

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET ILLUSTRATIONS.....	3
LISTE DES TABLEAUX.....	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	7
INTRODUCTION	9
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
I. Le Microcèbe mignon (<i>Microcebus murinus</i>) : son utilisation en recherche	13
1) Place du Microcèbe dans l'ordre des primates et particularités biologiques....	13
2) Le Microcèbe : un modèle primate du vieillissement.....	16
3) Le projet «Restrikal» : effet de la restriction calorique et de l'utilisation du resvératrol chez le Microcèbe	17
II. Le pancréas endocrine chez les mammifères.....	18
1) Organisation générale du pancréas	18
2) Les îlots de Langerhans : un « micro-organe » à part entière	19
3) Topographie des îlots de Langerhans chez l'Homme et les animaux de laboratoire	20
a. Chez l'Homme	20
b. Chez un primate non-humain : exemple du Macaque crabier (<i>Macaca fascicularis</i>)	20
c. Chez un carnivore : exemple du chien.....	21
d. Chez un rongeur : exemple de la souris.....	21
e. Chez un artiodactyle : exemple du porc	21
4) Développement embryonnaire du pancréas.....	22
5) Physiologie du pancréas endocrine	23
III. Les lésions du pancréas endocrine	26
1) Lésions dégénératives des îlots de Langerhans.....	26
a. Atrophie, nécrose, sclérose et amyloïdose.....	26
b. Diabète sucré.....	26
2) Hyperplasie des îlots de Langerhans.....	29

3) Lésions tumorales des îlots de Langerhans	29
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	31
I. Matériel et méthode	33
1) Animaux utilisés	33
2) Préparation des lames histologiques	33
3) L'immunohistochimie enzymatique	35
a. Principe de l'immunohistochimie enzymatique	35
b. Protocole d'immunomarquage	37
4) Analyse morphométrique	38
II. Résultats	40
1) Coloration hémalun-éosine-safran	40
2) Immunomarquages anti-insuline, anti-glucagon et analyse morphométrique	42
a. Répartition des cellules α et β dans le pancréas endocrine des Microcèbes	42
b. L'hyperplasie des îlots de Langerhans	43
c. Les animaux sous restriction calorique	46
d. Les animaux sous resvératrol	47
e. Les animaux sous régime <i>ad libitum</i>	47
III. Discussion	49
CONCLUSION	53
BIBLIOGRAPHIE	55
ANNEXE 1	59

LISTE DES FIGURES ET ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Classification de <i>Microcebus murinus</i>	13
Figure 2 : Photographie de <i>Microcebus murinus</i>	15
Figure 3 : îlot de Langerhans d'un Microcèbe.	19
Figure 4 : Développement embryonnaire du pancréas.....	22
Figure 5 : Schéma de régulation de la glycémie.....	25
Figure 6 : Les étapes de préparation des lames histologiques.....	34
Figure 7 : Les étapes du protocole D'immunomarquage histologique.....	36
Figure 8 : Principe de l'immunohistochimie.	37
Figure 9 : Section de pancréas avec immunomarquage des cellules α par un anticorps anti-glucagon.....	39
Figure 10 : Structure histologique pancréatique chez un Microcèbe témoin.....	40
Figure 11 : Hyperplasie des îlots de Langerhans chez un Microcèbe de l'étude.....	41
Figure 12 : Répartition des cellules α et β au sein des îlots de Langerhans chez un Microcèbe témoin.....	43
Figure 13 : Hyperplasie des cellules β chez le Microcèbe 13 0696-15 A5.....	45
Figure 14 : Hyperplasie des cellules β et insulinome chez le microcèbe 13 0975-65 A5.....	48

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différentes espèces de Microcèbe.	14
Tableau 2 : Répartition des Microcèbes étudiés en fonction de l'âge.	33
Tableau 3 : Répartition des Microcèbes étudiés en fonction du type de régime alimentaire.	33
Tableau 4 : Répartition des Microcèbes de l'étude selon le niveau d'hyperplasie du pancréas endocrine, évalué sur les lames colorées à l'hémalum éosine safran.	41
Tableau 5 : Pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes témoins.	42
Tableau 6 : Pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes de l'étude avec lésion d'hyperplasie des îlots de Langerhans.	44
Tableau 7 : Pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes de l'étude en fonction de l'âge.	44
Tableau 8 : Répartition de Microcèbes avec des lésions d'hyperplasie du pancréas endocrine en fonction du type de régime alimentaire.	46
Tableau 9 : Moyennes et écart-types des pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes sous restriction calorique.	46
Tableau 10 : Moyennes et écart-types des pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes traités par le resvératrol.	47
Tableau 11 : Moyennes et écart-types des pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes de l'étude sous régime <i>ad libitum</i>	47

LISTE DES ABRÉVIATIONS

APUD : « Amine precursor uptake and decarboxylation »
ARNm : Acide ribonucléique messager
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
DAB : 3,3'-diaminobenzine
ENVA : École Nationale Vétérinaire d'Alfort
GIP : « Glucose-dependent insulintropic peptide »
GLP-1 : « Glucagon-like peptide 1 »
GLUT : « Glucose transporter »
HES : Hémalum éosine safran
IgG : Immunoglobuline G
IVGTT : « Intravenous glucose tolerance test »
LEGMNHN : Laboratoire d'Ecologie Générale du Muséum National d'Histoire Naturelle
OGTT : « Oral glucose tolerance test »
PBS : « Phosphate buffered saline »
PP : Polypeptide pancréatique
PFA : Paraformaldéhyde
RC : Restriction calorique
UMR : Unité Mixte de Recherche
UMS : Unité Mixte de Service

INTRODUCTION

Le diabète sucré de type II, encore appelé diabète non insulino-dépendant, est le diabète le plus fréquent chez l'Homme adulte. C'est une maladie complexe dont le mécanisme pathogénique n'est pas totalement élucidé. Des facteurs environnementaux ainsi qu'une prédisposition génétique favoriseraient son apparition. L'obésité, le manque d'exercice physique et la malnutrition sont des facteurs de risque au développement de cette maladie (Nugent *et al.*, 2008).

Différents modèles animaux, incluant entre autre le rat, la souris, le lapin et le hamster, ont été développés afin d'étudier la physiopathogénie de cette maladie et l'application de nouvelles approches thérapeutiques (Lefort-Cordonnier, 1998a ; Yi, 2015).

Depuis quelques années, l'utilisation comme modèle animal de primates non-humains de petit format, tel que le *Microcebus murinus*, est croissante en recherche expérimentale.

La proximité phylogénique du microcèbe avec l'Homme, sa relative courte durée de vie et sa facilité d'élevage en font un modèle animal de choix, notamment dans les recherches sur les maladies humaines liées à l'âge.

Ainsi le microcèbe apparaît comme un modèle animal potentiel pour l'étude physiopathogénique du diabète sucré de type 2 chez l'Homme.

Dans cette optique, il est important de connaître chez le microcèbe les proportions et la répartition des différents types de cellules endocrines dans les îlots de Langerhans, en particulier les cellules β qui sécrètent l'insuline. Cette étape est un préalable à une étude objective des modifications morphologiques des îlots de Langerhans chez cette espèce dans l'évolution de cette maladie.

Lors des phases prédiabétique puis diabétique chez l'Homme et les modèles rongeurs, on observe des modifications de paramètres métaboliques et de l'activité des cellules β . Le nombre, la fonction et le phénotype de ces cellules sont progressivement modifiés et aboutissent à une sécrétion en insuline diminuée qui est incapable de compenser l'état insulino-résistant de l'individu (Weir et Bonner-Weir, 2004).

En début de phase prédiabétique, les lésions histologiques majeures du pancréas endocrine sont une hyperplasie parfois associée à une hypertrophie fonctionnelle des cellules β . Ces lésions évoluent vers une perte progressive réversible puis irréversible de ces cellules. En fin d'évolution, une diminution de 30 à 65% de la masse en cellules β peut être observée chez l'Homme (Kargar et Ktorza, 2008 ; Weir et Bonner-Weir, 2004). Elle est souvent associée à un

dépôt d'amyloïde et à une infiltration graisseuse des îlots de Langerhans (Wieczorek *et al.*, 1998).

Les animaux inclus dans l'étude étaient issus du projet «Restrikal» mené au laboratoire l'UMR 7179 du CNRS/UMS de Brunoy. Le projet «Restrikal» avait pour but d'étudier les effets à long terme d'une restriction calorique et d'une molécule supposée mimer les effets de la restriction calorique, le resvératrol, sur la durée de vie (Agence Nationale de la Recherche. *Projet RESTRIKAL*).

L'étude menée avait plusieurs objectifs. Tout d'abord, on étudiait chez des microcèbes jeunes adultes de 3 ans, vivant en captivité, la répartition et les proportions en cellules α et en cellules β dans un même îlot de Langerhans, ainsi que la proportion moyenne en tissu endocrinien par rapport au tissu pancréatique total.

Ces résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus sur 16 microcèbes adultes vieillissants vivant en captivité, regroupés en fonction de l'âge, de 4 à 9 ans, et selon le type de régime alimentaire suivi, *ad libitum*, sous restriction calorique ou complémenté en resvératrol.

Les données ont été obtenues par analyse directe au microscope optique de lames histologiques colorées à l'hémalum-éosine-safran ou immunomarquées par des anticorps anti-insuline et anti-glucagon, et à l'aide d'un logiciel de morphométrie (AxioVision), permettant une mesure objective et répétable des surfaces tissulaires définies. Ces dernières correspondaient aux surfaces totales en cellules α , en cellules β , en îlots de Langerhans, ainsi qu'en tissu pancréatique.

La finalité de ce projet était double. L'étude permettait, tout d'abord, d'obtenir des valeurs chiffrées permettant d'identifier la présence d'une hyperplasie ou d'une atrophie des îlots de Langerhans et de déterminer quel type de cellule endocrine était en cause. Ensuite, elle permettait d'analyser le lien existant entre la survenue de lésions d'hyperplasie ou d'atrophie du pancréas endocrine avec l'âge de l'animal ou le régime alimentaire suivi.

Ce travail est divisé en deux parties. La première aborde les données bibliographiques relatives à la biologie du microcèbe, l'intérêt de son emploi comme modèle animal, le projet «Restrikal», la structure histologique, l'embryologie, la physiologie et les lésions principales du pancréas endocrine observées chez les mammifères. La seconde partie expose le travail expérimental, en envisageant le matériel et méthodes, les résultats et la discussion.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE



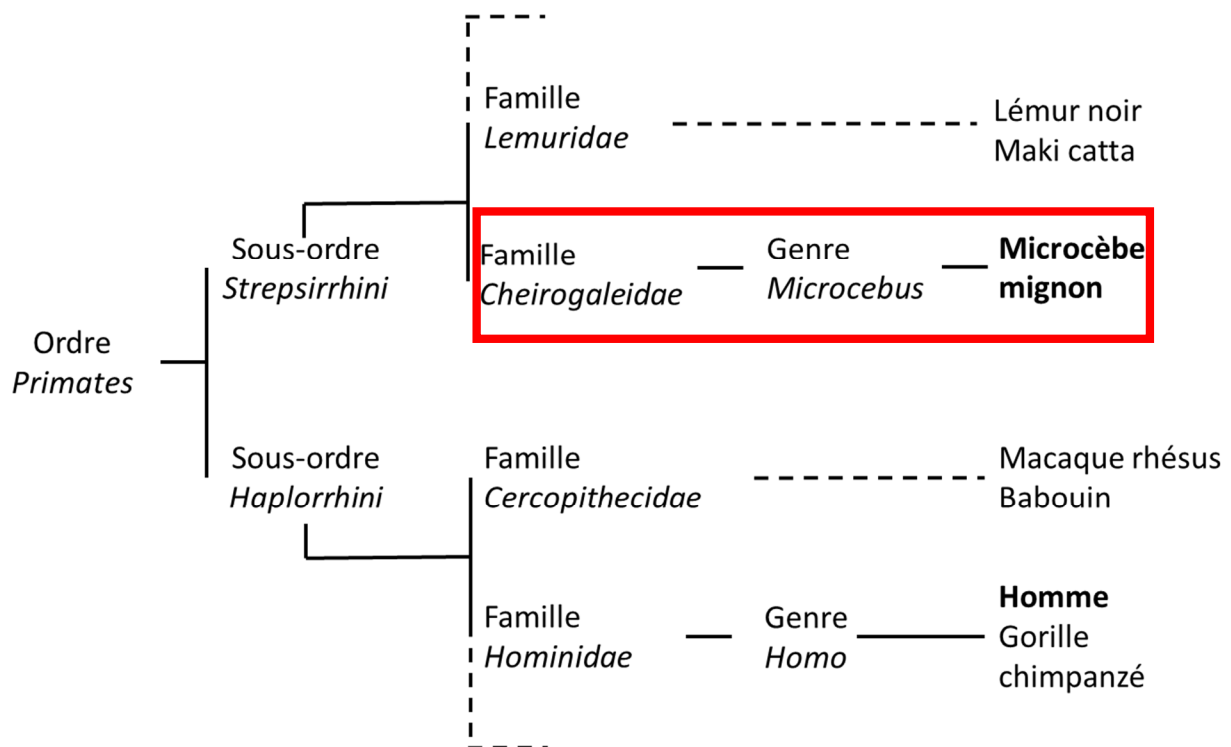
I. Le Microcèbe mignon (*Microcebus murinus*) : son utilisation en recherche

Le Microcèbe mignon est un primate de petite taille d'utilisation grandissante en recherche expérimentale. Il est principalement utilisé comme modèle animal dans les études des processus dégénératifs liés à l'âge.

1) Place du Microcèbe dans l'ordre des primates et particularités biologiques

L'espèce *Microcebus murinus* est un Lémurien au sens large. Il fait partie de l'infra-ordre des Lémuriformes, famille des *Cheirogaleidae* et genre *Microcebus* (Figure 1).

Figure 1 : Classification de *Microcebus murinus*.



Le genre *Microcebus* regroupe les plus petites espèces de Lémuriens. Depuis ces deux dernières décennies avec la multiplication d'études génétiques, le nombre d'espèces

répertoriées chez les Microcèbes ne cesse d’augmenter. On dénombre actuellement 21 espèces (Schäffler et Kappeler, 2014) (Tableau 1).

Tableau 1 : Les différentes espèces de Microcèbe.

Nom scientifique	Nom commun
<i>Microcebus arnholdi</i>	Microcèbe de la Montagne d'Ambre
<i>Microcebus berthae</i>	Microcèbe de Mme Berthe
<i>Microcebus bongolavensis</i>	Microcèbe du Bongolava
<i>Microcebus danfossi</i>	Microcèbe d'Ambarijebby
<i>Microcebus gerpi</i>	Microcèbe de Gerp
<i>Microcebus griseorufus</i>	Microcèbe gris-roux
<i>Microcebus jollyae</i>	Microcèbe de Jolly
<i>Microcebus lehilahytsara</i>	Microcèbe de Goodman
<i>Microcebus macarthurii</i>	Microcèbe d'Anjahely
<i>Microcebus mairatra</i>	Microcèbe de Nosy Be
<i>Microcebus margotmarshae</i>	Microcèbe de Margot Marsh
<i>Microcebus marohita</i>	
<i>Microcebus mittermeieri</i>	Microcèbe de Mittermeier
<i>Microcebus murinus</i>	Microcèbe mignon
<i>Microcebus myoxinus</i>	Microcèbe pygmée
<i>Microcebus ravelobensis</i>	Microcèbe brun-doré
<i>Microcebus rufus</i>	Microcèbe roux
<i>Microcebus sambiranensis</i>	Microcèbe du Sambirano
<i>Microcebus simmons</i>	Microcèbe de Simmons
<i>Microcebus tanosi</i>	
<i>Microcebus tavaratra</i>	Microcèbe roux du Nord

Toutes ces espèces sont arboricoles et endémiques à Madagascar. Le Microcèbe mignon est observé exclusivement dans les forêts du sud-ouest.

