ou prévenir l'ouverture du PTP en utilisant les inhibiteurs pharmacologiques connus du PTP ou des anti-oxydants au cours des différentes étapes de la transplantation d'îlots de Langerhans sont des pistes de travail à envisager pour espérer préserver la viabilité cellulaire β au cours de cette procédure.

BIBLIOGRAPHIE

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

2. **Mitchell P.** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961;191:144-8.

3. **Batandier C, Guigas B, Detaille D, et al.** The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr*. 2006;38(1):33-42.

4. **Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M.** The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:619-42.

5. **Li YZ, Li CJ, Pinto AV, Pardee AB.** Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. *Mol Med*. 1999;5(4):232-9.

6. **Desagher S, Martinou JC.** Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2000;10(9):369-77.

7. **Gonzales DH, Neupert W.** Biogenesis of mitochondrial c-type cytochromes. *J Bioenerg Biomembr*. 1990;22(6):753-68.

8. **Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91(4):479-89.

9. **Chang HY, Yang X.** Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(4):821-46.

10. **Thornberry NA, Lazebnik Y.** Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-6.

11. **Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G.** Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol*. 2002;192(2):131-7.

12. **Hsu YT, Youle RJ.** Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem*. 1998;273(17):10777-83.

13. **Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC.** Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J*. 2000;345 Pt 2:271-8.

14. **Narita M, Shimizu S, Ito T, et al.** Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14681-6.

15. **Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y.** Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 1999;399(6735):483-7.

16. **Vieira HL, Haouzi D, El Hamel C, et al.** Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ*. 2000;7(12):1146-54.

17. **Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al.** Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*. 1998;281(5385):2027-31.

18. **Chappell JB, Crofts AR.** Calcium Ion Accumulation and Volume Changes of Isolated Liver Mitochondria. Calcium Ion-Induced Swelling. *Biochem J*. 1965;95:378-86.

19. **Crofts AR, Chappell JB.** Calcium Ion Accumulation and Volume Changes of Isolated Liver Mitochondria. Reversal of Calcium Ion-Induced Swelling. *Biochem J*. 1965;95:387-92.

20. **Batandier C, Leverve X, Fontaine E.** Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17197-204.

21. **Hunter DR, Haworth RA.** The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys*. 1979;195(2):453-9.

22. **Novgorodov SA, Gudz TI, Jung DW, Brierley GP.** The nonspecific inner membrane pore of liver mitochondria: modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;180(1):33-8.

23. **Tikhonova IM, Andreyev A, Antonenko Yu N, Kaulen AD, Komrakov A, Skulachev VP.** Ion permeability induced in artificial membranes by the ATP/ADP antiporter. *FEBS Lett*. 1994;337(3):231-4.

24. **Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, et al.** The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. 2004;427(6973):461-5.

25. **Halestrap AP, Davidson AM.** Inhibition of Ca2(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J*. 1990;268(1):153-60.

26. **Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P.** Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem*. 2005;280(19):18558-61.

27. **Crompton M.** Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol*. 2000;529 Pt 1:11-21.

28. **McEnery MW.** The mitochondrial benzodiazepine receptor: evidence for association with the voltage-dependent anion channel (VDAC). *J Bioenerg Biomembr*. 1992;24(1):63-9.

29. **O'Gorman E, Beutner G, Dolder M, Koretsky AP, Brdiczka D, Wallimann T.** The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett*. 1997;414(2):253-7.

30. **Beutner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D.** Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1368(1):7-18.

31. **Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD.** Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol*. 2007;9(5):550-5.

32. **Kinnally KW, Zorov DB, Antonenko YN, Snyder SH, McEnery MW, Tedeschi H.** Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(4):1374-8.

33. **Brown DA, Aon MA, Akar FG, Liu T, Sorarrain N, O'Rourke B.** Effects of 4'-chlorodiazepam on cellular excitation-contraction coupling and ischaemia-reperfusion injury in rabbit heart. *Cardiovasc Res*. 2008;79(1):141-9.

34. **Gonzalez-Polo RA, Carvalho G, Braun T, et al.** PK11195 potently sensitizes to apoptosis induction independently from the peripheral benzodiazepin receptor. *Oncogene*. 2005;24(51):7503-13.

