

### III. Troisième partie : Métallothionéines et altérations phénotypiques des cellules $\beta$ soumises à une concentration faible de glucose

Jessica Duprez, Jean-Christophe Jonas

Résultats non publiés

But : Le premier but de cette étude était de déterminer, à l'aide d'îlots de souris contrôles (WT) et knock-out pour les gènes *Mt1/2* (*Mt1/2* KO), si les effets protecteurs du  $Zn^{2+}$  observés précédemment dans des îlots de rat dépendent de la stimulation d'expression des MT1/2 qu'il provoque.

Le deuxième but était d'étudier l'impact d'une inactivation des gènes *Mt1* et *Mt2* sur l'apoptose et l'oxydation du glutathion mitochondrial provoqués par les concentrations faibles de glucose.

Résultats : Aucune différence significative entre les deux types de souris n'a été observée quant à leur poids, leur glycémie à l'état nourri, la sécrétion d'insuline par les îlots cultivés 18h en présence de concentrations croissantes de glucose, ou l'expression des gènes *Hmox1* et *c-Myc* dans ces îlots.

Contrairement à nos observations dans les îlots de rat, le  $ZnCl_2$ , bien qu'il conserve son effet inducteur de *Mt1*, ne protégeait pas les îlots de souris WT contre l'apoptose provoquée par la culture en présence de 2 mmol/l de glucose, m'empêchant ainsi d'étudier l'impact de l'expression des MT1/2 sur cet effet.

L'apoptose des cellules  $\beta$  provoquée par une semaine de culture en présence de G2 n'était pas plus élevée dans les îlots de souris *Mt1/2* KO vs. les îlots de souris WT. De plus, l'oxydation des thiols mitochondriaux, qui n'était pas influencée par la diminution de la concentration en glucose dans les îlots de souris contrairement à nos observations chez le rat, était étonnamment diminuée dans les cellules issues d'îlots de souris *Mt1/2* KO vs. souris WT cultivées en présence de G10 mais pas de G2.

Conclusions : Contrairement aux îlots de rat, le  $Zn^{2+}$ , bien qu'il augmente l'expression de *Mt1*, ne protège pas les îlots de souris WT de l'apoptose induite par la culture en présence d'une concentration faible de glucose. Dans des îlots de souris WT, la culture en présence de G2 augmente l'apoptose par un mécanisme qui ne semble pas faire intervenir l'oxydation du glutathion dans la mitochondrie. De plus, l'inactivation des gènes *Mt1/2* ne modifie pas l'apoptose provoquée par la culture en présence d'une concentration faible de glucose dans les îlots de souris.

## 1. Introduction

Dans l'étude précédente, j'avais démontré que le  $\text{Zn}^{2+}$ , un inducteur des MT1/2, a un rôle protecteur contre l'apoptose des cellules  $\beta$  et l'oxydation de la sonde mt-roGFP1 après culture en présence de concentrations extrêmes de glucose. Je n'avais cependant pas élucidé les mécanismes sous-jacents. Dans cette étude, je voulais tester, en utilisant des souris dont les gènes *Mt1/2* ont été inactivés, l'hypothèse que cet effet protecteur fait intervenir l'expression des MT1/2. Il était cependant indispensable de vérifier si les effets du  $\text{Zn}^{2+}$  sur les cellules  $\beta$  de souris étaient semblables à ceux précédemment décrits chez le rat.

D'autre part, différents arguments m'ont convaincue d'étudier les effets de l'inactivation des gènes *Mt1/2* sur les altérations phénotypiques des cellules  $\beta$  provoquées par la culture en présence d'une concentration faible de glucose. En effet, alors que ces altérations sont relativement bien définies (voir section II de cette thèse), les mécanismes impliqués sont peu connus et méritent une attention particulière. L'analyse du transcriptome d'îlots de rat après culture pendant 18h en présence de 2, 5, 10 ou 30 mmol/l de glucose a permis de déterminer que *Mt1a* est un des cinq gènes dont l'expression est la plus modifiée par le glucose selon un profil similaire à celui de l'apoptose et des altérations de fonction des cellules  $\beta$  (Bensellam et al., 2009). L'utilisation des souris *Mt1/2* KO devrait me permettre de déterminer si l'augmentation importante de l'expression des *Mts* provoquée par une concentration faible de glucose a un effet protecteur ou n'est qu'un simple marqueur d'une augmentation de divers types de stress dans cette condition.

