

Introduction

De nombreuses études montrent une **adaptation de la masse de cellules bêta** en réponse à l'**insulinorésistance** (Homme et modèles murins) mais les mécanismes et les signaux impliqués dans ce processus restent inconnus. Dans un **modèle murin d'insulinorésistance sévère** induite par la corticostérone, nous avons montré la mise en place d'une **adaptation pancréatique** caractérisée par la **formation de nouvelles cellules bêta** ou **néogenèse**. Une technique de **quantification classique** par immunomarquage sur coupes de pancréas met en évidence l'augmentation du nombre et de la taille des îlots de Langerhans après 4 semaines de traitement (Fig.1). Néanmoins, cette méthode présente plusieurs **limites** (échantillonnage des coupes ; événements invisibles en 2D ; biais liés au plan de coupe des îlots). Enfin, cette méthode ne permet d'avoir qu'une estimation de la **quantité totale** des cellules bêta pancréatiques.

Objectifs :

Notre objectif est de quantifier le **nombre total de cellules bêta** et d'**îlots de Langerhans**, avec une **analyse non biaisée de la taille** et de la **distribution spatiale** des objets dans l'ensemble du pancréas. Pour cela, nous avons développé un protocole de marquage et de **transparisation** de pancréas de souris permettant une **analyse en 3D** de l'**organisation spatiale** des différentes populations cellulaires pancréatiques.

Modèle murin d'insulinorésistance sévère et méthodes d'analyse

L'insulinorésistance a été induite par un traitement à la **corticostérone (CORT ; 15mg/kg/j)** de 4 semaines chez des souris C57BL6/J âgées de 2 mois ; les souris contrôles sont notées **VEH**.
 Les pancréas entiers ont été prélevés pour réaliser une analyse en 2 ou 3 dimensions.
Analyse 2D : anticorps anti-insuline de souris (Sigma I2018) ; anticorps anti-souris couplé HRP (Jackson ImmunoResearch) révélée par le DAB+ (Dako) ; analyse des lames sélectionnées avec le système de microscope Leica DMRB équipé d'une caméra couleur couplée au logiciel de mesure Leica Q500IW
Analyse 3D : anticorps anti-chromogranine A de lapin (Abcam ab45179) ; anticorps anti-souris couplé Alexa 750 (Life Technologies A21037) ; anticorps anti-lapin couplé Alexa 546 (Invitrogen A10040) ; acquisitions réalisées avec un microscope à feuille de lumière Lavisoin Biotech UltraMicroscope II et reconstruction 3D avec le logiciel ARIVIS en collaboration avec Julien FERNANDES et Dmitri ERSHOV de l'Institut Pasteur

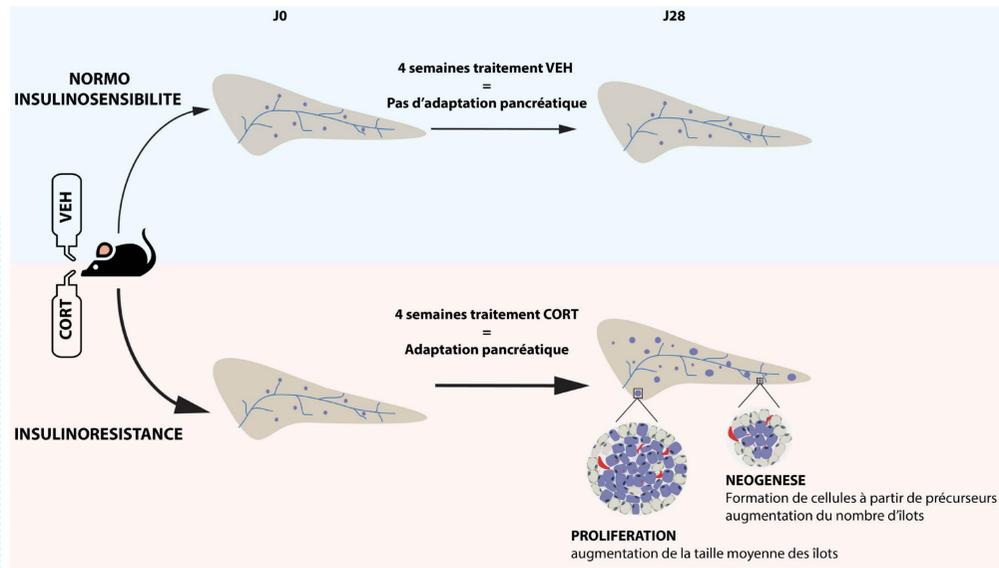


Fig.1: Adaptation pancréatique en réponse à l'insulinorésistance sévère cortico-induite