35. **Kletsas D, Li W, Han Z, Papadopoulos V.** Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) and PBR drug ligands in fibroblast and fibrosarcoma cell proliferation: role of ERK, c-Jun and ligand-activated PBR-independent pathways. *Biochem Pharmacol*. 2004;67(10):1927-32.

36. **Dolder M, Wendt S, Wallimann T.** Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol Signals Recept*. 2001;10(1-2):93-111.

37. **Dolder M, Walzel B, Speer O, Schlattner U, Wallimann T.** Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem*. 2003;278(20):17760-6.

38. **Hunter DR, Haworth RA, Southard JH.** Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem*. 1976;251(16):5069-77.

39. **Szabo I, Bernardi P, Zoratti M.** Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J Biol Chem*. 1992;267(5):2940-6.

40. **Bernardi P, Veronese P, Petronilli V.** Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me2+ binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J Biol Chem*. 1993;268(2):1005-10.

41. **Petronilli V, Cola C, Bernardi P.** Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca2+. *J Biol Chem*. 1993;268(2):1011-6.

42. **Haworth RA, Hunter DR.** The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca2+ trigger site. *Arch Biochem Biophys*. 1979;195(2):460-7.

43. **Nicolli A, Petronilli V, Bernardi P.** Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry*. 1993;32(16):4461-5.

44. **Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P.** Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem*. 1996;271(4):2185-92.

45. **Hunter DR, Haworth RA.** The Ca2+-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca2+ release. *Arch Biochem Biophys*. 1979;195(2):468-77.

46. **Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I, Zoratti M.** Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem*. 1992;267(5):2934-9.

47. **Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P.** Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *J Biol Chem*. 2008;283(39):26307-11.

48. **Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP.** Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem*. 1997;272(6):3346-54.

49. **Lenartowicz E, Bernardi P, Azzone GF.** Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. 1991;23(4):679-88.

50. **Petronilli V, Costantini P, Scorrano L, Colonna R, Passamonti S, Bernardi P.** The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J Biol Chem*. 1994;269(24):16638-42.

51. **Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P.** Selective inhibition of the mitochondrial permeability transition pore at the oxidation-reduction sensitive dithiol by monobromobimane. *FEBS Lett*. 1995;362(2):239-42.

52. **Chernyak BV, Bernardi P.** The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur J Biochem*. 1996;238(3):623-30.

53. **Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P.** Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem*. 1996;271(12):6746-51.

54. **Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P.** Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem*. 1998;273(20):12662-8.

55. **Chauvin C, De Oliveira F, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, Fontaine E.** Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem*. 2001;276(44):41394-8.

56. **Guigas B, Detaille D, Chauvin C, et al.** Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J*. 2004;382(Pt 3):877-84.

57. **Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL.** The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IV. Diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 1984;91(12):1464-74.

58. **Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL.** Glycosylated hemoglobin predicts the incidence and progression of diabetic retinopathy. *JAMA*. 1988;260(19):2864-71.

59. **Chase HP, Jackson WE, Hoops SL, Cockerham RS, Archer PG, O'Brien D.** Glucose control and the renal and retinal complications of insulin-dependent diabetes. *JAMA*. 1989;261(8):1155-60.

60. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*. 1993;329(14):977-86.

61. **Villiger P, Ryan EA, Owen R, et al.** Prevention of bleeding after islet transplantation: lessons learned from a multivariate analysis of 132 cases at a single institution. *Am J Transplant*. 2005;5(12):2992-8.

62. **Kawahara T, Kin T, Kashkoush S, et al.** Portal vein thrombosis is a potentially preventable complication in clinical islet transplantation. *Am J Transplant*;11(12):2700-7.

63. Seventh annual report - Collaborative islet transplant registry. 2011.

64. **Bretzel RG, Jahr H, Eckhard M, Martin I, Winter D, Brendel MD.** Islet cell transplantation today. *Langenbecks Arch Surg*. 2007;392(3):239-53.

65. **Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al.** Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000;343(4):230-8.

66. **Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al.** Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005;54(7):2060-9.

67. **Badet L, Benhamou PY, Wojtusciszyn A, et al.** Expectations and strategies regarding islet transplantation: metabolic data from the GRAGIL 2 trial. *Transplantation*. 2007;84(1):89-96.