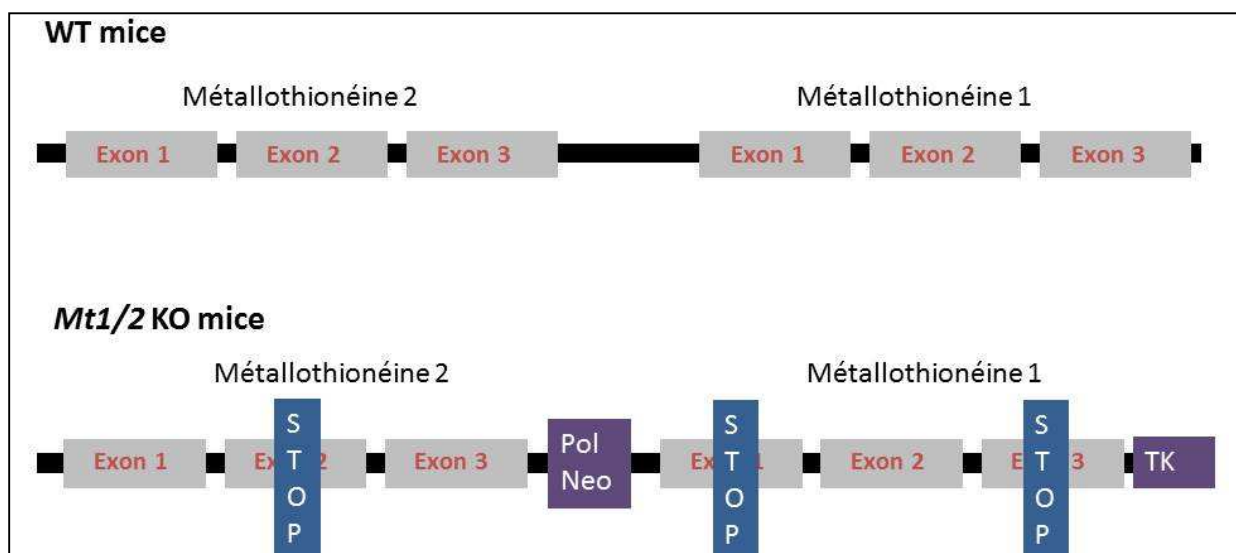
Différents auteurs se sont intéressés aux effets de l'inactivation des gènes *Mt1/2* dans la régulation de la balance énergétique chez la souris. Ainsi, Beattie et al. ont démontré que les souris *Mt1/2* KO (fond génétique 129/Ola et C57BL/6J) (Michalska & Choo, 1993) développaient une obésité modérée à partir de la sixième semaine de vie et une obésité plus sévère (particulièrement chez les mâles) à partir de la 22<sup>ème</sup> semaine de vie, avec accumulation de graisse et augmentation des taux plasmatiques de leptine et d'insuline (Beattie et al., 1998). Cependant, il n'est pas clair si cette obésité est associée à une hyperglycémie. En effet, il a été démontré que la glycémie des souris *Mt1/2* KO était semblable (Rofe et al., 1996) ou légèrement plus faible que celle des souris WT (Laychock et al., 2000), mais cette différence de glycémie n'est que mentionnée dans l'abstract sans donnée disponible dans le corps de l'article. Ces derniers auteurs ont également démontré que la sécrétion d'insuline basale et stimulée par le glucose était nettement diminuée dans les souris déficientes en *Mt* par rapport aux souris contrôles alors que le contenu en insuline des îlots était semblable (Laychock et al., 2000).

