THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche : Institut des Biomolécules Max Mousseron

Activité et mécanisme d'action d'analogues de la quercétine sur la fonctionnalité des cellules β pancréatiques

Présentée par Guillaume GAUTHERON

Le 16 novembre 2021

Sous la direction de Catherine OIRY-CUQ

Devant le jury composé de

M. Jean-François QUIGNARD, Professeur des Universités, Université de Bordeaux	Président du Jury
M. Dominique DELMAS, Professeur des Universités, Université de Bourgogne	Membre du Jury
Mme. Magalie RAVIER, Chargé de Recherche, IGF Montpellier	Membre du Jury
Mme. Béatrice CHABI, Chargé de Recherche, INRAE Montpellier	Membre du Jury
M. Jérémie NEASTA, Maître de Conférences des Universités, Université de Montpellier	Membre du Jury
Mme. Catherine OIRY-CUQ, Professeur des Universités, Université de Montpellier	Directeur de thèse
Mme. Valérie SCHINI-KERTH, Professeur des Universités, Université de Strasbourg	Rapporteur
M. Pierre-Louis TEISSEDRE, Professeur des Universités, Université de Bordeaux	Rapporteur

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe F13 – Pharmacologie Cellulaire, de l'Institut de Biomolécules Max Mousseron (IBMM) sous la direction de Catherine OIRY-CUQ, à qui je témoigne toute ma gratitude pour son accueil au sein du laboratoire. Merci pour votre bienveillance, votre disponibilité, votre implication et vos conseils avisés. Je souhaite aussi remercier Jérémie NEASTA qui a co-encadré cette thèse. Merci pour votre écoute, vos conseils, vos encouragements et votre soutien.

Je remercie Valérie SCHINI-KERTH et Pierre-Louis TEISSEDRE de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Magalie RAVIER, Béatrice CHABI, Dominique DELMAS et Jean-François QUIGNARD de m'avoir fait l'honneur d'accepter de siéger au sein de ce jury de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon plus grand respect et de ma plus profonde gratitude.

Je remercie Anne VIRSOLVY et Gyslaine BERTRAND d'avoir veillé au bon déroulement de cette thèse en participant à mes comités de suivi de thèse.

Je souhaite également témoigner un grand merci à Béatrice CHABI, Anne VIRSOLVY, Jean-François QUIGNARD et Michel VIGNES pour leur collaboration dans ce travail de thèse, ainsi que pour leur disponibilité.

J'adresse aussi un grand merci à Gérard CROS, Richard MAGOUS, Sylvie PERALDI-ROUX, Morgane BAYLE, Justine VAILLE, Fadi AZAR, Joseph ETOUNDI, Cédric WEIBEL, Audrey SCHLERNITZAUER, Lyne-Rose POUDROUX et Estelle YOUL pour m'avoir si bien accueilli au laboratoire de Pharmacologie de l'UFR de Pharmacie de Montpellier.

Je remercie également ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenu et accompagné tout au long de mon parcours.

Sommaire

Remerciements....1
Sommaire....2
Liste des illustrations....4
Liste des tableaux....8
Liste des abréviations....9
Introduction....10
Partie bibliographique....14
1 La cellule β pancréatique....15
1.1 Anatomie, histologie et fonctions du pancréas....15
1.2 Structure, synthèse et effets physiologiques de l'insuline....17
1.3 Sécrétion d'insuline....21
1.3.1 Sécrétion d'insuline induite par le glucose....21
1.3.1.1 Glycolyse et devenir du pyruvate....21
1.3.1.2 Le cycle de Krebs....23
1.3.1.3 La chaîne des phosphorylations oxydatives mitochondriale....25
1.3.1.4 Les canaux potassiques ATP dépendants....26
1.3.1.5 Les canaux calciques voltage dépendants....27
1.3.1.6 Rôle du calcium intracellulaire....30
1.3.1.7 Exocytose des granules de sécrétion....31
1.3.2 Régulation de la sécrétion d'insuline....34
2 Le diabète de type 2....47
2.1 Définition et épidémiologie....47
2.2 Facteurs de risques....48
2.3 Physiopathologie....49
2.3.1 Evolution de la maladie....49
2.3.2 Résistance à l'insuline des tissus périphériques....51
2.3.3 Défaut de sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques....52
2.4 Signes cliniques et complications....60
2.5 Prise en charge....63
2.5.1 Objectifs thérapeutiques....63
2.5.2 Mesures hygiéno-diététiques....64
2.5.3 Traitements médicamenteux existants....66
2.5.4 Nouvelles approches thérapeutiques médicamenteuses....73
2.6 Modèles expérimentaux....75
2.6.1 Modèles *in vitro* et *ex vivo*....75
2.6.2 Modèles animaux (*in vivo*)....78
3 Les flavonoïdes....81
3.1 Structures et classification des polyphénols....81
3.2 Effets des flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline et la protection des cellules β pancréatiques....85
3.3 Effets des flavonoïdes sur les canaux calciques voltage dépendants....89
3.4 Effets des flavonoïdes sur les fonctions mitochondriales....93

Partie expérimentale 97
I. Introduction 98
II. Matériels et méthodes 103
a - Culture des cellules INS-1 103
b - Test de sécrétion d'insuline par les cellules INS-1 103
c - Isolement d'ilots pancréatiques de rats et test de sécrétion d'insuline....104
d - Dosage de la concentration d'insuline 104
e - Dosage des protéines par la méthode Bradford 106
f - Enregistrement des courants calciques dans les cellules INS-1....106
g - Mesure de l'activité de la succinate déshydrogénase....107
h - Mesure de la respiration mitochondriale dans les cellules INS-1 107
i - Dosage de la concentration d'ATP produite par les cellules INS-1 109
j - Western Blot 110
k - Mesure de la capacité antioxydante des flavonoïdes 110
l - Analyses statistiques 112
m - Matériels....112
III. Résultats et discussion 115
III.1 Screening de flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline 115
III.2 Evaluation d'une toxicité potentielle des flavonoïdes dans les cellules INS-1 120
III.3 Mécanismes d'action des flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline dans les cellules INS-1 121
III.3.1 Effet des flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline induite par différents types de sécrétagogues 121
III.3.2 Implication des Ca_V dans le mécanisme d'action du résokaempférol....127
III.3.3 Implication de la mitochondrie le mécanisme d'action de la galangine....130
III.3.4 Implication de ERK 1/2 dans le mécanisme d'action du résokaempférol, de la morine et de la galangine 144
III.4 Protection des cellules INS-1 par le résokaempférol, la morine et la galangine ..147
III.5 Etude de relations structure activité des flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline 151
Conclusion générale....157
Bibliographie 162
Valorisation scientifique....179

Liste des illustrations

Figure 1 : Anatomie et structure du pancréas 16

Figure 2 : Innervation des îlots de Langerhans 17

Figure 3 : Structures de la pro-insuline et de l'insuline 18

Figure 4 : Transport et maturation intracellulaires de l'insuline 19

Figure 5 : Représentation schématique de la glycolyse 22

Figure 6 : Cycle de Krebs et chaîne des phosphorylations oxydatives mitochondriale 24

Figure 7 : Représentation du canal potassique ATP dépendant 27

Figure 8 : Représentation d'un canal calcique voltage dépendant de muscle squelettique 28

Figure 9 : Expression relative des gènes codants pour les sous-unités α_1 des Ca_V chez la souris et chez l'Homme dans la cellule β pancréatique 29

Figure 10 : Mécanismes d'exocytose des vésicules contenant l'insuline 32

Figure 11 : Profil biphasique de l'insuline sécrétée en fonction du temps, en réponse au glucose (A) et représentation de l'exocytose des différents pools de vésicules d'insuline (B) 33

Figure 12 : Principales voies de régulation de la sécrétion d'insuline 36

Figure 13 : Régulation de la sécrétion d'insuline par le système nerveux autonome 38

Figure 14 : Mécanisme d'action du GLP-1 sur la cellule β 39

Figure 15 : Mécanismes d'action extracellulaires (A) et intracellulaires (B) du glutamate dans la régulation de la sécrétion d'insuline 42

Figure 16 : Régulation paracrine de la cellule β pancréatique 44

Figure 17 : Profils de sécrétion de l'insuline, du glucagon et de la somatostatine en fonction de la glycémie 45

Figure 18 : Régulation paracrine dans les îlots de Langerhans 46

Figure 19 : Résistance à l'insuline et dysfonction des cellules β pendant le développement et la progression de l'hyperglycémie au cours du diabète de type 2 50

Figure 20 : Mécanismes impliqués dans la résistance à l'insuline 52

Figure 21 : Principales altérations observées lors de la dysfonction des cellules β au cours du diabète de type 2 53

Figure 22 : Régulation de la cellule β pancréatique par les macrophages 55

Figure 23 : Sources de ROS et leurs métabolismes dans la cellule β 56

Figure 24 : Mécanismes simplifiés du développement du stress du réticulum endoplasmique 57

Figure 25 : Implication d'UCP-2 dans la dysfonction mitochondriale des cellules β (A) et sa régulation (B) au cours du diabète de type 2 58

Figure 26 : Principales complications du diabète 61

Figure 27 : Mécanismes d'action des médicaments utilisés dans le traitement du diabète de type 2 .. 67

Figure 28 : Profils d'action hypoglycémiante des différents type d'insuline en fonction du temps 70

Figure 29 : Arbre décisionnel résumant la prise de position de la SFD dans la prise en charge du diabète de type 2 71

Figure 30 : Effets du glucose et de divers sécrétagogues sur la sécrétion d'insuline par les lignées cellulaires BRIN-BD11, HIT-T15, RINm5F et INS-1 76

Figure 31 : Principaux avantages et inconvénients des différentes classes de modèles animaux utilisés dans la recherche sur le diabète de type 2 79

Figure 32 : Mécanisme d'action de la streptozotocine induisant le diabète chez le rat (A) et représentation schématique de l'effet toxique de l'alloxane et de la streptozotocine dans les cellules β pancréatiques (B) 80

Figure 33 : Structures générales des principaux flavonoïdes (A) et des groupes mineurs (B) 82

Figure 34 : Exemples de composés polyphénoliques non flavonoïdes 85

Figure 35 : Positions des groupements hydroxyles et leurs effets sur la modulation des canaux $Ca_V1.2$ de cellules de muscles lisses vasculaires par les flavonoïdes 90

Figure 36 : Géométrie spatiale de quelques flavonoïdes et sites d'interaction des groupements hydroxyles avec la sous-unité α_{1C} des $Ca_V1.2$ 91

Figure 37 : Effets potentiels des flavonoïdes sur la mitochondrie 95

Figure 38 : Mécanisme d'action hypothétique de la quercétine sur la cellule β 100

Figure 39 : Effet de différents flavonoïdes sur la modulation des courants calciques sur un modèle de cellules musculaires lisses vasculaires 101

Figure 40 : Principe du dosage de l'insuline par la technique HTRF (CisBio) 105

Figure 41 : Oxygraphe Oroboros-O2k (A) et représentation schématique des effets des inhibiteurs et découplant de la chaîne OXPHOS mitochondriale sur la consommation d'oxygène (B) avec leur mécanisme d'action (C) 108

Figure 42 : Principe de l'évaluation de la capacité antioxydante d'un composé par la méthode ORAC 111

Figure 43 : Effets de la quercétine (A), du resvératrol (B) et de la NAC (N-acétyl-L-cystéine) (C) sur la sécrétion d'insuline dans des cellules INS-1 115

Figure 44 : Effets de concentrations croissantes de résokaempférol, de kaempférol, d'apigénine, de chrysine, de morine et de galangine sur la sécrétion d'insuline en condition basale (A) ou stimulante de glucose (B) dans des cellules INS-1 117

Figure 45 : Structures chimiques du résokaempférol, de la morine et de la galangine 118

Figure 46 : Effets du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur la sécrétion d'insuline sur le modèle des îlots de Langerhans isolés chez le rat en condition basale (2,8 mmol.L^{-1}) ou stimulante (8,3 mmol.L^{-1}) de glucose 119

Figure 47 : Concentration de protéines après 1h d'incubation des cellules INS-1 en présence de galangine, de résokaempférol ou de morine.....120

Figure 48 : Voies d'activation simplifiées de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, le pyruvate, la leucine, le méthylsuccinate, le glibenclamide et le bay K8644 dans des cellules INS-1 122

Figure 49 : Effet-concentration du pyruvate (A), de la leucine (B), du méthylsuccinate (C) et du bay K8644 (D) sur la sécrétion d'insuline en comparaison avec le glucose (8,3 mmol.L^{-1}) dans des cellules INS-1.....123

Figure 50 : Effets du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur la sécrétion d'insuline basale (A) ou induite par le glucose (B), le pyruvate (C), la leucine (D), le méthylsuccinate (E), le glibenclamide (F) ou le bay K8644 (G) dans des cellules INS-1 125

Figure 51 : Effet de la morine (100 µmol.L^{-1}) sur la sécrétion d'insuline en présence de 8,3 mmol.L^{-1} glucose et de résokaempférol (20 µmol.L^{-1}) ou de galangine (20 µmol.L^{-1}) dans des cellules INS-1....126

Figure 52 : Effets de concentrations croissantes de résokaempférol sur les courants calciques enregistrés à -10 mV (A) et effets de 20 µmol.L^{-1} de résokaempférol sur la relation intensité du courant / potentiel (I/V) des courants calciques de type L (B) dans des cellules INS-1.....128

Figure 53 : Effets de la nifédipine (A) et du vérapamil (B) sur la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le résokaempférol en présence de 8,3 mmol.L^{-1} glucose dans des cellules INS-1 129

Figure 54 : Effets du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur l'activité de la succinate déshydrogénase des cellules INS-1 131

Figure 55 : Effets de la galangine sur les différents états de respiration dans des cellules INS-1 133

Figure 56 : Effets de la galangine sur les différents états de respiration dans des cellules C2C12.....135

Figure 57 : Effets du résokaempférol sur les différents états de respiration dans des cellules INS-1 ..136

Figure 58 : Effets de la morine sur les différents états de respiration dans des cellules INS-1.....137

Figure 59 : Structure chimique du CCCP sous sa forme neutre protonée ou anionique (A), et son mécanisme d'action découplant (B).....138

Figure 60 : Hypothèse de mécanisme d'action découplant de certains polyphénols.....139

Figure 61 : Effet-concentration du CCCP sur la sécrétion d'insuline en comparaison avec la galangine (20 µmol.L^{-1}), en présence de 8,3 mmol.L^{-1} de glucose dans des cellules INS-1.....140

Figure 62 : Effet-concentration du CCCP sur la sécrétion d'insuline induite par le glibenclamide (10 nmol.L^{-1}) en présence de 1,4 mmol.L^{-1} de glucose dans des cellules INS-1.....141

Figure 63 : Effets de la galangine (20 µmol.L^{-1}) et du CCCP (0,4 µmol.L^{-1}) sur la concentration d'ATP en présence de 8,3 mmol.L^{-1} de glucose dans des cellules INS-1.....142

Figure 64 : Effets du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur la phosphorylation de ERK 1/2 dans des cellules INS-1, après 1h de traitement (A) et expérience type de western blot correspondante (B).....145

Figure 65 : Effet du PD0325901 sur la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le résokaempférol en présence de glucose 8,3 mmol.L^{-1} dans des cellules INS-1.....146

Figure 66 : Concentration-réponse du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur la sécrétion d'insuline en condition de stress oxydant induit par 60 µmol.L^{-1} de H_2O_2 et en présence de 8,3 mmol.L^{-1} de glucose dans des cellules INS-1.....148

Figure 67 : Indice ORAC de la quercétine, du résokaempférol, de la morine et de la galangine.....149

Figure 68 : Concentration-réponse du résokaempférol sur la phosphorylation de ERK 1/2 dans des cellules INS-1 en condition de stress oxydant induit par 60 µmol.L^{-1} de H_2O_2, après 1h de traitement, et en présence de 8,3 mmol.L^{-1} de glucose (A) et expérience type de western blot correspondante (B).150

Figure 69 : Effets des flavonoïdes (20 µmol.L^{-1}) sur la sécrétion d'insuline en condition basale (1,4 mmol.L^{-1} de glucose, A) ou en condition stimulante (8,3 mmol.L^{-1} de glucose, B) dans des cellules INS-1, avec la position des groupements hydroxyles sur les différents cycles (C) 152

Figure 70 : Histogramme des fréquences des réplicats et loi de densité de l'effet sur la stimulation de la sécrétion d'insuline des réplicats en condition stimulante de glucose (8,3 mmol.L^{-1}) 153

Figure 71 : Mécanismes d'action potentiels et simplifiés du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques 160

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différentes sous-unités α_1 des canaux calciques voltage dépendants avec les courants calciques et le gène correspondant 29

Tableau 2 : Rôle des signalisations médiées par les RCPG dans la régulation de la sécrétion d'insuline 36

Tableau 3 : Conseils nutritionnels chez le patient diabétiques de type 2.....65

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques des différentes familles d'antidiabétiques, pour aider à la décision dans le choix du traitement lorsque les mesures hygiéno-diététiques et la Metformine ne sont pas suffisants.....72

Tableau 5 : Principales lignées cellulaires dérivées de cellules de rongeurs avec leurs avantages et inconvénients, ainsi que l'estimation du nombre de publications totales et annuelles.....77

Tableau 6 : Exemples de modèles de rongeurs obèses et non obèses utilisés dans la recherche sur le diabète de type 2 80

Tableau 7 : Structures et principales sources alimentaires de divers flavonoïdes.....83

Tableau 8 : Résumé des études évaluant les effets des flavonoïdes sur les cellules β pancréatiques chez les animaux diabétiques.....87

Tableau 9 : Sources et références des principaux produits utilisés.....113

Tableau 10 : Effets de différents flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose (8,3 mmol.L^{-1}) dans des cellules INS-1 et sur les courants calciques dans des cellules vasculaires 156

Liste des abréviations

Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
AMP	Adénosine Monophosphate
AMPc	AMP cyclique
AMPK	AMP-activated protein Kinase
CaM	Calcium-modulated protein ou Calmoduline
CAMK	Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase
Ca_V	Canal Calcique Voltage Dépendant
CAT	Catalase
CREB	cAMP Responsive Element Binding protein
DAG	Diacylglycérol
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ΔΨm	Potentiel de membrane mitochondrial
DPP-4	Dipeptidyl-Peptidase-4
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FFD	Fédération Française de Diabétiques
FID	Fédération Internationnale du Diabète
GDH	Glutamate Déshydrogénase
GIP	Glucose dependent Insulinotropic Polypeptide
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GLP-1 RA	Agonistes des Récepteurs du GLP-1
GLUT	Glucose Transporter
GPx	Glutathion Peroxydase
GTP	Guanosine Triphosphate
HAS	Haute Autorité de Santé
HbA1c	Hémoglobine glyquée
IAG	Inhibiteurs des α-Glucosidases
IMC	Indice de Masse Corporelle
K_{ATP}	Canal potassique sensible à l'ATP
Kir	Inwardly-rectifying potassium channel
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCT	Monocarboxylate Transporter
NAC	N-Acétylcystéine
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OXPHOS	Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System
PDX1	Pancreatic and Duodenal Homeobox 1
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLC	Phospholipase Cβ
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RE	Reticulum Endoplasmique
ROS	Reactive Oxygen Species
SERCA	Sarcoendoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase
SGLT2	Sodium-Glucose cotransporter 2
SOD	Superoxyde Dismutase
STZ	Streptozotocine
SUR	Sulfonylurea Receptor
TCA	Cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de Krebs
UCP	Uncoupling Protein
VDCC	Voltage-Dependent Calcium Channels

Introduction

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique, c'est-à-dire une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L, soit 7 mmol/L. La prévalence du diabète est en augmentation dans le monde et génère un coût humain, social et économique important (Zheng et al., 2018). En effet, on dénombre en 2019, 463 millions de diabétiques dans le monde parmi les adultes âgés de 20 à 79 ans, soit 1 personne sur 11, et la prévalence du prédiabète en France est estimée entre 10 et 15 %. Le diabète est une pathologie grave en raison de ses complications, notamment les complications cardiovasculaires et rénales. Près de 4,2 millions de décès dans le monde en 2019 sont imputés au diabète. De plus, les dépenses mondiales de santé liées au diabète en 2019 sont estimées à 760,3 milliards USD par la Fédération Internationale du Diabète (FID, 2019).

On distingue notamment deux types de diabète : le diabète de type 1 qui résulte d'une destruction auto-immune des cellules β pancréatiques ; et le diabète de type 2 qui combine une résistance à l'insuline et un déficit de sécrétion d'insuline. L'insuline est la seule hormone hypoglycémiante. Elle est produite et sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, essentiellement en réponse à une élévation de la glycémie. Les mécanismes de sécrétion d'insuline induite par le glucose décrivent une succession d'étapes de la machinerie cellulaire indispensable comme la phosphorylation oxydative mitochondriale, la dépolarisation de la membrane plasmique et l'entrée de calcium dans la cellule. Le diabète de type 2 est précédé d'une phase de prédiabète correspondant à une diminution de la sensibilité à l'insuline, compensée par une hypersécrétion d'insuline. En fonction de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux, le stade prédiabète peut évoluer vers le stade de diabète de type 2 (Tabák et al., 2012). A ce stade, des phénomènes de gluco- et lipotoxicité, ainsi qu'une inflammation de bas grade vont contribuer à l'apparition de stress oxydant et provoquer une dysfonction et une apoptose des cellules β (Poitout and Robertson, 2008; Böni-Schnetzler and Meier, 2019). Cependant, dès le stade de prédiabète, la lipotoxicité et l'inflammation peuvent conduire à une dysfonction précoce de la cellule β (O'Neill et al., 2013; Alejandro et al., 2015). Ainsi, la cellule β joue un rôle central dans la physiopathologie du diabète de type 2. Il apparait donc intéressant d'étudier si des modulateurs pharmacologiques, comme les flavonoïdes, pourraient protéger ou restaurer la fonctionnalité des cellules β pancréatiques, dans le but de retarder l'apparition, voire de traiter le diabète de type 2.

Les flavonoïdes sont des molécules naturelles retrouvées dans de nombreux végétaux consommés par l'homme, ce qui constitue une mine de molécules très abondante et variée. Les principales sources alimentaires sont les fruits, les légumes, le vin, le thé et le café. Les flavonoïdes sont caractérisés par un noyau flavane de 15 atomes de carbone, disposés en trois cycles A, B et C

(Crozier et al., 2008; Del Rio et al., 2012). Plusieurs travaux ont révélé que certains d'entre eux seraient dotés d'activités pharmacologiques à potentiel thérapeutique et induiraient des effets bénéfiques dans de nombreuses pathologies (Williamson et al., 2018). Ces résultats sont corroborés par des études précliniques ayant démontré l'intérêt de ces molécules dans le traitement de maladies cardiovasculaires, du cancer, de troubles neurodégénératifs et du diabète (Del Rio et al., 2012; Rodriguez-Mateos et al., 2014; Dall'Asta et al., 2015; Zanotti et al., 2015). Chez l'Homme, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent que la consommation régulière de végétaux, riches en polyphénols, serait associée à un risque plus faible de développer ce type de maladies chroniques (Hartley et al., 2013; Wang et al., 2014). Ainsi, les flavonoïdes constituent une source de molécules d'origine naturelle avec un potentiel thérapeutique qui reste amplement à explorer. La quercétine est largement répandue dans le règne végétal, et par conséquent, est un des flavonoïdes les plus étudié au niveau expérimental. Il a été montré que la quercétine joue différents rôles dans l'homéostasie glucidique. Elle est impliquée dans l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose et dans la sensibilisation à l'insuline en améliorant sa captation par les tissus cibles. Elle participe également à la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Youl et al., 2010; Shi et al., 2019).

Ainsi, le diabète est une pathologie qui touche presque 10 % de la population mondiale et dont les complications peuvent être dramatiques. Les traitements existants ont pour but de normaliser la glycémie afin d'éviter les complications sans avoir d'action curative véritable. De plus, ils ne sont pas dénués d'effets indésirables (troubles digestifs, hypoglycémie, prise de poids…) et peuvent impacter la qualité de vie du patient (surveillance quotidienne de la glycémie, nécessité de la voie parentérale…). Les flavonoïdes sont des composés naturels retrouvés dans de nombreux végétaux. Leur consommation à travers l'alimentation a montré des effets bénéfiques sur de nombreuses pathologies chroniques, mais les mécanismes d'action restent pour la plupart peu ou pas connus (Williamson et al., 2018). Il est donc légitime de se demander si ces flavonoïdes sont capables d'agir sur les cellules β pancréatiques, lesquelles ont un rôle déterminant dans la physiopathologie du diabète de type 2, afin d'améliorer ou de restaurer la sécrétion d'insuline. Dans une partie bibliographique, ce travail de thèse s'appliquera à préciser les mécanismes de sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques et le contexte du diabète de type 2, avant de résumer les dernières connaissances sur les capacités des flavonoïdes à moduler la sécrétion d'insuline, l'activité des canaux calciques et les fonctions mitochondriales. Dans une seconde partie expérimentale, nous étudierons les effets des flavonoïdes sur les cellules β : tout d'abord en étudiant l'activité et le mécanisme d'action du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose ainsi que sur la protection des cellules β contre le stress oxydant. De plus, dans une dernière partie, une étude de relation

structure-activité sur la sécrétion d'insuline sera menée dans le but d'identifier les déterminants structuraux nécessaires à l'activité des flavonoïdes afin d'obtenir la molécule la plus efficace pour potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

Partie bibliographique

1 La cellule β pancréatique

1.1 Anatomie, histologie et fonctions du pancréas

Le pancréas est un organe situé en position rétro-péritonéale dans la cavité abdominale. Il est formé de quatre parties : la tête enchâssée dans le cadre duodénal est la partie la plus large ; l'isthme ou col situé en avant de la veine porte fait le lien entre la tête et le corps ; le corps de forme allongée est en position oblique en direction du haut, de la gauche et de l'arrière ; enfin la queue prolonge le pancréas dans la même direction que le corps jusqu'à la rate. **Figure 1**.

Le pancréas appartient au système digestif et au système endocrinien par ses fonctions exocrines et endocrines : il s'agit un organe amphicrine. 98 % du poids du pancréas est dédié à ses fonctions exocrines. Le pancréas exocrine est composé majoritairement de cellules acineuses formant des acini. Elles synthétisent les enzymes qui entrent dans la composition du suc pancréatique, lequel se déverse dans le duodénum pour jouer un rôle important dans la digestion des aliments. Dispersés dans le parenchyme pancréatique, les îlots de Langerhans représentent 1 à 2 % de la masse du pancréas, et forment le pancréas endocrine. **Figure 1**. Chez l'homme, on estime entre 3,2 et 14,8 millions le nombre d'îlots de Langerhans (Da Silva Xavier, 2018).

Les îlots de Langerhans sont de forme ronde ou ovoïde et composés de 50 à 3000 cellules divisées en cinq types majoritaires, classées en fonction de la principale hormone qu'elles sécrètent : les cellules α sécrétrices du glucagon dont l'action est hyperglycémiante, les cellules β sécrétrices d'insuline seule hormone hypoglycémiante, les cellules δ sécrétrices de la somatostatine qui inhibe la sécrétion de glucagon et d'insuline, les cellules PP sécrétrices du polypeptide pancréatique, et les cellules ε sécrétrices de ghréline (Wierup et al., 2014). Cependant, chaque type cellulaire possède son propre sécrétome constitué de plusieurs molécules (Da Silva Xavier, 2018; Hartig and Cox, 2020). La composition cellulaire et l'architecture des îlots diffèrent fortement selon les espèces. Chez le rongeur, les cellules β représentent 90 % des cellules de l'îlot et sont regroupées au centre. Les cellules α comptent pour 10 % des cellules, et sont situées en périphérie avec les cellules δ, moins de 10 % des cellules, et les cellules PP et ε, moins de 1 %. Chez l'Homme et les primates non humains, les cellules sont dispersées dans l'îlot, 60 % sont des cellules β, 30 % des cellules α, 5 à 10 % des cellules δ et 2 à 5 % des cellules PP, alors que les cellules ε sont les moins nombreuses (Da Silva Xavier, 2018; Folli et al., 2018). **Figure 1**. Par ailleurs, il est important de noter que les cellules β et les neurones partagent de nombreuses similitudes dans leur physiologie, leur fonction, leur développement et leur expression

génique, même si elles n'ont pas la même origine embryologique. En effet, la façon dont les cellules β stockent l'insuline, reçoivent et traitent les stimuli externes et, en réponse, libèrent de l'insuline imite presque exactement la façon dont les neurones stockent et libèrent les neurotransmetteurs (Arntfield and Kooy, 2011).

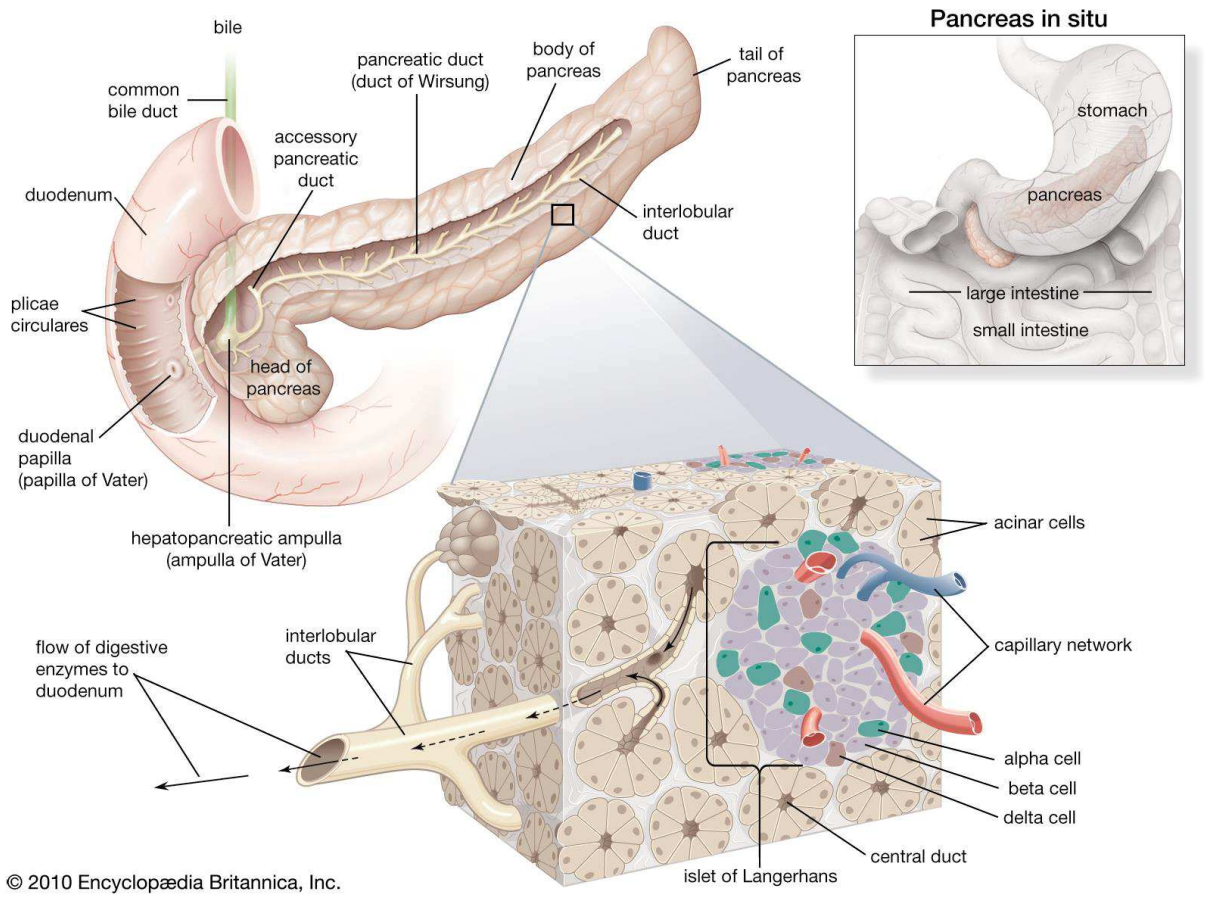


Figure 1 : Anatomie et structure du pancréas (Encyclopedia Britannica, 2010).

Les îlots de Langerhans sont richement vascularisés et innervés. Les hormones produites par chaque type cellulaire peuvent être véhiculées par le sang vers d'autres organes pour avoir une action endocrine, ou jouer un rôle local par une action autocrine et paracrine. Des fibres des systèmes nerveux sympathique et parasympathique permettent une régulation de ces sécrétions. **Figure 2**.

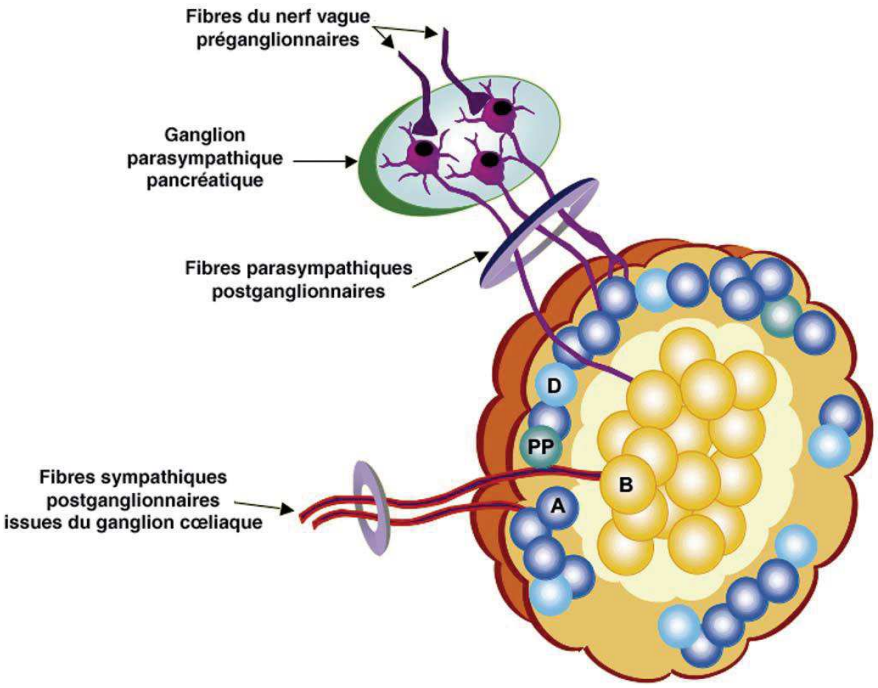


Figure 2 : Innervation des îlots de Langerhans (Magnan and Ktorza, 2005)

1.2 Structure, synthèse et effets physiologiques de l'insuline

La fonction principale des cellules β pancréatiques concerne la régulation de la glycémie à travers la synthèse et la sécrétion d'une hormone : l'insuline. L'insuline humaine est un peptide de 51 acides aminés, synthétisé et sécrété uniquement par ces cellules, les seules à exprimer le gène *INS*, localisé sur le chromosome 11p15.5. Même si chez la plupart des espèces, ce gène se trouve sous forme unique au sein du génome, le rat et la souris possèdent deux exemplaires non alléliques du gène : *Ins1* et *Ins2* sur le chromosome 1 pour le rat et sur les chromosomes 9 et 19 respectivement pour la souris (Magnan and Ktorza, 2005). L'insuline humaine est composée de deux chaînes A et B, de respectivement 21 et 30 acides aminés, reliés par deux ponts disulfures, et comprenant un troisième pont disulfure intra caténaire sur la chaîne A. **Figure 3**. Son poids moléculaire est de 5,8 kDa. Sa biosynthèse est régulée par de nombreux facteurs, même si l'augmentation de la concentration de glucose circulant en est le principal stimulateur (Poitout et al., 2006).

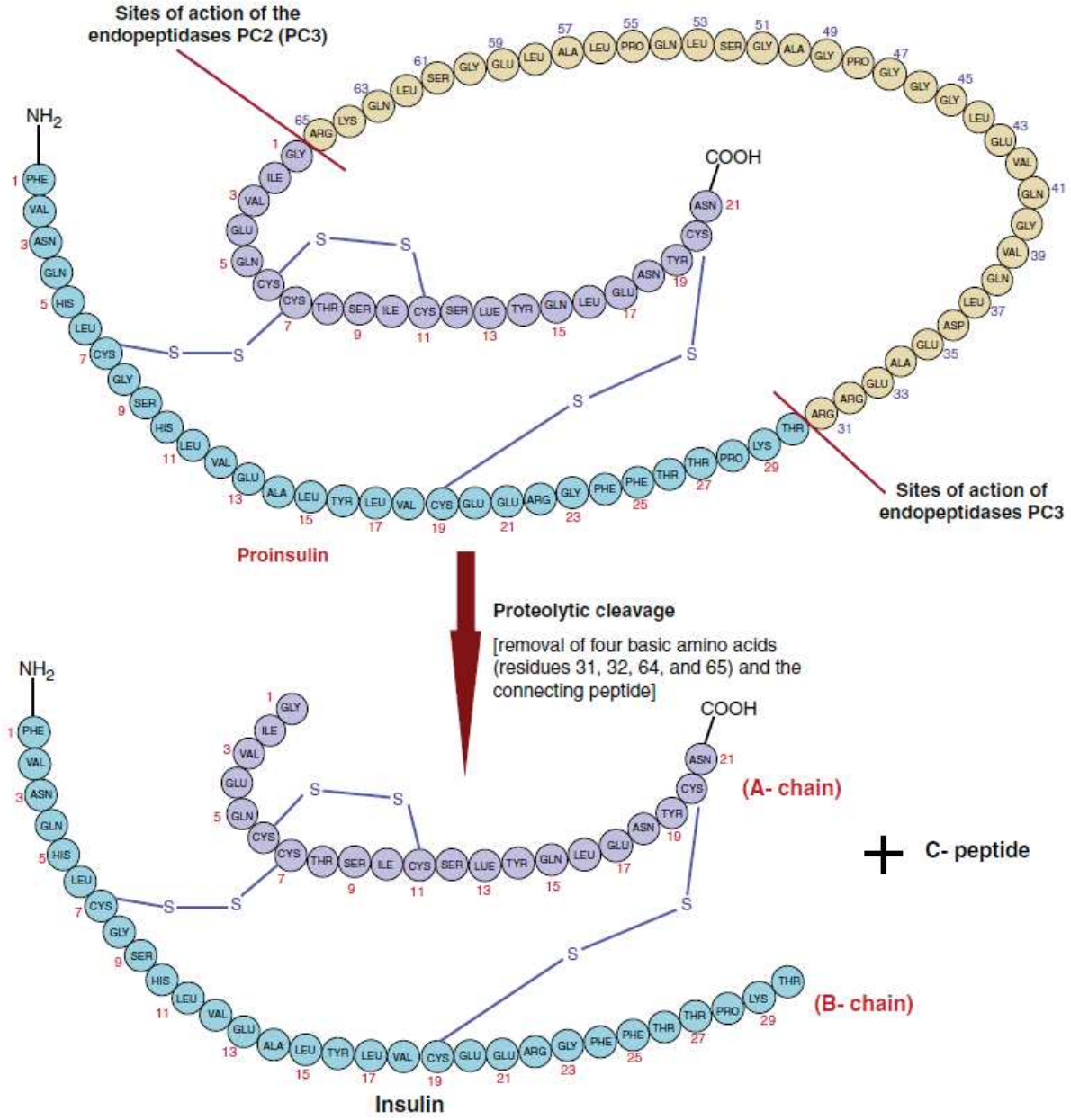


Figure 3 : Structures de la pro-insuline et de l'insuline. Les sites de clivage de la pro-insuline par les endopeptidases sont représentés par des traits rouges. Dans la pro-insuline, la chaîne A est représentée en mauve, la chaîne B en bleu, et le peptide C en jaune (Sen et al., 2016).

La transcription du gène de l'insuline conduit à la formation d'un précurseur appelé pré-pro-insuline de 110 acides aminés, dont la partie N-terminale, composée de 25 acides aminés majoritairement hydrophobes et appelée peptide signal, interagit avec le complexe SRP (*Signal Recognition Particle* ou particule de reconnaissance du signal) pour favoriser le passage de la pré-pro-insuline dans la lumière du réticulum endoplasmique. Des enzymes protéolytiques clivent alors le peptide signal pour générer la pro-insuline de 86 acides aminés. Suite à des étapes de maturation, elle est repliée et les trois ponts disulfures sont formés sous l'action de protéines chaperonnes. La pro-insuline est ensuite transportée dans l'appareil de Golgi pour donner naissance à des vésicules de sécrétions immatures. Son clivage, sur deux sites, par des endopeptidases libère l'insuline et un peptide C de 31 acides aminés, peptide de connexion initialement localisé entre les deux chaînes de l'insuline (Magnan and Ktorza, 2005; Steiner, 2008; Sen et al., 2016; Guest, 2019). **Figure 3 et Figure 4**. La vésicule devient mature et l'insuline y est contenue sous forme de cristaux hexamèriques, soit six monomères d'insuline reliés par deux atomes de zinc (Li, 2014). Ces vésicules de sécrétion fusionneront avec la membrane plasmique pour libérer l'insuline dans la circulation sanguine lorsqu'un signal approprié déclenchera l'exocytose d'insuline.

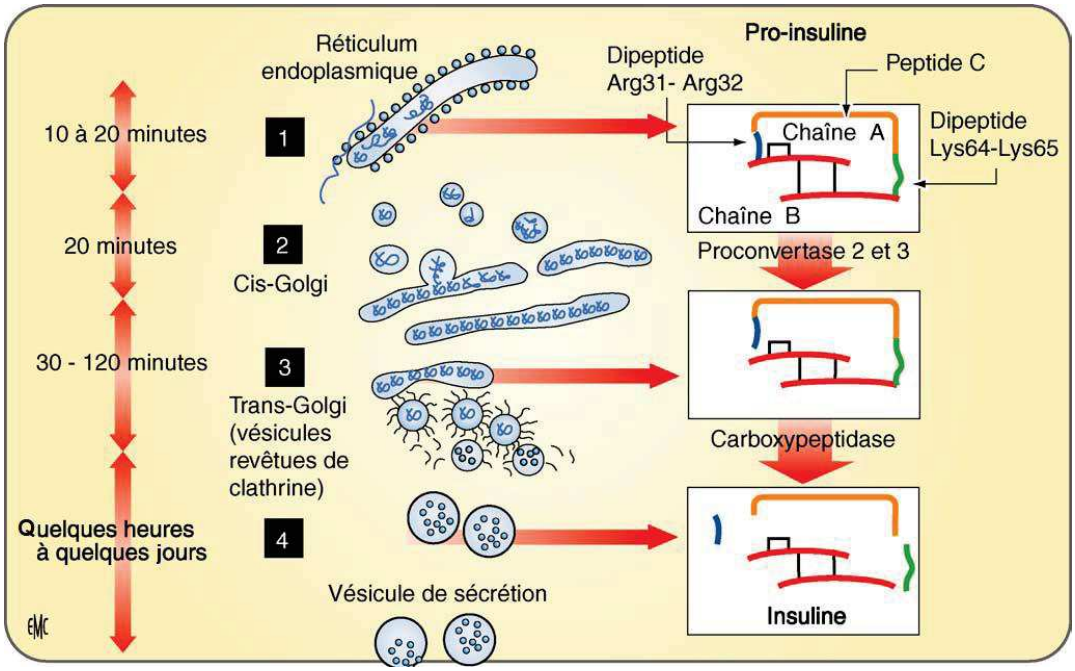


Figure 4 : Transport et maturation intracellulaires de l'insuline (Magnan and Ktorza, 2005).

L'insuline joue un rôle clé dans le métabolisme glucidique, mais pas seulement. C'est un acteur majeur pour le métabolisme dans son ensemble, en régulant le stockage ou l'utilisation des différentes sources d'énergie. En effet son action, essentiellement anabolique, intervient dans le métabolisme des glucides et des lipides, et influence aussi le métabolisme des protéines. Le récepteur de l'insuline INS-R est, par conséquent, retrouvé dans une grande majorité de tissus. Il s'agit d'un récepteur hétérotétramérique à activité tyrosine-kinase, composé de deux chaînes α extracellulaires où se lie l'insuline, et deux chaînes β transmembranaires portant l'activité tyrosine-kinase. L'activation de ce récepteur favorise une autophosphorylation de sa chaîne β, conduisant au recrutement à la membrane de plusieurs substrats. Les plus décrits appartiennent à la famille des *insulin receptor substrate* (IRS) qui comporte 6 isoformes (IRS 1-6). La liaison de l'insuline à son récepteur conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire, dont les principales sont : la voie des MAP-kinases, impliquée dans la différenciation et la prolifération cellulaire ; et la voie de la PI3-kinase qui, *via* l'activation de Akt aussi appelé PKB (protéine kinase B), dirige les actions de l'insuline sur le métabolisme (Landry and Gies, 2014; Petersen and Shulman, 2018).

L'insuline est indispensable au métabolisme glucidique car elle est la seule hormone à action hypoglycémiante. Sa liaison à son récepteur induit la translocation des transporteurs au glucose GLUT4 à la membrane plasmique des cellules musculaires et des adipocytes afin d'en augmenter la captation. Le glucose y sera dégradé par glycolyse ou stocké sous forme de glycogène (glycogénogenèse). Au niveau hépatique, l'insuline inhibe la néoglucogenèse en diminuant l'expression des gènes d'enzymes clés (phosphoénolpyruvate carboxylase, fructose-1,6-bisphosphatase, glucose-6-phosphatase) et stimule la glycolyse ainsi que la glycogénogenèse. Il en résulte une augmentation de la dégradation et du stockage du glucose, et une diminution de la formation du glucose, ce qui se répercute par une baisse de la glycémie au niveau systémique (Petersen and Shulman, 2018; Vargas et al., 2020). Concernant le métabolisme lipidique, l'action principale de l'insuline est l'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux. En effet, l'insuline favorise la synthèse des lipides et inhibe leur dégradation. Quant au métabolisme protéique, l'insuline augmente la synthèse des protéines et inhibe leur catabolisme (Dimitriadis et al., 2011). L'insuline est aussi capable de traverser la barrière hémato-encéphalique pour réguler l'appétit et les dépenses énergétiques en réduisant l'expression des peptides orexigènes NPY (Neuropeptide Y) et AgRP (*Agouti-related peptide*) (Tokarz et al., 2018).

1.3 Sécrétion d'insuline

1.3.1 Sécrétion d'insuline induite par le glucose

1.3.1.1 Glycolyse et devenir du pyruvate

Le glucose circulant entre dans les cellules β du pancréas par ses transporteurs GLUT1 (également appelé SLC2A1) et GLUT3 (SLC2A3) chez l'homme, ou GLUT2 (SLC2A2) chez les rongeurs (McCulloch et al., 2011). Dans la cellule β, le glucose est métabolisé par la voie de la glycolyse, également appelée voie d'Embden-Meyerhof-Parnas. Même si le métabolisme du glucose est dirigé à plus de 90 % vers la voie de la glycolyse, une faible part de glucose peut s'engager dans la voie des pentoses-phosphate. Cette voie anabolique permet la transformation du glucose en ribose-5-P, avec formation de coenzymes réduits (NADPH). Le ribose-5-P est utilisé par les cellules pour la synthèse de précurseurs des acides nucléiques (ARN et ADN) et des coenzymes nucléotidiques (NAD^+, $NADP^+$, FAD, coenzyme A). La glycolyse s'effectue dans le cytosol en condition anaérobie pour aboutir, à partir d'une molécule de glucose, à la formation de deux molécules de pyruvate et des molécules riches en énergie (2 ATP et 2 $NADH,H^+$). **Figure 5**. La première grande étape de la glycolyse est la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate puis en fructose-1,6-bisphophate, grâce notamment à l'action de la glucokinase, et consomme deux molécules d'ATP. Le fructose-1,6-bisphophate est ensuite clivé pour donner deux molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate. Chaque molécule de glycéraldéhyde 3-phosphate va être oxydée pour produire une molécule de pyruvate, une de $NADH,H^+$, et deux d'ATP (Hecketsweiler and Hecketsweiler, 2004). Il est à noter que la gluconéogenèse est faible dans les cellules β en raison de l'expression limitée de la phosphoénolpyruvate-carboxykinase et de la fructose 1,6-bisphosphatase, responsables du « chemin inverse » : la transformation du pyruvate en glucose (Da Silva Xavier and Rutter, 2020). Le bilan du métabolisme d'une molécule de glucose par la voie de la glycolyse est la synthèse de 2 molécules de pyruvate, de 2 molécules d'ATP et de 2 molécules de $NADH,H^+$.

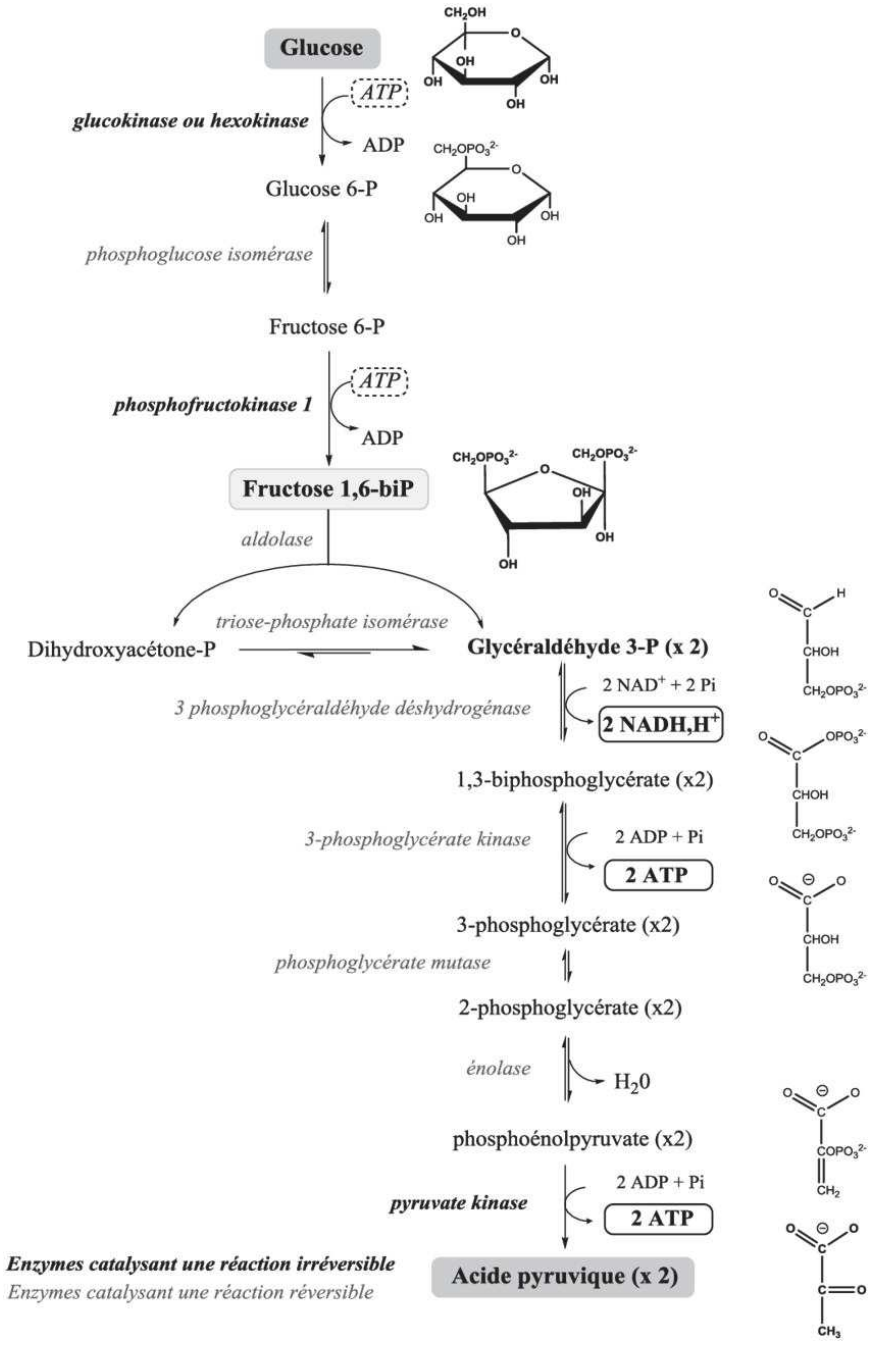


Figure 5 : Représentation schématique de la glycolyse (Seronie-Vivien, 2015).

Il est important de souligner que les cellules β expriment un niveau élevé du gène de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Sekine et al., 1994). Cette enzyme permet le transfert du pouvoir réducteur du $NADH,H^+$ produit par la glycolyse, sur le FAD (qui deviendra $FADH_2$) présent dans la mitochondrie pour alimenter la chaîne respiratoire mitochondriale.

Le pyruvate se situe à un carrefour métabolique important qui marque la fin de la voie de la glycolyse, mais qui est aussi le produit de la dégradation de plusieurs acides aminés. En condition anaérobie, le pyruvate est transformé en lactate grâce à la lactate déshydrogénase, afin d'assurer aux tissus anaérobies un apport énergétique performant grâce au cycle de Cori (glycolyse anaérobie dans les muscles, puis gluconéogenèse et glycogénonéogenèse dans le foie). En condition aérobie, le pyruvate pénètre dans la mitochondrie grâce à son transporteur spécifique, pour être oxydé et décarboxylé en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) par le complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase avec la formation d'un $NADH,H^+$. (Hecketsweiler and Hecketsweiler, 2004). Les cellules β n'exprimant pas les gènes de la lactate déshydrogénase et du transporteur de monocarboxylate (MCT-1 / SLC16A1, transporteur membranaire du pyruvate), la totalité du pyruvate formé conduit à la formation d'acétyl-CoA (Sekine et al., 1994; Ishihara et al., 1999).

1.3.1.2 Le cycle de Krebs

L'acétyl-CoA est le principal substrat du cycle Krebs, également appelé cycle de l'acide citrique ou cycle des acides tricarboxyliques (TCA). Le cycle de Krebs a lieu dans la matrice mitochondriale et consiste en huit réactions successives permettant d'oxyder l'acétyl-CoA en CO_2 avec libération de coenzymes réduits : $NADH,H^+$ et $FADH_2$, utilisés par la suite dans la chaîne des phosphorylations oxydatives (OXPHOS) mitochondriale. **Figure 6**. La première étape consiste en la condensation d'une molécule d'acétyl-CoA avec une molécule d'oxaloacétate pour former une molécule de citrate grâce à la citrate-synthase. L'aconitase va ensuite isomériser le citrate en isocitrate. Celui-ci subit une première décarboxylation oxydative via l'isocitrate-déshygrogénase pour conduire à la formation d'α-cétoglutarate, avec réduction d'une molécule de NAD^+ en $NADH,H^+$ et libération d'une molécule de CO_2. L'α-cétoglutarate subit alors une deuxième décarboxylation oxydative via l'α-cétoglutarate-déshydrogénase pour conduire, lui, à la formation de succinyl-CoA, avec également réduction d'une molécule de NAD^+ en $NADH,H^+$ et libération d'une molécule de CO_2. Le succinyl-CoA est ensuite transformé en succinate par la succinyl-thiokinase en libérant une molécule de GTP qui induira la transformation d'une molécule d'ADP en ATP. La réaction suivante met en jeu la succinate-déshydrogénase. C'est la seule enzyme non soluble du cycle de Krebs, elle est fixée à la membrane interne mitochondriale et appartient au complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle oxyde le succinate en fumarate et réduit une molécule de FAD en $FADH_2$. Le cycle de Krebs se poursuit avec l'hydratation du fumarate par la fumarase conduisant au malate. Enfin, le malate est oxydé en

oxaloacétate par la malate-déshydrogénase, avec réduction d'une molécule de NAD^+ en $NADH,H^+$. L'oxaloacétate régénéré peut ainsi recommencer un nouveau cycle (Hecketsweiler and Hecketsweiler, 2004). Le bilan énergétique du cycle de Krebs établit que chaque molécule d'acétyl-CoA produit une molécule d'ATP, 3 molécules de $NADH,H^+$, et une molécule de $FADH_2$.

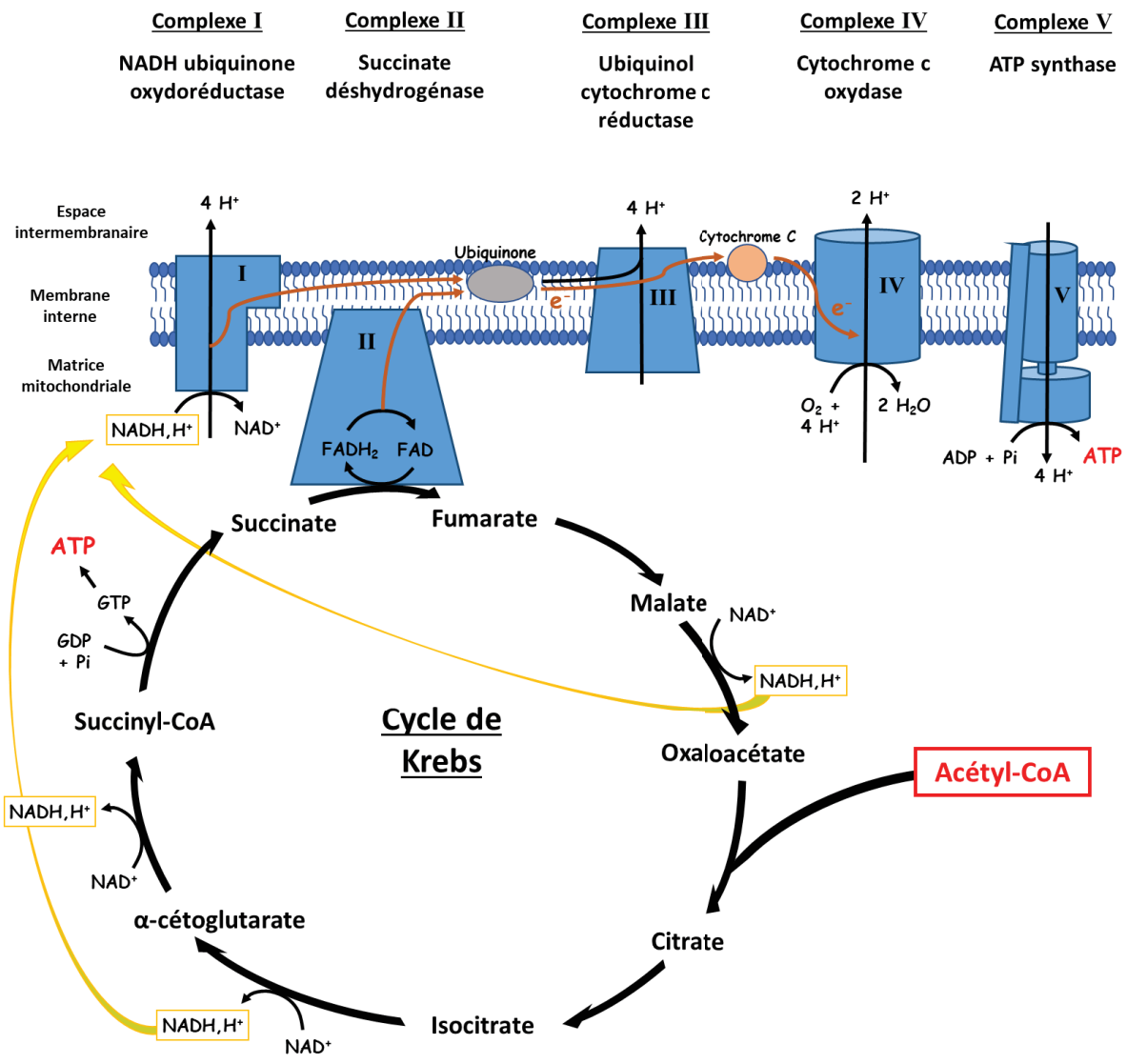


Figure 6 : Cycle de Krebs et chaîne des phosphorylations oxydatives mitochondriale.

1.3.1.3 La chaîne des phosphorylations oxydatives mitochondriale

La chaîne des phosphorylations oxydatives (OXPHOS) mitochondriale est composée de cinq complexes. Les quatre premiers forment la chaîne respiratoire mitochondriale, qui, grâce à des réactions d'oxydoréduction, favorise le passage de protons H^+ de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ils utilisent les coenzymes réduits, provenant principalement du cycle de Krebs, et l'oxygène de l'air. Le cinquième complexe permet la synthèse de l'ATP lors du retour des protons dans la matrice. Les complexes I, II, III et IV sont des complexes enchâssés dans la membrane interne mitochondriale, qui possèdent des éléments participant aux transports d'électrons. **Figure 6**. En effet, les réactions d'oxydoréduction mises en jeu par ces complexes conduisent au transfert de protons et d'électrons des coenzymes réduits $NADH,H^+$ et $FADH_2$ vers l'oxygène pour former de l'eau. Le complexe I, appelé NADH - ubiquinone - oxydoréductase, récupère les équivalents réducteurs du $NADH,H^+$ pour les céder à l'ubiquinone (également appelée Coenzyme Q), en libérant 4 protons dans l'espace intermembranaire. Le complexe II, succinate – ubiquinone - oxydoréductase, récupère les équivalents réducteurs du $FADH_2$ pour les céder à l'ubiquinone, mais sans libérer de protons. L'ubiquinone, devenue ubiquinol (QH_2) sous forme réduite, est un élément lipidique mobile de la membrane interne. Elle fait le lien entre les deux voies d'entrée dans la chaîne de respiration par les complexes I ou II avec le complexe III. Le complexe III, ubiquinol - cytochrome c - oxydoréductase, oxyde l'ubiquinol et sépare les électrons et les protons : les électrons sont transférés au cytochrome c, 2 protons sont relâchés dans l'espace intermembranaire et 2 autres protons vont être captés depuis la matrice vers l'espace intermenbranaire *via* le transfert des électrons. Au total, 4 protons sont transférés dans l'espace intermembranaire au niveau du complexe III pour une molécule d'ubiquinol oxydée. Le cytochrome c est une protéine mobile sur la face externe de la membrane interne qui assure le transfert des électrons entre les complexes III et IV. Le complexe IV, cytochrome c - oxydase, catalyse la réduction d'une molécule de O_2 en 2 molécules d'H_2O, et en libérant 2 protons dans l'espace intermembranaire. Ainsi, l'oxydation d'un $NADH,H^+$ et d'un $FADH_2$ génère respectivement un flux de 10 et 6 H^+. D'après la théorie chimio-osmotique de Mitchell, les complexes I, III et IV fonctionnent donc comme des pompes à protons pour créer un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. L'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire crée une force proton motrice en raison de l'imperméabilité de la membrane interne. Cette énergie est utilisée par le complexe V, ATP synthase (ou F0F1-ATPase), pour produire de l'ATP. Le complexe V est constitué de plusieurs sous-unités formant un rotor et un stator. Le flux de 4 protons va induire un mouvement rotatif qui conduira à la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP. Il en résulte que

chaque $NADH,H^+$ ou $FADH_2$ produit respectivement 2,5 ou 1,5 ATP. Ces valeurs sont traditionnellement arrondies à 3 et 2 ATP (Hecketsweiler and Hecketsweiler, 2004).

L'ATP ainsi produite peut rejoindre le cytosol grâce au transporteur ATP/ADP translocase (ANT) en échange d'une molécule ADP. Le métabolisme de chaque molécule de glucose peut donc conduire à la formation de 36 molécules d'ATP dans les cellules β pancréatiques. La glycolyse produit 2 ATP directement et 2 $NADH,H^+$ qui seront transformés en $FADH_2$ lors de leur passage dans la mitochondrie et qui donneront 4 ATP. L'oxydation de 2 pyruvate en 2 acétyl-CoA favorise la production de 6 ATP par l'intermédiaire de 2 $NADH,H^+$. Enfin, l'oxydation de 2 acétyl-CoA par le cycle de Krebs conduit à la production de 24 ATP (2 formées par l'intermédiaire de 2 GTP et 22 grâce à l'oxydation de 6 $NADH,H^+$ et 2 $FADH_2$).

1.3.1.4 Les canaux potassiques ATP dépendants

L'ATP produite par la chaîne des phosphorylations oxydatives, et donc l'augmentation du ratio ATP/ADP va induire la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP (canaux potassiques ATP dépendants, K_{ATP}). Il s'agit de complexes protéiques membranaires hétéro-octamériques composés de 4 sous-unités kir6 (*inward-rectifier potassium channel 6*) délimitant le pore du canal, et de 4 sous-unités régulatrices SUR1 (*sulfonylurea receptor 1*) de la famille ABCC (*ATP-binding cassette*, sous-famille C). Ces sous-unités SUR1 possèdent deux domaines capables de lier les nucléotides et de les hydrolyser, appelées NBF1 et NBF2 (ou NBD, *nucleotide binding folds* ou *domains*). La liaison de l'ATP cytosolique aux sous-unités Kir6.2 stabiliserait la fermeture du canal. Cependant, la régulation du canal résulte surtout des effets des nucléotides sur la sous-unité SUR1. L'ATP se lie au domaine NBF1 d'une manière indépendante au Mg^{2+}, alors que la liaison de l'ATP et de l'ADP au domaine NBF2 nécessite du Mg^{2+}. Les changements de conformation associés à la liaison et l'hydrolyse du MgATP au niveau des NBF sont vraisemblablement transmis aux sous-unités Kir6.2, stabilisant l'état de fermeture du pore du canal. A l'inverse, la liaison du MgADP au NBF2 semble suffisante pour maintenir l'ouverture du canal, en stabilisant l'état post-hydrolytique de NBF2. **Figure 7**. Ainsi, l'augmentation du ratio ATP/ADP, et non l'ATP seule, provoque la fermeture des K_{ATP}. L'arrêt du flux sortant de potassium conduit à une dépolarisation de la membrane plasmique (Seino, 1999; Zingman et al., 2001; Remedi and Nichols, 2016; Li et al., 2017a).

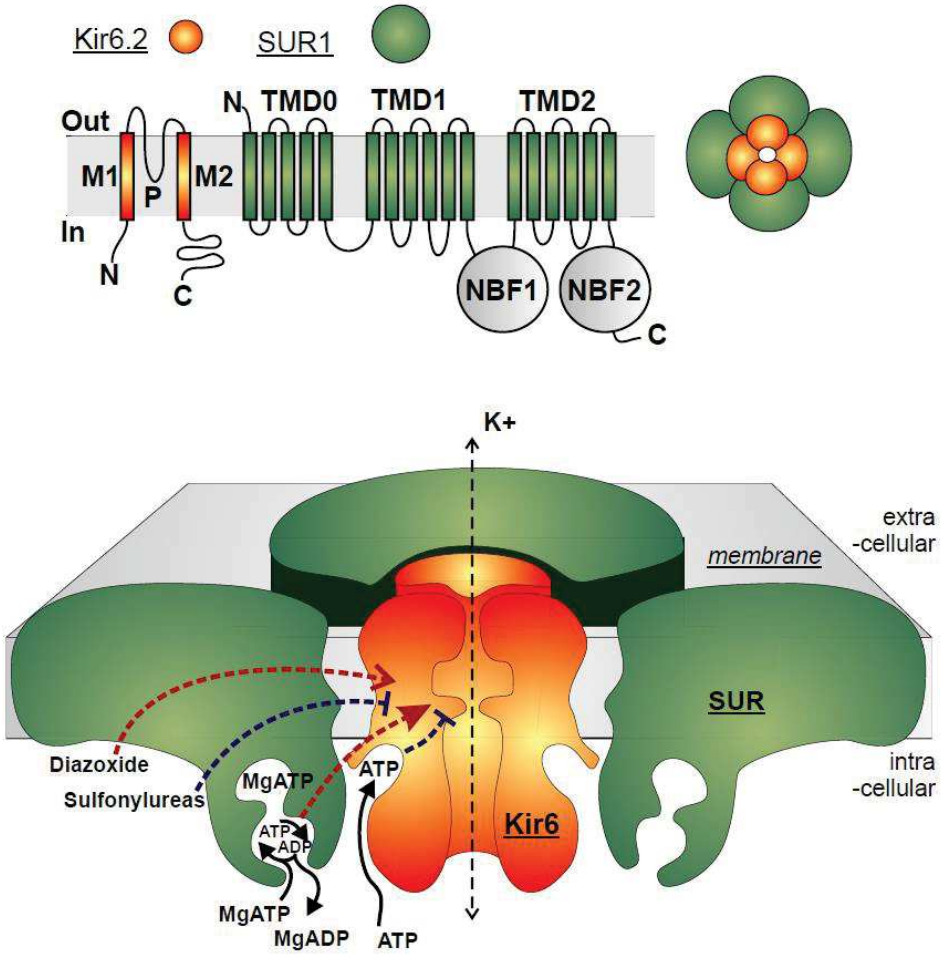


Figure 7 : Représentation du canal potassique ATP dépendant (Remedi and Nichols, 2016).