Analyse morphométrique en 2D : quantification de la néogenèse et de la prolifération

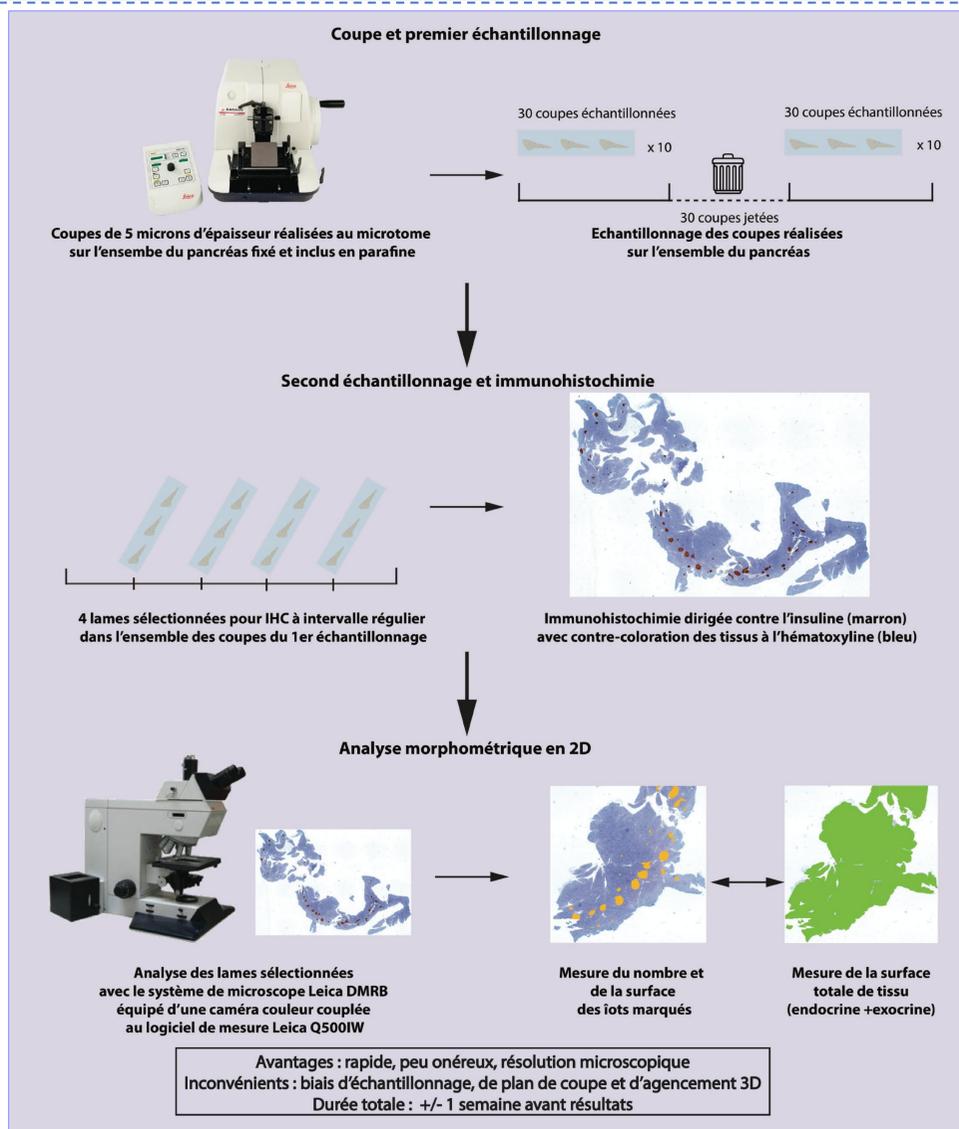


Fig.2 : Protocole de quantification classique par immunomarquage en 2D

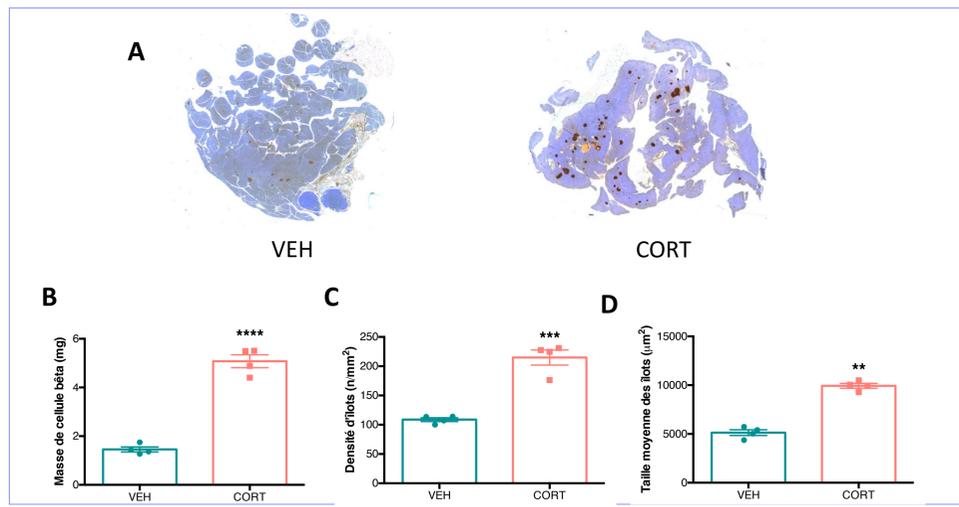


Fig.3 : Un traitement CORT de 4 semaine entraîne une augmentation de la **masse de cellules bêta** (A) ; B) résultant d'une augmentation de la **densité d'îlots** (C), reflet de la **néogenèse** des cellules bêta, ainsi que de la **taille moyenne des îlots** (D), reflet de la **prolifération** des cellules bêta.