Dans une autre étude, Apostolova et al. ont suggéré qu'une augmentation du  $\text{Zn}^{2+}$  libre joue un rôle protecteur dans le DT2 indépendamment de l'augmentation d'expression des MT1/2. En effet, ils ont montré qu'une faible supplémentation en  $\text{ZnSO}_4$  (1 mg/kg de poids corporel) ne prévenait pas le développement du diabète induit par la STZ chez les souris contrôles mais bien chez les souris *Mt1/2* KO qui ont un pouvoir chélateur du  $\text{Zn}^{2+}$  plus faible, alors qu'un supplément en  $\text{ZnSO}_4$  dix fois supérieur prévenait l'hyperglycémie provoquée par l'injection de STZ dans les deux types de souris. Les auteurs ont attribué cet effet protecteur à

l'augmentation du  $Zn^{2+}$  libre et à un rétablissement de l'activité de la SOD pancréatique et hépatique (Apostolova et al., 1997), et non à la stimulation de l'expression des MT1/2.

L'ensemble de ces résultats parfois contradictoires m'a conforté dans l'idée qu'il était intéressant de réétudier la question.

### 1.1 Modèle expérimental utilisé dans cette étude : les souris *Mt1/2* knock-out



**Figure 32. Construction génétique permettant l'inactivation des *Mt1* et *Mt2*.** Les *Mts* 1 et 2 contiennent chacune trois exons. L'inactivation des *Mts* a été réalisée par l'insertion d'un codon STOP au niveau de l'exon 2 de la *Mt2* et de deux codons STOP au niveau des exons 1 et 3 de la *Mt1*. Figure adaptée de (Masters et al., 1994).

Chez la souris, les gènes *Mt1* et *Mt2* se situent sur le chromosome 8 et sont séparés de ~6 kilobases. Comme illustré à la figure 32, des souris *Mt1/2* KO ont été générées en insérant trois paires d'oligonucléotides codant pour des codons STOP, un au niveau du site de restriction *Bam*HI de l'exon 2 de la *Mt2*, et deux aux sites *Age* I de l'exon 1 et au site *Sst* II de l'exon 3 de la *Mt1* (Masters et al., 1994). Un gène de résistance à la néomycine (Pol Neo) a été inséré entre les deux gènes des *Mts* pour la sélection positive, alors que le gène de la thymidine kinase (TK) a été inséré pour la sélection négative. Après génération des souris chimériques hétérozygotes, celles-ci n'ont été croisées qu'avec des souris de fond génétique 129/SvCPJ, ces dernières servant de souris contrôles (WT pour wild-type). Etant donné l'insertion de codons STOP, les gènes sont toujours transcrits mais les ARNm sont plus longs que dans les souris WT. Par contre, la traduction de ces transcrits est arrêtée au niveau des codons STOP ; il y a donc production de deux protéines tronquées de 10 et 6 acides aminés pour la MT1 et d'une protéine tronquée de 14 acides aminés correspondant au début de la protéine MT2. Ces polypeptides ne sont pas détectés par le test de liaison au cadmium radioactif mais pourraient être détectés par les anticorps polyclonaux spécifiques des MTs. Les souris *Mt1/2* KO ne montrent aucun phénotype anormal évident et ont une viabilité et une fertilité normales, avec des portées d'en moyenne 5 animaux. Ces souris sont beaucoup plus sensibles à la toxicité du Cd ; en effet, alors qu'aucune souris contrôle n'a succombé après 14 jours d'injection quotidienne de 10  $\mu$ mol/kg de Cd, quasi toutes les souris *Mt1/2* KO étaient mortes ou proche de la mort après seulement quatre jours d'injection (Masters et al., 1994).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Animaux

Les souris *Mt1/2* KO (129S7/SvEvBrd-*Mt1*<sup>tm1Bri</sup> *Mt2*<sup>tm1Bri</sup>/J) et les souris contrôles 129S1/SvImJ ont été achetées au Jackson Laboratory. Elles ont été élevées dans des conditions standards. Pour chaque expérience, des souris knock-out et contrôles d'âge similaire et de même sexe ont été utilisées. Un génotypage a été effectué pour chaque souris utilisée lors des expériences suivant le protocole fourni par le Jackson laboratory.