1.3.1.5 Les canaux calciques voltage dépendants

La dépolarisation de la membrane plasmique permet l'activation, et donc l'ouverture, de canaux calciques voltage dépendants (Ca_V ou VDCC), conduisant à une entrée de calcium dans la cellule β. Ces canaux sont constitués d'une sous-unité α_1 formant un pore, et de 3 classes distinctes de sous-unités auxiliaires : une sous-unité intracellulaire β et un complexe de sous-unités $\alpha_2\delta$ associées à la membrane et liées entre-elles par un pont disulfure. Une sous-unité transmembranaire supplémentaire γ peut être associée à la sous-unité α_1 des canaux $Ca_V1.1$ du muscle squelettique. Ces sous-unités auxiliaires influencent l'ouverture du canal ainsi que le repliement des protéines qui le composent et leur insertion dans la membrane plasmique (Alexander et al., 2019; Catterall et al., 2020). **Figure 8**.

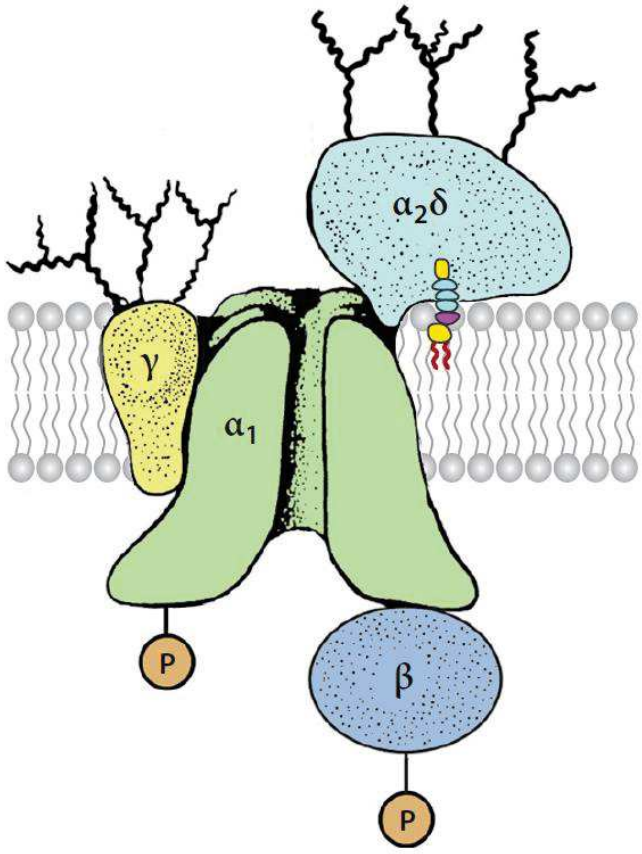


Figure 8 : Représentation d'un canal calcique voltage dépendant de muscle squelettique. Les lignes courbes noires représentent des chaînes glucidiques. Les P dans un cercle représentent les sites de phosphorylation des protéines. La sous-unité $\alpha_2\delta$ est liée à la membrane grâce à une ancre glycosylphosphatidylinositol (Nanou and Catterall, 2018; Catterall et al., 2020).

La sous-unité α_1 formant le pore du canal concentre les sites de liaison de la plupart des agonistes et antagonistes. 10 sous-unités α_1 ont été clonées et sont regroupées en trois familles (Alexander et al., 2019), **Tableau 1** :

- les $Ca_V1.x$: activés par haut voltage et sensibles aux dihydropyridines, induisant un courant calcique de type L ;
- les $Ca_V2.x$: activés par haut voltage et insensibles aux dihydropyridines, induisant un courant calcique de type P/Q, N ou R ;
- les $Ca_V3.x$: activés par bas voltage, induisant un courant calcique de type T.

Tableau 1 : Les différentes sous-unités α_1 des canaux calciques voltage dépendants avec les courants calciques et le gène correspondant (d'après Rorsman and Ashcroft, 2018; Alexander et al., 2019).

Sous-unité α_1	Courant calcique	Gène
1.1	L	*CACNA1S*
1.2	L	*CACNA1C*
1.3	L	*CACNA1D*
1.4	L	*CACNA1F*
2.1	P/Q	*CACNA1A*
2.2	N	*CACNA1B*
2.3	R	*CACNA1E*
3.1	T	*CACNA1G*
3.2	T	*CACNA1H*
3.3	T	*CACNA1I*

Les $Ca_V1.2$ sont particulièrement impliqués dans la première phase de la sécrétion d'insuline. Les cellules β pancréatiques de souris expriment des canaux calciques $Ca_V1.2$ (*Cacna1c*) mais aussi $Ca_V1.3$ (*Cacna1d*), $Ca_V2.2$ (*Cacna1b*) et $Ca_V2.1$ (*Cacna1a*). Les cellules β pancréatiques humaines diffèrent sensiblement. Elles expriment les $Ca_V1.2$ et $Ca_V1.3$ (*CACNA1C* et *CACNA1D*), les $Ca_V2.1$ (*CACNA1A*) et les $Ca_V3.2$ (*CACNA1H*). Les $Ca_V2.2$ (*CACNA1B*) sont exprimés à des niveaux inférieurs à ceux des cellules de souris (Rorsman and Ashcroft, 2018). **Figure 9**.

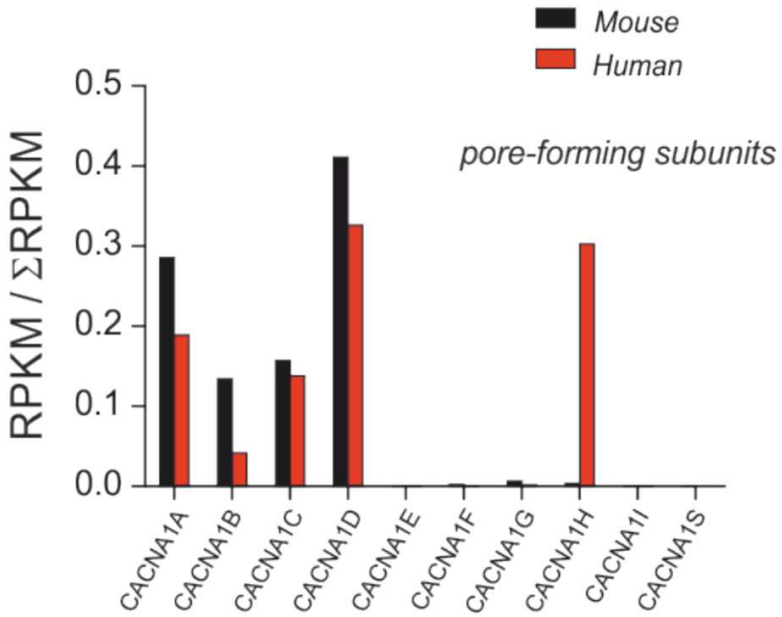


Figure 9 : Expression relative des gènes codants pour les sous-unités α_1 des Ca_V chez la souris et chez l'Homme dans la cellule β pancréatique (Rorsman and Ashcroft, 2018).

1.3.1.6 Rôle du calcium intracellulaire

Dans la cellule, le calcium initie de nombreuses cascades de signalisation. Une de ces voies de signalisation cellulaire concerne la calmoduline (CaM : *calcium-modulated protein*). Liée au calcium, la CaM subit un changement de conformation, lui permettant d'activer à son tour de nombreuses cibles en aval. Les interactions entre la CaM et ses partenaires sont très diverses : certaines protéines y sont presque continuellement liées, tandis que d'autres interagissent avec la CaM spécifiquement dans des conditions de faible ou de forte concentration en calcium. L'activation de ses cibles par la CaM peut faciliter une dimérisation, induire un remodelage des sites actifs ou supprimer des autoinhibitions. Les CAMK (*Ca^{2+}/Calmodulin-dependent protein kinase*) sont des protéines activées par la CaM liée au calcium. Parmi les cibles des CAMK figure le facteur de transcription CREB (*cAMP response element-binding protein*). Dans des conditions de faible concentration en calcium intracellulaire, CREB reste inactif. Lorsque la concentration en calcium intracellulaire augmente, cela entraîne une activation de CREB par une voie dépendante de la CAMK. CREB phosphorylé interagit ensuite avec ses cofacteurs CRTC2 (*CREB regulated transcription coactivator 2*) et CBP (*CREB binding protein*) pour promouvoir la transcription de gènes cibles, dont celui de l'insuline. Parmi les autres voies de signalisation, l'augmentation de calcium intracellulaire dans les cellules β stimule la voie d'activation ERK/MAPK (*Extracellular signal-regulated kinases/Mitogen-activated protein kinases*), médiée par l'activation de Ras-GEF et B-Raf *via* la calmoduline et la calcineurine respectivement. ERK1/2 (p42/44) participent au contrôle de processus cellulaires clés comme la survie, la prolifération et la transcription de gènes dont ceux liés aux mécanismes d'exocytose. La signalisation calcique peut également favoriser la sécrétion d'insuline en stimulant l'activité mitochondriale par un processus appelé "*Ca^{2+}-metabolic coupling*". Les périodes de fortes sécrétions d'insuline nécessitent une activité mitochondriale accrue pour reconstituer les réserves en ATP qui soutiennent la dépolarisation membranaire et la libération d'insuline. L'afflux de calcium et l'activation conséquente des CAMK sont nécessaires pour cet accroissement de la fonction mitochondriale en stimulant la phosphorylation oxydative (Sabatini et al., 2019; Toubal et al., 2020).

Par ailleurs, l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire active des voies de signalisation liées au calcium aboutissant à l'exocytose des vésicules de sécrétion contenant l'insuline. Ce mécanisme favorise la réorganisation du cytosquelette pour favoriser la migration des vésicules vers la membrane et la mobilisation de protéines permettant la fusion des membranes. C'est le cas des synaptotagmines qui sont des protéines transmembranaires à domaine C2. Les domaines C2 correspondent à des séquences arrangées en feuillets β et séparées par des boucles flexibles. Ces

boucles peuvent se resserrer après liaison de calcium et ainsi modifier la conformation de la protéine pour moduler son activité enzymatique ou son affinité envers d'autres acteurs moléculaires. L'augmentation du calcium intracellulaire va donc favoriser les interactions des synaptotagmines avec les phospholipides membranaires et les protéines de la famille SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor* (NSF) *attachment protein* (SNAP) *receptor*). Ces interactions, en combinaison avec l'activation d'autres protéines dépendantes du calcium, sont des prérequis aux mécanismes d'exocytose des vésicules de sécrétion (Landry and Gies, 2014).

1.3.1.7 Exocytose des granules de sécrétion

Le cytosquelette est principalement composé de filaments d'actine et de microtubules. L'actine se présente sous une forme polymérisée (actine-F fibrillaire) ou sous forme libre (actine-G globulaire). La dynamique de polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actine régule la migration des vésicules à la membrane. Le métabolisme du glucose permet une réorganisation de ces filaments pour favoriser l'adressage des vésicules d'insuline à la membrane. Il améliore également la polymérisation des microtubules qui jouent un rôle dans le déplacement des vésicules de sécrétion par l'intermédiaire de la kinésine, protéine dépendante de l'ATP (Wang and Thurmond, 2009). En réponse au calcium, le processus d'exocytose va mettre en jeu des protéines possédant des motifs particuliers et regroupées sous le terme de protéines de la famille SNARE, responsable de la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane. **Figure 10**.

Il existe deux types de protéines SNARE :

- les v-SNARE localisées à la surface des vésicules. Ce sont de petites protéines avec un domaine transmembranaire C-terminal, et comprenant notamment la synaptobrévine, protéine de la famille VAMP (*vesicle-associated membrane protein*), qui possède un motif R-SNARE (R pour arginine).

- les t-SNARE, localisées à la surface des membranes cibles (*target*). Les t-SNARE de la membrane plasmique sont représentées par la syntaxine, et SNAP-25 (*synaptosomal nerve-associated protein 25*). La syntaxine possède un domaine transmembranaire au niveau C-terminal, un domaine appelé Qa-SNARE (ou H3-SNARE, Q pour glutamine), et une région régulatrice nommée Habc au niveau N-terminal. SNAP-25 est une protéine lipidique ancrée dans la membrane sur laquelle sont présents deux domaines SNARE : Qb-SNARE et Qc-SNARE, respectivement en position N-terminal et C-terminal.

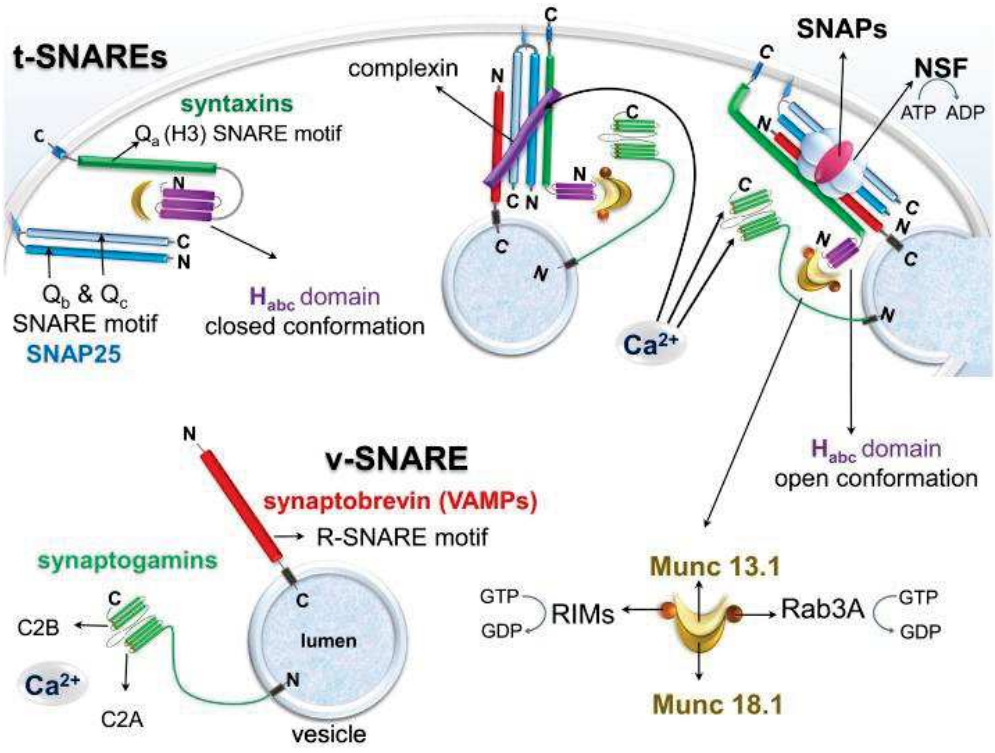


Figure 10 : Mécanismes d'exocytose des vésicules contenant l'insuline (Vakilian et al., 2019).

L'exocytose est déclenchée par l'augmentation du calcium intracellulaire. Celui-ci va pouvoir se lier à la complexine, protéine cytosolique, et à la synaptotagmine (ou synaptogamine), présente à la membrane des vésicules contenant l'insuline, et possédant 2 sites de liaison au calcium C2A et C2B du côté C-terminal. La première étape d'amorçage fait intervenir la syntaxine (t-SNARE). En condition basale, son domaine Habc présente une conformation fermée inactivée (*closed*) par association des domaines Habc et Qa de la syntaxine, et stabilisée par la protéine Munc 18.1. C'est la protéine Munc 13.1, en coopération avec Munc 18.1 et des petites protéines GTPases comme RIM et Rab3A, qui permet la transition vers la conformation ouverte activée (*open*) du domaine Habc et la libération du domaine Qa. La synaptotagmine de la vésicule, activée par le calcium, coopère avec la syntaxine et SNAP-25 (t-SNARE) pour attirer et recruter la synaptobrévine (v-SNARE) de la vésicule afin de former le complexe appelé trans-SNARE. Celui-ci est constitué par 4 hélices parallèles provenant chacune de la synaptobrévine, de la syntaxine et de chaque extrémité de SNAP-25. Au centre de ce complexe fermé par des résidus leucine (leucine-zipper), se trouve la couche ionique zéro (*zero ionic layer*) stabilisée par des interactions électrostatiques entre l'arginine du R-SNARE de la synaptobrévine et les glutamines de Qa-, Qb- et Qc-SNARE de la syntaxine et de SNAP-25. Ce complexe trans-SNARE permet

le rapprochement des membranes, et la formation d'un pore de fusion qui va s'agrandir pour pouvoir libérer l'insuline. Le NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), protéine de la famille des AAA-ATPase (ATPases Associées à diverses Activités cellulaires) et son cofacteur SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) désassemble ensuite le complexe en hydrolysant une molécule d'ATP pour recycler les molécules SNARE en vue d'une nouvelle fusion (Jewell et al., 2010; Vakilian et al., 2019).

Il existe plusieurs pools de vésicules contenant l'insuline. Le premier est constitué des vésicules proches ou amarrées à la membrane, facilement mobilisables, appelé RRP (*readily releasable pool*). Celui-ci inclut le pool hypersensible au calcium appelé HCSP (*highly calcium sensitive pool*). Le second pool nécessite d'être acheminé vers la membrane pour l'exocytose, c'est un pool de réserve. En conditions physiologiques, la sécrétion d'insuline induite par le glucose revêt un caractère biphasique. La cellule β déclenche dans un premier temps l'exocytose du pool de vésicules RRP, provoquant un pic précoce de sécrétion d'insuline. Ce premier pic est décrit comme préparant les tissus cibles en favorisant leur insulino-sensibilité. La mobilisation des vésicules de réserve conduit à la deuxième phase de sécrétion d'insuline, au cours de laquelle l'élévation de l'insulinémie est plus tardive et plus lente (Rorsman and Ashcroft, 2018). **Figure 11**.

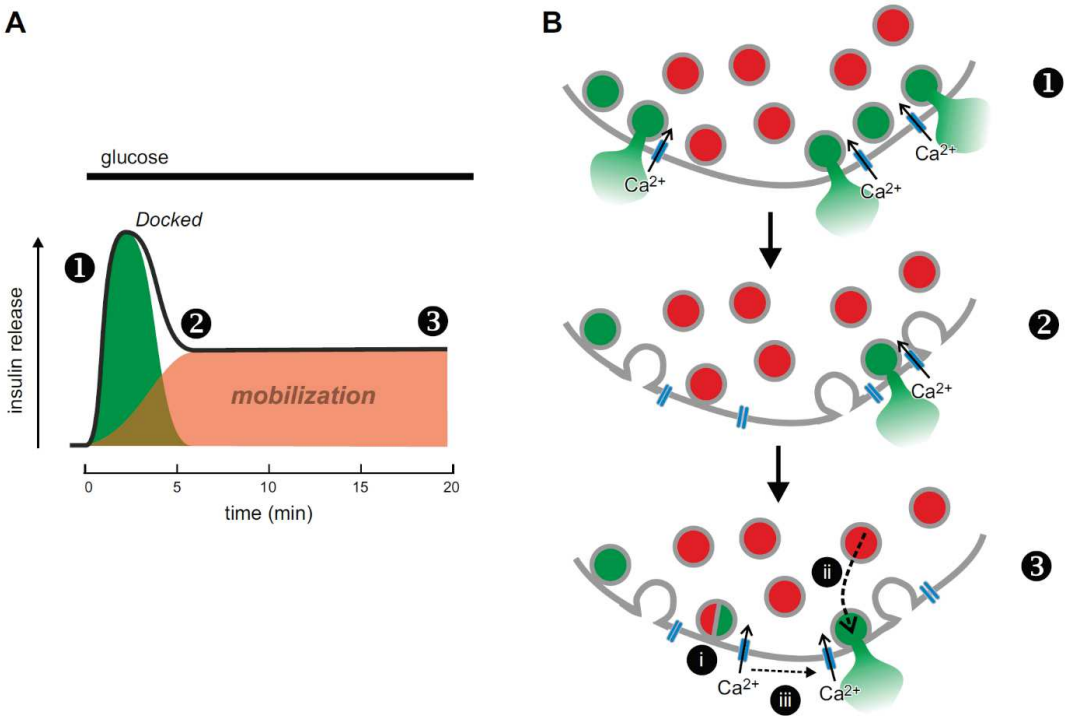


Figure 11 : Profil biphasique de l'insuline sécrétée en fonction du temps, en réponse au glucose (A) et représentation de l'exocytose des différents pools de vésicules d'insuline (B). Les nombres 1, 2 et 3 indiquent respectivement le début de la première phase de sécrétion, la fin de la première phase de sécrétion et la deuxième phase de sécrétion d'insuline. Les zones vertes et rouges correspondent à la libération de vésicules RRP et du pool de réserve respectivement (Rorsman and Ashcroft, 2018).

1.3.2 Régulation de la sécrétion d'insuline

Le glucose est le plus important sécrétagogue physiologique de l'insuline. De faibles variations de la glycémie sont capables de moduler amplement et rapidement la sécrétion d'insuline par les cellules β. Pour ce faire, la sécrétion d'insuline est très finement régulée, et fait intervenir plusieurs voies, majoritairement amplificatrices. En effet, l'insuline est une hormone essentielle au métabolisme énergétique dans son ensemble. Elle agit sur l'utilisation et le stockage des glucides, mais aussi des lipides et des protéines. Par conséquent, elle est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme, notamment en période de prise alimentaire. Ainsi, la régulation de la sécrétion d'insuline commence juste avant l'ingestion d'aliments, par le système nerveux autonome, afin d'anticiper l'élévation de la glycémie post-prandiale. Ensuite, les incrétines, hormones sécrétées par des cellules intestinales, auront pour but de potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose. La cellule β est également régulée par les sources alimentaires de glucides, de lipides et d'acides aminés, de sorte que la libération d'insuline se produise à des moments appropriés pour assurer une absorption et un stockage efficaces des nutriments par les tissus cibles. Enfin, les actions paracrines des autres cellules de l'îlot de Langerhans permettront un retour à une sécrétion d'insuline basale, ou au contraire à une amplification selon les besoins de l'organisme.

Les voies de signalisation mises en jeu pour la régulation de la sécrétion d'insuline peuvent notamment impliquer des canaux ioniques, des transporteurs membranaires, des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou des cibles intracellulaires. Elles sont résumées dans la **Figure 12** et détaillées après.

Les canaux ioniques et les transporteurs membranaires favorisent essentiellement la dépolarisation membranaire *via* une entrée de charge positive. Les RCPG représentent une grande famille de récepteurs cellulaires et sont définis par deux critères : la présence de 7 domaines transmembranaires et le couplage à une protéine hétérotrimérique, la protéine G, liée à un nucléotide à guanine et permettant la transduction du signal. En effet, la protéine G est composée de trois sous-unités α, β et γ ; la sous-unité α déterminant la cascade de signalisation intracellulaire mis en jeu. Il existe trois principaux sous-types de sous-unités α : α_s, α_i et α_q. Selon la sous-unité α couplée à son récepteur spécifique, le ligand pourra stimuler ou inhiber la sécrétion d'insuline. **Tableau 2**.

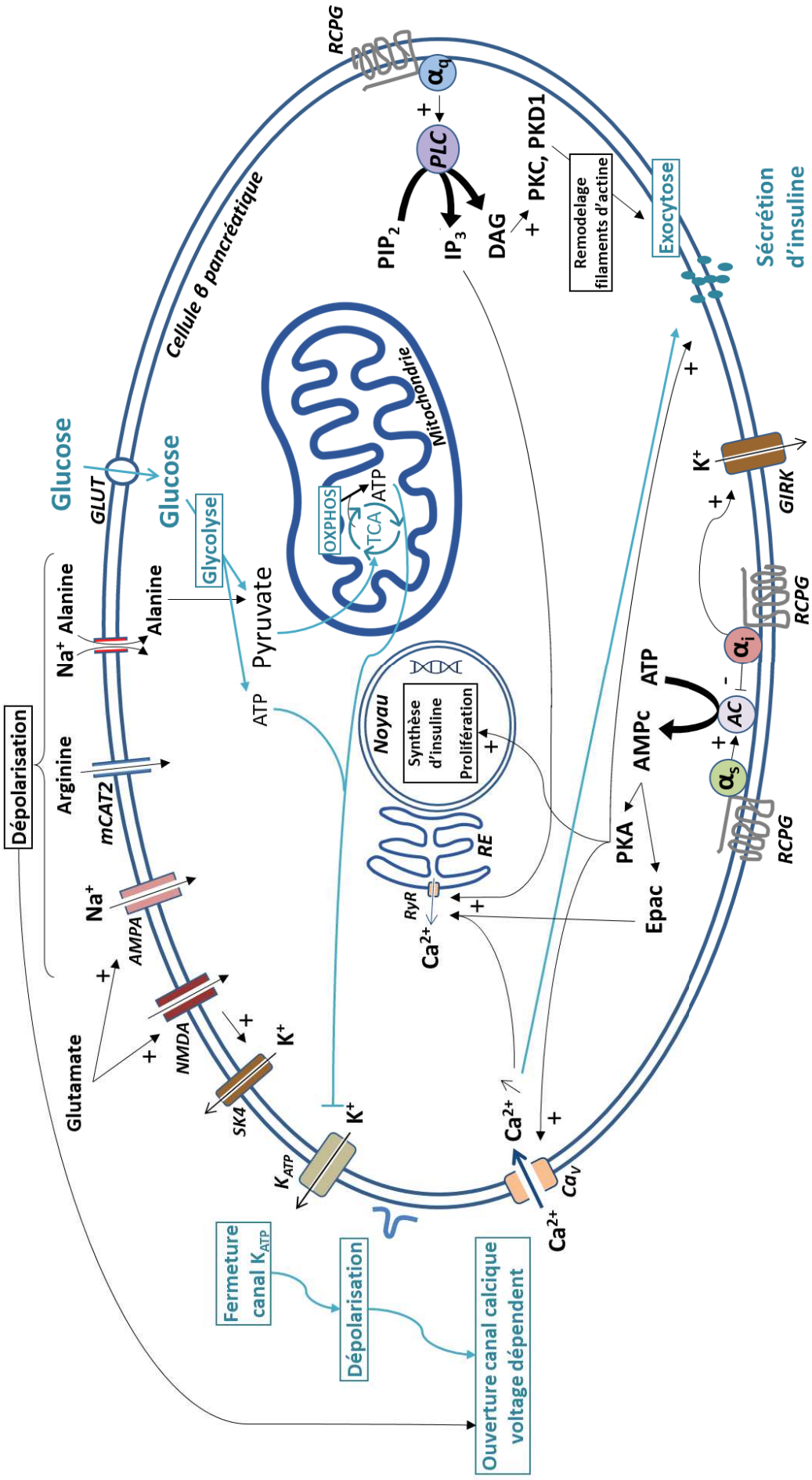

RCPG
α_q
PLC
PIP_2
IP_3
DAG
PKC, PKD1
Remodelage filaments d'actine
Exocytose
Sécrétion d'insuline
Cellule β pancréatique
Mitochondrie
OXPHOS
TCA
ATP
Glucose
GLUT
Glucose
Glycolyse
Pyruvate
ATP
Noyau
Synthèse d'insuline
Prolifération
RE
RyR
Ca^{2+}
Na+ Alanine
Alanine
Arginine
mCAT2
Na^+
AMPA
NMDA
Glutamate
SK4
K^+
K_{ATP}
Dépolarisation
Ca^{2+}
Ca_V
Ca^{2+}
K^+
GIRK
RCPG
α_i
AC
ATP
AMPc
PKA
Epac
α_s
RCPG
RCPG
Fermeture canal K_{ATP}
Dépolarisation
Ouverture canal calcique voltage dépendent

Figure 12 : Principales voies de régulation de la sécrétion d'insuline. GLUT, transporteur du glucose ; TCA, cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de Krebs ; OXPHOS, chaîne de phosphorylation oxydative ; mCAT2, transporteur d'acides aminés cationiques 2 ; AMPA, acide amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique ; NMDA, N-méthyl-D-aspartate ; SK4, canal potassique de faible conductance activé par le calcium 4 ; K_{ATP}, canal potassique ATP dépendant ; Ca_V, canal calcique voltage dépendant ; RCPG, récepteur couplé à une protéine G ; GIRK, canal potassique rectifiant activé par les protéines G ; AC, adénylate cyclase ; PKA, protéine kinase A ; ATP, adénosine triphosphate ; AMPc, adénosine monophosphate cyclique ; Epac, protéine d'échange directement activée par l'AMPc ; PLC, phospholipase C ; PIP_2, phosphatidyl inositol biphosphate ; IP_3, inositol triphosphate ; DAG, diacylglycérol ; PKC, protéine kinase C ; PKD1, protéine kinase D1 ; RE, réticulum endoplasmique ; RyR, récepteur à la ryanodine.

Tableau 2 : Rôle des signalisations médiées par les RCPG dans la régulation de la sécrétion d'insuline. RCPG, récepteur couplé à une protéine G ; VIP, peptide vasoactif intestinal ; PACAP, peptide hypophysaire activateur de l'adénylyl cyclase ; VPAC2, récepteur au PACAP et au VIP de type II ; PAC1, récepteur au PACAP de type I ; NPY, neuropeptide Y, Y1-R, récepteur au NPY 1 ; M3-R, récepteur muscarinique de l'acétylcholine 3 ; β_2-R, adrénorécepteur β_2 ; α_2-R, adrénorécepteur α_2 ; GHSR, récepteur de la ghréline ; GIP, peptide insulinotrope dépendant du glucose ; GIP-R, récepteur du GIP ; GLP-1, glucagon-like peptide 1 ; GLP-1R, récepteur du GLP-1 ; GcgR, récepteur du glucagon ; SSTR, récepteur de la somatostatine ; FFAR1, récepteur des acides gras libres 1 (d'après Shibasaki et al., 2014).

Ligand	RCPG	Protéine G	Sécrétion d'insuline
VIP	VPAC2	α_s	Stimulation
PACAP	PAC1, VPAC2	α_s	Stimulation
NPY	Y1-R	α_i	Inhibition
Acétylcholine	M3-R	α_q	Stimulation
Adrénaline/Noradrénaline	β_2-R	α_s	Stimulation
Adrénaline/Noradrénaline	α_2-R	α_i	Inhibition
Ghréline	GHSR	α_i	Inhibition
GIP	GIP-R	α_s	Stimulation
GLP-1	GLP-1R	α_s	Stimulation
Glucagon	GcgR	α_s	Stimulation
Somatostatine	SSTR 1/5	α_i	Inhibition
Acide gras	FFAR1	α_q	Stimulation

La protéine $G\alpha_s$ active l'adénylate cyclase. Cette enzyme catalyse la transformation de l'ATP en AMP cyclique (AMPc). L'augmentation de l'AMPc conduit à l'activation de la PKA (Protéine Kinase A) et de Epac2 (*exchange proteins directly activated by cAMP*). La PKA est capable de phosphoryler la sous-unité β2 des Ca_V de type L (favorisant l'augmentation de calcium dans la cellule), et de sensibiliser les K_{ATP} à l'ATP. Dans le même temps, la PKA inhibe les canaux potassiques voltage dépendants pour diminuer la repolarisation de la membrane et maintenir plus longtemps l'influx calcique à travers les Ca_V. La PKA est aussi impliquée dans la maturation des vésicules de sécrétion et augmente le pool de vésicules rapidement mobilisables RRP. Enfin, la PKA favorise la transcription du gène de l'insuline, ainsi que des gènes régulateurs positifs de la survie et de la prolifération cellulaire. Epac2 active les récepteurs de la ryanodine (RYR), qui permettent le relargage du calcium du réticulum endoplasmique dans le cytoplasme. Ce mécanisme nécessite néanmoins une entrée de calcium concomitante par les Ca_V, d'où son appellation de « *calcium-induced calcium release* » (CICR). Tous ces mécanismes permettent d'amplifier la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

La protéine $G\alpha_i$ est, à l'inverse, inhibitrice de l'adénylate cyclase, et conduit donc à la fermeture des canaux calciques voltage dépendants et à une inhibition de la sécrétion d'insuline.

La protéine $G\alpha_q$ active l'isoforme β de la phospholipase C (PLC β). Cette enzyme catalyse le clivage du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP_2) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG). L'IP_3 va permettre le relargage de calcium du réticulum endoplasmique, alors que le DAG va activer des protéines kinases C (PKC) et PKD1 (*phosphorylates protein kinase D1*) pour induire un remodelage des filaments d'actine et améliorer l'efficacité du calcium à déclencher l'exocytose des vésicules de sécrétion contenant l'insuline.

La vue et l'odeur des aliments provoquent une augmentation de l'insulinémie d'environ 25 %, sans être précédée d'une élévation de la glycémie. Ce mécanisme, appelé phase céphalique, est régulé par le **système nerveux autonome** (innervation sympathique et parasympathique des îlots) afin d'anticiper l'élévation de la glycémie. Le système nerveux parasympathique a une action hypoglycémiante en stimulant la sécrétion d'insuline. Son action est médiée par des voies cholinergiques et non cholinergiques. Les voies non cholinergiques font intervenir des neuropeptides comme le VIP (*vasoactive intestinal peptide*), le PACAP (*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*), ou le GRP (*gastrin-releasing peptide*), qui se lient sur des RCPG couplés à une protéine $G\alpha_s$. Les fibres cholinergiques, comme leur nom l'indiquent, libèrent de l'acétylcholine, laquelle va

activer des récepteurs muscariniques M3 exprimés à la membrane des cellules β (Güemes and Georgiou, 2018). Ces récepteurs sont des RCPG couplés à la protéine $G\alpha_q$, et sont aussi capables d'activer des courants entrants de sodium, favorisant une dépolarisation de la membrane et donc l'ouverture des Ca_V (Azua et al., 2011). Le système nerveux sympathique est responsable de l'effet inverse, il favorise l'hyperglycémie par une inhibition de la sécrétion d'insuline. Les fibres adrénergiques libèrent de la noradrénaline, tandis que l'action des fibres non-adrénergiques est médiée par le neuropeptide Y (NPY) et la galanine. **Figure 13**. Même si la noradrénaline est capable de stimuler la sécrétion d'insuline à travers l'activation des récepteurs β_2 adrénergiques (RCPG couplés à la protéine $G\alpha_s$), l'activation des récepteurs α_2 (RCPG couplés à la protéine $G\alpha_i$), plus nombreux à la surface des cellules β l'inhibe (Magnan and Ktorza, 2005; Güemes and Georgiou, 2018). Les sous-unités $G\alpha_i$ inhibent l'activité de l'adénylate cyclase et induisent également l'ouverture des K_{ATP} favorisant une hyperpolarisation cellulaire. Les sous-unités $G_{\beta\gamma}$ sont capables d'empêcher l'exocytose des vésicules en se liant au complexe SNARE et en inhibant l'interaction de la synaptotagmine avec la syntaxine et SNAP-25 (Furman et al., 2010; Zhao et al., 2010).

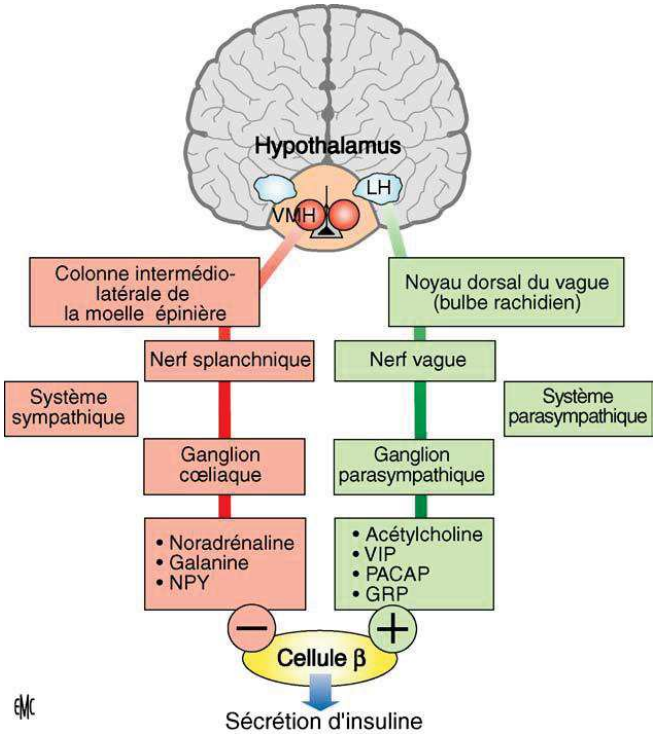


Figure 13 : Régulation de la sécrétion d'insuline par le système nerveux autonome (Magnan and Ktorza, 2005).

Les **incrétines** jouent un rôle crucial dans l'amplification de la sécrétion d'insuline. Ces hormones synthétisées majoritairement au niveau du tube digestif lors de la prise alimentaire, permettent une sécrétion d'insuline de façon gluco-dépendante. Le GIP (*glucose dependent insulinotropic polypeptide*) est sécrété par les cellules K du duodénum et du jéjunum proximal, et le GLP-1 (*glucagon like peptide 1*) est sécrété par les cellules L de l'intestin. Le GIP agit par l'intermédiaire de son récepteur GIP-R, et le GLP-1 se lie au récepteur GLP-1R, ces deux récepteurs étant des RCPG, tous deux couplés à une protéine $G\alpha_s$ (Campbell and Drucker, 2013; Müller et al., 2019). **Figure 14**.

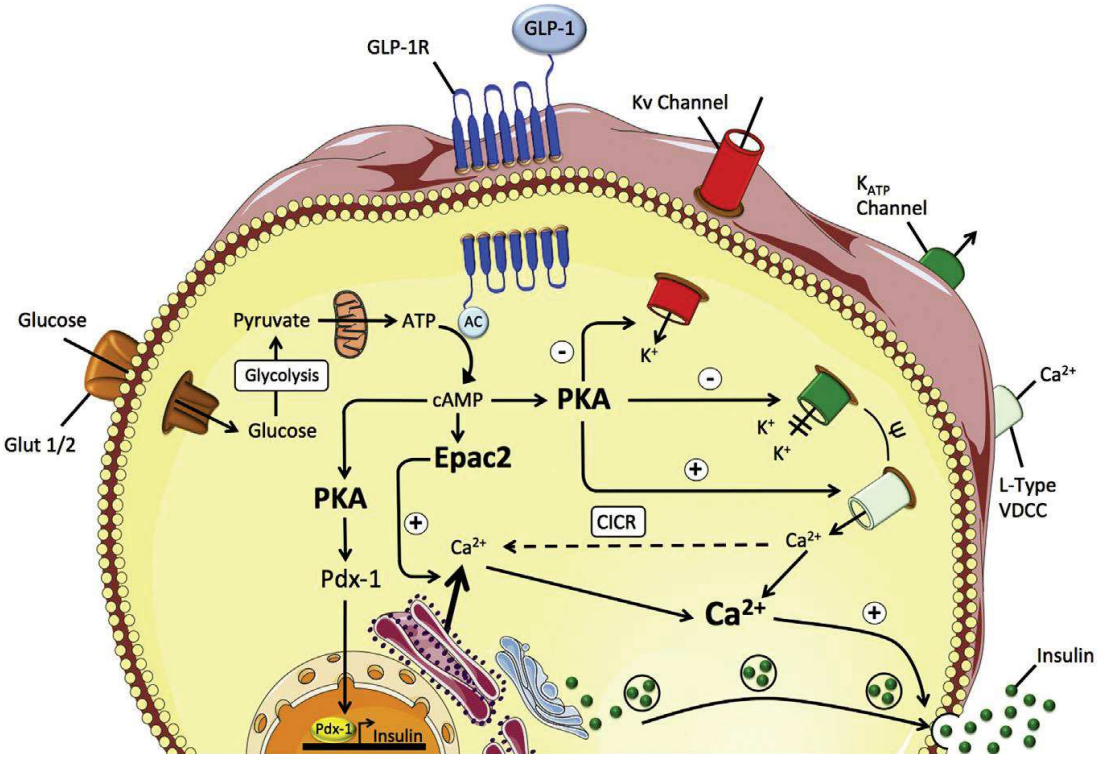


Figure 14 : Mécanisme d'action du GLP-1 sur la cellule β. L'élévation de l'AMPc induite par le GLP-1 entraîne l'activation de la PKA d'Epac. L'AMPc active la PKA, qui phosphoryle la sous-unité β2 des Ca_V et potentiellement les sous-unités Kir6.2 et SUR1. des K_{ATP}. Ceci sensibilise les canaux (Müller et al., 2019).

Une hypothèse propose une régulation de la sécrétion d'insuline par le **glucose** lui-même, indépendamment de son métabolisme, grâce à l'existence d'un glucorécepteur : le glucose serait capable d'activer un récepteur à la surface des cellules β, appelé « *glucose-sensing receptor* », pour

stimuler son propre métabolisme. Ce glucorécepteur serait un hétérodimère entre un RCPG similaire au récepteur du goût exprimé sur les cellules gustatives de la langue, et un RCPG calcium-sensing receptor. L'activation de cet hétérodimère par le glucose provoquerait une augmentation rapide d'AMPc et de calcium intracellulaire dans la cellule β ; le calcium étant décrit comme un activateur des enzymes calcium-dépendantes du cycle de Krebs nécessaires au métabolisme du glucose (Kojima et al., 2017).

Les **lipides** sont impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline par l'intermédiaire d'un récepteur exprimé à la surface des cellules, ou en tant que facteurs couplés au métabolisme (MCF) au niveau intracellulaire. D'une part, les acides gras libres sont décrits pour activer des récepteurs de surface FFA1/GPR40 (FFAR1), récepteurs couplés aux protéines $G\alpha_q$, afin de stimuler la sécrétion d'insuline (Imai et al., 2020). D'autre part, l'action intracellulaire des lipides suit l'hypothèse de la cascade de signalisation métabolique ACC/malonyl-CoA/CPT-1. Le métabolisme du glucose conduit à la formation de citrate, métabolite intermédiaire du cycle de Krebs, lequel peut sortir de la mitochondrie pour participer à la formation d'acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACL). L'acétyl-CoA, peut être carboxylé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) pour donner le malonyl-CoA. Celui-ci est un inhibiteur de la carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1), et inhibe donc le transport des acides gras vers la mitochondrie où se produit normalement la β-oxydation lipidique. En résulte la suppression de la β-oxydation et une stimulation de la signalisation lipidique par l'accumulation d'acides gras libres cytosoliques. Les acides gras n'ont alors pas d'autre choix que de rentrer dans le cycle glycérolipides/acides gras libres (GL/FFA) pour fournir, entre autres, du monoacylglycérol (MAG), un activateur de la protéine Munc 13-1 impliquée dans les mécanismes d'exocytose. Par ailleurs, les acides gras libres nouvellement formés par le cycle GL/FFA peuvent également sortir de la cellule et activer les récepteurs FFAR1 (Prentki et al., 2020).

Certains **acides aminés** sont aussi capables de moduler la sécrétion d'insuline. Les mécanismes impliqués peuvent mettre en jeu des enzymes importantes comme la glutamate déshydrogénase (GDH), alors que l'exposition chronique à certains acides aminés influence l'expression de plusieurs gènes. L'effet et l'action des principaux acides aminés sur la cellule β sont décrits ci-dessous.

Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur clé dans le système nerveux central ; il est aussi un modulateur important de la fonction et de la viabilité des cellules endocrines. Au niveau des cellules β pancréatiques, il peut se lier sur ses récepteurs spécifiques au niveau de la membrane plasmique ou avoir des actions intracellulaires, mais ses produits de dégradation sont également actifs sur la sécrétion d'insuline. Les cellules α expriment fortement les récepteurs au glutamate AMPA (acide α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionique) et kaïnate et la liaison du glutamate à ces récepteurs permet l'entrée d'ions sodium dans la cellule pour induire sa dépolarisation. Celle-ci active les Ca_V qui déclenchent un influx de calcium dans la cellule et la sécrétion de glucagon, le glucagon étant capable d'amplifier la sécrétion d'insuline. Les cellules α libèrent également du glutamate de façon concomitante au glucagon. Il peut ainsi agir comme boucle d'amplification pour soutenir la libération de glucagon. Les cellules β et δ expriment également les récepteurs AMPA/Kaïnate pour activer directement la sécrétion d'insuline et de somatostatine, respectivement. En outre, la cellule β exprime les récepteurs NMDA (N-methyl-D-aspartate) qui agissent comme régulateurs négatifs. Ces récepteurs induisent une réouverture des K_{ATP}, et ouvrent les SK4 (*small conductance Ca^{2+}-activated K^+ channel 4*), d'où une repolarisation de la membrane et et une inhibition de la sécrétion d'insuline (Otter and Lammert, 2016; Maechler, 2017). **Figure 15A**. Au niveau intracellulaire, le glutamate agit sur de nombreuses voies, en raison de sa place à l'interface entre le métabolisme des acides aminés, du glucose et des lipides. Tout d'abord, il est capable d'améliorer l'exocytose des vésicules de sécrétion en intervenant dans la signalisation incrétine/AMPc. Le glutamate peut aussi être désaminé par oxydation grâce à la GDH pour former de l'α-cétoglutarate et l'ion ammonium (NH_4^+), avec formation de cofacteurs réduits (NADH et NADPH). Les cofacteurs réduits stimulent la sécrétion d'insuline via la phosphorylation oxydative, alors que l'α-cétoglutarate est un intermédiaire du cycle de Krebs. Le glutamate est également un précurseur essentiel de la synthèse de glutathion, puissant antioxydant. Enfin, le glutamate peut être décarboxylé en acide γ-aminobutyrique (GABA) puis en γ-hydroxybutyrate (GHB), lesquels peuvent sortir de la cellule β et agir sur les cellules endocrines adjacentes. (Gheni et al., 2014; Otter and Lammert, 2016; Maechler, 2017). **Figure 15B**.

La glutamine est l'acide acide aminé le plus abondant du sang, mais n'a pas d'effet sur la sécrétion d'insuline par elle-même. Sous l'action de la glutaminase, elle est rapidement transformée en glutamate. L'activation de la GDH par la leucine conduit ensuite à la formation d'α-cétoglutarate, intermédiaire du cycle de Krebs (Keane and Newsholme, 2014). **Figure 15B**.

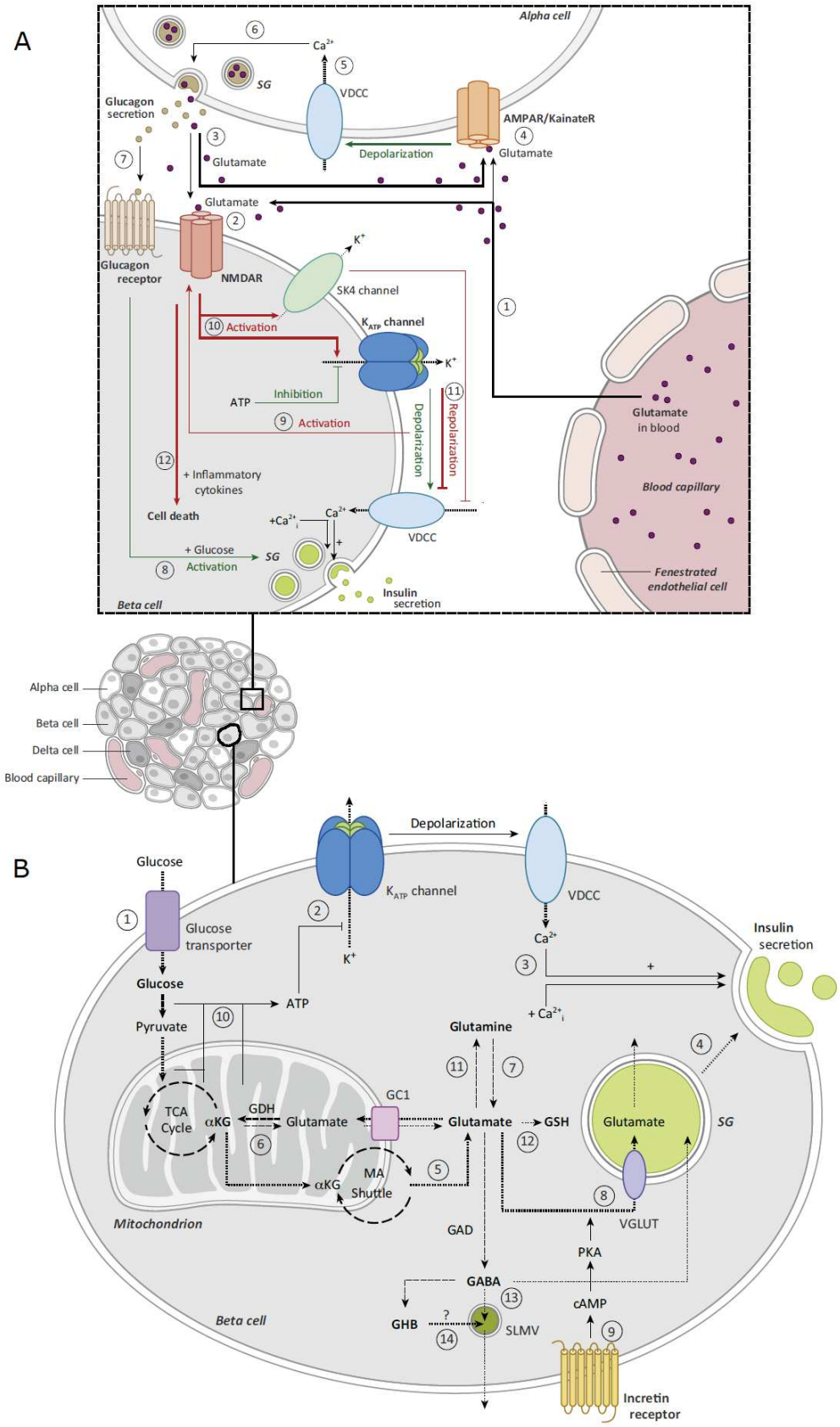


Figure 15 : Mécanismes d'action extracellulaires (A) et intracellulaires (B) du glutamate dans la régulation de la sécrétion d'insuline (Otter and Lammert, 2016).

L'arginine est un acide aminé chargé positivement. Il entre dans la cellule β grâce au transporteur d'acides aminés mCAT2A. La dépolarisation membranaire induite *via* ce transporteur électrogénique provoque une augmentation du calcium intracellulaire *via* l'ouverture des Ca_V pour déclencher la sécrétion d'insuline. Dans la cellule, l'arginine peut être converti en glutamate pour exercer des effets antioxydants. Cependant, un effet néfaste du métabolisme de l'arginine dépendant du monoxyde d'azote (NO) peut aussi s'observer : le NO est produit à partir de l'arginine par l'action de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). Des niveaux élevés de NO interférent avec les fonctions mitochondriales (Newsholme and Krause, 2012; Keane and Newsholme, 2014; D'Antona, 2015).

De nombreux mécanismes peuvent expliquer l'effet de la leucine sur la sécrétion d'insuline. Premièrement, la leucine est un puissant activateur de la GDH, ce qui augmente, en présence de glutamate, l'activité du cycle de Krebs par la production d'α-cétoglutarate. Ensuite, le métabolisme de la leucine produit de l'α-cétoïsocaproate (KIC) par transamination, puis de l'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs. En plus de ses effets sur la sécrétion d'insuline, la leucine est l'acide aminé le plus efficace pour activer le complexe mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1), la voie mTORC1 étant un régulateur clé de la croissance et de la prolifération cellulaire (de Oliveira et al., 2011).

Enfin, l'alanine entre dans la cellule β grâce à un co-transport avec le sodium. L'entrée de sodium induit une dépolarisation de la membrane et déclenche une sécrétion d'insuline. Au niveau intracellulaire, l'alanine peut ensuite être métabolisée en pyruvate et rejoindre le métabolisme insulino-sécréteur du glucose (Newsholme and Krause, 2012; Keane and Newsholme, 2014).

La densité des cellules endocrines et des vaisseaux sanguins dans les îlots de Langerhans facilite un réseau de **signalisation paracrine** médié par la proximité, le contact intercellulaire *via* les jonctions gap et le flux sanguin local. Comme décrit précédemment, en réponse à une augmentation de la glycémie, le métabolisme du glucose par les cellules β conduit à une dépolarisation membranaire, consécutive à l'augmentation du ratio ATP/ADP et à la fermeture des K_{ATP}. Les jonctions gap liant les cellules β permettent la transmission de ce signal électrique pour induire une dépolarisation et une sécrétion d'insuline dans les cellules β adjacentes. Cependant la régulation paracrine de la sécrétion d'insuline résulte également de l'action de plusieurs hormones sécrétées par les autres cellules des îlots de Langerhans. En réponse à une élévation de glucose, les cellules α sécrètent du glucagon pour

prévenir les risques d'hypoglycémie au niveau systémique. Le glucagon est une hormone hyperglycémiante produite et sécrétée par les cellules α en réponse à une baisse de la glycémie, mais qui exerce aussi un effet stimulateur sur la sécrétion d'insuline par les cellules β, par l'intermédiaire de son récepteur GcgR, RCPG couplé à une protéine $G\alpha_s$. De nombreuses études suggèrent que les cellules α sont également capables de produire du GLP-1. Celui-ci potentialise la sécrétion d'insuline en se liant sur son récepteur GLP-1R, mais il est aussi capable d'activer le récepteur du glucagon GcgR (Hartig and Cox, 2020). Face à ces effets activateurs, la somatostatine, produite par les cellules δ, inhibe la sécrétion d'insuline *via* les récepteurs SSTR 1/5. Il s'agit de récepteurs couplés à la protéine $G\alpha_i$, inhibitrice de l'adénylate cyclase et des canaux calciques voltage dépendants. En outre, cette protéine $G\alpha_i$ est aussi capable d'induire la repolarisation de la membrane, ainsi qu'une inhibition de l'activité électrique *via* l'ouverture de canaux potassiques rectificateurs GIRK (*G protein–activated inward rectifier K⁺*) (Hartig and Cox, 2020). **Figure 16**.

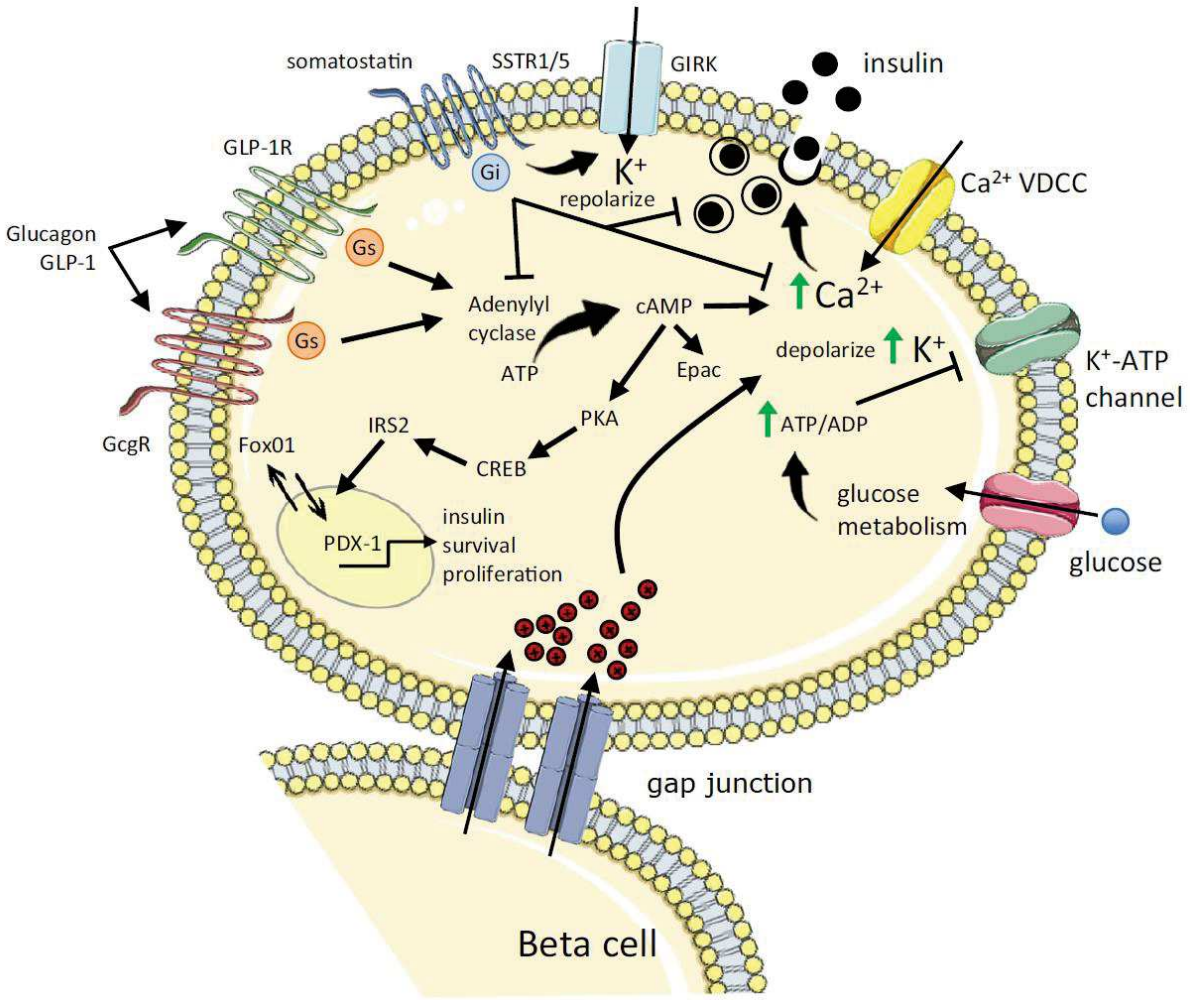


Figure 16 : Régulation paracrine de la cellule β pancréatique (Hartig and Cox, 2020).

Plus généralement concernant les régulations paracrines au sein de l'îlot de Langerhans, chaque sous-type cellulaire exerce un contrôle sur les autres cellules. Ainsi, les principales sécrétions hormonales (insuline, glucagon et somatostatine) sont finement contrôlées afin de maintenir l'homéostasie glucidique. **Figure 17**. Les cellules α sécrètent du glucagon et du GLP-1, capable de favoriser la sécrétion d'insuline par les cellules β, mais aussi la sécrétion de somatostatine par les cellules δ afin d'initier une boucle de rétrocontrôle négatif. En effet, la somatostatine inhibe en retour la sécrétion de glucagon et d'insuline. L'insuline quant à elle, inhibe la sécrétion de glucagon pour maintenir un état anabolique après le repas (Hartig and Cox, 2020). Il est à noter que les cellules β sont couplées aux cellules δ via des jonctions gap, facilitant la transmission des signaux électriques entre ces cellules (Briant et al., 2018). Par ailleurs, la cellule β, en plus de l'insuline, libère d'autre molécules à action paracrine. L'urocortine 3 et l'acide γ-aminobutyrique (GABA) provenant des granules de sécrétion d'insuline sont décrits comme médiateurs probables des effets stimulateurs des cellules β sur la somatostatine, bien que le GABA inhibe la sécrétion de glucagon. **Figure 18**. Enfin, la ghréline, connue pour son effet incitatif sur la prise alimentaire au niveau cérébral, est aussi produite par les cellules ε des îlots de Langerhans. Elle inhiberait la sécrétion d'insuline et de glucagon par l'intermédiaire de la libération de somatostatine (Hartig and Cox, 2020).

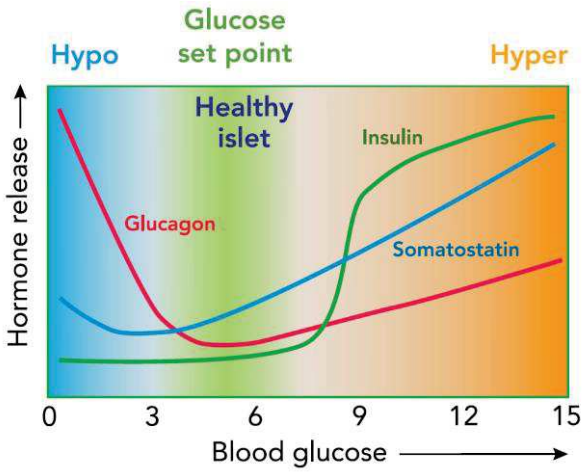


Figure 17 : Profils de sécrétion de l'insuline, du glucagon et de la somatostatine en fonction de la glycémie (Huising et al., 2018).

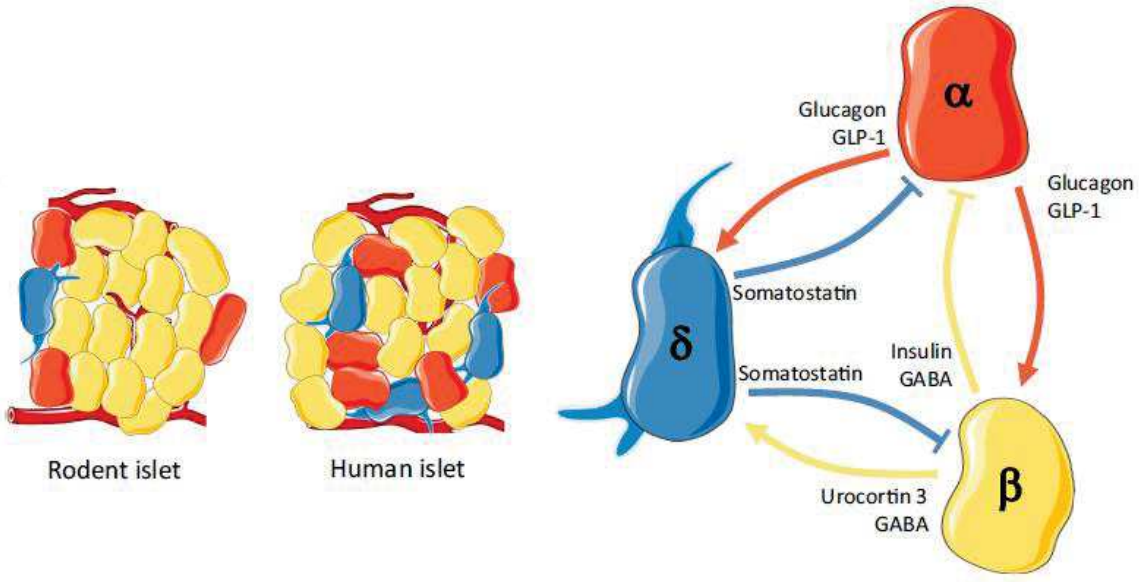


Figure 18 : Régulation paracrine dans les îlots de Langerhans (Hartig and Cox, 2020).

2 Le diabète de type 2

2.1 Définition et épidémiologie

Le diabète sucré, ou diabète mellitus (du grec διαβήτης : siphon, provenant lui-même de δια : au travers et βαίνειν : aller, passer, et du latin mellitus : doux comme le miel), très généralement simplement nommé diabète par abus de langage, est un trouble du métabolisme du glucose caractérisé par une élévation chronique de la glycémie. Cette terminologie provient du fait de l'abondance des urines des patients et de leur goût sucré. Il se différencie de ce que l'on appelle diabète insipide, qui est une tout autre pathologie correspondant à un défaut de concentration des urines par le rein et sans augmentation de la glycémie. Il existe plusieurs types de diabète sucré, dont les plus fréquents sont le diabète de type 1 et le diabète de type 2. Le diabète de type 1 survient généralement au cours de l'enfance et correspond à une destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Le diabète de type 2 apparait plus tardivement et combine une résistance à l'action de l'insuline par les tissus cibles et une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. Parmi les autres types de diabète, on retrouve notamment le diabète gestationnel, qui peut survenir à n'importe quel moment de la grossesse, et le diabète monogénique, qui regroupe de nombreux sous-types et résulte de la mutation d'un seul gène spécifique à chaque sous-groupe. Enfin, certaines pathologies peuvent être à l'origine de l'apparition d'un diabète : atteintes du pancréas (pancréatite, traumatisme…), troubles endocriniens, certaines infections, et certains médicaments. Cependant, le diabète de type 2 est le plus courant : il représente 90 % des cas de diabète (FID, 2019). Le diabète de type 2 est également appelé diabète non insulino-dépendant, par opposition au diabète de type 1, qui est, lui, insulino-dépendant.

Le diagnostic de diabète de type 2 est établi lorsque la glycémie, après un jeûne de 8 heures, est supérieure à 1,26 $g.L^{-1}$ (7 $mmol.L^{-1}$), et vérifiée à 2 reprises. Un autre critère peut aussi intervenir dans le diagnostic : un syndrome polyuro-polydipsique accompagné d'une glycémie post-prandiale supérieure à 2 $g.L^{-1}$ (11,1 $mmol.L^{-1}$). L'organisation mondiale de la santé (OMS) propose une démarche diagnostique avec une valeur de glycémie supérieure à 2 $g.L^{-1}$ lors d'un test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (2h après l'ingestion de 75 g de glucose). Les recommandations de l'*American Diabetes Association* (ADA) préconisent également l'utilisation de l'hémoglobine glyquée (HbA1c), avec un taux supérieur ou égal à 6,5 % en cas de diabète. L'HbA1c reflète l'équilibre glycémique des trois derniers mois avant le dosage et permet un suivi fidèle et fiable de la glycémie au cours du diabète

(Recos, 2013; HAS, 2014; VIDAL, 2020). Lorsque la valeur de la glycémie à jeun se situe entre 1,1 et 1,25 $g.L^{-1}$ (6,1 et 7 $mmol.L^{-1}$), on parle de prédiabète.

Le diabète est considéré comme la première pandémie mondiale due à une pathologie non infectieuse. Sa prévalence est en constante augmentation, et engendre un coût humain, social et économique majeur. Il s'agit d'une menace sanitaire importante qui ne connait pas de frontières et qui n'est pas déterminé par des facteurs sociaux-économiques. En 2019, on évalue à 463 millions le nombre d'adultes (de 20 à 79 ans) atteints de diabète dans le monde, soit une prévalence de 9,3 %, avec une estimation de 700 millions à l'horizon 2045. L'âge est un facteur de risque important et fait augmenter la prévalence du diabète qui atteint 19,3 % (135,6 millions de personnes) de la population âgée de 65 à 99 ans. La fédération internationale du diabète (FID, 2019), estime également qu'un adulte diabétique sur deux ignore qu'il est atteint de diabète. Les complications dues au diabète sont généralement graves et souvent fatales. Ainsi, en 2019, 4,2 millions d'adultes (entre 20 et 79 ans) sont décédés des suites du diabète, ce qui correspond à un décès toutes les 8 secondes, et à 11,3 % de la mortalité dans cette tranche d'âge, toutes causes confondues. Ces complications ont un fort impact social en diminuant la qualité de vie. Elles nécessitent un suivi et une prise en charge adaptés, et sont source de stress important pour le patient et pour ses proches. La prise en charge du diabète et de ses complications constitue également un poids considérable sur la société, en terme de coût économique. En effet, les dépenses de santé liées au diabète ont représenté un coût total de 760 milliards de dollars US pour l'année 2019, soit près de 10 % des dépenses totales de santé (7 800 milliards de dollars US en 2017). A ces dépenses s'ajoutent des coûts indirects, provenant de la perte de revenus à cause de la réduction de la population active et de la mortalité prématurée. En France, en 2019, on dénombrait 4,5 millions de personnes diabétiques, dont environ 1 million l'ignorant (FID, 2019; OMS, 2019). Par ailleurs, sur les 164 milliards d'euros de dépense de l'assurance maladie en 2017, 8,3 milliards d'euros ont été alloués à la prise en charge du diabète (Assurance Maladie).

