

# Comprendre la formation et la toxicité des fibres d'hiAPP pour les bloquer et favoriser la survie des cellules bêta pancréatiques

## 1. Contexte et hypothèses de travail ou contexte et objectifs

La cellule  $\beta$  du pancréas est connue pour sécréter l'insuline, hormone hypoglycémisante par excellence, nécessaire à la régulation de la glycémie et dont le défaut d'action et/ou de production entraîne le développement d'un diabète. Parmi les diabètes, on trouve le diabète de type 1, dû à une destruction auto-immune totale des cellules  $\beta$ , et le diabète de type 2, qui est la conséquence d'une insulino-résistance périphérique, et qui se déclare lorsque les cellules  $\beta$  ne sont plus capables de produire suffisamment d'insuline pour contrer cette insulino-résistance. Il est à noter que dans le cas du diabète de type 2, une diminution importante de la masse des cellules  $\beta$  est observée, [1].

Avec l'insuline, une autre hormone est produite et co-sécrétée par les cellules  $\beta$  : l'Islet Amyloid PolyPeptide (IAPP). Cette hormone participe également à la régulation de la glycémie, en régulant la vidange gastrique, en contrôlant la prise alimentaire ou en agissant sur la sécrétion d'insuline [2]. Si les effets physiologiques de IAPP sont bénéfiques pour l'organisme, ils semblent mineurs face au mastodonte qu'est l'insuline. C'est dans une situation pathologique que hiAPP va se révéler. En effet, pour des raisons encore inexplicables, cette protéine, qui fait partie de la famille des protéines dites amyloïdes peut s'auto-associer et former des agrégats amyloïdes toxiques [3]. A noter que la forme murine, qui a 85% d'identité de séquence avec la forme humaine, ne forme pas d'agrégats amyloïdes et n'est pas cytotoxique. Cependant, l'expression de la forme humaine du peptide, hiAPP, chez la souris est nécessaire et suffisante pour induire la mort des cellules  $\beta$  et conduire au développement d'un diabète [4].

Les objectifs de ce projet sont : 1/ comprendre pourquoi l'hormone hiAPP, s'agrège et forme des dépôts de fibres amyloïdes uniquement dans le pancréas, le cerveau ou le cœur ? 2/ et déterminer si en prévenant la fibrillation d'hiAPP, on peut préserver la survie des cellules  $\beta$

## 2. Méthodologie de recherche

### 2.1. Rôle des lipides membranaires dans la fibrillation d'hiAPP

Pour comprendre pourquoi des dépôts d'hiAPP ont été identifiés à ce jour uniquement dans peu de tissus (pancréas, cerveau, cœur et rein), nous avons comparé la fibrillation et la toxicité d'hiAPP en présence de différents types cellulaires ou en présence d'îlots pancréatiques de rats sains ou diabétiques (les rats Goto-Kakizaki ou GK). Nous avons pu observer que : i) hiAPP forme des fibres et exerce une activité cytotoxique principalement sur des cellules  $\beta$  ou neuronales ; ii) hiAPP forme des fibres également en présence d'adipocytes, sans exercer d'effet toxique et donc sans affecter la viabilité de ces cellules ; et iii) hiAPP forme des fibres en présence d'îlots issus de rats diabétiques GK, et ne fibrille pas en présence d'îlots de rats sains (données non publiées). Nous avons émis l'hypothèse qu'hiAPP s'ancrerait à la membrane via une liaison à son récepteur. Toutefois, cette hypothèse a été réfutée après analyse de son expression génique. Nous avons ensuite émis l'hypothèse que la composition lipidique membranaire, et plus particulièrement le cholestérol aurait un rôle important, en accord avec nos expériences *in vitro*, sur des membranes modèles contenant du cholestérol [5].

Nous allons donc dans un premier temps, étudier la composition lipidique membranaire des différentes lignées utilisées dans nos travaux préliminaires (lignées hépatique, adipocytaire, neuronale et  $\beta$  pancréatique), mais également dans les îlots de rats sains ou diabétiques. Cette étude sera réalisée par spectrométrie de masse après purification des membranes plasmiques par ultracentrifugation, à l'institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets (Université de Bordeaux). Le résultat de l'analyse permettra d'identifier une signature lipidique pouvant correspondre à un motif favorisant la fibrillation et la toxicité d'hiAPP. Résultat possible #1 : le cholestérol est la signature lipidique induisant la fibrillation d'hiAPP. Dans ce cas nous traiterons les cellules et les îlots par des molécules modulant positivement ou négativement la biosynthèse du cholestérol (comme par exemple le tamoxifène ou l'éconodazole). Puis, nous analyserons la fibrillation et la toxicité d'hiAPP sur ces cellules traitées. Résultat possible #2 : un autre lipide est lié à la fibrillation d'hiAPP.