Leur durée de vie en milieu naturel est de 8 à 10 ans, allant jusqu’à 13 ans en captivité. Les Microcèbes sont physiquement caractérisés par des membres courts et de larges yeux.

Plus précisément, le Microcèbe mignon mesure environ de 12 cm de long, de la base du front à la base de la queue et pèse en moyenne en saison sèche 50 g et jusqu’à 200 g en saison humide. Son pelage est gris-brun avec une large zone blanchâtre en région ventrale (Figure 2). Il possède de fines incisives et canines inférieures, particularité dentaire adaptée à une longue activité de toilettage.

Figure 2 : Photographie de *Microcebus murinus*.

(source : David Haring Photography).



Les Microcèbes forment des groupes sociaux multi-mâles et multi-femelles. Une hiérarchie entre les mâles s'établit uniquement lors de la période de reproduction.

La reproduction est saisonnière. Elle a lieu entre novembre et avril, lors de la saison des pluies, en photopériode des jours les plus longs.

C'est une espèce polyœstrienne. Elle peut présenter jusqu'à trois œstrus lors de la saison sexuelle. Les accouplements sont de type polygame, un mâle pouvant s'accoupler successivement avec plusieurs femelles et inversement pour les femelles.

La gestation dure 60 à 63 jours. Les portées sont composées de deux à trois petits. Le sevrage intervient après 40 jours d'allaitement et la maturité sexuelle s'observe vers 8 à 9 mois (Guignard, 2009).

Les Microcèbes vivent la nuit. Ils se regroupent le jour pour dormir dans des nids, les mâles séparés des femelles.

Ils sont généralement omnivores, se nourrissant d'insectes, de fruits, de feuillages et de petits mammifères.

2) *Le Microcèbe : un modèle primate du vieillissement*

Les primates non-humains partagent avec l'Homme une proximité génétique, physiologique et anatomique plus grande que les modèles animaux de laboratoires classiques (rongeurs, lagomorphes...).

Les modèles animaux primates non-humains de petite taille sont de plus en plus utilisés en recherche, notamment dans les études du vieillissement. *Callitrix jacchus*, un singe du nouveau monde communément appelé ouistiti à toupets blancs, et *Microcebus murinus* en font partie (Austad et Fischer, 2011).

Les intérêts du Microcèbe en recherche expérimentale sont son petit format, une maturité sexuelle rapide et une fécondité relativement élevée pour des primates, permettant de créer rapidement, maintenir et entretenir une colonie (Languille *et al.*, 2012).

Sa durée de vie en captivité est en moyenne de 10 à 13 ans. Lors d'études sur les mécanismes du vieillissement, des données sont plus rapidement obtenues avec le Microcèbe par rapport à d'autres primates non-humains (Galas *et al.*, 2012). L'utilisation de macaques ou tout autre primate de l'ancien monde dans ce type d'études nécessiterait une attente d'au moins 25 ans avant d'obtenir des résultats expérimentaux (Austad et Fischer, 2011). De plus à poids équivalent, le Microcèbe vit deux à trois fois plus longtemps que le rat (Stuart et Page, 2010).

De nombreux marqueurs biologiques du vieillissement ont été validés chez le Microcèbe pour des recherches sur les maladies neurodégénératives. Ainsi, *Microcebus murinus* est utilisé comme modèle animal dans l'étude de la maladie d'Alzheimer. Environ 5% de ces animaux présentent après l'âge de 5 ans des plaques amyloïdes denses en région corticale, une atrophie corticale et une dilatation ventriculaire. Ces lésions sont ainsi appelées *Alzheimer disease-like* (Galas *et al.*, 2012 ; Bons *et al.*, 2006).

Le laboratoire d'Ecologie Générale du Muséum National d'Histoire Naturelle à Brunoy est considéré comme le plus grand centre d'élevage de Microcèbes d'Europe. La colonie comprend plus de 500 animaux, descendants d'individus importés du sud de Madagascar entre 1967 et 1972. Une hétérogénéité génétique comparable à celle retrouvée dans la population humaine est préservée. Cet élevage fonctionne depuis plus de 35 ans et a permis l'accumulation de nombreuses données biologiques, notamment physiologiques et comportementales (UMR 7179 du CNRS, Mécanismes adaptatifs et évolution. *L'élevage des Microcèbes à Brunoy*).

3) Le projet «Restrikal» : effet de la restriction calorique et de l'utilisation du resvératrol chez le Microcèbe

Il a été démontré chez différentes espèces animales à courte durée de vie que la restriction calorique (RC) est l'unique moyen, hors manipulation génétique, permettant un ralentissement de l'apparition des maladies liées à l'âge et l'augmentation de la durée de vie (Marchal *et al.*, 2012a).

L'allongement de la vie humaine a entraîné l'apparition et l'augmentation d'un certain nombre de maladies liées à l'âge. Dans ce contexte, l'étude d'une application à l'Homme de la RC semble pertinente.

Cependant, les effets positifs de ce type de régime alimentaire sur des espèces à longue durée de vie restent à démontrer et son extension à l'Homme semble difficile. C'est pourquoi des alternatives doivent être développées.

Le resvératrol est un composé polyphénolique présent dans de nombreuses plantes et fruits, dont le raisin. Il a été observé chez l'homme que l'ingestion de resvératrol limite le développement de maladies cardio-vasculaires et neurodégénératives, ainsi que l'apparition des tumeurs (Frombaum *et al.*, 2012 ; Petrovski *et al.*, 2011 ; Richard *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2012). De plus, dans différentes espèces, incluant la souris, son ingestion permet d'augmenter la durée de vie (Agarwal et Baur, 2011). Cela le place au centre de nombreuses recherches, dont le projet «Restrikal».

Le projet «Restrikal» emploie le Microcèbe comme modèle animal. Les animaux étaient répartis en trois groupes : les animaux nourris *ad libitum*, les animaux recevant du resvératrol et les animaux subissant une restriction calorique (RC). Les objectifs étaient de tester le potentiel mimétique à la RC du resvératrol et d'étudier les effets sur le long terme de la RC (Agence Nationale de la Recherche. *Projet RESTRIKAL* ; Marchal *et al.*, 2012b ; Dal-Pan *et al.*, 2011).

II. Le pancréas endocrine chez les mammifères

Le pancréas fait partie des glandes annexes du tube digestif. Son parenchyme est formé de deux tissus de morphologie et d'activités différentes :

- le pancréas exocrine qui synthétise et sécrète des enzymes à activité digestive protéolytique (trypsine, chymotrypsine et carboxypeptidase), glucolytique (α -amylase) et lipolytique (lipase) dans la lumière intestinale ;
- le pancréas endocrine qui produit et libère dans le flot sanguin différentes hormones, jouant notamment un rôle essentiel dans la régulation de la glycémie.

1) *Organisation générale du pancréas*

Chez les mammifères, le pancréas présente plus de variations macroscopiques que microscopiques.

Deux aspects anatomiques dominent :

- le type mésentérique, présent chez le lapin. Le tissu pancréatique est diffus, le long de l'intestin grêle ;
- le type compact, observé chez le hamster, le chien, le primate non-Humain et l'Homme. Le tissu pancréatique est individualisé en regard du duodénum.

Le pancréas de la souris et du rat est de type mésentérique, mais d'aspect moins diffus que chez le lapin (Greaves, 2011).

Le pancréas chez les primates prend une forme allongée et est orienté en partie crâniale dans la cavité abdominale. Il peut être divisé en deux lobes : le lobe droit retrouvé le long du duodénum et le lobe gauche longeant l'estomac et la rate à gauche ; ou en quatre régions : une tête, un col, un corps et une queue. La tête, le col et le corps longent le duodénum et l'estomac. La queue affleure la rate (Lefort-Cordonnier, 1998b).

Selon les espèces, le drainage des canaux pancréatiques dans la lumière duodénale est différent.

Chez les carnivores, le conduit pancréatique majeur s'ouvre directement dans le duodénum au niveau de la papille duodénale majeure. Cette papille est située à 5-10 cm du pylore, au niveau de la courbure crâniale du duodénum. Le conduit cholédoque s'ouvre au même niveau. Il est parfois présent un second conduit pancréatique, appelé conduit pancréatique accessoire. Il s'abouche au duodénum par l'intermédiaire de la papille duodénale mineure. Cette architecture se rapproche de celle de l'Homme.

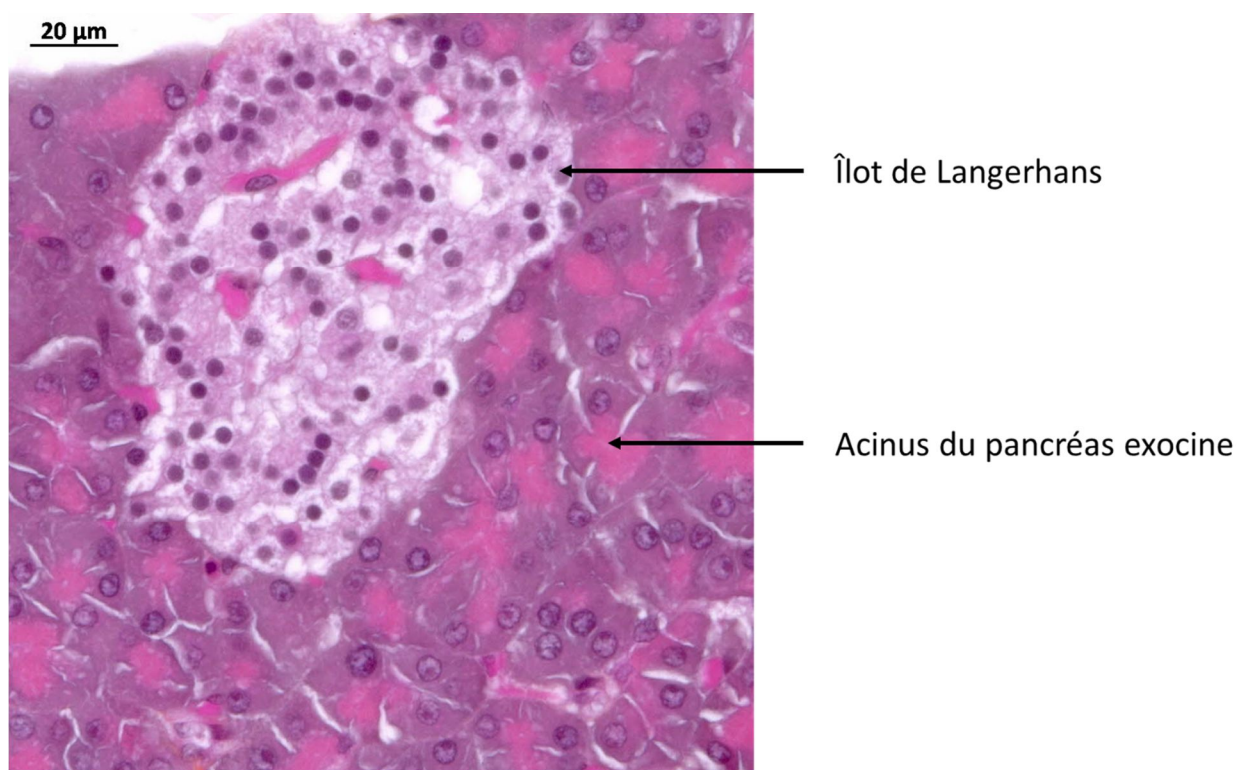
2) Les îlots de Langerhans : un « micro-organe » à part entière

Chez le rongeur adulte, le pancréas endocrine correspond à 1-2 % des cellules pancréatiques totales. Les cellules endocrines sont regroupées en îlots de 100-200 μm de diamètre appelés îlots de Langerhans et répartis au sein du pancréas exocrine. La densité en îlots de Langerhans est variable selon la région (plus abondants dans la queue du pancréas par rapport à la tête) et le nombre varie selon la taille du pancréas (500 à 800 îlots chez la souris contre 500 000 chez l'Homme) (Haschek *et al.*, 2009).

Les îlots de Langerhans sont formés de cordons cellulaires anastomosés, composés de cellules polygonales au cytoplasme abondant, faiblement colorable, aux contours indistincts et au noyau rond central, arrangées autour de nombreux capillaires fenestrés et soutenues par un fin stroma collagénique et réticulé. Ils reçoivent chacun une innervation sympathique et parasympathique (Figure 3).

Figure 3 : îlot de Langerhans d'un Microcèbe.

Coloration Hémalun-Éosine-Safran (photographie issue de l'étude).



L'utilisation de marqueurs immunohistochimiques permet de classer les cellules endocrines en 4 types.

Chez l'homme, les cellules β sont les plus abondantes, représentent 80 % des cellules totales et synthétisent l'insuline. Les cellules α représentent 15 % des cellules totales et synthétisent le glucagon. Les cellules δ représentent 4 % des cellules totales et synthétisent la somatostatine. Le reste (1 %) est représenté par différentes cellules, comme les cellules à

polypeptide pancréatique (PP) qui synthétisent le polypeptide pancréatique (Haschek *et al.*, 2009) ou les cellules sécrétant la ghréline (Nugent *et al.*, 2008).

Certaines cellules endocriniennes peuvent sécréter plusieurs hormones. En plus de l'insuline, les cellules β synthétisent :

- l'amyline, qui module le métabolisme glucidique des cellules musculaires et hépatiques (Moore et Cooper, 1991) ;
- le peptide C, un dérivé de l'insuline qui joue un rôle de prévention dans l'apparition des maladies neurologiques et des lésions vasculaires (Ido *et al.*, 1997).

3) Topographie des îlots de Langerhans chez l'Homme et les animaux de laboratoire

Selon les espèces, on observe pour chaque région pancréatique un arrangement différent des îlots de Langerhans, ainsi qu'une distribution des types cellulaires dans chaque îlot qui lui est propre.

a. Chez l'Homme



En comparaison avec les rongeurs, les îlots de Langerhans humains ont plus de cellules α et moins de cellules β (Steiner *et al.*, 2010).

Les cellules α , β et δ sont réparties de manière homogène dans les îlots de Langerhans. Les cellules à PP sont un peu plus nombreuses dans la tête du pancréas. Le col, le corps et la queue possèdent des îlots de Langerhans plus riches en cellules α et β (Steiner *et al.*, 2010).

b. Chez un primate non-humain : exemple du Macaque crabier (*Macaca fascicularis*)

Le type cellulaire prédominant est la cellule β (Steiner *et al.*, 2010).

Les cellules β sont typiquement retrouvées en périphérie des îlots, formant un cercle irrégulier. Les cellules α ont plutôt une localisation centrale. Les cellules δ présentent une distribution homogène et les cellules PP sont peu nombreuses et souvent observées en périphérie.