2.2 Facteurs de risques

Les facteurs de risque de développer un diabète de type 2 sont nombreux et peuvent être génétiques comme environnementaux. Parmi les facteurs de risques environnementaux, le principal est la **surcharge pondérale**, et plus particulièrement l'excès de masse grasse. En effet, on estime que chez les personnes en surpoids, caractérisé par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à

25 kg/m², ou en obésité, dont l'IMC est supérieur à 30 kg/m², la prévalence du diabète est multipliée par 3 et 6 respectivement. La **sédentarité** et l'**inactivité physique** font également parties des facteurs de risque majeurs, car elles favorisent l'installation d'un excès pondéral, tout comme une **alimentation** riche en graisse (notamment en acides gras saturés) et en sucre (notamment la consommation de boissons sucrées), et pauvre en fibre alimentaire. L**'âge** est également un facteur de risque important, puisque la prévalence du diabète augmente considérablement après 45 ans. L'**origine ethnique** peut aussi jouer un rôle dans la survenue du diabète : l'adoption d'un mode de vie occidental (alimentation, sédentarité…) par des personnes non caucasiennes (africaines, asiatiques…) a démontré un risque majoré de développer un diabète dans ces populations par rapport aux personnes caucasiennes. Le **tabagisme** et certaines pathologies comme l'**hypertension artérielle** et les **dyslipidémies** sont aussi décrits comme favorisant l'apparition de diabète. Les **antécédents familiaux**, ainsi que le **diabète gestationnel** augmentent le risque de développer un diabète. Sur le plan génétique, de nombreuses études se sont intéressées au génome de patients diabétiques. Plus de 40 gènes impliqués dans le diabète ont été identifiés (HAS, 2014; OMS, 2016; Khan et al., 2019; Mahat et al., 2019). Enfin, une dysrégulation de l'homéostasie glucidique, et notamment le prédiabète, nécessite une attention particulière, afin d'éviter l'évolution vers le diabète de type 2. Les facteurs de risque de développer un diabète de type 2 sont donc très nombreux et extrêmement variés. Une étude récente a également montré que les personnes de petites tailles étaient plus à risque de développer un diabète : le risque de diabète de type 2 diminuant de plus de 30 % tous les 10 cm. Ceci s'expliquerait en partie par un meilleur profil cardio-métabolique et une meilleure répartition des graisses (Wittenbecher et al., 2019).

2.3 Physiopathologie

2.3.1 Evolution de la maladie

Le diabète de type 2 commence dès le stade du prédiabète. Au cours de cette phase, on observe des mécanismes de résistance à l'insuline : l'insuline ne joue plus son rôle au niveau des tissus cibles et parvient plus difficilement à faire baisser la glycémie. Les cellules β pancréatiques vont alors compenser cette perte d'efficacité de l'insuline par une augmentation de sa sécrétion (hypersécrétion compensatoire). La glycémie à jeun parvient à être maintenue en-dessous de 1,26 g/L. En raison de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux décrits plus haut, le stade prédiabète

peut évoluer vers le stade de diabète de type 2. A ce stade, les cellules β n'arrivent plus à compenser la résistance à l'insuline, et un déficit de la sécrétion d'insuline est alors observé. Il en résulte une hyperglycémie chronique. **Figure 19**. En effet, au stade diabète de type 2, des mécanismes de lipo- et gluco-toxicité, ainsi qu'une inflammation de bas grade, contribuent à la dysfonction et l'apoptose des cellules β. Cependant, dès le stade de prédiabète, on observe ces processus d'inflammation et de lipotoxicité délétères pour la cellule β. La cellule β pancréatique joue donc un rôle majeur dans la physiopathologie du diabète de type 2.

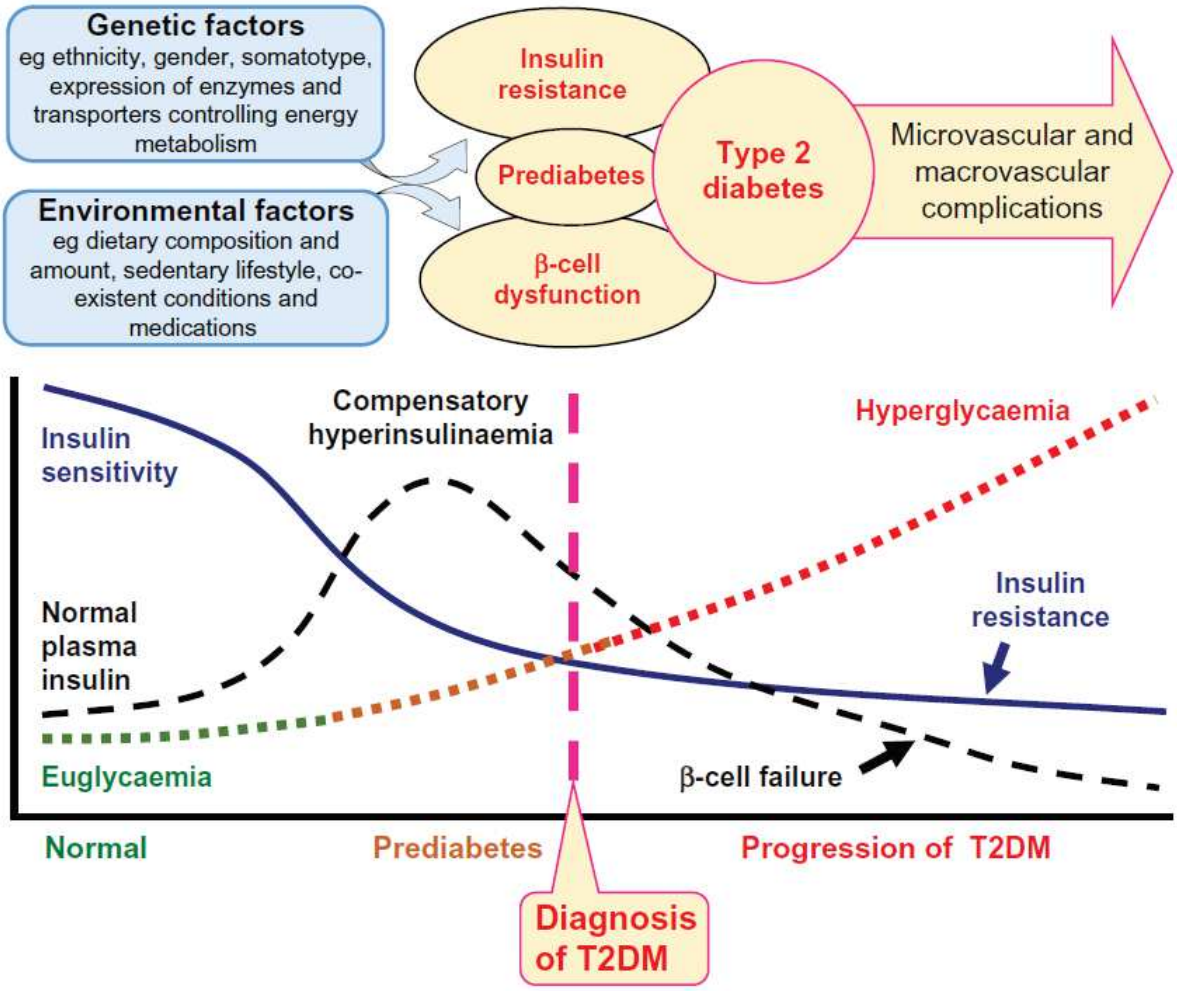


Figure 19 : Résistance à l'insuline et dysfonction des cellules β pendant le développement et la progression de l'hyperglycémie au cours du diabète de type 2 (Bailey and Day, 2018).

2.3.2 Résistance à l'insuline des tissus périphériques

La diminution de sensibilité à l'insuline résulte de plusieurs mécanismes physiopathologiques dont une lipotoxicité et une inflammation chronique. Des études ont également montré une part génétique et mis en évidence l'influence du microbiote intestinal (Pernet and Petriccioli, 2011). Au cours de l'insulino-résistance, on observe une diminution du nombre et de l'affinité des récepteurs à l'insuline. Les voies de transduction du signal au niveau intracellulaire sont également altérées et mènent à un défaut de translocation du transporteur au glucose GLUT4 à la membrane plasmique. De plus, l'excès de nourriture entraîne une hypertrophie et une hyperplasie du tissu adipeux, et un dépôt ectopique d'adipocytes, principalement dans les muscles et le foie. Ceci conduit à une dysfonction du tissu adipeux, pouvant être due à une hypoxie locale, et entraînant une apoptose des cellules adipeuses. L'infiltration de macrophages et la libération de TNF-α et d'interleukines (IL-1β et IL-6) sont les premiers signes du développement d'une inflammation chronique. Cette réaction inflammatoire, d'abord locale, augmente la lipolyse directement avec une libération d'acides gras non estérifiés (NEFA) et de glycérol et *via* l'inhibition de la signalisation de l'insuline. Au niveau hépatique, les acides gras produisent de l'acétyl-CoA, et le glycérol est converti en glucose, ce qui favorise la synthèse de triglycérides et la néoglucogenèse. Au niveau musculaire, les acides gras sont oxydés préférentiellement au glucose et produisent de l'acétyl-CoA qui va inhiber la voie de la glycolyse. La baisse de captation et de la dégradation du glucose, ainsi que la synthèse hépatique du glucose concourent à l'augmentation de la glycémie (Johnson and Olefsky, 2013; Petersen and Shulman, 2018; Roden and Shulman, 2019; Sikalidis and Maykish, 2020). **Figure 20**. Enfin, certaines études rapportent que l'insulino-résistance pourrait être secondaire à une hypersécrétion d'insuline. En effet, l'insuline favorise le stockage des lipides et participe à la prise de poids (Erion and Corkey, 2018).

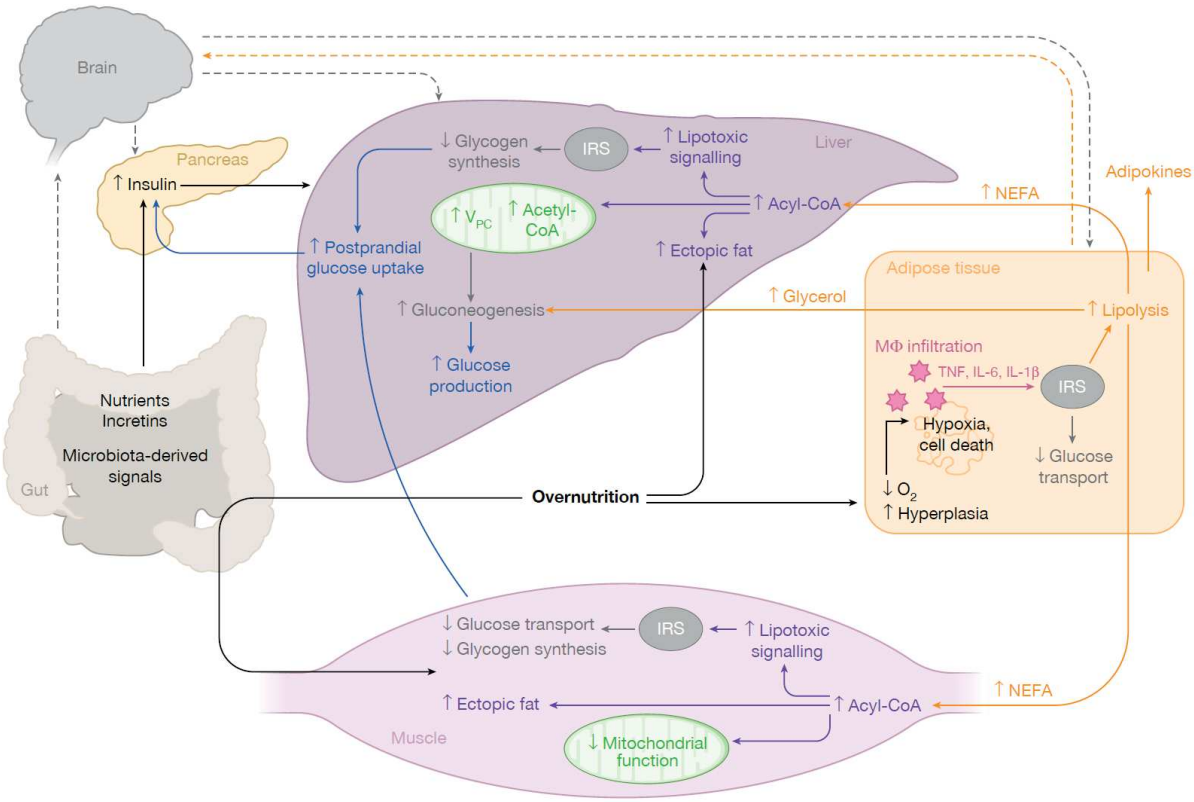


Figure 20 : Mécanismes impliqués dans la résistance à l'insuline (Roden and Shulman, 2019).

2.3.3 Défaut de sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques

Le diabète de type 2 se traduit par une dysfonction, et une apoptose des cellules β pancréatiques, et donc par un déficit de la sécrétion d'insuline (associé à l'insulino-résistance), ce qui souligne le rôle central de ces cellules dans la physiopathologie de cette maladie. Les mécanismes aboutissant à cette dysfonction sont nombreux, et résultent principalement d'une glucolipotoxicité et d'une inflammation chronique. Ces mécanismes peuvent toucher directement la physiologie et les systèmes de régulation de la cellule β, ou perturber l'expression de plusieurs gènes (Poitout et al., 2010; Lytrivi et al., 2020). **Figure 21**.

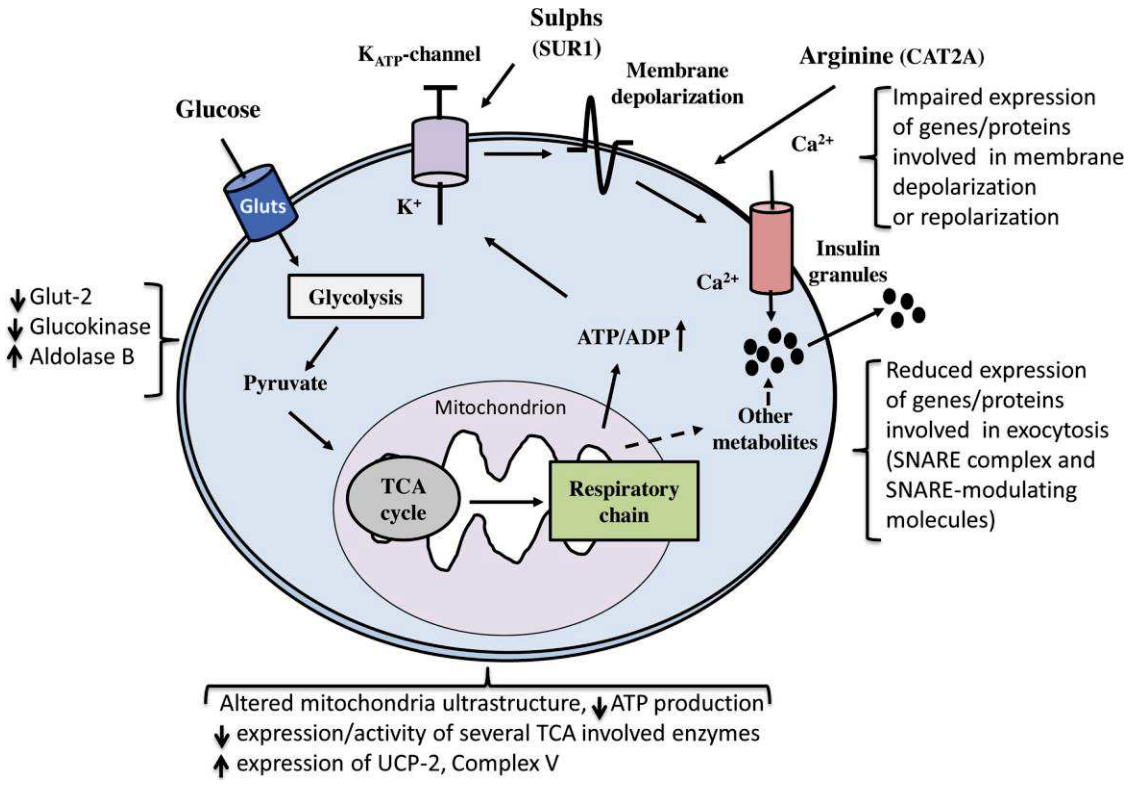


Figure 21 : Principales altérations observées lors de la dysfonction des cellules β au cours du diabète de type 2 (Marchetti et al., 2020).

Les mécanismes moléculaires conduisant à une **lipotoxicité** des acides gras sont complexes et pléiotropiques, et restent encore mal connus actuellement. Cependant, bien que les acides gras à longue chaîne soient des stimulateurs efficaces de la sécrétion d'insuline, une élévation chronique de leur taux circulant conduit à l'inverse à une détérioration de la sécrétion d'insuline. Ils favorisent en effet le développement de stress oxydant, induisent l'apoptose des cellules β, peuvent altérer les voies de signalisation intracellulaire et la composition des membranes. La métabolisation des acides gras libres à longue chaîne consiste en une β-oxydation peroxysomale, puis une β-oxydation mitochondriale. Ces oxydations peroxysomales et mitochondriales des acides gras à longue chaîne sont la première source de production d'anions superoxydes, radicaux libres dérivés de l'oxygène, à fort potentiel oxydant et responsables du stress oxydant (Ježek et al., 2018; Lytrivi et al., 2020).

Le diabète est caractérisé par une élévation chronique de la glycémie. La cellule β est donc exposée à un environnement riche en glucose, induisant une **glucotoxicité**. Les mécanismes mis en jeux sont nombreux et encore non complétement élucidés. En présence d'une élévation chronique de

la glycémie, la cellule β est sur-stimulée. Elle n'est pas capable de produire assez d'insuline en réponse au flux élevé continu de glucose, tandis que les réserves d'insuline s'épuisent. Sur le plan métabolique, l'excès de glucose implique une augmentation de l'utilisation des voies alternatives à la glycolyse comme la voie de l'hexosamine, la voie du sorbitol et la formation de dihydroxyacétone et de diacylglycérol. Le glucose peut également réagir spontanément avec des résidus d'amine sur les protéines, les lipides et les acides nucléiques pour former des adduits covalents stables appelés AGE (*advanced glycation end-products*). Des conditions d'hyperglycémie favorisent cette glycation non enzymatique conduisant à des altérations structurelles des protéines intracellulaires. Les AGE peuvent également exercer leurs effets toxiques par diffusion hors de la cellule et activer les RAGE (*Receptor of advanced glycation end-products*) pour déclencher diverses cascades de signalisation, comme l'activation du facteur nucléaire NF-κB, impliqué dans les réponses immunes et pro-inflammatoires. Tous ces mécanismes peuvent favoriser l'apparition de stress oxydant, de stress du réticulum endoplasmique, et de syndrome inflammatoire (Bensellam et al., 2012; Lytrivi et al., 2020). De plus le glucose engendre une exacerbation des effets néfastes des acides gras. L'apparition plus marquée des effets délétères de la lipotoxicité en condition de d'hyperglycémie est à l'origine du concept de **glucolipotoxicité** (Prentki et al., 2002).

La présence d'un **syndrome inflammatoire** de bas grade est mise en évidence dans de nombreux troubles métaboliques tels que le diabète de type 2. Cette inflammation chronique, souvent causée par le surpoids ou l'obésité, est d'ailleurs considérée comme l'une des étiologies du diabète de type 2. On observe une infiltration de cellules immunitaires telles que les macrophages dans les îlots de Langerhans. Les mécanismes par lesquels ces macrophages altèrent la sécrétion d'insuline induite par le glucose ne sont pas entièrement compris, mais impliqueraient à la fois des facteurs solubles dérivés des macrophages et un contact direct de cellule à cellule entre les macrophages des îlots et les cellules β. En effet, on observe une sécrétion accrue de cytokines et de chimiokines principalement pro-inflammatoires, rendant l'environnement délétère pour les cellules β. Les cytokines telles que le TNF-α et l'IL-1β provoquent de nombreux dysfonctionnements en activant plusieurs voies de signalisation spécifiques comme les voies de signalisation de la JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) et du facteur nucléaire NF-κB, conduisant à un stress du réticulum endoplasmique et une baisse de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Les macrophages sont aussi capables de communiquer avec les cellules β par contact direct cellule-cellule. En plus des jonctions gap, ils peuvent générer des canaux ouverts appelés *tunneling nanotubes* (TNT), qui transportent du matériel cytoplasmique entre les cellules connectées pour réguler directement la sécrétion d'insuline des cellules β. Cependant, les macrophages peuvent aussi favoriser la prolifération des cellules β *via* l'activation de ERK (*Extracellular*

Signal-Regulated Kinase) par l'intermédiaire de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) qui se lie aux récepteurs PDGF (PDGFR) exprimés par les cellules β (O'Neill et al., 2013; Böni-Schnetzler and Meier, 2019; Ying et al., 2020). **Figure 22**.

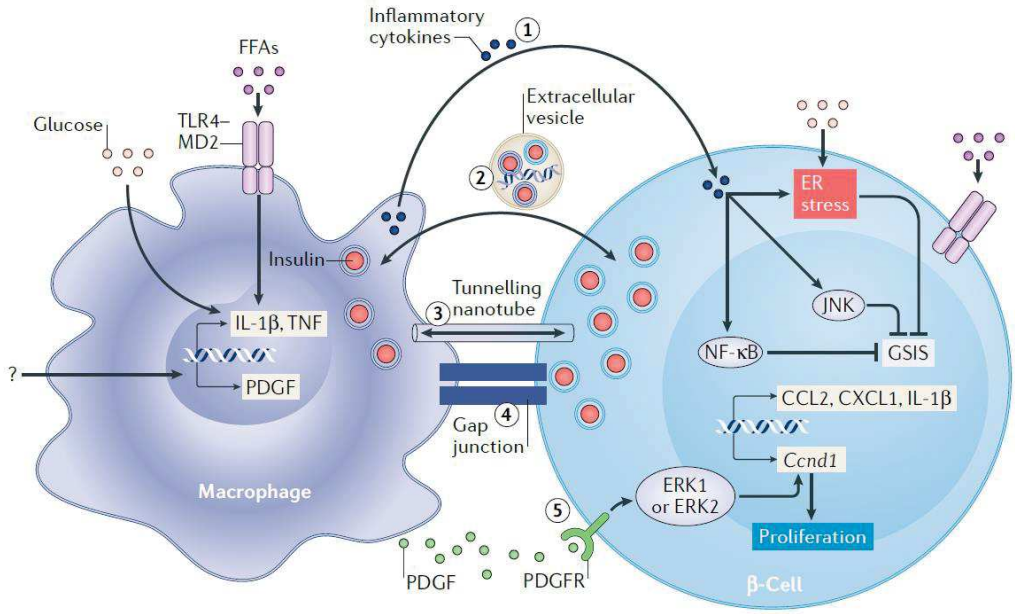


Figure 22 : Régulation de la cellule β pancréatique par les macrophages (Ying et al., 2020)

Les cellules β sont très sensibles au **stress oxydant** car elles expriment peu d'enzymes antioxydantes pour combattre les anions superoxydes générés en continu. La mitochondrie produit naturellement par la phosphorylation oxydative des ROS tels que l'anion superoxyde ($O2^{\bullet-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'anion superoxyde peut être converti en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD) puis en O_2 et en H_2O par des enzymes comme la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la peroxyrédoxine (Prx). La cellule β n'est équipée que d'environ 50% de SOD et 5% des enzymes réduisant le H_2O_2 (GPx et CAT) par rapport aux enzymes présentes dans les hépatocytes (Wang and Wang, 2017). **Figure 23**. La lipotoxicité, la glucotoxicité, ainsi que l'inflammation chronique favorisent l'apparition de stress oxydant, qui s'ajoute à celui physiologiquement présent. Les mécanismes par lesquels les ROS conduisent à une dysfonction des cellules β sont complexes. En raison de leur nature hautement réactive, les ROS peuvent altérer la conformation des protéines et donc corrompre leurs fonctionnalités. Cela peut toucher les protéines associées au transport membranaire des ions, les enzymes impliquées dans les régulations métaboliques, et les protéines régulant l'expression des gènes et la transduction du signal. Un des

principaux exemples des effets négatifs des ROS sur la fonction des cellules β et la sécrétion d'insuline concerne l'expression du gène de l'insuline *via* les principaux facteurs de transcription sensibles à l'oxydoréduction tels que PDX1 (*Pancreatic and Duodenal Homeobox 1*) et MafA (*V-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog A*). Ces deux facteurs de transcription sont des cibles pour les ROS et leur exposition à un stress oxydant inhibe leur interaction avec l'ADN, conduisant à une diminution de l'expression du gène de l'insuline. Les effets négatifs sur PDX1 sont médiés par la voie JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et le facteur de transcription FOXO1 (*Forkhead box Protein O1*) (Newsholme et al., 2019).

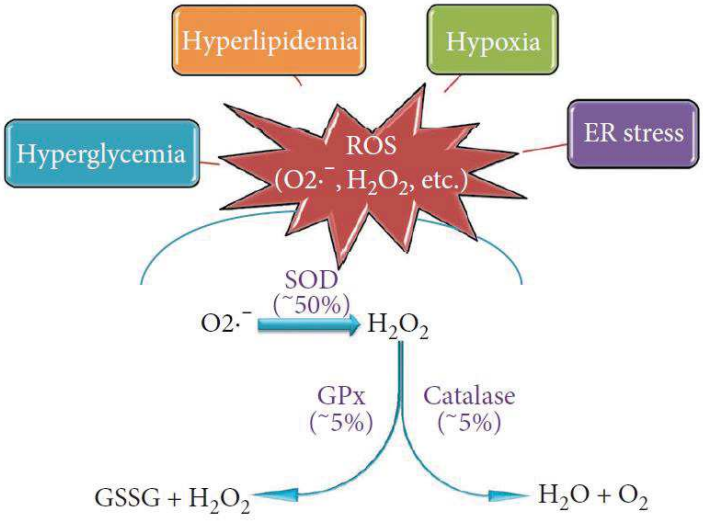


Figure 23 : Sources de ROS et leurs métabolismes dans la cellule β. Deux facteurs rendent les cellules β sensible au stress oxydatif : une génération endogène élevée de ROS induite par différents stimuli (hyperglycémie, hyperlipidémie, hypoxie, stress du RE) et une faible expression d'enzymes antioxydantes telles que la SOD, la catalase, et la GPx. Les pourcentages se réfèrent à la quantité d'expression de l'ARNm dans les îlots pancréatiques par rapport au tissu hépatique chez les rats. (Wang and Wang, 2017).

Le réticulum endoplasmique (RE) a un rôle central dans la synthèse lipidique, le stockage du calcium, et dans la synthèse et la bonne conformation des protéines. Par exemple, pendant la formation des ponts disulfures, deux électrons sont transférés aux deux cystéines du polypeptide par le site actif de la *Protein Disulfide Isomerase* (PDI). Ensuite, les PDI réduites reçoivent des électrons du dioxygène par une réaction d'oxydoréduction médiée par la *Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1* (ERO1), ce qui entraîne la formation de H_2O_2. Le glutathion rétablit alors l'état d'oxydation en piégeant le H_2O_2. Plusieurs stimuli, comme une demande accrue de synthèse protéique, dépassent la capacité

de repliement du RE et perturbent l'équilibre d'oxydoréduction, entraînant l'accumulation de protéines mal repliées. La présence d'un stress oxydant perturbe également l'équilibre d'oxydoréduction, et entraîne l'accumulation de protéines mal repliées. Cette accumulation de protéines mal repliées active des voies de signalisation spécifiques, et définit ce que l'on appelle le **stress du RE**. **Figure 24** (Burgos-Morón et al., 2019). La cellule cherche alors à rétablir l'homéostasie du RE en restreignant la traduction globale des protéines, en améliorant la capacité du RE à trouver la bonne conformation des protéines et en dégradant les protéines mal repliées. Lorsque cela ne peut être réalisé, les mécanismes d'apoptose sont déclenchés. Au cours du diabète de type 2, l'augmentation de la synthèse protéique due à la forte demande en insuline est en partie responsable du stress du RE. De plus, les acides gras comme le palmitate (palmitoylation des protéines), les taux élevés du glucose (glycation des protéines) et le stress oxydant participent également au développement du stress du RE. D'autre part, le glucose inhibe la *sarcoendoplasmic reticulum* Ca^{2+}-*ATPase* (SERCA) qui permet l'entrée de calcium dans le RE. Ainsi, on observe une déplétion de calcium dans le RE, et les protéines chaperonnes dépendantes du calcium ne peuvent plus replier les protéines correctement. A côté de cela, les lipides altèrent la composition membranaire. Ils déstructurent les microdomaines régulant l'entrée des protéines dans le RE ou spécialisés dans la formation de vésicules en vue de l'adressage vers l'appareil de Golgi. Ensemble, ces mécanismes conduisent à une baisse de la sécrétion d'insuline et à l'apoptose des cellules β (Lytrivi et al., 2020).

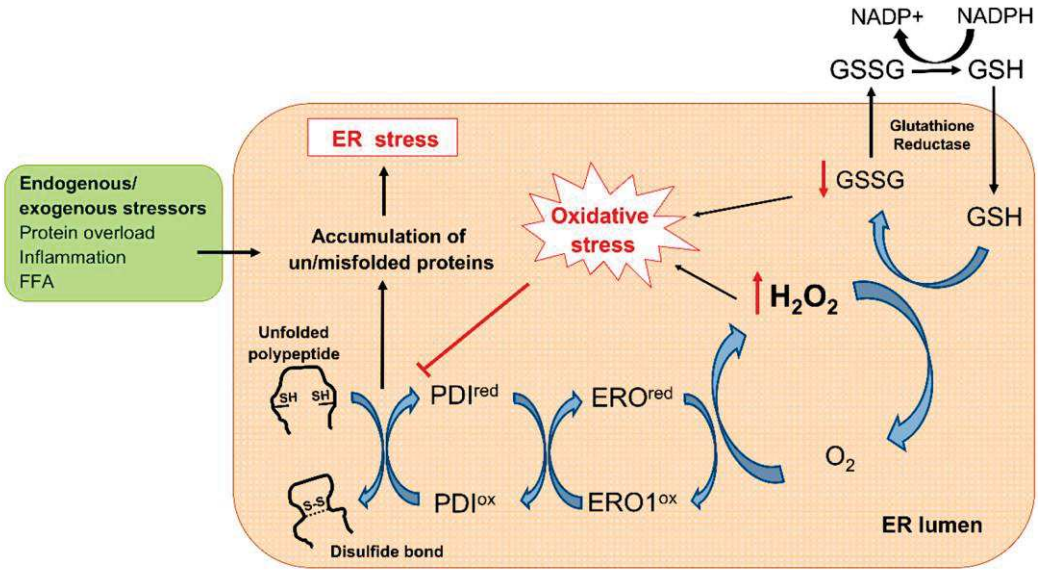


Figure 24 : Mécanismes simplifiés du développement du stress du réticulum endoplasmique. ER : Réticulum endoplasmique ; ERO1 : ER oxidoreductin 1 ; FFA : acides gras libres ; GSH : glutathion (forme réduite) ; GSSG : disulfure de glutathion (forme oxydée) ; NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ; PDI : Protein disulfide isomerase (Burgos-Morón et al., 2019).

Les cellules β pancréatiques des patients diabétiques présentent une **dysfonction de la mitochondrie**, avec une expression accrue des complexes I et V de la chaîne des phosphorylations oxydatives mitochondriale. On observe toutefois une baisse de la concentration intracellulaire d'ATP et du ratio ATP/ADP. Ce paradoxe s'explique par la surexpression de la *uncoupling protein 2* (UCP-2), protéine responsable d'un découplage de la synthèse d'ATP. Cette surexpression est induite par un environnement hyperglycémique et hyperlipidique. Par ailleurs, la production d'anions superoxydes par la chaîne de transport d'électrons augmente l'activité d'UCP-2. En conséquence, UCP-2 est sur-exprimée et sur-activée, ce qui conduit à une augmentation marquée de la fuite de protons médiée par UCP-2. Ainsi, le métabolisme du glucose produit moins d'ATP et n'est plus en mesure de déclencher efficacement les mécanismes de sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Lowell and Shulman, 2005; Pinti et al., 2019; Marchetti et al., 2020). **Figure 25**.

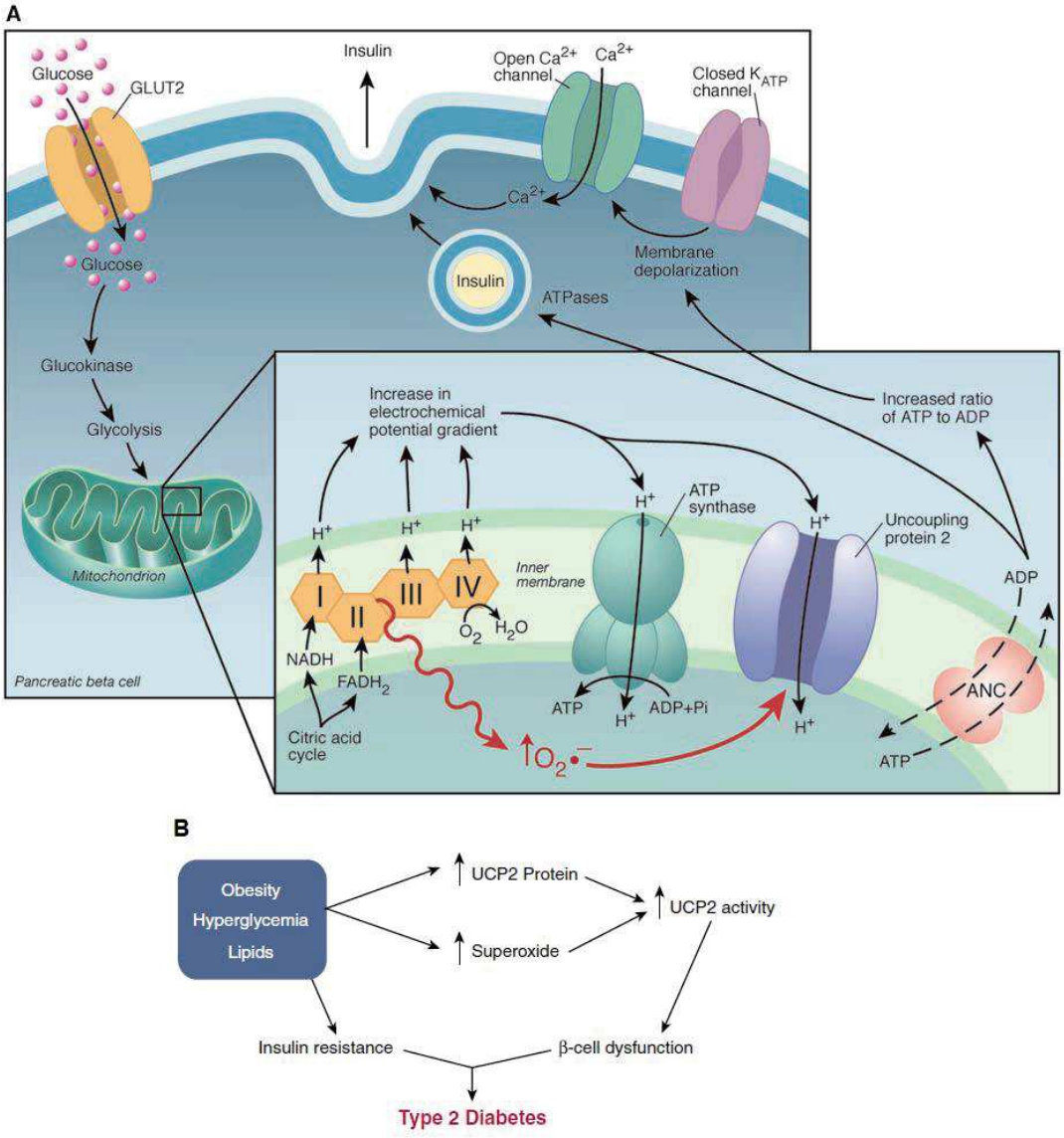


Figure 25 : Implication d'UCP-2 dans la dysfonction mitochondriale des cellules β (A) et sa régulation (B) au cours du diabète de type 2 (Lowell and Shulman, 2005).

La complexité des mécanismes d'**exocytose** des vésicules d'insuline explique sa vulnérabilité dans la physiopathologie du diabète de type 2. En effet, on constate une diminution significative de l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes d'exocytose (Andersson et al., 2012). Certaines protéines telles que SNARE ou Sec1/Munc18 voient leur expression réduite dans la cellule β, alors que d'autres montrent un niveau d'expression normal. Il en résulte la formation de complexes SNARE incomplets et inhibiteurs, qui entrent en compétition avec les complexes SNARE complets (Thurmond and Gaisano, 2020). On observe également, au cours du diabète, une perte de la proximité des vésicules d'insuline rapidement mobilisables (RRP) avec les microdomaines riches en Ca_V responsables de l'influx calcique. La concentration en calcium autour de ces vésicules n'est alors pas suffisante pour déclencher leur exocytose (Lytrivi et al., 2020).

La diminution de la masse de cellule β observée au cours du diabète de type 2, est vraisemblablement due à une mortalité accrue et à une régénération réduite des cellules. La mort des cellules β se produit principalement par **apoptose**. L'apoptose est un processus complexe qui peut être induit par l'activation de la voie de signalisation des caspases et des protéines de la famille Bcl agissant *via* la caspase 3. En principe, la régénération des cellules β se produit essentiellement par réplication (prolifération) de cellules existantes, néogenèse à partir de précurseurs ou transdifférenciation d'autres cellules matures existantes. Au cours du diabète, la réplication ne semble pas être impactée alors que la néogenèse est inhibée. La transdifférenciation est un processus par lequel les cellules β peuvent dériver d'autres types cellulaires matures différents, contribuant ainsi à la modulation de la masse cellulaire β. Des études ont démontré, à partir de préparation d'îlots humains, que les cellules α et les cellules δ peuvent se différencier en cellules β. Des examens histologiques de pancréas humain ont révélé l'existence de cellules contenant à la fois du glucagon et de l'insuline, suggérant une plasticité des cellules endocrines pancréatiques et une possible interconversion du type cellulaire. Il a été constaté que la proportion de cellules contenant à la fois de l'insuline et du glucagon était significativement plus élevée chez les sujets résistants à l'insuline. Le concept de dédifférenciation, quant à lui, suggère que dans des conditions de stress (glucotoxicité et lipotoxicité), les cellules β peuvent perdre leur identité moléculaire et fonctionnelle et devenir plus sensibles aux phénomènes d'apoptoses (Remedi and Emfinger, 2016; Marchetti et al., 2020).

Enfin, différentes études suggèrent que la dysfonction des cellules β pourrait être la conséquence d'une **résistance à l'insuline**. En effet, la sécrétion d'insuline observée à jeun chez certains sujets prédiabétiques ou diabétiques obèses est jusqu'à 9 fois plus importante que chez des sujets sains. Une surstimulation à long terme des cellules β dépasserait leur capacité maximale de

sécrétion d'insuline, et conduirait à leur épuisement. Les auteurs expliquent ainsi qu'il faudrait mettre au repos les cellules β et empêcher l'hyperinsulinémie afin de prévenir l'apparition du diabète (Erion and Corkey, 2018).

2.4 Signes cliniques et complications

Le diabète de type 2 est une maladie silencieuse et l'augmentation de la glycémie est souvent asymptomatique. Cependant, on peut observer l'apparition de nombreux signes non spécifiques comme une asthénie, une sècheresse buccale, des maux de ventre et une perte de poids malgré une sensation de faim exacerbé. Le signe le plus caractéristique est l'installation d'un syndrome polyuro-polydipsique (FID, 2019). Dans la grande majorité des cas, on n'observe aucun signe clinique du diabète de type 2. Le diagnostic se fait grâce à la surveillance de la glycémie ou suite à l'apparition d'une complication.

Les complications aiguës du diabète de type de 2 sont rares mais constituent des urgences thérapeutiques pouvant mettre en jeu la vie des patients. Elles peuvent être consécutives à une forte hyperglycémie par décompensation du diabète (acidocétose diabétique (ACD) et syndrome d'hyperglycémie hyperosmolaire (SHH)), ou à une hypoglycémie d'origine iatrogène. L'ACD apparait généralement lors d'une chute de l'insulinémie ou d'une résistance brutale à l'insuline. L'insuline ne favorise plus l'entrée de glucose dans les cellules et les pousse ainsi à utiliser les lipides comme source d'énergie principale. Ce métabolisme lipidique exacerbé conduit à un excès de formation de corps cétoniques responsables d'une acidose métabolique pouvant conduire jusqu'au coma acidocétosique. Le SHH est plus rare, mais aussi plus grave que l'ACD. Il apparait lorsqu'une glycémie très élevée (supérieure à 6 $g.L^{-1}$ ou 33 $mmol.L^{-1}$) conduit à une forte augmentation de l'osmolarité sanguine favorisant une glycosurie et une perte hydroélectrolytique importante pouvant conduire à un coma hyperosmolaire. A l'opposé de ces complications liées à l'hyperglycémie, des épisodes d'hypoglycémies (glycémie inférieure à 0,6 $g.L^{-1}$ ou 3,3 $mmol.L^{-1}$ chez le diabétique) peuvent être la conséquence de la prise de certains médicaments, en raison de leur mécanisme d'action, et peuvent conduire au coma hypoglycémique, une urgence absolue (Orban and Ichai, 2008; French et al., 2019).

Les complications chroniques du diabète résultent d'une souffrance vasculaire, laquelle peut concerner l'intégralité des vaisseaux de l'organisme, et d'une altération du système nerveux

périphérique ou autonome. Ces complications sont la conséquence directe d'une hyperglycémie prolongée, mais peuvent aussi être exacerbées par des pathologies souvent associées au diabète, comme l'hypertension artérielle ou les dyslipidémies. Les mécanismes physiopathologiques mis en jeu conduisent à une altération du fonctionnement cellulaire, et à une détérioration de leur capacité de défense et de réparation, désorganisant l'équilibre de la cellule. Ces complications peuvent être classées en complications vasculaires, elles-mêmes divisées en complications macrovasculaires et microvasculaires, et en complications neuropathiques. **Figure 26**.

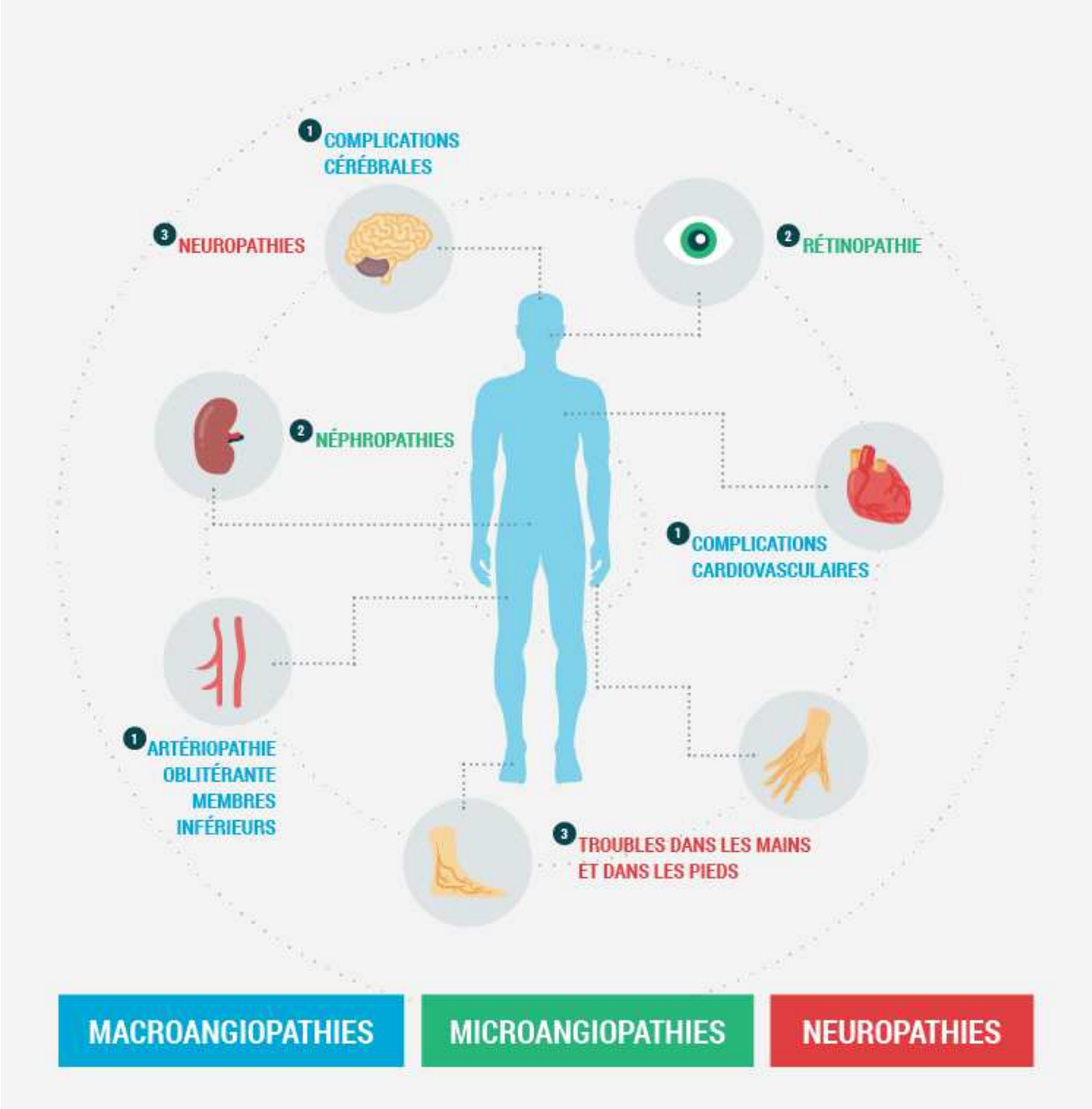


Figure 26 : Principales complications du diabète (CeeD).

Les complications macrovasculaires sont les plus nombreuses et sont la conséquence d'altérations au niveau des gros vaisseaux (aorte, artères coronaires, vaisseaux des membres inférieurs et vaisseaux cérébraux). Elles conduisent à l'apparition et au développement de maladies cardiovasculaires qui sont la principale cause de morbi-mortalité chez les personnes diabétiques. Ces atteintes peuvent toucher le cœur et conduire à des pathologies coronariennes et des cardiopathies ischémiques pouvant aller jusqu'à une insuffisance cardiaque et un risque élevé d'infarctus du myocarde. Les complications peuvent également se situer au niveau cérébral avec un risque 2 à 5 fois plus grand d'accident vasculaire cérébral (AVC), principalement d'origine ischémique, et de moins bon pronostic que chez les sujets non diabétiques. Enfin, les troubles macrovasculaires peuvent être localisés au niveau des membres inférieurs et causer des artériopathies oblitérantes des membres inférieurs (AOMI).

Les complications microvasculaires, à l'inverse, concernent les pathologies associées aux atteintes des petits vaisseaux (artérioles et capillaires). Ces atteintes touchent principalement les vaisseaux oculaires et rénaux, mais participent également au développement de la neuropathie diabétique. La rétinopathie diabétique est une des principales causes de cécité, et mène à d'importantes conséquences socio-économiques. La néphropathie diabétique est responsable d'insuffisance rénale. Dans le monde, 80 % des insuffisances rénales sont dues au diabète, à l'hypertension ou à l'association des deux, et la prévalence des insuffisances rénales terminales est 10 fois plus grande chez le diabétique. En France, la néphropathie diabétique est la première cause de dialyse (Schlienger, 2013; FID, 2019; Maranta et al., 2020).

La neuropathie diabétique peut se présenter sous différentes formes en fonction de la localisation des dommages au niveau du système nerveux. Elle est retrouvée chez près de la moitié des patients. Il peut s'agir de neuropathie périphérique touchant un seul nerf (mono-neuropathie) ou plusieurs nerfs (polyneuropathie) ou de neuropathie autonome, chacune présentant des symptômes spécifiques. La douleur et la perte de sensibilité sont les premiers et les plus courants symptômes des neuropathies périphériques. La neuropathie diabétique autonome peut affecter n'importe quel organe ou système (cœur, système digestif, système génito-urinaire…) (Bril et al., 2018; Feldman et al., 2019).

La pathologie la plus caractéristique des complications du diabète est le pied diabétique. Il associe des atteintes neuropathiques et microvasculaires. En effet, le pied subit de fortes contraintes mécaniques lors de la marche et est un site privilégié pour le développement de micro-plaies et

traumatismes : les callosités, les cloques, les coupures, les brûlures et les ongles incarnés peuvent tous conduire à des ulcérations. De plus, la transpiration et la macération contribuent à une évolution infectieuse de ces ulcères, et le trouble métabolique induit par le diabète accroit la dissémination profonde de ces infections. Les atteintes vasculaires sont un frein à la bonne et rapide cicatrisation des plaies. Les atteintes neuropathiques conduisent à une perte de sensibilité, et notamment une insensibilité à la douleur. Ainsi, les blessures facilement et spontanément résolutives chez le patient sain, vont se propager rapidement et profondément dans les tissus, sans alerter le patient, et s'ulcérer pouvant amener à une amputation du membre touché (Schlienger, 2013; Grennan, 2019). L'incidence de ces ulcères du pied est estimée à 2 % chez les personnes diabétiques, et environ 1 % des diabétiques subiront une amputation d'un membre inférieur au cours de leur vie. Cela représente à l'échelle mondiale, une amputation toutes les 30 secondes (FID, 2019).

Il est important de souligner que ces complications chroniques du diabète (maladies cardiovasculaires, rétinopathie, néphropathie), peuvent se mettre en place dès le stade de prédiabète (Tabák et al., 2012).

2.5 Prise en charge

2.5.1 Objectifs thérapeutiques

L'objectif principal de la prise en charge du patient diabétique est de prévenir l'apparition des complications. Cette prévention tertiaire s'appuie sur la normalisation de la glycémie, sur la surveillance régulière des premiers signes évocateurs des complications, et sur la limitation des comorbidités. Dans ce but, bien que la mesure de la glycémie soit indispensable afin d'anticiper les hypoglycémies et de contrôler l'élévation post-prandiale de la glycémie, le critère de surveillance retenu est la valeur de l'hémoglobine glyquée (HbA1c). En effet, le glucose est capable de se lier irréversiblement à la partie N-terminale de la chaîne β de l'hémoglobine A pour former ce que l'on appelle l'HbA1c. Environ 4 à 6 % de l'hémoglobine est ainsi glyquée, mais cette proportion augmente lors d'une élévation chronique de la glycémie. L'HbA1c s'accumule dans les érythrocytes (globules rouges) qui ont durée de vie d'environ 120 jours et le pourcentage d'HbA1c reflète alors la glycémie moyenne des patients des 3 derniers mois. 7 % d'HbA1c équivaut à une glycémie moyenne de 1,5 $g.L^{-1}$, et chaque élévation de 1 % de l'HbA1c correspond à une élévation de 0,3 $g.L^{-1}$ de la glycémie moyenne.

L'objectif de la prise en charge chez le patient diabétique de type 2 est de maintenir une valeur d'HbA1c inférieure à 7 %, mais cette valeur peut varier en fonction du profil de chaque patient. (Recos, 2013; Darmon, 2014; Darmon et al., 2019; VIDAL, 2020; FFD).

Dans la prise en charge du diabète, la surveillance de la survenue des complications prend une place particulière. Il est recommandé de faire un dépistage de la rétinopathie tous les 2 ans et de rechercher une insuffisance rénale tous les ans. Le patient doit aussi être vigilant quant à l'apparition de signes évocateurs d'une neuropathie autonome (troubles digestifs et urinaires, hypotension artérielle orthostatique, impuissance…) ou périphérique (troubles sensitifs : paresthésie, dysesthésie…). De plus, le patient est amené à prendre soin de ses pieds, à rechercher quotidiennement tout signe de lésions, et à consulter régulièrement son podologue. Enfin, étant donné que la plus grave des complications concerne le risque cardiovasculaire, la réalisation d'un électrocardiogramme (ECG) est recommandée tous les ans. A cela s'ajoutent toutes les mesures, notamment hygiéno-diététiques, visant à faire baisser le risque cardiovasculaire. Ces mesures hygiéno-diététiques sont principalement basées sur l'installation d'un régime alimentaire équilibré et la mise en place d'une activité physique régulière (Assurance Maladie, 2019; HAS).

2.5.2 Mesures hygiéno-diététiques

La première et la plus importante ligne de traitement du diabète est le respect des règles hygiéno-diététiques (modifications thérapeutiques du mode de vie). Elles doivent être mises en place dès le stade de prédiabète afin de limiter l'évolution de la maladie vers le stade diabète, et elles doivent être maintenues tout au long de la vie du patient dans le but de normaliser la glycémie, d'éviter la survenue des complications, et de diminuer les facteurs de risque cardiovasculaires. Ces mesures s'articulent majoritairement sur deux volets : une alimentation saine et équilibrée et la pratique d'une activité physique régulière. Un des premiers objectifs pour un patient en surpoids est la réduction pondérale. On estime que pour chaque kilogramme perdu, le risque de faire évoluer le prédiabète en diabète diminue de 16 % (Mahat et al., 2019).

Sur le plan alimentaire, les grignotages entre les repas sont proscrits, tout comme les boissons sucrées. A l'inverse, la consommation de fruits et de légumes est plébiscitée. Au cours des repas, les glucides complexes doivent être privilégiés et représenter entre 40 à 50 % des apports caloriques

journaliers. Les lipides doivent être limités à 35 % de ces apports, sachant que les acides gras mono- et poly-insaturés sont à privilégier. Enfin, il faut éviter de dépasser 15 % d'apport protéique (Recos, 2013). Ces recommandations sont détaillées dans le **Tableau 3** établi par la HAS. La consultation d'un diététicien-nutritionniste qui accompagnera le patient et personnalisera son régime alimentaire en adaptant les apports énergétiques au contexte et aux objectifs individuels ne peut être que bénéfique.

Tableau 3 : Conseils nutritionnels chez le patient diabétiques de type 2 (HAS, 2014).

Nutriment	Recommandation	Commentaire
Apports caloriques journaliers	Les apports caloriques journaliers doivent être réduits de 15 % à 30 % par rapport aux apports caloriques journaliers évalués par l'enquête alimentaire.	Les régimes modérément restrictifs entraînent de meilleurs résultats à long terme et induisent moins d'effets secondaires que les restrictions alimentaires sévères.
Glucides simples	Les boissons sucrées (sodas, jus de fruits) sont interdites, sauf en cas d'hypoglycémie. Le saccharose est autorisé à raison de 5 % à 10 % de l'apport calorique quotidien, à condition de le substituer gramme par gramme avec les autres glucides.	L'apport calorique des boissons alcoolisées (toujours prises au cours du repas) doit être pris en compte (ne pas dépasser 2 unités d'alcool par jour). Un ajout supplémentaire de fructose est déconseillé.
Glucides complexes	Les glucides sont une part importante de l'alimentation des sujets diabétiques (moitié de la ration calorique quotidienne, soit un apport minimal de l'ordre de 180 g/jour)	Les glucides à favoriser sont les aliments amylacés (pain, pâtes, riz, autres féculents). Les glucides pouvant être consommés mais en limitant leur apport sont les fruits et les laitages.
Index glycémiques des aliments	Privilégier les aliments à index glycémique bas (légumes secs, pâtes, riz) pour limiter l'effet hyperglycémiant d'un repas.	Les aliments à index glycémique élevé (pommes de terre, pain) ne doivent pas être supprimés mais être limités et répartis sur l'ensemble des repas.
Édulcorants	De préférence acaloriques (aspartam, saccharine, acesulfame, sucralose).	–
Répartition des apports glucidiques	Fractionnement des apports glucidiques en au moins 3 repas et/ou collations.	Le grignotage entre les repas est déconseillé.
Graisses alimentaires	Diminuer préférentiellement les graisses d'origine animale (viandes grasses, œufs, charcuterie, fromages, beurre, crème fraîche). Diminuer les aliments riches en graisses tels que les fritures, les cacahuètes ou autres fruits oléagineux, les chocolats, les glaces, les pâtisseries et autres viennoiseries, les biscuits apéritifs.	Éviter d'associer plusieurs aliments gras dans un même repas. Augmenter la fréquence de consommation des poissons. Préférer les viandes maigres (filet de porc, volailles sans la peau), les laitages écrémés ou demi-écrémés. Choisir, pour cuisiner, des matières grasses d'origine végétale riches en acides gras monoinsaturés (olive, arachide, colza) ou polyinsaturés (tournesol, pépins de raisin, maïs, etc.) au détriment des acides gras saturés. Favoriser les modes de cuisson sans graisse. Il n'est pas démontré qu'un apport supplémentaire en acides gras polyinsaturés (huiles de poisson) ait un intérêt chez le sujet diabétique de type 2.
Macronutriments	Il n'existe pas d'argument pour modifier les apports protéiques chez le sujet diabétique de type 2 non compliqué.	
Fibres alimentaires	L'alimentation doit être riche en fibres alimentaires de type soluble (pectines, guar, gomme), contenues dans les fruits, les légumes verts et les légumineuses.	Un ajout de fibres alimentaires sous forme de poudre, comprimés, gélules, aliments spéciaux n'est pas recommandé.

De très nombreuses études ont démontré l'importance et l'efficacité d'une activité physique régulière dans la prévention et la prise en charge du diabète de type 2 (Hou et al., 2020). L'exercice physique augmente l'oxydation des acides gras libres, améliore les fonctions mitochondriales du muscle squelettique et réduit la lipotoxicité dans le muscle et le foie. Tout ceci contribue à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. De plus, l'activité physique agit comme un stress physiologique qui augmente l'absorption du glucose par les cellules musculaires et réduit ainsi ses taux circulants (Khan et al., 2019). La pratique d'une activité physique est aussi indiquée dans le but de contrôler les complications du diabète, et notamment le risque cardiovasculaire. Elle prend une place encore plus importante chez les patients en surpoids afin de mieux contrôler leur poids. Les recommandations préconisent au minimum 150 min (2h30) par semaine d'une activité d'intensité modérée (la fréquence cardiaque doit se situer entre 50 et 70 % de la fréquence cardiaque maximale, calculée par soustraction de l'âge du patient à 220 pulsations par minute), associée à quelques séances de renforcement musculaire (HAS, 2014; Hou et al., 2020).

Enfin, même si la consommation modérée d'alcool a montré un effet bénéfique sur la prévention du diabète de type 2 (Li et al., 2016), elle reste fortement déconseillée. En effet, une consommation élevée d'alcool est au contraire un facteur de risque du diabète. De plus, l'alcool fait partie des facteurs de risque importants de plusieurs complications, notamment les complications cardiovasculaires. Il en va de même du tabac dont l'arrêt est impératif, puisque c'est aussi un facteur de risque du diabète et de ses complications (Khan et al., 2019; Mahat et al., 2019).

2.5.3 Traitements médicamenteux existants

Lorsque les mesures hygiéno-diététiques ne sont pas suffisantes pour atteindre l'objectif glycémique fixé (en terme d'HbA1c), un traitement médicamenteux doit être envisagé. Cependant, les mesures hygiéno-diététiques doivent, quel que soit le traitement mis en place, continuer à être rigoureusement suivies. Les classes thérapeutiques des traitements existants possèdent des mécanismes d'action très variés qui leur confèrent une synergie d'action. En effet, ils agissent chacun à différents niveaux des mécanismes de contrôle de la glycémie. **Figure 27**. (Bianchi and Anbassi, 2012; Scheen, 2016; VIDAL, 2020).

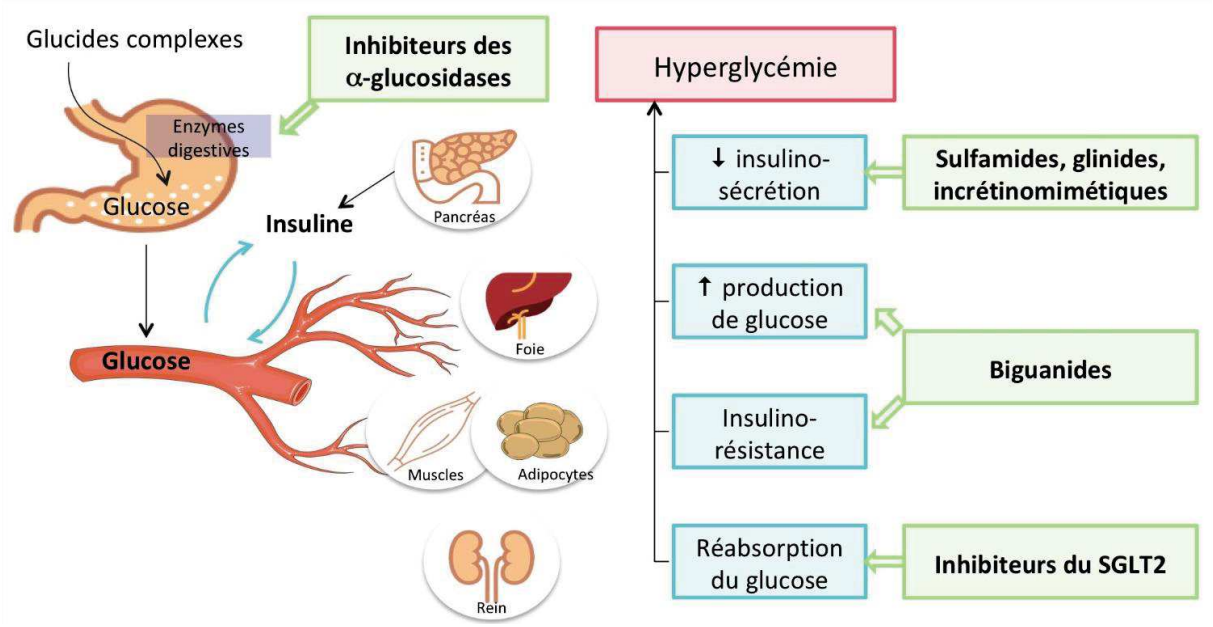


Figure 27 : Mécanismes d'action des médicaments utilisés dans le traitement du diabète de type 2 (CNPM).

La metformine est seul représentant de la famille des **biguanides**. C'est le seul traitement à avoir une action insulino-sensibilisante par augmentation de l'affinité des récepteurs à l'insuline et inhibition de la néoglucogenèse hépatique. Cependant, elle inhibe la glycolyse aérobie au profit de la glycolyse anaérobie, ce qui augmentent la formation des lactates impliqués dans le développement de son effet indésirable le plus grave : l'acidose lactique. La metformine est également responsable de troubles digestifs, potentiellement à l'origine d'une mauvaise observance des patients et conduisant à l'arrêt du traitement. Les spécialités contenant de la Metformine sont le STAGID® (Emboate de Metformine) et le GLUCOPHAGE® (Chlorhydrate de Metformine).

Les **sulfamides hypoglycémiants** (ou **sulfonylurées**) se lient sur la sous-unité SUR-1 des K_{ATP} de la cellule β pancréatique conduisant à leur fermeture. L'accumulation de K^+ intracellulaire favorise une dépolarisation de la membrane plasmique, induisant l'ouverture des Ca_V et l'entrée de calcium dans la cellule β pour déclencher l'exocytose des vésicules d'insuline. La sécrétion d'insuline est stimulée quel que soit la valeur de la glycémie. Ce mécanisme explique le principal effet indésirable des sulfamides hypoglycémiants : les hypoglycémies. Parmi les spécialités contenant un sulfamide hypoglycémiant, on retrouve le MINIDIAB®, OZIDIA® (Glipizide), DIAMICRON® (Gliclazide), DAONIL® (Glibenclamide), AMAREL® (Glimépiride). Certains peuvent être associé à la metformine comme le Glibenclamide dans le GLUCOVANCE®.

Le Répaglinide est le dernier représentant des **glinides**. Son mécanisme d'action est similaire à celui des sulfamides hypoglycémiants mais il se lie sur un site différent. Au niveau pharmacocinétique, son absorption et son élimination sont plus rapides, et donc plus appropriés aux situations d'hyperglycémie post-prandiale. Sa demi-vie plus courte explique le plus faible risque d'hypoglycémie par rapport aux sulfamides hypoglycémiants. La spécialité princeps du Répaglinide est le NOVONORM®.

Les **inhibiteurs des α-glucosidases** (IAG) diminuent l'absorption des glucides simples au niveau intestinal par inhibition compétitive des α-glucosidases. Ceci va permettre de limiter l'hyperglycémie post-prandiale. Ces molécules peuvent conduire à des troubles digestifs de type dyspepsie, flatulences et météorisme. La dernière spécialité commercialisée est le GLUCOR® (Acarbose).

Des médicaments découverts plus récemment ciblent les incrétines, notamment le GLP-1. Le GLP-1 est une hormone qui ralentit la vidange gastrique, potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose, inhibe la sécrétion de glucagon et diminue la prise alimentaire. Le GLP-1 est rapidement dégradé par la dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) dans l'organisme. Deux stratégies sont mises en place dans le traitement du diabète : inhiber la DPP-4 ou utiliser des analogues non métabolisables du GLP-1.

Les gliptines sont **inhibiteurs de la DPP-4** (iDPP4). Elles vont donc permettre de maintenir plus longtemps le taux de GLP-1, aboutissant à une potentialisation de la sécrétion d'insuline de façon gluco-dépendante. Ce mécanisme prévient les risques d'hypoglycémie. Ces molécules sont commercialisées seules ou en association avec la Metformine : XELEVIA®, JANUVIA® (Sitagliptine) ou VELMETIA®, JANUMET® (Sitagliptine + Metformine), GALVUS® (Vildagliptine) ou EUCREAS® (Vildagliptine + Metformine) et ONGLYZA® (Saxagliptine) ou KOMBOGLYZE® (Saxagliptine + Metformine).

Les **agonistes des récepteurs du GLP-1** (GLP1-RA), appelés **incrétinomimétiques**, sont des analogues du GLP-1 qui ne sont pas dégradés par la DPP-4, mais qui possèdent une action similaire au GLP-1 endogène. La potentialisation de la sécrétion d'insuline est gluco-dépendante. Le risque hypoglycémique est ainsi aussi écarté. Leur nature peptidique nécessite qu'ils soient administrés par voie parentérale (sous-cutanée). Il existe le BYETTA® (Exénatide), le VICTOZA® (Liraglutide), le TRULICITY® (Dulaglutide) et l'OZEMPIC® (Sémaglutide)

Très récemment, le FORXIGA® (Dapagliflozine) et le XIGDUO® (Dapaglifozine + Metformine) ont débuté leur commercialisation en France, bien que ces médicaments soient déjà utilisés dans plus de 100 pays, depuis 2012 pour certains (comme l'Australie). La dapagliflozine est un **inhibiteur de SGLT2** (iSGLT2), co-transporteur sodium-glucose, exprimé sélectivement au niveau rénal. Ce transporteur a pour but la réabsorption rénale du glucose. Cet inhibiteur de SGLT2 favorise ainsi l'élimination urinaire du glucose (glycosurie), ce qui provoque une baisse de la glycémie, indépendamment de la sécrétion et de l'action de l'insuline (Bauduceau et al., 2019; VIDAL, 2020).

Les **insulines** utilisées en thérapeutique sont nombreuses et variées. Certaines ont une séquence d'acide aminés identique à l'insuline humaine et ont une action rapide et/ou intermédiaire, tandis que les autres sont des analogues ultra-rapides, rapides, ou lents. L'effet des insulines ultra-rapides débute en quelques minutes et dure jusqu'à 4h. Elles doivent être administrées au moment du repas. C'est le cas de NOVORAPID®, HUMALOG® ou APIDRA®. Les insulines rapides, administrées avant chaque repas, ont un effet qui s'observe après 15 à 30 min pour arriver à un plateau entre 1 et 4h, et se termine au bout de 6h. Il s'agit de UMULINE RAPIDE®, ACTRAPID® par exemple. Les insulines intermédiaires ont une action qui commence 1h après l'injection, et se poursuit une dizaine d'heures. On retrouve notamment INSULATARD® et UMULINE NPH® (NPH pour Neutral Protamine Hagedorn). Enfin, les insulines lentes ont un délai et une durée d'action prolongés, jusqu'à 24h, comme LANTUS® et LEVEMIR® entre-autres. **Figure 28**. L'allongement de l'effet des insulines permet d'espacer les injections pour permettre une meilleure observance et un meilleur confort des patients. La glycémie est ainsi mieux contrôlée au cours de la journée. Cependant, il ne faut pas négliger les insulines rapides, qui permettent de contrôler plus efficacement les hyperglycémies post-prandiales. Dans ce but, certaines spécialités associent des insulines intermédiaires avec des insulines d'action rapide ou ultra-rapide comme NOVOMIX® ou HUMALOG MIX®. Néanmoins, les effets secondaires (prise de poids, risque hypoglycémique très élevé), le caractère injectable, la complexité du traitement (association de plusieurs insulines, autosurveillance glycémique, ajustement quotidien des doses) peuvent être source de réticence du patient, et souligne l'importance de l'éducation thérapeutique.