### 2.2 Isolement des îlots et culture

Les îlots pancréatiques de souris ont été isolés par digestion du pancréas à la collagénase suivi d'un gradient de densité comme précédemment décrit (Duprez & Jonas, 2011). Les îlots ont été précultivés pendant une semaine à 37°C et en présence de 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu RPMI 1640 sans sérum (Invitrogen, Carlsbad, CA) contenant 10 mmol/l de glucose, 5g/l de BSA (Fraction V, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Ils ont ensuite été cultivés pendant 18h à une semaine en présence de 2, 5, 10 ou 30 mmol/l de glucose (G2, G5, G10 ou G30) +/- 100 µM de ZnCl<sub>2</sub> (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, New Jersey, USA) avant d'effectuer les diverses expériences décrites ci-dessous. Toutes les manipulations ont été approuvées par le comité d'éthique local pour l'expérimentation animale.

### 2.3 Mesures de la sécrétion d'insuline et de l'expression des ARNm

Après 18h de culture, la concentration d'insuline a été mesurée dans le milieu par RIA en utilisant de l'insuline de rat comme standard (Heding, 1972), et l'ARN total des îlots a été extrait. L'ARN a ensuite été rétro-transcrit en ADNc comme précédemment décrit (Duprez et al., 2012). Les PCR en temps réel ont été réalisées avec un système de détection CFX96<sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). Les séquences des amorces et les conditions de réactions sont présentées ci-dessous.

| Gène         | Primer sens (5'-3')      | Primer anti-sens (5'-3') | Taille de l'amplicon (pb) | AT (°C) | Extension (°C) | Tm (°C) |
|--------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------|----------------|---------|
| <i>Tbp</i>   | ACCCCTTCACCAATGACTCCTATG | TCAGCATTTCTGGCAGCAAGT    | 157                       | 60      | 80             | 84      |
| <i>Mt1</i>   | GGACCCCAACTGCTCCT        | CGAGGCACCTTTGCAGACAC     | 160                       | 60      | 80             | 89,5    |
| <i>Hmox1</i> | ACAGCATGTCCCAGGATTGTC    | AAGGAGGCCATCACCAGCTT     | 142                       | 60      | 80             | 87,5    |
| <i>c-Myc</i> | GACACGGAGGAAAACGACAAG    | TGTGCTCGTCTGCTTGAATGG    | 190                       | 60      | 80             | 86      |
| <i>Mt3</i>   | CCCTGTCCTACTGGTGTTCC     | TGGCACACTTCTCACATCCGG    | 121                       | 60      | NO             | 86,5    |

**Table 1 : Séquences des amorces utilisées et conditions de PCR.** La spécificité des séquences a été confirmée par BLAST. Un cycle de la réaction consiste en : 15 sec de dénaturation à 95°C, 60 sec à 60°C pour l'étape d'hybridation et d'élongation (Annealing temperature, AT), et 15 sec d'extension à 80°C. Dans ces conditions, l'efficacité des PCR était de ~0,95-1. Le Tm (melting temperature ou température de fusion) des amplicons a été vérifié à la fin de chaque PCR.

## 2.4 Mesures d'apoptose

Les fragments d'ADN cytosoliques de 50-60 îlots par condition ont été quantifiés à l'aide du kit commercial « Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> » (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en suivant les instructions du fabricant et comme précédemment décrit (Duprez & Jonas, 2011).