De rares cellules endocrines isolées ou en paquet sont retrouvées dans le pancréas exocrine. Ce sont majoritairement des cellules β (Wieczorek *et al.*, 1998) (Steiner *et al.*, 2010).

c. Chez un carnivore : exemple du chien

Ces données morphologiques sont issues du Beagle, une race canine couramment utilisée en recherche expérimentale.

Les cellules endocrines sont retrouvées isolées ou en paquet dans le pancréas exocrine (forme majoritairement observée dans le lobe droit) ou en larges îlots compacts (forme majoritairement observée dans le lobe gauche).

Les cellules isolées ou en paquet sont typiquement des cellules β . Ces dernières sont retrouvées aussi bien en périphérie qu'au centre des îlots de Langerhans. Les cellules α sont préférentiellement observées dans les îlots de Langerhans souvent en position centrale et occasionnellement en périphérie. Les cellules δ sont réparties au sein du lobe gauche isolées dans les acini ou dans les îlots de Langerhans. Les cellules à PP sont presque exclusivement rencontrées dans le lobe droit sous forme de cellules isolées réparties de manière homogène dans le pancréas exocrine (Wieczorek *et al.*, 1998).

d. Chez un rongeur : exemple de la souris

Les cellules endocrines forment majoritairement des îlots de Langerhans de taille variable de répartition homogène dans le pancréas et rarement isolées dans les acini pancréatiques (Steiner *et al.*, 2010). Les cellules β forment le centre des îlots et les cellules α la périphérie. Les cellules PP et les cellules δ sont occasionnellement observées en périphérie (Wieczorek *et al.*, 1998).

e. Chez un artiodactyle : exemple du porc

Ces données morphologiques sont issues du mini-porc, un animal issu d'un croisement de différentes races porcines et couramment utilisé en recherche expérimentale.

Il existe trois types d'îlots de Langerhans : des îlots de petite taille formés uniquement de cellules β ; des îlots de grande taille avec des cellules β au centre et des îlots de grande taille avec des cellules β en périphérie. La distribution des cellules α varie d'une région à l'autre. Dans le lobe droit elles sont retrouvées en faible nombre en périphérie des îlots et dans le lobe gauche elles sont observées en grand nombre aussi bien en périphérie qu'au centre des îlots. Les cellules δ et les cellules PP sont majoritairement localisées en périphérie des îlots (Wieczorek *et al.*, 1998).

De nombreuses cellules endocrines isolées ou en paquets sont réparties dans le pancréas exocrine et sont formées majoritairement de cellules β et de cellules α .

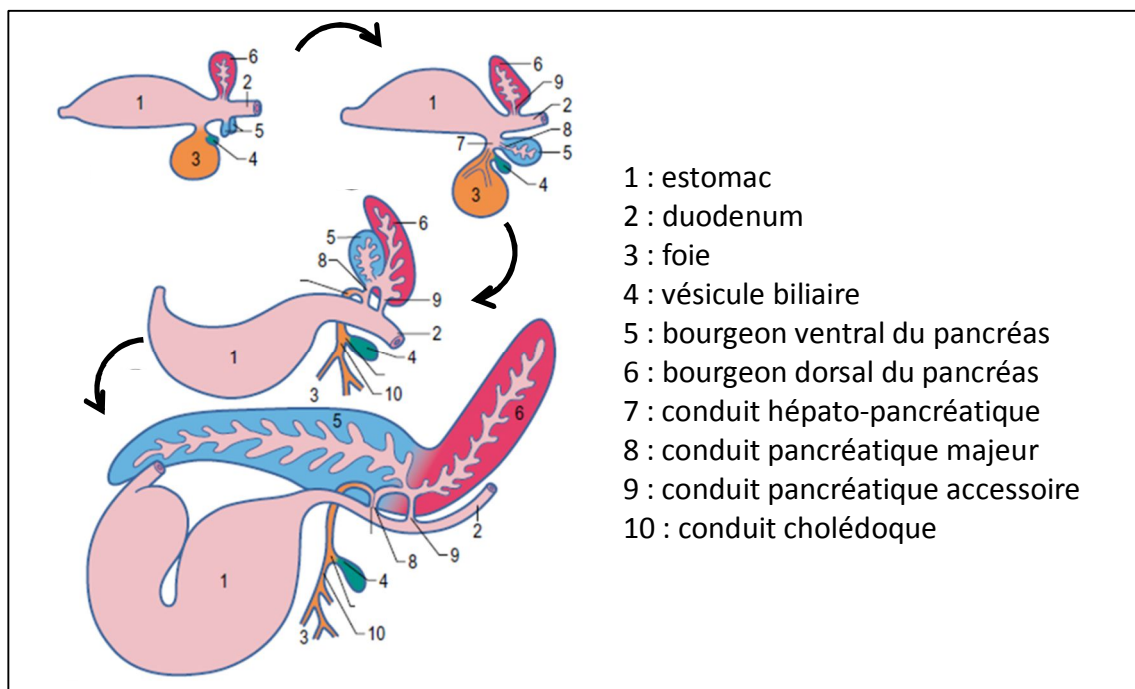
4) Développement embryonnaire du pancréas

Le pancréas est formé par la fusion de deux bourgeons embryonnaires d'origine endodermique, émergeant de la partie caudale de l'intestin antérieur. Le premier est situé dans le méso dorsal et est appelé bourgeon pancréatique dorsal. Le second est situé dans le méso ventral à côté de l'ébauche de la vésicule biliaire et est appelé bourgeon pancréatique ventral.

Suite à une rotation de l'estomac selon son axe longitudinal, le bourgeon ventral se retrouve caudalement au bourgeon dorsal et fusionne avec ce dernier. Le bourgeon dorsal formera la tête, le col, une partie du corps et la queue. Le bourgeon ventral sera à l'origine, entre autres, de la partie restante du corps pancréatique (Larsen *et al.*, 2011) (Figure 4).

Figure 4 : Développement embryonnaire du pancréas.

D'après Hyttel P. *et al.*, 2010.



L'endoderme pancréatique s'épaissit ensuite par pluri-stratification et forme de multiples excroissances qui prolifèrent au sein de mésoderme qui l'entoure. Les amas épithéliaux formés se creusent et forment ensuite des microcavités intraépithéliales qui fusionnent de proche en proche et forment une arborescence épithéliale constituant les canalicules et, à leur extrémité, les acini du pancréas exocrine (Larsen *et al.*, 2011; Lefort-Cordonnier, 1998b).

Deux théories s'opposent concernant l'origine des cellules composant les îlots de Langerhans : la crête neurale *versus* l'endoderme (Wieczorek *et al.*, 1998).

Les cellules β possèdent la capacité de capter des précurseurs d'amines et de les décarboxyler et, ce faisant, feraient parties du système APUD (*Amine Precursor Uptake et Decarboxylation*), un système neuroendocrinien diffus issu de la crête neurale (Pearse et Polak, 1971). De plus, les cellules β et d'autres cellules des îlots de Langerhans sont positives pour différents marqueurs neuroendocriniens et neuronaux tel que la tyrosine hydroxylase, la phényléthanolamine N-méthyl transférase, la enolase spécifique du neurone et la synaptophysine (Le Douarin, 1988 ; Wiedenmann *et al.*, 1986).

Cependant, des arguments expérimentaux vont à l'encontre de cette première hypothèse et confortent l'idée d'une origine endodermique. Par exemple, des embryons de rats ont été cultivés *in vitro* après excision de la région destinée à devenir la crête neurale. Dans de nombreux cas, le pancréas présentait des cellules β et de l'insuline était détectée (Pictet *et al.*, 1976).

5) Physiologie du pancréas endocrine

L'ensemble des îlots de Langerhans constitue un « micro-organe » qui joue un rôle majeur dans la régulation de la glycémie par les hormones qu'il synthétise. L'insuline et le glucagon en sont les deux hormones clés. Elles ont une activité antagoniste. Une glycémie haute ou basse favorise la sécrétion de l'une ou de l'autre.

L'insuline est une hormone polypeptidique formée de deux chaînes peptidiques reliées entre elle par deux ponts disulfure. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur appelé préproinsuline. Cette molécule perd son peptide signal et donne naissance à la proinsuline dans le réticulum endoplasmique granuleux des cellules β . La proinsuline est formée de deux chaînes polypeptidiques reliées par le peptide C. Dans l'appareil de golgi, le peptide C est libéré par lyse enzymatique. L'insuline ainsi formée et le peptide C sont stockés dans des granules de sécrétion intracytoplasmiques et sécrétés après stimulation dans la circulation sanguine (Lefort-Cordonnier, 1998a).

La sécrétion basale et post-prandiale en insuline sont sous l'influence de différents stimuli, dont le glucose, les acides aminés, les incrétines représentées par le *gastric inhibitory polypeptide* (GIP) et le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1).

L'insuline a une action hypoglycémiante. Elle est responsable de la captation du glucose et de l'élaboration de réserves. Pour cela, elle active la glycogénogenèse dans les cellules musculaires et hépatiques, la lipogenèse dans les cellules adipeuses, la synthèse protéique et l'oxydation du glucose.

Elle active aussi la pénétration du glucose dans les tissus périphériques par l'activation de l'insertion membranaire du transporteur GLUT (*Glucose Transporter*). Il existe 6 isoformes de ce transporteur membranaire du glucose, notées GLUT 1 à 5 et GLUT 7 (Lefort-Cordonnier N., 1998a). GLUT 4 est principalement présent dans les fibres musculaires squelettiques, les

cardiomyocytes et les adipocytes du tissu adipeux brun et blanc. Son insertion membranaire dépend de l'insuline. GLUT 2 est présent dans les hépatocytes, les cellules β et est indépendant de l'action de l'insuline. GLUT 1, 3 et 5 sont exprimés dans de nombreux tissus adultes.

L'insuline inhibe la sécrétion de glucagon par les cellules α par effet paracrine.

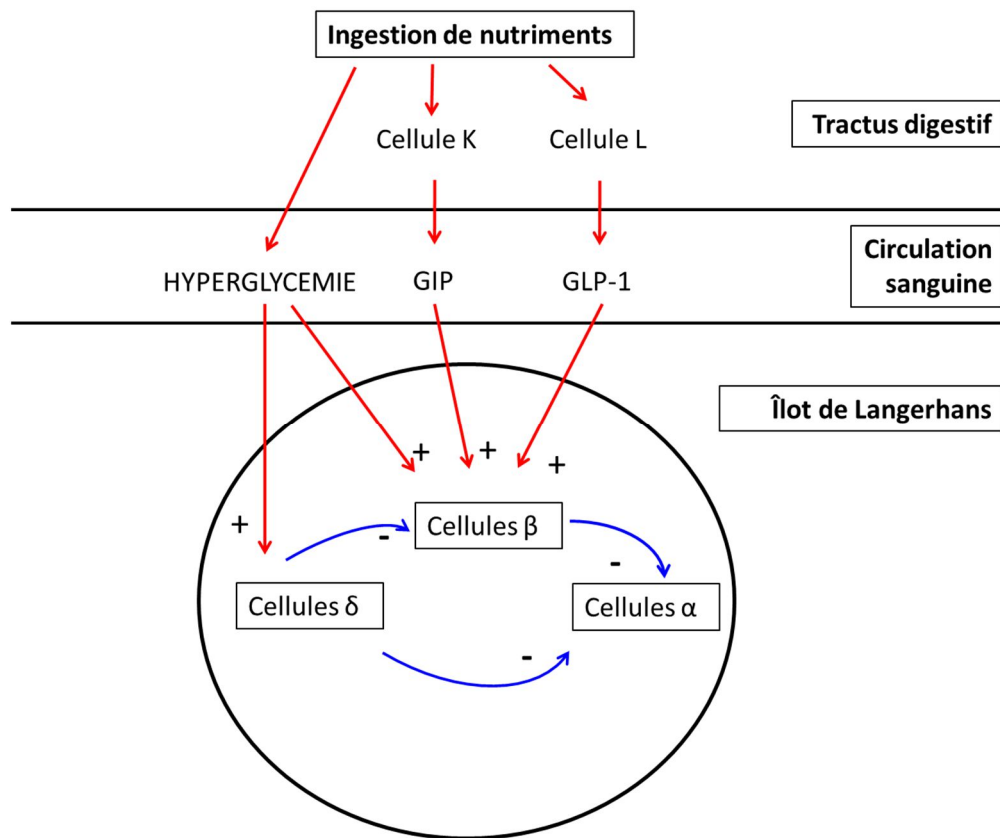
Lors de test de tolérance au glucose par voie intraveineuse (IVGTT), un bolus de glucose est injecté. Une minute après l'injection, la concentration sanguine en insuline s'élève pour atteindre son maximum au bout de 3 à 4 minutes. C'est la première phase de sécrétion de l'insuline. Elle correspond à la libération dans la circulation sanguine de l'insuline stockée. En complément, une seconde phase de sécrétion se met en place. Elle intervient au bout de 10 minutes et dure le temps nécessaire au rétablissement d'une glycémie physiologique. Elle correspond à la libération de l'insuline stockée mais aussi à la formation et à la sécrétion de nouvelles protéines. Ce test permet d'identifier et d'évaluer la fonction des cellules β (Scheen, 2004).

Le test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT) permet une évaluation globale de la tolérance au glucose.

L'insuline sécrétée lors de la première phase agit davantage sur le foie que sur les autres tissus périphériques. Elle permet une diminution de la glycémie par inhibition de la néoglucogenèse hépatique. Cette première phase de sécrétion d'insuline est critique dans l'état de tolérance au glucose. Il existe en effet une corrélation forte entre la concentration sanguine en insuline 30 minutes après l'ingestion du glucose et la glycémie deux heures après l'ingestion de glucose.

La libération d'insuline lors de la première phase est principalement consécutive à une stimulation des cellules β par les incrétines, tel que le GIP et le GLP-1. En réponse à l'ingestion de nutriments, et avant l'élévation de la glycémie, ces hormones sont libérées dans la circulation sanguine par les cellules endocrines du tractus digestifs. Le GLP-1 stimule non seulement la libération de l'insuline et l'activité des cellules β , mais favorise aussi la prolifération de ces cellules et inhibe leur apoptose (Figure 5) (Scheen, 2004).

Figure 5 : Schéma de régulation de la glycémie.



La réponse des cellules β à une hyperglycémie est plus marquée chez un individu présentant une résistance périphérique à l'insuline. Ainsi les individus obèses possèdent une hyperinsulinémie marquée avec une hyperglycémie modérée (Scheen, 2004).

En période de jeûne, le glucagon domine. Il a une action hyperglycémiante. Il permet la mobilisation du glucose. Pour cela, il active la glycogénolyse, la néoglucogenèse, la lipolyse et inhibe la glyconéogenèse et la lipogenèse.

La somatostatine est un produit des cellules δ qui inhibe la libération de l'insuline et du glucagon, affinant la régulation de la sécrétion de ces hormones.

III. Les lésions du pancréas endocrine

1) *Lésions dégénératives des îlots de Langerhans*

a. Atrophie, nécrose, sclérose et amyloïdose

L'atrophie des îlots de Langerhans est souvent consécutive à une compression lors de pancréatite chronique interstitielle fibrosante ou à un dépôt d'amyloïde (Charles , 2007).

La nécrose des îlots de Langerhans est une des causes d'apparition du diabète sucré chez le chien. Elle est principalement observée lors de nécrose pancréatique aiguë, de sclérose et lors de progression tumorale par destruction du parenchyme pancréatique.