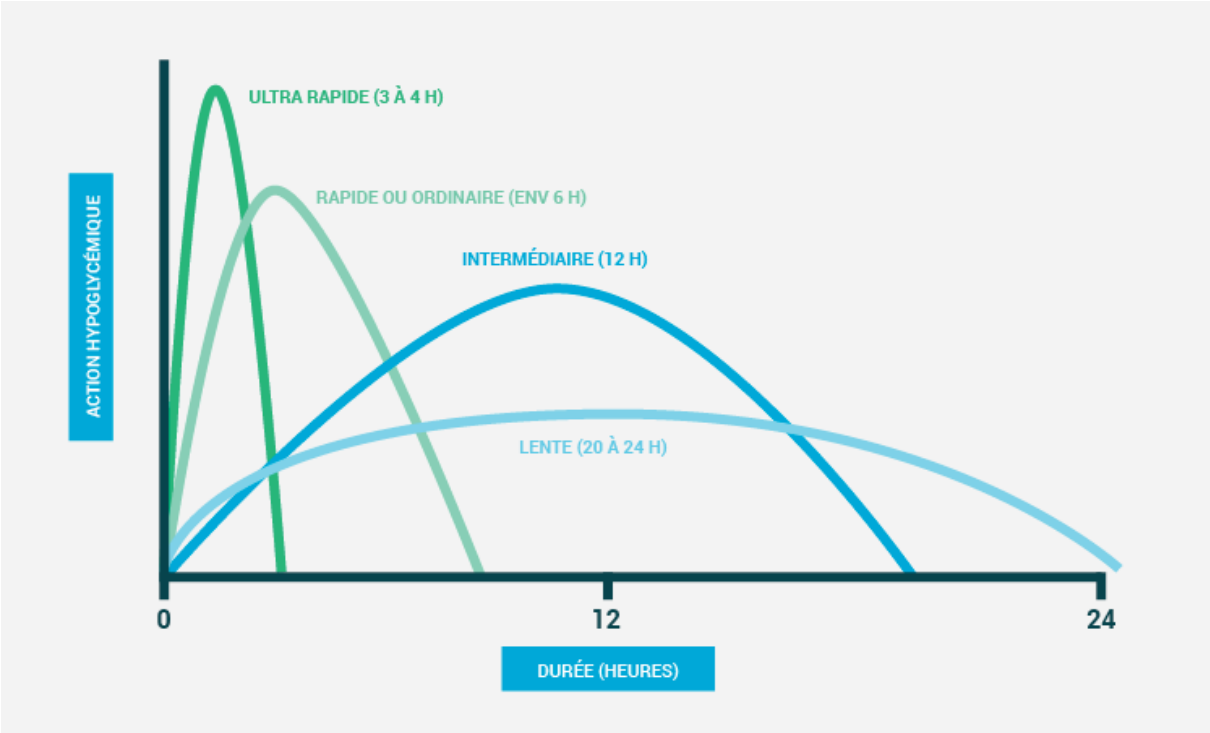


Figure 28 : Profils d'action hypoglycémiante des différents type d'insuline en fonction du temps (CeeD).

Les **thiazolidinediones** (TZD) ou glitazones sont des agonistes des récepteurs PPAR-γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma*). Ils agissent sur la résistance à l'insuline en favorisant la différenciation adipocytaire, en augmentant les taux d'adiponectine et en réduisant la libération d'acides gras libres pour diminuer les taux de triglycérides et augmenter ceux du HDL-cholestérol. Cependant, la rosiglitazone, retirée du marché européen est soumise à des restrictions d'utilisation aux Etats-Unis, tandis que la pioglitazone n'est plus commercialisée en France en raison d'un possible risque de cancers de la vessie mais reste disponible dans la plupart des pays européens et aux Etats-Unis.

Enfin, certains pays comme les Etats-Unis, utilisent les **analogues de l'amyline** dans le traitement du diabète de type 2 avec le SYMLIN® (Pramlintide). L'amyline est une hormone peptidique sécrétée avec l'insuline par les cellules β pancréatiques. Elle agit en ralentissant la vidange gastrique afin de retarder le passage des nutriments dans l'intestin, et donc du glucose dans le sang. L'amyline possède aussi un effet inhibiteur sur la sécrétion de glucagon par les cellules α. Au cours du diabète, les taux d'amyline sécrétés sont liés à ceux de l'insuline : élevés au début de la maladie puis de plus en

plus bas. L'utilisation d'analogue de l'amyline permet ainsi de réduire le temps de la vidange gastrique, la glycémie post-prandiale, et la sécrétion de glucagon. Son effet indésirable le plus observé est la nausée. Elle est souvent utilisée en association avec l'insuline, ce qui majore le risque d'hypoglycémie sévère (Mietlicki-Baase, 2016).

Chaque famille de médicaments possède ses propres caractéristiques (mode d'administration, effets indésirables, efficacité, …) et présente ou non des effets protecteurs vis-à-vis de chaque complication. **Tableau 4**. La Société Francophone du Diabète (SFD) a ainsi établi des recommandations dans la stratégie thérapeutique du diabète de type 2, qui sont résumées dans la **Figure 29**. (Darmon et al., 2019).

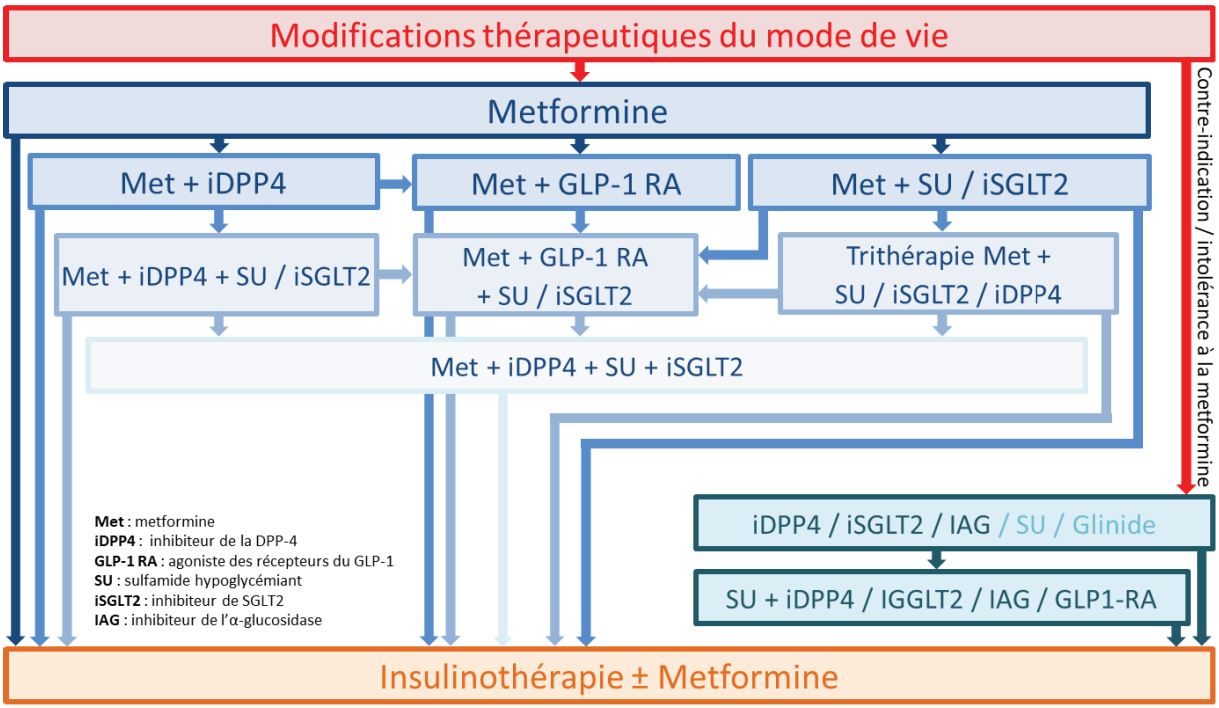


Figure 29 : Arbre décisionnel résumant la prise de position de la SFD dans la prise en charge du diabète de type 2 (d'après Darmon et al., 2019).

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques des différentes familles d'antidiabétiques, pour aider à la décision dans le choix du traitement lorsque les mesures hygiéno-diététiques et la Metformine ne sont pas suffisants (Darmon et al., 2019).



	Efficacité sur la baisse de la glycémie	Risque d'hypoglycémie	Effet sur le poids	Modalité d'administration	Bénéfices cardio-vasculaires en cas de maladie CV avérée		Progression de la maladie rénale	Principaux effets secondaires
					IDM, AVC, ou décès CV	Insuffisance cardiaque		
Sulfamides hypoglycémiants et glinides	• •	Oui + (glibenclamide ++)	←	1 à 4 prises/jour	Sécurité démontrée pour le glimépiride		Absence de données	Hypoglycémies, prise de poids
Inhibiteurs des α-glucosidases	•	Non	↔	3 à 4 prises/jour	Sécurité démontrée chez des patients intolérants au glucose		Absence de données	Effets digestifs fréquents (flatulences)
Inhibiteurs de la DPP4 (gliptines)	• •	Non	↔	1 à 2 prises/jour	Sécurité démontrée	• Sécurité démontrée pour sitagliptine • Risque potentiel pour saxagliptine	Effet neutre	Risque rare de pancréatite aiguë et de douleurs articulaires
Agonistes des récepteurs du GLP-1	• • •	Non	→ →	sous-cutanées 1 inj./jour à 1 inj./semaine	Bénéfices démontrés pour liraglutide, dulaglutide et semaglutide	• Sécurité démontrée si insuffisance cardiaque NYHA I à III • Doute sur la sécurité si fraction d'éjection du VG < 40 %	Bénéfices sur l'albuminurie démontrés pour liraglutide, dulaglutide et semaglutide	• Effets digestifs fréquents (nausées, vomissements, diarrhées, lithiases biliaires) • Risque de pancréatite aigué ? *
Analogues lents de l'insuline	• • • •	Oui +++	← ←	sous-cutanées 1 inj./jour	Sécurité démontrée pour glargine U100 et dégludec		Effet neutre	Hypoglycémies, prise de poids
Inhibiteurs de SGLT2 (gliflozines)	• •	Non	→ →	1 prise/jour	Bénéfices démontrés pour empagliflozine et canagliflozine	Bénéfices démontrés pour empagliflozine, canagliflozine et dapagliflozine	Bénéfices sur la fonction rénale démontrés pour empagliflozine, canagliflozine et dapagliflozine	• Mycoses génitales • Risque d'hypotension • Risque rare d'acido-cétose • Risque rare d'amputation ? * (canagliflozine) • Risque rare de fractures ? * (canagliflozine) • Risque exceptionnel de gangrène de Fournier ?

2.5.4 Nouvelles approches thérapeutiques médicamenteuses

Les pistes suivies pour la découverte de nouveaux traitements sont très nombreuses et impliquent des cibles extrêmement variées. Cependant, ces pistes thérapeutiques nécessitent de nouvelles investigations plus poussées avant de voir l'apparition de nouveaux médicaments. Quelques-unes de ces nouvelles approches sont présentées ci-dessous (Scheen, 2016; Chikara et al., 2018).

Récemment, des peptides qui combinent l'activité du GLP-1 avec une activité du glucagon et/ou du GIP ont été suggérés comme de nouveaux agents thérapeutiques pour le contrôle de la glycémie et du poids. Le tirzépatide (LY3298176) et un peptide synthétique de 39 acides aminés basé sur la séquence du GIP, agissant comme **double agoniste GLP-1 et GIP**. Des études cliniques de phases II et III ont montré une réduction significative de l'HbA1c et du poids corporel des patients diabétiques recevant du tirzépatide, sans augmentation du risque d'hypoglycémie. (Coskun et al., 2018; Bhagavathula et al., 2021; Rosenstock et al., 2021)

Les **agonistes de FFAR1** (GPR40) - Ces dernières années, de nombreux brevets ont été déposés pour des agonistes de FFAR1. L'activation des FFAR1 induit une sécrétion d'insuline de façon gluco-dépendante. Des études cliniques ont été réalisées et ont démontré une amélioration du contrôle de la glycémie chez des patients diabétiques de type 2, avec un faible risque d'hypoglycémie. Cependant, la molécule la plus avancée (TAK-875), a vu son développement interrompu lors de l'étude clinique de phase III en raison d'une toxicité hépatique (Li et al., 2020).

Les **inhibiteurs de la thioredoxin-interacting protein (TXNIP)** - Les cellules β pancréatiques sont particulièrement sensibles au stress oxydant en raison de leur faible niveau d'expression des enzymes antioxydantes. La TXNIP est une α-arrestine qui se lie aux thiorédoxines et entrave leur rôle antioxydant. Ainsi, TXNIP bloque les mécanismes cellulaires de défense contre le stress oxydant. De plus, TXNIP joue un rôle dans l'apoptose des cellules β et possède des propriétés pro-inflammatoires. Enfin, TXNIP aurait également un effet négatif sur l'expression du gène de l'insuline, par modulation de l'expression de microARN et de leur gènes cibles comme MafA et FoxA2. En cas de diabète, l'augmentation de la glycémie favorise l'expression de TXNIP, notamment *via* la *carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP) au niveau transcriptionnel, alors que la délétion du gène de TXNIP protège du diabète. Le vérapamil, un inhibiteur calcique, est capable de diminuer l'expression de TXNIP. Cet effet est dû à une diminution du calcium libre intracellulaire par blocage des canaux calciques de type L, entraînant une inhibition de la transcription de la TXNIP. Des études cliniques ont

montré une amélioration de la production d'insuline chez des patients traités au vérapamil, ainsi qu'une diminution de l'incidence du diabète de type 2. D'autres études précliniques et cliniques sont indispensables pour confirmer la pertinence d'inhibiteurs de TXNIP, comme le W2476 (inhibiteur de l'expression de TXNIP), la geniposide (stimulateur la dégradation de TXNIP) ou le TXNIP-IN-1 (inhibiteur du complexe TXNIP-Thiorédoxine) dans le traitement du diabète (Li et al., 2017b; Thielen and Shalev, 2018; Liu et al., 2020; Wondafrash et al., 2020).

Les **inhibiteurs de la phosphorylation oxydative** - L'iméglimine est le premier représentant de la classe des **glimines**. Ces molécules sont décrites comme des inhibiteurs de la phosphorylation oxydative qui amélioreraient l'équilibre énergétique mitochondrial. Les mécanismes moléculaires ne sont pas encore entièrement découverts, mais l'iméglimine semble capable de moduler l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale tout en diminuant la production d'espèces réactives de l'oxygène. Une récente étude clinique de phase III a montré que l'iméglimine diminue de manière significative le taux d'HbA1c chez des patients japonais atteints de diabète de type 2 par rapport au placebo, tout en présentant un profil de sécurité similaire à celui du placebo (Scheen, 2016; Yaribeygi et al., 2020; Dubourg et al., 2021).

Les **agonistes des récepteurs M3 (M3R)** - Les cellules β expriment à leur surface le sous-type 3 du récepteur muscarinique de l'acétylcholine (M3R). Ces récepteurs peuvent être stimulés par l'acétylcholine libérée au niveau des terminaisons nerveuses parasympathiques. Chez l'Homme, on observe également une action paracrine de l'acétylcholine libérée par les cellules α pancréatiques. Ces récepteurs sont couplés à la protéines $G\alpha_q$ qui va activer une cascade de signalisation intracellulaire pour conduire à la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Il a été montré qu'un modulateur allostérique positif des M3R est capable d'amplifier la sécrétion d'insuline induite par le glucose chez la souris sauvage et améliore la tolérance au glucose chez la souris obèse. Ces études préliminaires doivent cependant être complétées par d'autres études précliniques et cliniques. (Zhu et al., 2020).

Les **agonistes des récepteurs TGR5** - Des chercheurs se sont intéressés à l'amélioration de la sécrétion de GLP-1 par une activation du récepteur nucléaire FXR (*Farnesoid X Receptor*) et du récepteur couplé aux protéines G TGR5 (ou Gpbar1 pour *G protein-coupled bile acid receptor 1*). Le WB403, un agoniste du TGR5, favorise la sécrétion de GLP-1, réduit l'hyperglycémie et préserve la masse et la fonction des cellules β pancréatiques chez la souris (Scheen, 2016).

Les **activateurs de la glucokinase** - Cette enzyme joue un rôle majeur dans la dégradation du glucose par la voie de la glycolyse. De nombreuses molécules sont en cours de développement mais, malgré des résultats encourageants chez l'animal, des effets indésirables comme l'hypoglycémie ou l'hypertriglycéridémie sont décrits (Scheen, 2016).

Des études cliniques ont mis en évidence que la thérapie par **cellules souches** améliore les taux d'HbA1c et réduit les besoins journaliers en insuline des patients diabétiques (Zhang et al., 2020).

2.6 Modèles expérimentaux

2.6.1 Modèles *in vitro* et *ex vivo*

Les modèles expérimentaux d'étude du diabète sont nombreux. Les plus utilisés et les moins coûteux sont les lignées cellulaires sécrétrices d'insuline. La majorité d'entre elles sont dérivées de cellules de rongeurs. Chaque lignée possède ses propres caractéristiques, notamment en ce qui concerne leur morphologie, leur viabilité, leur capacité de prolifération, leur contenu en insuline et leur sensibilité au glucose et aux autres sécrétagogues. **Figure 30**. (Hamid et al., 2002).

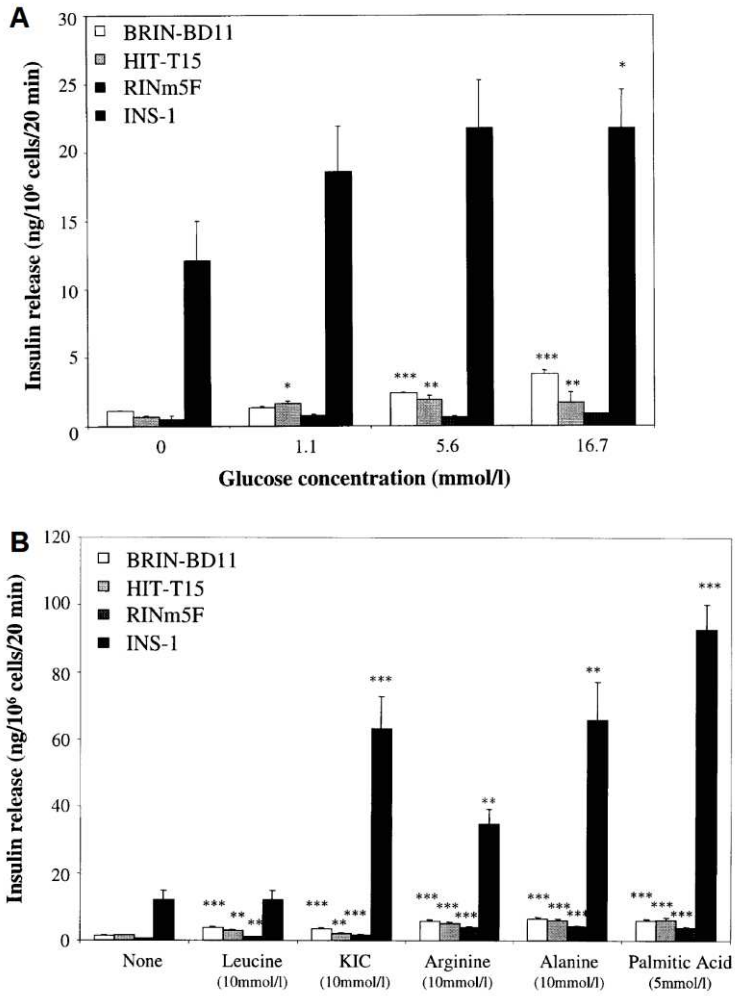


Figure 30 : Effets du glucose et de divers sécrétagogues sur la sécrétion d'insuline par les lignées cellulaires BRIN-BD11, HIT-T15, RINm5F et INS-1. KIC, acide alpha-cétoisocaproïque (Hamid et al., 2002).

Le **Tableau 5** résume l'origine ainsi que les avantages et inconvénients des principales lignées cellulaires. Sur ce tableau, il est intéressant de constater que les lignées INS-1 et MIN-6 sont largement plébiscitées par les chercheurs par rapport aux autres lignées avec plus de 60 publications par an pour la lignée INS-1 (Green et al., 2018). Les cellules INS-1 sont dérivées d'un insulinome de rat induit par irradiation aux rayons X. Les cellules MIN-6 proviennent d'un insulinome de souris C57BL/6 transgéniques exprimant le gène codant pour une protéine immortalisante (l'antigène T du virus simien 40) sous le contrôle du promoteur du gène de l'insuline (Miyazaki et al., 1990; Asfari et al., 1992; Skelin et al., 2010).

Tableau 5 : Principales lignées cellulaires dérivées de cellules de rongeurs avec leurs avantages et inconvénients, ainsi que l'estimation du nombre de publications totales et annuelles (Green et al., 2018).

Cell line	Species	Positives	Negatives	No of pubs	Pubs/ year
Cell lines generated from radiation-induced insulinomas					
RIN	Rat	Produces insulin	Function does not mirror physiological responses	388	9.7
RINr				17	0.4
RINm				14	0.3
RINm5F				685	17.1
CRI-G1	Rat	Produces insulin	Secretes glucagon. Non-functional under normal conditions	29	0.9
INS-1	Rat	High insulin content. Accurate beta-cell function	Dependent on 2-mercaptoethanol Slow proliferation.	1538	61.5
INS-1 832/13		Superior clone with higher insulin content and function	Dependent on 2-mercaptoethanol	167	9.8
INS-2		High insulin content. Accurate beta-cell function	Dependent on 2-mercaptoethanol	2	0.1
Cell lines generated by oncogenic transfection of primary beta-cells					
HIT-T15	Hamster	Produces insulin	Majority of subclones unresponsive to glucose and produce very little insulin	383	10.6
Beta-TC	Mouse	Produces insulin Some subclones exhibit near-normal glucose sensitivity	Expresses hexokinase Most subclones unresponsive to glucose and produce little insulin	138	4.7
NIT-1	Mouse	High levels of insulin transcription	Unresponsive to glucose at physiologically relevant concentrations	133	5.1
MIN-6	Mouse	High insulin content, glucokinase and GLUT2 expression. Accurate beta-cell function at low passages.	Diminished functionality at higher passage numbers	1145	47.7
Beta-HC	Mouse	Subclone 9 expresses GLUT2 and glucokinase and is glucose responsive	Other subclones unresponsive and hexokinase activity increases with passage number	8	0.3
Created by virally induced insulinoma					
In-111	Hamster	Produces insulin	Unresponsive to glucose at physiologically relevant concentrations	5	0.1
Created by electrofusion of primary pancreatic beta-cells with immortal partner cells					
BRIN-BD11	Rat	High insulin content. Accurate beta-cell function. Fast growing and easy to culture.	Expresses hexokinase	213	10.1
BRIN-BG5		Additional clones with similar attributes	Slightly less responsive than the BD11 clone	3	0.1
BRIN-BG7				2	0.1

Il est également possible de travailler sur des îlots de Langerhans isolés extemporanément à partir de pancréas de rat ou de souris. Même si cette technique est plus exigeante à mettre en œuvre, l'environnement insulaire des cellules β est conservé et permet une meilleure intégration des résultats observés dans la physiologie de l'animal. En effet les régulations intra-îlots par les autres cellules sont toujours présentes. Ces îlots peuvent aussi être perifusés afin d'obtenir une cinétique de sécrétion d'insuline. De plus, l'utilisation d'animaux sains et diabétiques permet d'étudier l'effet d'un traitement directement au niveau de l'îlot de Langerhans. Il est également possible d'utiliser la technique du pancréas isolé et perfusé pour aller plus loin dans l'intégration des expérimentations sans avoir recours aux modèles *in vivo*. Ce modèle permet lui aussi de mesurer l'évolution de la glycémie et/ou de l'insulinémie au cours du temps, mais en conservant tout l'environnement du pancréas.

2.6.2 Modèles animaux (*in vivo*)

Même si aucun modèle n'arrive à mimer fidèlement à lui seul la physiopathologie du diabète humain, les modèles animaux restent indispensables pour aider à comprendre la physiopathologie du diabète et de ses complications, ainsi que pour explorer, valider et optimiser les nouvelles thérapies en vue de leur utilisation en toute sécurité chez l'Homme. Les différents modèles animaux de diabète de type 2, allant des modèles non mammifères aux primates non humains, ont chacun leurs propres avantages et limites qui sont résumés sur la **Figure 31**. En règle générale, les modèles non mammifères présentent l'avantage d'un faible coût d'entretien, d'un cycle de vie court et de la disponibilité de divers outils d'édition génétique. Toutefois, leur valeur translationnelle est limitée en raison de leur anatomie et de leur physiologie distincte. En revanche, la physiologie des modèles animaux de grande taille, comme le chien et le porc, et surtout celle des primates non humains, ressemble beaucoup à la physiologie humaine. Cependant, ces espèces ont des coûts d'entretien élevés et des cycles de vie particulièrement longs. En outre, comme chaque mère ne produit qu'un faible nombre de descendants au cours de sa vie, ces modèles ne sont pas souhaitables pour les expériences à grande échelle et à faible coût. Les modèles rongeurs représentent un bon compromis entre le rendement et la physiologie translationnelle. Ils sont donc les plus couramment utilisés grâce à leur fécondité élevée et leur cycle de vie court, associés à la relative facilité d'édition de leur génome, aux faibles coûts d'hébergement et à la facilité de manipulation (Kleinert et al., 2018; Fang et al., 2019).

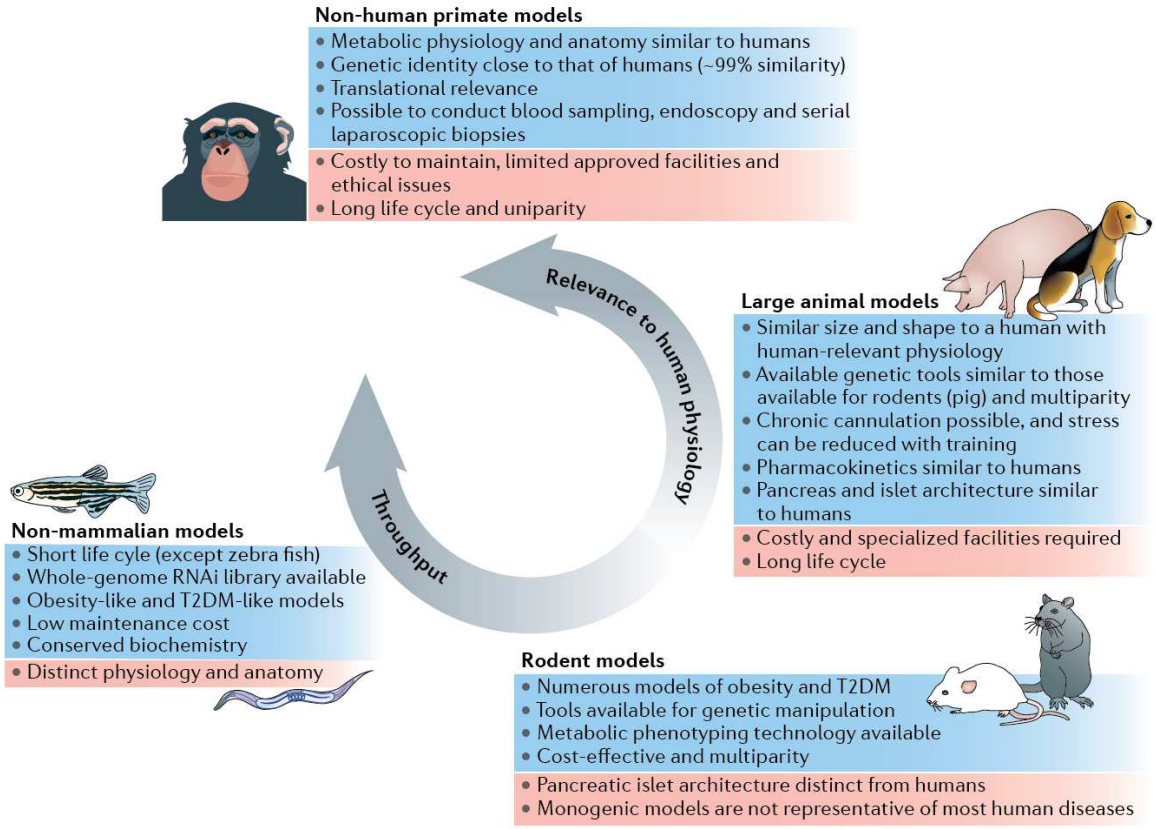


Figure 31 : Principaux avantages et inconvénients des différentes classes de modèles animaux utilisés dans la recherche sur le diabète de type 2 (Kleinert et al., 2018).

Ces modèles animaux peuvent reproduire des situations de résistance à l'insuline, de défaillance des cellules β pancréatiques, ou une combinaison des deux. Il est à noter que plusieurs de ces modèles sont obèses, et peuvent alors mieux refléter les conditions de développement du diabète humain puisque l'obésité y est généralement étroitement liée. Plusieurs méthodes sont utilisées pour aboutir à un modèle de diabète. L'approche chirurgicale permet de produire des modèles non obèses de diabète par pancréatectomie partielle ou complète, dans laquelle l'étendue de la pancréatectomie semble déterminer la gravité de l'affection résultante. Le diabète peut aussi être chimiquement induit chez les rongeurs à l'aide des substances cytotoxiques (comme la streptozotocine ou l'alloxane) qui détruisent les cellules β pancréatiques. **Figure 32**. Les animaux peuvent également être soumis à différents régimes alimentaires pour mimer différents troubles métaboliques caractéristiques de l'obésité humaine, notamment en augmentant la teneur en matières grasses et en sucres. Enfin, les modèles génétiques du diabète peuvent être classés en deux grands groupes : les modèles génétiquement dérivés spontanés (par des mutations naturelles telles que des mutations sur le gène de la leptine *ob* ou de son récepteur *db*) et les modèles génétiquement modifiés (modèles transgéniques). **Tableau 6**. (Chandrasekera and Pippin, 2014; Al-awar et al., 2016).

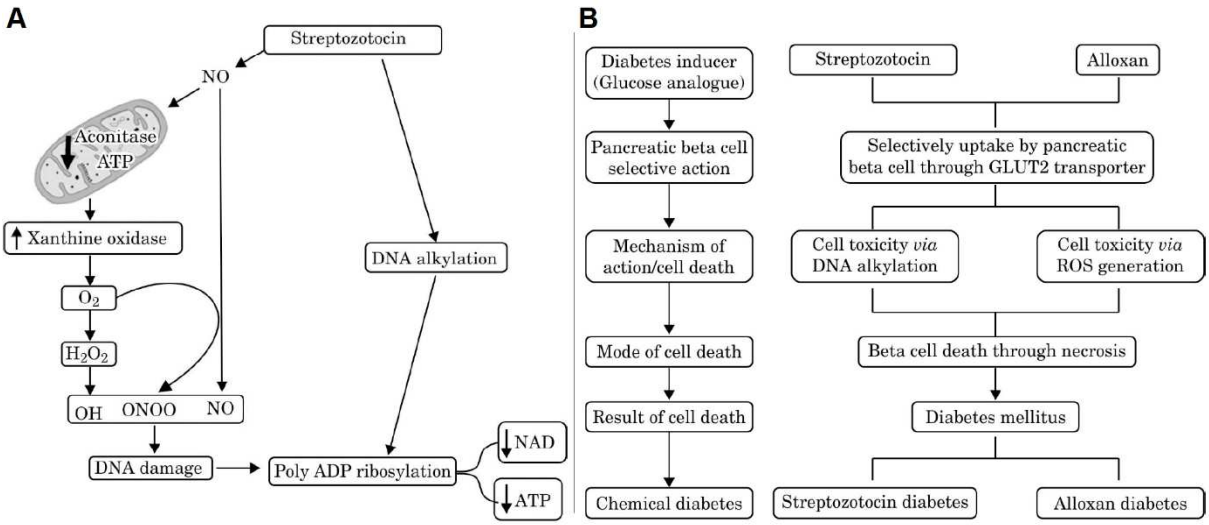


Figure 32 : Mécanisme d'action de la streptozotocine induisant le diabète chez le rat (A) et représentation schématique de l'effet toxique de l'alloxane et de la streptozotocine dans les cellules β pancréatiques (B) (Prabhakar, 2015).

Tableau 6 : Exemples de modèles de rongeurs obèses et non obèses utilisés dans la recherche sur le diabète de type 2. *ob*, gène codant pour la leptine ; *db*, gène codant pour le récepteur de la leptine ; ALX, alloxane ; STZ, streptozotocine. (Chatzigeorgiou et al., 2009).

Type of animal models	Obese	Non-obese
Spontaneous or genetically derived models	*ob/ob* mouse *db/db* mouse Zucker (fa/fa) fatty rat KK (Kuo Kondo) mouse KK/A^y (yellow KK obese) mouse NZO (New Zealand obese) mouse NONcNZO10 mouse OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima fatty) rat ZDF (Zucker diabetic fatty) rat JCR/LA-cp (James C Russel/LA corpulent) rat M16 mouse SHR/N-cp (spontaneously hypertensive rat/NIH-corpulent) rat TSOD (Tsumara Suzuki obese diabetes) mouse Obese rhesus monkey female Yucatan minipigs	Cohen diabetic rat GK (Goto-Kakizaki) rat Torri rat Non-obese C57BL/6 (Akita) mutant mouse ALS(alloxan sensitive)/Lt mouse
Diet/nutrition induced models	Israeli Sand rat (Psammomys obesus) Spiny mouse (Acomys calirinus) C57/BL 6J mouse Ctenomis talarum (Tucotuco) Gottingen minipigs	--
Chemically induced	GTG (goldthioglucose) treated obese mice	ALX or STZ adult models Neonatal STZ rat
Surgically induced	VMH (ventromedial hypothalamus) lesioned dietary obese rat	Partial pancreatectomized animals
Genetically modified animals (transgenic/knockout)	β_3 receptor knockout mouse Uncoupling protein (UCP1) knock-out mouse	Transgenic or knockout animals (mainly mice) of genes implicated in insulin resistanse (*e.g. IRS-1, IRS-2, GLUT-4*), lipid and glucose metabolism (*e.g. PPARs*) and insulin secretion (*GLUT-2, Glukokinase, IGF-1R*) human islet amyloid polypeptide (hIAPP) transgenic rodents

3 Les flavonoïdes

3.1 Structures et classification des polyphénols

Les végétaux synthétisent une vaste gamme de composés organiques considérés comme leurs métabolites. Parmi eux, les composés polyphénoliques, ou polyphénols, sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs groupements phénoliques arrangés en structures plus ou moins complexes. Autrement dit, les polyphénols possèdent un ou plusieurs noyaux benzéniques, sur lesquels sont liés une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Plus de 8 000 structures phénoliques ont été décrites et largement retrouvées dans tout le règne végétal, généralement conjuguées à des sucres ou des acides organiques. Les polyphénols peuvent être classés en fonction du nombre et de la disposition de leurs atomes de carbone. Il est ainsi possible de les diviser en deux groupes : les flavonoïdes et les non flavonoïdes. Les polyphénols sont généralement impliqués dans la défense des végétaux contre les rayons ultraviolets ou l'agression par des agents pathogènes. Ils jouent également un rôle dans la stabilité oxydative et dans les qualités sensorielles des aliments végétaux en contribuant à moduler leur amertume, leur astringence, leur couleur, leur saveur et leur odeur (Beckman, 2000; Crozier et al., 2008).

Les flavonoïdes (du latin flavus : jaune) sont les polyphénols les plus nombreux. Ils possèdent un noyau flavane de 15 atomes de carbone disposés en trois cycles A, B et C. Le cycle C, en position centrale, est un hétérocycle pyrane lié aux cycles aromatiques A et B. Les cycles A et C forment un noyau chromane. Le système de doubles liaisons conjuguées leur permet d'absorber dans la gamme visible, et leur confère une large gamme de couleurs selon leur structure allant de l'ultra-violet au rouge en passant par le jaune. Ils ont une forte absorption dans la plage de 340 à 380 nm ce qui est particulièrement utile pour attirer les insectes sensibles au rayonnement UV. Ils donnent leurs couleurs à de nombreuses fleurs et de nombreux fruits, et une couleur verte plus intense d'une plante est un bon indicateur d'une teneur plus élevée en flavonoïdes. Les flavonoïdes sont souvent glycosylés, préférentiellement en C3 sous forme de mono-, di- ou tri-glycoside(s), et la glucuronidation est également possible. Les flavonoïdes peuvent être classés en six principales sous-classes en fonction du degré d'oxydation du cycle C et du carbone lié au cycle B : les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanols, les flavanones et les anthocyanidines. **Figure 33A**. Il existe également d'autres groupes mineurs de flavonoïdes, basés sur l'ouverture et le réarrangement du cycle C : les dihydroflavones, les flavan-3,4-diols, les chalcones, les coumarines, les dihydrochalcones et les aurones. **Figure 33B**. (Crozier et al., 2008; Murkovic, 2016; Singla et al., 2019).

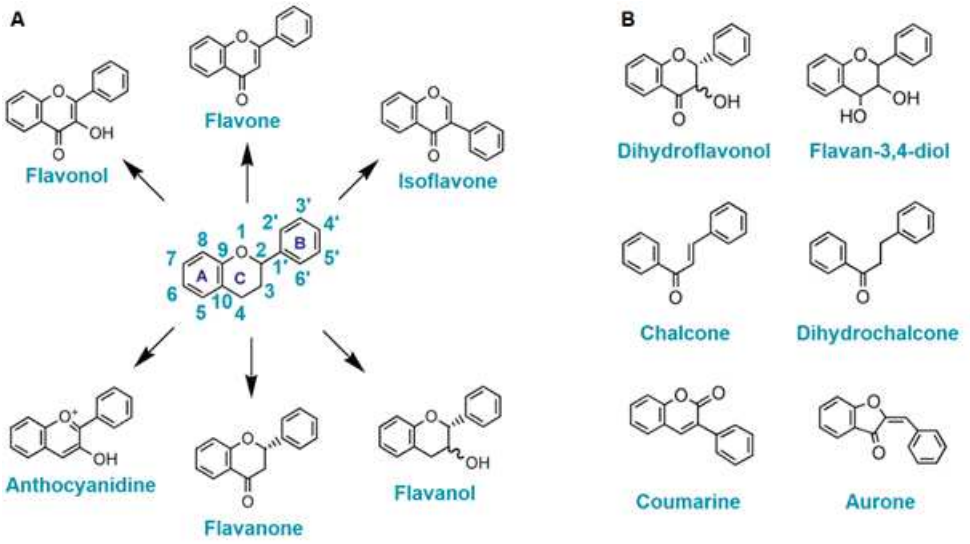
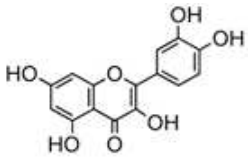
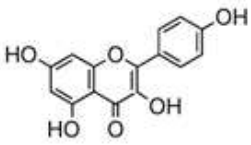
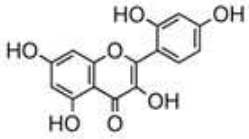
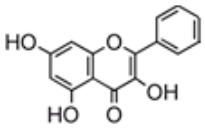
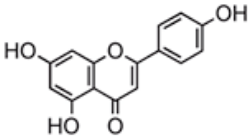
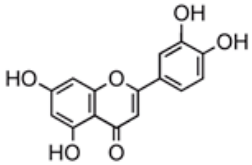


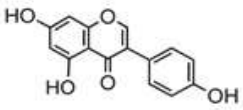
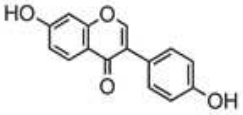
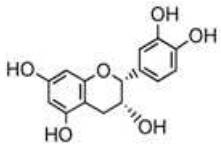
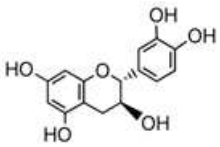
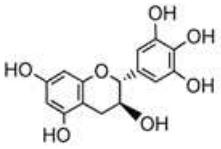
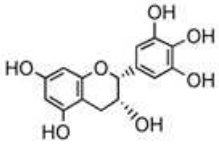
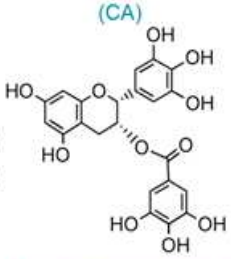
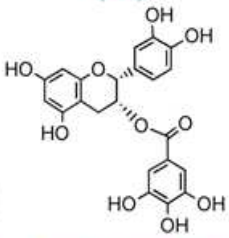
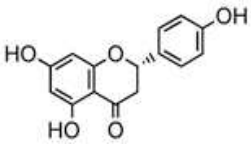
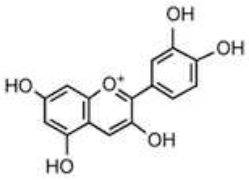
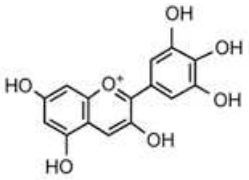
Figure 33 : Structures générales des principaux flavonoïdes (A) et des groupes mineurs (B) (d'après Crozier et al., 2008).

Les **flavones** (lutéoline, apigénine…) possèdent une fonction cétone en position 4 sur un cycle C oxydé. De nombreuses substitutions sont possibles comme des hydroxylations, des méthylations, des O- et C-alkylations ou des glycosylations. Les **flavonols** (quercétine, kaempférol, morine, galangine…) sont des flavones qui présentent un groupement hydroxyle sur le carbone 3 du cycle C. Il s'agit des flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal (à l'exception des champignons et des algues). De nombreuses substitutions sont également possibles avec par exemple plus de 200 conjugués de glucides différents pour le kaempférol. La particularité des **isoflavones** (génistéine, daidzéine…), en comparaison aux flavones, réside dans le fait que le cycle B est lié en position 3 et non en position 2 sur le cycle C. Les **flavanols** (flavan-3-ols) ont un cycle C saturé, un groupement hydroxyle en position 3, et possèdent ainsi deux carbones asymétriques. Il s'agit de la sous-classe la plus complexe de flavonoïdes allant de monomères simples (catéchine, épicatéchine…), aux oligomères et polymères proanthocyanidines également connus sous le nom de tanins condensés. Les **flavanones** (hespérétine, naringénine…) possèdent une fonction cétone en position 4 et un centre chiral en position 2. Cette structure est très réactive et peut subir des réactions d'hydroxylation, de glycosylation et de O-méthylation. Les **anthocyanidines** (cyanidine, delphinidine…) ont un cycle C oxydé donnant l'ion flavylium. À faible pH, le noyau chromane (cycle A et C) est chargé positivement, ce qui entraîne une forte absorption à environ 520 nm. À des valeurs de pH supérieures à 4,5, la charge est perdue et l'absorption considérablement réduite. Les anthocyanidines sont principalement retrouvées sous

forme de conjugués hétérosidiques, appelés anthocyanes. Il est très facile d'identifier les végétaux riches en anthocyanes car ils sont responsables des couleurs rouges intenses des fruits et des fleurs en raison de leur absorption à environ 520 nm. **Figure 33A**. (Crozier et al., 2008; Murkovic, 2016). Les structures et les différentes sources alimentaires des principaux flavonoïdes sont résumées dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Structures et principales sources alimentaires de divers flavonoïdes (Crozier et al., 2008; Caselli et al., 2016; Murkovic, 2016; Hostetler et al., 2017; Manzoor et al., 2017; hmdb, 2020)**.**

Flavonoïde	Structure	Sources alimentaires
Flavonol		
Quercétine		- oignon, brocoli et autres légumes verts à feuilles - baies : raisin rouge, tomate, framboise, canneberge - agrumes
Kaempférol		- épices : safran, cumin, - condiments : câpre, carvi, fenugrec - haricot, choux frisé, luzerne, noix de macadamia, igname - cerise griotte, myrtille
Morine		- feuilles de goyave, certaines algues, graines de céréales - oignon - amande, pomme - thé, café, vin rouge
Galangine (norizalpinine)		- herbes et épices comme l'origan - pomme, orange douce, thé - racine de Galanga (*Alpinia officinarum*)
Flavone		
Apigénine		- persil, thym, origan, basilic, coriandre - céleri, oignon - orange, myrtille - thé, camomille, bière, vin
Lutéoline		- persil, thym, menthe poivrée, romarin, origan - céleri, brocoli, choux, artichaut, carotte - poivron, peau de pomme - huile d'olive

Isoflavone		
Génistéine		- soja, produits à base de soja (ex. tofu)
Daidzéine		
Flavanol		
Epicatéchine (EC)		- en abondance dans les feuilles de thé - raisin, pomme, abricots et plusieurs autres baies - fève de cacao et donc chocolat
Catéchine (CA)		
Gallocatéchine (GC)		
Epigallocatéchine (EGC)		
Epigallocatéchine gallate (EGCG)		
Epicatéchine gallate (ECG)		
Flavanone		
Naringénine		- agrumes, raisin et plusieurs autres fruits - tomates et les produits à base de tomates
Anthocyanidine		
Cyanidine		- aubergine, rhubarbe, chou rouge, oignon rouge - mûre, cassis, myrtille, raisin, cerise, fraise, prune - sureau, aronia, camarine noire
Delphinidine		

Les principaux composés non flavonoïdes sont les acides phénoliques (acide gallique, précurseur des tanins et ellagitanins), les acides hydroxycinnamiques (acide férulique, acide p-coumarique, acide caféique…) et les stilbènes (resvératrol…). **Figure 34**. (Crozier et al., 2008; Singla et al., 2019).

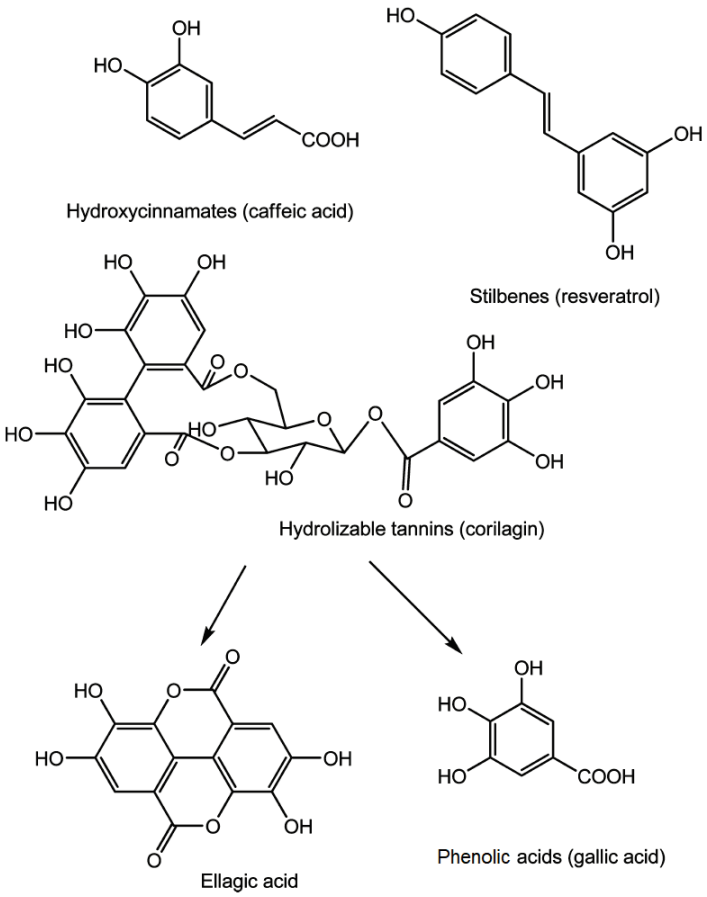


Figure 34 : Exemples de composés polyphénoliques non flavonoïdes (Selma et al., 2009).

3.2 Effets des flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline et la protection des cellules β pancréatiques

Au cours des dernières décennies, un grand nombre d'études ont démontré les effets bénéfiques sur la santé de la consommation de composés polyphénoliques présents dans les végétaux. Plusieurs études épidémiologiques ont montré une corrélation entre l'exposition aux polyphénols et la prévention de plusieurs maladies non transmissibles telles que le cancer, les maladies

neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et le diabète. Toutefois, les mécanismes sous-jacents sont peu connus (Del Rio et al., 2012; Rodriguez-Mateos et al., 2014; Chiva-Blanch and Badimon, 2017; Durazzo et al., 2019). Les effets des flavonoïdes sur les cellules β pancréatiques concernent essentiellement la survie de ces cellules ou leur fonctionnalité avec en première ligne la sécrétion d'insuline. Les effets sont décrits *in vivo*, grâce à des études réalisées sur des modèles animaux de diabète, ou bien *in vitro*, dans des expériences menées sur des îlots isolés ou sur des lignées cellulaires sécrétant de l'insuline. Les différents résultats d'études récentes qui ont évalué les effets des flavonoïdes sur la survie des cellules β dans différents modèles d'animaux diabétiques sont résumés dans le **Tableau 8**. Les investigations évaluant les effets des flavonoïdes sur la fonctionnalité des cellules β et l'identification de leurs cibles cellulaires sont le plus souvent réalisées sur des modèles *in vitro*. Ces études explorent également la capacité des flavonoïdes à protéger les cellules β en mimant des conditions décrites dans la physiopathologie du diabète de type 2 comme le stress oxydant, la gluco- et la lipotoxicité ou l'inflammation chronique. (Dall'Asta et al., 2015; Soares et al., 2017; Ghorbani et al., 2019).

De plus en plus d'études démontrent la capacité de plusieurs flavonoïdes comme la quercétine, le kaempférol, la morine, la génistéine, la catéchine ou la cyanidine à stimuler la sécrétion d'insuline. Ainsi, un large éventail de flavonoïdes peut agir sur les cellules β pancréatiques et moduler la sécrétion d'insuline. Les cibles pharmacologiques de ces composés sont nombreuses et reflètent des mécanismes d'action différents. La quercétine et la cyanidine, par exemple, sont capables d'activer les Ca_V pour induire une entrée de calcium dans les cellules β et déclencher l'exocytose des vésicules de sécrétion (Youl et al., 2010; Bardy et al., 2013; Bhattacharya et al., 2014; Suantawee et al., 2017; Zhuang et al., 2018). Cependant certains flavonoïdes améliorent la sécrétion d'insuline induite par le glucose en influençant les voies de régulation, notamment les cascades de signalisation PLCβ / PKC et AMPc / PKA, ou en agissant sur le métabolisme mitochondrial. Plus précisément, l'effet du kaempférol implique le transporteur MCU (*Mitochondrial Calcium Uniporter*) pour augmenter l'entrée de calcium dans la mitochondrie lors de la stimulation par le glucose (Bermont et al., 2020). La morine, quant à elle, interagit avec les récepteurs aux imidazolines I3 (R-I3), conduisant à la fermeture des K_{ATP} et à l'ouverture consécutive des Ca_V, mais aussi à l'activation de la PLCβ, puis de la PKC (Lin et al., 2017a, 2017b). La génistéine stimule la signalisation de l'AMPc *via* une interaction avec le GPR30 (*G protein-coupled receptor 30*), récepteur aux œstrogènes de type RCPG, couplé à la protéine $G\alpha_s$ (Luo et al., 2018).

Tableau 8 : Résumé des études évaluant les effets des flavonoïdes sur les cellules β pancréatiques chez les animaux diabétiques. ALO : alloxane ; EGCG : épigallocatéchine gallate ; FBG : glycémie à jeun ; GPx : glutathion peroxydase ; GST: glutathion S transférase ; NO : monoxyde d'azote ; STZ : streptozotocine ; SOD : superoxyde dismutase ; ↓ : diminution ; ↑ : augmentation (Ghorbani et al., 2019).

Flavonoids	Experimental model	Effective dose	Effects on pancreatic islets	Other effects
Epicatechin	STZ-induced diabetic rats	30 mg/kg twice a day (6 days)	↓Beta cell degeneration ↑Insulin and glucagon expression ↑Insulin release ↓NO	↓FBG
EGCG	*db/db* type 2 diabetic mice	10 g per kg of diet (10 weeks)	↑The number and the size of islets ↑Pancreatic insulin content	↑Serum insulin; ↓FBG ↑Glucose tolerance
Eupatilin	*db/db* type 2 diabetic mice	5 mg and 20 mg per 100 g diet (6 weeks)	↑Pancreatic insulin level	↑Serum insulin ↓FBG and HbA1c ↑Serum adiponectin ↑Hepatic glycogen content
Fisetin	STZ-induced diabetic mice	10 mg/kg (30 days)	↓Beta cell degeneration ↑Enzymatic antioxidants (↑catalase, ↑SOD, ↑GPx ↑GST)	↑Serum insulin ↓FBG and HbA1c ↓Serum NO ↓Serum oxidative stress indices (↓ lipid peroxidation; ↓glutathione) ↓Serum IL-1β
Genistein	STZ-induced diabetic mice	250 mg/ kg (4 weeks)	↓ Beta cell apoptosis ↑Beta cell proliferation	↑Serum insulin ↓FBG
Naringenin	STZ-induced diabetic rats	50 mg/ kg (3 weeks)	↑Beta cell number ↓Oxidative stress (↓lipid peroxidation; ↑SOD; ↑catalase; ↑GPx; ↑GST)	↑Serum insulin ↓FBG
Naringin	STZ-induced diabetic rats	100 mg/ kg (4 weeks)	↑Beta cell number ↓Oxidative stress (↓lipid peroxidation; ↑SOD; ↑catalase; ↑GPx; ↑GST)	↓Serum cytokines (TNF-α, IL-6)
Proanthocyanidins	STZ- and high carbohydrate/fat diet-induced diabetic rats	250 & 500 mg/kg (16 weeks)	↓Beta cell apoptosis ↑Insulin expression in the pancreas	↑Glucose tolerance
	ALO-induced diabetic rats	50 & 100 mg/kg (72 h)	↓Oxidative stress (↑glutathione, ↓lipid peroxidation) ↓Nitrate/nitrite content)	↑Serum insulin ↓FBG
	Cadmium-induced pancreatitis in rats	Pretreatment with 25-100 mg/ kg	↓Beta cell apoptosis ↓Expression of caspases ↑Pancreatic insulin ↓NO ↓Pancreatic TNF-α, IL-1β, and IFN-γ ↓Oxidative stress (↓ROS, ↑glutathione, ↓lipid peroxidation, ↓xanthine oxidase)	↑Serum insulin ↓FBG ↓Serum lipids
Puerarin	STZ-induced diabetic mice	100 mg/kg (3 days pretreatment)	↑Beta cell mass	↑Serum insulin ↓FBG ↑Glucose tolerance
Quercetin	STZ-induced diabetic rats	15 mg/kg (4 weeks)	↑Beta cell number ↓Oxidative stress (↓lipid peroxidation, ↑catalase, ↑GPx)	↑Serum insulin ↓FBG ↓Serum NO
		15 mg/kg (10 days)	↑Beta cell number	↑Serum insulin ↓FBG ↑Glucose tolerance
		25 mg/kg (30 days)	↓Beta cell apoptosis ↓Oxidative stress (↑SOD; ↓lipid peroxidation, ↑catalase, ↑GPx)	↑Serum insulin ↓FBG ↓Serum NO
		50 mg/kg (40 days)	↑Beta cell number	↑Serum insulin ↓Hepatic oxidative stress (↓lipid peroxidation)
	STZ-induced diabetic mice	Diets containing 0.1% or 0.5% quercetin (2 weeks)	↑Beta cell proliferation ↓Oxidative stress (↓lipid peroxidation)	↑Serum insulin ↓FBG
	Fructose-induced hyperinsulinemia (rats)	100 mg/Kg (4 weeks)	Preserving islet morphology and function	↓FBG ↓Serum insulin ↓Serum leptin
Rutin	STZ-induced diabetic rats	100 mg/g (45 days)	↑Beta cell number ↓Oxidative stress (↓lipid peroxidation; ↑SOD; ↑GPx; ↑catalase; ↑glutathione)	↑Serum insulin ↓FBG

Dans le but de promouvoir les effets bénéfiques des flavonoïdes sur les cellules β pancréatiques, et après avoir montré leur efficacité pour stimuler la sécrétion d'insuline, de nombreuses études se sont également attachées à prouver leur capacité à protéger ces cellules dans un environnement délétère mimant le diabète de type 2 : stress oxydant, gluco- et lipotoxicité, environnement pro-inflammatoire. Le stress oxydant peut être induit par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le 2-désoxy-D-ribose (dRib), générateurs de ROS. La gluco- et la lipotoxicité sont provoquées par une exposition prolongée à une forte concentration en glucose ou acide gras saturé à longue chaîne respectivement. L'environnement pro-inflammatoire est mimé par une exposition à un cocktail de cytokines pro-inflammatoires, généralement composé de TNF-α (*Tumor necrosis factors α*), IL-1β (Interleukine 1 β) et IFN-γ (Interféron γ). Ces conditions particulières interfèrent avec le métabolisme des cellules β et aboutissent à leur apoptose.

Il a été montré que la quercétine, le kaempférol, la morine et l'apigénine sont capables de protéger la fonction et la viabilité des cellules β contre les dommages oxydatifs induits par H_2O_2 ou le dRib. Les mécanismes sous-jacents impliquent le pouvoir anti-oxydant de ces flavonoïdes mais aussi une action pharmacologique (Lee et al., 2010; Suh et al., 2012). La morine inhibe la formation de radicaux libres *via* l'activation du facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor erythroid-2-related factor 2*) et l'augmentation consécutive de l'expression d'un ensemble de gènes antioxydants (SOD, CAT et GPx) (Vanitha et al., 2017). L'action de la quercétine semble dépendre de l'équilibre entre l'activation de ERK1/2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase* 1/2) favorable à une survie et une prolifération des cellules et JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) conduisant à l'apoptose et à la mort cellulaire (Youl et al., 2010, 2014).

En conditions de gluco- et/ou lipotoxicité, induisant l'apoptose des cellules β, la quercétine, la naringénine, le kaempférol, et la myricétine parviennent à sauvegarder la viabilité cellulaire. Ces flavonoïdes agissent essentiellement en bloquant les mécanismes d'apoptose comme l'activation des caspases, en augmentant l'expression des protéines anti-apoptotiques Akt et Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) et parallèlement en diminuant l'expression des protéines pro-apoptotiques comme BAX (*Bcl-2-associated X protein*) et BAD (*Bcl2-associated agonist of cell death*) (Zhang and Liu, 2011; Bhattacharya et al., 2014; Zhuang et al., 2018; Karunakaran et al., 2019).

De la même façon, plusieurs flavonoïdes sont également capables de protéger les cellules β de l'apoptose induite par un environnement pro-inflammatoire en augmentant l'expression des protéines anti-apoptotiques Akt et Bcl-2 et en diminuant l'expression des protéines pro-apoptotiques comme

BAX. Par ailleurs, il est à noter que les cytokines pro-inflammatoires favorisent la translocation de NF-κB dans le noyau, conduisant à une augmentation de l'expression de la forme inductible de la NO synthase (iNOS) et à l'augmentation conséquente de NO, favorable à l'apoptose des cellules. La quercétine, la naringénine, l'apigénine, la lutéoline, la myricétine et l'EGCG sont capables de bloquer cette voie de signalisation (Kim et al., 2007; Zhang et al., 2011; Ding et al., 2012; Dai et al., 2013).

Ainsi, plusieurs études *in vitro*, utilisant différents modèles cellulaires, ont permis la mise en évidence des effets bénéfiques des flavonoïdes sur les cellules β pancréatiques. En effet, ils sont décrits pour améliorer leur capacité à sécréter de l'insuline en réponse au glucose et à résister aux agressions qui miment les conditions du diabète. Les résultats de ces études indiquent que l'effet protecteur des flavonoïdes à des concentrations non nutritionnelles (supérieures à 1 µM) peut reposer, au moins en partie, sur leur capacité à moduler directement la fonctionnalité cellulaire. Il est difficile d'identifier leurs cibles moléculaires précisément, mais il apparait que l'exposition des cellules β aux flavonoïdes entraîne une modulation de diverses cibles pharmacologiques, notamment des canaux ioniques, des protéines kinases ou des facteurs de transcription. Plus précisément, les flavonoïdes peuvent améliorer la fonction des cellules β non seulement en stimulant les facteurs de survie ou les effecteurs de la sécrétion d'insuline, mais également en inhibant les processus cellulaires délétères.

3.3 Effets des flavonoïdes sur les canaux calciques voltage dépendants

Une étape clé dans les mécanismes de sécrétion d'insuline est l'activation des Ca_V, afin de déclencher l'exocytose de vésicules de sécrétion. Les Ca_V sont également d'une importance capitale dans la fonctionnalité d'autres types cellulaires (contractions musculaires, propagation des potentiels d'action, exocytose des neurotransmetteurs…). L'effet des flavonoïdes sur ces canaux a donc été largement étudié sur de nombreux modèles.

Parmi les canaux calciques, les $Ca_V1.2$ sont particulièrement impliqués dans la première phase de la sécrétion d'insuline (Rorsman and Ashcroft, 2018). Summanen *et al.* (2001) ont été les premiers à démontrer que la quercétine augmente les courants de type L *via* les $Ca_V1.2$ spécifiquement, dans des cellules hypophysaires de rats de la lignée GH4C1. Depuis, plusieurs autres études ont confirmé à l'aide d'expériences électrophysiologiques dans divers types cellulaires, que la quercétine est un activateur des canaux $Ca_V1.2$ (Summanen et al., 2001; Fusi et al., 2017). Sur des cellules de muscles

lisses vasculaires, Saponara et ses collaborateurs (2011) ont étudié 24 molécules, structurellement proches de la quercétine et de la myricétine, dans le but de déterminer les caractéristiques structurelles responsables de leur activité sur les $Ca_V1.2$. Certains flavonoïdes se sont révélés activateurs (agonistes) et d'autres inhibiteurs (antagonistes) des courants calciques. La myricétine, la quercétine, l'isorhamnétine, la lutéoline, l'apigénine et le kaempférol ont augmenté les courants calciques, tandis que la naringénine, le résokaempférol, la baicaléine, la génistéine, la 3-méthyl-galangine, la 5,7,2'-trihydroxyflavone et la chrysine ont inhibé ces courants. Cependant, aucune relation structure-activité n'a pu véritablement être affirmée avec cette série de composés, même si des positions d'hydroxylation ont émergé comme plus importantes pour conférer aux flavonoïdes des effets agonistes ou antagonistes sur les canaux calciques. **Figure 35**. (Saponara et al., 2011).

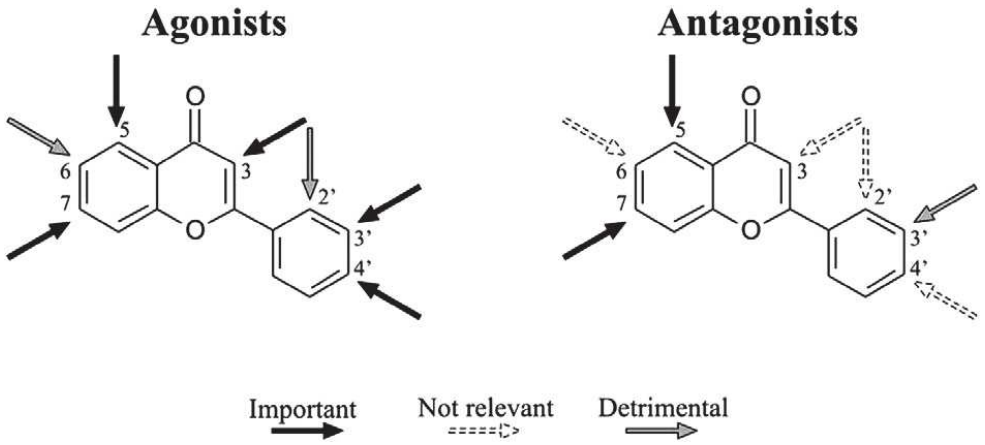


Figure 35 : Positions des groupements hydroxyles et leurs effets sur la modulation des canaux $Ca_V1.2$ de cellules de muscles lisses vasculaires par les flavonoïdes (Saponara et al., 2011).

Par la suite, la même équipe a réalisé une étude de relation structure/activité *in silico* sur les mêmes flavonoïdes en utilisant un modèle 3D de la sous-unité α_{1C} des $Ca_V1.2$. Concernant les flavonoïdes classés comme activateurs lors des expériences d'électrophysiologie précédemment décrites, le groupement hydroxyle en position 3' apparait essentiel pour la formation d'une liaison hydrogène avec le résidu Thr-1066 du canal, tandis que ceux en position 5, 6 et 7 contribuent à la formation de liaisons hydrogène avec les résidus Tyr-1178, Ser-1141 et Tyr-1489 du canal respectivement. Ces interactions stabiliseraient une conformation favorisant l'ouverture du canal. Pour les molécules inhibitrices, les groupements hydroxyles en position 4' et 5' semblent être

importants pour la formation de liaisons hydrogène avec le résidu Tyr-1489 du canal. Par ailleurs, le groupement hydroxyle en position 6 semble délétère car il empêche la formation d'une liaison hydrophobe avec le résidu Leu-774 du canal. Inversement, le groupement hydroxyle en position 7 s'avère important pour la formation d'une liaison hydrogène avec le groupe amino du résidu Asn-770 du canal. Ces interactions stabiliseraient une conformation favorisant la fermeture du canal. **Figure 36**. La géométrie spatiale des flavonoïdes semble également jouer un rôle important dans l'effet de ces molécules puisque les flavonoïdes activateurs présentent un angle dièdre entre les plans formés par les cycles A et C et par le cycle B, et les flavonoïdes inhibiteurs possèdent une géométrie plane. Cette géométrie moléculaire différente est causée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires dans leur structure. **Figure 36**. (Fusi et al., 2017).

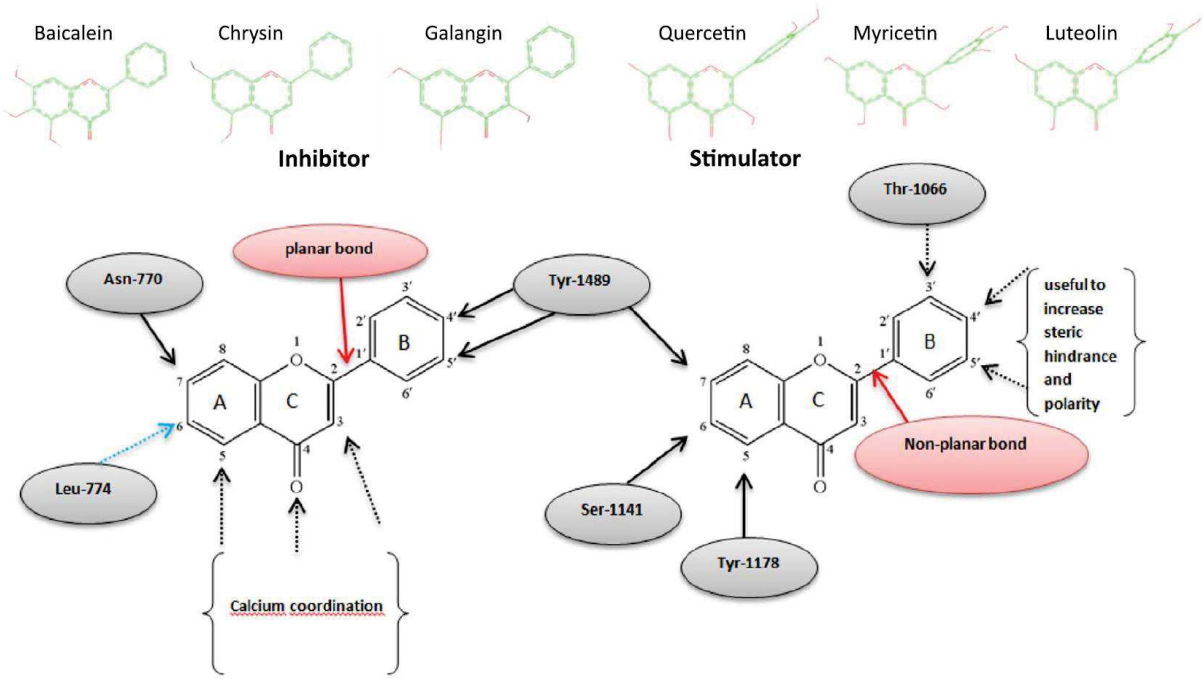


Figure 36 : Géométrie spatiale de quelques flavonoïdes et sites d'interaction des groupements hydroxyles avec la sous-unité α_{1C} des $Ca_V1.2$ (Fusi et al., 2017).