68. **Davalli AM, Ogawa Y, Ricordi C, Scharp DW, Bonner-Weir S, Weir GC.** A selective decrease in the beta cell mass of human islets transplanted into diabetic nude mice. *Transplantation*. 1995;59(6):817-20.

69. **Pileggi A, Ricordi C, Alessiani M, Inverardi L.** Factors influencing Islet of Langerhans graft function and monitoring. *Clin Chim Acta*. 2001;310(1):3-16.

70. **Kaneto H, Fujii J, Myint T, et al.** Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J*. 1996;320 (Pt 3):855-63.

71. **Maiztegui B, Borelli MI, Madrid VG, et al.** Sitagliptin prevents the development of metabolic and hormonal disturbances, increased beta-cell apoptosis and liver steatosis induced by a fructose-rich diet in normal rats. *Clin Sci (Lond)*;120(2):73-80.

72. **Federici M, Hribal M, Perego L, et al.** High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes*. 2001;50(6):1290-301.

73. **Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, et al.** Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*. 2001;50(8):1683-90.

74. **Ballian N, Brunicardi FC.** Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. *World J Surg*. 2007;31(4):705-14.

75. **Menger MD, Jaeger S, Walter P, Feifel G, Hammersen F, Messmer K.** Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes*. 1989;38 Suppl 1:199-201.

76. **Jansson L, Carlsson PO.** Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia*. 2002;45(6):749-63.

77. **Carlsson PO, Palm F, Mattsson G.** Low revascularization of experimentally transplanted human pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(12):5418-23.

78. **Carlsson PO, Liss P, Andersson A, Jansson L.** Measurements of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. *Diabetes*. 1998;47(7):1027-32.

79. **Carlsson PO, Palm F, Andersson A, Liss P.** Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. *Diabetes*. 2001;50(3):489-95.

80. **Tanioka Y, Hering BJ, Sutherland DE, et al.** Effect of pancreatic warm ischemia on islet yield and viability in dogs. *Transplantation*. 1997;64(12):1637-41.

81. **Koshkin V, Dai FF, Robson-Doucette CA, Chan CB, Wheeler MB.** Limited mitochondrial permeabilization is an early manifestation of palmitate-induced lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 2008;283(12):7936-48.

82. **Marselli L, Trincavelli L, Santangelo C, et al.** The role of peripheral benzodiazepine receptors on the function and survival of isolated human pancreatic islets. *Eur J Endocrinol*. 2004;151(2):207-14.

83. **Fujimoto K, Chen Y, Polonsky KS, Dorn GW, 2nd.** Targeting cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition enhances beta-cell survival and prevents diabetes in Pdx1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*;107(22):10214-9.

84. **Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H.** Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*. 2003;52(3):581-7.

85. **Zoratti M, Szabo I.** The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1241(2):139-76.

86. **Detaille D, Guigas B, Chauvin C, et al.** Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes*. 2005;54(7):2179-87.

87. **Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY.** Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366(1-2):79-94.

88. **Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P.** Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res*. 2003;93(4):292-301.

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

90. **Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW.** Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. 1988;37(4):413-20.

91. **Bucher P, Mathe Z, Morel P, et al.** Assessment of a novel two-component enzyme preparation for human islet isolation and transplantation. *Transplantation*. 2005;79(1):91-7.

92. **Dumas JF, Argaud L, Cottet-Rousselle C, et al.** Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells. *J Biol Chem*. 2009;284(22):15117-25.

93. **Robinson KM, Janes MS, Beckman JS.** The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat Protoc*. 2008;3(6):941-7.

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

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

96. **Service FJ, Nelson RL.** Characteristics of glycemic stability. *Diabetes Care*. 1980;3(1):58-62.

97. **Wahjudi PN, Patterson ME, Lim S, Yee JK, Mao CS, Lee WN.** Measurement of glucose and fructose in clinical samples using gas chromatography/mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2010;43(1-2):198-207.

98. **Kashiwagi A, Obata T, Suzaki M, et al.** Increase in cardiac muscle fructose content in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism*. 1992;41(10):1041-6.

99. **Tilton RG, Chang K, Nyengaard JR, Van den Enden M, Ido Y, Williamson JR.** Inhibition of sorbitol dehydrogenase. Effects on vascular and neural dysfunction in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1995;44(2):234-42.