Le dépôt d'amyloïde dans les îlots est une lésion caractéristique du diabète sucré non insulino-dépendant (type 2). Quatre-vingt-dix pourcent des hommes et des macaques cynomolgus ainsi que 80 % des chats atteints par cette maladie présentent une amyloïdose des îlots de Langerhans (O'Brien *et al.*, 1993, 1996).

b. Diabète sucré

Le diabète sucré se caractérise par une hyperglycémie à jeun. Une action insuffisante de l'insuline est la cause de l'apparition de cette maladie. Elle peut être due à un défaut de production ou à un défaut d'action de l'insuline sur les tissus périphériques.

En médecine humaine, cette maladie est classée en diabète sucré primaire de type 1 et en type 2 et en diabète sucré secondaire. Cette classification repose sur des mécanismes pathologiques et des lésions histologiques pancréatiques caractéristiques.

Le diabète sucré de type 1 ou diabète insulino-dépendant

Le diabète insulino-dépendant est observé chez l'Homme jeune. Il est le type de diabète le plus sévère. La sécrétion en insuline est réduite voire absente. Une maladie auto-immune ciblant et détruisant les cellules β est la cause de l'apparition de ce type de diabète chez l'Homme. Le nombre des cellules β doit chuter de 80 % avant que la maladie ne se manifeste cliniquement (Scheen, 2004).

De par l'absolue nécessité d'un apport exogène d'insuline, le diabète sucré chez le chien se rapproche du diabète sucré de type 1. Cette maladie est principalement observée chez les chiens adultes à vieillissant. Une composante immunitaire est suspectée dans certains cas (Hoenig, 2002 ; Nelson et Reusch, 2014). A l'examen histologique, les îlots de Langerhans présentent un nombre et une taille diminués et sont infiltrés par de nombreux lymphocytes.

Des anticorps dirigés, entre autre, contre la pro-insuline, l'insuline, l'acide glutamique décarboxylase 65 et l'*insulinoma antigen 2* ont été identifiés (Hoenig, 2002).

Une forme juvénile sévère a été rapportée. Elle résulte d'une hypoplasie ou aplasie des îlots de Langerhans (Nelson et Reusch, 2014).

Une autre cause de diabète sucré par défaut de production d'insuline chez le chien est la destruction du parenchyme exocrine et endocrine pancréatique lors de pancréatite aiguë (Nelson et Reusch, 2014)

Le diabète sucré de type 2 ou diabète sucré non insulino-dépendant

Le diabète sucré non insulino-dépendant est observé chez l'adulte. Chez l'Homme, 80 à 90 % des cas de diabète sucré sont de type 2 (Charles, 2007). Il correspond à une résistance du tissu périphérique à l'action de l'insuline, associée à une dérégulation de la synthèse d'insuline.

Lors de la phase pré-diabétique, une intolérance au glucose se met en place. La population de cellules β ainsi que leur activité évoluent progressivement. Cette période peut s'étendre sur plusieurs années avant l'apparition du diabétique proprement dit.

Plusieurs modèles pathologiques ont été développés pour expliquer les mécanismes de cette maladie, notamment un modèle décrit par Weir, qui divise cette maladie en plusieurs phases en tenant compte de la population de cellules β , de leur activité et de leur phénotype (Weir *et al.*, 2001; Weir et Bonner-Weir, 2004 ; Weir et Bonner, 2013) :

- la première phase est une longue période d'insulino-résistance accompagnée d'une augmentation compensatrice de la synthèse d'insuline expliquée par une augmentation de la population de cellules β et une réaction accentuée de ces cellules à une stimulation.

L'adaptation de la population de cellules β à une demande accrue en insuline est un processus dynamique, qui combine une hyperplasie des cellules β , une prolifération et différenciation des cellules souches pancréatiques, une hypertrophie et enfin une apoptose des cellules β . Lors de cette phase, une glycémie physiologique demeure maintenue ;

- la seconde phase est une période d'adaptation, au cours de laquelle la sécrétion en insuline devient insuffisante pour compenser l'insulino-résistance croissante des tissus périphériques et où l'activité et le phénotype des cellules β sont altérés. A cette phase, une hyperglycémie est détectée.

Lors de l'ingestion de nutriments, la première phase de sécrétion immédiate d'insuline est absente. La seconde phase est cependant conservée. Ces observations laissent à penser que la population de cellules β est devenue insensible ou réfractaire au stimulus d'hyperglycémie mais que la sécrétion de l'insuline et sa synthèse ne sont pas altérées.

L'hyperglycémie chronique a un effet glucotoxique sur les cellules β . Elle constitue un environnement délétère provoquant entre autre une dédifférenciation des cellules β . Ces

cellules présentent différents changements dans l'expression des gènes. Toutefois le niveau en ARNm codant pour les différentes chaînes protéiques de l'insuline reste inchangé ;

- la troisième phase est une période d'installation de la décompensation, caractérisée par une hyperglycémie marquée expliquée en partie par une baisse de la synthèse d'insuline et par une diminution de la population de cellules β , une dédifférenciation cellulaire et par une accentuation de l'état insulino-résistant. Les cellules β sont sévèrement dédifférenciées avec un effondrement du niveau de transcription des gènes codant pour les différentes chaînes protéiques de l'insuline, aboutissant à un changement de phénotype et donc de l'activité cellulaire ;

- la quatrième phase est une période de décompensation solidement installée, avec la mise en évidence chez l'Homme d'une réduction de 50 % de la population de cellules β et chez les rongeurs d'une dédifférenciation des cellules β accompagnée d'une diminution de l'activité de ces cellules;

- la cinquième phase est période de décompensation sévère. Le taux en insuline sécrété est insuffisant pour prévenir un diabète acido-cétosique.

Le diabète sucré de type 2 est une maladie polygénique et multifactorielle. L'obésité, le manque d'exercice physique et la malnutrition sont des facteurs de risque du développement de cette maladie (Nugent *et al.*, 2008).

Chez le chat, le diabète sucré primaire, c'est-à-dire sans cause sous-jacente identifiée, se rapproche du diabète sucré de type 2 de l'homme (Hoenig, 2002). Il touche majoritairement les chats âgés de plus de 10 ans et est caractérisé histologiquement par la présence d'amyloïde dans les îlots de Langerhans.

Une des spécificités du diabète sucré chez le chat est l'existence du phénomène de glucotoxicité. Ainsi, après le début de l'insulinothérapie, une reprise de l'insulinosécrétion des cellules β est possible et permet même un arrêt transitoire de la thérapeutique.

Les facteurs de risque identifiés sont la sédentarité, l'obésité et une prédisposition génétique, comme chez le chat sacré de Birmanie et les races apparentées (Rand, 1999).

Le diabète sucré secondaire

Ce diabète est le reflet d'un antagonisme entre l'insuline et d'autres hormones. L'hyperprogestéronémie lors de pseudo-gestation ou de pyomètre chez la chienne, l'hypersecrétion d'hormone de croissance lors d'adénome hypophysaire chez le chien, le chat et le cheval et l'hypercorticisme chez le chat et le chien peuvent induire un diabète sucré par résistance périphérique à l'action de l'insuline (van Keulen *et al.*, 1996 ; Elliott *et al.*, 2000).

2) Hyperplasie des îlots de Langerhans

Les lésions d'hyperplasie du pancréas endocrine sont sous-estimées chez les animaux domestiques. Les variations en densité et en taille des îlots de Langerhans en fonction des régions pancréatiques observées et de l'âge rendent cette évaluation difficile (Charles, 2007).

Cette lésion a été décrite chez l'Homme, des primates non humains, tel que le macaque cynomolgus, la souris, le rat et le hamster.

Les îlots sont hypercellulaires, augmentés en taille et compriment discrètement le tissu périphérique. Souvent l'hyperplasie concerne les cellules β (Spencer *et al.*, 1986).

La cause reste inconnue. Un phénomène d'hyperplasie par compensation du tissu sain est suspecté lors de perte partielle du parenchyme pancréatique dans un contexte tumoral ou inflammatoire ou lors d'antagonisme dans les tissus périphériques de l'activité de l'insuline par d'autres hormones, comme lors d'hypercorticisme chez le chien.

Chez l'Homme et le rat, ces lésions d'hyperplasie sont également rapportées lors de fibrose pancréatique (Charles, 2007).

Elles sont aussi observées chez le cheval et le rat âgé, ainsi que le rat obèse sédentaire (Furuoka *et al.*, 1989 ; Spencer *et al.*, 1986).

3) Lésions tumorales des îlots de Langerhans

Ces lésions regroupent l'insulinome, le gastrinome et le glucagonome (Charles, 2007). Ces tumeurs possèdent une architecture histologique de type neuro-endocrine : arrangement des cellules tumorales en rubans, acini et structures glandulaires séparés par un fin stroma fibro-vasculaire. Elles peuvent avoir un comportement bénin ou malin et sont souvent associées à différents syndromes d'hypersécrétion hormonale.

L'insulinome est observé chez le chien et le furet. Il est principalement composé de cellules β , souvent sécrétrices. Cette tumeur est associée à un syndrome regroupant une hyperinsulinémie, une hypoglycémie et des troubles neurologiques.

Le gastrinome a été décrit chez le rat et le chien et est associé à une hypergastrinémie cause du syndrome de Zollinger-Ellison regroupant une hyperacidité gastrique, une ulcération gastrique et duodénale et une hyperplasie de la muqueuse gastrique en région antrale.

Le glucagonome a rarement été observé chez le chien et est associé à un syndrome associant une hyperglycémie, une glycogénose hépatique et une dermatite nécrosante superficielle.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

I. Matériel et méthode

1) Animaux utilisés

Les 19 pancréas inclus dans cette étude ont été prélevés sur des Microcèbes du Laboratoire d'Ecologie Générale du Muséum National d'Histoire Naturelle (LEGMNHN) à Brunoy lors d'autopsies d'animaux issus du projet «Restrikal» (Annexe 1 ; Tableau 2 ; Tableau 3).

Tableau 2 : Répartition des Microcèbes étudiés en fonction de l'âge.

Âge	3 ans (animaux contrôles)	4 ans	5 ans	6 ans	7 ans	8 ans	9 ans
Nombre d'animaux	3	2	3	6	2	2	1

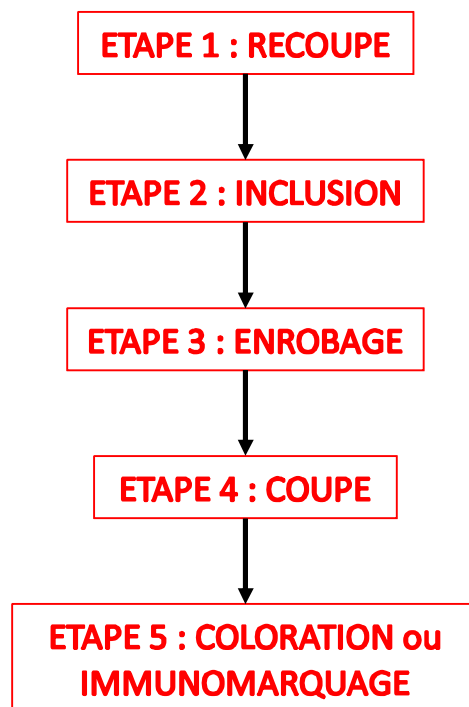
Tableau 3 : Répartition des Microcèbes étudiés en fonction du type de régime alimentaire.

Type de régime	<i>ad libitum</i>	Restriction Calorique	Resvératrol
Nombre d'animaux	6 + 3 contrôles	5	5

2) Préparation des lames histologiques

Les pancréas ont été fixés 48 heures dans du paraformaldéhyde (PFA) puis conservés dans de l'éthanol à 70 % à 4°C. Avant de subir les différentes étapes de préparation histologique (Figure 6), ils ont été post-fixés au formol au minimum 48 heures (formaldéhyde tamponné à 10 % en PBS) (Lefort-Cordonnier *et al.*, 2015).

Figure 6 : Les étapes de préparation des lames histologiques.



Etape 1 : des tranches de pancréas d'environ 5 mm d'épaisseur étaient déposées dans des cassettes ajourées, chacune identifiée par un numéro d'identification. La faible épaisseur des prélèvements et l'utilisation de cassettes perforées permettaient un bon échange des liquides et une bonne pénétration de ces derniers dans les tissus.

Etape 2 : Les prélèvements étaient ensuite déshydratés par immersion dans 5 bains d'éthanol successifs, de concentration croissante et imprégnés de paraffine liquide (58°C) après passage dans un solvant organique, le toluène, facilitant la pénétration de la paraffine.

Etape 3 : Les tranches de pancréas imprégnées de paraffine liquide étaient placées dans des moules métalliques. Ces moules étaient ensuite remplis de paraffine liquide (58°C) et refroidis sur plaque froide. La paraffine se solidifiait et formait un bloc enrobant le prélèvement. Les blocs étaient ensuite démoulés et durcis au froid.

Etape 4 : Les blocs étaient coupés à l'aide d'un microtome. Des sections de 4 µm d'épaisseur étaient réalisées et étalées sur l'eau d'un bain-marie à 38°C pour éliminer les plis. Elles étaient ensuite recueillies sur des lames de verre, puis séchées. Pour les techniques d'immunomarquages, des lames SuperFrost®Plus ont été utilisées. Elles permettaient une meilleure adhérence des tissus à leur surface.

Etape 5 : La coloration s'effectuait en phase aqueuse. Les lames devaient au préalable être déparaffinées. Elles étaient successivement passées dans des bains de toluène et réhydratées par immersion dans des bains d'alcool de degré décroissant puis réhydratées dans de l'eau distillée.

La coloration de routine utilisée au laboratoire associait l'hémalun, l'éosine et le safran (coloration HES, une coloration trichromique). Elle permettait d'apprécier la morphologie des tissus. Le noyau était coloré en bleu-violet par l'hémalun, le cytoplasme en rose par l'éosine et les fibres de collagène en orange par le safran.

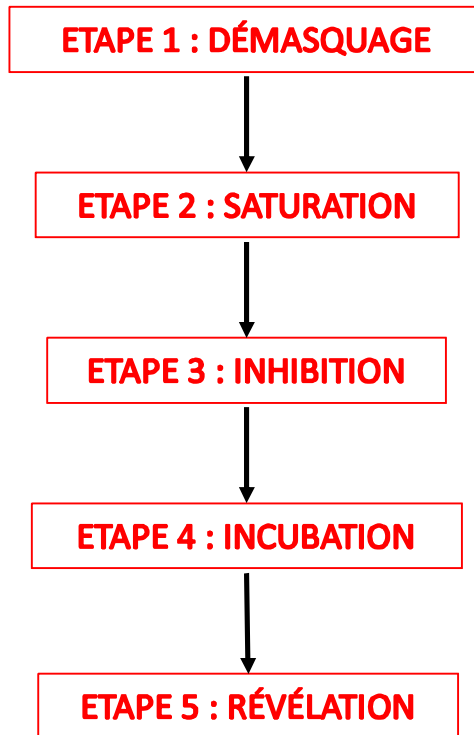
3) *L'immunohistochimie enzymatique*

a. Principe de l'immunohistochimie enzymatique

L'immunohistochimie repose sur le principe de reconnaissance d'un antigène (la protéine étudiée) par un anticorps spécifique (anticorps primaire), puis sur la détection du complexe antigène-anticorps ainsi formé à l'aide d'un système de révélation et d'amplification du signal (Lefort-Cordonnier *et al.*, 2015).

