

Calcium et diabète

Le calcium a longtemps été considéré comme un matériau relativement inerte dans l'organisme. Cependant, sa mise en évidence en tant que second messager intracellulaire (par exemple pour le peptide-c) et ses **potentialités électrophysiologiques** en font un ion d'une grande importance dans les phénomènes dynamiques mettant en jeu des **échanges transmembranaires et des perturbations des sécrétions cellulaires** qui sont d'une importance majeure dans le diabète NID; à tel point qu'il faut se demander si, dans une large proportion, cette maladie ne serait pas avant tout liée à une altération du métabolisme calcique!

Cet ion est fonctionnellement impliqué dans les processus suivants:

- perméabilité cellulaire
- excitabilité neuro-musculaire
- divisions cellulaires
- cohésion entre les cellules épithéliales
- assemblage des microtubules
- réponse hormonale (second messenger)

Le métabolisme du calcium est lié à un ensemble de protéines régulatrices, les calciprotéines, dont la plus connue est la calmoduline. Cette molécule a la capacité de fixer 4 ions calcium qui modifient sa conformation et la rendent active, c'est-à-dire capable d'influer sur l'activité d'autres enzymes (le plus souvent pour les activer). Ainsi, dans les cellules musculaires squelettiques, la calmoduline constitue une sous-unité de l'ensemble phosphorylase b kinase qui active la glycogénolyse nécessaire à l'obtention de l'énergie destinée aux phénomènes contractiles. Dans l'organisme, la régulation de la teneur en calcium des os, du rein et du tube digestif est surtout assurée par l'hormone para-thyroïdienne (PTH) qui accroît la calcémie. Au niveau intestinal, elle stimule le transport actif de calcium. Sa libération est fonction de la teneur en calcium du liquide extracellulaire de la glande parathyroïde.

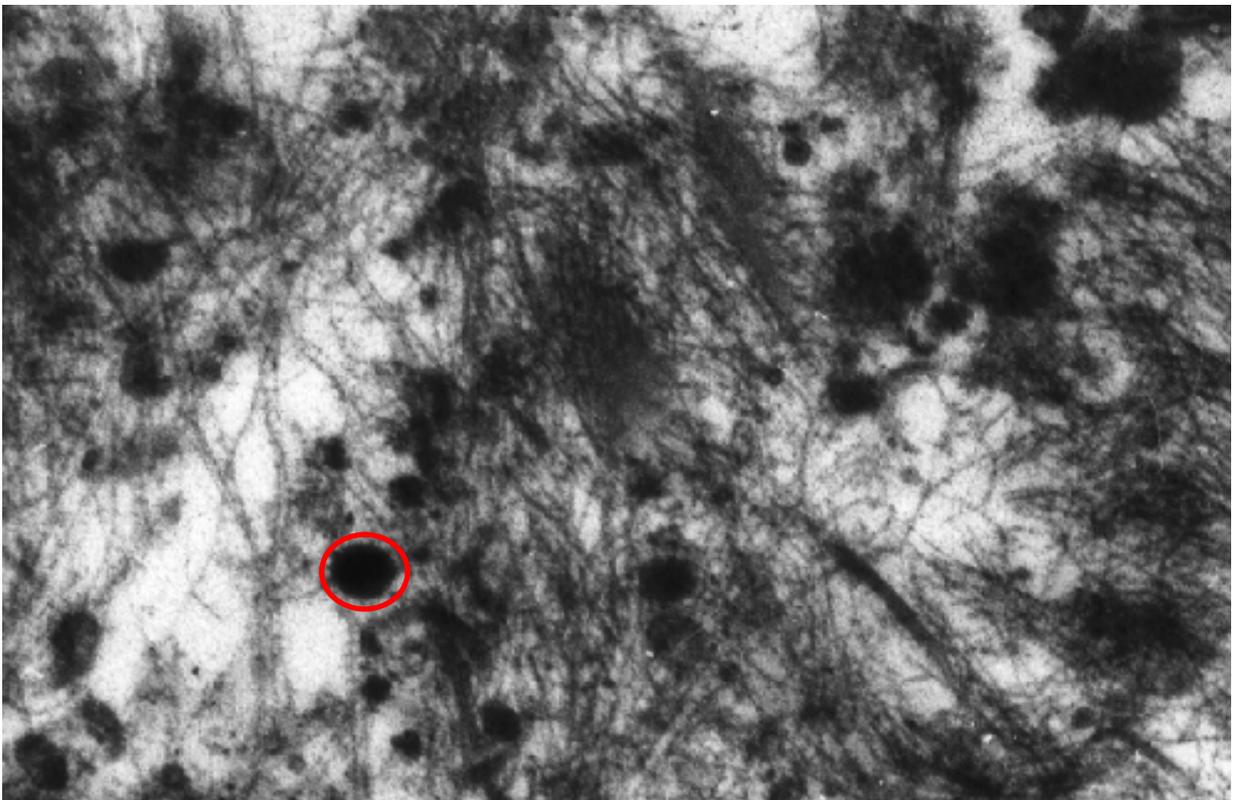
L'importance métabolique du calcium dans les cellules est probablement due aux mécanismes de couplages énergétiques qui font appel à de nombreux composés phosphorylés. Les phosphates, formant avec le calcium des sels insolubles, peuvent ainsi priver les cellules d'énergie. En conséquence, le gradient de concentration du calcium rejeté dans les espaces extracellulaires est de l'ordre de 10^5 , ce qui représente le plus fort gradient connu. Les réserves calciques rapidement disponibles pour les cellules sont constituées par un pool extracellulaire localisé au niveau de la matrice et par un pool intracellulaire constitué des vésicules du reticulum endoplasmique lisse