Concernant les cellules β pancréatiques, dans le modèle des cellules de la lignée INS-1, la quercétine (20 µmol.L^{-1}), en l'absence de tout facteur co-stimulant , induit une augmentation de calcium intracellulaire et une sécrétion d'insuline, toutes deux inhibées par la nifédipine (un

antagoniste des Ca_V de type L). Ces résultats ont pu être reproduits dans des cellules isolées d'îlots pancréatiques de rat. De plus, des expériences de patch-clamp cellule entière ont confirmé que la quercétine active directement les Ca_V de type L dans les cellules INS-1, en interagissant toutefois avec un site de liaison différent de celui du bay K8644 (agoniste du canal calcique) (Bardy et al., 2013). Toujours dans les cellules INS-1, la cyanidine augmente la sécrétion d'insuline avec un effet maximal obtenu à 100 $\mu mol.L^{-1}$ en présence de 4 $mmol.L^{-1}$ de glucose. Elle induit une augmentation de calcium intracellulaire qui peut être inhibée par une déplétion de calcium extracellulaire et par la nimodipine (inhibiteur des Ca_V). Des expériences d'électrophysiologie en patch clamp cellule entière ont montré que la perfusion de cellules INS-1 avec de la cyanidine conduit à l'apparition de courants électriques caractéristiques des Ca_V de type L. Ces résultats sont en faveur d'un mécanisme d'action impliquant l'activation des Ca_V par la cyanidine. (Suantawee et al., 2017).

Sur des artères pulmonaires isolées de rats, un protocole standard pour l'évaluation fonctionnelle des Ca_V de type L consiste à induire une contraction des artères avec des concentrations croissantes en $CaCl_2$, dans un milieu dépolarisant riche en potassium et dépourvu de calcium. Un traitement par 10 $\mu mol.L^{-1}$ de kaempférol diminue les contractions induites par le $CaCl_2$. Ceci montre que le kaempférol agit comme un antagoniste des Ca_V de type L dans les cellules musculaires lisses vasculaires de l'artère pulmonaire du rat (Mahobiya et al., 2018).

La lutéoline (20 $\mu mol.L^{-1}$) a un fort effet inhibiteur sur la motilité du côlon en inhibant la contraction des muscles lisses de souris. Son effet inhibiteur n'est pas affecté par le TTX (un inhibiteur des canaux Na^+), le L-NAME (un inhibiteur de la NO synthase), l'ODQ (un inhibiteur de la guanylyl-cyclase) ou l'Ani9 (un bloqueur spécifique des canaux ANO1), ni même par le TEA (un inhibiteur non sélectif des canaux K^+), le glibenclamide (un inhibiteur des K_{ATP}) et l'apamine (un inhibiteur des canaux potassiques activés par le calcium à faible conductivité). En revanche, l'effet inhibiteur de la lutéoline est diminué par le bay K8644 (un activateur des Ca_V de type L). Par ailleurs, les courants calciques de type L, enregistrés par la technique de patch-clamp cellule entière sur des cellules musculaires lisses du côlon proximal, sont fortement diminués par la lutéoline. Ainsi, l'effet inhibiteur de la lutéoline sur la contraction des muscles lisses du côlon semble médiée par l'inhibition des Ca_V de type L chez la souris (Yang et al., 2020).

Les flavonoïdes sont donc capables de moduler les courants calciques à travers les Ca_V dans plusieurs modèles expérimentaux. Certains composés se révèlent activateurs de ces canaux et amplifient les courants entrants de calcium, tandis que d'autres s'avèrent être inhibiteurs. Il est à noter qu'un même flavonoïde peut agir à la fois comme activateur ou inhibiteur des Ca_V selon le modèle utilisé. Ceci pourrait être dû aux sous-unités du canal potentiellement légèrement différentes en fonction de chaque type cellulaire ou s'expliquer par l'expression de protéines régulatrices spécifiques ou par l'environnement du canal au niveau de la membrane plasmique.

3.4 Effets des flavonoïdes sur les fonctions mitochondriales

La mitochondrie joue un rôle déterminant dans les mécanismes de sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Elle permet de transformer l'énergie du métabolisme glucidique en ATP. L'augmentation du ratio ATP/ADP va alors déclencher l'exocytose des vésicules d'insuline *via* la fermeture des K_{ATP} et l'ouverture des Ca_V.

Les flavonoïdes peuvent agir sur la chaîne des phosphorylations oxydatives (OXPHOS) des mitochondries et impacter la synthèse d'ATP. Certains d'entre eux sont capables de moduler l'activité des complexes de la chaîne respiratoire et/ou de découpler la phosphorylation oxydative en affectant la perméabilité membranaire. Ce dernier point peut être la conséquence d'une modulation de l'activité du pore de transition de perméabilité mitochondrial *via* l'ANT (*Adenine Nucleotide Translocase*), ou bien d'une action découplante directe en leur qualité de protonophore.

Il est bien établi que la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie produit des ROS, comme l'anion superoxyde (O_2^-), rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'action de la superoxyde dismutase mitochondriale. Les ROS sont connus pour conduire à une dysfonction des cellules β dans la physiopathologie du diabète de type 2 (cf. 2.3.3 Défaut de sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques). L'inhibition de la chaîne respiratoire augmente la production de ROS par les mitochondries, tandis que son découplage la diminue. Une étude menée sur des mitochondries isolées de cerveaux et de cœurs de rats a montré que la quercétine, le kaempférol et l'épicatéchine sont de puissants inhibiteurs de la production de H_2O_2 par les mitochondries. (Lagoa et al., 2011). Une autre étude sur des mitochondries isolées de foies de rats, a montré, à l'inverse, que la quercétine inhibe la respiration mitochondriale et augmente donc la

génération de ROS par les mitochondries. Cependant, cette étude précise que, potentiellement, la quercétine élimine rapidement les ROS générés grâce à son pouvoir antioxydant direct. La galangine, quant à elle, provoque un découplage de la chaîne des phosphorylations oxydatives, diminuant la génération de ROS par les mitochondries (Dorta et al., 2008). L'inhibition de la production de ROS par les flavonoïdes a un effet protecteur sur les cellules β, améliorant ainsi leurs fonctionnalités telles que la sécrétion d'insuline.

Concernant les effets des flavonoïdes sur les complexes de la chaîne OXPHOS, une étude a montré que la quercétine, le kaempférol et l'apigénine (dès 10 µmol.L^{-1}) n'affectent pas la consommation de dioxygène, mais qu'ils inhibent l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire dans des mitochondries isolées de cerveau et de cœur chez le rat. Cette inhibition a été diminuée par ajout d'ubiquinone, suggérant une compétition entre ces flavonoïdes et l'ubiquinone sur le site de liaison au niveau du complexe I. En effet, les flavonoïdes présentent une structure chimique proche de la partie quinone de l'ubiquinone. Par contre, ces flavonoïdes ne modulent pas l'activité des complexes II, III et IV (Lagoa et al., 2011). La génistéine est décrite pour inhiber l'activité de l'ATP synthase (CI_{50} = 55 µmol.L^{-1}) dans des mitochondries isolées de cerveau de rats (de Oliveira, 2016). A partir de mitochondries isolées de cerveau et de foie de rat, une autre équipe a classé divers flavonoïdes vis-à-vis de leur capacité à inhiber l'ATP synthase en évaluant leurs CI_{50}. L'épigallocatéchine gallate est le flavonoïde le plus inhibiteur de leur screening avec une CI_{50} évaluée à 17 µmol.L^{-1}. Suivent l'épicatéchine gallate (CI_{50} = 45 µmol.L^{-1}), puis la génistéine, la quercétine, le kaempférol et la morine (CI_{50} de 55 à 65 µmol.L^{-1}) et la phlorétine, l'apigénine et la daidzéine (CI_{50} environ de 100 µmol.L^{-1}). La catéchine, l'épicatéchine et l'épigallocatéchine sont plus faiblement inhibitrices (Zheng and Ramirez, 2000).

Les flavonoïdes, acides faibles hydrophobes, présentent des caractéristiques structurelles souvent associées aux molécules découplantes telles que les protonophores. Ils sont capables de diffuser à travers les membranes et de se présenter sous forme anionique déprotonée ou sous forme neutre associée à un proton. Dans le cytosol (pH 7,4), ils existent sous la forme d'un mélange de formes anioniques et neutres. La proportion de forme anionique et neutre dépend du pKa de chaque groupement phénolique. Leur propension à traverser la membrane cellulaire et les membranes mitochondriales externe et interne dépend de leur lipophilie. De nombreux flavonoïdes ont des valeurs de pKa comprises entre 6 et 9, soit proches du pH physiologique du cytosol et des compartiments mitochondriaux. Ils ont donc la capacité d'atteindre la matrice mitochondriale et d'y libérer un proton dans l'environnement relativement basique (pH 7,8) de la matrice. Après dissociation, les flavonoïdes

sous forme anionique diffusent à travers la membrane interne mitochondriale grâce au gradient électrochimique pour rejoindre l'environnement relativement acide de l'espace intermembranaire (pH 6,8) et s'associer à un proton. Cette diffusion à travers la membrane mitochondriale interne entraîne le transport de protons de l'espace membranaire interne vers la matrice mitochondriale, ce qui conduit à la dissipation du potentiel de membrane mitochondrial et au découplage de la phosphorylation oxydative. **Figure 37** (Stevens et al., 2018). Une étude réalisée sur des mitochondries isolées de cellules de foie de rat a montré que la galangine, à 25 et 50 µmol.L^{-1}, peut dissiper le potentiel de membrane mitochondrial et diminuer la synthèse d'ATP. Les auteurs expliquent que la structure chimique de la galangine favorise son activité découplante en tant que protonophore (Dorta et al., 2005).

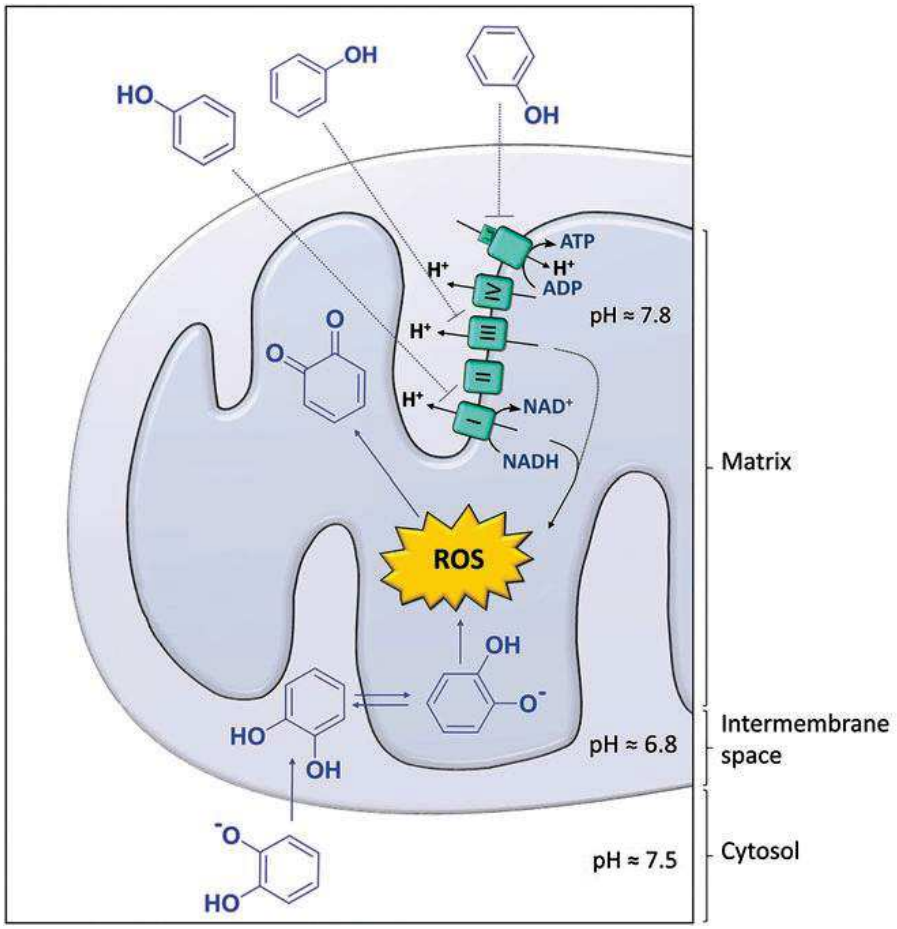


Figure 37 : Effets potentiels des flavonoïdes sur la mitochondrie (d'après Stevens et al., 2018).

Les pores de transition de perméabilité mitochondriaux (PTP) sont des complexes multiprotéiques formant un canal associé à de nombreuses protéines régulatrices. Ils sont notamment impliqués dans le déclenchement de l'apoptose. Dans des conditions physiologiques, les complexes PTP régulent les échanges ATP/ADP et les échanges de petits métabolites entre le cytosol et la matrice mitochondriale. L'ANT est une protéine régulatrice du PTP capable d'induire ou d'inhiber son ouverture. Sur des mitochondries isolées à partir de cortex de rein de rat, la quercétine inhibe la consommation de dioxygène à des concentrations supérieures à 30 $\mu mol.L^{-1}$. Elle induit également une chute du gradient électrique transmembranaire à 5 et 30 $\mu mol.L^{-1}$. Les auteurs ont montré que la quercétine induit l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriaux (PTP) par l'inhibition de l'ANT, expliquant la baisse du potentiel de membrane (Ortega and García, 2009).

Les flavonoïdes présentent des effets variés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ils sont décrits pour piéger les ROS en formant des quinones et protéger ainsi le métabolisme mitochondrial. Ils peuvent également cibler la phosphorylation oxydative mitochondriale en interagissant avec les complexes de la chaîne de transport des électrons, principalement l'ATP synthase, en diminuant le potentiel membranaire comme protonophores ou induire l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriaux. La modulation des fonctions mitochondriales a un fort impact sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose puisqu'elles permettent la synthèse d'ATP. L'augmentation du ratio ATP/ADP est en effet une étape nécessaire dans le processus de sécrétion d'insuline. Une inhibition du métabolisme mitochondrial pourra ainsi avoir comme conséquence une inhibition de la sécrétion d'insuline. A l'inverse, une protection des fonctions mitochondriales sera bénéfique pour la cellule β et la sécrétion d'insuline.

Nous venons de voir que de nombreux flavonoïdes sont actifs sur la cellule β pancréatique, et qu'ils sont notamment capables de moduler la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Cependant, les mécanismes d'action de ces molécules ne sont pas toujours clairement identifiés et peuvent faire intervenir plusieurs cibles cellulaires. De plus, les flavonoïdes sont capables de moduler l'activité des Ca_V et/ou d'interférer avec le métabolisme mitochondrial dans plusieurs types cellulaires. Il apparait alors important de pouvoir comparer les effets de ces flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline et d'essayer d'identifier plus précisément les mécanismes d'actions mis en jeu, particulièrement au niveau des Ca_V et des fonctions mitochondriales.

Partie expérimentale

I. Introduction

Le diabète est un trouble du métabolisme du glucose qui peut engendrer des complications microvasculaires (rétinopathie, néphropathie, neuropathie) et macrovasculaires (coronaropathies avec angine de poitrine ou infarctus du myocarde, et artériopathies périphériques avec accidents vasculaires cérébraux) s'il n'est pas correctement pris en charge. Les dépenses mondiales de santé liées au diabète en 2019 sont estimées à 760 milliards USD par la Fédération Internationale du Diabète (FID, 2019). La prévalence du diabète est en augmentation dans le monde et génère un coût humain, social et économique important (Zheng et al., 2018). En effet, en 2019, on dénombre 463 millions de diabétiques dans le monde, soit 1 personne sur 11, et la prévalence du prédiabète en France est estimée entre 10 et 15 %. Le diabète peut conduire à des décès prématurés en raison de ses complications, notamment les complications cardiovasculaires et rénales : il a causé près de 4,2 millions de morts dans le monde en 2019. Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique, c'est-à-dire une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L, soit 7 mmol/L. On distingue particulièrement deux types de diabète : le diabète de type 1 qui résulte d'une destruction auto-immune des cellules β pancréatiques ; et le diabète de type 2 qui combine une résistance à l'insuline et un déficit de sécrétion d'insuline. L'insuline est la seule hormone hypoglycémiante. Elle est produite et sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Le diabète de type 2 est précédé d'une phase de prédiabète correspondant à une diminution de la sensibilité à l'insuline, compensée par une hypersécrétion d'insuline. En fonction de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux, le stade de prédiabète peut évoluer vers le stade de diabète de type 2 (Tabák et al., 2012). A ce stade, des phénomènes de gluco- et lipotoxicité, ainsi qu'une inflammation de bas grade vont contribuer à l'apparition de stress oxydant et provoquer une dysfonction et une apoptose des cellules β (Poitout and Robertson, 2008; Böni-Schnetzler and Meier, 2019). Cependant, dès le stade de prédiabète, la lipotoxicité et l'inflammation peuvent conduire à une dysfonction précoce de la cellule β (O'Neill et al., 2013; Alejandro et al., 2015). Ainsi, la cellule β joue un rôle central dans la physiopathologie du diabète de type 2 et constitue la cible de plusieurs classes d'antidiabétiques (Bauduceau et al., 2019).

Les polyphénols sont des molécules naturelles retrouvées dans de nombreux végétaux consommés par l'Homme. Il existe des milliers de polyphénols, ce qui constitue une mine de molécules très abondante et variée. Les principales sources alimentaires sont les fruits, les légumes, le vin, le thé et le café. Les composés phénoliques sont caractérisés par la présence d'au moins un cycle benzénique portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ils peuvent être classés en fonction de la complexité de

la structure du squelette de base. Les flavonoïdes (famille de polyphénols parmi les plus abondants du règne végétal) sont des molécules connues pour leur pouvoir antioxydant (Crozier et al., 2008; Del Rio et al., 2012). Plus récemment, plusieurs travaux ont révélé que certains d'entre eux seraient également dotés d'activités pharmacologiques et induiraient des effets santé pouvant être exploités d'un point de vue thérapeutique (Williamson et al., 2018). Ces résultats sont corroborés par des études précliniques ayant démontré l'intérêt potentiel de ces molécules dans le traitement des maladies cardiovasculaires, des cancers, de troubles neurodégénératifs et du diabète (Del Rio et al., 2012; Rodriguez-Mateos et al., 2014; Dall'Asta et al., 2015; Zanotti et al., 2015). Chez l'Homme, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent que la consommation régulière de végétaux, riches en polyphénols, serait associée à un risque plus faible de développer ces pathologies chroniques (Hartley et al., 2013; Wang et al., 2014). Ainsi, les polyphénols et leurs dérivés constituent une source de molécules d'origine naturelle avec un potentiel thérapeutique qui reste largement à explorer.

La cellule β jouant un rôle central dans la physiopathologie du diabète de type 2, nous pouvons légitimement nous demander si des modulateurs pharmacologiques, comme les polyphénols, peuvent protéger, améliorer ou restaurer la fonctionnalité de la cellule β dans le but de retarder l'apparition voire de traiter le diabète de type 2. Les insulino-sécréteurs actuellement sur le marché ne sont pas dénués d'effets indésirables (risque d'hypoglycémie avec les sulfamides hypoglycémiants), ou peuvent impacter la qualité de vie du patient (les incrétino-mimétiques devant être administrés sous forme injectable). Des études antérieures menées dans notre équipe ont permis de montrer que la quercétine, un polyphénol de la famille des flavonoïdes, est capable de potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose, et de protéger la cellule β du stress oxydant, notamment en activant la voie de signalisation ERK1/2 (Youl et al., 2010). De plus, lors d'une étude plus approfondie de son mécanisme d'action, il a été montré que la quercétine est capable d'activer les canaux calciques voltage dépendant de type L de la cellule β. Ainsi la quercétine induit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, processus requis pour déclencher la sécrétion d'insuline. Elle sensibiliserait également la membrane plasmique en déplaçant le seuil d'activation des Ca_V vers des potentiels de membrane plus négatifs, permettant de préparer la cellule β à l'augmentation de la glycémie. **Figure 38**. (Bardy et al., 2013).

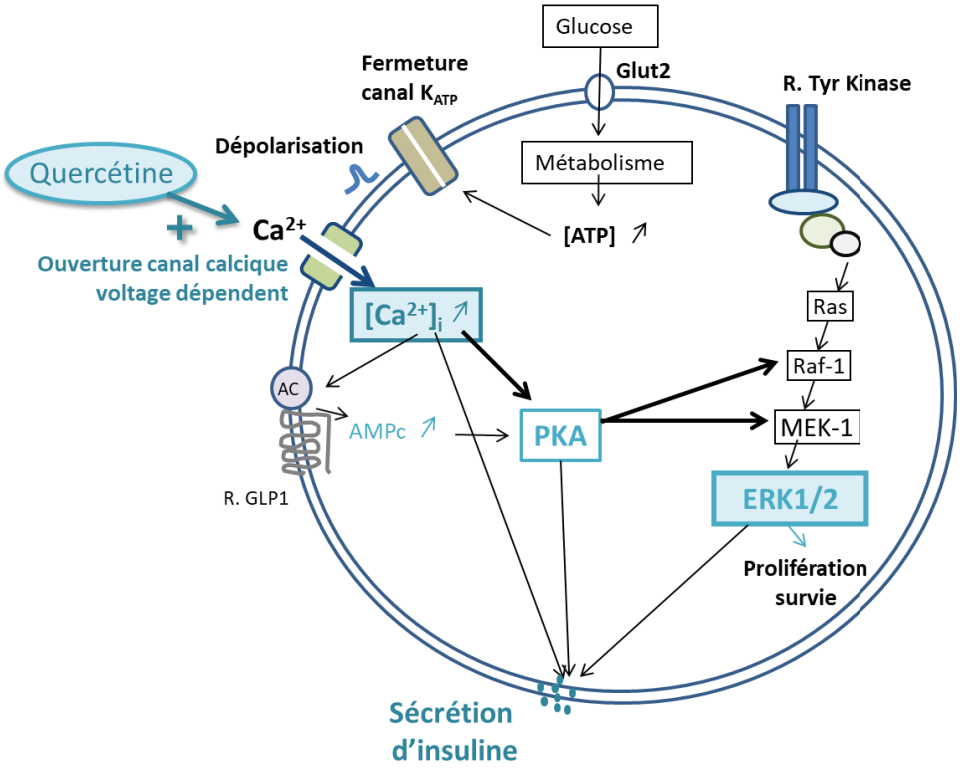


Figure 38 : Mécanisme d'action hypothétique de la quercétine sur la cellule β (d'après Youl et al., 2010; Bardy et al., 2013).

En 2011, Saponara et ses collaborateurs ont classé différents flavonoïdes selon leur capacité à moduler l'activité des canaux calciques Ca_V 1.2 sur un modèle de cellules musculaires lisses vasculaires (des plus agonistes, qui ouvrent les canaux, aux plus antagonistes, qui les ferment, en passant par les flavonoïdes inactifs) (Saponara et al., 2011). Compte-tenu de nos résultats expérimentaux obtenus avec la quercétine, nous avons décidé d'étudier le comportement de ces molécules sur la fonctionnalité des cellules β pancréatiques qui expriment également les Ca_V 1.2. En effet, il apparait important de s'attacher à trouver s'il existe une molécule avec des propriétés plus intéressantes que la quercétine : plus efficace, plus puissante, plus sélective… Par ailleurs, la quercétine possède un effet-propre sur la sécrétion d'insuline *in vitro* : elle induit une sécrétion d'insuline en absence de glucose (Bardy et al., 2013). Une molécule sans effet-propre, autrement dit qui stimule la sécrétion d'insuline uniquement en présence de glucose, serait plus appréciable puisqu'elle limiterait les risques d'hypoglycémie lors d'une utilisation en tant que médicament anti-diabétique. Ainsi, sur la base des résultats obtenus par Saponara et al. **Figure 39**., nous avons sélectionné des molécules dont les structures sont proches de celle de la quercétine puis évalué leur effet sur la sécrétion d'insuline.

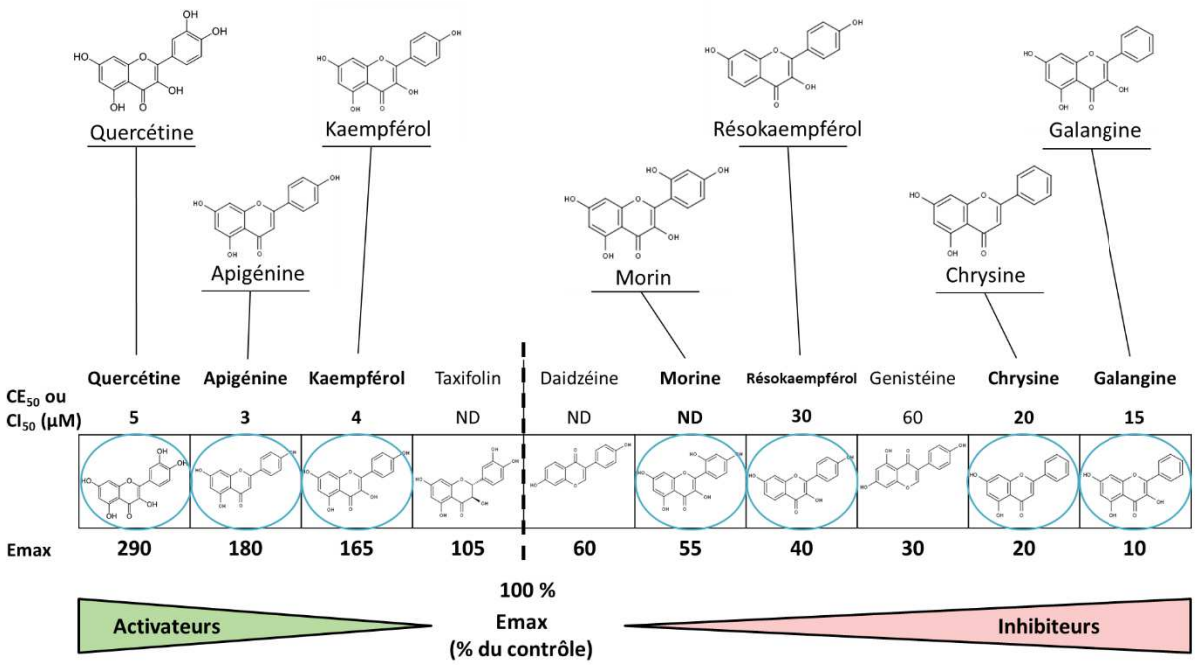


Figure 39 : Effet de différents flavonoïdes sur la modulation des courants calciques sur un modèle de cellules musculaires lisses vasculaires (d'après Saponara et al., 2011)**.**

Ce travail de thèse présente donc de nombreux intérêts majeurs. D'un point de vue pharmaceutique, cette étude ouvre la voie sur la recherche de nouvelles thérapies antidiabétiques. Plusieurs flavonoïdes, dont la quercétine, se sont montrés efficaces pour stimuler la sécrétion d'insuline et protéger les cellules β pancréatiques des conditions de stress mimant le diabète. De plus il s'agit de molécules naturelles qui semblent à priori plus sûres d'utilisation. L'étude des relations structure-activité autour du squelette de la quercétine a pour but de trouver des molécules plus actives, c'est-à-dire efficaces à des concentrations inférieures à 20 µmol.L^{-1} (plus faciles à atteindre dans la circulation sanguine), mais aussi et surtout, de trouver des molécules dénuées d'effet propre, c'est-à-dire gluco-dépendantes, comme les incrétines, afin de limiter les risques d'hypoglycémie. Par ailleurs, il a été montré que la quercétine stimule la sécrétion d'insuline *via* l'activation des Ca_V. Ces canaux pourraient ainsi être une nouvelle cible pharmacologique dans te traitement du diabète de type 2.

Un deuxième intérêt de ce travail concerne la pharmacologie fondamentale. Il apparait tout d'abord important d'observer le comportement des flavonoïdes sur un modèle cellulaire différent de celui de Saponara et *al.* (2011). Ensuite, l'étude des relations structure-activité permet de mettre en

évidence les positions des groupements hydroxyles sur le noyau flavone qui provoquent un comportement agoniste ou antagoniste, et qui augmentent ou diminuent sa puissance. L'exploration du mécanisme d'action de ses analogues de la quercétine tente d'expliquer ces différences de comportement et conduit à l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques mises en jeu. Tout ceci ouvre la voie vers une éventuelle modulation chimique du squelette de la quercétine afin d'obtenir le meilleur stimulateur de la sécrétion d'insuline : efficace à des concentrations inférieures à 20 $\mu mol.L^{-1}$ et sans effet-propre.

II. Matériels et méthodes

a - Culture des cellules INS-1

Des cellules de la lignée INS-1 (RRID : CVCL_0352, cellules β-pancréatiques sécrétrices d'insuline, issues d'un insulinome de rat) sont cultivées sous atmosphère humide (5% de CO_2, 37°C) dans du milieu RPMI-1640, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (30 min à 56°C), 100 $U.mL^{-1}$ de pénicilline, 100 $\mu g.mL^{-1}$ de streptomycine, 2 $mmol.L^{-1}$ de L-glutamine, 10 $mmol.L^{-1}$ d'HEPES, 1 $mmol.L^{-1}$ de pyruvate de sodium et 50 $\mu mol.L^{-1}$ de 2-mercaptoethanol. Cinq jours avant les expériences, les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits (4.10^5 cellules par puits) ou 96 puits (5.10^4 ou 10.10^4 cellules par puits), préalablement recouverts de poly-L-lysine, dans respectivement 1 mL ou 100 µL du même RPMI-1640 qu'utilisé pour la culture. Les cellules ont un passage compris entre 30 et 52.

b - Test de sécrétion d'insuline par les cellules INS-1

Les études de sécrétions sont réalisées lorsque la confluence est proche de 80 %, soit 5 jours après l'ensemencement des plaques 24 puits (plaque 24 puits transparente, fond plat, Falcon). Le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées avec 800 µL de tampon Krebs-Ringer Buffer (KRB). Celui-ci est composé de 123 $mmol.L^{-1}$ de NaCl, 5,4 $mmol.L^{-1}$ de KCl, 1,3 $mmol.L^{-1}$ de KH_2PO_4, 1,4 $mmol.L^{-1}$ de $MgSO_4$, 2,9 $mmol.L^{-1}$ de $CaCl_2$, 5 $mmol.L^{-1}$ de $NaHCO_3$ et 20 $mmol.L^{-1}$ d'HEPES, puis il est bullé 15 min avec du carbogène, ajusté à pH 7,5 avec NaOH 30% (m/v) et supplémenté de 0,1% (m/v) de sérum albumine bovine (BSA). Les cellules sont ensuite incubées sous atmosphère humide (5% de CO_2, 37°C) dans 500 µL de tampon KRB contenant 1,4 $mmol.L^{-1}$ de glucose (conditions basales) ou contenant 8,3 $mmol.L^{-1}$ de glucose (conditions stimulantes de glucose), en présence ou non de flavonoïde et de modulateur pharmacologique aux concentrations indiquées dans les figures. Après 1 heure d'incubation, les surnageants cellulaires sont récupérés pour doser l'insuline directement. Afin de limiter les variations dues à la mesure, chaque condition est réalisée en duplicat sur la même plaque. Lors des expérimentations utilisant le PD0325901, le vérapamil et la nifédipine, les cellules subissent un prétraitement avec ces molécules directement dans le RPMI durant respectivement 1h, 10 et 15 min, à la même concentration.

c - Isolement d'ilots pancréatiques de rats et test de sécrétion d'insuline

Des rats Wistar mâles (Crl:WI(Han), RRID : RGD_2308816, Charles River, France) âgés de 8 à 10 semaines, et pesant 280 à 320 g au moment de l'expérience sont utilisés pour la préparation des îlots de Langerhans. Les animaux sont hébergés en animalerie conventionnelle, dans une pièce dont la température et l'humidité sont contrôlées, avec un cycle jour-nuit de 12h-12h (cycle jour de 7h à 19h), et avec de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Le soin et les expérimentations sur les animaux sont réalisés conformément au décret 2013-118 et aux cinq arrêtés datés du 1er février 2013 et publiés le 7 février 2013, en application de la directive 2010/63/UE du parlement et du conseil européen.

Les rats sont anesthésiés avec de l'isoflurane et sacrifiés par décapitation. Le canal cholédoque et clampé puis est canulé et une solution de collagénase V à 4°C (10 mL, 1 $mg.mL^{-1}$), est injectée dans le pancréas. Celui-ci est isolé des tissus environnants puis incubé 10 min sous agitation (190 rpm) à 37°C pour être digéré par la collagénase. Après une décantation de 5 min, le surnageant est aspiré et les îlots sont doucement remis en suspension dans 50 mL de PBS (contenant 5,67 $mmol.L^{-1}$ de glucose) froid (4°C). 3 lavages similaires (décantation, aspiration, ajout de PBS) permettent de retirer le tissu adipeux (de plus faible densité) et la collagénase. Les îlots sont prélevés dans le culot à l'aide d'une pipette sous une loupe binoculaire. Ils sont ensuite incubés 1h à 37°C dans un tampon KRB modifié (120 $mmol.L^{-1}$ de NaCl, 4,7 $mmol.L^{-1}$ de KCl, 1,2 $mmol.L^{-1}$ de KH_2PO_4, 1,2 $mmol.L^{-1}$ de $MgSO_4$, 2,5 $mmol.L^{-1}$ de $CaCl_2$, 24 $mmol.L^{-1}$ de $NaHCO_3$, bullé 30 min avec du carbogène, ajusté à pH 7,4 avec NaOH 30% (m/v) et supplémenté de 0,1% BSA), contenant 2,8 $mmol.L^{-1}$ de glucose. Les îlots sont ensuite regroupés par paquets de 5, et incubés au bain-marie à 37°C dans 1 mL de ce même tampon en conditions basales (2,8 $mmol.L^{-1}$ de glucose) ou en conditions stimulantes de glucose (8,3 $mmol.L^{-1}$ de glucose), en présence ou non de flavonoïde à 20 $\mu mol.L^{-1}$. Afin de limiter les variations dues à la mesure, chaque condition est réalisée en quintuplat. Après 1 heure d'incubation, les surnageants contenant l'insuline à doser sont récupérés.

d - Dosage de la concentration d'insuline

La concentration en insuline est mesurée grâce au kit Insulin Ultra Sensitive (CisBio), basé sur la technologie HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence), selon les recommandations du fabricant. Cette technologie, basée sur un transfert d'énergie par résonnance de fluorescence (FRET : *fluorescence resonance energy transfer*), nécessite l'utilisation de deux anticorps. Le premier est marqué avec du cryptate d'europium (fluorophore donneur) et le deuxième avec la XL665 (fluorophore

accepteur). Ces deux anticorps reconnaissent deux épitopes différents de l'insuline. La liaison de ces 2 anticorps à l'insuline permet le rapprochement des fluorophores. Lorsque le fluorophore donneur est excité, il peut transférer son énergie d'émission au fluorophore accepteur, qui, à son tour, émet une fluorescence à une longueur d'onde spécifique. Le signal de fluorescence qui en résulte est représentatif de la concentration d'insuline dans le milieu. **Figure 40**. La particularité de la technologie HTRF provient de sa mesure de la fluorescence en temps résolu, permettant de diminuer le bruit de fond. L'europium est un fluorophore lanthanidique émettant une fluorescence longue. Par conséquent, l'excitation du fluorophore peut être suivie d'un délai avant la mesure du signal. Ce délai permet à la fluorescence brève (fluorescence d'excitation ou émise par les matériaux dans le puits ou par l'échantillon) de s'atténuer avant de réaliser une mesure. Les échantillons sont dilués entre 5 et 30 fois dans un tampon phosphate (30 mmol.L^{-1} de Na_2HPO_4 et 20 de mmol.L^{-1} KH_2PO_4 ajusté à pH 7) avant d'être déposés (8 µL) dans une plaque 384 puits (plaque blanche 384 puits petits volumes, fond plat, Greiner). Une gamme étalon (0 - 0,625 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 - 16 - 20 ng.mL^{-1}) est réalisée dans le même tampon grâce à une insuline étalon fournie avec le kit. 8 µL du mélange d'anticorps sont ensuite ajoutés, la plaque est incubée une nuit à température ambiante et la mesure de la fluorescence (excitation à 320 nm et émission à 620 et 665 nm pour le cryptate d'europium et la XL665 respectivement) est effectuée par un Tecan Spark 10M.

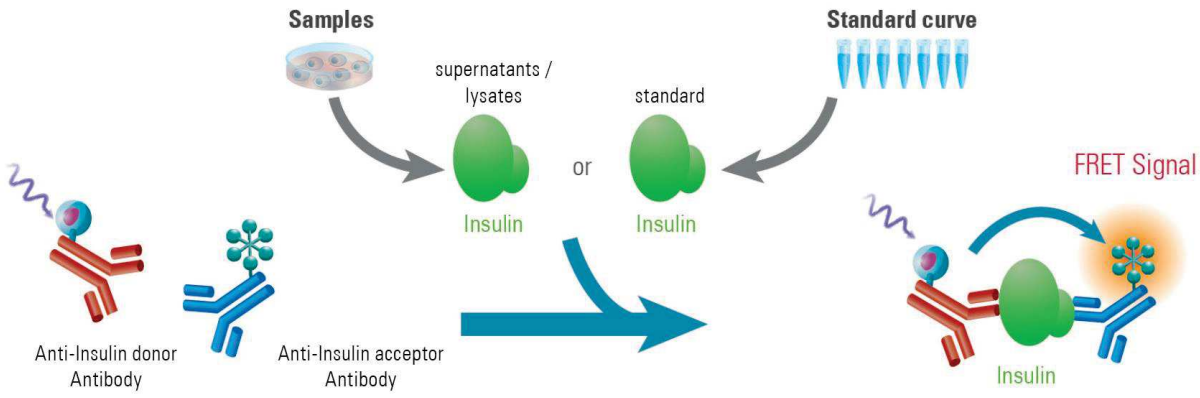


Figure 40 : Principe du dosage de l'insuline par la technique HTRF (CisBio).

e - Dosage des protéines par la méthode Bradford

A l'issue des tests de sécrétion d'insuline ici réalisés en triplicat pour obtenir suffisamment de protéines, et après avoir récupéré les surnageants pour doser l'insuline, les cellules sont rincées une fois avec 800 µL de PBS à 4°C. Elles sont ensuite lysées à l'aide de 50 µL d'un tampon de lyse contenant 20 mmol.L^{-1} de Tris, 150 mmol.L^{-1} de NaCl, 1% (v/v) de triton X-100, 1% (m/v) de sodium déoxycholate, 0,1% (m/v) de dodécylsulfate de sodium (SDS), 100 mmol.L^{-1} de vanadate, 1 mmol.L^{-1} de dithiothréitol (DTT), 50 mmol.L^{-1} de NaF, 40 mmol.L^{-1} de bétaglycérol phosphate, 10 mmol.L^{-1} d'HEPES, 5 mmol.L^{-1} d'EDTA et des inhibiteurs de protéases (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich). Les triplicats de lysats cellulaires sont réunis et après 30 min de centrifugation à 4°C à 12000 g, les surnageants sont récupérés pour doser les protéines par la méthode de Bradford. Les échantillons sont dilués au 1/10ème et déposés en triplicat sur une plaque 96 puits transparente avec une gamme de BSA (15,625 - 31,25 - 62,5 - 125 - 250 - 500 - 1000 µg.L^{-1}). Le réactif de Bradford est ajouté, et après 20 min d'incubation, la densité optique à 596 nm est lue et la concentration en protéines est calculée à partir de la droite étalon de BSA.

f - Enregistrement des courants calciques dans les cellules INS-1

Les courants calciques sont enregistrés par la technique patch-clamp cellule entière dans des cellules de la lignée INS-1, avec un amplificateur biologique RK400 (Biologic, France). L'acquisition et l'analyse des données se font grâce au logiciel pCLAMP system (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Les courants sont enregistrés avec des pipettes de patch de 2 à 5 MΩ. Le milieu extracellulaire contient 130 mmol.L^{-1} de NaCl, 5,6 mmol.L^{-1} de KCl, 1 mmol.L^{-1} de $MgCl_2$, 1 mmol.L^{-1} de glucose, 10 mmol.L^{-1} d'HEPES et 5 mmol.L^{-1} de $BaCl_2$, ajusté à pH 7,4 avec NaOH 30% (m/v). Le baryum est utilisé comme porteur de charge positive à la place du calcium afin que les courants des canaux calciques de type T puissent être identifiés et différenciés des courants des canaux calciques de type L car la cinétique d'inactivation de ces derniers est beaucoup plus lente que celui des courants de type T dans ces conditions. La pipette contient une solution composée de 130 mmol.L^{-1} de CsCl, 10 mmol.L^{-1} d'EGTA, 5 mmol.L^{-1} d'ATP Na_2, 2 mmol.L^{-1} de $MgCl_2$ et 10 mmol.L^{-1} d'HEPES, ajusté à pH 7,3 avec du CsOH. Le césium intracellulaire agit comme un inhibiteur des canaux potassiques, il permet donc de s'affranchir des courants potassiques. Les composés d'intérêt sont injectés dans l'environnement cellulaire par des pipettes en verre. Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante. D'une part, l'étude effet-concentration sur les courants de type L est enregistrée à -10 mV. D'autre part, pour l'étude de la relation intensité du courant / potentiel imposé (I/V), le potentiel est maintenu

à -80 mV et des tests de dépolarisation sont réalisés. Les pas de dépolarisation sont incrémentés de 10 mV à 0,1 Hz de -70 à 30 mV. Les courbes de l'intensité du courant en fonction du potentiel imposé (I/V) ainsi obtenues sont normalisées à la valeur du courant entrant maximale.

g - Mesure de l'activité de la succinate déshydrogénase

Le MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) est un substrat de la succinate déshydrogénase, enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce sel de tétrazolium est réduit à l'intérieur de la cellule par cette enzyme pour former des cristaux de formazan violets non hydrosolubles. L'activité mitochondriale des cellules est donc corrélée à la transformation du MTT en cristaux de formazan. Les cellules INS-1 sont ensemencées dans des plaques de 96 puits (plaque 96 puits transparente, fond plat, Falcon) à 10.10^4 cellules par puits dans 100 µL de RPMI. A J5, elles sont rincées avec 300 µL de KRB identique aux expériences de sécrétions d'insuline puis incubées 1h à 37°C en présence 100 µL de KRB contenant différentes concentrations de flavonoïdes et 8,3 $mmol.L^{-1}$ de glucose, de la même manière que lors des expériences de sécrétions d'insuline. Le milieu est aspiré et les cellules sont lavées 2 fois avec 100 µL de KRB. Elles sont ensuite incubées pendant 3h sous atmosphère humide (5% de CO_2, 37°C) en présence de 0,5 $g.L^{-1}$ de MTT dans du KRB sans flavonoïde. Après un dernier lavage par 100 µL de PBS, les cristaux de formazan sont solubilisés avec 50 µL de DMSO pur. Après agitation, la densité optique à 570 nm, reflétant l'activité de la succinate déshydrogénase, est alors mesurée.

h - Mesure de la respiration mitochondriale dans les cellules INS-1

La respiration mitochondriale est évaluée par respirométrie haute résolution, également appelée oxygraphie. Elle consiste en la mesure de la consommation de dioxygène par les cellules grâce à un oxygraphe haute résolution (OROBOROS O2k Oxygraph, Autriche). **Figure 41A**. La concentration en dioxygène au cours du temps est mesurée en parallèle dans deux chambres grâce à une électrode de Clark. La consommation de dioxygène à chaque instant est calculée grâce à la pente de la droite évaluant la concentration de dioxygène en fonction du temps. L'acquisition et l'analyse des résultats sont réalisées avec le logiciel Oxygraph-2k-DatLab version 7.3.0.3 (OROBOROS Instruments).

Dans chacune des deux chambres thermostatées à 37°C, 3 millions de cellules INS-1 (ou 2 millions de cellules C2C12) sont incubées dans 2 mL de tampon KRB (tampon KRB utilisé pour les expériences de sécrétion d'insuline dans les cellules INS-1 et conservé à -20 °C) contenant 8,3 $mmol.L^{-1}$

de glucose. La respiration basale, appelé de « routine », est mesurée après fermeture des chambres. Dans une des deux chambres, 2 µL de flavonoïde à tester est injecté pour obtenir une concentration finale de 20 µmol.L^{-1}, tandis que dans l'autre chambre dite « contrôle », une concentration équivalente de véhicule (2 µL de DMSO : 0,1 % final) est injectée. En plus de la respiration de routine, il est possible d'explorer d'autres états de la respiration mitochondriale. Pour cela, différentes drogues sont injectées parallèlement dans les deux chambres et successivement dès que le signal est stabilisé (environ 5 min). Après blocage de l'ATP synthase par injection d'oligomycine (2,5 µmol.L^{-1} final), la respiration mesurée traduit la fuite membranaire de protons. La respiration maximale est déterminée par l'ajout progressif d'un agent découplant chimique, le carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP) de 0,1 à 0,8 µmol.L^{-1} final (incrément de 0,1 µmol.L^{-1}). L'injection d'antimycine A (5 µmol.L^{-1} final) arrête complètement le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale en inhibant le complexe III. La consommation de dioxygène traduit alors uniquement la consommation de dioxygène indépendante de la respiration mitochondriale. **Figure 41B et C**. Cette consommation de dioxygène indépendante de la respiration mitochondriale est soustraite aux autres valeurs mesurées afin de s'intéresser spécifiquement à la respiration de la chaîne respiratoire mitochondriale.

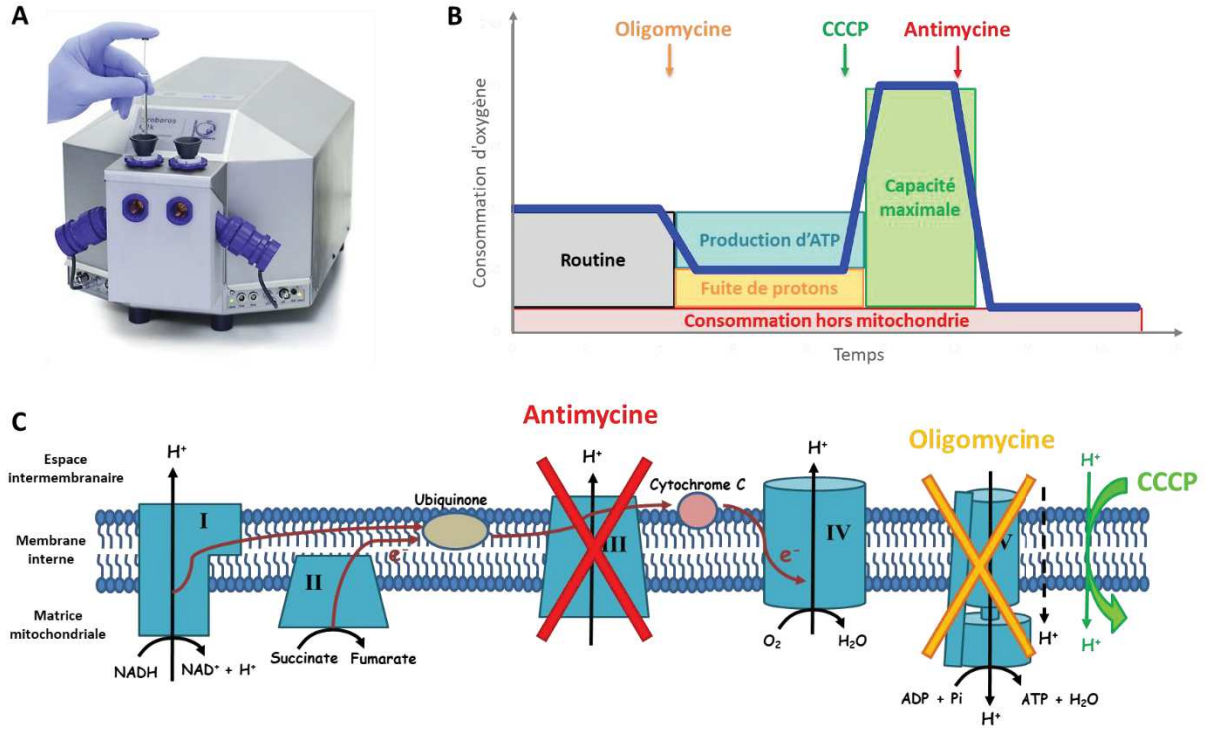


Figure 41 : Oxygraphe Oroboros-O2k (A) et représentation schématique des effets des inhibiteurs et découplant de la chaîne OXPHOS mitochondriale sur la consommation d'oxygène (B) avec leur mécanisme d'action (C).

Le calcul des ratios des flux permet d'obtenir les proportions des consommations d'oxygène utilisées par la cellule pour synthétiser de l'ATP ou pour compenser la fuite membranaire de protons grâce aux équations suivantes :

$$\text{Proportion d'}O_2\text{ dédiée à la synthèse d'ATP} = \frac{\text{consommation de routine - consommation de fuite}}{\text{consommation de routine}}$$

$$\text{Proportion d'}O_2\text{ compensant la fuite membranaire de protons} = \frac{\text{consommation de fuite}}{\text{consommation de routine}}$$

i - Dosage de la concentration d'ATP produite par les cellules INS-1

Les cellules INS-1 sont ensemencées dans des plaques de 96 puits (plaque 96 puits blanche, stérile, traitée culture, PerkinElmer) à 5.10^4 cellules par puits dans 100 µL de RPMI. A J5 elles sont rincées avec 300 µL de KRB, puis incubées 30 min avec 100 µL de KRB contenant 0,4 µmol.L^{-1} de CCCP ou 20 µmol.L^{-1} de galangine et 8,3 mmol.L^{-1} de glucose de manière similaire aux mesures de sécrétion d'insuline. Le dosage d'ATP est réalisé par luminescence à l'aide du kit ATPlite Luminescence Assay System (PerkinElmer) selon les recommandations du fabricant : ajout de 50 µL de tampon de lyse fourni avec le kit ; agitation 5 min avec un agitateur orbital à 700 tr/min pour lyser les cellules et stabiliser l'ATP ; ajout de 50 µL de solution substrat également fournie ; agitation 5 min avec un agitateur orbital à 700 tr/min ; placer la plaque 10 min dans l'obscurité.

Le système de dosage ATPlite est basé sur la production de lumière provoquée par la réaction entre l'ATP et la D-luciférine grâce à la luciférase :

$$\text{ATP + D-luciférine + } O_2 \xrightarrow{\text{Luciférase + } Mg^{2+}} \text{Oxyluciférine + AMP + PPi + } CO_2 \text{ + Lumière}$$

La lumière émise est donc proportionnelle à la concentration d'ATP. La luminescence est lue sur un lecteur CLARIOstar® Plus (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France) avec un gain de 3600. L'incubation des cellules en présence d'olygomycine (5 µmol.L^{-1}) permet de quantifier l'ATP non produite par l'ATP synthase (ATP cytosolique). La quantité d'ATP produite par l'ATP synthase (ATP mitochondriale) est obtenue en soustrayant l'ATP cytosolique (en présence d'oligomycine) à l'ATP totale (en absence d'oligomycine).

j - Western Blot

Après dosage des protéines, les extraits protéiques issus des cellules INS-1 sont préparés dans du tampon Laemmli (250 mmol.L^{-1} de Tris pH 6,8, 4% de SDS, 10 % (v/v) de glycérol, 2 % (v/v) de β-mercaptoéthanol et 0,1 % (m/v) de bleu de bromophénol), puis chauffés 5 à 10 min à 96°C. Ils sont ensuite dilués dans de l'eau dans le but de déposer 20 µL contenant 10 µg de protéines par puits. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE (1 à 2 h à 50 V à travers un gel de « *stacking* » : 125 mmol.L^{-1} de Tris pH 6,8, 0,1 % (v/v) de SDS, 4 % (v/v) d'acrylamide, 0,1 % (v/v) d'ammonium persulfate (APS) et 0,1 % (v/v) de N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) ; et 1 h environ à 100 V à travers un gel de séparation : 375 mmol.L^{-1} de Tris pH 8,8, 0,1 % (v/v) de SDS, 10 % (v/v) d'acrylamide, 0,1 % (v/v) d'ammonium persulfate et 0,1 % (v/v) de TEMED). Le tampon de migration est composé de 25 mmol.L^{-1} de Tris base, 190 mmol.L^{-1} de glycine et 0,1% (v/v) de SDS. Les protéines séparées sont alors transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (iBlot® 2 Dry Blotting System INVITROGEN). La membrane est ensuite incubée dans une solution de « *blocking* » : 0,5 % (m/v) de lait écrémé dans du tampon TBS-T (20 mmol.L^{-1} de Tris base et 137 mmol.L^{-1} de NaCl ajusté à pH 7,6 avec HCl 37%, et 0,1 % (v/v) de tween-20) ; puis en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt (phospho-ERK) dilué au 1/4000, et enfin en présence de l'anticorps secondaire (anti-anticorps de lapin) couplé à la péroxydase du raifort (*horseradish peroxidase*, HRP) dilué également au 1/4000. L'immunorévélation est réalisée par chimioluminescence (Kit ECL™ Prime Western Blotting System, GE Healthcare). L'intensité des bandes est quantifiée grâce au logiciel Bio-1D. La membrane est ensuite « strippée » sous agitation à 50°C pendant 30 min dans un tampon de stripping (62,5 mmol.L^{-1} de Tris-HCl pH 6,8, 2% de SDS et 100 mmol.L^{-1} de β-mercaptoéthanol) puis rincée abondamment dans du tampon TBS-T avant de réaliser un nouvel immunoblot avec un anticorps primaire dirigé contre ERK total (phosphorylé et non phosphorylé). La phosphorylation de ERK 1/2 est évaluée en divisant la somme des intensités des 2 bandes de p-ERK à la somme des intensités des 2 bandes de ERK total. Les résultats sont exprimés en fonction du glucose 8,3 mmol.L^{-1} et le résultat du glucose 8,3 mmol.L^{-1} est exprimé en fonction de la moyenne des valeurs brutes obtenues pour chaque glucose 8,3 mmol.L^{-1}.

k - Mesure de la capacité antioxydante des flavonoïdes

Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes est déterminé *in vitro* avec la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) comme décrit par Huang et al., 2002. Celle-ci se base sur la propriété de la fluorescéine à ne plus émettre de fluorescence une fois oxydée. Le 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH), un initiateur de radicaux libres, inhibe la fluorescence

en oxydant la fluorescéine. Les composés anti-oxydants protègent la fluorescéine et retarde la diminution de fluorescence. Ce test quantifie donc le délai nécessaire pour inhiber la fluorescence, autrement dit pour oxyder la fluorescéine. L'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-3,4-dihydrochromène-2-carboxylique (trolox), un antioxydant hydrosoluble dérivé de la vitamine E, est utilisé comme antioxydant standard. Une gamme de trolox (6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 µmol.L^{-1}) et les composés à tester (20 µmol.L^{-1}) sont incubés en présence de fluorescéine (10 min à 37°C dans un incubateur) dans une plaque 96 puits (plaque noire 96 puits, fond plat, Greiner). L'AAPH est ensuite ajouté et la fluorescence émise à 528-538 nm est évaluée toutes les minutes pendant 1h (excitation à 485 nm). L'aire sous courbe (AUC) de la fluorescence en fonction du temps est calculée pour chaque condition. Une droite étalon est établie en représentant les AUC obtenues en fonction de la concentration en trolox. L'équivalent de trolox de chaque composé est déterminé à partir de cette droite étalon. L'indice ORAC se calcule en divisant l'équivalent de trolox d'un composé par la concentration de ce composé. **Figure 42**. L'indice ORAC est proportionnel à l'activité antioxydante du composé.

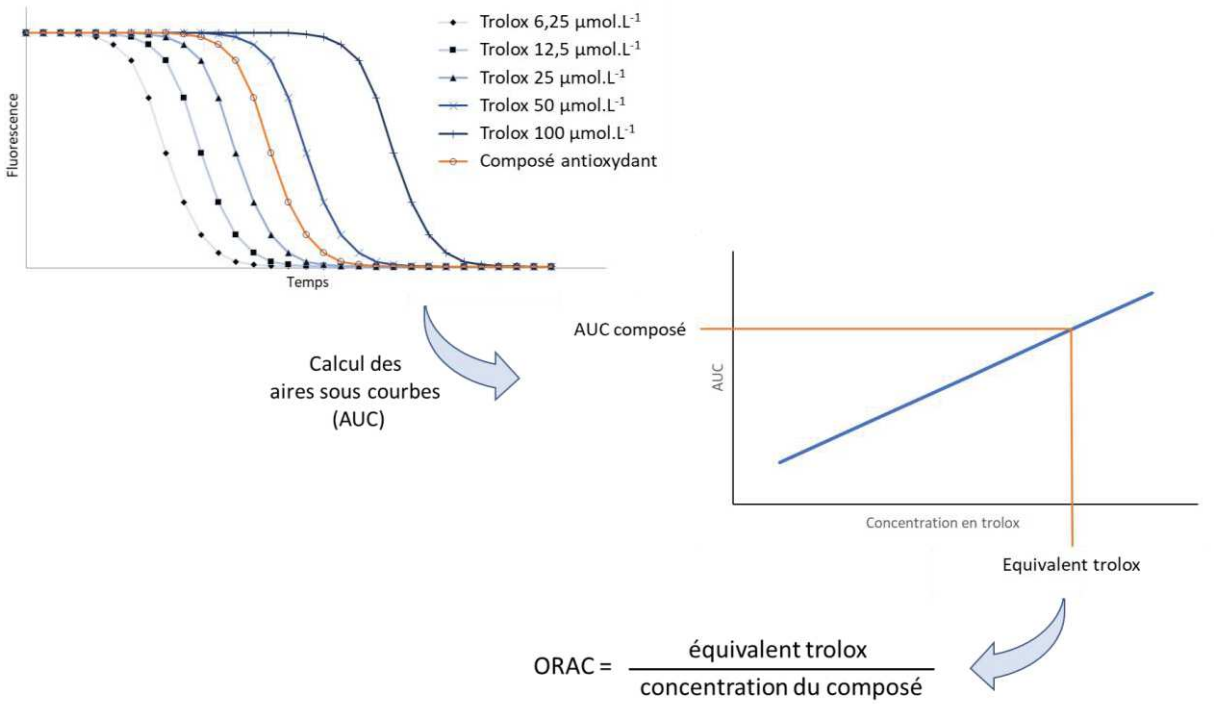


Figure 42 : Principe de l'évaluation de la capacité antioxydante d'un composé par la méthode ORAC.

l - Analyses statistiques

Toutes les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM. Le nombre de répétitions indépendantes est précisé sur chaque figure. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism v6 (GraphPadPrism, RRID : SCR_002798). Pour garantir la fiabilité des valeurs individuelles, les expériences de sécrétion ont été réalisées en duplicat ou triplicat avec les cellules INS-1 et en quintuplat avec les îlots pancréatiques. Selon la conception de l'expérience, les données ont été analysées à l'aide d'un test de Student, d'une ANOVA 1 ou ANOVA 2. Pour les ANOVA 1, l'égalité des variances a été vérifiée à l'aide du test de Brown-Forsythe. Lorsque l'ANOVA a atteint le niveau de signification statistique nécessaire ($p < 0,05$) et qu'aucune inhomogénéité significative des variances n'a été détectée, le test de comparaisons multiples de Holm-sidak a été utilisé pour attribuer une signification aux comparaisons entre les groupes. En cas d'inhomogénéité des variances, le test non paramétrique de Kruskall-Wallis a été utilisé, complété du test de comparaisons multiples de Dunn's pour attribuer une signification aux comparaisons entre les groupes. La limite de la significativité, matérialisée par un astérisque, a été fixée à $p < 0,05$.

m - Matériels

Les produits utilisés proviennent de plusieurs fournisseurs comme détaillé dans le **Tableau 9** :

- abcr GmbH (Karlsruhe, Allemagne)
- Bio-Rad (Hercules, Californie, États-Unis)
- Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, États-Unis)
- Eurobio (Les Ulis, France)
- Extrasynthese (Genay, France)
- Lonza (Levallois-Perret, France)
- Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, États-Unis)

Les dosages d'insuline sont réalisés avec le Insulin Ultra Sensitive kit (#62IN2PEH) commercialisé par Cisbio (Bagnols-sur-Cèze, France). Les dosages d'ATP sont accomplis à l'aide du kit ATPlite Luminescence Assay System de PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, États-Unis). Les flavonoïdes sont solubilisés dans du DMSO (20 ou 50 $\mu mol.L^{-1}$) et stockées à -20°C. Les contrôles et les traitements sont toujours réalisés en utilisant la même quantité finale de DMSO qui n'excède pas dans le milieu de traitement 1% (v/v) pour le screening, et 0,1 ou 0,2 % (v/v) pour les autres expériences.

Tableau 9 : Sources et références des principaux produits utilisés.

Produit	Source	Référence
Acrylamide	Sigma-Aldrich	A7168
Anticorps anti-anticorps de lapin liés à l'HRP	Cell Signaling Technology	7074S
Anticorps anti-p44/42 MAPK (ERK 1/2)	Cell Signaling Technology	9102S
Anticorps anti-phospho-p44/42 MAPK (p-ERK 1/2)	Cell Signaling Technology	9101S
Antimycine A	Sigma-Aldrich	A8674-25MG
APS	Bio-Rad	161-0700
Bay K8644	Sigma-Aldrich	B133-1MG
BSA	Sigma-Aldrich	A8022-50G
CCCP	Sigma-Aldrich	C2759-100MG
Collagénase V	Sigma-Aldrich	C9263-500MG
DMSO	Sigma-Aldrich	D8418-100ML
DTT	Sigma-Aldrich	43816-10ML
Glibenclamide	Sigma-Aldrich	
Glucose	Sigma-Aldrich	G7528-250G
HEPES 1M	Sigma-Aldrich	H8418-100ML
Inhibiteurs de protéases	Sigma-Aldrich	P8340-5ML
Méthylsuccinate	Sigma-Aldrich	M81101-25G
MTT	Sigma-Aldrich	M5655-500MG
Nifédipine	Sigma-Aldrich	N7634-1G
Oligomycine	Sigma-Aldrich	O4876-5MG
PBS (îlots)	Sigma-Aldrich	D8662-6X500ML
PBS (cellules INS-1)	Sigma-Aldrich	D8537-6X500ML
Pénicilline + streptomycine + L-glutamine	Sigma-Aldrich	G6784-5ML
Poly-L-lysine	Sigma-Aldrich	P6282-5MG
Poudres pour les solutions KRB	Sigma-Aldrich	-
Poudres pour les solutions de Western Blot	Sigma-Aldrich	-
Pyruvate de sodium	Sigma-Aldrich	S8636-100ML
Réactif de Bradford	Bio-Rad	5000006
RPMI 1640	Lonza	BE12-167F
SVF	Eurobio	CVFSVF000U
TEMED	Bio-Rad	131-0800
Trypsine	Sigma-Aldrich	T3924-100ML
Vérapamil	Sigma-Aldrich	V4629-1G

Flavonoïde	Source	Référence
3-hydroxyflavone	abcr GmbH	AB 117256
3,5-dihydroxyflavone	abcr GmbH	AB 151802
3,4’-dihydroxyflavone	abcr GmbH	AB 205922
3’-hydroxyflavone	abcr GmbH	AB 151878
3’,4’-dihydroxyflavone	Extrasynthese	1204
4’-hydroxyflavone	abcr GmbH	AB 304389
4’,7-dihydroxyflavone	Extrasynthese	1259
Apigénine	Extrasynthese	1102S
Chrysine	Extrasynthese	1009
Datiscétine	Extrasynthese	1141S
Fisétine	Extrasynthese	1167S
Flavone	Extrasynthese	1016
Galangine	Extrasynthese	1114S
Kaempférol	Extrasynthese	1124S
Lutéoline	Extrasynthese	1125S
Morine	Extrasynthese	1344S
Quercétine	Sigma-Aldrich	337951
Résogalangine	Sigma-Aldrich	419826-1G
Résokaempférol	Extrasynthese	1251

III. Résultats et discussion

III.1 Screening de flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline

Une étude précédente menée au laboratoire a montré que la quercétine, à la concentration de 20 µmol.L^{-1}, est capable de potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose, contrairement au resvératrol, un polyphénol de la famille des stilbènes et à la N-acétyl-L-cystéine (NAC), un antioxydant de référence. **Figure 43**. (Youl et al., 2010). Son action sur la cellule β semble donc, au moins en partie, indépendante de son pouvoir antioxydant. En effet, les flavonoïdes sont connus pour leur activité antioxydante mais ils sont aussi décrits pour moduler diverses cibles pharmacologiques comme des canaux ioniques, des protéines kinases ou des facteurs de transcription… (Dall'Asta et al., 2015).

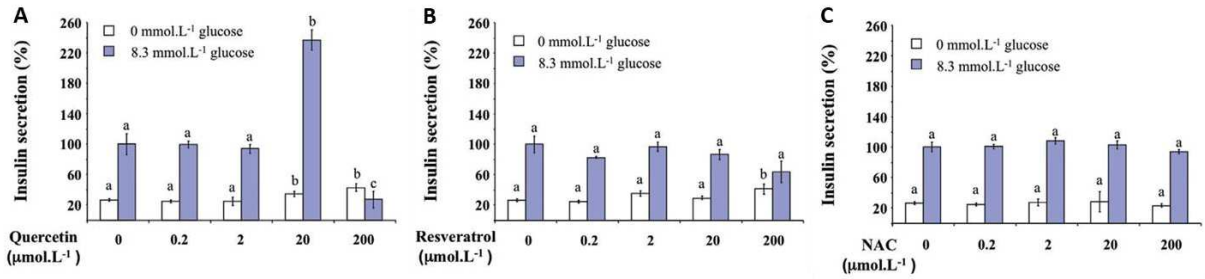


Figure 43 : Effets de la quercétine (A), du resvératrol (B) et de la NAC (N-acétyl-L-cystéine) (C) sur la sécrétion d'insuline dans des cellules INS-1 (Youl et al., 2010).

Dans le but d'améliorer le profil pharmacologique de la quercétine (recherche de molécules potentiellement plus puissantes, plus efficaces, sans effet sur la sécrétion d'insuline en condition basale de glucose…), nous avons étudié le comportement sur la sécrétion d'insuline de 6 autres flavonoïdes, structurellement proches de la quercétine : le résokaempférol, le kaempférol, l'apigénine, la chrysine, la morine et la galangine. Le choix de ces flavonoïdes a été orienté par l'étude de Saponara *et al.* (2011) qui a évalué la capacité de différents flavonoïdes à moduler l'activité des Ca_V 1.2, cible pharmacologique de la quercétine sur les cellules β identifiée par Bardy *et al.* (2013). Ils ont été testés

à des concentrations allant de 2 à 100 µmol.L^{-1} pour encadrer la concentration de 20 µmol.L^{-1}, correspondant à l'effet maximal de la quercétine obtenu par Youl *et al.* (2010). Dans les cellules INS-1, la condition basale, non stimulante de glucose, est obtenue en présence d'une concentration de glucose de 1,4 mmol.L^{-1}. Cette sécrétion correspond à une concentration d'insuline d'environ 40 ng.mL^{-1} dans le surnageant après 1h d'incubation. Dans cette même lignée, la stimulation de la sécrétion d'insuline est induite en présence de 8,3 mmol.L^{-1} de glucose. Il 'agit d'une concentration qui induit une sécrétion sub-maximale d'insuline, permettant d'évaluer le potentiel amplificateur ou inhibiteur des molécules. En présence de 8,3 mmol.L^{-1} de glucose, la concentration d'insuline dosée dans le surnageant est d'environ 120 ng.mL^{-1} après 1h d'incubation.