## 2.5 Mesures de l'équilibre redox dans la mitochondrie

La mesure du ratio GSH/GSSG dans la mitochondrie à l'aide de la sonde mt-roGFP1 a été utilisée comme indicateur de l'équilibre redox mitochondrial. La construction de l'adénovirus codant cette sonde a été décrite précédemment (Roma et al., 2012a). Pour ces expériences, des clusters de cellules d'îlots de souris ont été infectés pendant 24 à 48h avec l'adénovirus codant la mt-roGFP1 et le milieu de culture a été changé 18 à 24h avant le début de l'expérience par un milieu contenant 2 ou 10 mmol/l de glucose +/- 50 µM de ZnCl<sub>2</sub>. Le ratio de fluorescence (excitation : 405 et 480 nm ; émission : 530 nm) a ensuite été mesuré lors de la perfusion d'une solution Krebs contenant la même concentration en glucose que lors de la culture mais sans ZnCl<sub>2</sub>. Ce ratio a ensuite été normalisé sur le ratio obtenu en présence de G10 + 10 mmol/l de DTT (considéré comme 0%) et celui obtenu en présence de G10 + 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (considéré comme 100%). La méthodologie concernant ces expériences a été détaillée précédemment (Duprez et al., 2012).

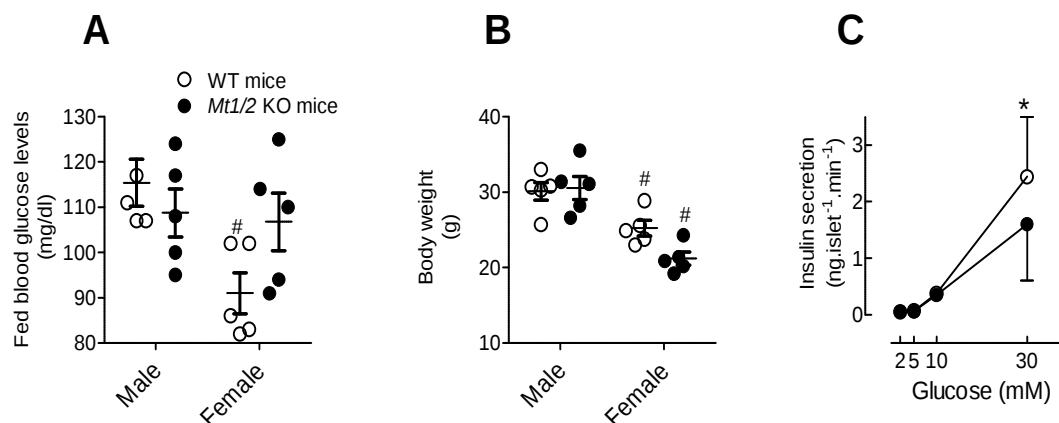
## 2.6 Analyses statistiques

Les résultats présentés sont les moyennes +/- SEM pour le nombre indiqué d'expériences. Des tests ANOVA à deux voies ont été réalisés suivis de post-tests de Bonferroni. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives lorsque  $P < 0,05$ .

# **3. Résultats**

## 3.1 Caractéristiques des souris *Mt1/2* KO

Comme illustré à la figure 33, la glycémie à l'état nourri et le poids sont significativement plus faibles chez les souris femelles comparées aux souris mâles de même âge (à l'exception de la glycémie des souris *Mt1/2* KO). L'inactivation des gènes *Mt1/2* ne provoque aucune différence significative de ces deux paramètres, suggérant que ces gènes ne jouent pas un rôle majeur dans l'homéostasie glucidique en conditions normales.