De façon générale, l'entrée du calcium dans le cytoplasme constitue une information principalement relayée par deux molécules, la calmoduline et la protéine kinase C (PKC), dont la stimulation active une pompe à calcium qui expulse ces ions. Leur concentration n'augmente donc que transitoirement et dans un volume limité, sous membranaire, du cytoplasme. Les hormones (angiotensine 2 par exemple) dont la liaison au récepteur déclenche l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol-2-phosphate en DAG et IP3 provoquent, grâce à ce dernier, une libération interne de calcium qui agit alors sur la calmoduline. Cette première vague calcique provoque la fixation de la PKC dans la membrane. Cette fixation perdure, active le recyclage de l'ion et stimule des enzymes. On a donc une action en 2 temps:

- une première vague calcique active la calmoduline qui relaie son action sur d'autres protéines
- une deuxième vague agit sur la PKC, fixée alors dans la membrane plasmique, qui modifie la phosphorylation d'autres protéines. Si la stimulation est répétée, un nombre supérieur de molécules de PKC se lie à la membrane, intensifiant la réponse cellulaire au stimulus.

Le métabolisme du calcium peut être directement impliqué dans le diabète NID, et ce à la fois au niveau de la cellule B, en intervenant dans le mécanisme par lequel la réponse de ces cellules au glucose est altéré, et au niveau des nombreux organes touchés par les complications dégénératives caractéristiques du diabète de type 2.

Au cours de cette maladie, l'homéostasie cellulaire du calcium est perturbée dans une grande variété de cellules et de tissus. Cependant, il n'est pas clairement établi si ces changements précèdent ou succèdent l'état diabétique. Il est probable que certains d'entre eux sont impliqués dans les causes du diabète alors que d'autres n'en soient que des conséquences, en particulier au niveau des atteintes vasculaires. Le métabolisme calcique est perturbé aux niveaux rénal, cardiaque, oculaire (rétine et cristallin), vasculaire (plaquettes, érythrocytes, endothélium), musculaire, hépatique, osseux, adipeux, nerveux (cerveau et nerfs périphériques) et **pancréatique (cellule B)** : tout l'organisme est donc atteint! Une hyperglycémie, caractéristique de l'état diabétique, provoque un afflux de calcium dans la cellule, une diminution du flux sortant de cet ion et, dans certains types cellulaires, la mobilisation des réserves calciques. Il en résulte une **augmentation du taux de calcium intracellulaire**.