En condition basale, non stimulante de glucose, aucun des six flavonoïdes testés n'a montré d'effet sur la sécrétion d'insuline : ils sont dénués d'effet-propre quelle que soit la concentration testée. L'effet-propre des composés est calculé en soustrayant la concentration d'insuline obtenue en présence de ce composé à la concentration d'insuline contrôle (en absence du composé) en condition basale. **Figure 44A**. En condition stimulante de glucose, le résokaempférol et le kaempférol amplifient la sécrétion d'insuline de façon concentration-dépendante. Une potentialisation significative est observée à 20 et 50 µmol.L^{-1} (respectivement 250,6 ± 30,2 et 285,8 ± 50,9 ng.mL^{-1} pour le résokaempférol et 177,4 ± 10,6 et 165,8 ± 20,6 ng.mL^{-1} pour le kaempférol), la sécrétion d'insuline obtenue en présence conjointe du polyphénol et de 8,3 mmol.L^{-1} glucose est supérieure à la somme de chaque effet obtenu. Nous observons un comportement inverse avec la galangine, seul flavonoïde inhibant de façon concentration-dépendante la sécrétion d'insuline induite par le glucose : une inhibition significative étant observée dès 20 µmol.L^{-1} (32,4 ± 7,3 ng.mL^{-1}). Dans les mêmes conditions expérimentales, l'apigénine, la chrysine et la morine ne modulent pas la sécrétion d'insuline quelle que soit la concentration testée. **Figure 44B**. Il est à noter qu'à 100 µmol.L^{-1}, le résokaempférol n'a plus d'effet sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose (128,2 ± 40,2 ng.mL^{-1}), et le kaempférol l'inhibe (22,4 ± 1,75 ng.mL^{-1}).

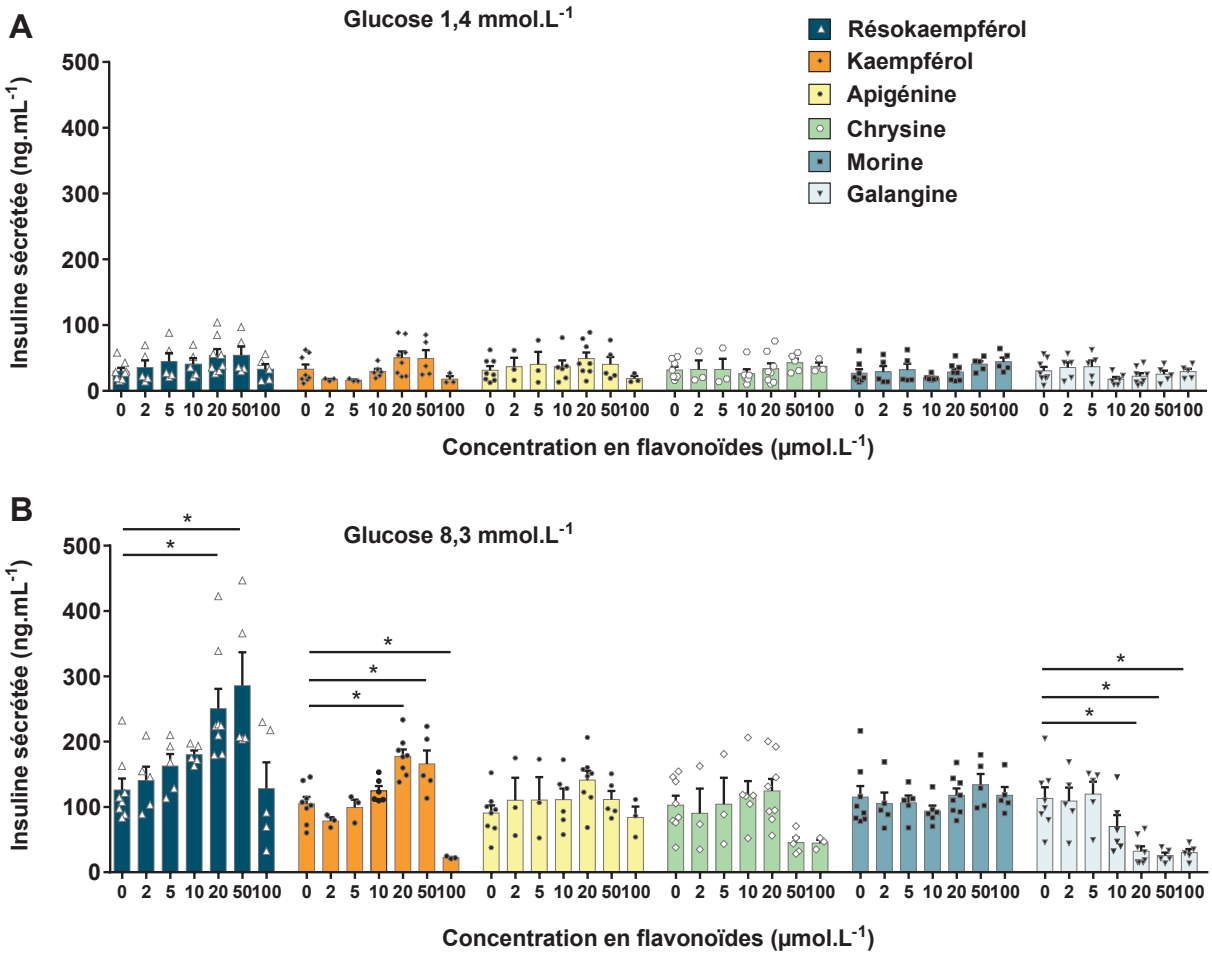


Figure 44 : Effets de concentrations croissantes de résokaempférol, de kaempférol, d'apigénine, de chrysine, de morine et de galangine sur la sécrétion d'insuline en condition basale (A) ou stimulante de glucose (B) dans des cellules INS-1. ANOVA 1, non apparié, comparaisons avec le point à la concentration de 0 µmol.L^{-1} en flavonoïde (n = 3 à 8).

Nous avons décidé d'explorer plus dans le détail les mécanismes d'action de flavonoïdes présentant des effets différents sur la sécrétion d'insuline. Notre choix s'est porté sur :

1- Le résokaempférol qui est le plus efficace en terme de potentialisation et qui n'a jamais été décrit dans la littérature vis-à-vis de la sécrétion d'insuline. Il semble donc intéressant d'étudier par quel mécanisme il parvient à potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose, et notamment si ce mécanisme est similaire à celui de la quercétine (activation des Ca_V).

2- La galangine, qui est le seul flavonoïde inhibiteur du screening. Il apparait donc primordial de comprendre l'origine de ce comportement, à savoir s'il s'agit d'un effet antagoniste sur la même cible pharmacologique que le résokaempférol ou bien si ce flavonoïde possède un mécanisme d'action différent.

3- La morine qui ne module pas la sécrétion d'insuline quelle que soit la concentration testée. Il s'avère par conséquent utile d'étudier si cette molécule est tout de même capable d'interagir avec une ou plusieurs cibles cellulaires sans affecter la sécrétion d'insuline ou bien si elle ne module aucune voie de signalisation.

Les structures chimiques de ces trois molécules sont présentées dans la **Figure 45**.

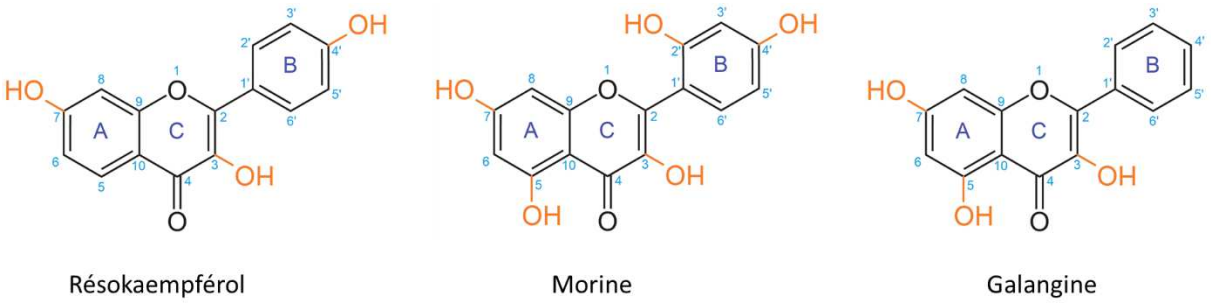


Figure 45 : Structures chimiques du résokaempférol, de la morine et de la galangine (d'après Kim et al., 2020).

L'étude effet-concentration du résokaempférol et de la galangine sur la sécrétion d'insuline dans les cellules INS-1 a permis de déterminer l'effet maximal (Emax) et la puissance (concentration efficace 50 : CE_{50} ; ou concentration inhibitrice 50 : CI_{50}) de ces composés. En condition stimulante de glucose (8,3 mmol.L^{-1}), dans la gamme de concentrations testée, le résokaempférol montre un Emax de 285,8 ng.mL^{-1} (pour un effet du glucose 8,3 mmol.L^{-1} à 120 ng.mL^{-1}) et une CE_{50} d'environ 7 µmol.L^{-1} avec un pic d'activité à 50 µmol.L^{-1}. La galangine possède un Emax de 25,6 ng.mL^{-1} (pour un effet du glucose 8,3 mmol.L^{-1} à 120 ng.mL^{-1}) et une CI_{50} d'environ 10 µmol.L^{-1}. Dans les deux cas, la concentration en flavonoïde retenue pour la suite des expériences est de 20 µmol.L^{-1}. Pour le résokaempférol, il s'agit d'une concentration intermédiaire entre la CE_{50} (7 µmol.L^{-1}) et la concentration correspondant au Emax (50 µmol.L^{-1}). Pour la galangine, il s'agit de la concentration la plus faible pour laquelle la galangine a un effet significatif.

Afin d'évaluer les effets de ces flavonoïdes sur un modèle plus intégré, nous avons poursuivi nos travaux sur le modèle des îlots de Langerhans isolés à partir de pancréas de rats. En effet, les îlots pancréatiques sont des réseaux cellulaires denses composés de plusieurs types cellulaires sécrétant différentes molécules à actions notamment paracrines dans le but de réguler la fonction et la survie des cellules voisines (Henquin, 2021). Dans ce modèle, la condition basale, non stimulante de glucose, est évaluée en présence de 2,8 mmol.L^{-1} de glucose. Elle représente 1,7 ± 0,3 ng.mL^{-1} d'insuline/îlot après 1h d'incubation. A la concentration de 20 µmol.L^{-1}, les flavonoïdes n'ont pas modulé la sécrétion d'insuline basale. Comme attendu, à la concentration de 8,3 mmol.L^{-1}, le glucose stimule la sécrétion d'insuline : 3,8 ± 0,3 ng.mL^{-1}/îlot. Dans ces conditions, le résokaempférol potentialise la sécrétion d'insuline (7,5 ± 0,7 ng.mL^{-1}/îlot), la morine n'a pas d'effet (3,7 ± 0,5 ng.mL^{-1}/îlots), et la galangine l'inhibe (2,8 ± 0,4 ng.mL^{-1}/îlot). **Figure 46**.

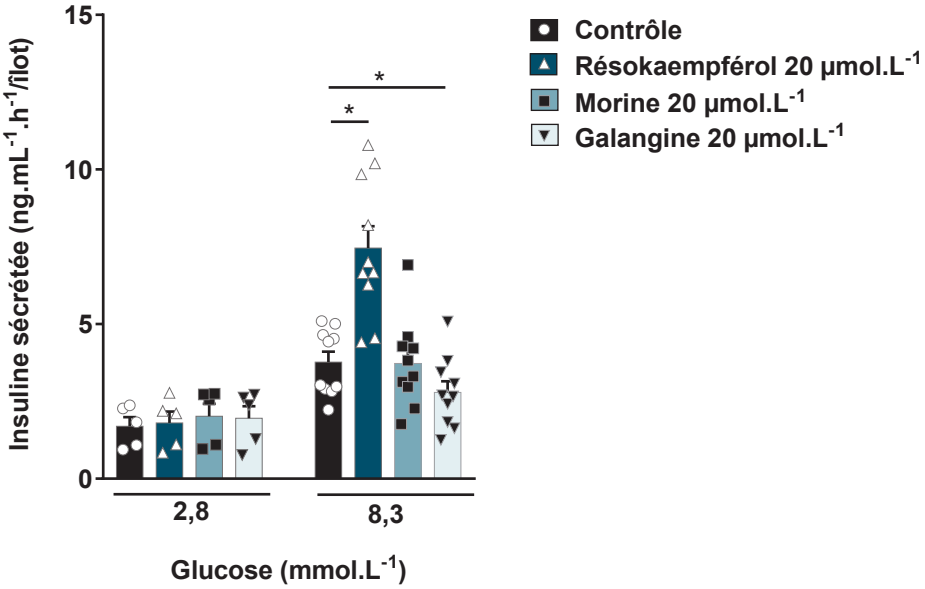


Figure 46 : Effets du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur la sécrétion d'insuline sur le modèle des îlots de Langerhans isolés chez le rat en condition basale (2,8 mmol.L^{-1}) ou stimulante (8,3 mmol.L^{-1}) de glucose. ANOVA 1, apparié, comparaisons avec le contrôle, n = 5 (glucose 2,8 mmol.L^{-1}) ou n = 10 (glucose 8,3 mmol.L^{-1}).

Le profil pharmacologique de modulation de la sécrétion d'insuline obtenu sur le modèle des cellules INS-1 avec les trois flavonoïdes est similaire à celui observé sur le modèle des îlots isolés de rats. Ainsi, pour plus de facilité expérimentale, nous avons poursuivi nos travaux par l'étude de leur mécanisme d'action dans les cellules INS-1.

III.2 Evaluation d'une toxicité potentielle des flavonoïdes dans les cellules INS-1

Nous avons décrit que la galangine, le résokaempférol et la morine présentent des effets différents sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose avec notamment un fort effet inhibiteur de la part de la galangine. Cet effet pourrait être dû à une toxicité de ce composé. Toutefois l'absence d'inhibition en condition basale ne conforterait pas cette hypothèse. **Figure 44A**. Afin d'évaluer une toxicité potentielle, nous avons réalisé un dosage des protéines totales après 1h d'incubation des cellules INS-1 en présence de galangine, dans des conditions similaires aux expériences de sécrétion d'insuline. En effet, même si ce temps d'incubation apparait bien trop court pour déceler une modulation de l'expression des protéines, une toxicité d'un de nos composés, induisant une mort cellulaire, conduirait au décollement des cellules qui seraient retirées des puits lors du lavage. Ainsi, une diminution du nombre de cellules vivantes et adhérentes se répercuterait sur la quantité de protéines totales. En condition basale ou stimulante de glucose, l'incubation des cellules INS-1 en présence de galangine ne conduit pas une différence significative en terme de quantité de protéines par rapport au contrôle. **Figure 47**. Des résultats équivalents sont obtenus en présence de résokaempférol ou de morine. Ces résultats tendent à démontrer une absence de toxicité des flavonoïdes testés dans les cellules INS-1 à la concentration de 20 µmol.L^{-1}, dans nos conditions expérimentales. L'inhibition de la sécrétion d'insuline par la galangine serait donc en lien avec une activité pharmacologique inhibitrice.

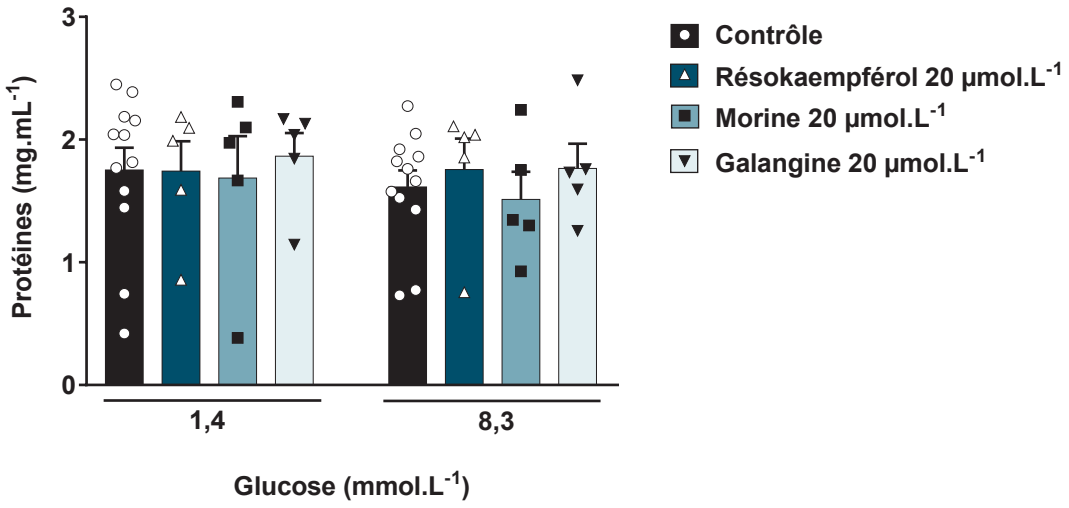


Figure 47 : Concentration de protéines après 1h d'incubation des cellules INS-1 en présence de galangine, de résokaempférol ou de morine. ANOVA 1, non apparié, comparaisons avec le contrôle, n = 5 (flavonoïdes) ou n = 12 (contrôle).

III.3 Mécanismes d'action des flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline dans les cellules INS-1

III.3.1 Effet des flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline induite par différents types de sécrétagogues

La sécrétion d'insuline induite par le glucose par les cellules β pancréatiques est un processus complexe qui fait intervenir de nombreux acteurs au niveau cellulaire (cf. 1.3.1 Sécrétion d'insuline induite par le glucose). L'enchaînement de ces évènements peut être résumé comme ceci : 1- le glucose entre dans la cellule où il est transformé en pyruvate grâce à la voie de la glycolyse ; 2- le pyruvate pénètre dans la mitochondrie pour être transformé en acétyl-CoA ; 3- l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs pour fournir les substrats de la chaîne des phosphorylations oxydatives mitochondriale ; 4- la chaîne des phosphorylations oxydatives mitochondriale (OXPHOS) synthétise de l'ATP ; 5- l'augmentation du ratio ATP/ADP cytosolique conduit à la fermeture des K_{ATP} ; 6- la fermeture des K_{ATP} induit une dépolarisation de la membrane plasmique ; 7- la dépolarisation de la membrane plasmique provoque l'activation des Ca_V de type L et l'entrée de calcium dans la cellule; 8- l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire déclenche l'exocytose des vésicules de sécrétion contenant l'insuline. **Figure 48**.

Différentes molécules d'origine endogène ou exogène sont capables de stimuler la sécrétion d'insuline en agissant à différents niveaux de cette cascade métabolique du glucose. Le **pyruvate**, produit de la glycolyse et précurseur de l'acétyl-CoA, entre dans les cellules grâce au transporteur des monocarboxylates MCT-1. Bien que l'expression de ce transporteur soit normalement quasiment nulle dans les cellules β pancréatiques humaines, il est présent dans les membranes des cellules INS-1 (Zhao et al., 2001). La **leucine** est un acide aminé qui entre dans la cellule β grâce au transporteur d'acides aminés LAT1 (*Large Amino Acid Transporter 1* aussi appelé SLC7A5) (Javed and Fairweather, 2019). Elle est métabolisée dans la cellule en acétyl-CoA (Newsholme et al., 2006). Le **méthylsuccinate** est un analogue du succinate capable de diffuser dans les cellules où il est hydrolysé en succinate. Le succinate est le substrat de la succinate déshydrogénase, complexe II de la chaîne des phosphorylations oxydatives mitochondriale et enzyme constitutive du cycle de Krebs. Il conduit à la formation d'ATP par activation de la chaîne respiratoire mitochondriale (Picton et al., 2001; Marchi et al., 2017). Le **glibenclamide** est un sulfamide hypoglycémiant qui induit une sécrétion d'insuline en fermant les K_{ATP} (Remedi and Nichols, 2016). Le **bay K8644**, agoniste des Ca_V, provoque une entrée de calcium dans la cellule (Bardy et al., 2013; Alexander et al., 2019). **Figure 48**.

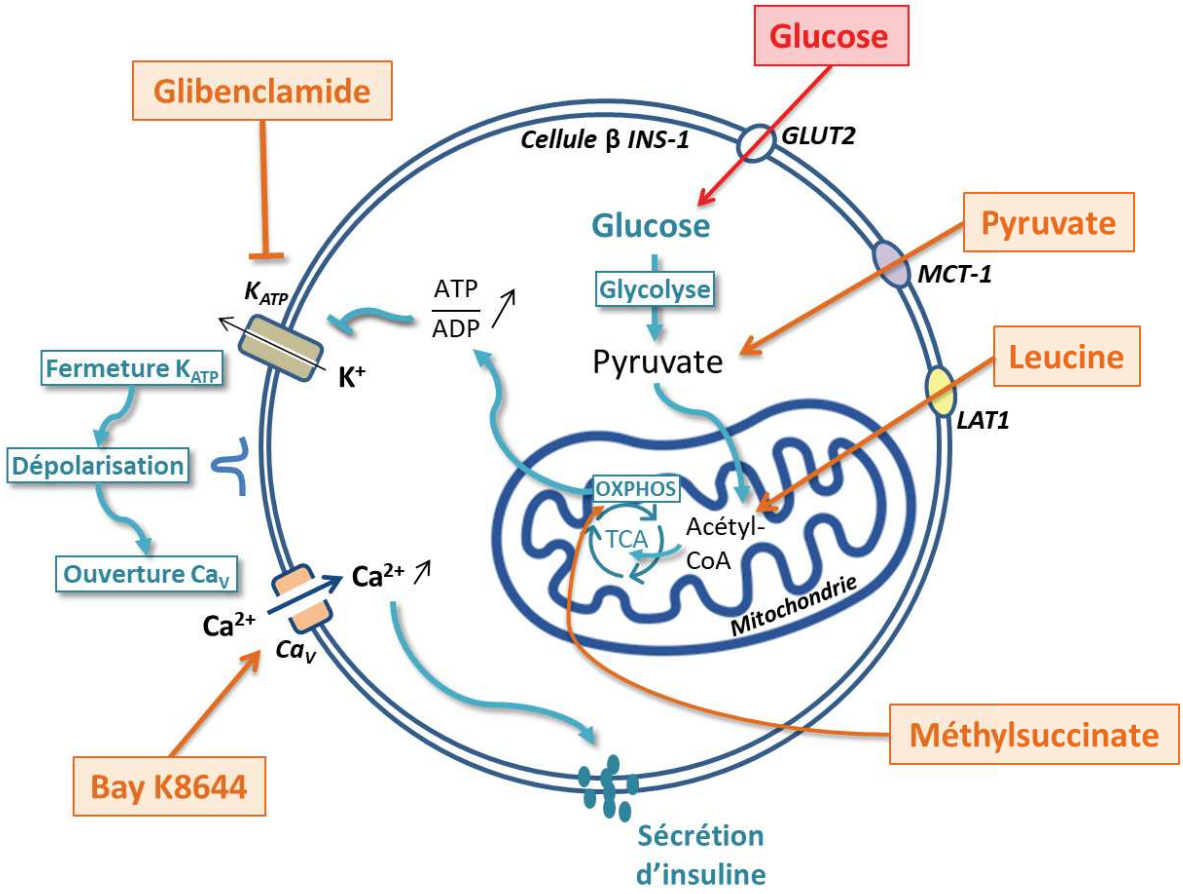


Figure 48 : Voies d'activation simplifiées de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, le pyruvate, la leucine, le méthylsuccinate, le glibenclamide et le bay K8644 dans des cellules INS-1. GLUT2, transporteur du glucose 2 ; MCT-1, transporteur des monocarboxylates 1 ; LAT1, transporteur d'acides aminés ; TCA, cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de Krebs ; OXPHOS, chaîne de phosphorylation oxydative ; K_{ATP}, canal potassique ATP dépendant ; Ca_V, canal calcique voltage dépendant.

Dans le but de mieux localiser le site d'action des flavonoïdes dans la cellule β, nous avons étudié les effets modulateurs des flavonoïdes en présence de ces différents sécrétagogues dans les cellules INS-1. Avant tout, un travail de mise au point a été nécessaire dans le but de trouver la concentration de sécrétagogue à utiliser afin d'obtenir un niveau de sécrétion d'insuline équivalent. Pour chacun d'entre eux, des tests d'effets/concentrations ont été réalisés. **Figure 49**. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, nos résultats montrent que 5 mmol.L^{-1} de pyruvate, 5 mmol.L^{-1} de leucine, 5 mmol.L^{-1} de méthylsuccinate et 2 µmol.L^{-1} de bay K8644 constituent la concentration minimale pour induire une sécrétion d'insuline comparable à celle induite par 8,3 mmol.L^{-1} de glucose. Par ailleurs, des études précédentes menées au laboratoire avaient montré que 10 nmol.L^{-1} de glibenclamide stimule la sécrétion d'insuline de façon comparable au glucose 8,3 mmol.L^{-1} (Bayle et al., 2019).

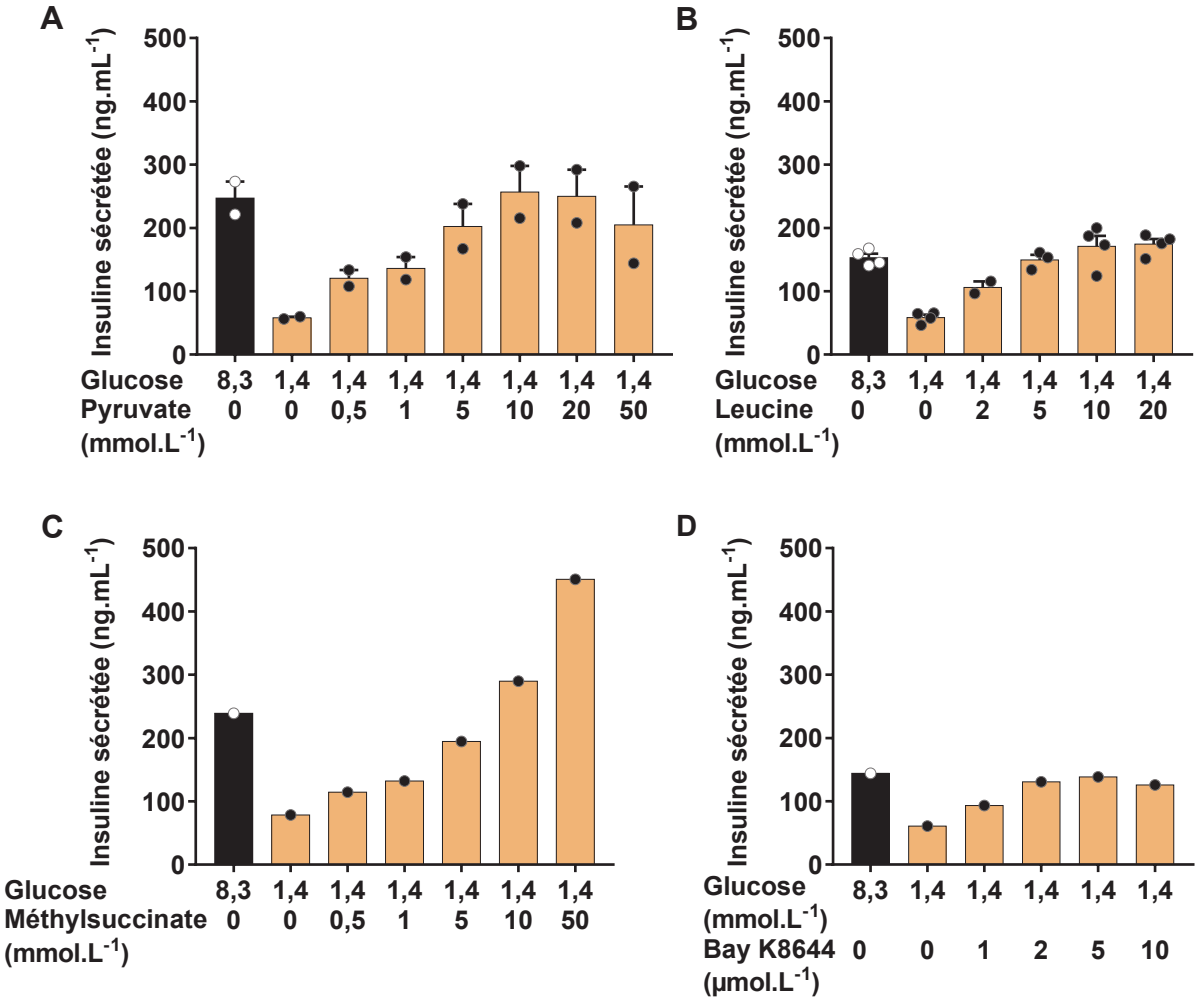


Figure 49 : Effet-concentration du pyruvate (A), de la leucine (B), du méthylsuccinate (C) et du bay K8644 (D) sur la sécrétion d'insuline en comparaison avec le glucose (8,3 mmol.L^{-1}) dans des cellules INS-1. n = 1 à 4.

Sur la **Figure 50**, nous pouvons observer les effets du résokaempférol, de la morine et de la galangine (20 µmol.L^{-1}) sur la sécrétion d'insuline basale (1,4 mmol.L^{-1} de glucose) ou induite par le glucose (8,3 mmol.L^{-1}), le pyruvate (5 mmol.L^{-1}), la leucine (5 mmol.L^{-1}), le méthylsuccinate (5 mmol.L^{-1}), le glibenclamide (10 nmol.L^{-1}) et le bay K8644 (2 µmol.L^{-1}) dans des cellules INS-1 après 1h d'incubation. Nous pouvons vérifier qu'aucun de ces flavonoïdes ne module la sécrétion d'insuline basale : 46,7 ± 6,6 ng.mL^{-1} pour le contrôle, 83,1 ± 15,4 ng.mL^{-1} pour le résokaempférol, 52,1 ± 8,8 ng.mL^{-1} pour la morine et 33,2 ± 5,0 ng.mL^{-1} pour la galangine. Nous observons également que les sécrétagogues induisent une sécrétion d'insuline équivalente : 173,9 ± 18,5 ng.mL^{-1} pour le glucose,

176,2 ± 33,3 ng.mL^{-1} pour le pyruvate, 155,2 ± 20,4 ng.mL^{-1} pour la leucine, 177,7 ± 17,8 ng.mL^{-1} pour le méthylsuccinate, 185,1 ± 23,5 ng.mL^{-1} pour le glibenclamide et 99,7 ± 4 ng.mL^{-1} pour le bay K8644.

Le résokaempférol potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose (392,0 ± 18,5 ng.mL^{-1}), le pyruvate (358,3 ± 67,9 ng.mL^{-1}), la leucine (317,1 ± 43,3 ng.mL^{-1}), le méthylsuccinate (304,8 ± 21,2 ng.mL^{-1}), le glibenclamide (401,7 ± 55,4 ng.mL^{-1}) et par le bay K8644 (230,5 ± 18,45 ng.mL^{-1}). **Figure 50**. Il amplifie la sécrétion d'insuline quel que soit le sécrétagogue testé. Son mécanisme d'action semble donc impliquer les Ca_V ou une cible en aval des Ca_V dans la cascade de signalisation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les cellules INS-1.

La galangine inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose (55,9 ± 8,9 ng.mL^{-1}), le pyruvate (66,4 ± 11,6 ng.mL^{-1}), la leucine (60,34 ± 4,3 ng.mL^{-1}) et le méthylsuccinate (45,8 ± 1,7 ng.mL^{-1}). Par contre, elle n'a pas d'effet significatif sur la sécrétion d'insuline induite par le glibenclamide (191,1 ± 23,6 ng.mL^{-1}) ou le bay K8644 (53,4 ± 4,5 ng.mL^{-1}). **Figure 50**. Nous pouvons en déduire que la galangine inhibe la sécrétion d'insuline induite par les sécrétagogues nécessitant d'être métabolisés par la mitochondrie pour induire une sécrétion d'insuline (glucose, pyruvate, leucine et méthylsuccinate) mais qu'elle n'a pas d'effet lorsque la sécrétion d'insuline est induite indépendamment de la mitochondrie (par le glibenclamide ou le bay K8644). Son mécanisme d'action semble donc impliquer le métabolisme mitochondrial dans les cellules INS-1, et plus précisément la chaîne OXPHOS mitochondriale.

La morine n'a pas d'effet sur la sécrétion d'insuline induite par les sécrétagogues testés (182,1 ± 20,4 ng.mL^{-1} pour le glucose, 201,8 ± 35,5 ng.mL^{-1} pour le pyruvate, 155,7 ± 21,2 ng.mL^{-1} pour la leucine, 176,3 ± 19,6 ng.mL^{-1} pour le méthylsuccinate, 210,8 ± 22,8 ng.mL^{-1} pour le glibenclamide et 104,5 ± 3,3 ng.mL^{-1} pour le bay K8644). **Figure 50**. Elle ne semble donc moduler aucune cible dans la voie de signalisation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les cellules INS-1.

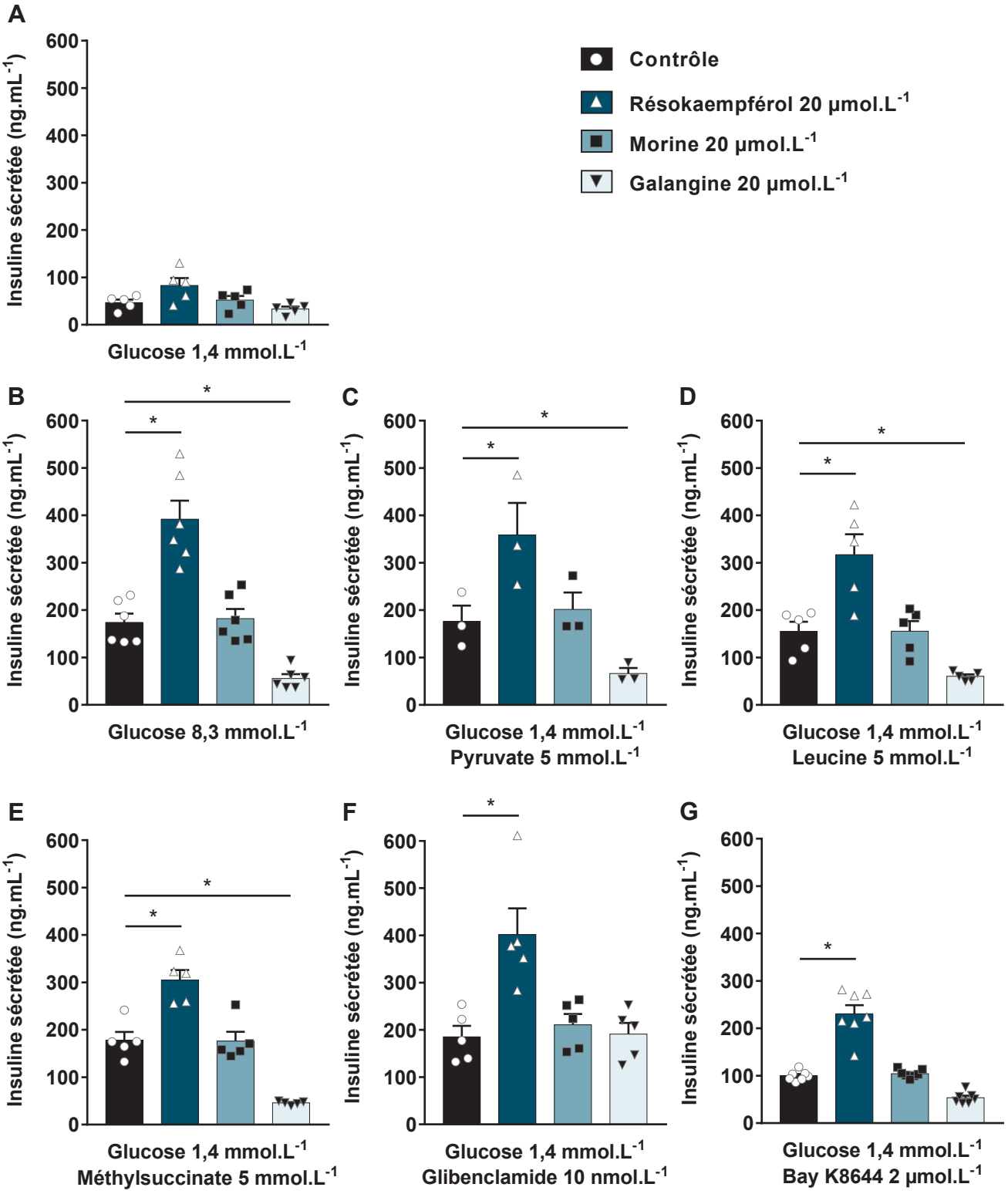


Figure 50 : Effets du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur la sécrétion d'insuline basale (A) ou induite par le glucose (B), le pyruvate (C), la leucine (D), le méthylsuccinate (E), le glibenclamide (F) ou le bay K8644 (G) dans des cellules INS-1. ANOVA 1 sauf G : Kruskall-Wallis car inhomogénéité des variances, non apparié, comparaisons avec le contrôle, A : n = 5, B : n = 6, C : n = 3, D : n = 5, E : n = 5, F : n = 5, G : n = 7.

La morine ne semble pas moduler la voie de signalisation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Cependant, elle pourrait interagir avec les mêmes sites que ceux du résokaempférol ou ceux de la galangine en qualité d'antagoniste neutre. Dans ce cas-là, elle inhiberait l'effet de ces composés sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Pour tester cette hypothèse, de manière très préliminaire (n = 1), nous avons évalué les effets de 20 µmol.L^{-1} de résokaempférol ou de galangine en présence d'une concentration plus élevée, en excès, de morine (100 µmol.L^{-1}). Nous observons que la morine ne bloque ni l'effet du résokaempférol (277,7 et 308,8 ng.mL^{-1} en absence et en présence de morine, respectivement), ni l'effet de la galangine (57,2 et 39,0 ng.mL^{-1} en absence et en présence de morine, respectivement). **Figure 51**. La morine ne module pas la sécrétion d'insuline induite par le glucose et ne se comporte pas comme un antagoniste neutre au niveau des cibles pharmacologiques du résokaempférol et de la galangine.

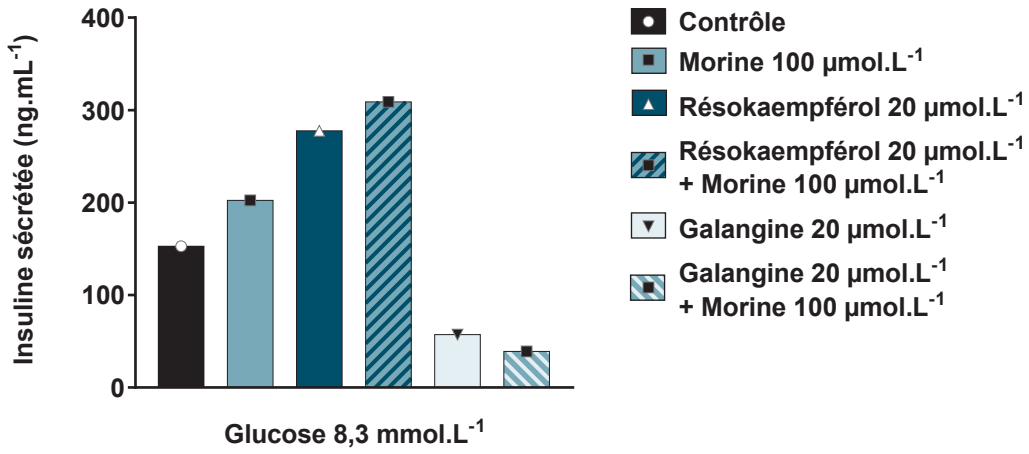


Figure 51 : Effet de la morine (100 µmol.L^{-1}) sur la sécrétion d'insuline en présence de 8,3 mmol.L^{-1} glucose et de résokaempférol (20 µmol.L^{-1}) ou de galangine (20 µmol.L^{-1}) dans des cellules INS-1. n = 1.

III.3.2 Implication des Ca_V dans le mécanisme d'action du résokaempférol

Nous venons de voir que le résokaempférol potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose et que son mécanisme d'action sur la sécrétion d'insuline pourrait impliquer les Ca_V. De plus, il a déjà été montré dans des cellules de la lignée INS-1, que la quercétine active les Ca_V afin d'induire une sécrétion d'insuline (Bardy et al., 2013). Or le profil pharmacologique de la quercétine sur la sécrétion d'insuline est similaire à celui du résokaempférol. Par ailleurs, plusieurs études ont décrit les flavonoïdes comme des modulateurs des Ca_V (cf. 3.3 Effets des flavonoïdes sur les canaux calciques voltage dépendants). Sur des cellules de muscles lisses vasculaires, des études d'électrophysiologie ont permis de montrer que les flavonoïdes modulent différemment les Ca_V 1.2. Certains ont un comportement agoniste et sont capables d'ouvrir ces canaux, d'autres se montrent antagonistes et induisent leur fermeture, tandis que d'autres encore ne présentent pas d'effet sur les courants calciques (Saponara et al., 2011). De plus, il est connu que les courant calciques de type L sont particulièrement impliqués dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Rorsman and Ashcroft, 2018).

Afin d'étudier l'implication des Ca_V dans le mécanisme d'action du résokaempférol, en collaboration avec le Pr. Jean-François Quignard (Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, INSERM U1045, Université Bordeaux), nous avons réalisé des mesures d'électrophysiologie par patch-clamp, cellules entières, dans des cellules de la lignée INS-1.

Dans un premier temps, nous avons observé l'effet de concentrations croissantes de résokaempférol sur les courants de type L, les Ca_V étant maintenus activés par un potentiel imposé de -10 mV. Dans ces conditions expérimentales, nos résultats montrent que le résokaempférol amplifie les courants de type L à 5 µmol.L^{-1} (121,0 ± 7,8 %) et 20 µmol.L^{-1} (121,1 ± 4,6 %). **Figure 52A.**

Nous avons ensuite étudié la capacité du résokaempférol (20 µmol.L^{-1}) à sensibiliser les Ca_V. Pour cela, nous avons tracé les courbes I/V : intensité du courant en fonction du voltage, I = f (V). **Figure 52B**. Ces courbes se construisent en mesurant l'intensité maximale du courant pour différents potentiels imposés : de -70 à 30 mV par incrément de 10 mV. Nous observons un décalage de la courbe I/V vers la gauche en présence de résokaempférol : les courants de type L sont renforcés par le résokaempférol pour une dépolarisation comprise entre -20 et -10 mV. Cela signifie que le résokaempférol est capable de sensibiliser les Ca_V, autrement dit qu'il induit une ouverture des Ca_V pour des voltages plus faibles. Par conséquent, le résokaempférol diminue le potentiel de demi-

activation ($V_{0,5}$) des courants de type L (-17,7 ± 1,0 mV pour le contrôle et -24,8 ± 2,3 pour le résokaempférol, test de Student, non apparié, n = 18 et 6 respectivement, p<0,05).

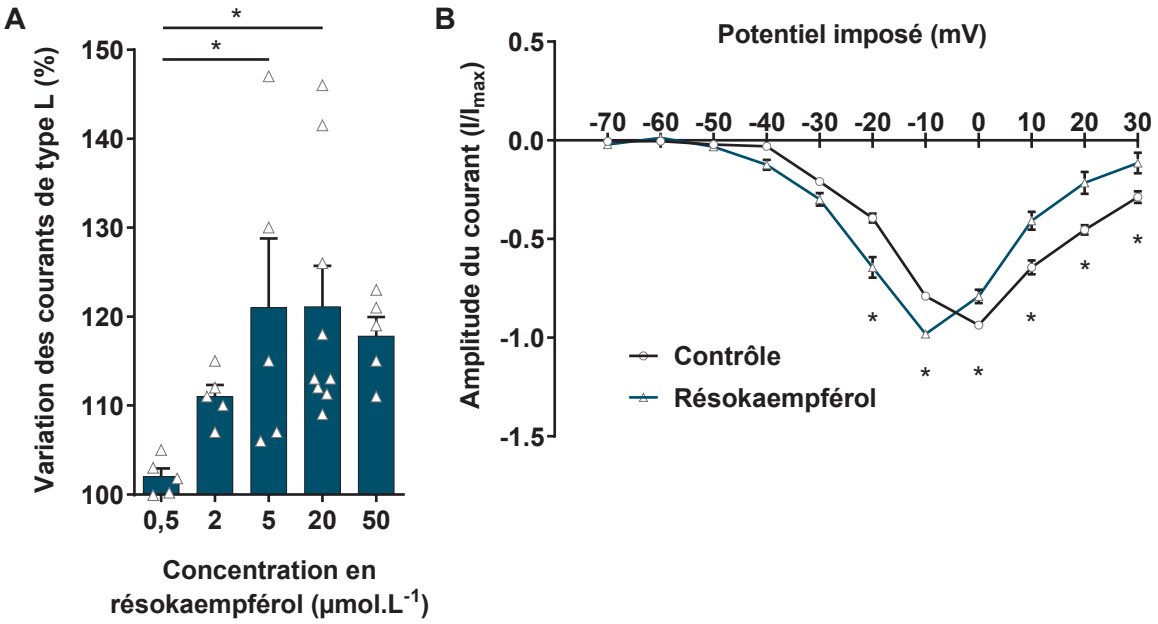


Figure 52 : Effets de concentrations croissantes de résokaempférol sur les courants calciques enregistrés à -10 mV (A) et effets de 20 µmol.L^{-1} de résokaempférol sur la relation intensité du courant / potentiel (I/V) des courants calciques de type L (B) dans des cellules INS-1. A : moyenne des courants exprimés en pourcentage du contrôle (sans résokaempférol), ANOVA 1, non apparié, comparaison avec 0,5, n = 5 à 9 ; B : courbes I/V normalisées à la valeur de l'intensité du courant entrant maximale (I_{max}), ANOVA 2, non apparié, n = 5.

Nous venons de voir que le résokaempférol augmente les courants calciques de type L à 5 et 20 µmol.L^{-1} d'environ 20 %, dans les cellules INS 1. Afin de confirmer le rôle des Ca_V sur le mécanisme d'action du résokaempférol, nous avons étudié la répercussion du blocage de ces canaux sur l'amplification de la sécrétion d'insuline en présence de résokaempférol. La nifédipine et le vérapamil sont deux inhibiteurs des Ca_V de type L appartenant respectivement à la famille des dihydropyridines et des phényl-alkylamines. La nifédipine est un modulateur allostérique tandis que le vérapamil est capable d'obstruer le canal (Tang et al., 2016). Dans nos conditions expérimentales, la nifédipine à 1 µmol.L^{-1} et le vérapamil à 20 µmol.L^{-1} présentent seulement une tendance inhibitrice sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose comme retrouvé dans la littérature (Szollosi et al., 2010; Bardy et al., 2013; Lin et al., 2017b). Il s'agit de concentrations non saturantes permettant d'étudier l'effet du

résokaempférol sans affecter l'effet du glucose. Nos résultats montrent que l'effet potentialisateur de la sécrétion d'insuline induit par 20 µmol.L^{-1} de résokaempférol est inhibé par la nifédipine (diminution de 282,3 ± 15,5 à 153,2 ± 11,9 ng.mL^{-1}) et le vérapamil (20 µmol.L^{-1}) (diminution de 301,0 ± 37,3 à 181,8 ± 15,4 ng.mL^{-1}). **Figure 53**.

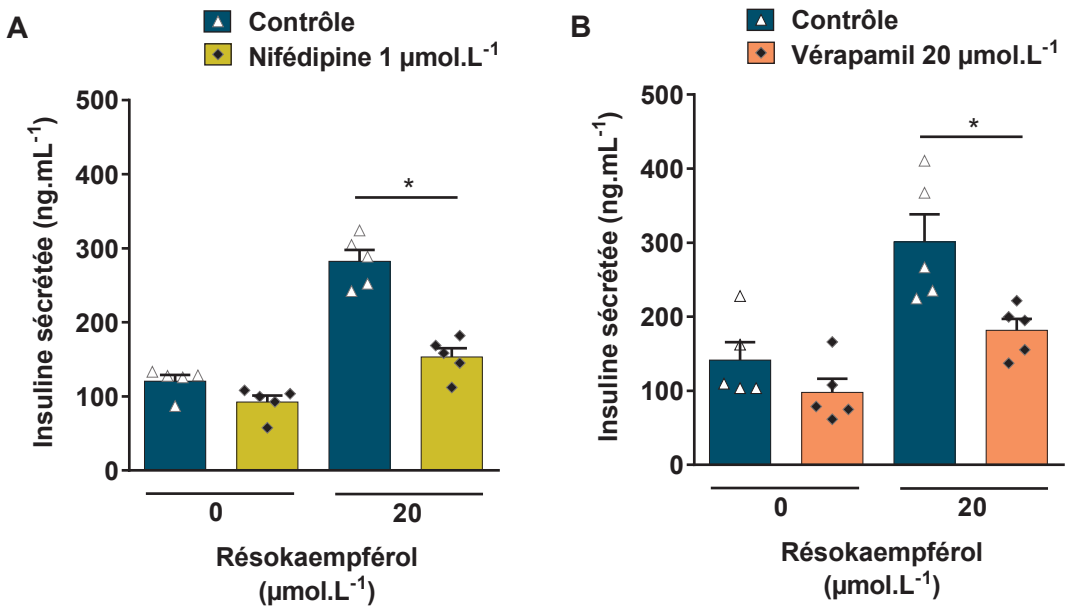


Figure 53 : Effets de la nifédipine (A) et du vérapamil (B) sur la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le résokaempférol en présence de 8,3 mmol.L^{-1} glucose dans des cellules INS-1. ANOVA 2, non apparié, comparaisons avec le contrôle, n = 5.

L'ensemble de ces données confirmerait ainsi l'implication des Ca_V de type L dans le mécanisme d'action du résokaempférol, favorisant notamment une sensibilisation du canal et conduisant à son ouverture à des voltages plus faibles.

III.3.3 Implication de la mitochondrie le mécanisme d'action de la galangine

Le métabolisme mitochondrial est primordial dans les mécanismes de sécrétion d'insuline induite par le glucose (Sha et al., 2020). Il permet de synthétiser l'ATP nécessaire à la fermeture des K_{ATP}. De plus, la modulation des fonctions mitochondriales, notamment par les flavonoïdes, peut influer sur la sécrétion d'insuline (cf. 3.4 Effets des flavonoïdes sur les fonctions mitochondriales). Nous avons vu que la galangine inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose et que son mécanisme d'action semble impliquer le métabolisme mitochondrial, et plus précisément la chaîne OXPHOS mitochondriale.

Nous avons décrit que la galangine inhibe la sécrétion d'insuline induite par le méthylsuccinate, un analogue du succinate, substrat de la succinate déshydrogénase. **Figure 50**. La succinate déshydrogénase est une enzyme du cycle de Krebs, mais il s'agit aussi du complexe II de la chaîne OXPHOS mitochondriale. Nous avons donc étudié l'effet de la galangine sur l'activité de cette enzyme en utilisant le test au MTT. En effet, ce test repose sur la transformation du MTT en un substrat coloré par l'action de la succinate déshydrogénase. Le test a été réalisé sur des cellules INS-1 incubées avec des concentrations croissantes en flavonoïde. Nous observons que la galangine n'a pas d'effet sur l'activité de la succinate déshydrogénase entre 2 et 20 µmol.L^{-1}. Cependant, dès 50 µmol.L^{-1}, elle inhibe significativement l'activité de l'enzyme. **Figure 54**. La galangine est donc capable d'impacter le métabolisme mitochondrial et notamment d'interférer avec l'activité de la succinate déshydrogénase, complexe II de la chaîne OXPHOS.

En accord avec nos résultats précédents, le résokaempférol et la morine n'ont pas d'effet sur l'activité de la succinate déshydrogénase quelle que soit la concentration testée. **Figure 54**. L'absence d'effet potentialisateur du résokaempférol à 100 µmol.L^{-1} sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose (**Figure 44B**) ne semble donc pas être le résultat d'une inhibition de l'activité de la succinate déshydrogénase à une telle concentration.

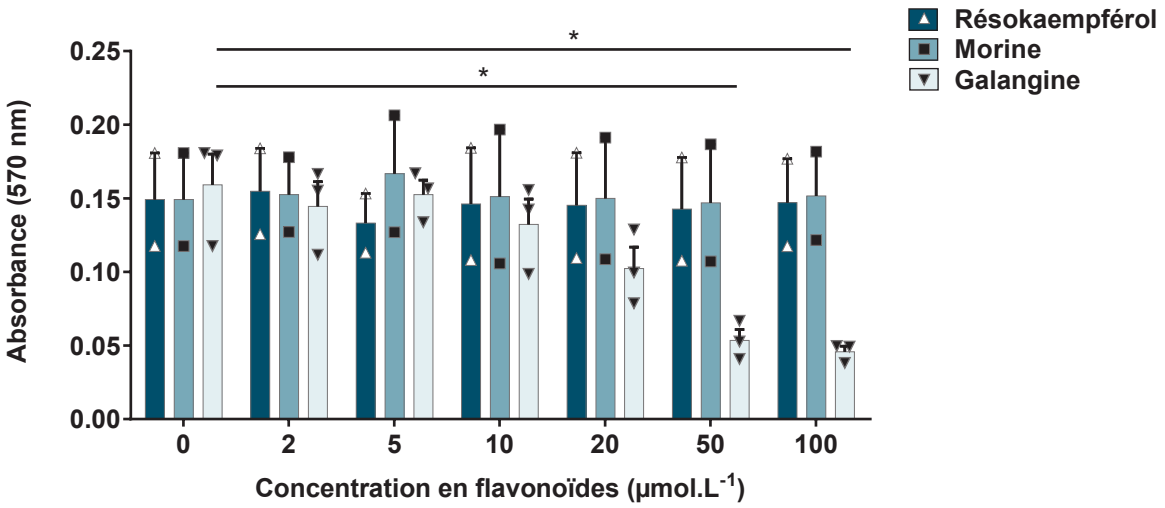


Figure 54 : Effets du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur l'activité de la succinate déshydrogénase des cellules INS-1. ANOVA 2, non apparié, comparaisons avec le 0 µmol.L^{-1}, n = 2 à 3.

Nous venons de voir que la galangine est capable d'inhiber l'activité d'au moins un des complexes de la chaîne OXPHOS mitochondriale. Celle-ci utilise les cofacteurs réduits issus du métabolisme du glucose et le dioxygène pour synthétiser de l'ATP impliquée dans le mécanisme de sécrétion d'insuline. Ainsi, une inhibition de la chaîne OXPHOS peut avoir des répercussions sur la sécrétion d'insuline, en lien avec la consommation de dioxygène par la cellule (Špaček et al., 2008). Afin d'explorer l'impact de la galangine sur la chaîne OXPHOS mitochondriale, une collaboration avec le Dr. Béatrice Chabi (Dynamique du Muscle et Métabolisme, INRAE UMR 866, Université de Montpellier) a été mise en place pour réaliser des mesures d'oxygraphie dans des cellules de la lignée INS-1.

La chaîne respiratoire mitochondriale (formée par les complexes I à IV de la chaîne OXPHOS) a pour fonction principale la consommation de dioxygène grâce au passage des électrons de complexe en complexe. Au cours de ce transfert d'électrons, des protons (H^+) sont « pompés » de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. L'accumulation de protons dans cet espace crée un gradient électrochimique au niveau de la membrane interne mitochondriale. Le retour des protons peut se faire *via* l'ATP synthase (complexe V de la chaîne OXPHOS) et l'énergie générée par le flux de protons conduit à la formation d'ATP. Cependant une partie des protons peut également diffuser à travers la membrane interne. Dans ce cas, l'énergie est restituée sous forme de chaleur et ce phénomène est appelé fuite membranaire de protons.

En présence de glucose (8,3 mmol.L^{-1}), la consommation de routine des cellules INS-1 est de 15,7 ± 2,3 pmol de dioxygène par seconde et par million de cellules (pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules). En présence d'oligomycine (2,5 µmol.L^{-1}), un inhibiteur de l'ATP synthase, l'unique moyen pour les protons de retourner dans la matrice est la fuite membranaire. La membrane interne étant relativement imperméable aux protons, ce phénomène est limité et conduit à une accumulation des protons dans l'espace intermembranaire. Par conséquent, l'activité de la chaîne respiratoire ralentit et la consommation de dioxygène par la mitochondrie reflète uniquement la consommation de dioxygène nécessaire pour compenser la fuite membranaire de protons. Dans les cellules INS-1, cette consommation de dioxygène liée à la fuite membranaire de protons est de 7,0 ± 1,0 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules. Le CCCP est un protonophore qui favorise le retour des protons dans la matrice mitochondriale. Il provoque une déplétion de protons dans l'espace intermembranaire qui est compensée par une accélération de la de la respiration mitochondriale. L'ajout de progressif de CCCP (jusqu'à 0,8 µmol.L^{-1}) permet donc de mesurer la consommation maximale de dioxygène par les mitochondries, à savoir 23,6 ± 5,7 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules dans les cellules INS-1. **Figure 55A et B**.

En présence de 20 µmol.L^{-1} de galangine, la respiration de routine (26,9 ± 4,0 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules), la consommation de dioxygène liée à la fuite membranaire de protons (14,8 ± 2,7 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules) et la consommation maximale de dioxygène (30,0 ± 6,2 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules) sont significativement augmentées. **Figure 55A et B**.

Grâce au calcul des ratios des flux, à partir des mesures de consommation de dioxygène des différents états de respiration, il est possible d'estimer les proportions de la consommation de dioxygène utilisées par la cellule, soit pour conduire à la synthèse d'ATP, soit pour compenser la fuite membranaire de protons. Dans les cellules INS-1, en présence de 8,3 mmol.L^{-1} de glucose, on observe que 55,8 ± 0,6 % de la consommation de dioxygène sont dédiés à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase, tandis que 44,2 ± 0,6 % servent à compenser la fuite membranaire de protons. La galangine inverse ces proportions avec 45,4 ± 3,0 % de la consommation de dioxygène dédiés à la synthèse d'ATP et 54,6 ± 3,0 % servant à compenser la fuite membranaire de protons. **Figure 55C**.

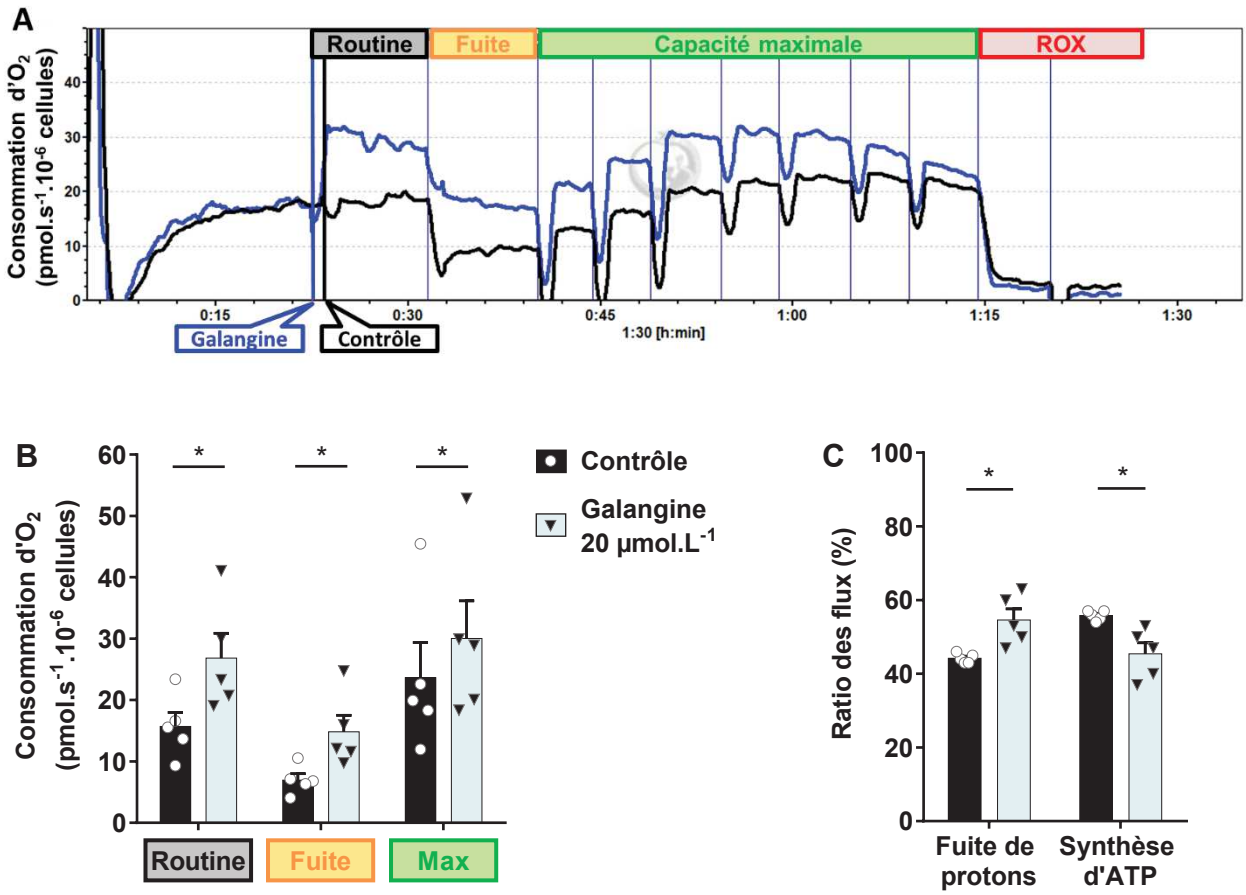


Figure 55 : Effets de la galangine sur les différents états de respiration dans des cellules INS-1. Exemple de graphe de respirométrie (**A**), consommation de dioxygène pour chaque état de respiration (**B**) et ratio des flux (**C**) en condition stimulante de glucose (8,3 mmol.L^{-1}) et en présence ou en absence de 20 µmol.L^{-1} de galangine. Test de Student bilatéral, apparié, n = 5.

La galangine augmente significativement la consommation de dioxygène de tous les états de respiration de la chaîne OXPHOS mitochondriale dans les cellules INS-1. Elle accentue notamment la consommation de dioxygène de routine, la consommation de dioxygène liée à la fuite membranaire de protons, et accroit la proportion de la consommation de dioxygène utilisée pour compenser la fuite membranaire de protons. Ce comportement rappelle celui d'un agent découplant de la chaîne OXPHOS mitochondriale. En effet, les agents découplants favorisent le retour des protons dans la matrice mitochondriale au détriment de l'ATP synthase. L'activité de la chaîne respiratoire s'accélère et consomme une plus grande quantité de dioxygène pour compenser le retour accru des protons dans la matrice. Cet effet est visible sur la consommation de dioxygène de routine et *a fortiori* sur celle liée

à la fuite membranaire de protons qui se voit augmentée. La part de la consommation de dioxygène servant à compenser la fuite membranaire de protons est de ce fait, elle aussi augmentée.

Afin de vérifier si cet effet découplant de la galangine est spécifique des cellules INS-1, nous avons réalisé les mêmes expériences d'oxygraphie dans des cellules de la lignée C2C12. Cette lignée est un sous-clone d'une lignée de myoblastes établi à partir de cellules musculaires de souris. En tant que cellules musculaires, les cellules de la lignée C2C12 sont spécialisées dans la synthèse d'énergie et le métabolisme mitochondrial y est plus performant que dans les cellules INS-1. En effet, leur consommation de dioxygène de routine est de 41,3 ± 4,5 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules, celle liée à la fuite membranaire de protons est de 7,4 ± 0,9 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules, et la consommation de dioxygène maximale de 147,1 ± 18,5 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules. Le calcul des ratios des flux confirme la meilleure efficience des cellules C2C12 par rapport aux cellules INS-1 à la synthèse d'ATP puisque 81,2 ± 1,2 % de la consommation de dioxygène sont dédiés à la synthèse d'ATP et 18,2 ± 1,2 % servent à compenser la fuite membranaire de protons. Dans les cellules C2C12, la galangine (20 µmol.L^{-1}) augmente la respiration de routine (61,3 ± 2,9 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules) et la consommation de dioxygène liée à la fuite membranaire de protons (25,0 ± 1,7 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules), mais n'a pas d'effet sur la consommation maximale de dioxygène (151,1 ± 8,5 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules). **Figure 56A et B**. Le calcul des ratios des flux montre que la galangine diminue significativement la part de la consommation de dioxygène dédié à la synthèse d'ATP (59,4 ± 2,2 %) et augmente celle servant à compenser la fuite membranaire de protons (40,6 ± 2,2 %). **Figure 56C**. Ces résultats montrent que l'effet découplant de la galangine sur la respiration mitochondriale n'est pas spécifique des cellules INS-1.

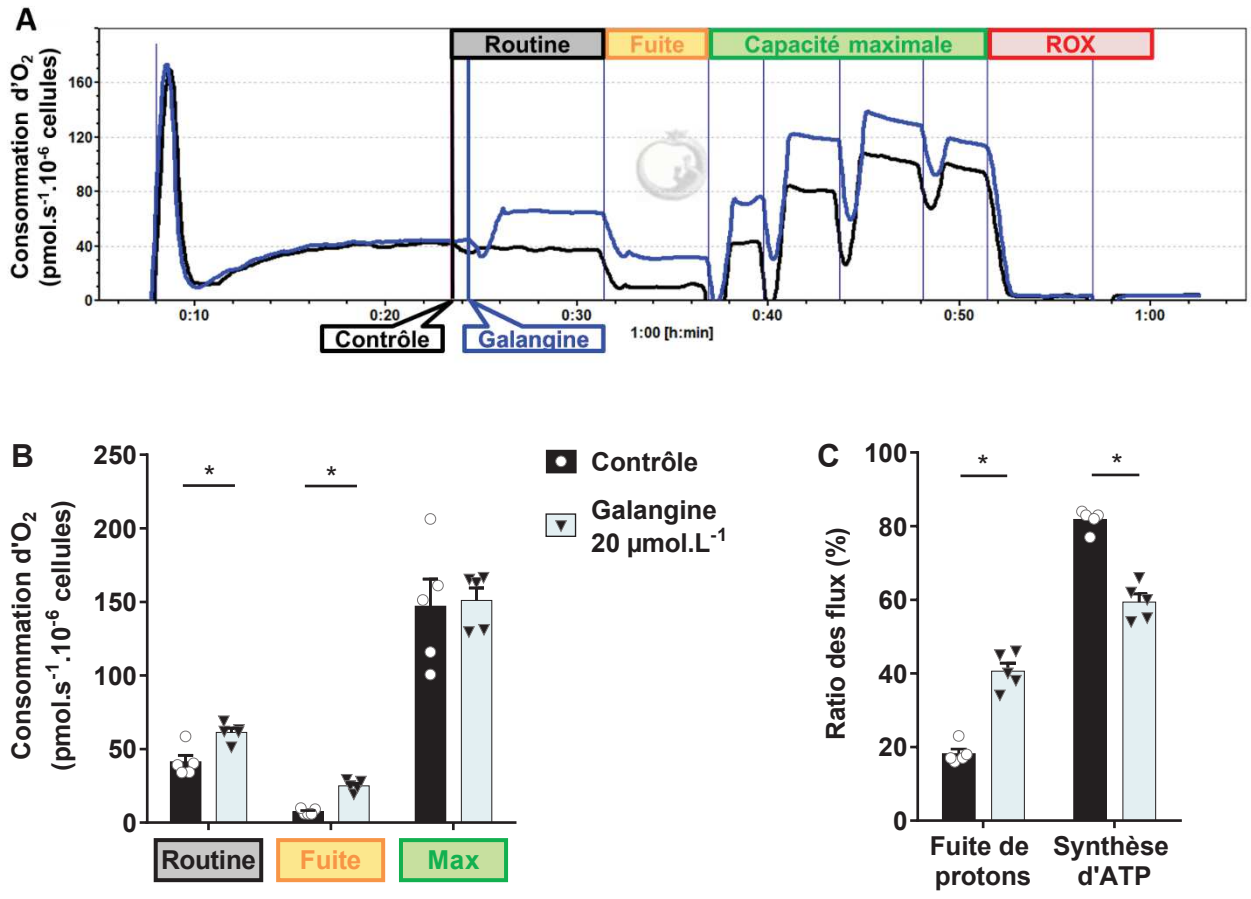


Figure 56 : Effets de la galangine sur les différents états de respiration dans des cellules C2C12. Exemple de graphe de respirométrie (**A**), consommation de dioxygène pour chaque état de respiration (**B**) et ratio des flux (**C**) en condition stimulante de glucose (8,3 mmol.L^{-1}) et en présence ou en absence de 20 µmol.L^{-1} de galangine. Test de Student bilatéral, apparié, n = 5.