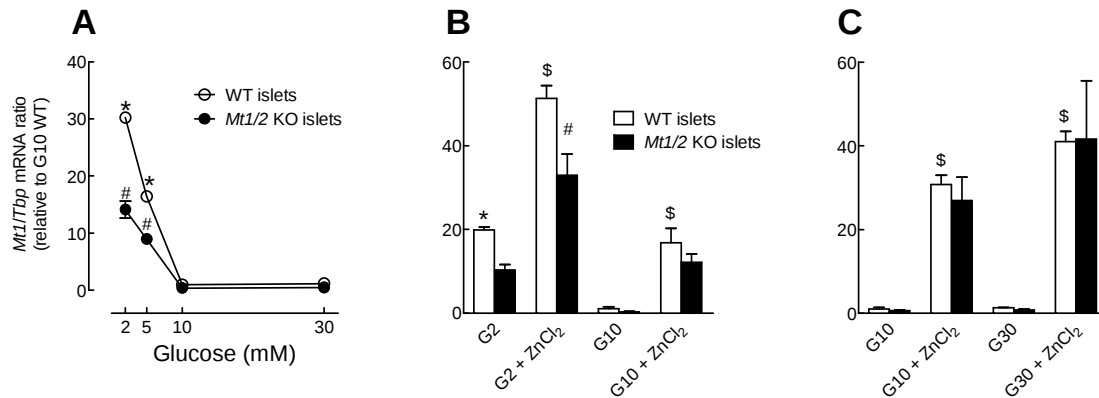
**Figure 33. Glycémies mesurées à l'état nourri (A) et poids (B) des souris 129S1/SvImJ (WT) et *Mt1/2* KO ; Stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose (C) dans des îlots de souris 129S1/SvImJ (WT) et *Mt1/2* KO.** A et B. les souris d'âge semblable ont été séparées en fonction du sexe. n=5. C. Après 18h de culture, l'insuline a été mesurée dans le milieu de culture par RIA. n=4. #, différence statistiquement significative par rapport aux mâles ; \*, différence statistiquement significative par rapport aux îlots cultivés en présence de G10.

Etant donné le rôle du glucose dans le maintien de la fonction et de la survie des cellules  $\beta$  en culture, la sensibilité au glucose a également été déterminée en mesurant la SISG dans les îlots issus de souris WT ou de souris *Mt1/2* KO. Comme attendu, l'augmentation de la concentration en glucose de 2 à 30 mmol/l stimule la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de souris. Aucune différence n'est observée entre les îlots de souris *Mt1/2* KO et ceux de souris WT. Néanmoins, la déviation standard de ces résultats est importante.

### 3.2 Effets du glucose et du $Zn^{2+}$ sur l'expression de *Mt1* dans les îlots de souris *Mt1/2* KO et WT

Comme illustré à la figure 34A, dans des îlots de souris 129S1/SvImJ, l'expression de l'ARNm *Mt1* suit un profil un L en fonction de la concentration en glucose présente dans le milieu de culture, comme nous l'avons déjà décrit dans des îlots de souris C57BL/6J (Jonas et al., 2009). Comme expliqué dans l'introduction de cette troisième partie, l'insertion des deux codons STOP au niveau du gène *Mt1* chez la souris *Mt1/2* KO n'empêche pas la transcription du gène (Masters et al., 1994). Cependant, l'augmentation d'expression de *Mt1* en G2 et G5 est diminuée de moitié dans les îlots de souris *Mt1/2* KO par rapport aux îlots de souris WT.

Alors qu'il avait été décrit que le  $Zn^{2+}$  n'augmente pas l'expression des MTs dans les îlots de souris (Laychock et al., 2000), j'ai observé que l'addition de 100  $\mu$ M de  $ZnCl_2$  au milieu de culture augmente de ~2,5 fois l'expression de *Mt1* en présence de G2, d'en moyenne 23 fois en présence de G10, et de ~30 fois en présence de G30 dans les îlots de souris WT (figure 34B et C) (ces expériences n'ont été réalisées que 2 ou 3 fois étant donné la difficulté d'isoler les îlots chez ces souris). Comme précédemment, l'expression de l'ARNm *Mt1* dans les îlots de souris *Mt1/2* KO suit un profil semblable à celui observé dans les îlots de souris WT, avec des niveaux réduits de 30-40% en G2 +  $ZnCl_2$  comme en absence de  $ZnCl_2$ .