Les étapes de marquage s'effectuaient après déparaffinage et réhydratation des lames (Figure 7).

Figure 7 : Les étapes du protocole D'immunomarquage histologique.



Etape 1 : De nombreuses liaisons covalentes ont été créées lors de la fixation des tissus par le formol. Ces liaisons peuvent masquer ou altérer la conformation de la protéine d'intérêt et empêcher sa reconnaissance par l'antigène primaire. La chaleur (par l'utilisation d'un bain-marie ou d'un micro-onde) ou la digestion enzymatique (par l'utilisation de trypsine, de pepsine, de protéinase K) permettaient de démasquer les sites antigéniques.

Etape 2 : Pour limiter les liaisons aspécifiques de l'anticorps primaire, les sites de liaison non spécifiques sont saturés par l'application sur la lame d'une solution riche en protéines comme la sérum albumine bovine ou des caséines.

Etape 3 : L'enzyme utilisée dans le système de révélation est souvent naturellement présente à faible concentration dans le tissu étudié. La peroxydase était l'enzyme utilisée dans ce protocole de marquage. L'activité des peroxydases endogènes devait donc être inhibée pour limiter les signaux non spécifiques (bruit de fond). Pour cela, les lames étaient immergées dans de l'eau oxygénée avant emploi du kit de révélation.

Etape 4 : Après dépôt de l'anticorps primaire, les lames étaient incubées soit la nuit à température ambiante soit quelques heures à 37°C.

Etape 5 : Les complexes antigènes-anticorps étaient détectés et le signal amplifié par un système révélateur-amplificateur. Le système utilisé dans l'étude était composé d'un

anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire biotinylé et du complexe Streptavidine-*Horse Radish* peroxydase.

La streptavidine a une forte affinité pour la biotine et se fixe à cette dernière. Le substrat de la peroxydase utilisé était le 3,3'-diaminobenzine (DAB). Sa transformation fait apparaître un précipité brun là où le système de révélation est fixé (Figure 8). La lame était ensuite contre-colorée par l'hémalun.

On observait au microscope optique des précipités bruns sur un tissu coloré en bleu.

Figure 8 : Principe de l'immunohistochimie.

D'après Lezmi, 2014.

Ire : primaire ; Ilre : secondaire ; HRP : *horse radish* peroxydase ; STREP : streptavidine ; DAB : 3,3'-diaminobenzine.



b. Protocole d'immunomarquage

A l'exception du dépôt des anticorps primaires, fait manuellement, la totalité des étapes d'immunomarquage était réalisée par l'automate Discovery XT Full System (Ventana Medical Systems, Inc.).

Les deux anticorps primaires utilisés sur deux coupes successives d'un même bloc étaient :

- un mélange de deux IgG monoclonales de souris anti-insuline (Insulin Ab-6, ThermoScientific #MS-1379-R7) à une concentration de 0,5 µg/mL ne nécessitant pas d'étape de démasquage ;
- un mélange d'IgG polyclonales de lapin anti-glucagon (Cell Marque 259A-18) à une concentration de 5,67 µg/mL nécessitant une étape de démasquage utilisant un tampon citrate pH6 (CC2, Ventana Medical System).

Le système de révélation utilisait comme anticorps secondaire un mélange d'IgG biotinylées de chèvre anti-IgG de souris et anti-IgG de lapin (Universal Secondary antibody, Roche Ventana 760-4205), comme système d'amplification la *horseradish* peroxydase couplée à la streptavidine avec comme substrat l'eau oxygénée et comme co-substrat le 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (DAB MAP, Roche Ventana).

Des contrôles négatifs sans anticorps primaires et des contrôles positifs sur animaux jeunes en absence de lésion pancréatique (animaux contrôles) étaient incubés dans la même série et validés.

4) *Analyse morphométrique*

Les lames immunomarquées ont été photographiées au grossissement 25 à l'aide d'un microscope Zeiss, motorisé-informatisé, ImagerZ1 et d'une caméra Zeiss HRc. La surface totale du pancréas, des îlots de Langerhans et des cellules marquées par l'insuline ou le glucagon était mesurée à l'aide du logiciel AxioVision 4.6.3. (Carl Zeiss S.A.S., Le Pecq, France).

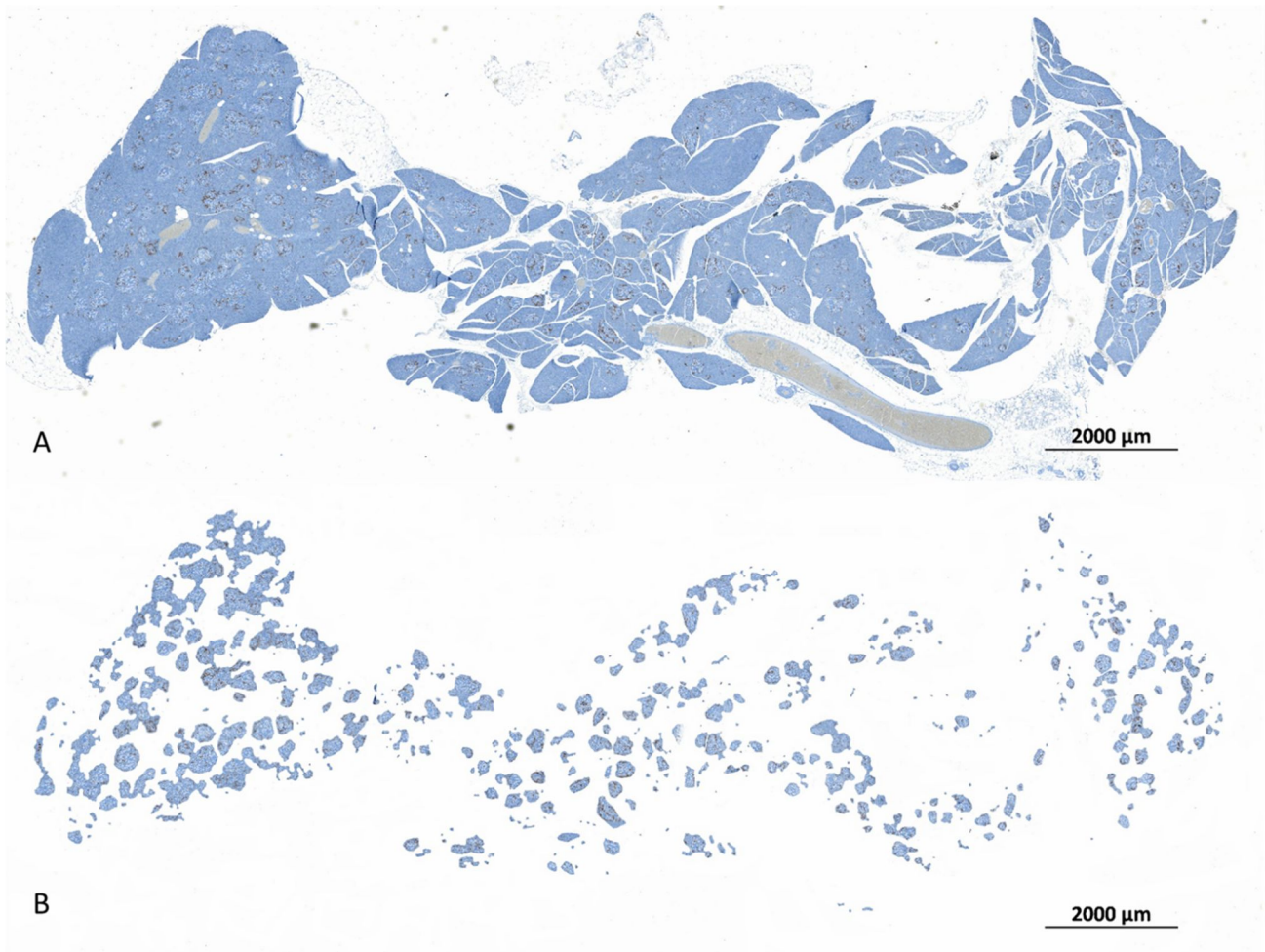
Un seuil de détection, combinant une valeur de teinte, de luminosité et de saturation, considéré comme marquage cellulaire spécifique en glucagon ou insuline a été déterminé et figé au préalable et intégré au programme du logiciel de morphométrie.

Pour limiter dans les mesures de surface l'incorporation de marquage aspécifique présent dans le tissu et hors du tissu, les photographies ont été retouchées à l'aide du logiciel GIMP. Chaque photographie de lame immunomarquée a été comparée à la lame immunomarquée correspondante. Toutes les traces foncées retrouvées sur la photographie et considérées comme du bruit de fond sur la lame immunomarquée ont été éliminées (vaisseaux, poussières, dépôt de DAB sur le verre...) (Figure 9).

Figure 9 : Section de pancréas avec immunomarquage des cellules α par un anticorps anti-glucagon.

Elimination à l'aide du logiciel GIMP des marquages aspécifiques.

A : avant retouche par le logiciel GIMP. B : après retouche par le logiciel GIMP.



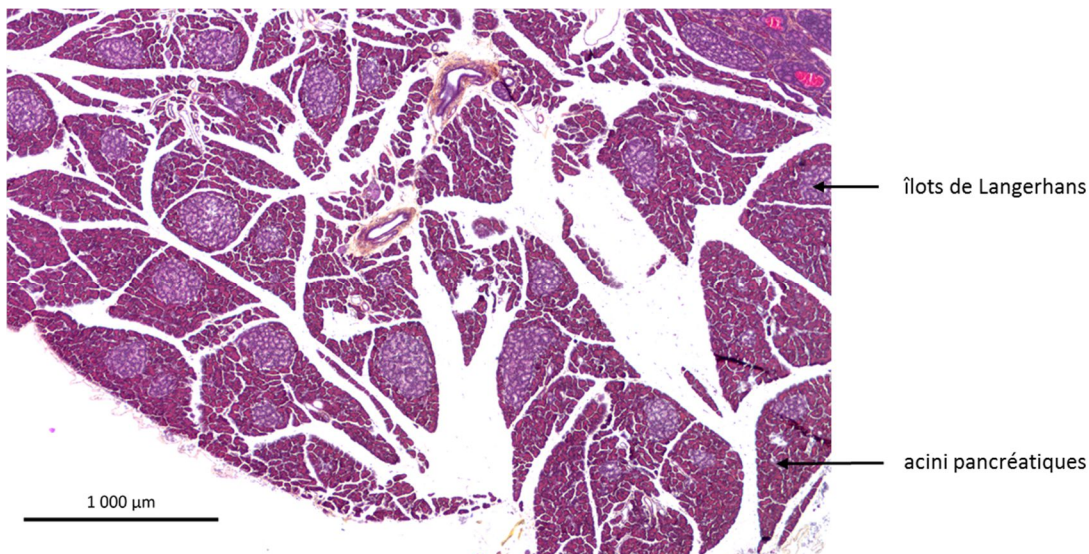
II. Résultats

1) Coloration hémalun-éosine-safran

Les îlots de Langerhans observés chez les animaux témoins, correspondant à l'aspect histologique normal, étaient de forme sphérique, de 300 à 400 μm de diamètre, séparés par du tissu pancréatique exocrine et régulièrement répartis dans le pancréas exocrine (Figure 10).

Figure 10 : Structure histologique pancréatique chez un Microcèbe témoin.

Coloration hémalun éosine safran.



En comparaison avec les animaux contrôles, sur les seize pancréas des Microcèbes étudiés, certains possédaient des îlots de Langerhans plus nombreux, de taille augmentée et irrégulièrement anastomosés (Figure 11). Ces îlots ont été considérés comme hyperplasiques. Si seul le nombre ou la taille des îlots de Langerhans semblait visuellement augmenté, ils ont été considérés comme subnormaux (Tableau 4).

Figure 11 : Hyperplasie des îlots de Langerhans chez un Microcèbe de l'étude.

Augmentation du nombre et de la taille avec anastomose irrégulière des îlots de Langerhans.

Coloration hémalun éosine safran.

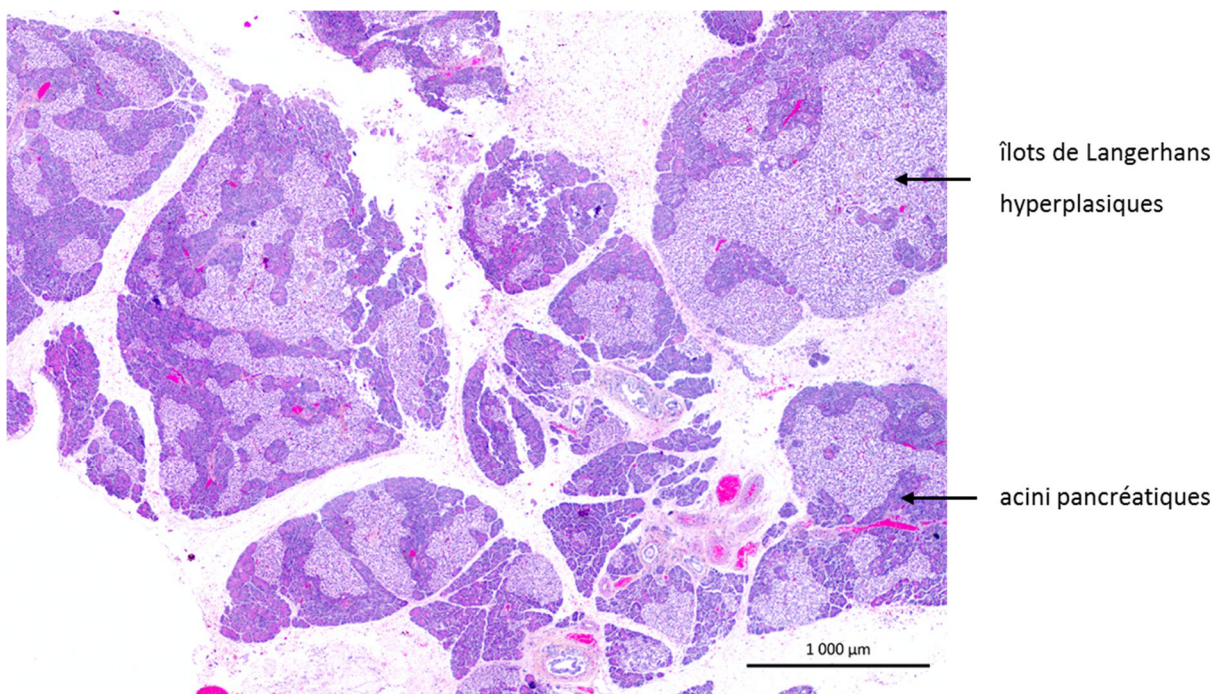


Tableau 4 : Répartition des Microcèbes de l'étude selon le niveau d'hyperplasie du pancréas endocrine, évalué sur les lames colorées à l'hémalun éosine safran.