A titre de contrôle, dans les cellules de la lignée INS-1, nous avons étudié les effets du résokaempférol et de la morine. Nos résultats indiquent que ces deux flavonoïdes (20 µmol.L^{-1}) n'ont pas d'effet sur les niveaux de consommation de dioxygène de chaque état de respiration : 14,4 ± 2,0 et 14,98 ± 2,5 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules (en absence et en présence de résokaempférol, respectivement) et 17,7 ± 2,1 et 17,4 ± 1,8 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules (en absence et en présence de morine, respectivement) pour la respiration de routine ; 6,0 ± 0,6 et 6,2 ± 1,0 (en absence et en présence de résokaempférol, respectivement) et 7,7 ± 0,9 et 7,4 ± 0,6 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules (en absence et en présence de morine, respectivement) pour la consommation de dioxygène liée à la fuite membranaire de protons ; 21,6 ± 3,3 et 25,3 ± 4,3 (en absence et en présence de résokaempférol, respectivement) et 26,7 ± 3,1 et 28,8 ± 4,3 pmol.s^{-1}.10^{-6} cellules (en absence et en présence de morine, respectivement) pour la

consommation maximale de dioxygène. Les ratios des flux ne sont pas modifiés par le résokaempférol ou la morine : 42,4 ± 1,6 % et 41,6 ± 1,4 % (en absence et en présence de résokaempférol, respectivement) et 43,6 ± 1,1 % et 43,0 ± 1,3 % de la consommation de dioxygène (en absence et en présence de morine, respectivement) sont dédiés à la synthèse d'ATP ; 57,6 ± 1,6 % et 58,4 ± 1,4 % (en absence et en présence de résokaempférol, respectivement) et 56,4 ± 1,1 % et 57,0 ± 1,3 % de la consommation de dioxygène (en absence et en présence de morine, respectivement) servent à compenser la fuite membranaire de protons. **Figure 57** et **Figure 58**. Ces résultats confirment que le résokaempférol et la morine ne modulent pas l'activité mitochondriale dans les cellules INS-1. Il est à noter également que ces deux flavonoïdes n'ont pas d'effet sur les niveaux de consommation de dioxygène de chacun des états de respiration dans les cellules de la lignée C2C12 (résultats non présentés).

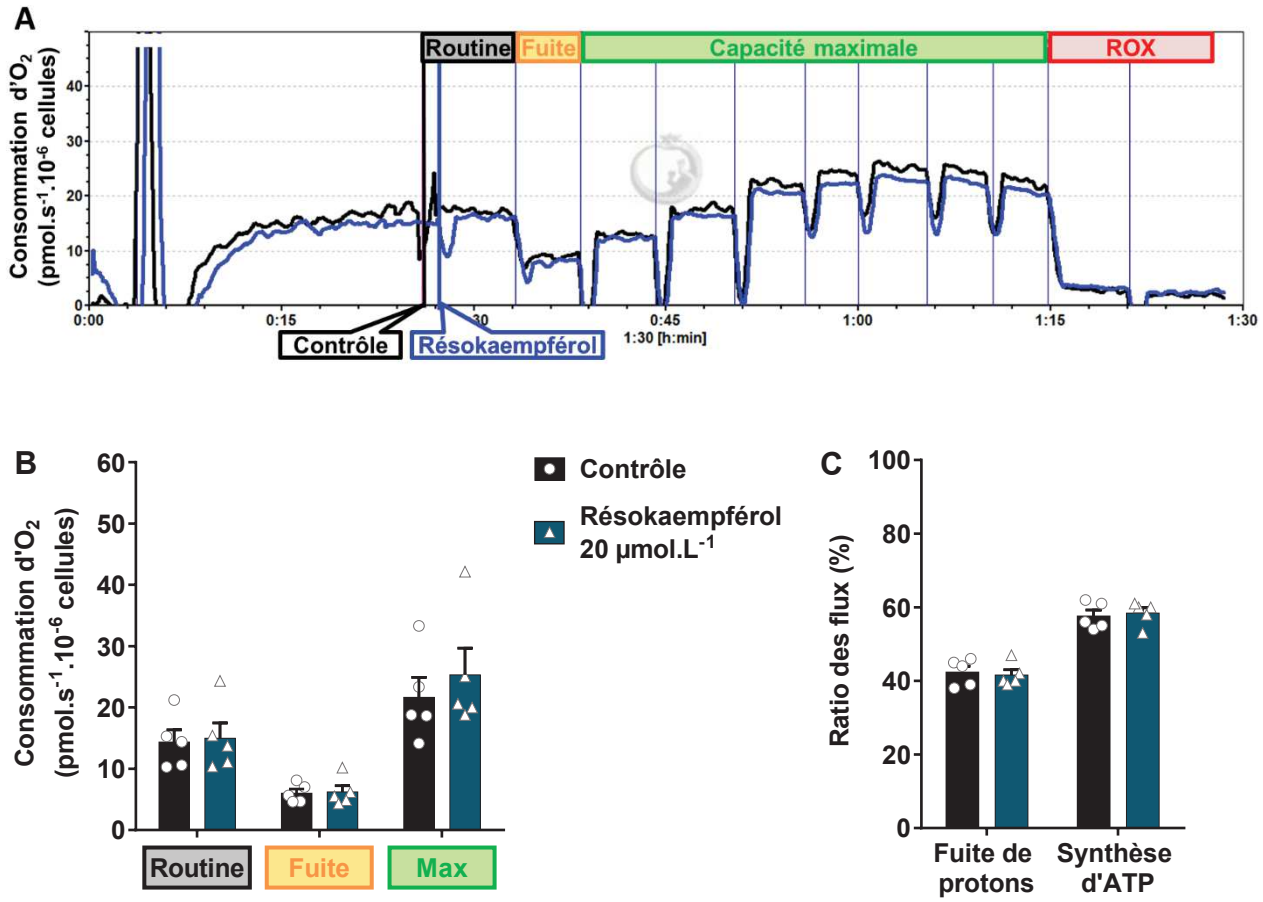


Figure 57 : Effets du résokaempférol sur les différents états de respiration dans des cellules INS-1. Exemple de graphe de respirométrie (**A**), consommation de dioxygène pour chaque état de respiration (**B**) et ratio des flux (**C**) en condition stimulante de glucose (8,3 mmol.L^{-1}) et en présence ou en absence de 20 µmol.L^{-1} de résokaempférol. Test de Student bilatéral, apparié, n = 5.

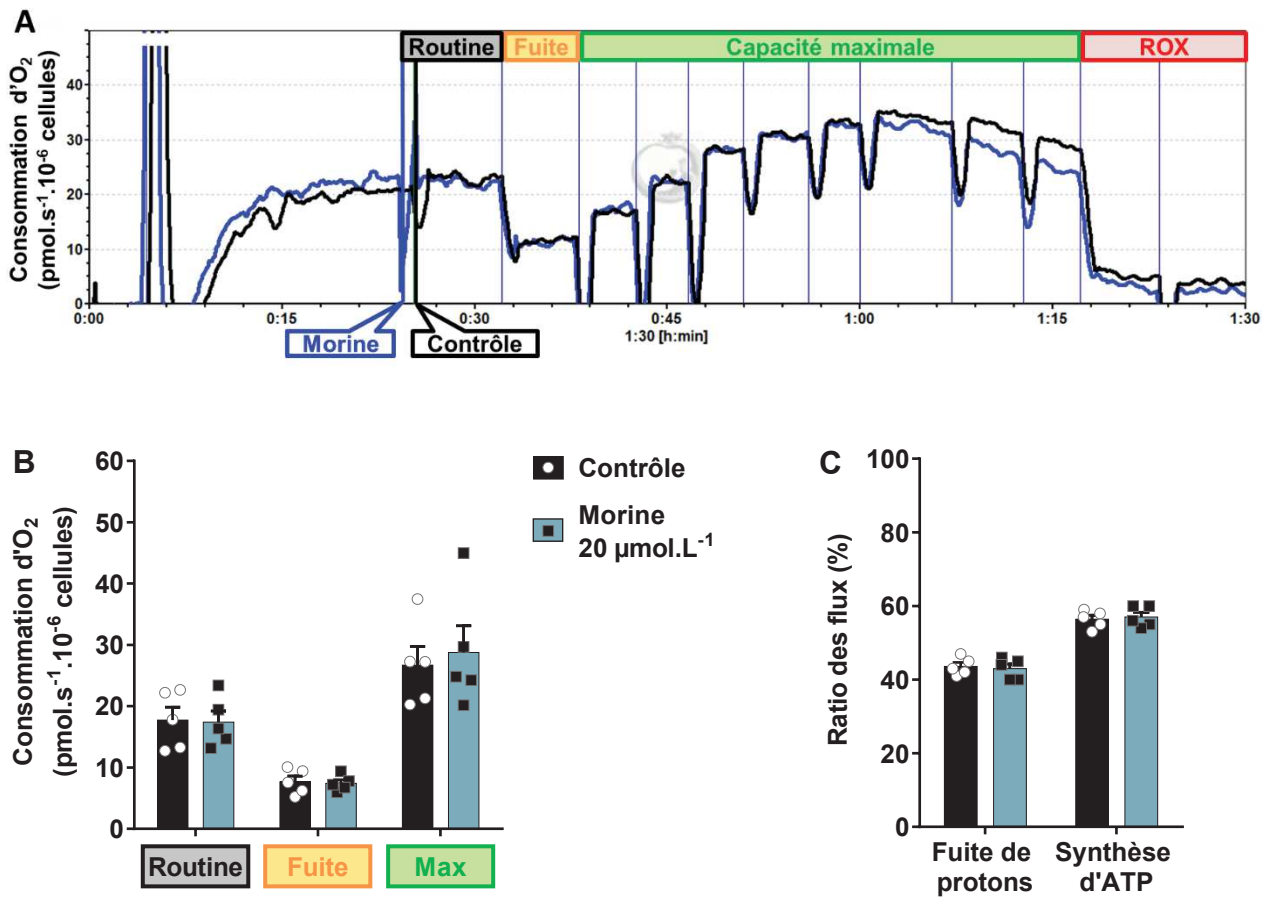


Figure 58 : Effets de la morine sur les différents états de respiration dans des cellules INS-1. Exemple de graphe de respirométrie (**A**), consommation de dioxygène pour chaque état de respiration (**B**) et ratio des flux (**C**) en condition stimulante de glucose (8,3 mmol.L^{-1}) et en présence ou en absence de 20 µmol.L^{-1} de morine. Test de Student bilatéral, apparié, n = 5.

Par ailleurs, lors de la mise au point de ces expériences d'oxygraphie dans les cellules INS-1, nous avons observé une respiration constante des cellules en présence ou en absence de galangine pendant au moins 1h, montrant une viabilité cellulaire non affectée par la galangine. Cette observation confirme que l'inhibition de la sécrétion d'insuline induite par la galangine n'est pas due à une toxicité cellulaire dans nos conditions expérimentales (1h d'incubation, 20 µmol.L^{-1} de galangine en présence de 8,3 mmol.L^{-1} glucose).

Les résultats d'oxygraphie montrent que la galangine se comporte comme un agent découplant de la phosphorylation oxydative et donc de la synthèse d'ATP mitochondriale dans les cellules INS-1 (et C2C12). Le cyanure de carbonyle m-chlorophénylhydrazone (CCCP) est un

protonophore découplant la phosphorylation oxydative mitochondriale. Il s'agit d'une petite molécule qui peut se retrouver sous forme protonée neutre, ou sous forme ionique chargée négativement (forme anionique). Dans des conditions physiologiques, le taux de dissociation des molécules de CCCP dans l'espace intermembranaire des mitochondries est faible en raison de la concentration élevée en protons. Cette forme protonée (non dissociée) est suffisamment lipophile pour permettre son passage à travers la membrane interne mitochondriale. Les molécules de CCCP protonées diffusent dans la matrice suivant leur gradient de concentration transmembranaire. Dans la matrice, les molécules de CCCP se dissocient en $CCCP^-$ (forme anionique) et en protons. La charge négative est largement délocalisée sur une dizaine d'atomes dans la forme ionisée du CCCP, de sorte que le champ électrique entourant l'anion CCCP est très faible. Cela permet à l'anion de diffuser librement dans des milieux non polaires, tels que les membranes phospholipidiques. Les anions $CCCP^-$ quittent donc la matrice sous l'effet du potentiel électrochimique membranaire. Dans l'espace intermembranaire, les anions $CCCP^-$ s'associent avec des protons disponibles en abondance pour former des molécules de CCCP protonées prêtes à entamer un autre cycle. Ces cycles sont entraînés par le gradient de concentration transmembranaire des CCCP neutres ainsi que par le gradient électrochimique des anions $CCCP^-$. Par conséquent, une faible quantité de CCCP peut catalyser le retour d'un nombre important de protons et ainsi court-circuiter l'ATP-synthase conduisant au découplage de la phosphorylation oxydative. En résumé, les protons retournent dans la matrice sous forme de molécules de CCCP protonées. **Figure 59**. (Plášek et al., 2017).

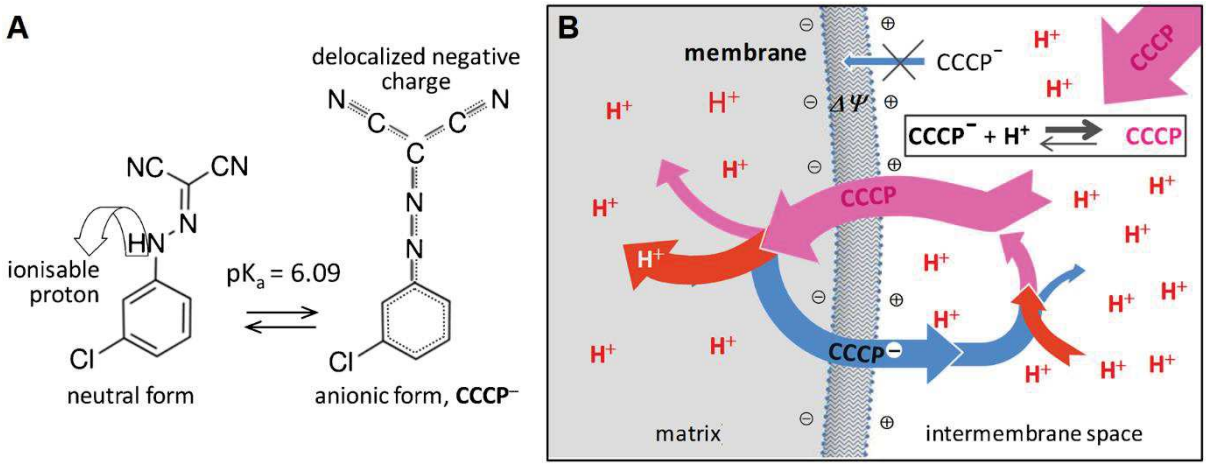


Figure 59 : Structure chimique du CCCP sous sa forme neutre protonée ou anionique (A), et son mécanisme d'action découplant (B). (Plášek et al., 2017). CCCP, cyanure de carbonyle m-chlorophénylhydrazone ; H^+, proton ; ΔΨ, potentiel de membrane.

En fonction du pKa de chaque groupement hydroxyle, les polyphénols, et par conséquent les flavonoïdes, sont capables de se dissocier en anions phénolates et protons au pH cytosolique. Les anions phénolates peuvent diffuser à travers la membrane externe mitochondriale jusqu'à l'espace intermembranaire, où un environnement plus acide facilite leur reprotonation et leur diffusion vers la matrice. Dans la matrice, ils se « déprotonent » et les anions phénolates qui en résultent diffusent à nouveau vers l'espace intermembranaire en suivant le gradient électrochimique. Ce cycle caractéristique des protonophores conduit à la dissipation du potentiel de la membrane mitochondriale. **Figure 60**. (Stevens et al., 2018). L'effet découplant de la galangine a été décrit sur des mitochondries isolées de cellules de foie de rat (Dorta et al., 2005). Il serait favorisé par la double liaison en position 2-3, le groupement hydroxyle en position 3, la fonction cétone en position 4 sur le cycle C, et l'absence de groupement hydroxyle sur le cycle B. **Figure 45**.

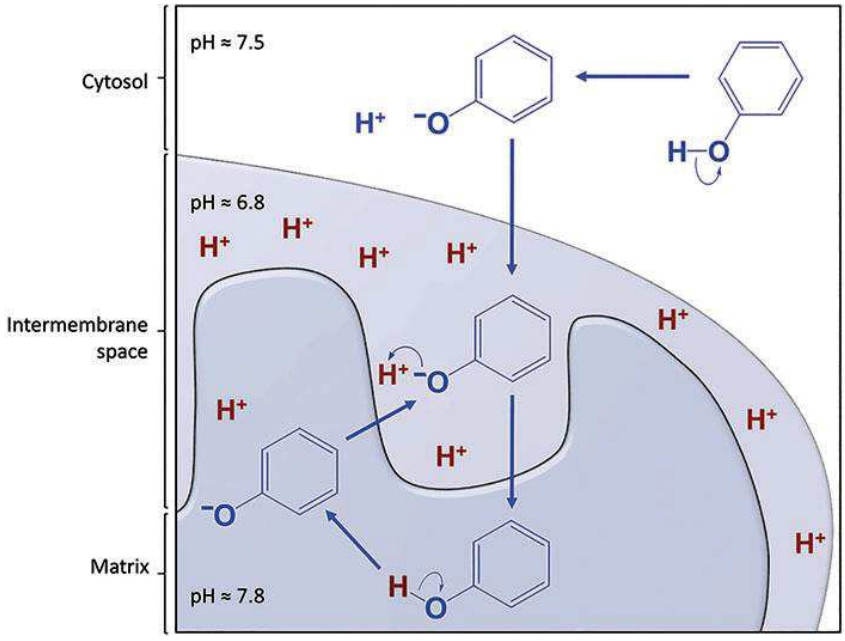


Figure 60 : Hypothèse de mécanisme d'action découplant de certains polyphénols (Stevens et al., 2018).

Une autre possibilité serait une action pharmacologique de la galangine envers des protéines localisées à la membrane interne mitochondriale telles que l'*adenine nucleotide translocase* (ANT) ou une protéine de la famille des *uncoupling proteins* (UCP) capables de dissiper le gradient mitochondrial

de protons (Jastroch et al., 2010; Busiello et al., 2015). En effet, il a été montré que la quercétine agit comme agent découplant sur des mitochondries isolées à partir de cortex de rein de rat, par un mécanisme impliquant vraisemblablement l'inhibition de l'ANT (Ortega and García, 2009). En ce qui concerne les UCP, l'invalidation génétique de la protéine UCP2 augmente la production d'ATP et la sécrétion d'insuline induites par le glucose dans des ilots de Langerhans (Zhang et al., 2001). La possibilité que la galangine active la protéine UCP2 constitue une piste à explorer.

Afin d'évaluer si l'effet découplant observé de la galangine pourrait être à l'origine de son effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline, nous avons étudié le comportement d'un agent découplant connu, le CCCP, sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose. En condition stimulante de glucose (8,3 mmol.L^{-1}), nous confirmons que la galangine (20 µmol.L^{-1}) inhibe significativement la sécrétion d'insuline par les cellules INS-1 après 1h d'incubation (143,4 ± 13,7 et 63,6 ± 12,2 ng.mL^{-1} en absence et en présence de galangine, respectivement). Nos résultats montrent que le CCCP inhibe de façon concentration dépendante la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Nous notons qu'à la concentration de 0,4 µmol.L^{-1}, le CCCP induit une inhibition de la sécrétion d'insuline comparable à celle de la galangine à 20 µmol.L^{-1} (62,8 ± 7,1 ng.mL^{-1} et 63,6 ± 12,2 ng.mL^{-1} pour le CCCP et la galangine, respectivement). **Figure 61**. Le profil pharmacologique du CCCP, agent découplant mitochondrial, est donc similaire à celui de la galangine.

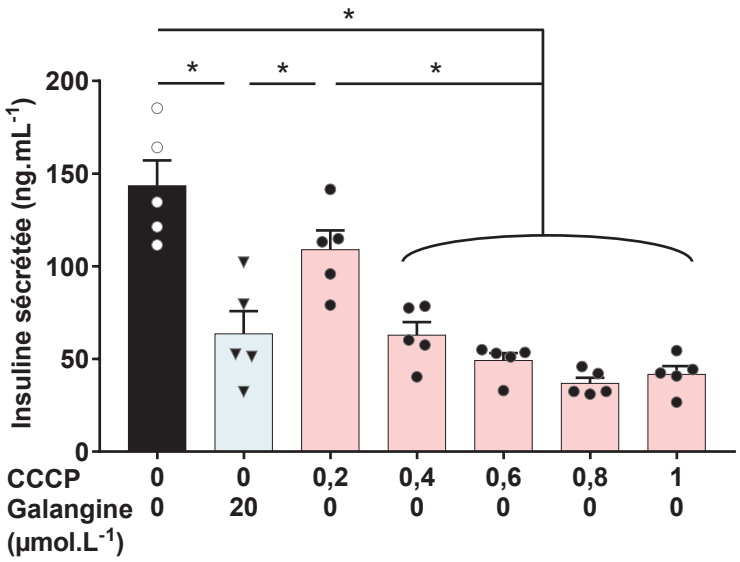


Figure 61 : Effet-concentration du CCCP sur la sécrétion d'insuline en comparaison avec la galangine (20 µmol.L^{-1}), en présence de 8,3 mmol.L^{-1} de glucose dans des cellules INS-1. ANOVA 1, non apparié, comparaisons multiples, n = 5.

Pour s'assurer que le CCCP inhibe la sécrétion d'insuline *via* une modulation de l'activité mitochondriale, nous avons étudié l'effet du CCCP sur la sécrétion d'insuline induite par le glibenclamide (sécrétagogue induisant la sécrétion d'insuline indépendamment de l'activité mitochondriale). Le CCCP ne module pas la sécrétion d'insuline induite par 10 nmol.L^{-1} de glibenclamide (162,3 ± 13,9 ng.mL^{-1}) pour des concentrations de 0,2, 0,4 et 0,6 µmol.L^{-1} (129,7 ± 13,5 ; 141,1 ± 10,2 ; 125,2 ± 12,2 ng.mL^{-1}, respectivement). Le CCCP semble donc inhiber la sécrétion d'insuline en inhibant le métabolisme mitochondrial dans les cellules INS-1. **Figure 62**.

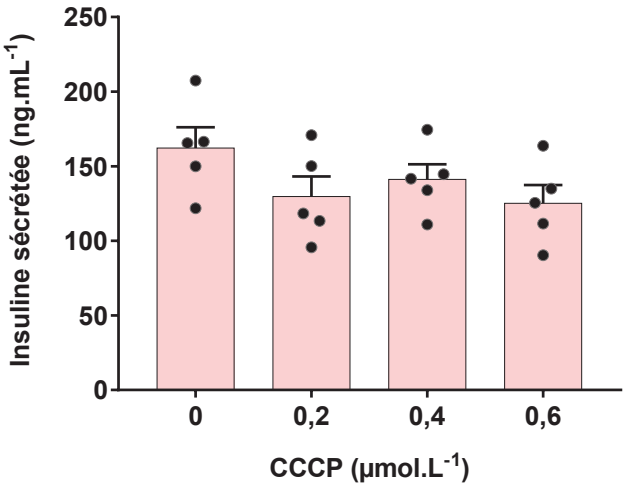


Figure 62 : Effet-concentration du CCCP sur la sécrétion d'insuline induite par le glibenclamide (10 nmol.L^{-1}) en présence de 1,4 mmol.L^{-1} de glucose dans des cellules INS-1. ANOVA 1, non apparié, comparaisons avec le 0 µmol.L^{-1}, n = 5.

Les agents découplants de la chaine OXPHOS diminuent la synthèse d'ATP par la mitochondrie. Dans la physiologie des cellules β, l'ATP et plus précisément l'augmentation du ratio ATP/ ADP est indispensable pour induire une fermeture des K_{ATP} nécessaire aux mécanismes de sécrétion d'insuline induite par le glucose. Afin de vérifier si l'effet découplant de la galangine sur la chaine OXPHOS est à l'origine de l'inhibition de la sécrétion d'insuline *via* une inhibition de la synthèse d'ATP, nous avons réalisé des mesures des concentrations en ATP dans les cellules INS-1. L'ATP totale est quantifiée suite à une incubation des cellules INS-1 durant 30 min. Ce temps d'incubation est diminué par rapport aux expériences de sécrétion d'insuline (60 min) car l'ATP est une molécule bien moins stable que l'insuline. L'ATP non produite par l'ATP synthase, que l'on peut qualifier d'ATP cytosolique, est mesurée en ajoutant de l'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase, 2,5 µmol.L^{-1}) dans le milieu. La

quantité d'ATP produite par l'ATP synthase, que l'on peut qualifier d'ATP mitochondriale, est calculée en soustrayant l'ATP cytosolique de l'ATP totale. Des expériences de mise au point ont permis de vérifier que la quantité de protéine reste identique pour chaque condition expérimentale (résultats non présentés). En condition stimulante de glucose (8,3 mmol.L^{-1}), la quantité d'ATP totale est évaluée à 1,53 ± 0,15 µmol.L^{-1} se décomposant ainsi : 1,00 ± 0,13 µmol.L^{-1} d'ATP mitochondriale et 0,53 ± 0,03 µmol.L^{-1} d'ATP cytosolique. Le CCCP (testé à la concentration induisant un effet inhibiteur similaire à celui de la galangine sur la sécrétion d'insuline - 0,4 µmol.L^{-1}) diminue la quantité d'ATP mitochondriale (0,39 ± 0,06 µmol.L^{-1}) sans affecter de façon significative le niveau d'ATP totale (1,17 ± 0,05 µmol.L^{-1}). La galangine (20 µmol.L^{-1}) présente le même comportement en diminuant également la quantité d'ATP mitochondriale (0,64 ± 0,14 µmol.L^{-1}) sans moduler la quantité d'ATP totale (1,59 ± 0,22 µmol.L^{-1}). **Figure 63**.

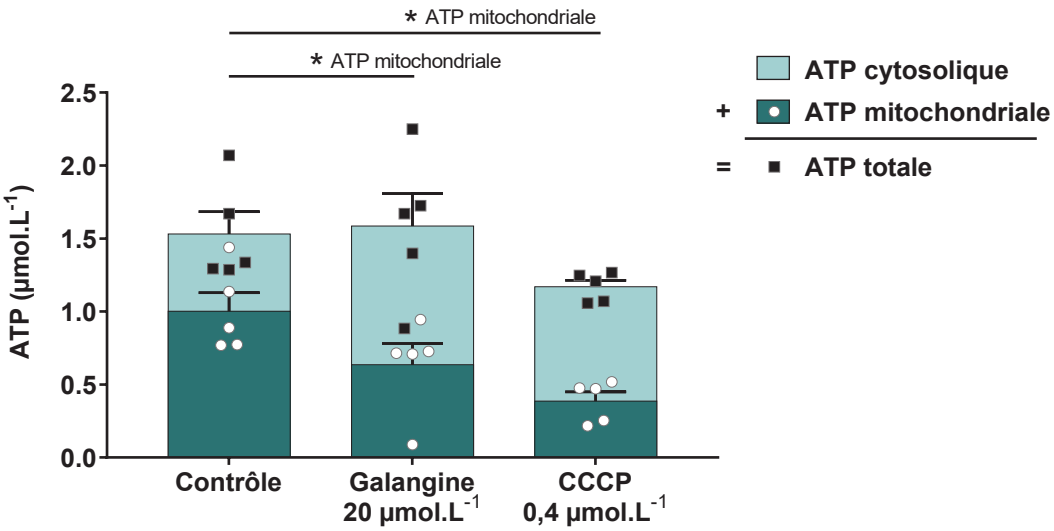


Figure 63 : Effets de la galangine (20 µmol.L^{-1}) et du CCCP (0,4 µmol.L^{-1}) sur la concentration d'ATP en présence de 8,3 mmol.L^{-1} de glucose dans des cellules INS-1. ATP mitochondriale : ATP produite par l'ATP synthase ; ATP cytosolique : ATP non produite par l'ATP synthase ; ATP totale : ATP mitochondriale + ATP cytosolique. ANOVA 1, non apparié, pour l'ATP totale et l'ATP mitochondriale, comparaison avec le contrôle, n = 5.

Ces résultats suggèrent que la galangine est capable d'inhiber la synthèse d'ATP mitochondriale par l'ATP synthase *via* un mécanisme rappelant celui d'un agent découplant de la chaîne OXPHOS. La synthèse d'ATP est une étape indispensable de la sécrétion d'insuline induite par le glucose puisqu'elle permet la fermeture des K_{ATP}. Cependant, nos résultats montrent également que

l'inhibition de la synthèse d'ATP mitochondriale (par l'ATP synthase) induite par la galangine est compensée par une augmentation de l'ATP cytosolique ; la galangine ne modulant pas la quantité totale d'ATP produite par les cellules. Néanmoins, le CCCP n'est pas non plus en mesure d'inhiber la synthèse d'ATP totale par les cellules INS-1 bien qu'il soit un agent découplant de la phosphorylation oxydative. Par ailleurs, il a été démontré la nécessité d'une augmentation de la concentration en ATP concomitante à une baisse de celle d'ADP, soit une augmentation du ratio ATP/ADP, pour induire la fermeture des K_{ATP} et non d'une augmentation isolée de la concentration en ATP (Zingman et al., 2001). D'autre part, les modifications du ratio ATP/ADP imputables au glucose seraient en grande partie dues à une baisse de l'ADP cytosolique (Detimary et al., 1996). Il serait donc particulièrement intéressant d'étudier l'influence de la galangine sur les niveaux d'ADP afin d'évaluer le ratio ATP/ADP. La galangine pourrait effectivement diminuer ce ratio, conduisant à la fermeture des K_{ATP}.

A la vue de ces résultats, il est légitime de se questionner sur l'intérêt de la galangine dans le contexte du diabète de type 2. En effet, inhiber la sécrétion d'insuline dans le but de prévenir les hyperglycémies semble contre-productif. Cependant, certains auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle une surstimulation de la sécrétion d'insuline, pourrait conduire à l'épuisement et à la défaillance des cellules β et serait le point de départ du diabète de type 2 (Whitticar and Nunemaker, 2020). La galangine, en diminuant l'activité des cellules, pourrait prévenir ou inverser les effets négatifs de la surstimulation des cellules β. En outre, il est à noter que le diazoxide, inhibiteur de la sécrétion d'insuline en maintenant ouvert les K_{ATP}, est un médicament indiqué dans le traitement des hypoglycémies par hyperinsulinisme d'origine tumorale. Par ailleurs, le découplage de la chaîne OXPHOS mitochondriale diminue la production de ROS délétères pour les cellules. De plus, l'effet découplant de la galangine semble se confirmer sur plusieurs tissus. **Figure 56**. Au niveau hépatique par exemple, la baisse d'ATP mitochondriale, due à un effet découplant, pourrait augmenter l'activité de l'AMPK, et ainsi améliorer la sensibilité à l'insuline et inhiber la néoglucogenèse de manière similaire à la metformine (Rena et al., 2017; Vial et al., 2019). Des études ont confirmé les effets bénéfiques de la galangine *in vivo* : l'administration orale de galangine chez des rats hyperglycémiques (STZ) pendant 45 jours permet de ramener les taux d'insuline et de glucose à des niveaux comparables aux rats contrôles (Aloud et al., 2018). Un autre intérêt d'étudier le mécanisme d'action de la galangine concerne la pharmacologie fondamentale : comprendre comment sa structure, pourtant proche de celle du résokaempférol et de la quercétine, induit un effet inverse à ces composés, à savoir une inhibition de la sécrétion d'insuline.

III.3.4 Implication de ERK 1/2 dans le mécanisme d'action du résokaempférol, de la morine et de la galangine

De façon générale, ERK 1 (p44 MAPK) et ERK 2 (p42 MAPK) (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*), protéines de la famille des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) jouent un rôle important dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire. Dans la cellule β pancréatique, il a été montré que ERK 1/2 joue un rôle crucial dans la potentialisation par la quercétine de la sécrétion d'insuline induite par le glucose puisque cette potentialisation est inhibée par l'UO126, inhibiteur MEK (Youl et al., 2010). Par ailleurs, l'élévation du niveau de phosphorylation et donc d'activation de ERK 1/2 semble jouer un rôle majeur dans la préservation de la sécrétion d'insuline en condition de stress oxydant (Youl et al., 2014). Nous avons réalisé des expériences de Western Blot qui ont permis de confirmer que le glucose induit une augmentation de la phosphorylation de ERK 1/2 comme décrit dans la littérature (Youl et al., 2010; Niu et al., 2016) : en exprimant les résultats en pourcentage du glucose 8,3 mmol.L^{-1} (100 %), la phosphorylation de ERK 1/2 n'est que de 50 % en condition basale de glucose (1,4 mmol.L^{-1}). Dans ces expériences, nous observons qu'en condition basale de glucose (1,4 mmol.L^{-1}), le résokaempférol (20 µmol.L^{-1}) tend à augmenter la phosphorylation de ERK 1/2 (145,0 ± 19,4 %), la morine n'a pas d'effet (56,1 ± 11,4 %) et la galangine diminue la phosphorylation de ERK 1/2 (27,9 ± 4,3 %). En condition stimulante de glucose (8,3 mmol.L^{-1}), le résokaempférol augmente la phosphorylation de ERK 1/2 (543,0 ± 102,5 %), la morine n'a pas d'effet (68,7 ± 4,0 %) et la galangine l'inhibe (43,5 ± 6,0 %). **Figure 64**. Ces profils sont similaires à ceux obtenus sur la modulation de la sécrétion d'insuline.

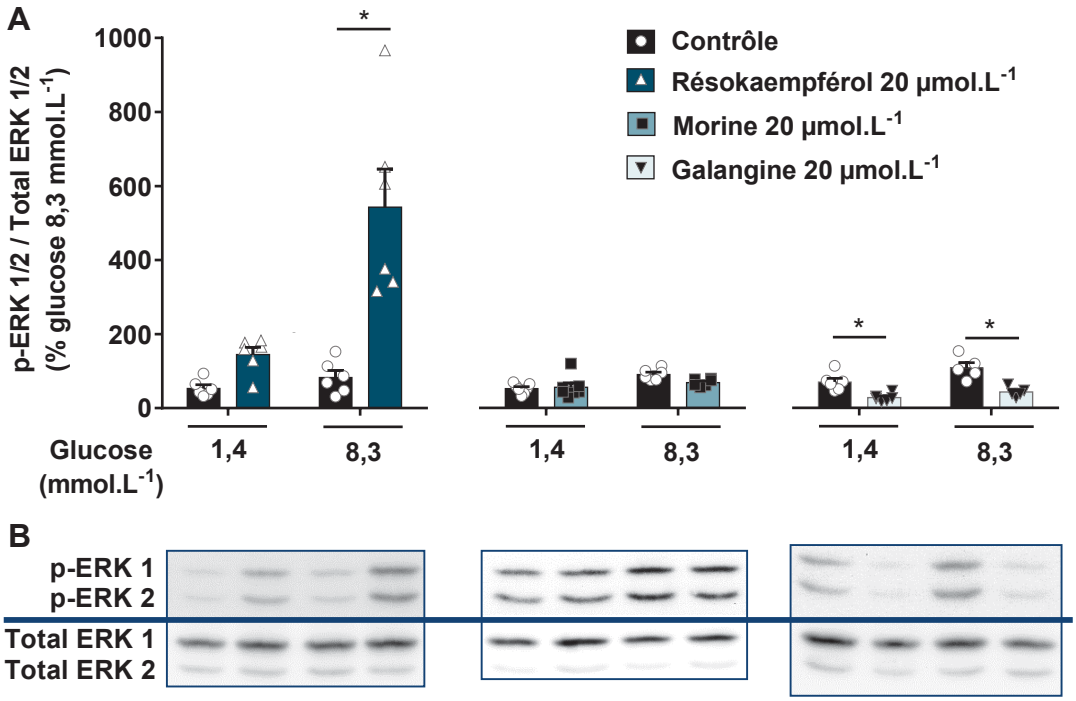


Figure 64 : Effets du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur la phosphorylation de ERK 1/2 dans des cellules INS-1, après 1h de traitement (A) et expérience type de western blot correspondante (B). ANOVA 2, non apparié, n = 5 à 7.

Afin de tester si l'activation de ERK 1/2 est impliquée dans le phénomène de potentialisation du résokaempférol sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose ou s'il s'agit seulement d'une conséquence de l'augmentation de la sécrétion d'insuline, il est possible de bloquer pharmacologiquement cette voie de signalisation avec le PD0325901 (mirdametinib, inhibiteur de MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*), kinase activatrice de ERK 1/2) qui inhibe l'activation de ERK1/2. Il est plus puissant que le U0126, un autre inhibiteur de MEK couramment utilisé. Le PD0325901 a été testé à la concentration de 0,5 µmol.L^{-1}, une concentration décrite comme suffisante pour inhiber la phosphorylation de ERK 1/2, mais ne modulant pas la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Toubal et al., 2020). Nous confirmons la potentialisation par le résokaempférol (272,1 ± 20,4 ng.mL^{-1}) de la sécrétion d'insuline induite par 8,3 mmol.L^{-1} de glucose (106,5 ± 8,9 ng.mL^{-1}). De plus, nos résultats montrent que le PD0325901, qui n'affecte pas la sécrétion d'insuline induite par le glucose (115,3 ± 10,9 ng.mL^{-1}), parvient cependant à inhiber en partie la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le résokaempférol (218,3 ± 9,8 ng.mL^{-1}). **Figure 65**. Le mécanisme

potentialisateur du résokaempférol sur la sécrétion d'insuline semble donc, au moins en partie, lié à l'activation de ERK 1/2 dans les cellules INS-1.

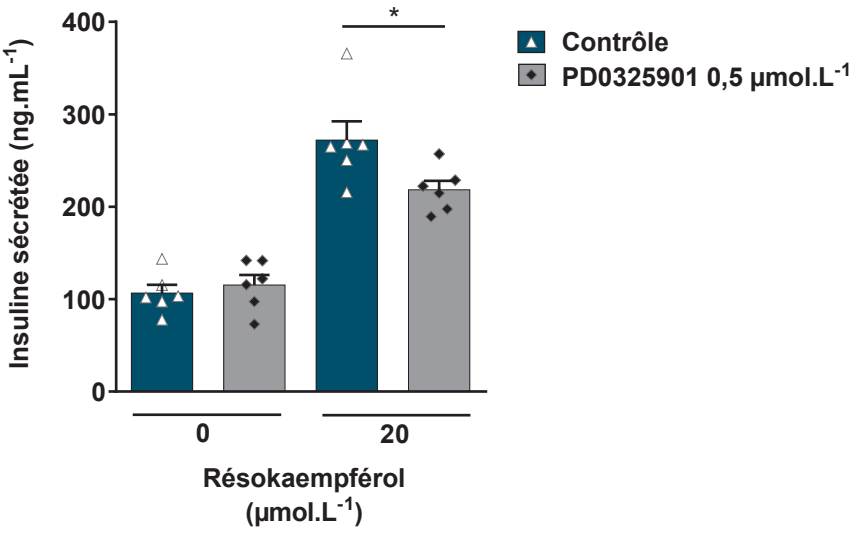


Figure 65 : Effet du PD0325901 sur la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le résokaempférol en présence de glucose 8,3 mmol.L^{-1} dans des cellules INS-1. ANOVA 2, non apparié, n = 5.

Le résokaempférol, la morine et la galangine modulent la phosphorylation de ERK 1/2 de manière similaire à la modulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose confirmant une corrélation entre activation de ERK 1/2 et sécrétion d'insuline (Bowe et al., 2013; Niu et al., 2016). En effet, le résokaempférol amplifie la phosphorylation de ERK 1/2 et potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose. La morine n'a d'effet ni sur la phosphorylation de ERK 1/2, ni sur la sécrétion d'insuline. La galangine inhibe la phosphorylation de ERK 1/2 et inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Cependant, le lien entre l'activation de ERK 1/2 et la sécrétion d'insuline induite par le glucose n'a pas encore été clairement établi. Nos résultats et différentes études sur le sujet ont seulement permis de montrer une diminution de la sécrétion d'insuline en présence d'inhibiteurs de ERK 1/2 sans pouvoir détailler le mécanisme cellulaire sous-jacent (Bowe et al., 2013; Niu et al., 2016, 2017; Toubal et al., 2020). Néanmoins, ERK 1/2 peut être activée par le glucose, ainsi que par d'autres nutriments et hormones qui potentialisent la sécrétion d'insuline. Elle possède également de nombreuses cibles cellulaires, tels que des facteurs de transcription, et notamment ceux impliqués dans la transcription du gène de l'insuline. Ainsi ERK 1/2 permet de faire le lien entre les besoins en insuline et la transcription du gène de l'insuline (Khoo et al., 2003, 2004).

III.4 Protection des cellules INS-1 par le résokaempférol, la morine et la galangine

Les cellules β sont très sensibles au stress oxydant en raison de la faiblesse de leurs systèmes de défense antioxydants. En outre, le stress oxydant prend une part non négligeable dans la physiopathologie du diabète de type 2, notamment en conduisant à une dysfonction des cellules β et à une baisse de la sécrétion d'insuline (Wang and Wang, 2017; Newsholme et al., 2019). Afin d'explorer les effets du stress oxydant sur les cellules β, celui-ci peut être induit de différentes manières *in vitro*. Une méthode consiste à incuber des cellules avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier est capable de produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'induire de nombreuses altérations au niveau cellulaire conduisant à une inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Youl et al., 2010, 2014; Vanitha et al., 2017; Yang and Chan, 2018).

Pour déterminer l'effet du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur des cellules en dysfonction, nous avons incubé les cellules INS-1 avec 60 µmol.L^{-1} de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en présence de différentes concentrations en flavonoïde, en condition stimulante de glucose (8,3 mmol.L^{-1}) pendant 1 h (conditions expérimentales similaires à celles des expériences de sécrétion d'insuline sur des cellules fonctionnelles).

Nous confirmons que le H_2O_2 inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose d'environ 50 % (100 ng.mL^{-1} et 50 ng.mL^{-1} en absence et en présence de H_2O_2, respectivement). En présence de H_2O_2, le résokaempférol est capable de restaurer la fonctionnalité de la cellule β de façon concentration dépendante. A la concentration de 20 µmol.L^{-1}, nous observons comme dans la **Figure 44**, une amplification de la sécrétion d'insuline (156,2 ± 22,8 ng.mL^{-1}). Dans la gamme de concentration testée, la morine protègerait partiellement la fonction cellulaire beta alors que la galangine serait sans effet protecteur et présenterait une tendance inhibitrice à 20 µmol.L^{-1} (30,8 ± 2,2 ng.mL^{-1}). **Figure 66**.

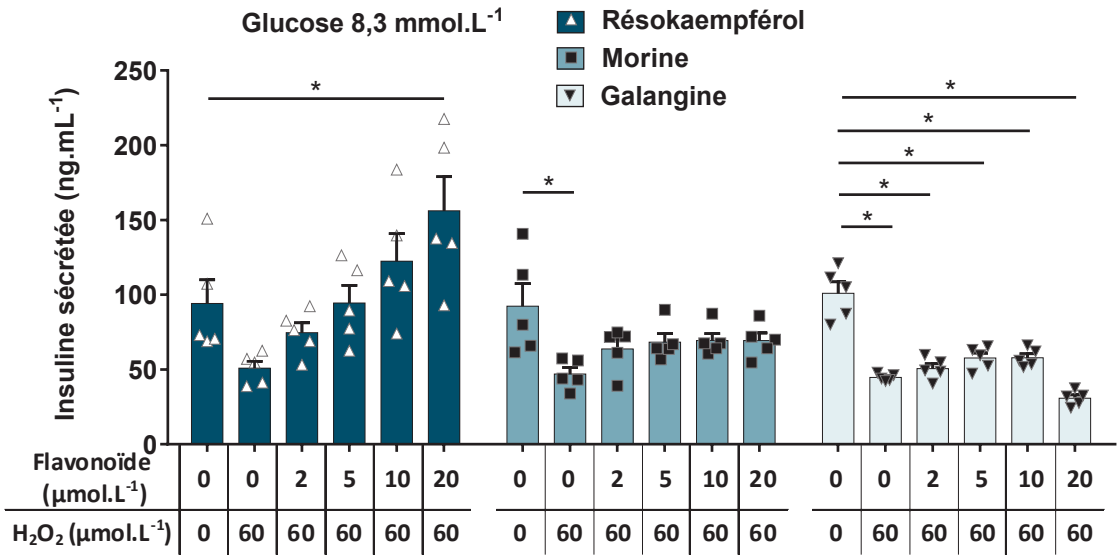


Figure 66 : Concentration-réponse du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur la sécrétion d'insuline en condition de stress oxydant induit par 60 µmol.L^{-1} de H_2O_2 et en présence de 8,3 mmol.L^{-1} de glucose dans des cellules INS-1. ANOVA 1, non apparié, comparaisons avec le 0 µmol.L^{-1} de flavonoïde et de H_2O_2), n = 5.

En condition de dysfonction induite par H_2O_2, les flavonoïdes présentent donc des comportements différents sur la sécrétion d'insuline. Le résokaempférol semble « gommer » l'effet du stress oxydant en amplifiant la sécrétion d'insuline à la concentration de 20 µmol.L^{-1}. Cette amplification est toutefois plus faible qu'en absence d'H_2O_2 (sécrétion d'insuline multipliée par 2 en absence d'H_2O_2 et par 1,5 en présence d'H_2O_2). En présence de morine, quelle que soit la concentration testée, la sécrétion d'insuline n'apparait pas différente du contrôle. La morine protégerait donc partiellement la fonction cellulaire β. Par contre, un tel effet protecteur ne serait pas observé en présence de galangine. Afin d'étudier l'implication potentielle des capacités antioxydantes de ces molécules dans les différents profils de sécrétion observés, nous avons évalué le pouvoir antioxydant de ces flavonoïdes.

En collaboration avec le Pr. Michel Vignes (IBMM, CNRS UMR 5247, Université de Montpellier), nous avons mesuré l'indice ORAC (capacité d'absorption des radicaux oxygénés) des trois flavonoïdes d'intérêt. A titre de comparaison, nous avons également évalué l'indice ORAC de la quercétine dont le comportement pharmacologique sur la sécrétion d'insuline en présence de H_2O_2 est similaire à celui du résokaempférol (Youl et al., 2010).

La quercétine, le résokaempférol, la morine et la galangine présentent un indice ORAC respectivement de 5,2 ± 0,3 ; 5,9 ± 0,3 ; 4,3 ± 0,2 et 1,4 ± 0,1 équivalents de Trolox par µmol.L^{-1} de composé. **Figure 67**.

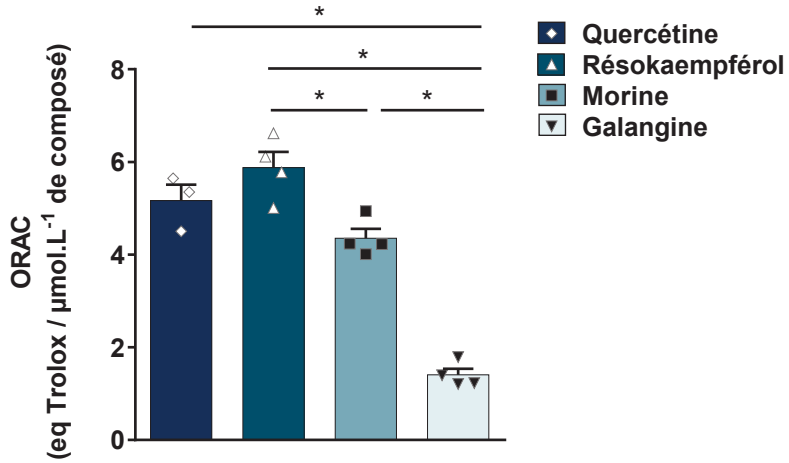


Figure 67 : Indice ORAC de la quercétine, du résokaempférol, de la morine et de la galangine. ANOVA 1, non apparié, comparaisons multiples, n = 3 (quercétine) ou 4 (résokaempférol, morine et galangine).

Hormis la galangine qui présente un indice ORAC significativement plus faible, la quercétine, le résokaempférol et la morine possèdent des indices ORAC équivalents. Ainsi, les profils de sécrétion différents observés en présence de H_2O_2 entre le résokaempférol (ou la quercétine) et la morine ne semblent pas être expliqués sur la seule base du pouvoir antioxydant de ces flavonoïdes. Ils sont certainement à mettre en lien avec la capacité du résokaempférol à avoir une action pharmacologique (activation des canaux calciques voltage dépendants). La morine présente un indice ORAC significativement plus élevé que celui de la galangine, expliquant probablement sa capacité modérée à moduler la dysfonction induite par le H_2O_2. La galangine semble dénuée d'effet protecteur vis-à-vis de la dysfonction cellulaire β. A la concentration de 20 µmol.L^{-1}, l'effet inhibiteur que nous observons serait à mettre en lien avec son action pharmacologique (agent découplant de la chaine OXPHOS).

La voie ERK 1/2 étant impliquée dans les phénomènes de survie et de prolifération cellulaire, nous avons étudié l'effet du résokaempférol sur la phosphorylation de ERK 1/2 en condition de stress oxydant. Pour cela, nous nous sommes placés dans les conditions expérimentales de la sécrétion d'insuline : incubation des cellules INS-1 pendant 1h en présence de 60 µmol.L^{-1} de H_2O_2 et de différentes concentrations de résokaempférol. Nos résultats montrent que le H_2O_2 tend à diminuer la

phosphorylation de ERK 1/2 induite par 8,3 mmol.L^{-1} de glucose (de 100 ± 38,6 à 54,1 ± 5,1 %) même si cet effet n'est pas significatif. Dans ces conditions de stress oxydant, le résokaempférol active ERK1/2 de façon concentration dépendante. A la concentration de 20 µmol.L^{-1}, la phosphorylation de ERK1/2 est fortement amplifiée par le résokaempférol en comparaison au point contrôle (301,0 ± 61,2 %). **Figure 68**. Ce résultat suggère un rôle crucial de ERK1/2 dans le mécanisme d'action de ce flavonoïde, probablement à mettre en lien avec l'amplification de la sécrétion d'insuline que nous observons.

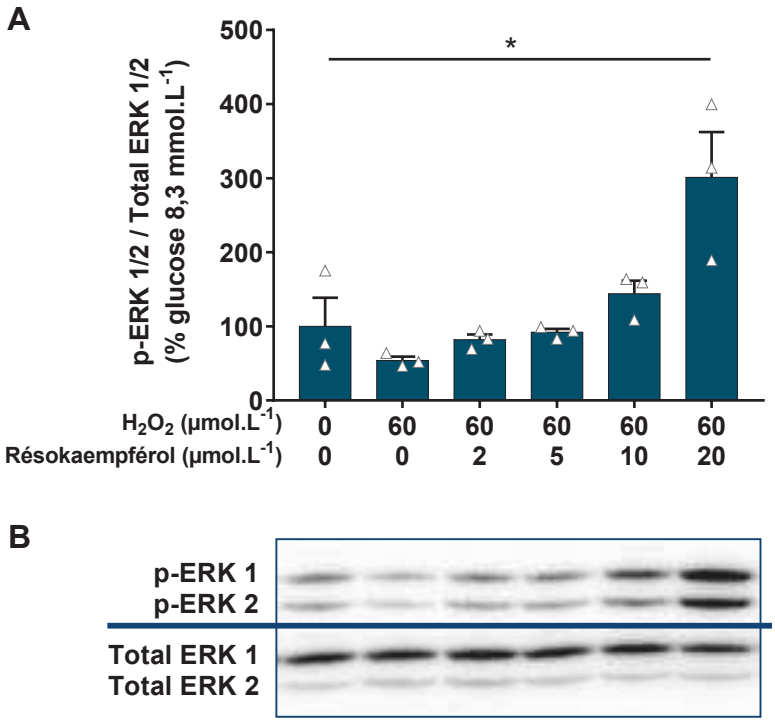
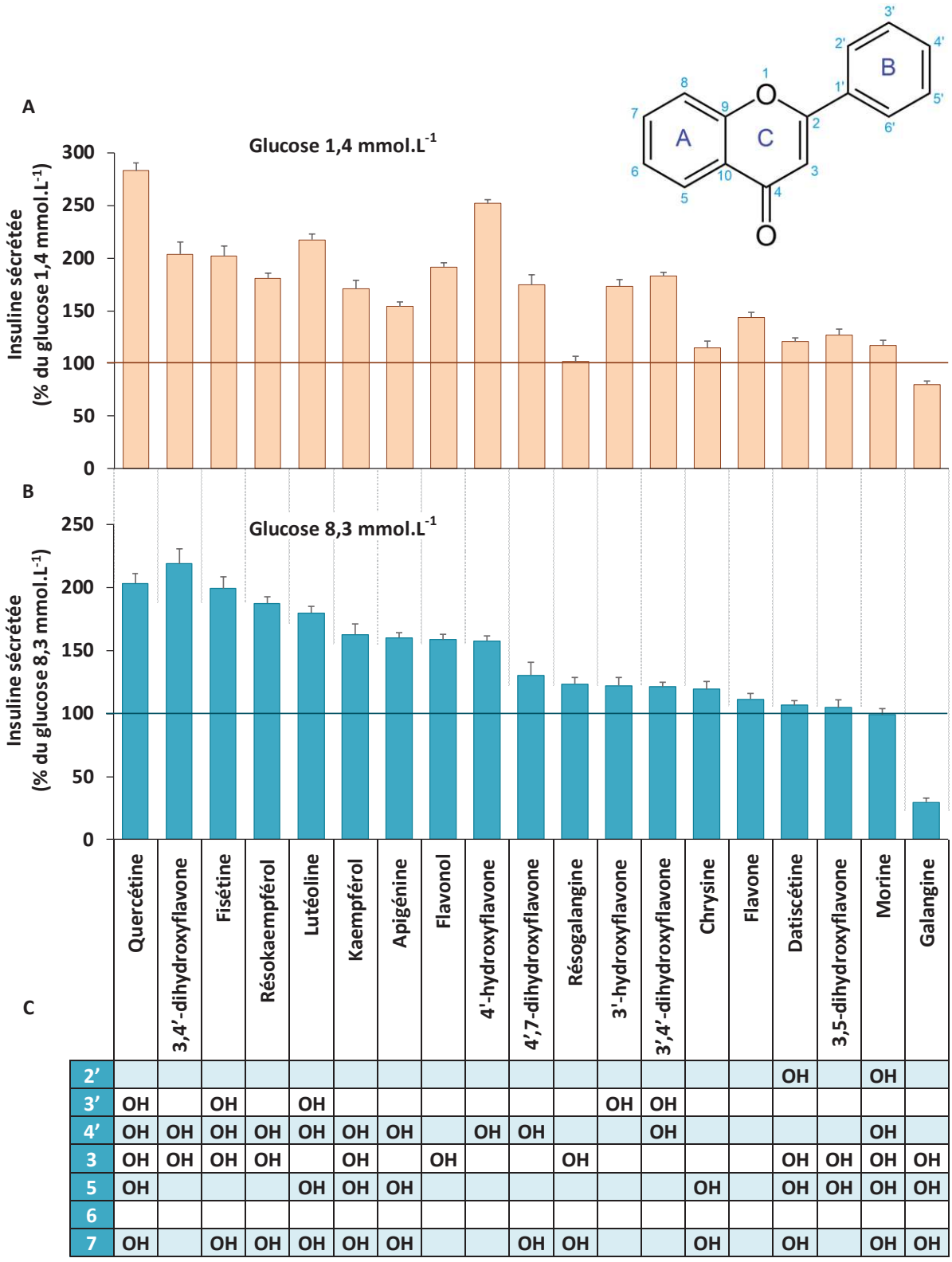


Figure 68 : Concentration-réponse du résokaempférol sur la phosphorylation de ERK 1/2 dans des cellules INS-1 en condition de stress oxydant induit par 60 µmol.L^{-1} de H_2O_2, après 1h de traitement, et en présence de 8,3 mmol.L^{-1} de glucose (A) et expérience type de western blot correspondante (B). ANOVA 1, non apparié, comparaisons avec le 0 µmol.L^{-1} de résokaempférol et de H_2O_2, n = 3.

III.5 Etude de relations structure activité des flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline

Il est largement décrit dans la littérature et nos résultats expérimentaux le confirment (**Figure 44**), que de nombreux flavonoïdes sont capables de moduler la fonctionnalité de la cellule β pancréatique (cf. 3.2 Effets des flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline et la protection des cellules β pancréatiques). La quercétine est un des flavonoïdes les plus étudiés. Elle potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose et protège la viabilité des cellules β contre un stress oxydant (Youl et al., 2010; Bhattacharya et al., 2014; Zhuang et al., 2018). Afin d'étudier plus en détail les déterminants structuraux impliqués dans la modulation de la sécrétion d'insuline, nous avons sélectionné, en partant de la structure de la quercétine, une vingtaine de molécules proches structurellement et disponibles commercialement pour réaliser des expériences de sécrétion d'insuline. Les analogues de la quercétine que nous avons étudiés se distinguent par la position des groupements hydroxyles sur le noyau flavone. **Figure 69C.**

Nous avons testé ces flavonoïdes dans des cellules de la lignée INS-1 à la concentration de 20 µmol.L^{-1}, une concentration souvent retenue dans la littérature, notamment pour décrire les effets de la quercétine. De plus, il s'agit de la plus faible concentration à laquelle le résokaempférol, le kaempférol et la galangine modulent la sécrétion d'insuline dans notre premier screening. **Figure 44**. Nous observons une grande disparité quant à la capacité de ces flavonoïdes à moduler la sécrétion d'insuline. En conditions non stimulantes de glucose (1,4 mmol.L^{-1}), certains présentent un effet propre en stimulant la sécrétion d'insuline (quercétine : 283 ± 21,1 % ; lutéoline : 217,3 ± 17,5 % ; 4'-hydroxyflavone : 252,0 ± 10,5 %…) et d'autres n'ont pas d'effet comme la résogalangine (101,6 ± 10,4 %) ou la morine (117,2 ± 9,7 %). **Figure 69A**. En conditions stimulantes de glucose (8,3 mmol.L^{-1}), la 3,4'-dihydroxyflavone (218,9 ± 11,7 %), la fisétine (199,3 ± 9,5 %) et la quercétine (203,4 ± 7,5 %) par exemple, multiplient par 2 la sécrétion d'insuline induite par le glucose, tandis que la morine (99,1 ± 4,9 %) n'a pas d'effet. Entre l'effet potentialisateur maximal de la 3,4'-dihydroxyflavone et l'absence d'effet de la morine, les flavonoïdes couvrent toutes les réponses intermédiaires possibles. A l'opposé, la galangine (29,4 ± 3,4 %) inhibe fortement, de l'ordre de 70 %, la sécrétion d'insuline induite par le glucose. **Figure 69B**. Ces réponses très variées des flavonoïdes s'observent en dépit de structures extrêmement proches puisqu'elles ne diffèrent entre elles que par le nombre et la position des groupements hydroxyles sur le noyau flavone. **Figure 69C**.



C

	Quercétine	3,4'-dihydroxyflavone	Fisétine	Résokaempférol	Lutéoline	Kaempférol	Apigénine	Flavonol	4'-hydroxyflavone	4',7-dihydroxyflavone	Résogalangine	3'-hydroxyflavone	3',4'-dihydroxyflavone	Chrysine	Flavone	Datiscétine	3,5-dihydroxyflavone	Morine	Galangine
2'																OH		OH	
3'	OH		OH		OH							OH	OH						
4'	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH		OH	OH			OH					OH	
3	OH	OH	OH	OH		OH		OH			OH					OH	OH	OH	OH
5	OH				OH	OH	OH							OH		OH	OH	OH	OH
6																			
7	OH		OH	OH	OH	OH	OH			OH	OH			OH		OH		OH	OH

Figure 69 : Effets des flavonoïdes (20 µmol.L^{-1}) sur la sécrétion d'insuline en condition basale (1,4 mmol.L^{-1} de glucose, A) ou en condition stimulante (8,3 mmol.L^{-1} de glucose, B) dans des cellules INS-1, avec la position des groupements hydroxyles sur les différents cycles (C). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle sans flavonoïde (1,4 mmol.L^{-1} ou 8,3 mmol.L^{-1}), n = 5.

Afin d'analyser ces résultats, nous avons construit la loi de distribution de l'effet sur la stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (avec tous les réplicats obtenus pour chaque flavonoïde en condition stimulante de glucose). Nous avons ensuite « découpé » cette loi de distribution en trois groupes de densité égale qui correspondent à trois intensités d'effet sur la stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose : un « effet important », un « effet modéré », et un « effet faible ou inexistant » (seuils à 121,2 et 162,5 ng.mL^{-1}). Pour chaque flavonoïde, nous avons ensuite testé l'appartenance des réplicats aux groupes « effet important » ou « effet faible ou inexistant » (test exact de Fisher, $p < 0,05$). Les réplicats des groupes traités par la quercétine, la 3,4'-dihydroxyflavone, la fisétine, le résokaempférol et la lutéoline appartiennent significativement au groupe « effet important ». Les réplicats des groupes traités par la flavone, la datiscétine, la 3,5-dihydroxyflavone, la morine et la galangine appartiennent significativement au groupe « effet faible ou inexistant ». Enfin, les réplicats des groupes de traitement n'appartenant significativement à aucun de ces deux groupes ont été attribués au groupe « effet modéré ». Il s'agit des réplicats des groupes traités par le kaempferol, l'apigénine, le flavonol, la 4'-hydroxyflavone, la 4',7-dihydroxyflavone, la résogalangine, la 3'-hydroxyflavone, la 3',4'-dihydroxyflavone et la chrysine, **Figure 70**.

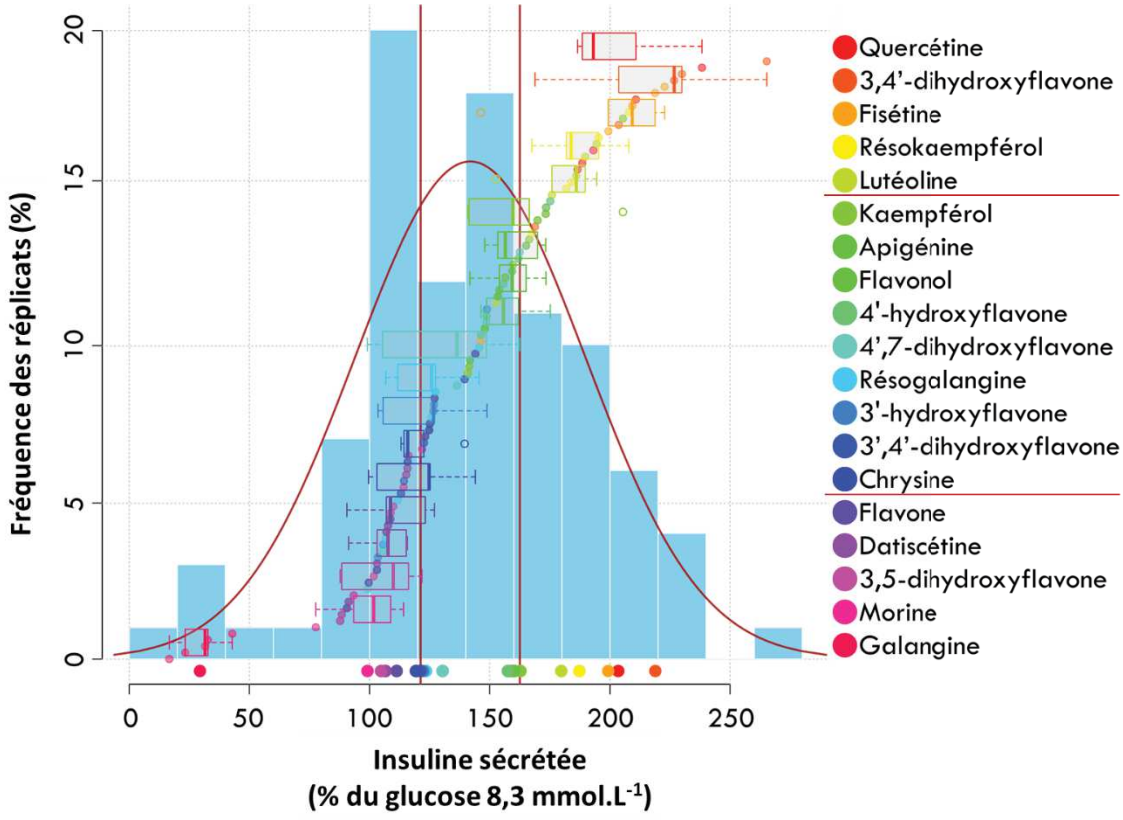


Figure 70 : Histogramme des fréquences des réplicats et loi de densité de l'effet sur la stimulation de la sécrétion d'insuline des réplicats en condition stimulante de glucose (8,3 mmol.L^{-1}).

La quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) et tous les composés possédant des groupements hydroxyles à la fois en position 3 et 4' appartiennent au groupe ayant le maximum d'effet sur la stimulation de la sécrétion d'insuline à l'exception du kaempférol et de la morine. La 3,4'-dihydroxyflavone, uniquement substituée par un groupement hydroxyle en position 3 et 4', appartient à ce groupe, alors que la 3-hydroxyflavone et la 4'-hydroxyflavone, possédant chacune un seul groupement hydroxyle respectivement en position 3 et 4', se montrent moins actives. La double substitution par des groupements hydroxyles en position 3 et 4' semble donc être un minimum requis pour conférer au flavonoïde une activité stimulante maximale. Toutefois, l'absence de groupement hydroxyle en position 3 de la lutéoline (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) pourtant capable d'amplifier la sécrétion d'insuline, ne permet pas d'affirmer complètement que cette combinaison d'hydroxylation (3 et 4') a une valeur prédictive sur la sécrétion d'insuline. De plus, la morine (2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone), bien que présentant les substitutions hydroxyles en 3 et 4', n'a pas d'effet sur la sécrétion d'insuline dans notre modèle. Elle se différencie du kaempférol (3,4',5,7-tétrahydroxyflavone), potentialisateur de la sécrétion d'insuline, par la présence d'un groupement hydroxyle en position 2'. La présence de ce groupement semble donc être délétère vis-à-vis de l'activité agoniste des flavonoïdes. Pour corroborer cette hypothèse, il serait opportun de tester l'activité d'autres molécules substituées en position 2' comme la 2'-hydroxyquercétine, la 2',3,4'-trihydroxyflavone, la 2'-hydroxyfisétine ou encore le 2'-hydroxyrésokaempférol, qui ne sont malheureusement pas disponibles commercialement. Néanmoins, la datiscétine (2',3,5,7-tetrahydroxyflavone) et la galangine (3,5,7-trihydroxyflavone) se distinguent également par une hydroxylation en position 2' sur la datiscétine. La galangine inhibe fortement la sécrétion d'insuline induite par le glucose alors que la datiscétine possède un comportement similaire à la morine, à savoir une absence d'effet. L'hydroxylation en position 2' apparait donc délétère sur toute activité pharmacologique du flavonoïde, que celui-ci se révèle agoniste ou antagoniste. Ce groupement hydroxyle pourrait créer un encombrement stérique, empêchant le flavonoïde d'interagir avec sa cible. Cependant, les substitutions peuvent également influencer l'angle dièdre entre le plan formé par les cycles A et C et le plan formé par le cycle B des flavonoïdes. Alors que les flavonols ont une structure généralement presque plane, une interaction de type liaison hydrogène entre les groupements hydroxyles des positions 3 et 2' imposent un angle dièdre plus élevé (35,7° pour la morine, contre -3,5° pour le kaempférol). La mésomérie et le degré de délocalisation des électrons sur la structure sont alors impactés. Ces impacts structuraux (planéité et mésomérie) pourraient être à l'origine de la perte d'effet pharmacologique des molécules possédant une substitution hydroxyle en position 2' (Todorova et al., 2013; Spiegel et al., 2020).