Agrégats de calcium dans un pancréas diabétique vus en microscopie électronique. (x37500)

LE CALCIUM INTERVIENT DANS LA PERTE DE SENSIBILITE DE LA CELLULE B AU GLUCOSE

La réponse des cellules B au glucose est fortement dégradée dans l'état diabétique. Une hyperglycémie provoque une **désensibilisation de la cellule B**: celle-ci réagit de moins en moins à des stimulations glucosées répétées, pouvant par exemple correspondre à ce qui se passe *in vivo* dans des périodes d'hyperglycémie chronique. La "sur-stimulation" des cellules B altère leur réponse au glucose de façon continue mais cependant réversible: elle n'induit pas une gluco-intoxication des cellules B qui est plus tardive et cette fois irréversible.

• La sécrétion d'insuline est liée au taux de calcium intracellulaire

En réponse au glucose sanguin, il s'établit dans la cellule B un flux calcique dirigé de l'extérieur de la cellule vers le cytoplasme, puis qui atteint les mitochondries. Ce flux s'accompagne d'une élévation du taux d'acides aminés. Dans des cellules B saines, ces modifications de la concentration calcique provoquent par exemple l'activation d'une protéine kinase calcium dépendante, la CaMK II (sous ses isoformes α et β) qui est associée aux vésicules de sécrétion et est impliquée dans l'exocytose des granules contenant l'insuline. **Celle-ci est déficiente**, de façon accentuée dans le MODY, ensemble d'affections d'origine génétique, et **dans le diabète NID**. Les mécanismes intracellulaires d'utilisation du calcium sont également perturbés au niveau des cellules endocrines pancréatiques du lapin développant un diabète de type 2.

Les cellules B pancréatiques possèdent, à l'instar des neurones, un canal transmembranaire calcique de type T qui est à plus de 96 % homologue à celui des neurones. Cette protéine de 2288 acides aminés possède un domaine transmembranaire conservé et permet l'entrée du calcium dans le cytoplasme. Elle est également exprimée dans le rein, le cerveau et le cœur chez le nouveau-né. Ce canal influe sur le potentiel électrique de la membrane cellulaire, ce qui revêt une grande importance car **il conditionne en grande partie les processus d'exocytose** indispensables à la sécrétion d'insuline. Ainsi, toutes les cellules B pancréatiques peuvent être décrites comme étant électriquement couplées. L'activation des canaux calciques membranaires est dépendante de la protéine G et peut donc faire suite à l'activation de nombreux récepteurs hormonaux. Dans des îlots isolés, **l'activation du gène de l'insuline** en réponse à une stimulation hormonale assurée par l'hormone de croissance ou la prolactine nécessite, outre le second messager STAT5, l'assimilation de calcium.

• Le calcium influe sur le rythme basal de la sécrétion insulinaire

La sécrétion d'insuline est, physiologiquement, pulsatile (5 à 10 mn entre chaque "bouffée sécrétoire"). Or, la fréquence de sa libération correspond aux variations de concentrations cytoplasmiques en calcium. Cependant, cette pulsatilité dépendrait surtout du rapport ATP/ADP agissant en synergie avec le calcium ainsi qu'avec un **facteur d'origine mitochondriale** encore mal connu, mais qui activerait la conversion du phosphatidyl inositol en inositol tri phosphate et di-acyl-glycérol. Le malonyl CoA mais surtout les **acylCoA à longue chaîne** (Acyl CoA LC) ont été proposés en tant que stimulants mitochondriaux de l'insulino-sécrétion.

La gestion temporelle de la libération d'insuline est importante: **un meilleur effet hypoglycémique est obtenu avec une sécrétion pulsatile plutôt qu'avec une production continue.** Cette sécrétion pulsatile, observée sur des îlots isolés, est coordonnée dans l'ensemble du pancréas. Bien que plusieurs facteurs aient été suspectés d'être le "pace-maker" de cette sécrétion, il semble que le ganglion intrapancréatique soit largement impliqué dans ce rôle: lorsqu'il est endommagé, l'intolérance au glucose progresse.