100. **Bizeau ME, Pagliassotti MJ.** Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism*. 2005;54(9):1189-201.

101. **Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, et al.** The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *Febs J*. 2006;273(10):2077-99.

102. **Bernardi P.** Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1127-55.

103. **Kim WH, Lee JW, Suh YH, et al.** Exposure to chronic high glucose induces beta-cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2005;54(9):2602-11.

104. **Tanaka Y, Gleason CE, Tran PO, Harmon JS, Robertson RP.** Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(19):10857-62.

105. **Koshkin V, Bikopoulos G, Chan CB, Wheeler MB.** The characterization of mitochondrial permeability transition in clonal pancreatic beta-cells. Multiple modes and regulation. *J Biol Chem*. 2004;279(40):41368-76.

106. **Barbu A, Welsh N, Saldeen J.** Cytokine-induced apoptosis and necrosis are preceded by disruption of the mitochondrial membrane potential (Deltapsi(m)) in pancreatic RINm5F cells: prevention by Bcl-2. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;190(1-2):75-82.

107. **Fujimoto K, Chen Y, Polonsky KS, Dorn GW, 2nd.** Targeting cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition enhances beta-cell survival and prevents diabetes in Pdx1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(22):10214-9.

108. **El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X.** Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*. 2000;275(1):223-8.

109. **Moriscot C, Pattou F, Kerr-Conte J, Richard MJ, Lemarchand P, Benhamou PY.** Contribution of adenoviral-mediated superoxide dismutase gene transfer to the reduction in nitric oxide-induced cytotoxicity on human islets and INS-1 insulin-secreting cells. *Diabetologia*. 2000;43(5):625-31.

110. **Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S.** Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*. 1997;46(11):1733-42.

111. **Murphy RC, Schneider E, Kinnally KW.** Overexpression of Bcl-2 suppresses the calcium activation of a mitochondrial megachannel. *FEBS Lett*. 2001;497(2-3):73-6.

112. **Roy SS, Madesh M, Davies E, Antonsson B, Danial N, Hajnoczky G.** Bad targets the permeability transition pore independent of Bax or Bak to switch between Ca2+-dependent cell survival and death. *Mol Cell*. 2009;33(3):377-88.

113. **Zamzami N, El Hamel C, Maisse C, et al.** Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene*. 2000;19(54):6342-50.

114. **D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, et al.** Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J*. 2004;18(9):959-61.

115. **Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M.** PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res*. 2006;69(1):178-85.

116. **Efanova IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B, et al.** Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular Ca2+ concentration. *J Biol Chem*. 1998;273(50):33501-7.

117. **Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, et al.** Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2427-43.

118. **Sesti G, Marini MA, Cardellini M, et al.** The Arg972 variant in insulin receptor substrate-1 is associated with an increased risk of secondary failure to sulfonylurea in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(6):1394-8.

119. **Eriksson O, Eich T, Sundin A, et al.** Positron emission tomography in clinical islet transplantation. *Am J Transplant*. 2009;9(12):2816-24.

120. **Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E.** Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes*. 2002;51(1):66-72.

121. **Emamaullee JA, Shapiro AM.** Factors influencing the loss of beta-cell mass in islet transplantation. *Cell Transplant*. 2007;16(1):1-8.

122. **Lablanche S, Cottet-Rousselle C, Lamarche F, et al.** Protection of pancreatic INS-1 beta-cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporin A or metformin. *Cell Death Dis*. 2011;2:e134.

123. **Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD.** Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2640-7.

124. **Duchen MR.** Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*. 2000;529 Pt 1:57-68.

125. **Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P.** Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23(16):2861-74.

126. **Kantrow SP, Piantadosi CA.** Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232(3):669-71.

127. **Moriscot C, Candel S, Sauret V, et al.** MnTMPyP, a metalloporphyrin-based superoxide dismutase/catalase mimetic, protects INS-1 cells and human pancreatic islets from an in vitro oxidative challenge. *Diabetes Metab*. 2007;33(1):44-53.

128. **Tobaben S, Grohm J, Seiler A, Conrad M, Plesnila N, Culmsee C.** Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. *Cell Death Differ*. 2011;18(2):282-92.