Îlots de Langerhans	Normaux	Subnormaux	Hyperplasiques
Identifiant de l'animal	13 0692-67 A5 13 0694-91 A5 13 0697-27 A5 13 0701-75 A5 13 0969-93 A5 13 0974-53 A5 13 0976-77 A4	13 0686-94 A5 13 0687-07 A5 13 0695-03 A5 13 0700-63 A5	13 0684-70 A5 13 0696-15 A5 13 0702-87 A5 13 0975-65 A5
Nombre de pancréas	8	4	4

2) Immunomarquages anti-insuline, anti-glucagon et analyse morphométrique

a. Répartition des cellules α et β dans le pancréas endocrine des Microcèbes

Les animaux contrôles étaient au nombre de trois et étaient âgés de 3 ans. L'un d'entre eux était issu du projet «Restrikal». Les deux autres faisaient partie de la colonie de Microcèbes du LEGMNH de Brunoy mais n'étaient inclus dans aucun projet. Ils ont été euthanasiés, deux suite à des accidents (traumatisme externe) et un suite au développement d'une tumeur non endocrine et ne touchant pas le pancréas.

Chez ces animaux contrôles, le pourcentage de surface d'îlot de Langerhans par rapport à la surface totale était en moyenne de 8 %. Les îlots de Langerhans étaient formés en moyenne de 10 % de cellules α et de 70 % de cellules β . Les 20 % restant correspondaient aux cellules δ , aux autres cellules endocrines, aux vaisseaux sanguins et terminaisons nerveuses (Tableau 5).

Tableau 5 : Pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes témoins.

pour les 3 animaux témoins	% [surface totale en îlot de Langerhans / surface totale pancréatique]	% [surface en cellule α /surface en îlot de Langerhans]	% [surface en cellule β /surface en îlot de Langerhans]	[surface en cellules α] / [surface en cellules β]
Moyenne	7,67	10,27	69,67	0,15
Ecart-type	4,50	3,32	1,80	0,04

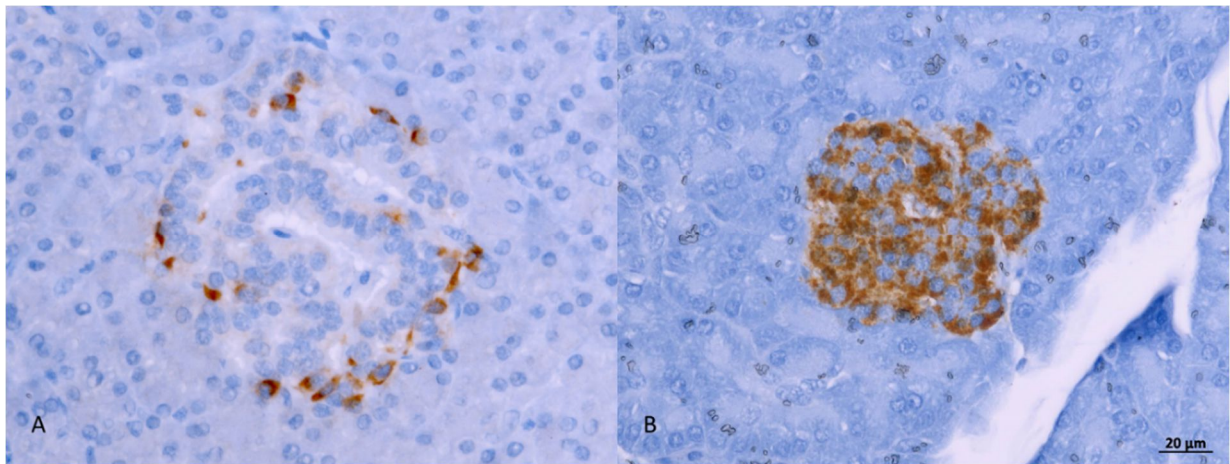
Les cellules α formaient un cercle périphérique, discontinu et d'épaisseur irrégulière. Les cellules β étaient réparties de manière homogène sur toute la surface de l'îlot de Langerhans (Figure 12).

Figure 12 : Répartition des cellules α et β au sein des îlots de Langerhans chez un Microcèbe témoin.

A : cellules α marquées avec un anticorps anti-glucagon. B : cellules β marquées avec un anticorps anti-insuline.

Le complexe antigène-anticorps était révélé par un précipité marron, correspondant au produit formé lors de la transformation du DAB par la peroxydase.

Contre coloration à l'hémalun.



b. L'hyperplasie des îlots de Langerhans

Sur les 16 animaux de l'étude, six présentaient des lésions d'hyperplasie du pancréas endocrine (Annexe 1 ; Tableau 6).

Tableau 6 : Pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes de l'étude avec lésion d'hyperplasie des îlots de Langerhans.

Identifiant histologique de l'animal	% [surface totale en îlot de Langerhans / surface totale pancréatique]	[surface en cellules α] / [surface en cellules β]	Âge	Type de régime alimentaire	Cause de la mort
13 0702-87 A5	22	0,06	5 ans	resvératrol	insuffisante rénale chronique
13 0700-63 A5	19	0,19	5 ans	<i>ad libitum</i>	insuffisante rénale chronique
13 0695-03 A5	19	0,04	6 ans	resvératrol	insuffisante rénale chronique
13 0696-15 A5	55	0,03	6 ans	resvératrol	insuffisante rénale chronique
13 0975-65 A5	non évaluable	non évaluable	6 ans	<i>ad libitum</i>	insulinome
13 0684-70 A5	21	0,31	7 ans	restriction calorique	insuffisante rénale chronique

Le pourcentage de surface en îlot par rapport à la surface totale du pancréas variait de 19 % à 55 %. Tous les animaux présentant ces lésions étaient âgés de plus de 4 ans. A partir de cinq ans, les microcèbes avaient une population de cellules endocrines qui tendait à doubler (Tableau 7).

Tableau 7 : Pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes de l'étude en fonction de l'âge.

		% [surface totale en îlot de Langerhans / surface totale pancréatique]		[surface en cellules α] / [surface en cellules β]	
Age des animaux	Nombre d'animaux	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
3 ans (témoins)	3	7,67	5,51	0,15	0,05
4 ans	2	3,50	0,71	0,24	0,00
5 ans	3	16,00	7,94	0,18	0,11
6 ans	5	19,00	20,80	0,21	0,17
7 ans	2	16,50	6,36	0,24	0,11
≥ 8 ans	3	11,67	1,53	0,22	0,06

Pour 4 d'entre eux, une hyperplasie des cellules β était la cause de l'augmentation en surface des îlots de Langerhans (Figure 13). Les rapports de surface de marquage des cellules α sur cellules β variaient de 0,03 à 0,06 contre une valeur moyenne contrôle de 0,15.

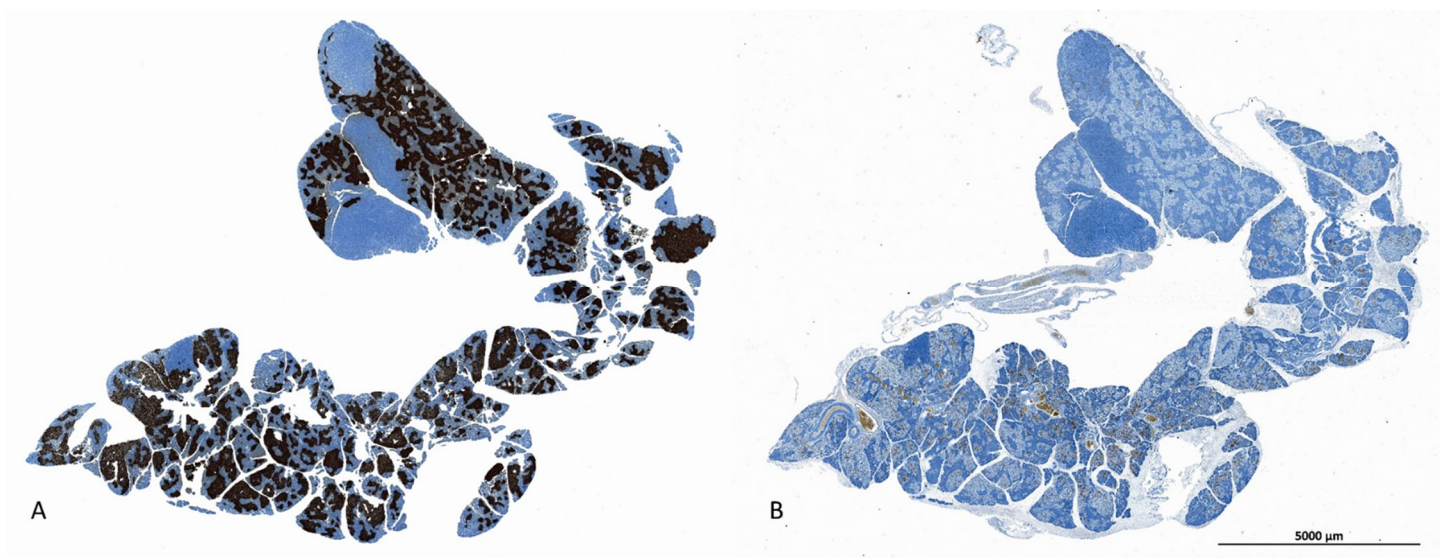
Figure 13 : Hyperplasie des cellules β chez le Microcèbe 13 0696-15 A5.

A : marquage des cellules β par un anticorps anti-insuline. B : marquage des cellules α par un anticorps anti-glucagon.

Les îlots de Langerhans étaient nombreux et de taille augmentée avec anastomose irrégulière. La surface des îlots de Langerhans était majoritairement marquée par l'anticorps anti-insuline.

Le complexe antigène-anticorps était révélé par un précipité marron, correspondant au produit formé lors de la transformation du DAB par la peroxydase.

Contre coloration à l'hémalun.



Trois des six Microcèbes présentant une hyperplasie du pancréas endocrine étaient sous un régime alimentaire complétement en resvératrol. Deux autres suivaient un régime alimentaire sans restriction et le dernier un régime alimentaire restreint en calorie (Tableau 8).

Les deux autres Microcèbes présentait une prolifération concomitante, mais à des degrés variables des cellules α et β (Tableau 6 ; Annexe 1) :

- pour l'un, un rapport de surface de marquage anti-glucagon sur celui anti-insuline faiblement augmenté avec une valeur de 0,19, expliqué par un pourcentage de marquage anti-insuline élevé (91 %) et un marquage anti-glucagon légèrement augmenté (18 %) ;
- pour l'autre, un rapport de surface de marquage anti-glucagon sur anti-insuline nettement augmenté avec une valeur de 0,31, expliqué par un pourcentage de marquage anti-insuline faiblement augmenté (74 %) et un marquage du anti-glucagon nettement augmenté (23 %).

Tableau 8 : Répartition de Microcèbes avec des lésions d'hyperplasie du pancréas endocrine en fonction du type de régime alimentaire.

	<i>ad libitum</i>	resvératrol	restriction calorique
Nombre de Microcèbes avec des lésions d'hyperplasie	2	3	1

c. Les animaux sous restriction calorique

L'étude comportait cinq animaux sous restriction calorique. Trois de ces animaux faisaient partie des cinq animaux âgés de plus de 6 ans. Un seul présentait des lésions d'hyperplasie du pancréas endocrine. Il était âgé de 7 ans (Annexe 1 ; Tableau 9).

Tableau 9 : Moyennes et écart-types des pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes sous restriction calorique.

	% [surface totale en îlot de Langerhans / surface totale pancréatique]		[surface en cellules α] / [surface en cellules β]	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
restriction calorique	11,11	6,74	0,25	0,06

d. Les animaux sous resvératrol

L'étude comportait cinq animaux sous resvératrol. Trois de ces animaux présentaient des lésions d'hyperplasie des îlots de Langerhans par prolifération des cellules β . Ils étaient âgés de 5 à 6 ans (Annexe 1 ; Tableau 10).

Un seul de ces cinq animaux était âgé de plus de 7 ans.

Tableau 10 : Moyennes et écart-types des pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes traités par le resvératrol.

	% [surface totale en îlot de Langerhans / surface totale pancréatique]		[surface en cellules α] / [surface en cellules β]	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
resvératrol	22,60	19,13	0,14	0,14

e. Les animaux sous régime *ad libitum*

L'étude comportait 6 animaux sous régime *ad libitum*. Deux de ces animaux présentaient des lésions d'hyperplasie des îlots de Langerhans. Ils étaient âgés de 5 et 6 ans (Annexe 1 ; Tableau 11).

Tableau 11 : Moyennes et écart-types des pourcentages et rapports des surfaces évaluées chez les Microcèbes de l'étude sous régime *ad libitum*.

	% [surface totale en îlot de Langerhans / surface totale pancréatique]		[surface en cellules α] / [surface en cellules β]	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
<i>ad libitum</i>	10,00	6,03	0,25	0,07

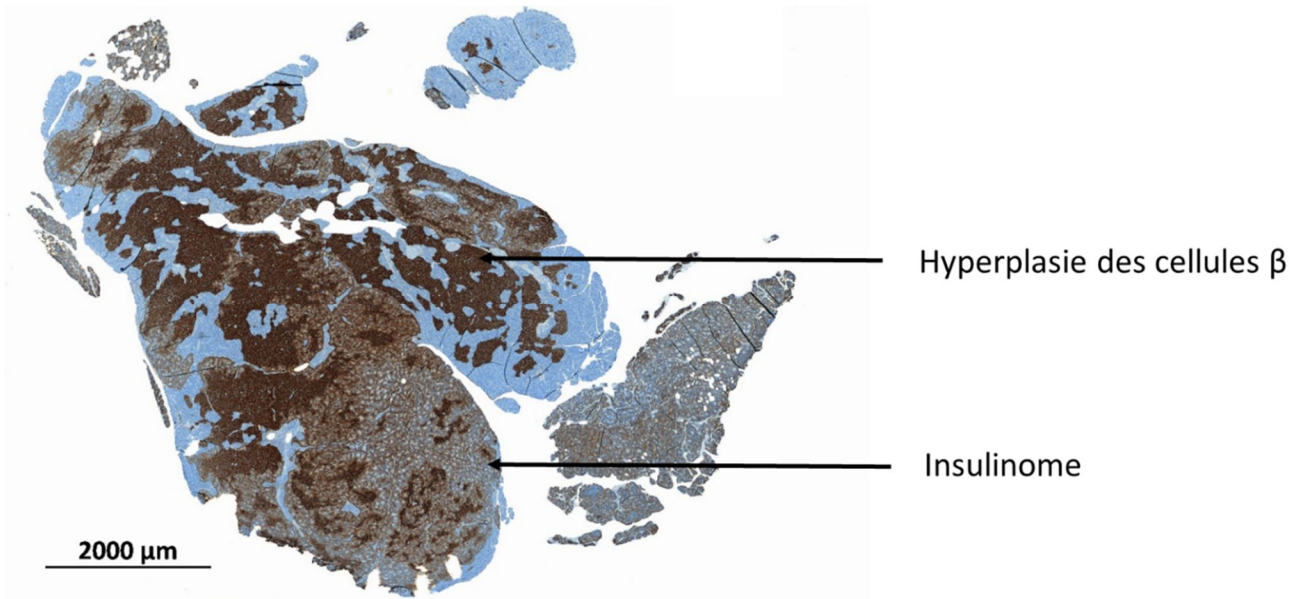
L'animal âgé de 6 ans identifié 13-0975-65 A5 a été exclu des analyses de surface. Il présentait une hyperplasie des cellules β , ainsi qu'une tumeur des cellules β (insulinome), empêchant une analyse correcte du marquage anti-insuline par le logiciel de morphométrie en raison de la grande hétérogénéité dans l'intensité du signal (Figure 14).

Figure 14 : Hyperplasie des cellules β et insulinome chez le microcèbe 13 0975-65 A5.