Dans le diabète NID, le rythme de la sécrétion insulinaire est perturbé, ce qui peut être relié à une diminution (régulation négative) des récepteurs à l'insuline. Outre le calcium intracellulaire, d'autres facteurs tels que des signaux nerveux, d'autres hormones ou le récepteur à l'insuline des cellules B, ne sont pas à exclure pour expliquer le rythme des sécrétions. Sur des îlots isolés, on a mis en évidence que **l'amplitude sécrétoire** est diminuée dans le cas du diabète NID plutôt que la fréquence de sécrétion. Dans d'autres modèles de diabète, ces dysfonctionnements de la pulsativité sécrétoire ont pu être reliés à l'activité de la glucokinase, de la phospho-fructokinase et à l'ARN de transfert mitochondrial de la leucine.

- **Les mitochondries sont la source d'un facteur déclenchant l'exocytose d'insuline**

Le glucose étant par excellence le substrat énergétique des cellules de l'organisme et les mitochondries constituant la source d'énergie des cellules animales, il n'est pas surprenant que ces organites interviennent dans la régulation de la réponse insulinaire au taux circulant de glucose. L'analyse de certaines variations génétiques dans la transmission du diabète NID ou d'affections apparentées (MODY) a permis de mettre en lumière le rôle important des mitochondries pour assurer le fonctionnement correct de la réponse des cellules B au glucose. L'insulinosécrétion nécessite donc **l'activation du métabolisme mitochondrial.** Une diminution de la réaction des mitochondries au calcium est impliquée dans la désensibilisation de la cellule B vis-à-vis du glucose. Ce phénomène est important car des mutations de l'ADN mitochondrial sont à l'origine d'une forme de diabète NID génétiquement transmise par la mère. Ces mutations perturbent également la sécrétion insulinaire en réponse au glucose dans des cellules en culture qui pourtant conservent leurs potentialités sécrétoires par réaction au calcium: mitochondries et calcium semblent donc être tous deux indispensables à l'activité sécrétoire de la cellule B.

Le glucose déclenche dans les cellules B la production d'ATP par le mécanisme classique impliquant glycolyse-cycle de Krebs et activation des chaînes respiratoires mitochondriales. Cet ATP provoque **l'entrée de calcium dans le cytoplasme** qui est suivie de l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline. L'augmentation cytosolique et surtout mitochondriale de la teneur en calcium est indispensable à la réponse de la cellule: un blocage de l'entrée de cet ion conduit à une diminution de la gluco-oxydation cellulaire. En effet, l'élévation de la teneur calcique mitochondriale conduit à l'activation des déshydrogénases calcium-dépendantes du cycle de Krebs (-cétoglutarate et NADH isocitrate déshydrogénase). Il y a formation de $\text{NADH} + \text{H}^+$ et FADH_2 , ce qui permet la synthèse d'ATP. NADH et FADH_2 , transférés à la chaîne respiratoire des crêtes mitochondriales, hyperpolarisent la membrane de cet organite. Ce transfert **active un**

transporteur calcique mitochondrial (protéine de 18 KDa) de faible affinité. Le calcium supplémentaire qui entre ainsi stimule davantage les déshydrogénases. Cependant, l'hyperpolarisation diminue la consommation d'oxygène et le taux de H^+ qui sont rejetés par la chaîne de transport des électrons. Ceci exerce une régulation négative s'opposant aux effets calciques. La synthèse de glutamate qui résulte de l'activité mitochondriale participe à l'exocytose des granules contenant l'insuline.

- **Les mitochondries sont à l'origine de la perte de sensibilité au glucose des cellules B**