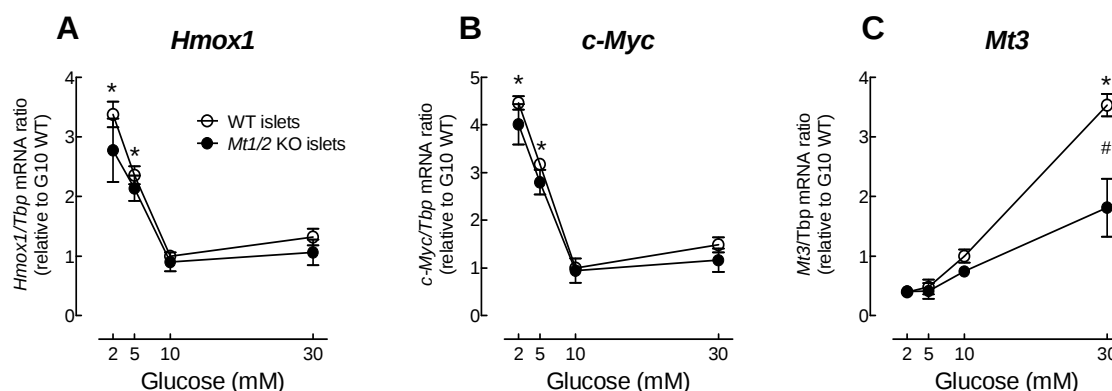


**Figure 34. Expression de l'ARNm *Mt1* dans des îlots de souris 129S1/SvImJ (WT) et *Mt1/2* KO après 18h de culture en présence de 2, 5, 10 ou 30 mmol/l de glucose (A) ou de 2, 10 ou 30 mmol/l de glucose +/- 100  $\mu$ M de ZnCl<sub>2</sub> (B et C).** Après la culture, l'ARN des îlots a été extrait et les ARNm *Mt1* et *Tbp* ont été mesurés par RT-PCR semi-quantitative en temps réel. Les ratios *Mt1/Tbp* ont été normalisés sur le ratio mesuré dans les îlots WT cultivés en G10. n=4 (A) n=2-3 (B,C) ; \*, différence statistiquement significative par rapport à la condition G10 ; #, différence statistiquement significative par rapport aux îlots de souris WT ; \$, différence statistiquement significative par rapport à la condition sans ZnCl<sub>2</sub>.

J'ai également tenté de mesurer l'expression protéique des MT1/2. Alors que les résultats obtenus par immunodétection sur coupes à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-MT1/2 confirment l'absence des MT1/2 en condition contrôle (îlots cultivés en présence de G10), ils montrent un marquage important après culture en présence de ZnCl<sub>2</sub> dans les deux types d'îlots (données non montrées, n=1).

### 3.3 Effets du glucose sur l'expression de *Hmox1* et *c-Myc* dans les îlots de souris *Mt1/2* KO et WT

Comme pour l'expression de *Mt1*, l'expression des ARNm *Hmox1* et *c-Myc* suit un profil un L en fonction de la concentration en glucose présente dans le milieu de culture (figure 35A et B). L'expression de ces deux ARNm n'est pas modifiée entre les îlots de souris *Mt1/2* KO et WT, ce qui montre que l'inactivation des *Mt1/2* ne modifie pas le signal responsable de la stimulation de l'expression de *Hmox1* et *c-Myc* par la culture en présence de G2 et de G5.



**Figure 35. Expression des ARNm *Hmox1* (A), *c-Myc* (B) et *Mt3* (C) dans des îlots de souris 129S1/SvImJ (WT) et *Mt1/2* KO après 18h de culture en présence de 2, 5, 10 ou 30 mmol/l de glucose.** La méthodologie est semblable à celle décrite pour la figure 34. N=4 ; \*, différence statistiquement significative par rapport à la condition G10 ; #, différence statistiquement significative par rapport aux îlots de souris WT.