Marquage des cellules β par un anticorps anti-insuline.

Le complexe antigène-anticorps était révélé par un précipité marron, correspondant au produit formé lors de la transformation du DAB par la peroxydase.

Contre coloration à l'hémalun.



III. Discussion

Lors de l'analyse morphométrique, les surfaces de pancréas analysées ont été restreintes aux lobes pancréatiques où les îlots de Langerhans présentaient à la fois des cellules avec un marquage anti-insuline et des cellules avec un marquage anti-glucagon. Sur certaines coupes, étaient observés des lobes entiers avec seulement un marquage cellulaire anti-insuline. Ces zones ont été effacées permettant ainsi l'analyse de surfaces pancréatiques représentatives.

L'absence de marquage en glucagon de lobes pancréatiques entiers serait en faveur d'une hétérogénéité dans la composition des îlots de Langerhans au sein du pancréas.

La petite taille des pancréas et le paramétrage de l'étude après prélèvement des pancréas ne permettaient pas une standardisation des coupes. Lors des prochaines études, il faudrait prélever en entier le pancréas des Microcèbes et apprêter le tissu selon un plan de recoupe standardisé et prédéfinir sur les lames histologiques les zones à analyser.

Les îlots de Langerhans des animaux témoins étaient de forme sphérique, délimités en périphérie par un cercle irrégulier et discontinu de cellules α . Les cellules β étaient réparties de façon dispersée dans les îlots de Langerhans. La répartition des deux types majeurs de cellules endocrines était comparable à celle des rongeurs mais inversée par rapport à celle des primates non humains déjà décrite, comme le macaque crabier où les cellules α sont en position centrale et les cellules β forment un cercle irrégulier périphérique. Chez l'Homme, les cellules α et β sont réparties de façon homogène dans les îlots de Langerhans (Wieczorek *et al.*, 1998).

Dans l'étude, les moyennes des pourcentages en cellules α et β au sein des îlots de Langerhans chez les animaux témoins étaient respectivement de 10 % et 70 % (Tableau 5). Ces valeurs étaient comparables à celles observées chez les autres mammifères (Wieczorek *et al.*, 1998). Si des variations dans la répartition topographique des cellules endocrines pancréatiques étaient présentes entre certaines espèces de mammifères, les proportions respectives des cellules, quant à elles, semblaient conservées.

Sur les lames colorées par l'HES, le manque de contraste entre les tissus pancréatiques endocrine et exocrine ne permettait pas au logiciel de morphométrie d'identifier les îlots de Langerhans de façon systématique.

Le logiciel de morphométrie pouvait en revanche utiliser le marquage anti-insuline très contrasté pour délimiter les îlots de Langerhans et évaluer leur surface sur la coupe.

Le marquage anti-glucagon observé en périphérie était trop discontinu pour être employé comme indicateur de limite externe par le logiciel. Une majorité de la surface en cellules α , correspondant au maximum à 10 % de la surface en pancréas endocrine dans des conditions normales, se situait en périphérie des îlots de Langerhans. Cette couronne externe n'était donc pas prise en compte dans la mesure de la surface totale de l'îlot de Langerhans. Cela a abouti à une sous-évaluation faible mais systématique du rapport de la surface totale des

îlots de Langerhans sur la surface totale du pancréas, ainsi qu'une sur-évaluation minime et systématique des pourcentages en cellules α et en cellules β dans l'îlot de Langerhans.

Sur les 16 pancréas analysés dans cette étude, six présentaient des lésions d'hyperplasie du pancréas endocrine. La tranche d'âge de ces animaux était de cinq à sept ans (Tableau 6). Ainsi ce type de lésion était plus fréquent chez les Microcèbes adultes matures à vieillissants. L'hyperplasie des îlots résultait dans quatre cas sur six de la prolifération des cellules β .

De nombreux modèles animaux servant à l'étude de la pathogénie et des effets sur l'organisme du diabète sucré ou de l'obésité ont été développés. La présence d'une hyperplasie fonctionnelle associée ou non à une régénération des cellules β a souvent été observée.

Par exemple, un modèle animal du diabète sucré, utilisant le rat, induit par pancréatectomie a été développé. Une résection de 90 % du parenchyme pancréatique était nécessaire pour induire un diabète. Huit semaines après l'intervention, la population de cellules β s'établissait à 40 % de la normale. La population de cellules β était donc capable de se régénérer (Kargar et Ktorza, 2008).

Cependant, la présence d'une hyperglycémie chronique a deux conséquences. Tout d'abord, la population résiduelle de cellules β est continuellement stimulée, ce qui aboutit à long terme à un épuisement d'abord réversible puis irréversible de leur capacité de sécrétion. Ensuite, l'hyperglycémie chronique altère l'environnement cellulaire. Ainsi, la régénération de la population de cellules β se produit dans un milieu défavorable. Cela a pour conséquence l'apparition de cellules β présentant une altération de l'expression de leur génome, des voies de signalisation, conduisant à un phénotype anormal et une différenciation anormale (Kargar et Ktorza, 2008).

Dans une autre étude, des rats qui ont subi une résection de 60 % du pancréas et dont la glycémie demeure physiologique, ont été supplémentés en glucose par ajout de sucre dans l'eau de boisson. Une régénération de la population de cellules β a été observée aboutissant à un volume cellulaire équivalent aux animaux contrôles. L'hyperglycémie chronique stimule donc la régénération des cellules β . Cependant, cette régénération, dans ces conditions, est associée à l'apparition d'anomalies fonctionnelles dans ces cellules : diminution voire absence de granules de sécrétions et de la réponse cellulaire à divers stimuli (Bonner-Weir *et al.*, 1983; Leahy *et al.*, 1988).

Le rat Zucker obèse *fa/fa* est un modèle d'étude des effets de l'obésité. Il présente un état de résistance à l'insuline associé à une glycémie physiologique. En comparaison avec le rat Zucker maigre *Fa/fa* ou *Fa/FA*, le volume en cellules β du rat obèse est quadruplé et est expliqué par une hyperplasie et une hypertrophie de ces cellules (Milburn *et al.* 1995). De même, des souris soumises à un régime riche en graisse développent au bout de 4 mois un état de résistance à l'insuline, un volume en cellules β triplé et une réponse accrue de ces cellules à l'hyperglycémie (Sone et Kagawa 2005).

La population en cellules β peut donc varier en fonction de la demande en insuline. Une demande élevée en insuline aboutit à une prolifération de ces cellules. En fonction du contexte où se déroule la multiplication des cellules β , on observe une corrélation entre le volume en cellules β et le niveau d'insuline sécrétée. Un environnement défavorable, comme lors d'une hyperglycémie chronique, aboutit à une altération de leur phénotype et donc à une perte de leur activité.

Dans notre étude, en l'absence de lésions inflammatoires ou nécrosantes du parenchyme pancréatique, ces résultats peuvent suggérer une hyperplasie fonctionnelle des cellules β suite à une demande croissante en insuline. Un défaut d'action de l'insuline sur les tissus périphériques, révélant un état insulino-résistant de ces Microcèbes, pourrait expliquer ces observations.

Parmi les Microcèbes adultes vieillissants, âgés de plus de six ans, se trouvait trois animaux en restriction calorique, un animal en régime *ad libitum* et un animal traité par du resvératrol. Les animaux en restriction calorique avaient tendance à avoir une durée de vie prolongée, une observation déjà décrite chez le macaque rhésus (Colman *et al.*, 2009). Un seul animal du groupe en restriction calorique présentait une hyperplasie des îlots de Langerhans mais cet animal était âgé de plus de sept ans. Ce type de régime alimentaire pourrait donc retarder l'apparition des lésions d'hyperplasie du pancréas endocrine. Cette observation irait dans le sens d'un effet protecteur contre l'instauration d'état insulino-résistant chez le Microcèbe soumis à un régime alimentaire restreint en calories (Marchal *et al.*, 2012b).

Trois des cinq animaux de la tranche d'âge de cinq à six ans traité par resvératrol présentaient des lésions d'hyperplasie des îlots de Langerhans par prolifération des cellules β . Cette étude tend à montrer que le resvératrol à lui seul ne semblait pas avoir d'effet préventif sur l'hyperplasie des îlots de Langerhans.

Si l'on compare les pancréas des Microcèbes en restriction calorique et les pancréas des Microcèbes sans restriction alimentaire, le régime *ad libitum* ne semblait pas avoir d'impact sur la survenue et le délai d'apparition des lésions d'hyperplasie des îlots de Langerhans.

Une analyse statistique a été effectuée sur notre étude comparant la présence d'hyperplasie du pancréas endocrine entre :

- les animaux traité par du resvératrol et les animaux en régime *ad libitum* ;
- les animaux en restriction calorique et les animaux en régime *ad libitum* en prenant compte ou non de la variable de l'âge.

Sans tenir compte de la variable de l'âge, le pourcentage d'animaux présentant une hyperplasie du pancréas endocrine était plus élevé chez les Microcèbes traité par du resvératrol (50 %) que chez les Microcèbes en régime *ad libitum* (33 %). Cependant, le faible nombre d'animaux par groupe (5 traité par du resvératrol et 6 en régime *ad libitum*) ne

permettait que d'obtenir une tendance non statistiquement significative. Au test de Fisher, l'Odd Ratio est de 0,3704 (intervalle de confiance à 95 % [0,0157 ; 6,457] et le p de 0,57.

Pour compléter cette étude, il serait intéressant de corrélérer ces résultats à la glycémie et à l'insulinémie, des données régulièrement collectées chez ces animaux durant toute leur vie.

De plus, des tests de tolérance au glucose ont été effectués du vivant de ces animaux. Les résultats de ces tests permettraient d'évaluer l'activité des cellules β et de déterminer si la fonction de ces cellules était conservée, leur niveau de réactivité face à un stimulus, ainsi que la conservation ou non de la première phase de sécrétion de l'insuline. On pourrait, ainsi, affiner notre interprétation et déterminer si les lésions d'hyperplasie des cellules β seraient en lien avec la mise en place d'un état d'insulino-résistance et approfondir l'étude de l'effet protecteur du régime de restriction calorique envers l'état insulino-résistant.

Enfin, il serait important d'inclure dans cette étude d'avantage d'animaux pour élargir l'effectif et conférer ainsi une force statistique aux résultats.

CONCLUSION

Cette étude chez les Microcèbes a permis d'observer que la répartition des cellules α et β dans les îlots de Langerhans était différente de celle des autres primates non-humains et de l'Homme. Elle s'apparente à celle des rongeurs, c'est-à-dire constituée d'une couronne périphérique de cellules α , encerclant irrégulièrement les cellules β diffusément réparties dans les îlots de Langerhans.

Les proportions de cellules α et β étaient toutefois comparables à celles observées chez les mammifères, avec 10 % de cellules α et 70 % de cellules β .

Six pancréas sur seize présentaient une hyperplasie des îlots de Langerhans, une lésion majoritairement due à une prolifération des cellules β . Ces Microcèbes étaient tous des animaux âgés de plus de 4 ans. Ce type de lésion pancréatique serait donc observé préférentiellement chez l'adulte mature à vieillissant.

Trois des animaux âgés de plus de 6 ans étaient en restriction calorique. Un seul animal avec ce type de régime alimentaire a développé une hyperplasie des cellules β . Il était âgé de 7 ans. La restriction calorique pourrait donc limiter l'apparition des lésions du pancréas endocrine chez le Microcèbe. On peut émettre l'hypothèse que la restriction calorique chez ce modèle animal aurait un effet protecteur contre le développement de lésions d'hyperplasie compensatrice du pancréas endocrine et donc de l'instauration d'un état insulino-résistant.

La prise quotidienne de resvératrol chez le Microcèbe, une molécule pouvant produire potentiellement les effets de la restriction calorique, ne limitait pas l'apparition de ces lésions. Au contraire, ces lésions semblaient être plus fréquentes chez ces animaux. Cependant, le faible nombre de Microcèbes étudiés ne permettait pas une conclusion statistiquement significative. Dans ce modèle animal, le resvératrol ne permettrait donc pas la protection de l'individu contre le développement de lésion d'hyperplasie du pancréas endocrine.

Pour donner une force statistique à ces résultats, il faudrait poursuivre l'étude en incluant des pancréas d'animaux de tous âges et provenant des trois types de régime alimentaire.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de comparer les données de glycémie et les résultats des tests de tolérance au glucose de chaque animal, régulièrement collectés de leur vivant et de les corrélérer avec la présence ou non de lésions du pancréas endocrine. Ceci permettrait d'évaluer l'effet protecteur contre l'instauration d'un état insulino-résistant d'un régime restreint en calorie.

BIBLIOGRAPHIE

AGARWAL B, BAUR J.A. (2011). Resvératrol et life extension. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215, 138–143.

Agence Nationale de la Recherche. *Projet RESTRIKAL*. [en ligne]. [http://www.agence-nationale-recherche.fr/projet-anr/?tx_lwmsuivibilan_pi2%5BCODE%5D=ANR-06-PNRA-0010] (consulté le 14/04/2015).

AUSTAD SN, FISCHER KE. (2011). The development of small primate models for aging research. *ILAR J. Natl. Res. Counc. Inst. Lab. Anim. Resour.* 52, 78–88.

BONNER-WEIR, S., TRENT, D.F., WEIR, G.C. (1983). Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *J. Clin. Invest.* 71, 1544–1553.

BONS N, RIEGER F, PRUDHOMME D, FISHER A, KRAUSE KH. (2006). *Microcebus murinus*: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease? *Genes Brain Behav.* 5, 120–130.

CHARLES J. (2007). Pancreas. In: Jubb, Kennedy, Palmer (editors). *Pathology of Domestic Animals*. Vol.2. 5^e ed. Edinburgh, Saunders Ltd., 408–423.

COLMAN RJ, ANDERSON RM, JOHNSON SC, KASTMAN EK, KOSMATKA KJ, BEASLEY TM *et al.* (2009). Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325, 201–204.

DAL-PAN A, PIFFERI F, MARCHAL J, PICQ J-L, AUJARD F *et al.* «RESTRIKAL» Consortium (2011). Cognitive performances are selectively enhanced during chronic caloric restriction or resveratrol supplementation in a primate. *PloS One* 6, e16581.

David Haring Photography. *Mouse and Dwarf lemurs*. [en ligne]. (Mise à jour le 14/01/2009). [<http://dharing.zenfolio.com/p664636544/h3BF148DF#h3bda9bae>]. (Consulté le 28/05/2015).

ELLIOTT DA, FELDMAN EC, KOBLIK PD, SAMII VF, NELSON RW. (2000). Prevalence of pituitary tumors among diabetic cats with insulin resistance. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 216, 1765–1768.

FROMBAUM M, LE CLANCHE S, BONNEFONT-ROUSSELOT D, BORDERIE D. (2012). Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and *NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases. *Biochimie* 94, 269–276.

FURUOKA H, SHIRAKAWA T, TANIYAMA H, OHISHI H, SATOH H, ITAKURA C. (1989). Histogenesis of neoformation in the endocrine pancreas of aging horses. *Vet. Pathol.* 26, 40–46.

GALAS S, CHATEAU M-T, POMIES P, WANG J, MENARDO J, PUEL J-L *et al.* (2012). The diversity of aging models. *Médecine Sci. MS* 28, 297–304.

GREAVES P. (2011). *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies, Fourth Edition: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation* (Amsterdam u.a.: Academic Press).