Les mitochondries jouent un rôle déterminant non seulement dans la promotion de la sécrétion insulinaire mais également dans la perte de sensibilité des cellules B au glucose. Cette désensibilisation a été observée chez plusieurs modèles animaux de diabète NID. Chez le rat, elle se manifeste par une diminution de l'insulino-sécrétion et de l'entrée du calcium dans la cellule. Sur des cellules isolées, une première stimulation de la sécrétion insulinaire par le méthyl-succinate augmente le taux de calcium mitochondrial. Si cette stimulation est répétée 5 mn plus tard, cette augmentation ne se produit plus, et l'insulino-sécrétion est fortement réduite: tout se passe comme si **la cellule B stimulée intensément développait une période réfractaire pendant laquelle elle devient insensible au stimulus glucose**. Le succinate utilisé pour stimuler la cellule B, tout comme l' γ -glycérophosphate, activent la chaîne de transport mitochondriale des électrons et aboutissent à une synthèse d'ATP. Ceci provoque, alors, l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale qui stimule la synthèse d'ATP et l'entrée de calcium via un transporteur. Expérimentalement, on a mesuré qu'une quantité de calcium extramitochondrial multipliée par 5 aboutit à un quadruplement de l'oxydation mitochondriale du succinate. Lors d'une seconde stimulation, le succinate diminue l'entrée de calcium dans la mitochondrie et il en est de même pour l' γ -glycérophosphate: ces deux composés provoquent une **désensibilisation croisée** de la cellule B. L'étude de l'état de polarisation de la membrane mitochondriale entre deux stimulations a montré qu'en fait **la désensibilisation observée implique surtout le transporteur mitochondrial du calcium**.

LE CALCIUM INTERVIENT DANS LES COMPLICATIONS DÉGÉNÉRATIVES DIABÉTIQUES

Le calcium est un facteur primordial de plusieurs processus dégénératifs liés au diabète. Il exerce son influence au niveau cellulaire (apoptose, métabolisme), moléculaire (polymérisation, dépôts) et organique (hypertension).

- **apoptose**

Le calcium est impliqué dans les phénomènes apoptotiques liés à l'état diabétique, particulièrement au niveau nerveux mais également pancréatique. En effet, le suicide de certains neurones est précédé d'une entrée de calcium dans ces cellules. De même, le contrôle de la transcription du gène du BDNF, molécule protégeant les neurones auditifs de l'apoptose, est assuré par le taux cellulaire de calcium.

Dans les cellules B, la production inadéquate de NO provoque un afflux calcique activant des protéases dépendantes du calcium comme la calpaïne, qui déclenchent à leur tour les phénomènes apoptotiques. Dans les cellules humaines, la protéine de choc thermique hsp 70 exerce à ce niveau une action protectrice contre l'influence délétère de NO sur les mitochondries. Il existe également des liens entre le calcium et la polymérisation des fibres

amyloïdes qui peuvent générer une apoptose au niveau nerveux et pancréatique.

- **polymérisation de molécules fibrillaires**

La polymérisation des fibres amyloïdes pourrait permettre la formation de canaux transmembranaires à l'origine d'une entrée inopportune de calcium dans le cytoplasme des neurones ou des cellules B. Le calcium permet également au composant P amyloïde ou à son précurseur SAP de jouer un rôle dans la formation des fibres et surtout des dépôts amyloïdes.

Au niveau des membranes basales, modifiées et dégradées par l'état diabétique, le calcium participe à l'assemblage des laminines. Il se fixe également sur les fibulines pour stabiliser les réseaux collagène / laminine.

- **constitution de dépôts calciques**

Au niveau vasculaire, la macroangopathie diabétique est associée à une accumulation de calcium provoquant l'induration des gros vaisseaux. L'infiltration calcique des lésions athéromateuses aboutit à la formation de dépôts se constituant principalement au niveau des plages lipidiques. La calcification résulte également d'un phénomène actif: chez la souris, un état diabétique hyperinsulinémique associée à une nourriture riche en graisse provoque **l'activation des gènes ostéoblastiques** (Msx1 et 2) et du gène Opn de l'ostéopontine au niveau de l'adventice. Opn peut également être exprimé par des macrophages et des cellules musculaires intimes. La calcification vasculaire peut donc provenir activement de l'activité ostéoblastique d'une population cellulaire de l'adventice. Ceci peut contribuer à expliquer pourquoi, chez les sujets diabétiques, les calcifications sont beaucoup plus précoces et étendues que chez les sujets ne souffrant pas de cette affection. L'induration de la paroi artérielle qui en découle ainsi que la confluence des différentes plaques aboutissent à la transformation de cette paroi, particulièrement au niveau de l'aorte abdominale, en un tuyau rigide et inextensible.