Nous réaliserons alors des expériences sur des membranes modèles, dans lesquelles les lipides d'intérêt auront été ajoutés à différentes concentrations. Nous étudierons i) la fibrillation d'hiAPP par fluorescence, ii) la structure d'hiAPP par spectroscopie ATR-FTIR et iii) les interactions hiAPP-membrane en mesurant par exemple l'endommagement de la membrane par fluorescence. Enfin, nous modifierons dans les lignées cellulaires les compositions lipidiques pour i) supprimer la signature protectrice dans les lignées où hiAPP ne fibrille pas, et ii) ajouter la signature lipidique dans les cellules où hiAPP fibrille et est toxique. Nous pourrions finalement relier la toxicité et la fibrillation d'hiAPP avec la présence de certains types de lipides.

## **2.2 Prévenir la fibrillation d'hiAPP en agissant sur la protéine TSPO**

Les maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson sont, comme le DT2, des amyloïdoses, impliquant l'agrégation de protéines amyloïdes toxiques, le peptide amyloïde  $\beta$  ( $A\beta$ ) et Tau pour la maladie d'Alzheimer et l' $\alpha$ -synucléine pour la maladie de Parkinson [6, 7]. Il a été observé que leur fibrillation, comme celle d'hiAPP, est favorisée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) [8]. Récemment, il a été montré qu'un ligand, activateur de la protéine translocatrice 18kDa (TSPO) pouvait inhiber la fibrillation d' $A\beta$ , Tau et de l' $\alpha$ -synucléine en réduisant la production de ROS [9, 10, 11]. Cette protéine nous intéresse à double titre puisque qu'elle a été identifiée comme transporteur de cholestérol au niveau de la membrane mitochondriale. En effet, en plus de moduler la production de ROS dans la cellule, elle participe également à la modulation du cholestérol membranaire (cf partie 1).

Le diabète de type 2 et les maladies neurodégénératives partageant de nombreux facteurs étiologiques communs [12, 13], nous souhaitons transposer les résultats obtenus sur le cerveau dans le pancréas. Pour cela, nous devons tout d'abord caractériser l'expression de TSPO dans cet organe et plus particulièrement dans les cellules  $\beta$  pancréatiques. Nos analyses préliminaires ont permis de montrer l'expression génique de TSPO dans des cellules de lignée  $\beta$  pancréatiques de rat Ins1 et dans les îlots humains. Dans les cellules Ins1, nos analyses préliminaires ont montré que i) l'expression de TSPO augmentait en réponse aux concentrations extracellulaires de glucose, mais diminuait en réponse au palmitate, qui est connu pour exercer une fonction diabétogène ; ii) l'expression de TSPO est augmentée d'un facteur 2 dans les îlots issus de patients en surpoids ou obèses mais non diabétiques. Nous voulons maintenant aller plus loin et caractériser l'expression de TSPO dans les modèles suivants : les cellules pancréatique Ins1, des îlots pancréatiques humains (qui expriment naturellement hiAPP), des îlots de rats contrôles et Goto-Kakizaki (GK), et des îlots pancréatiques de rats invalidés pour l'expression de TSPO (TSPO-KO).

### **2.2.1. Caractérisation de l'expression de TSPO dans le pancréas**

Dans un premier temps, nous déterminerons à l'aide de co-marquages immunohistochimiques la localisation de TSPO dans le pancréas et plus particulièrement dans l'îlot pancréatique, en marquant à l'aide d'anticorps TSPO d'une part et l'insuline et le glucagon d'autre part. Les marquages insuline permettront de déterminer différents paramètres morphométriques (masse des cellules  $\beta$ , densité et taille des îlots). Ces analyses seront réalisées dans les pancréas des rats contrôles, TSPO-KO, pour déterminer si l'absence de TSPO est importante sur le nombre des îlots et la masse des cellules  $\beta$ , et GK, pour déterminer si l'état diabétique joue sur l'expression de TSPO.

Le niveau d'expression (ARNm et protéines) de TSPO sera également déterminé dans les îlots de rats contrôles, TSPO-KO et GK.

### **2.2.2. Effet des ligands de TSPO sur les cellules $\beta$ dans un contexte diabétogène**

La suite de l'étude sera réalisée sur des îlots humains, qui co-expriment et co-sécrètent hiAPP avec l'insuline. Sur ces îlots, nous nous intéresserons à la fibrillation d'hiAPP et analyserons si celle-ci peut être modifiée par des ligands de TSPO en conditions standards et diabétogènes. Pour cela, la Thioflavine-T, une molécule fluoresçant lorsqu'elle est incorporée dans des fibres, sera ajoutée aux îlots et l'intensité de fluorescence sera mesurée afin de suivre la formation des fibres au cours du temps.

Nous analyserons également la fonction des cellules  $\beta$  en mesurant la sécrétion d'insuline par les îlots traités dans les mêmes conditions que précédemment, à savoir en condition standard ou diabétogène, en présence ou en absence de ligands de TSPO et en absence et en présence d'hiAPP. Les îlots seront cultivés en présence de concentrations croissantes de glucose et l'insuline sécrétée dans le milieu de culture sera dosée.