Transparisation et analyse morphométrique en 3D : application au pancréas

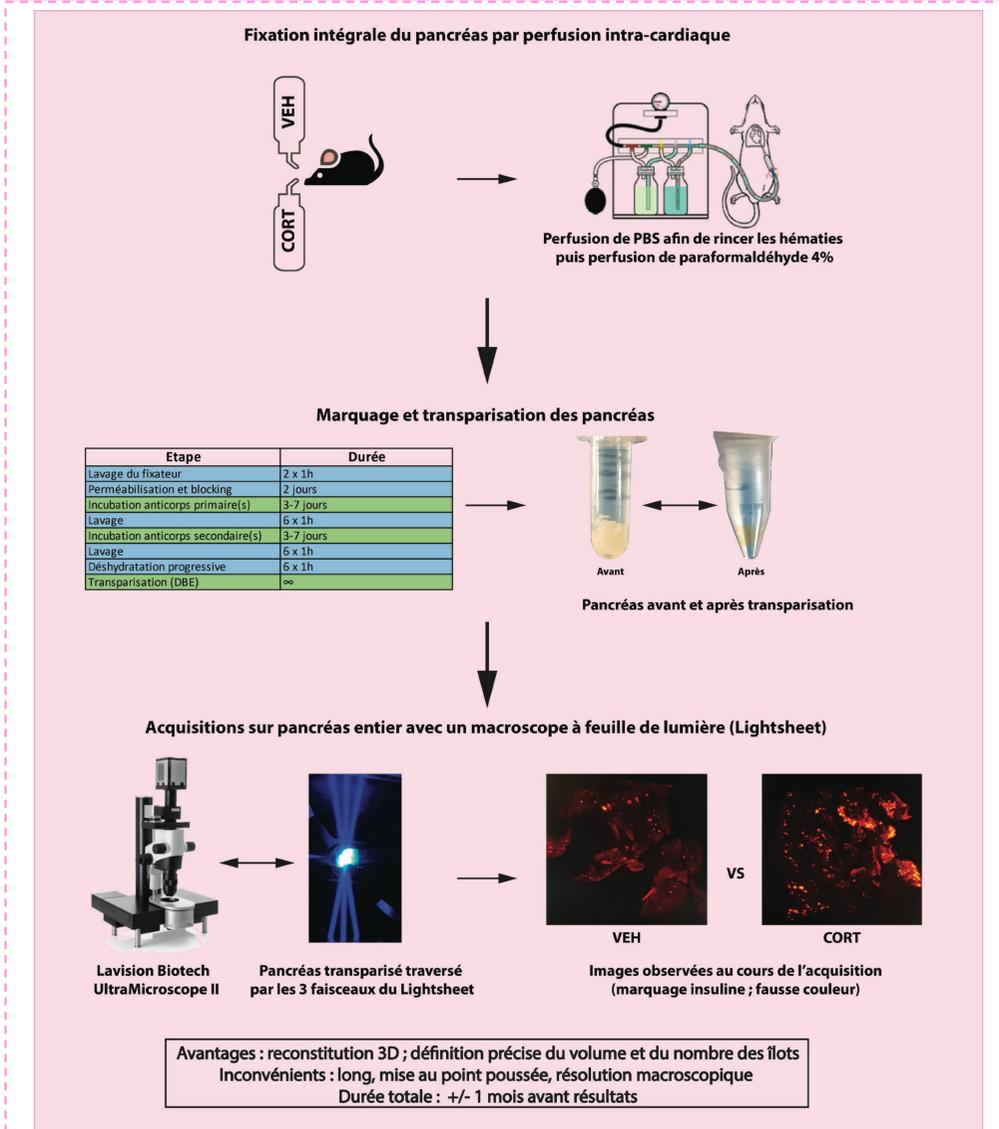


Fig.4 : Protocole d'immunomarquage et transparisation sur pancréas entier pour analyse en 3D

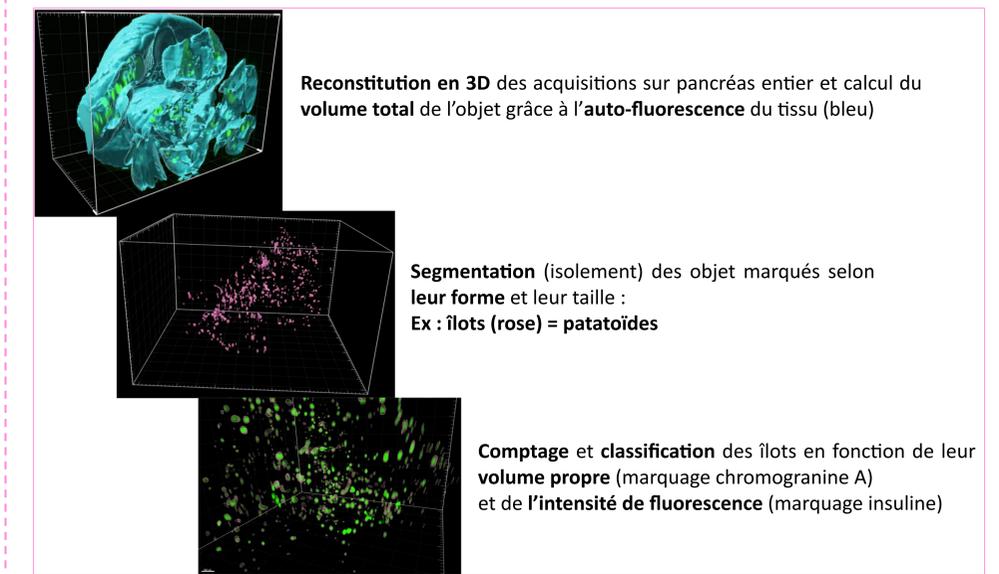


Fig.5 : Démarche de quantification et de classification des îlots de Langerhans en 3D sur pancréas entier

Conclusion

Nous avons validé notre technique d'**immunomarquage** et de **transparisation** pour la quantification du **nombre total d'îlots de Langerhans sur pancréas entier**. Les premières analyses révèlent une **quantification plus précise** ainsi qu'une **meilleure résolution et sensibilité** que l'étude en 2D.

Cette nouvelle technique, constituant une **avancée technologique majeure** dans l'analyse morphologique pancréatique, permet une quantification fiable du **nombre**, de la **taille** et de la **distribution spatiale** des îlots au sein du pancréas dans notre modèle ainsi qu'une meilleure compréhension de la **dynamique adaptative des cellules bêta pancréatiques**.

Les prochaines analyses permettront de déterminer s'il existe des corrélations du type intensité de fluorescence/volume de l'objet ou dans la distance entre les canaux (réservoir présumé des précurseurs pancréatiques) et les îlots néoformés. Cette technique peut également être **adaptée à l'étude d'autres organes endocrines** contenant de multiples types cellulaires tels que les surrénales ou la thyroïde.