Dans la fibrose calcifiante, la pancréatite évolue par dépôt de calculs calcifiés et on note des zones fibreuses dispersées dans un tissu acineux normal. Chez le modèle de diabète NID induit chez le lapin par ligature du canal pancréatique, la fibrose s'installe d'abord uniformément en remplacement du tissu acineux et est ainsi classée dans la catégorie de pancréatite chronique obstructive. Mais le dépôt de collagène concomitant du processus de destruction des cellules acineuses par apoptose et par la suite la présence de nombreuses plaques de fibrilles amyloïdes corrélées au composant p-amyloïde, la dégénérescence de la trame conjonctive changée en tissu adipeux à long terme ainsi que la visualisation de nombreux cristaux de calcium dans les canaux et d'agrégats calciques attestent d'une pancréatite fibro-calcifiante.

- **Liens avec le métabolisme de l'insuline**

Outre ses effets sur l'insulino-sécrétion, le calcium ainsi que les molécules qui sont associées à son métabolisme, peuvent interférer avec les voies de signalisation insuliniques. Ainsi, les substrats du récepteur à insuline IRS 1 et IRS2 peuvent se fixer sur la calmoduline, ce qui provoque une entrée de calcium dans la cellule. Ainsi, il se produit une compétition entre IRS et la calmoduline. Le calcium est également impliqué dans l'effet vasodilatateur de l'insuline.

• Implication dans l'hypertension associée au diabète

Le diabète NID s'accompagne fréquemment d'une hypertension artérielle, d'origine plurifactorielle (dyslipidémie, insulino-résistance, perturbations endocrines...) dans laquelle le calcium intervient également, en particulier au niveau du rein. L'état diabétique provoque une augmentation de la teneur en calcium intracellulaire au niveau de l'appareil juxta-glomérulaire qui, via la sécrétion de rénine, contrôle pour une large part la pression artérielle. Les perturbations du stockage, et des flux calciques, aboutissent à une activation inadéquate des mécanismes tendant à augmenter la pression artérielle. En effet, le calcium est le second messenger de tous les facteurs, hormonaux ou nerveux, stimulant la sécrétion de pro-rénine. Il est donc légitime que l'administration de molécules bloquant les canaux calciques, les antagonistes du calcium (inhibiteurs des canaux calciques - HCC) améliore l'hypertension chez le diabétique. Après de récentes et multiples controverses sur le rapport risque / bénéfice de cette thérapie, il apparaît que l'administration d'HCC aux diabétiques hypertendus diminue bien le risque de développer des maladies cardiovasculaires majeures. Il faut noter que cette restriction est bien plus importante chez le sujet diabétique que chez le sujet non diabétique, confirmant ainsi le rôle de cet ion dans cette maladie.

• Imbrication du métabolisme calcique et des produits des cellules endocrines pancréatiques

La séquence de l'IAPP produit par les cellules B humaines est homologue à 50 % avec celle du CGRP, peptide voisin de la calcitonine. CGRP et calcitonine possèdent un effet hypocalcémiant qui s'exerce au niveau du rein, de l'os mais également du tube digestif en période post-prandiale. Ces molécules ont également un effet vasodilatateur et cardiostimulant. Possédant des affinités différentes pour des récepteur identiques ou voisins, calcitonine, CGRP et IAPP interagissent ensemble au niveau des capillaires sanguins, cibles de la micro-angiopathie diabétique.

Le calcium présente donc un ensemble de caractéristiques qui en font un ion dont les interactions avec les cellules et processus touchés par la pathologie diabétique sont tels que son étude demeure importante pour la compréhension des mécanismes fondamentaux de cette maladie.

Tout dérèglement métabolique, au niveau de l'individu entier, dans n'importe quelle pathologie et par conséquent dans le diabète NID passe par l'intermédiaire de l'ion ou d'agrégats de calcium. Cette molécule apparaît indispensable au maintien d'un état de bonne santé et intervient dès que l'on passe à un état maladif.