129. **Grohm J, Plesnila N, Culmsee C.** Bid mediates fission, membrane permeabilization and peri-nuclear accumulation of mitochondria as a prerequisite for oxidative neuronal cell death. *Brain Behav Immun*. 2010;24(5):831-8.

130. **Jansson L.** The regulation of pancreatic islet blood flow. *Diabetes Metab Rev*. 1994;10(4):407-16.

131. **Brunicardi FC, Stagner J, Bonner-Weir S, et al.** Microcirculation of the islets of Langerhans. Long Beach Veterans Administration Regional Medical Education Center Symposium. *Diabetes*. 1996;45(4):385-92.

132. **Parr EL, Bowen KM, Lafferty KJ.** Cellular changes in cultured mouse thyroid glands and islets of Langerhans. *Transplantation*. 1980;30(2):135-41.

133. **Clayton HA, London NJ.** Survival and function of islets during culture. *Cell Transplant*. 1996;5(1):1-12; discussion 13-7, 19.

134. **Sandberg JO, Margulis B, Jansson L, Karlsten R, Korsgren O.** Transplantation of fetal porcine pancreas to diabetic or normoglycemic nude mice. Evidence of a rapid engraftment process demonstrated by blood flow and heat shock protein 70 measurements. *Transplantation*. 1995;59(12):1665-9.

135. **Bolli R, Marban E.** Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*. 1999;79(2):609-34.

136. **Robin E, Guzy RD, Loor G, et al.** Oxidant stress during simulated ischemia primes cardiomyocytes for cell death during reperfusion. *J Biol Chem*. 2007;282(26):19133-43.

137. **Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Schumacker PT, Becker LB.** Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(9):2571-83.

138. **Loor G, Kondapalli J, Iwase H, et al.** Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1382-94.

139. **Fischer UM, Cox CS, Jr., Allen SJ, Stewart RH, Mehlhorn U, Laine GA.** The antioxidant N-acetylcysteine preserves myocardial function and diminishes oxidative stress after cardioplegic arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126(5):1483-8.

140. **McDonald MC, Zacharowski K, Bowes J, Cuzzocrea S, Thiemermann C.** Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(5-6):493-503.

141. **Griffiths EJ, Halestrap AP.** Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995;307 (Pt 1):93-8.

142. **Di Lisa F, Bernardi P.** Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res*. 2006;70(2):191-9.

143. **Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C.** Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol*. 2011;3(6):186-200.

144. **Griffiths EJ, Halestrap AP.** Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25(12):1461-9.

145. **Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM.** Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res*. 2002;55(3):534-43.

146. **Weinbrenner C, Liu GS, Downey JM, Cohen MV.** Cyclosporine A limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Cardiovasc Res*. 1998;38(3):678-84.

147. **Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, et al.** Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38(2):367-74.

148. **Bhamra GS, Hausenloy DJ, Davidson SM, et al.** Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(3):274-84.

149. **Piot C, Croisille P, Staat P, et al.** Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359(5):473-81.

150. **Linn T, Schmitz J, Hauck-Schmalenberger I, et al.** Ischaemia is linked to inflammation and induction of angiogenesis in pancreatic islets. *Clin Exp Immunol*. 2006;144(2):179-87.

151. **Clarke SJ, Khaliulin I, Das M, Parker JE, Heesom KJ, Halestrap AP.** Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation. *Circ Res*. 2008;102(9):1082-90.

152. **Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS.** Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4127-35.

153. **Boveris A, Chance B.** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973;134(3):707-16.

154. **Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA.** High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 1997;416(1):15-8.

155. **Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A.** Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)+ oxidation-reduction state. *Biochem J*. 2002;368(Pt 2):545-53.

156. **Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ.** Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*. 2000;192(7):1001-14.

157. **Giraud S, Hauet T, Eugene M, Mauco G, Barrou B.** A new preservation solution (SCOT 15) Improves the islet isolation process from pancreata of non-heart-beating donors: a Murine model. *Transplant Proc*. 2009;41(8):3293-5.

158. **Lai Y, Brandhorst H, Hossain H, et al.** Activation of NFkappaB dependent apoptotic pathway in pancreatic islet cells by hypoxia. *Islets*. 2009;1(1):19-25.