GUIGNARD J. (2009). Effets de la restriction calorique chronique, ou d'un mimétique, sur les performances cognitives chez un primate non humain, *Microcebus murinus*. Thèse Méd. Vét, Alfort, 103p.

HASCHEK WM, ROUSSEAU CG, WALLIG MA. (2009). *Fundamentals of Toxicologic Pathology, Second Edition* (Amsterdam u.a.: Academic Press).

HOENIG M. (2002). Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 197, 221–229.

HYTTEL P. (2010). Development of the gastro-pulmonary system. *In* : Hyttel P., Sinowatz F., Vejlsted M. (editors). *Essentials of domestic animal embryology*. St Louis, Saunders-Elsevier, 239-242.

IDO Y, VINDIGNI A, CHANG K, STRAMM L, CHANCE R, HEATH WF *et al.* (1997). Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science* 277, 563–566.

KARGAR, C., KTORZA, A. (2008). Anatomical versus functional beta-cell mass in experimental diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 10 Suppl 4, 43–53.

LANGUILLE S, BLANC S, BLIN O, CANALE CI, DAL-PAN A, DEVAU G *et al.* (2012). The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies. *Ageing Res. Rev.* 11, 150–162.

LARSEN WJ, SCHOENWOLF GC, BLEYL S, BRAUER P, FRANCIS-WEST P, MILAIRE T. (2011). *Embryologie humaine* (Bruxelles: De Boeck).

LEAHY, J.L., BONNER-WEIR, S., WEIR, G.C. (1988). Minimal chronic hyperglycemia is a critical determinant of impaired insulin secretion after an incomplete pancreatectomy. *J. Clin. Invest.* 81, 1407–1414.

LE DOUARIN NM. (1988). On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell* 53, 169–171.

LEFORT-CORDONNIER N. (1998a). Contribution à l'étude de deux nouveaux modèles expérimentaux murins de diabète par absence d'insuline ou de son récepteur. Thèse de doctorat vétérinaire. Alfort, 125p.

LEFORT-CORDONNIER N. (1998b). Etude des répercussions de l'absence d'insuline ou de son récepteur au cours du développement embryonnaire et périnatal chez la souris. Thèse de doctorat en physiologie de développement et de la différenciation fonctionnelle de l'Université Paris VII, Paris, 221p.

LEFORT-CORDONNIER N. (2015). Techniques en anatomo-cytopathologie et en hématologie vétérinaire. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'embryologie, d'histologie et d'anatomie pathologique vétérinaires, 23p.

LI F, GONG Q, DONG H, SHI J. (2012). Resveratrol, a neuroprotective supplement for Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 18, 27–33.

MARCHAL J, PERRET M, AUJARD F. (2012a). Caloric restriction in primates: how efficient as an anti-aging approach?. *Médecine Sci.* MS 28, 1081–1086.

MARCHAL J, BLANC S, EPELBAUM J, AUJARD F, PIFFERI F. (2012b). Effects of chronic calorie restriction or dietary resveratrol supplementation on insulin sensitivity markers in a primate, *Microcebus murinus*. *PLoS One* 7, e34289.

MILBURN, J.L., HIROSE, H., LEE, Y.H., NAGASAWA, Y., OGAWA, A., OHNEDA, M. *et al.* (1995). Pancreatic beta-cells in obesity. Evidence for induction of functional, morphologic, and metabolic abnormalities by increased long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 270, 1295–1299.

MOORE CX, COOPER GJ. (1991). Co-secretion of amylin and insulin from cultured islet beta-cells: modulation by nutrient secretagogues, islet hormones and hypoglycemic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 1–9.

NELSON, R.W., REUSCH, C.E. (2014). Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *J. Endocrinol.* 222, T1–T9.

NUGENT DA, SMITH DM, JONES HB. (2008). A review of islet of Langerhans degeneration in rodent models of type 2 diabetes. *Toxicol. Pathol.* 36, 529–551.

O'BRIEN TD, BUTLER PC, WESTERMARK P, JOHNSON KH. (1993). Islet amyloid polypeptide: a review of its biology and potential roles in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Vet. Pathol.* 30, 317–332.

O'BRIEN TD, WAGNER JD, LITWAK KN, CARLSON CS, CEFALU WT, JORDAN K *et al.* (1996). Islet amyloid and islet amyloid polypeptide in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): an animal model of human non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Vet. Pathol.* 33, 479–485.

PEARSE AG, POLAK JM. (1971). Neural crest origin of the endocrine polypeptide (APUD) cells of the gastrointestinal tract and pancreas. *Gut* 12, 783–788.

PETROVSKI G, GURUSAMY N, DAS DK. (2011). Resveratrol in cardiovascular health and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215, 22–33.

PICTET RL, RALL LB, PHELPS P, RUTTER WJ. (1976). The neural crest and the origin of the insulin-producing and other gastrointestinal hormone-producing cells. *Science* 191, 191–192.

RAND J. (1999). Current understanding of feline diabetes: part 1, pathogenesis. *J. Feline Med. Surg.* 1, 143–153.

RICHARD T, PAWLUS AD, IGLESIAS M-L, PEDROT E, WAFFO-TEGUO P, MERILLON J-M *et al.* (2011). Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1215**, 103–108.

SCHÄFFLER L, KAPPELER PM. (2014). Distribution and Abundance of the World's Smallest Primate, *Microcebus berthae*, in Central Western Madagascar. *Int. J. Primatol.* **35**, 557–572.

SCHEEN, A.J. (2004). Pathophysiology of insulin secretion. *Ann. Endocrinol.* **65**, 29–36.

SONE, H., et KAGAWA, Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* **48**, 58–67.

SPENCER AJ, ANDREU M, GREAVES P. (1986). Neoplasia and hyperplasia of pancreatic endocrine tissue in the rat: an immunocytochemical study. *Vet. Pathol.* **23**, 11–15.

STEINER DJ, KIM A, MILLER K, HARA M. (2010). Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* **2**, 135–145.

STUART JA, PAGE MM. (2010). Plasma IGF-1 is negatively correlated with body mass in a comparison of 36 mammalian species. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 591–598.

UMR 7179 du CNRS, Mécanismes adaptatifs et évolution. *L'élevage des Microcèbes à Brunoy*. [en ligne]. (Mise à jour le 10/07/2014). [<http://mecadev.cnrs.fr/index.php?post/elevage-microcebe-Brunoy&navlang=fr>]. (Consulté le 14/04/2015).

VAN KEULEN LJ, WESDORP JL, KOOISTRA HS. (1996). Diabetes mellitus in a dog with a growth hormone-producing acidophilic adenoma of the adenohypophysis. *Vet. Pathol.* **33**, 451–453.

WEIR, G.C., BONNER-WEIR, S. (2004). Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 3**, S16–S21.

WEIR, G.C., BONNER-WEIR, S. (2013). Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1281**, 92–105.

WEIR, G.C., LAYBUTT, D.R., KANETO, H., BONNER-WEIR, S., SHARMA, A. (2001). Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S154–S159.

WIECZOREK G, POSPISCHIL A, PERENTES E. (1998). A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Für Toxikol. Pathol.* **50**, 151–172.

WIEDENMANN B, FRANKE WW, KUHN C, MOLL R, GOULD VE. (1986). Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 3500–3504.

YI SS. (2015). Effects of exercise on brain functions in diabetic animal models. *World J. Diabetes* **6**, 583–597.

ANNEXE 1

Identifiant histologique de l'animal	Surface totale pancréatique [μm^2]	Surface totale de Langerhans [μm^2]	% [surface totale en îlot de Langerhans] / [surface totale pancréatique]	Surface en cellule b [μm^2]	% [surface en cellule b/surface en îlot de Langerhans]	Surface totale en cellules a [μm^2]	% [surface en cellule a/surface en îlot de Langerhans]	% surface en cellules a) / % surface en cellules b)	Type de régime alimentaire	Age	Cause de la mort
13 0227-82 A6	1 535 092	127 283	8	90 633	71	16 959	13	0,19	Témoin	3 ans	tumeur maligne d'origine indéterminée
13 0228-94 A5	1 324 558	20 957	2	14 694	70	2 253	11	0,15	Témoin	3 ans	traumatisme
13 0973-41 A5	32 623 434	4 141 368	13	2 803 538	68	278 739	7	0,10	Témoin	3 ans	traumatisme
13 0694-91 A5	69 956 627	3 062 158	4	2 772 866	91	658 973	22	0,24	ad libitum	4 ans	insuffisante rénale chronique
13 0969-93 A5	14 902 415	391 520	3	380 620	97	90 477	23	0,24	RC	4 ans	anomalie cardiaque
13 0702-87 A5	10 213 384	2 263 027	22	1 848 817	82	110 075	5	0,06	resvératrol	5 ans	insuffisante rénale chronique
13 0700-63 A5	22 534 105	4 386 411	19	4 048 110	92	770 613	18	0,19	ad libitum	5 ans	insuffisante rénale chronique
13 0976-77 A4	18 709 783	1 373 959	7	968 043	70	274 511	20	0,28	RC	5 ans	anomalie cardiaque
13 0692-67 A5	25 667 782	2 136 054	8	2 104 979	99	737 048	35	0,35	ad libitum	6 ans	insuffisante rénale chronique
13 0695-03 A5	47 111 428	9 142 572	19	7 690 415	84	342 083	4	0,04	resvératrol	6 ans	insuffisante rénale chronique
13 0696-15 A5	67 699 025	37 296 729	55	25 256 662	68	748 513	2	0,03	resvératrol	6 ans	insuffisante rénale chronique
13 0974-53 A5	10 283 276	608 219	6	469 669	77	135 986	22	0,29	ad libitum	6 ans	lymphome multicentrique
13 0975-65 A5		Surfaces non mesurables : association d'une hyperplasie des îlots de Langerhans avec un insulino									
13 0977-89 A5	10 393 743	777 348	7	507 977	65	182 059,72	23	0,36	ad libitum	6 ans	insulino
13 0684-70 A5	16 278 211	3 338 059	21	2 458 036	74	767 447	23	0,31	resvératrol	6 ans	insuffisante rénale chronique
13 0687-07 A5	57 822 385	6 660 805	12	5 909 932	89	973 028	15	0,16	RC	7 ans	problème d'anesthésie
13 0701-75 A5	31 151 623	3 049 221	10	1 662 816	55	316 848	10	0,19	resvératrol	8 ans	insuffisante rénale chronique
13 0697-27 A5	31 534 769	3 630 418	12	2 996 896	83	826 811	23	0,28	RC	8,5 ans	traumatisme
13 0686-94 A5	19 386 225	2 516 035	13	2 314 998	92	410 292	16	0,18	ad libitum	9 ans	insuffisante rénale chronique

RC: restriction calorique

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES LÉSIONS D'HYPERPLASIE DU PANCRÉAS ENDOCRINE CHEZ UNE COLONIE DE MICROCÈBES (*Microcebus murinus*)

HURION Murielle

Résumé

Microcebus murinus est un primate apparenté aux Lémuriens. Sa proximité phylogénique avec l'Homme, sa relative courte durée de vie et sa facilité d'élevage en font un modèle animal de choix dans l'étude des maladies liées à l'âge chez l'Homme.

Le diabète sucré de type 2 est une maladie multifactorielle observée chez l'Homme adulte vieillissant. De nombreux facteurs environnementaux comme l'obésité favorisent son apparition. Une hyperplasie fonctionnelle des cellules β est présente dans la phase pré-diabétique, en réponse à la mise en place d'un état insulino-résistant de l'individu.

L'étude expérimentale a porté sur 19 pancréas de Microcèbes issus d'une étude du CNRS testant les effets à long terme de la restriction calorique ou d'une molécule mimant la restriction calorique, le resvératrol. Les Microcèbes étaient répartis en fonction de l'âge et du type de régime alimentaire suivi : *ad libitum*, restriction calorique ou resvératrol.

La morphologie et la présence ou non d'une hyperplasie des îlots de Langerhans ont été observées sur les sections colorées à l'hémalun-éosine-safran. Une analyse morphométrique a été faite sur les sections immunomarquées avec des anticorps anti-insuline et anti-glucagon. Elle a permis une quantification objective des lésions d'hyperplasie des îlots de Langerhans et de la proportion des cellules α et β .

Contrairement aux autres primates, dont l'Homme, chez le Microcèbe, les cellules α formaient un cercle discontinu externe et les cellules β étaient diffusément réparties sur toute la surface des îlots de Langerhans.

Des lésions d'hyperplasie du pancréas endocrine étaient observées chez les Microcèbes adultes matures à vieillissants et expliquées par une prolifération des cellules β .

La restriction calorique semblait limiter l'apparition des lésions d'hyperplasie des îlots de Langerhans, pouvant être le signe d'un effet protecteur contre une insulino-résistance. La prise de resvératrol ne semblait pas limiter le développement de lésions d'hyperplasie du pancréas endocrine.

Mots clés : HYPERPLASIE ; PANCRÉAS ENDOCRINE ; DIABÈTE SUCRÉ ;
MICROCEBUS MURINUS ; RESVÉRATROL ; RESTRICTION CALORIQUE

Jury :

Président : Pr

Directeur : Dr Nathalie Cordonnier

Assesseur : Dr Fanny Storck

EXPERIMENTAL STUDY ON HYPERPLASTIC LESIONS OF THE PANCREATIC ENDOCRINE IN A GRAY MOUSE LEMUR COLONY (*Microcebus murinus*)

HURION Murielle

Abstract

Microcebus murinus (gray mouse lemur) is a primate related to lemurs. Its phylogenetic proximity with Humans, its relatively short lifespan and the ease of its breeding make him a suitable animal model for the study of aging-associated diseases in Humans.

Type 2 mellitus diabetes is a complex disease observed in aging Humans. Several environmental factors such as obesity promote its development. A functional hyperplasia of the β cells is present in the pre-diabetes phase, corresponding to the establishment of an insulin resistance state.

This experimental study comprised the examination of 19 pancreases of gray mouse lemurs issued from a study of the CNRS testing the long term effects of caloric restriction or a mimetic of caloric restriction called resveratrol. The gray mouse lemurs were grouped by age and type of diet: *ad libitum*, caloric restriction or resveratrol.

We observed the morphology and the presence or absence of hyperplasia in the islets of Langerhans on the sections stained with hematoxylin-eosin-saffron. A morphometric analysis was carried out on immunolabeled sections with anti-insulin and anti-glucagon antibodies. It permitted an objective quantification of hyperplastic lesions in the islets of Langerhans and of proliferation of the α and β cells.

On the contrary to the other primates, including Humans, in the gray mouse lemurs, the α cells formed a discontinuous outer circle and the β cells were widespread across the whole surface of the islets of Langerhans.

The hyperplastic lesions of the endocrine pancreas were observed in adult animals that are older than 4 years and were due to the proliferation of the β cells. It appeared that the caloric restriction limited the onset of hyperplastic lesions in the islets of Langerhans, which could be the sign of a protective effect against the insulinoreistance state. The intake of resveratrol did not appear to limit the development of hyperplastic lesions of the endocrine pancreas.

Keywords: HYPERPLASIA ; ENDOCRINE PANCREAS ; MELLITUS DIABETES ;
MICROCEBUS MURINUS ; RESVERATROL ; CALORIC RESTRICTION

Jury :

Président : Pr

Directeur : Dr Nathalie Cordonnier

Assesseur : Dr Fanny Storck