Il faut toutefois souligner que ces résultats ont été obtenus en testant chaque flavonoïde à une concentration de 20 µmol.L^{-1}. Pour une meilleure interprétation des effets de ces molécules, la détermination de leur EC_{50} et de leur Emax apparait nécessaire. En effet, les résultats de notre premier screening montrent que le résokaempférol à 20 et 50 µmol.L^{-1} potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose, mais qu'il n'a plus d'effet à 100 µmol.L^{-1}, et que le kaempférol stimule la sécrétion d'insuline à 20 et 50 µmol.L^{-1}, mais qu'il possède un effet inhibiteur à 100 µmol.L^{-1}. **Figure 44**. Ce profil « en cloche » rappelle celui de la quercétine qui n'a pas d'effet sur la sécrétion induite par le glucose à 2 µmol.L^{-1}, la potentialise à 20 µmol.L^{-1} et l'inhibe à 200 µmol.L^{-1} (Youl et al., 2010). Ces effets délétères observés à des concentrations élevées pourraient être expliqués par une toxicité des flavonoïdes lorsqu'ils sont testés à forte concentration. En effet, plusieurs études décrivent des effets pro-apoptotiques de la quercétine à des concentrations de l'ordre de 100 µmol.L^{-1} dans des cellules tumorales, et notamment dans un contexte de cancer du pancréas (Rauf et al., 2018).

Par ailleurs, il reste aussi à étudier le mécanisme d'action par lesquels ces différents flavonoïdes potentialisent ou inhibent la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Autrement dit, est-ce que toutes ces molécules ont le même mécanisme d'action et agissent sur la même cible que la quercétine, à savoir les canaux calciques voltage dépendants ? Et quel est l'impact de chaque groupement hydroxyle sur la capacité du flavonoïde à moduler cette ou ces cible(s) pharmacologique(s) ? Saponara et ses collaborateurs (2011) ont étudié la capacité de plusieurs flavonoïdes à moduler les courants calciques de type L des $Ca_V1.2$ sur un modèle de cellules musculaires lisses vasculaires. Ils ont constaté que certains flavonoïdes sont capables d'amplifier les courants calciques (quercétine, lutéoline, apigénine…), tandis que d'autres n'ont pas d'effet ou sont inhibiteurs de ces courants (résokaempférol, chrysine, galangine…). Malgré de grandes différences dans les concentrations testées pour certains composés entre les expérimentations, nous observons une discordance entre ces résultats sur les $Ca_V1.2$ et nos résultats sur la sécrétion d'insuline. **Tableau 10**. Bien que les $Ca_V1.2$ soient particulièrement impliqués dans les mécanismes de sécrétion d'insuline (Rorsman and Ashcroft, 2018), le 3,4'-dihydroxyflavone multiplie par 2 la sécrétion d'insuline induite par le glucose, tandis que cette même molécule inhibe de 30 % les courants calciques dans le modèle de Saponara pour des concentrations équivalentes (20 et 30 µmol.L^{-1}, respectivement). De même, le résokaempférol multiplie par 2 la sécrétion d'insuline dans notre modèle à 20 µmol.L^{-1}, et inhibe les courants calciques dès 10 µmol.L^{-1} dans l'étude de Saponara, avec presque 50 % d'inhibition à 30 µmol.L^{-1}. La morine, quant à elle, n'a pas montré d'effet sur la sécrétion d'insuline de 2 à 100 µmol.L^{-1} lors de notre premier screening, mais inhibe de moitié les courants calciques à 100 µmol.L^{-1}. Ces différences peuvent s'expliquer par une différence entre les modèles utilisés : des cellules de muscles

lisses isolées d'artères de rats dans l'étude de Saponara et des cellules β pancréatiques dans notre cas. Ainsi, l'environnement membranaire différent du canal et les protéines régulatrices (β et $\alpha_2\delta$) spécifiques pourraient expliquer ces réponses différentes. Par ailleurs, il faut comparer avec prudence des résultats obtenus par la mesure directe de courants calciques par patch clamp (travaux de Saponara *et al.*) à ceux que nous obtenons correspondant à un effet cellulaire global : la sécrétion d'insuline. Saponara et ses collaborateurs (2011) ont réalisé une mesure directe sur une cible pharmacologique distincte. La sécrétion d'insuline est un mécanisme cellulaire complexe et reflète la somme des potentiels effets des flavonoïdes sur plusieurs cibles pharmacologiques.

Tableau 10 : Effets de différents flavonoïdes sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose (8,3 mmol.L^{-1}) dans des cellules INS-1 et sur les courants calciques dans des cellules vasculaires (d'après Saponara et al., 2011).

Substituant							Flavonoïde	Sécrétion d'insuline à 20 µM (%)	Courants Ca^{2+} (Saponara *et Al.*)	
2'	3'	4'	3	5	6	7			E_{max} (%)	(µM)
	OH	OH	OH	OH		OH	Quercétine	203,4	285,0	30
		OH	OH				3,4'-dihydroxyflavone	218,9	68,8	30
	OH	OH	OH			OH	Fisétine	199,3	ND	-
		OH	OH			OH	Résokaempférol	187,3	42,4	100
	OH	OH		OH		OH	Lutéoline	179,8	183,2	30
		OH	OH	OH		OH	Kaempférol	162,8	164,6	30
		OH		OH		OH	Apigénine	160,2	181,9	30
			OH				Flavonol	158,7	ND	-
		OH					4'-hydroxyflavone	157,6	ND	-
		OH				OH	4',7-dihydroxyflavone	130,4	ND	-
			OH			OH	Résogalangine	123,5	ND	-
	OH						3'-hydroxyflavone	122,3	ND	-
	OH	OH					3',4'-dihydroxyflavone	121,1	ND	-
				OH		OH	Chrysine	119,3	18,4	100
							Flavone	111,3	ND	-
OH			OH	OH		OH	Datiscétine	106,6	ND	-
			OH	OH			3,5-dihydroxyflavone	104,8	ND	-
OH		OH	OH	OH		OH	Morine	99,1	53,6	100
			OH	OH		OH	Galangine	29,4	9,4	100

Conclusion générale

Dans la première partie bibliographique, nous avons vu que le diabète est une pathologie qui engendre un coût humain, économique et social important. La gravité de cette maladie chronique réside dans ses complications, et nécessite de ce fait le meilleur maintien possible de la glycémie. Les traitements actuellement disponibles n'ont pas de visée curative et présentent des effets indésirables ou des conditions d'utilisation pouvant mettre en péril l'observance des patients. L'insuline, synthétisée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, est la seule hormone hypoglycémiante. La dysfonction des cellules β pancréatiques est une étape clé dans la physiopathologie du diabète de type 2. En effet, les mécanismes de sécrétion d'insuline par ces cellules mettent en jeu des processus complexes qui font intervenir de nombreuses voies métaboliques comme la phosphorylation oxydative mitochondriale ou l'entrée de calcium dans les cellules. Les flavonoïdes, molécules naturelles du règne végétal, sont largement connus pour leur rôle bénéfique dans la prévention et l'amélioration de nombreuses pathologies chroniques. Ils sont notamment capables d'agir sur les cellules β pancréatiques et d'en modifier leurs fonctionnalités. Ainsi, cette famille de polyphénols pourrait se montrer utile dans le traitement du diabète de type 2.

La quercétine est un flavonoïde largement étudié pour ses effets santé. Elle est décrite pour potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose et protéger la cellule β pancréatique du stress oxydant. A partir de structures chimiques proches de la quercétine, l'objectif de ce travail de thèse a été de caractériser des molécules plus puissantes et plus efficaces mais aussi et surtout, de mettre en évidence des molécules présentant un effet gluco-dépendant. Le mécanisme d'action des molécules d'intérêt a été étudié au niveau de la cellule β pancréatique.

Une étude des relations structure-activité à partir du squelette de la quercétine a mis en évidence une large gamme de réponses entre les divers flavonoïdes testés. En effet, certains sont capables de potentialiser la sécrétion d'insuline induite par 8,3 $mmol.L^{-1}$ de glucose (3,4'-dihydroxyflavone, fisétine, résokaempférol,…) alors que d'autres n'ont pas d'effet (3,5-dihydroxyflavone, morine…). Un seul composé inhibe fortement la sécrétion d'insuline : la galangine. Le nombre et la position des groupements hydroxyles présents sur la structure des flavonoïdes semblent donc jouer un rôle déterminant vis-à-vis de leur capacité à moduler la sécrétion d'insuline. En effet, même si de nombreux flavonoïdes ont démontré leurs actions bénéfiques sur la fonctionnalité de la cellule β, et notamment la sécrétion d'insuline, il apparait à la lumière de ces résultats, que tous n'en sont pas capables. De petites modifications telles que le changement de position d'un groupement hydroxyle sont capables de modifier considérablement le comportement pharmacologique du flavonoïde vis-à-vis de la sécrétion d'insuline par la cellule β. Ainsi, une double

substitution en position 3 et 4' par un groupement hydroxyle semble être le minimum requis pour conférer au flavonoïde la meilleure activité sur la stimulation de la sécrétion d'insuline, tout en conservant un effet propre minimal. Il serait donc judicieux d'étudier plus en détail la 3,4'-dihydroxyflavone, et notamment de déterminer ses paramètres pharmacologiques (E_{max} et CE_{50}), d'explorer son mécanisme d'action et de confirmer son effet *in vivo*.

Par ailleurs, cette étude des relations structure-activité a mis en évidence les positions des groupements hydroxyles importantes et pose les bases d'une éventuelle modulation chimique du flavonoïde dans le but d'optimiser ses paramètres pharmacocinétiques. En effet, la greffe d'une chaine lipidique ou d'un groupement alkyle peut influencer la biodisponibilité et l'élimination de la molécule. Notre étude a permis de déterminer les groupements hydroxyles à sauvegarder pour conserver une activité maximale sur la sécrétion d'insuline.

Le résokaempférol est un flavonoïde qui n'a pas, à ce jour, été décrit pour moduler la sécrétion d'insuline. Or nos résultats indiquent qu'il est aussi efficace que la quercétine pour potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose avec l'avantage de ne pas présenter d'effet-propre. Ces caractéristiques pourraient placer cette molécule comme un candidat potentiel pour le développement de nouvelles thérapies dans le diabète de type 2. Son mécanisme d'action semble impliquer l'activation des canaux calciques voltages dépendant de type L. Il apparait alors intéressant d'étudier plus en détail ce mécanisme d'action en évaluant par exemple la modulation du calcium intracellulaire. La morine n'a pas d'effet sur la sécrétion d'insuline. Nos résultats démontrent qu'elle n'agit sur aucune des deux cibles particulièrement étudiées dans cette thèse, à savoir les canaux calciques voltage dépendant de type L et la phosphorylation oxydative mitochondriale. La galangine est le seul flavonoïde inhibiteur de notre screening. Son comportement pharmacologique se rapproche de celui d'un agent découplant de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Elle est capable de diminuer la synthèse d'ATP mitochondriale mais n'affecte pas la quantité d'ATP totale dans la lignée de cellules β INS-1. Une mesure du ratio ATP/ADP apparait complémentaire à nos études afin de confirmer que son mécanisme d'action découplant est à l'origine d'une altération de la sécrétion d'insuline. **Figure 71**.

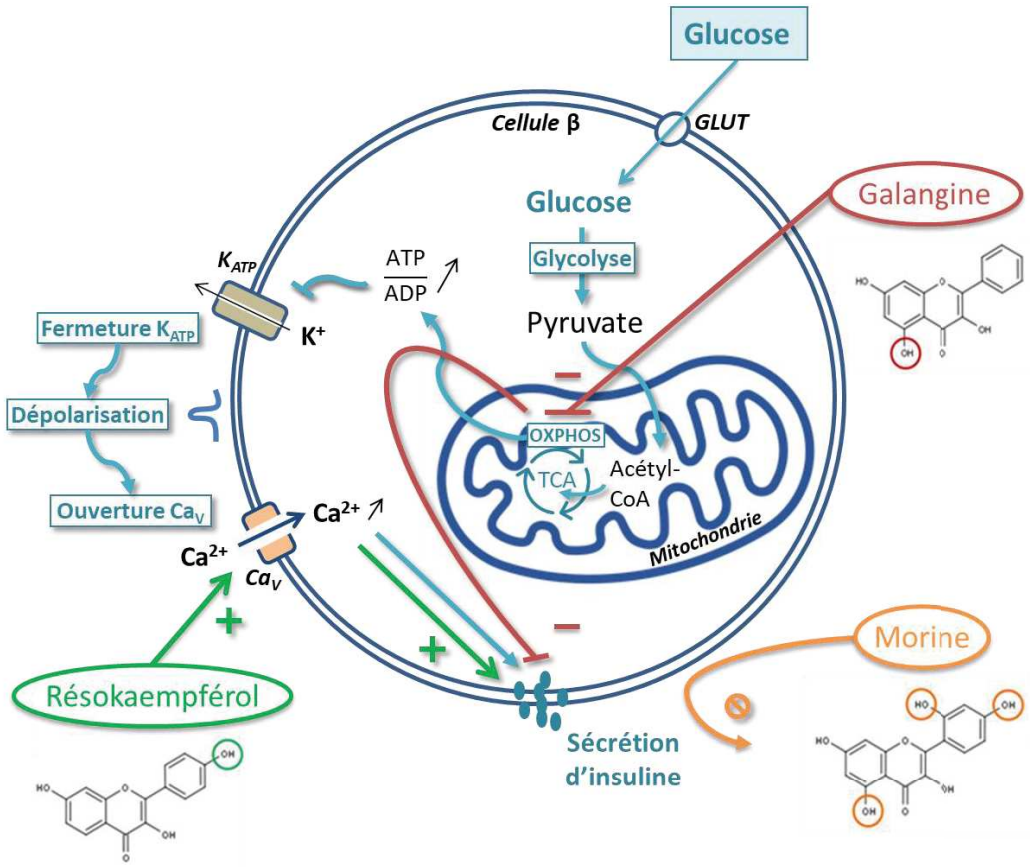


Figure 71 : Mécanismes d'action potentiels et simplifiés du résokaempférol, de la morine et de la galangine sur la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques. GLUT, transporteur du glucose ; TCA, cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de Krebs ; OXPHOS, chaîne de phosphorylation oxydative ; K_{ATP}, canal potassique ATP dépendant ; Ca_V, canal calcique voltage dépendant.

D'autre part, le résokaempférol est capable de protéger les cellules β pancréatiques du stress oxydant en lien avec une augmentation de la phosphorylation de ERK 1/2. Il serait opportun d'étudier le comportement de ce flavonoïde sur des cellules en dysfonction induite par une gluco- et/ou lipotoxicité, ainsi que par un environnement pro-inflammatoire (cocktail de cytokines), composantes majeures de la physiopathologie du diabète de type 2 avec le stress oxydant.

Cette étude a été majoritairement réalisée *in vitro* sur une lignée cellulaire. Il apparait alors important de confirmer les résultats obtenus dans des modèles plus intégrés comme le pancréas isolé et perfusé et d'évaluer le comportement des flavonoïdes dans des modèles *in vivo*. En effet, alors que nos résultats dans les cellules INS-1 montrent une inhibition de la sécrétion d'insuline par la galangine, des études *in vivo* ont mis en évidence des effets bénéfiques de ce composé sur l'amélioration de la

glycémie chez des rats hyperglycémiques (Aloud et al., 2018). Ces résultats contradictoires au premier abord pourraient s'expliquer par un effet compensateur qu'il serait intéressant d'identifier. En parallèle, une étape vers la transposition de ces résultats chez l'Homme serait d'évaluer les effets de ces molécules dans des îlots de Langherans humains.

Ce travail de thèse ouvre donc de nombreuses perspectives sur l'intérêt des flavonoïdes dans la prise en charge du diabète de type 2. Nous avons vu que certaines molécules (3,4'-dihydroxyflavone, fisétine, résokaempférol…) potentialisent la sécrétion d'insuline induite par le glucose et possèdent peu ou pas d'effets propres, caractéristique déterminante des médicaments antidiabétiques. De plus, le résokaempférol potentialise également la sécrétion d'insuline induite par le glibenclamide, un sulfamide hypoglycémiant actuellement commercialisé. Il est alors possible d'envisager l'utilisation des flavonoïdes en association avec d'autres antidiabétiques déjà présents sur le marché afin de réduire les doses administrées et ainsi minimiser leurs effets indésirables.

Bibliographie

Al-awar, A., Kupai, K., Veszelka, M., Szűcs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., et al. (2016). Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models (Hindawi).

Alejandro, E.U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Méneur, C., and Bernal-Mizrachi, E. (2015). Natural history of β-cell adaptation and failure in type 2 diabetes. Mol. Aspects Med. *42*: 19–41.

Alexander, S.P.H., Mathie, A., Peters, J.A., Veale, E.L., Striessnig, J., Kelly, E., et al. (2019). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: Ion channels. Br. J. Pharmacol. *176*: S142–S228.

Aloud, A.A., Chinnadurai, V., Govindasamy, C., Alsaif, M.A., and Al-Numair, K.S. (2018). Galangin, a dietary flavonoid, ameliorates hyperglycaemia and lipid abnormalities in rats with streptozotocin-induced hyperglycaemia. Pharm. Biol. *56*: 302–308.

Andersson, S.A., Olsson, A.H., Esguerra, J.L.S., Heimann, E., Ladenvall, C., Edlund, A., et al. (2012). Reduced insulin secretion correlates with decreased expression of exocytotic genes in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. Mol. Cell. Endocrinol. *364*: 36–45.

Arntfield, M.E., and Kooy, D. van der (2011). β-Cell evolution: How the pancreas borrowed from the brain. BioEssays *33*: 582–587.

Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P.A., and Wollheim, C.B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. Endocrinology *130*: 167–178.

Assurance Maladie (2019). Surveillance du diabète : les fondamentaux.

Assurance Maladie Fiches par pathologie.

Azua, I.R. de, Gautam, D., Guettier, J.-M., and Wess, J. (2011). Novel insights into the function of β-cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications. Trends Endocrinol. Metab. *22*: 74–80.

Bailey, C.J., and Day, C. (2018). Treatment of type 2 diabetes: future approaches. Br. Med. Bull. *126*: 123–137.

Bardy, G., Virsolvy, A., Quignard, J.F., Ravier, M.A., Bertrand, G., Dalle, S., et al. (2013). Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells. Br. J. Pharmacol. *169*: 1102–1113.

Bauduceau, B., Bordier, L., Bringer, J., Chabrier, G., Charbonnel, B., Cosson, E., et al. (2019). Prise de position de la Société Francophone du Diabète (SFD) : évaluation du rapport bénéfices-risques des inhibiteurs de SGLT2. Médecine Mal. Métaboliques *13*: 195–209.

Bayle, M., Neasta, J., Dall'Asta, M., Gautheron, G., Virsolvy, A., Quignard, J.-F., et al. (2019). The Ellagitannin Metabolite Urolithin C is a Glucose-Dependent Regulator of Insulin Secretion through L-type Calcium Channel Activation. Br. J. Pharmacol. *0*:

Beckman, C.H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? Physiol. Mol. Plant Pathol. *57*: 101–110.

Bensellam, M., Laybutt, D.R., and Jonas, J.-C. (2012). The molecular mechanisms of pancreatic β-cell glucotoxicity: Recent findings and future research directions. Mol. Cell. Endocrinol. *364*: 1–27.

Bermont, F., Hermant, A., Benninga, R., Chabert, C., Jacot, G., Santo-Domingo, J., et al. (2020). Targeting Mitochondrial Calcium Uptake with the Natural Flavonol Kaempferol, to Promote Metabolism/Secretion Coupling in Pancreatic β-cells. Nutrients *12*: 538.

Bhagavathula, A.S., Vidyasagar, K., and Tesfaye, W. (2021). Efficacy and Safety of Tirzepatide in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Phase II/III Trials. Pharmaceuticals *14*: 991.

Bhattacharya, S., Oksbjerg, N., Young, J.F., and Jeppesen, P.B. (2014). Caffeic acid, naringenin and quercetin enhance glucose-stimulated insulin secretion and glucose sensitivity in INS-1E cells. Diabetes Obes. Metab. *16*: 602–612.

Bianchi, V., and Anbassi, S.E. (2012). Médicaments (De Boeck Superieur).

Böni-Schnetzler, M., and Meier, D.T. (2019). Islet inflammation in type 2 diabetes. Semin. Immunopathol.

Bowe, J.E., Chander, A., Liu, B., Persaud, S.J., and Jones, P.M. (2013). The permissive effects of glucose on receptor-operated potentiation of insulin secretion from mouse islets: a role for ERK1/2 activation and cytoskeletal remodelling. Diabetologia *56*: 783–791.

Briant, L.J.B., Reinbothe, T.M., Spiliotis, I., Miranda, C., Rodriguez, B., and Rorsman, P. (2018). δ-cells and β-cells are electrically coupled and regulate α-cell activity via somatostatin. J. Physiol. *596*: 197–215.

Bril, V., Breiner, A., Perkins, B.A., and Zochodne, D. (2018). Neuropathy. Can. J. Diabetes *42*: S217–S221.

Burgos-Morón, E., Abad-Jiménez, Z., Martínez de Marañón, A., Iannantuoni, F., Escribano-López, I., López-Domènech, S., et al. (2019). Relationship between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. J. Clin. Med. *8*: 1385.

Busiello, R.A., Savarese, S., and Lombardi, A. (2015). Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. Front. Physiol. *6*: 36.

Campbell, J.E., and Drucker, D.J. (2013). Pharmacology, Physiology, and Mechanisms of Incretin Hormone Action. Cell Metab. *17*: 819–837.

Caselli, A., Cirri, P., Santi, A., and Paoli, P. (2016). Morin: A Promising Natural Drug.

Catterall, W.A., Lenaeus, M.J., and Gamal El-Din, T.M. (2020). Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *60*: 133–154.

CeeD Centre européen d'étude du Diabète.

Chandrasekera, P.C., and Pippin, J.J. (2014). Of rodents and men: Species-specific glucose regulation and type 2 diabetes research. ALTEX - Altern. Anim. Exp. *31*: 157–176.

Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K., and Kamper, E. (2009). The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. In Vivo *23*: 245–258.

Chikara, G., Sharma, P.K., Dwivedi, P., Charan, J., Ambwani, S., and Singh, S. (2018). A Narrative Review of Potential Future Antidiabetic Drugs: Should We Expect More? Indian J. Clin. Biochem. IJCB *33*: 121–131.

Chiva-Blanch, G., and Badimon, L. (2017). Effects of Polyphenol Intake on Metabolic Syndrome: Current Evidences from Human Trials. Oxid. Med. Cell. Longev. *2017*:.

CNPM Pharmacomédicale.org.

Coskun, T., Sloop, K.W., Loghin, C., Alsina-Fernandez, J., Urva, S., Bokvist, K.B., et al. (2018). LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes mellitus: From discovery to clinical proof of concept. Mol. Metab. *18*: 3–14.

Crozier, A., Clifford, M.N., and Ashihara, H. (2008). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet (John Wiley & Sons).

Da Silva Xavier, G. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. J. Clin. Med. *7*: 54.

Da Silva Xavier, G., and Rutter, G.A. (2020). Metabolic and Functional Heterogeneity in Pancreatic β Cells. J. Mol. Biol. *432*: 1395–1406.

Dai, X., Ding, Y., Zhang, Z., Cai, X., and Li, Y. (2013). Quercetin and quercitrin protect against cytokine-induced injuries in RINm5F β-cells via the mitochondrial pathway and NF-κB signaling. Int. J. Mol. Med. *31*: 265–271.

Dall'Asta, M., Bayle, M., Neasta, J., Scazzina, F., Bruni, R., Cros, G., et al. (2015). Protection of pancreatic β-cell function by dietary polyphenols. Phytochem. Rev. *14*: 933–959.

D'Antona, G. (2015). Amino Acids Supplementation as Nutritional Therapy Strategy in Diabetes Mellitus. In Glucose Intake and Utilization in Pre-Diabetes and Diabetes, R.R. Watson, and B.B. Dokken, eds. (Boston: Academic Press), pp 387–401.

Darmon, P. (2014). À la hausse ou à la baisse HbA1c : attention aux pièges. Quotid. Médecin 11.

Darmon, P., Bauduceau, B., Bordier, L., Charbonnel, B., Cosson, E., Detournay, B., et al. (2019). Prise de position de la Société Francophone du Diabète (SFD) sur la prise en charge médicamenteuse de l'hyperglycémie du patient diabétique de type 2-2019. Médecine Mal. Métaboliques *13*: 711–732.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., and Crozier, A. (2012). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. Antioxid. Redox Signal. *18*: 1818–1892.

Detimary, P., Jonas, J.C., and Henquin, J.C. (1996). Stable and diffusible pools of nucleotides in pancreatic islet cells. Endocrinology *137*: 4671–4676.

Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., and Raptis, S.A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. Diabetes Res. Clin. Pract. *93*: S52–S59.

Ding, Y., Zhang, Z.-F., Dai, X.-Q., and Li, Y. (2012). Myricetin Protects Against Cytokine-Induced Cell Death in RIN-m5f β Cells. J. Med. Food *15*: 733–740.

Dorta, D.J., Pigoso, A.A., Mingatto, F.E., Rodrigues, T., Pestana, C.R., Uyemura, S.A., et al. (2008). Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. Phytother. Res. *22*: 1213–1218.

Dorta, D.J., Pigoso, A.A., Mingatto, F.E., Rodrigues, T., Prado, I.M.R., Helena, A.F.C., et al. (2005). The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. Chem. Biol. Interact. *152*: 67–78.

Dubourg, J., Fouqueray, P., Thang, C., Grouin, J.-M., and Ueki, K. (2021). Efficacy and Safety of Imeglimin Monotherapy Versus Placebo in Japanese Patients With Type 2 Diabetes (TIMES 1): A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Parallel-Group, Multicenter Phase 3 Trial. Diabetes Care *44*: 952–959.

Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E.B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A.A., et al. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. Phytother. Res. *0*:

Encyclopedia Britannica (2010). Pancreas | anatomy.

Erion, K., and Corkey, B.E. (2018). β-Cell Failure or β-Cell Abuse? Front. Endocrinol. *9*:.

Fang, J.-Y., Lin, C.-H., Huang, T.-H., and Chuang, S.-Y. (2019). In Vivo Rodent Models of Type 2 Diabetes and Their Usefulness for Evaluating Flavonoid Bioactivity. Nutrients *11*:.

Feldman, E.L., Callaghan, B.C., Pop-Busui, R., Zochodne, D.W., Wright, D.E., Bennett, D.L., et al. (2019). Diabetic neuropathy. Nat. Rev. Dis. Primer *5*: 1–18.

FFD Fédération Française des Diabétiques, https://www.federationdesdiabetiques.org.

FID (2019). Atlas du diabète, 9ème édition, Fédération Internationale du Diabète.

Folli, F., Rosa, S.L., Finzi, G., Davalli, A.M., Galli, A., Dick, E.J., et al. (2018). Pancreatic islet of Langerhans' cytoarchitecture and ultrastructure in normal glucose tolerance and in type 2 diabetes mellitus. Diabetes Obes. Metab. *20*: 137–144.

French, E.K., Donihi, A.C., and Korytkowski, M.T. (2019). Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic syndrome: review of acute decompensated diabetes in adult patients. BMJ *365*:.

Furman, B., Ong, W.K., and Pyne, N.J. (2010). Cyclic AMP signaling in pancreatic islets. Adv. Exp. Med. Biol. *654*: 281–304.

Fusi, F., Spiga, O., Trezza, A., Sgaragli, G., and Saponara, S. (2017). The surge of flavonoids as novel, fine regulators of cardiovascular Cav channels. Eur. J. Pharmacol. *796*: 158–174.

Gheni, G., Ogura, M., Iwasaki, M., Yokoi, N., Minami, K., Nakayama, Y., et al. (2014). Glutamate Acts as a Key Signal Linking Glucose Metabolism to Incretin/cAMP Action to Amplify Insulin Secretion. Cell Rep. *9*: 661–673.

Ghorbani, A., Rashidi, R., and Shafiee-Nick, R. (2019). Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function: A mechanistic review. Biomed. Pharmacother. *111*: 947–957.

Green, A.D., Vasu, S., and Flatt, P.R. (2018). Cellular models for beta-cell function and diabetes gene therapy. Acta Physiol. *222*: e13012.

Grennan, D. (2019). Diabetic Foot Ulcers. JAMA *321*: 114–114.

Güemes, A., and Georgiou, P. (2018). Review of the role of the nervous system in glucose homoeostasis and future perspectives towards the management of diabetes. Bioelectron. Med. *4*: 9.

Guest, P.C. (2019). Biogenesis of the Insulin Secretory Granule in Health and Disease. In Reviews on Biomarker Studies of Metabolic and Metabolism-Related Disorders, P.C. Guest, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp 17–32.

Hamid, M., McCluskey, J.T., McClenaghan, N.H., and Flatt, P.R. (2002). Comparison of the Secretory Properties of Four Insulin-Secreting Cell Lines. Endocr. Res. *28*: 35–47.

Hartig, S.M., and Cox, A.R. (2020). Paracrine signaling in islet function and survival. J. Mol. Med.

Hartley, L., Igbinedion, E., Holmes, J., Flowers, N., Thorogood, M., Clarke, A., et al. (2013). Increased consumption of fruit and vegetables for the primary prevention of cardiovascular diseases. Cochrane Database Syst. Rev.

HAS (2014). Prévention et dépistage du diabète de type 2 et des maladies liées au diabète.

HAS Haute Autorité de Santé - Diabète de type 2.

Hecketsweiler, B., and Hecketsweiler, P. (2004). Voyage en biochimie: Circuits en biochimie humaine, nutritionnelle et métabolique (Elsevier).

Henquin, J.-C. (2021). Paracrine and autocrine control of insulin secretion in human islets: evidence and pending questions. Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab. *320*: E78–E86.

hmdb (2020). The Human Metabolome Database, https://hmdb.ca/.

Hostetler, G.L., Ralston, R.A., and Schwartz, S.J. (2017). Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. Adv. Nutr. *8*: 423–435.

Hou, L., Ge, L., Li, Y., Chen, Y., Li, H., He, J., et al. (2020). Physical activity recommendations for patients with type 2 diabetes: a cross-sectional survey. Acta Diabetol.

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., and Prior, R.L. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. J. Agric. Food Chem. *50*: 4437–4444.

Huising, M.O., Meulen, T. van der, Huang, J.L., Pourhosseinzadeh, M.S., and Noguchi, G.M. (2018). The Difference δ-Cells Make in Glucose Control. Physiology *33*: 403–411.

Imai, Y., Cousins, R.S., Liu, S., Phelps, B.M., and Promes, J.A. (2020). Connecting pancreatic islet lipid metabolism with insulin secretion and the development of type 2 diabetes. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1461*: 53–72.

Ishihara, H., Wang, H., Drewes, L.R., and Wollheim, C.B. (1999). Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in β cells. J. Clin. Invest. *104*: 1621–1629.

Jastroch, M., Divakaruni, A.S., Mookerjee, S., Treberg, J.R., and Brand, M.D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. Essays Biochem. *47*: 53–67.

Javed, K., and Fairweather, S.J. (2019). Amino acid transporters in the regulation of insulin secretion and signalling. Biochem. Soc. Trans. *47*: 571–590.

Jewell, J.L., Oh, E., and Thurmond, D.C. (2010). Exocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4. Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol. *298*: R517–R531.

Ježek, P., Jabůrek, M., Holendová, B., and Plecitá-Hlavatá, L. (2018). Fatty Acid-Stimulated Insulin Secretion vs. Lipotoxicity. Mol. Basel Switz. *23*:.

Johnson, A.M.F., and Olefsky, J.M. (2013). The Origins and Drivers of Insulin Resistance. Cell *152*: 673–684.

Karunakaran, U., Elumalai, S., Moon, J.S., Jeon, J.-H., Kim, N.D., Park, K.-G., et al. (2019). Myricetin Protects Against High Glucose-Induced β-Cell Apoptosis by Attenuating Endoplasmic Reticulum Stress via Inactivation of Cyclin-Dependent Kinase 5. Diabetes Metab. J. *43*: 192–205.

Keane, K., and Newsholme, P. (2014). Metabolic Regulation of Insulin Secretion. In Vitamins & Hormones, G. Litwack, ed. (Academic Press), pp 1–33.

Khan, R.M.M., Chua, Z.J.Y., Tan, J.C., Yang, Y., Liao, Z., and Zhao, Y. (2019). From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. Medicina (Mex.) *55*:.

Khoo, S., Gibson, T.B., Arnette, D., Lawrence, M., January, B., McGlynn, K., et al. (2004). MAP kinases and their roles in pancreatic β-cells. Cell Biochem. Biophys. *40*: 191–200.

Khoo, S., Griffen, S.C., Xia, Y., Baer, R.J., German, M.S., and Cobb, M.H. (2003). Regulation of Insulin Gene Transcription by ERK1 and ERK2 in Pancreatic β Cells*. J. Biol. Chem. *278*: 32969–32977.

Kim, E.-K., Kwon, K.-B., Song, M.-Y., Han, M.-J., Lee, J.-H., Lee, Y.-R., et al. (2007). Flavonoids Protect Against Cytokine-Induced Pancreatic β-Cell Damage Through Suppression of Nuclear Factor κB Activation. Pancreas *35*: e1.

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., et al. (2020). PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. Nucleic Acids Res. *49*: D1388–D1395.

Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S.M., Moore, M.C., Renner, S., Woods, S.C., et al. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. Nat. Rev. Endocrinol. *14*: 140–162.

Kojima, I., Medina, J., and Nakagawa, Y. (2017). Role of the glucose-sensing receptor in insulin secretion. Diabetes Obes. Metab. *19*: 54–62.

Lagoa, R., Graziani, I., Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V., and Gutierrez-Merino, C. (2011). Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. *1807*: 1562–1572.

Landry, Y., and Gies, J.-P. (2014). Pharmacologie - 3e édition: Des cibles à la thérapeutique (Dunod).

Lee, Y.J., Suh, K.S., Choi, M.C., Chon, S., Oh, S., Woo, J.-T., et al. (2010). Kaempferol protects HIT-T15 pancreatic beta cells from 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative damage. Phytother. Res. *24*: 419–423.

Li, N., Wu, J.-X., Ding, D., Cheng, J., Gao, N., and Chen, L. (2017a). Structure of a Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channel. Cell *168*: 101-110.e10.

Li, T., Lin, G., Zhong, L., Zhou, Y., Wang, J., Zhu, Y., et al. (2017b). W2476 ameliorates β-cell dysfunction and exerts therapeutic effects in mouse models of diabetes via modulation of the thioredoxin-interacting protein signaling pathway. Acta Pharmacol. Sin. *38*: 1024–1037.

Li, X.-H., Yu, F., Zhou, Y.-H., and He, J. (2016). Association between alcohol consumption and the risk of incident type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis. Am. J. Clin. Nutr. *103*: 818–829.

Li, Y.V. (2014). Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. Endocrine *45*: 178–189.

Li, Z., Zhou, Z., and Zhang, L. (2020). Current status of GPR40/FFAR1 modulators in medicinal chemistry (2016–2019): a patent review. Expert Opin. Ther. Pat. *30*: 27–38.

Lin, M.H., Hsu, C.-C., Lin, J., Cheng, J.-T., and Wu, M.C. (2017a). Identification of morin as an agonist of imidazoline I-3 receptor for insulin secretion in diabetic rats. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *390*: 997–1003.

Lin, M.H., Hsu, C.-C., Lin, J., Cheng, J.T., and Wu, M.C. (2017b). Investigation of morin-induced insulin secretion in cultured pancreatic cells. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. *44*: 1254–1262.

Liu, M., Liu, C., Shen, S., Liu, J., and Yin, F. (2020). Geniposide inhibits glucolipotoxicity and cooperates with Txnip knockdown to potentiate cell adaption to endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells. Cell Biol. Int. *44*: 1535–1543.

Lowell, B.B., and Shulman, G.I. (2005). Mitochondrial Dysfunction and Type 2 Diabetes. Science *307*: 384–387.

Luo, J., Wang, A., Zhen, W., Wang, Y., Si, H., Jia, Z., et al. (2018). Phytonutrient genistein is a survival factor for pancreatic β-cells via GPR30-mediated mechanism. J. Nutr. Biochem. *58*: 59–70.

Lytrivi, M., Castell, A.-L., Poitout, V., and Cnop, M. (2020). Recent Insights Into Mechanisms of β-Cell Lipo- and Glucolipotoxicity in Type 2 Diabetes. J. Mol. Biol. *432*: 1514–1534.

Maechler, P. (2017). Glutamate pathways of the beta-cell and the control of insulin secretion. Diabetes Res. Clin. Pract. *131*: 149–153.

Magnan, C., and Ktorza, A.A. (2005). Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. EMC - Endocrinol. *10*: 241–264.

Mahat, R.K., Singh, N., Arora, M., and Rathore, V. (2019). Health risks and interventions in prediabetes: A review. Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev. *13*: 2803–2811.

Mahobiya, A., Singh, T.U., Rungsung, S., Kumar, T., Chandrasekaran, G., Parida, S., et al. (2018). Kaempferol-induces vasorelaxation via endothelium-independent pathways in rat isolated pulmonary artery. Pharmacol. Rep. *70*: 863–874.

Manzoor, M., Ahmad, N., and Kalsoom, A. (2017). Food based phytochemical luteolin their derivatives, sources and medicinal benefits. Int. J. Agric. Life Sci. 195–207.

Maranta, F., Cianfanelli, L., and Cianflone, D. (2020). Glycaemic Control and Vascular Complications in Diabetes Mellitus Type 2. 1–24.

Marchetti, P., Suleiman, M., De Luca, C., Baronti, W., Bosi, E., and Marselli, L. (2020). A direct look at the dysfunction and pathology of the β cells in human type 2 diabetes. Semin. Cell Dev. Biol.

Marchi, U.D., Hermant, A., Thevenet, J., Ratinaud, Y., Santo-Domingo, J., Barron, D., et al. (2017). A novel ATP-synthase-independent mechanism coupling mitochondrial activation to exocytosis in insulin-secreting cells. J. Cell Sci. *130*: 1929–1939.

McCulloch, L.J., Bunt, M. van de, Braun, M., Frayn, K.N., Clark, A., and Gloyn, A.L. (2011). GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: Implications for understanding genetic association signals at this locus. Mol. Genet. Metab. *104*: 648–653.

Mietlicki-Baase, E.G. (2016). Amylin-mediated control of glycemia, energy balance, and cognition. Physiol. Behav. *162*: 130–140.

Miyazaki, J.-I., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., et al. (1990). Establishment of a Pancreatic β Cell Line That Retains Glucose-Inducible Insulin Secretion: Special Reference to Expression of Glucose Transporter Isoforms. Endocrinology *127*: 126–132.

Müller, T.D., Finan, B., Bloom, S.R., D'Alessio, D., Drucker, D.J., Flatt, P.R., et al. (2019). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). Mol. Metab. *30*: 72–130.

Murkovic, M. (2016). Phenolic Compounds: Occurrence, Classes, and Analysis. In Encyclopedia of Food and Health, B. Caballero, P.M. Finglas, and F. Toldrá, eds. (Oxford: Academic Press), pp 346–351.

Nanou, E., and Catterall, W.A. (2018). Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. Neuron *98*: 466–481.

Newsholme, P., Brennan, L., and Bender, K. (2006). Amino Acid Metabolism, β-Cell Function, and Diabetes. Diabetes *55*: S39–S47.

Newsholme, P., Keane, K.N., Carlessi, R., and Cruzat, V. (2019). Oxidative stress pathways in pancreatic β-cells and insulin-sensitive cells and tissues: importance to cell metabolism, function, and dysfunction. Am. J. Physiol.-Cell Physiol. *317*: C420–C433.

Newsholme, P., and Krause, M. (2012). Nutritional Regulation of Insulin Secretion: Implications for Diabetes. Clin. Biochem. Rev. *33*: 35–47.

Niu, B., Niu, B., Liu, L., Liu, L., Su, H., Su, H., et al. (2016). Role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 signal transduction pathway in insulin secretion by β-TC6 cells. Mol. Med. Rep. *13*: 4451–4454.

Niu, B., Su, H., Xia, X.-S., He, Q., Xue, Y.-M., and Yan, X.-M. (2017). The role of interleukin-1β and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in glucose-stimulated insulin secretion. Kaohsiung J. Med. Sci. *33*: 224–228.

Oliveira, C.A.M. de, Latorraca, M.Q., Mello, M.A.R. de, and Carneiro, E.M. (2011). Mechanisms of insulin secretion in malnutrition: modulation by amino acids in rodent models. Amino Acids *40*: 1027–1034.

Oliveira, M.R. de (2016). Evidence for genistein as a mitochondriotropic molecule. Mitochondrion *29*: 35–44.

OMS (2016). OMS | Rapport mondial sur le diabète (World Health Organization).

OMS (2019). Global Spending on Health: A World in Transition. World Health Organization.

O'Neill, C.M., Lu, C., Corbin, K.L., Sharma, P.R., Dula, S.B., Carter, J.D., et al. (2013). Circulating Levels of IL-1B+IL-6 Cause ER Stress and Dysfunction in Islets From Prediabetic Male Mice. Endocrinology *154*: 3077–3088.

Orban, J.-C., and Ichai, C. (2008). Complications métaboliques aiguës du diabète. Réanimation *17*: 761–767.

Ortega, R., and García, N. (2009). The flavonoid quercetin induces changes in mitochondrial permeability by inhibiting adenine nucleotide translocase. J. Bioenerg. Biomembr. *41*: 41.

Otter, S., and Lammert, E. (2016). Exciting Times for Pancreatic Islets: Glutamate Signaling in Endocrine Cells. Trends Endocrinol. Metab. *27*: 177–188.

Pernet, A., and Petriccioli, N. (2011). Microbiote intestinal, obésité et résistance à l'insuline. Rev. Médicale Suisse *7*: 2236–2238.

Petersen, M.C., and Shulman, G.I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. Physiol. Rev. *98*: 2133–2223.

Picton, S.F., Flatt, P.R., and McClenaghan, N.H. (2001). Differential Acute and Long Term Actions of Succinic Acid Monomethyl Ester Exposure on Insulin-Secreting BRIN-BD11 Cells. Int. J. Exp. Diabetes Res. *2*: 19–27.

Pinti, M.V., Fink, G.K., Hathaway, Q.A., Durr, A.J., Kunovac, A., and Hollander, J.M. (2019). Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus: an organ-based analysis. Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab. *316*: E268–E285.

Plášek, J., Babuka, D., and Hoefer, M. (2017). H+ translocation by weak acid uncouplers is independent of H+ electrochemical gradient. J. Bioenerg. Biomembr. *49*: 391–397.

Poitout, V., Amyot, J., Semache, M., Zarrouki, B., Hagman, D., and Fontés, G. (2010). Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. Biochim. Biophys. Acta *1801*: 289–298.

Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R.P., and Harmon, J.S. (2006). Regulation of the Insulin Gene by Glucose and Fatty Acids. J. Nutr. *136*: 873–876.

Poitout, V., and Robertson, R.P. (2008). Glucolipotoxicity: Fuel Excess and β-Cell Dysfunction. Endocr. Rev. *29*: 351–366.

Prabhakar, D.P. (2015). Animal Models in Type 2 Diabetes Research. pp 525–550.

Prentki, M., Corkey, B.E., and Madiraju, S.R.M. (2020). Lipid-associated metabolic signalling networks in pancreatic beta cell function. Diabetologia *63*: 10–20.

Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W., and Roduit, R. (2002). Malonyl-CoA Signaling, Lipid Partitioning, and Glucolipotoxicity: Role in β-Cell Adaptation and Failure in the Etiology of Diabetes. Diabetes *51*: S405–S413.

Rauf, A., Imran, M., Khan, I.A., Rehman, M.- ur-, Gilani, S.A., Mehmood, Z., et al. (2018). Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. Phytother. Res. *32*: 2109–2130.

Recos, V. (2013). Recommandations en pratique 2014. 175 stratégies thérapeutiques. Sous Dir. Pr Charles Caulin.

Remedi, M.S., and Emfinger, C. (2016). Pancreatic β-cell identity in diabetes. Diabetes Obes. Metab. *18*: 110–116.

Remedi, M.S., and Nichols, C.G. (2016). Chapter 8 - KATP Channels in the Pancreas: Hyperinsulinism and Diabetes. In Ion Channels in Health and Disease, G.S. Pitt, ed. (Boston: Academic Press), pp 199–221.

Rena, G., Hardie, D.G., and Pearson, E.R. (2017). The mechanisms of action of metformin. Diabetologia *60*: 1577–1585.

Roden, M., and Shulman, G.I. (2019). The integrative biology of type 2 diabetes. Nature *576*: 51–60.

Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C.G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., et al. (2014). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. Arch. Toxicol. *88*: 1803–1853.

Rorsman, P., and Ashcroft, F.M. (2018). Pancreatic β-Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. Physiol. Rev. *98*: 117–214.

Rosenstock, J., Wysham, C., Frías, J.P., Kaneko, S., Lee, C.J., Landó, L.F., et al. (2021). Efficacy and safety of a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist tirzepatide in patients with type 2 diabetes (SURPASS-1): a double-blind, randomised, phase 3 trial. The Lancet *398*: 143–155.

Sabatini, P.V., Speckmann, T., and Lynn, F.C. (2019). Friend and foe: β-cell Ca2+ signaling and the development of diabetes. Mol. Metab. *21*: 1–12.

Saponara, S., Carosati, E., Mugnai, P., Sgaragli, G., and Fusi, F. (2011). The flavonoid scaffold as a template for the design of modulators of the vascular Cav1.2 channels: Flavonoids as vascular Cav1.2 channels modulators. Br. J. Pharmacol. *164*: 1684–1697.

Scheen, A.J. (2016). Investigational insulin secretagogues for type 2 diabetes. Expert Opin. Investig. Drugs *25*: 405–422.

Schlienger, J.-L. (2013). Complications du diabète de type 2. Presse Médicale *42*: 839–848.

Seino, S. (1999). ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS: A Model of Heteromultimeric Potassium Channel/Receptor Assemblies. Annu. Rev. Physiol. *61*: 337–362.

Sekine, N., Cirulli, V., Regazzi, R., Brown, L.J., Gine, E., Tamarit-Rodriguez, J., et al. (1994). Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. J. Biol. Chem. *269*: 4895–4902.

Selma, M.V., Espín, J.C., and Tomás-Barberán, F.A. (2009). Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health. J. Agric. Food Chem. *57*: 6485–6501.

Sen, S., Chakraborty, R., and De, B. (2016). Pancreatic Hormones and Control of Blood Glucose: A Glance. In Diabetes Mellitus in 21st Century, S. Sen, R. Chakraborty, and B. De, eds. (Singapore: Springer), pp 1–12.

Seronie-Vivien, S. (2015). Biochimie et Biologie moléculaire (Livre d'entraînement au concours PACES).

Sha, W., Hu, F., and Bu, S. (2020). Mitochondrial dysfunction and pancreatic islet β-cell failure (Review). Exp. Ther. Med. *20*: 266.

Shi, G.-J., Li, Y., Cao, Q.-H., Wu, H.-X., Tang, X.-Y., Gao, X.-H., et al. (2019). In vitro and in vivo evidence that quercetin protects against diabetes and its complications: A systematic review of the literature. Biomed. Pharmacother. *109*: 1085–1099.

Shibasaki, T., Takahashi, T., Takahashi, H., and Seino, S. (2014). Cooperation between cAMP signalling and sulfonylurea in insulin secretion. Diabetes Obes. Metab. *16*: 118–125.

Sikalidis, A.K., and Maykish, A. (2020). The Gut Microbiome and Type 2 Diabetes Mellitus: Discussing a Complex Relationship. Biomedicines *8*:.

Singla, R.K., Dubey, A.K., Garg, A., Sharma, R.K., Fiorino, M., Ameen, S.M., et al. (2019). Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures (AOAC International).

Skelin, M., Rupnik, M., and Cencic, A. (2010). Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. ALTEX *27*: 105–113.

Soares, J.M.D., Pereira Leal, A.E.B., Silva, J.C., Almeida, J.R.G.S., and Oliveira, H.P. de (2017). Influence of Flavonoids on Mechanism of Modulation of Insulin Secretion. Pharmacogn. Mag. *13*: 639–646.

Špaček, T., Šantorová, J., Zacharovová, K., Berková, Z., Hlavatá, L., Saudek, F., et al. (2008). Glucose-stimulated insulin secretion of insulinoma INS-1E cells is associated with elevation of both respiration and mitochondrial membrane potential. Int. J. Biochem. Cell Biol. *40*: 1522–1535.

Spiegel, M., Andruniów, T., and Sroka, Z. (2020). Flavones' and Flavonols' Antiradical Structure–Activity Relationship—A Quantum Chemical Study. Antioxidants *9*: 461.

Steiner, D.F. (2008). The Biosynthesis of Insulin. In Pancreatic Beta Cell in Health and Disease, S. Seino, and G.I. Bell, eds. (Tokyo: Springer Japan), pp 31–49.

Stevens, J.F., Revel, J.S., and Maier, C.S. (2018). Mitochondria-Centric Review of Polyphenol Bioactivity in Cancer Models. Antioxid. Redox Signal. *29*: 1589–1611.

Suantawee, T., Elazab, S.T., Hsu, W.H., Yao, S., Cheng, H., and Adisakwattana, S. (2017). Cyanidin Stimulates Insulin Secretion and Pancreatic β-Cell Gene Expression through Activation of l-type Voltage-Dependent Ca2+ Channels. Nutrients *9*: 814.

Suh, K.S., Oh, S., Woo, J.-T., Kim, S.-W., Kim, J.-W., Kim, Y.S., et al. (2012). Apigenin Attenuates 2-Deoxy-D-ribose-Induced Oxidative Cell Damage in HIT-T15 Pancreatic β-Cells. Biol. Pharm. Bull. *35*: 121–126.

Summanen, J., Vuorela, P., Rauha, J.-P., Tammela, P., Marjamäki, K., Pasternack, M., et al. (2001). Effects of simple aromatic compounds and flavonoids on Ca2+ fluxes in rat pituitary GH4C1 cells. Eur. J. Pharmacol. *414*: 125–133.

Szollosi, A., Nenquin, M., and Henquin, J.C. (2010). Pharmacological stimulation and inhibition of insulin secretion in mouse islets lacking ATP-sensitive K+ channels. Br. J. Pharmacol. *159*: 669–677.

Tabák, A.G., Herder, C., Rathmann, W., Brunner, E.J., and Kivimäki, M. (2012). Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. The Lancet *379*: 2279–2290.

Tang, L., Gamal El-Din, T.M., Swanson, T.M., Pryde, D.C., Scheuer, T., Zheng, N., et al. (2016). Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca 2+ channel by Ca 2+ antagonist drugs. Nature *537*: 117–121.

Thielen, L., and Shalev, A. (2018). Diabetes pathogenic mechanisms and potential new therapies based upon a novel target called TXNIP. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. *25*: 75–80.

Thurmond, D.C., and Gaisano, H.Y. (2020). Recent Insights into Beta-cell Exocytosis in Type 2 Diabetes. J. Mol. Biol. *432*: 1310–1325.

Todorova, T.Z., Traykov, M.G., Tadjer, A.V., and Velkov, Zh.A. (2013). Structure of flavones and flavonols. Part I: Role of substituents on the planarity of the system. Comput. Theor. Chem. *1017*: 85–90.

Tokarz, V.L., MacDonald, P.E., and Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. J. Cell Biol. *217*: 2273–2289.

Toubal, S., Oiry, C., Bayle, M., Cros, G., and Neasta, J. (2020). Urolithin C increases glucose-induced ERK activation which contributes to insulin secretion. Fundam. Clin. Pharmacol. *n/a*:

Vakilian, M., Tahamtani, Y., and Ghaedi, K. (2019). A review on insulin trafficking and exocytosis. Gene *706*: 52–61.

Vanitha, P., Senthilkumar, S., Dornadula, S., Anandhakumar, S., Rajaguru, P., and Ramkumar, K.M. (2017). Morin activates the Nrf2-ARE pathway and reduces oxidative stress-induced DNA damage in pancreatic beta cells. Eur. J. Pharmacol. *801*: 9–18.

Vargas, E., Joy, N.V., and Carrillo Sepulveda, M.A. (2020). Biochemistry, Insulin Metabolic Effects. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Vial, G., Detaille, D., and Guigas, B. (2019). Role of Mitochondria in the Mechanism(s) of Action of Metformin. Front. Endocrinol. *0*:

VIDAL (2020). VIDAL - Diabète de type 2 : prise en charge initiale - Prise en charge.

Wang, J., and Wang, H. (2017). Oxidative Stress in Pancreatic Beta Cell Regeneration. Oxid. Med. Cell. Longev. *2017*:.

Wang, X., Ouyang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhao, G., Bao, W., et al. (2014). Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. BMJ *349*: g4490.

Wang, Z., and Thurmond, D.C. (2009). Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis – roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. J. Cell Sci. *122*: 893–903.

Whitticar, N.B., and Nunemaker, C.S. (2020). Reducing Glucokinase Activity to Enhance Insulin Secretion: A Counterintuitive Theory to Preserve Cellular Function and Glucose Homeostasis. Front. Endocrinol. *11*:.

Wierup, N., Sundler, F., and Heller, R.S. (2014). The islet ghrelin cell. J. Mol. Endocrinol. *52*: R35–R49.

Williamson, G., Kay, C.D., and Crozier, A. (2018). The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. *17*: 1054–1112.

Wittenbecher, C., Kuxhaus, O., Boeing, H., Stefan, N., and Schulze, M.B. (2019). Associations of short stature and components of height with incidence of type 2 diabetes: mediating effects of cardiometabolic risk factors. Diabetologia *62*: 2211–2221.

Wondafrash, D.Z., Nire'a, A.T., Tafere, G.G., Desta, D.M., Berhe, D.A., and Zewdie, K.A. (2020). Thioredoxin-Interacting Protein as a Novel Potential Therapeutic Target in Diabetes Mellitus and Its Underlying Complications (Dove Press).

Yang, K., and Chan, C.B. (2018). Epicatechin potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 cells is not dependent on its antioxidant activity. Acta Pharmacol. Sin. *39*: 893–902.

Yang, M., Zhou, Y., Wan, L., Ye, J., Lu, H.-L., Huang, X., et al. (2020). Luteolin suppresses colonic smooth muscle motility via inhibiting L-type calcium channel currents in mice. Gen. Physiol. Biophys. *39*: 49–58.

Yaribeygi, H., Maleki, M., Sathyapalan, T., Jamialahmadi, T., and Sahebkar, A. (2020). Molecular Mechanisms by Which Imeglimin Improves Glucose Homeostasis (Hindawi).

Ying, W., Fu, W., Lee, Y.S., and Olefsky, J.M. (2020). The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β-cell abnormalities. Nat. Rev. Endocrinol. *16*: 81–90.

Youl, E., Bardy, G., Magous, R., Cros, G., Sejalon, F., Virsolvy, A., et al. (2010). Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic β-cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. Br. J. Pharmacol. *161*: 799–814.

Youl, E., Magous, R., Cros, G., and Oiry, C. (2014). MAP Kinase cross talks in oxidative stress-induced impairment of insulin secretion. Involvement in the protective activity of quercetin. Fundam. Clin. Pharmacol. *28*: 608–615.

Zanotti, I., Dall'Asta, M., Mena, P., Mele, L., Bruni, R., Ray, S., et al. (2015). Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. Food Funct. *6*: 13–31.

Zhang, C.-Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., et al. (2001). Uncoupling Protein-2 Negatively Regulates Insulin Secretion and Is a Major Link between Obesity, β Cell Dysfunction, and Type 2 Diabetes. Cell *105*: 745–755.

Zhang, Y., Chen, W., Feng, B., and Cao, H. (2020). The Clinical Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy for Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. Aging Dis. *11*: 141–153.

Zhang, Y., and Liu, D. (2011). Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. Eur. J. Pharmacol. *670*: 325–332.

Zhang, Z., Ding, Y., Dai, X., Wang, J., and Li, Y. (2011). Epigallocatechin-3-gallate protects pro-inflammatory cytokine induced injuries in insulin-producing cells through the mitochondrial pathway. Eur. J. Pharmacol. *670*: 311–316.

Zhao, C., Wilson, M.C., Schuit, F., Halestrap, A.P., and Rutter, G.A. (2001). Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas. Diabetes *50*: 361–366.

Zhao, Y., Fang, Q., Straub, S.G., Lindau, M., and Sharp, G.W.G. (2010). Noradrenaline inhibits exocytosis via the G protein βγ subunit and refilling of the readily releasable granule pool via the α(i1/2) subunit. J. Physiol. *588*: 3485–3498.

Zheng, J., and Ramirez, V.D. (2000). Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. Br. J. Pharmacol. *130*: 1115–1123.

Zheng, Y., Ley, S.H., and Hu, F.B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nat. Rev. Endocrinol. *14*: 88–98.

Zhu, L., Rossi, M., Doliba, N.M., and Wess, J. (2020). Beta-cell M3 muscarinic acetylcholine receptors as potential targets for novel antidiabetic drugs. Int. Immunopharmacol. *81*: 106267.

Zhuang, M., Qiu, H., Li, P., Hu, L., Wang, Y., and Rao, L. (2018). Islet protection and amelioration of type 2 diabetes mellitus by treatment with quercetin from the flowers of Edgeworthia gardneri. Drug Des. Devel. Ther. *12*: 955–966.

Zingman, L.V., Alekseev, A.E., Bienengraeber, M., Hodgson, D., Karger, A.B., Dzeja, P.P., et al. (2001). Signaling in Channel/Enzyme Multimers: ATPase Transitions in SUR Module Gate ATP-Sensitive K+ Conductance. Neuron *31*: 233–245.

Valorisation scientifique

Ces travaux ont fait l'objet de plusieurs communications lors de congrès et journées scientifiques :

2017 :

- CBS2 Day, Génopolys le 24 mai 2017 – Poster :

Structure-insulin secretion relationship of flavonols in pancreatic β-cells

Guillaume Gautheron, Estelle Youl, Julie N'Guyen Gérard Cros, Jérémie Neasta, Catherine Oiry
Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier

2018 :

- 2nd Montpellier DIABETES DAY, Génopolys le 16 Novembre 2018 – Poster + communication orale (3 min) :

Functional and pharmacological explorations of quercetin-like compounds on glucose-induced insulin secretion

Guillaume Gautheron[1], Sylvie Péraldi Roux[1], Jean-François Quignard[2], Anne Virsolvy[3], Estelle Youl[1], Morgane Bayle[1], Gérard Cros[1], Jérémie Neasta[1], Catherine Oiry[1]

[1]Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier
[2]Université Bordeaux, INSERM U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Bordeaux
[3]PhyMedExp, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier

2019 :

- Congrès national de la Fédération Nationale des Syndicats d'Internes en Pharmacie et en Biologie Médicale (FNSIP-BM), Grenoble le 23 mars 2019 – Poster :

Effets d'analogues structuraux de la quercétine sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose

Guillaume Gautheron[1], Sylvie Péraldi Roux[1], Jean-François Quignard[2], Anne Virsolvy[3], Julie N'Guyen[1], Estelle Youl[1], Morgane Bayle[1], Gérard Cros[1], Jérémie Neasta[1], Catherine Oiry[1]

[1]Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier
[2]Université Bordeaux, INSERM U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Bordeaux
[3]PhyMedExp, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier

- Congrès annuel de la SFD, Marseille du 26 au 29 mars 2019 – Poster :

Effets d'analogues structuraux de la quercétine sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose

Guillaume Gautheron[1], Sylvie Péraldi Roux[1], Jean-François Quignard[2], Anne Virsolvy[3], Julie N'Guyen[1], Estelle Youl[1], Morgane Bayle[1], Gérard Cros[1], Jérémie Neasta[1], Catherine Oiry[1]

[1]Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier
[2]Université Bordeaux, INSERM U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Bordeaux
[3]PhyMedExp, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier

- CBS2 Day, Montpellier le 29 mai 2019 – Présentation orale (20 min) :

Functional and pharmacological explorations of quercetin-like compounds on glucose-induced insulin secretion

Guillaume Gautheron[1], Sylvie Péraldi Roux[1], Jean-François Quignard[2], Anne Virsolvy[3], Béatrice Chabi[4], Julie N'Guyen[1], Estelle Youl[1], Morgane Bayle[1], Gérard Cros[1], Jérémie Neasta[1], Catherine Oiry[1]

[1]Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Université de Montpellier, CNRS UMR 5247, ENSCM, Montpellier
[2]Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Université Bordeaux, INSERM U1045, Bordeaux
[3]PhyMedExp, Université de Montpellier, CNRS, INSERM U1046, Montpellier
[4]Dynamique Musculaire et Métabolisme (DMEM), UMR 866, Université de Montpellier, INRA, Montpellier

- Congrès annuel de la SFPT, Lyon du 12 au 14 Juin 2019 – Présentation orale (3 min) :

Functional and pharmacological explorations of quercetin-like compounds on glucose-induced insulin secretion

Guillaume Gautheron[1], Sylvie Péraldi Roux[1], Jean-François Quignard[2], Anne Virsolvy[3], Béatrice Chabi[4], Julie N'Guyen[1], Estelle Youl[1], Morgane Bayle[1], Gérard Cros[1], Jérémie Neasta[1], Catherine Oiry[1]

[1]Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Université de Montpellier, CNRS UMR 5247, ENSCM, Montpellier
[2]Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Université Bordeaux, INSERM U1045, Bordeaux
[3]PhyMedExp, Université de Montpellier, CNRS, INSERM U1046, Montpellier
[4]Dynamique Musculaire et Métabolisme (DMEM), UMR 866, Université de Montpellier, INRA, Montpellier

- Séminaire externe à l'INRA, Montpellier le 5 novembre 2019, dans le cadre de la collaboration mise en place avec le Dr. Béatrice Chabi – présentation orale (20 min) :

Activité et mécanisme d'action d'analogues de la Quercétine sur la fonctionnalité de la cellule β-pancréatique

- 3rd Montpellier DIABETES DAY, Génopolys le 15 Novembre 2019 – Poster + communication orale (3 min) :

Galangin inhibits glucose-induced insulin secretion through the alteration of mitochondrial oxidative phosphorylation

Guillaume Gautheron[1], Sylvie Péraldi Roux[1], Béatrice Chabi[2], Estelle Youl[1], Morgane Bayle[1], Gérard Cros[1], Jérémie Neasta[1], Catherine Oiry[1]

[1]Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier
[2]Dynamique Musculaire et Métabolisme (DMEM), Univ Montpellier, INRA, Montpellier

2020 :

- Congrès annuel de la SFD virtuel, du 8 au 11 septembre 2020 – Poster affiché et discuté (5 min) :

Effets et mécanismes d'action d'analogues structuraux de la quercétine sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose

Guillaume Gautheron[1], Béatrice Chabi[2], Sylvie Péraldi Roux[1], Jean-François Quignard[3], Anne Virsolvy[4], Julie N'Guyen[1], Estelle Youl[1], Morgane Bayle[1], Gérard Cros[1], Jérémie Neasta[1], Catherine Oiry[1]

[1]Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier
[2]Dynamique Musculaire et Métabolisme (DMEM), Univ Montpellier, INRA, Montpellier
[3]Université Bordeaux, INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Bordeaux
[4]PhyMedExp, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier

Activité et mécanismes d'action d'analogue de la quercétine sur la fonctionnalité des cellules β pancréatiques

La cellule β pancréatique régule l'homéostasie glucidique. Sa dysfonction, favorisée par divers facteurs tels que le stress oxydant et l'inflammation, joue un rôle clé dans la physiopathologie du diabète de type 2 (DT2). Le maintien de sa fonctionnalité, notamment par l'utilisation de flavonoïdes, pourrait retarder l'apparition ou l'évolution de la pathologie. En effet, les flavonoïdes, composés naturels du règne végétal, initialement décrits pour leurs effets santé du fait de leur action antioxydante, apparaissent désormais comme des molécules capables d'interagir avec des cibles pharmacologiques et de réguler des voies de signalisation cellulaires. Sur la base de résultats décrivant la capacité des flavonoïdes à moduler les canaux calciques voltage dépendants (Ca_V) au niveau vasculaire, les effets d'une dizaine de molécules ont été étudiés vis-à-vis de la fonction cellulaire β. Cette approche de pharmacologie fondamentale nous permet de montrer que le résokaempférol et la galangine, bien que possédant des structures chimiques très proches, exercent des effets opposés sur la sécrétion d'insuline *via* des cibles pharmacologiques distinctes. Le résokaempférol, qui amplifie la sécrétion d'insuline, activerait les Ca_V au niveau de la membrane plasmique. La galangine, qui au contraire inhibe la sécrétion d'insuline, se comporterait comme un agent découplant de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Il serait intéressant de compléter ce travail en comparant les effets de ces molécules *in vivo* sur la régulation glycémique. Notre étude complémentaire de relation structure-activité visant à étudier les déterminants structuraux impliqués dans la modulation de la sécrétion d'insuline suggère qu'une double substitution par des groupements hydroxyles en position 3 et 4' sur le noyau flavone semble être un minimum requis pour conférer au flavonoïde une activité stimulante maximale vis-à-vis de la sécrétion d'insuline. A l'opposé, une hydroxylation en position 2' apparait délétère sur toute activité pharmacologique du flavonoïde, que celui-ci se révèle un agoniste ou un antagoniste vis-à-vis de la sécrétion d'insuline. Cette étude pourrait être poursuivie en analysant les courbes effet concentration et le mécanisme d'action des molécules les plus efficaces à moduler et protéger la fonction cellulaire β.

Mots clés : cellule β pancréatique, insuline, flavonoïde, canal calcique voltage-dépendant, mitochondrie.

Effects and mechanisms of action of quercetin-like compounds on pancreatic β-cells functions

The pancreatic β-cell regulates glucose homeostasis. Various factors such as oxidative stress and inflammation can lead to its dysfunction which is a core feature of the pathophysiology of type 2 diabetes (T2D). Preserving β-cell functionality could delay the onset or the evolution of the pathology and in this regards flavonoids are promising molecules. Flavonoids are natural compounds that occur in plant kingdom. They were initially described for their health effects due to their antioxidant action. Later on, they were reported to interact with pharmacological targets and to regulate cellular signaling pathways. Based on published data describing the ability of flavonoids to modulate voltage-dependent calcium channels at the vascular level, the effects of around ten molecules have been studied with regards to β-cell function. This fundamental pharmacology approach allows us to show that resokaempferol and galangin, despite very similar chemical structures, exert opposite effects on insulin secretion through the modulation of distinct pharmacological targets. Resokaempferol, which enhances insulin secretion, is thought to activate Ca_V at the plasma membrane. Galangin, which inhibits insulin secretion, would act as an uncoupler of mitochondrial oxidative phosphorylation. It would be interesting to complete this work by comparing the effects of these molecules in vivo on glycemic regulation. In a complementary structure-activity study, we aimed at investigating the structural determinants involved in the modulation of insulin secretion. Our data suggest that a double substitution by hydroxyl groups at the 3 and 4' position on the flavone ring seems to be a minimum requirement to confer the flavonoid a maximal stimulatory activity towards insulin secretion. On the other hand, hydroxylation of the flavonoid at the 2' position appears to be deleterious for its pharmacological activity regardless it is an agonist or an antagonist towards insulin secretion. This study could be continued and extended by analyzing the concentration effect curves and the mechanism of action of the most effective molecules to modulate and protect the β-cell function.

Keywords: Pancreatic β-cell, insulin, flavonoid, voltage-dependent calcium channels, mitochondria.