Sur les îlots cultivés de la même façon, nous pourrions mesurer la viabilité cellulaire (test MTT) ainsi que la production de ROS, en utilisant du 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate (DCFH-DA), une sonde fluorescente

couramment utilisée pour détecter et mesurer les ROS produits. A la fin de la période de culture, l'intensité de fluorescence sera mesurée. Les ARN seront également extraits pour mesurer l'expression de différentes enzymes (Mn-superoxyde dismutase, superoxyde dismutase 1 & 2, ...), dont l'expression est corrélée à la production mitochondriale de ROS.

### 2.2.3 Etude de la fibrillation d'hiAPP sur îlots de rats dépourvus en TSPO

Les rats invalidés pour TSPO (TSPO-KO) [14] sont disponibles sur Paris (Didier Morin, Inserm U955). A ce jour, aucune information sur les paramètres métaboliques ou leur masse de cellules  $\beta$  est disponible. Nous allons ainsi caractériser cette masse, et nous allons également isoler les îlots de rat contrôles ou TSPO-KO isolés. Ces îlots seront cultivés dans des conditions normales ou diabétogènes, en présence ou en absence d'hiAPP et en présence ou en absence de ligands de TSPO. L'ajout de hiAPP exogène est nécessaire, car seule la forme humaine forme des fibres, alors que la forme murine, dont la séquence en acide aminés diffère par 6 acides aminés seulement, n'en forme pas.

Pour chaque d'expérience, la sécrétion d'insuline, la production de ROS, la viabilité cellulaire seront mesurées, ainsi que la fibrillation d'hiAPP. Nous pourrions ainsi déterminer le rôle de TSPO quant à la protection de la masse et de la fonction des cellules  $\beta$  du pancréas lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions délétères. De même, nous pourrions lier la fibrillation d'hiAPP à la production de ROS, et déterminer l'importance de TSPO dans le processus de protection. Enfin, l'utilisation de ligands de TSPO permettra de conclure quant à leur intérêt dans la production de ROS, la fibrillation d'hiAPP et la survie des cellules  $\beta$ . Ainsi, les résultats apportés dans cette partie permettront de conclure quant à l'effet bénéfique des ligands de TSPO sur la fibrillation d'hiAPP et la survie des cellules  $\beta$ .

### **3.Faisabilité**

Ce projet s'appuiera sur l'expertise complémentaire de Ghislaine Guillemain (CRCN, HDR, Inserm) du centre de recherche de St-Antoine (CRSA, Paris) et de Lucie Khemtemourian (CRCN, HDR, CNRS) de l'institut de Chimie et Biologies de Membranes et des Nano-objets (Université de Bordeaux). GG possède une solide expertise sur la physiologie et la fonction du pancréas endocrine, ainsi que toutes les compétences pour réaliser les expériences *in cellulo*. LK possède une solide expertise dans le domaine des protéines amyloïdes et plus particulièrement hiAPP et des membranes modèles ainsi que toutes les compétences pour réaliser les expériences de biophysiques. Ensemble, elles ont co-encadré deux étudiantes de L3 (Noa Kadmiel, 2020, Amandine Rossel, 2020) de l'université de Bordeaux, deux étudiantes de M1 (Audrey Binabout, 2016, Amélie Vandendaele, 2017) de Sorbonne Université et elles ont co-dirigé une étudiante de thèse (Shadai Salzar Vazquez, soutenu en octobre 2019). GG et LK ont de plus publié deux articles de recherche (Khemtemourian et al., Biochimie, 2017 et Salazar Vazquez et al., Biochimie, 2019) ainsi qu'une revue (Guillemain et al. BBA-Biomembranes, 2022). Ce projet bénéficiera également de l'expertise du Dr J.J. Lacapère, un expert reconnu de la protéine TSPO.

La première année de thèse, l'étudiant(e) réalisera la 1<sup>ère</sup> partie du projet (2.1) au CBMN (Bordeaux). La 2<sup>ème</sup> partie (2.2) sera réalisée au cours des années 2 et 3 de thèse, au CRSA (Paris). Des visio-réunions seront mises en place toutes les 2 semaines pour coordonner et assurer le bon suivi du projet.

### **4.Bibliographie**

1. Butler, A.E., et al., DOI: 10.2337/diabetes.52.1.102
2. Young, A., et al. doi.org/10.1016/S1054-3589(05)52004-0
3. Westermark, P., et al. DOI: 10.1152/physrev.00042.2009
4. Matveyenko, A.V., et al. DOI: 10.1093/ilar.47.3.225
5. Caillon, L., et al., et al. DOI: 10.3109/09687688.2014.987182
6. Dehay, B. et al., DOI: 10.1016/j.neurol.2016.04.003
7. Gulisano, W. J., et al., DOI: 10.3233/JAD-179935
8. Zhang, P., et al., DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.034
9. Dimitrova-Shumkovska et al., doi: 10.3390/cells9040870
10. Grimm, A., et al., DOI: 10.1111/jne.12796
11. Lejri, I., et al., DOI: 10.3233/JAD-190127
12. Shi, Q. et al, DOI: 10.1136/bmjopen-2018-024954
13. Hamzé, R. et al., doi: 10.3390/ijms232315287.
14. Giusti, L. J Cell Biochem, 1997. 64(2): p. 273