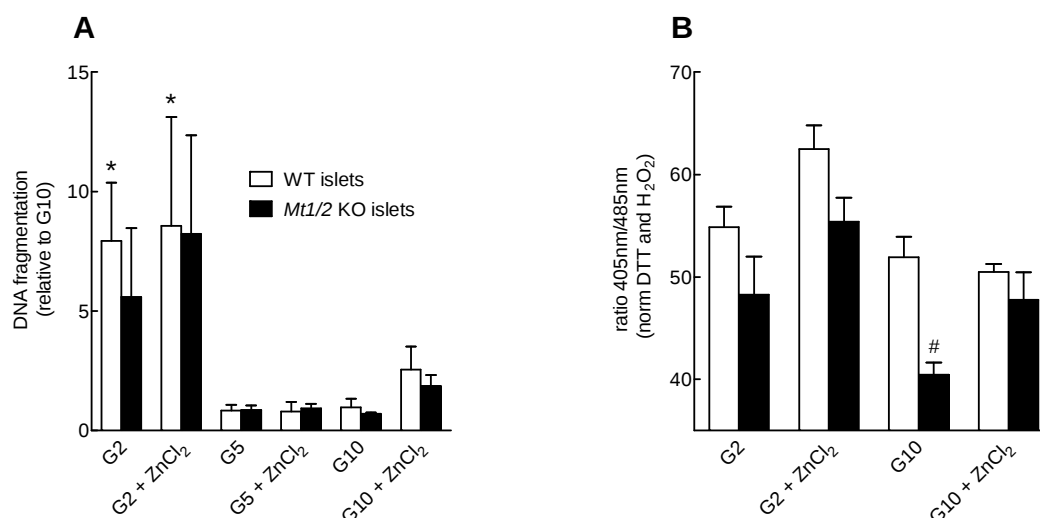
J'ai également mesuré l'expression des ARNm *Mt3* et *Mt4* pour tester si l'inactivation des *Mt1/2* entraînait un mécanisme compensatoire impliquant une augmentation de l'expression des autres *Mts*. Comme illustré à la figure 35C, l'expression de *Mt3* augmente lors de l'augmentation de la concentration en glucose et est similaire dans les deux types d'îlots, mis à part une stimulation de l'expression après culture en présence de G30 plus faible dans les îlots de souris *Mt1/2* KO que dans les îlots de souris WT. L'expression de *Mt4* est indétectable dans nos préparations.

#### 3.4 Effets de l'inactivation des gènes *Mt1/2* sur l'apoptose et l'oxydation du glutathion mitochondrial induites par les concentrations faibles de glucose

Comme illustré à la figure 36A, une semaine de culture d'îlots de souris 129S1/SvImJ en présence de 2 mmol/l de glucose augmente l'apoptose par rapport à la culture en présence de 10 mmol/l de glucose. Cependant, contrairement à ce que j'ai observé dans les îlots de rat, la culture en présence de 5 mmol/l de glucose n'entraîne pas d'augmentation de la fragmentation de l'ADN dans les îlots de souris. De plus, l'addition de 100  $\mu$ mol/l de  $ZnCl_2$  n'a pas d'effet protecteur sur l'apoptose provoquée par G2. L'inactivation des gènes *Mt1/2* n'a aucun effet significatif sur l'apoptose mesurée dans toutes les conditions testées ici. Je peux donc conclure que l'augmentation d'expression des *MT1/2* par la culture en présence de G2 ne semble pas diminuer l'apoptose dans cette condition délétère. L'augmentation d'expression de ces gènes serait donc plutôt un indicateur de stress.

La figure 36B montre que l'oxydation des thiols mitochondriaux n'est pas augmentée dans des clusters de cellules d'îlots de souris WT après 18h de culture en présence de G2 vs. G10. L'inactivation des gènes *Mt1/2* diminue légèrement l'oxydation de la sonde dans toutes les conditions et significativement dans la condition G10.

L'ensemble de ces résultats est surprenant par rapport aux résultats obtenus avec les îlots de rat et m'empêche de tester l'implication de l'expression des MT1/2 dans les effets du  $Zn^{2+}$ .



**Figure 36. Fragmentation de l'ADN (A) et oxydation des thiols mitochondriaux (B) dans des îlots (A) ou des clusters de cellules d'îlots (B) de souris 129S1/SvImJ (WT) et *Mt1/2* KO.** A. Les îlots ont été cultivés pendant une semaine en présence de 2, 5 ou 10 mmol/l de glucose +/- 100  $\mu$ M  $ZnCl_2$ . Après la culture, la fragmentation de l'ADN a été mesurée et les résultats ont été corrigés pour les variations de contenu en ADN dans la fraction nucléaire des extraits d'îlots, puis normalisés sur la valeur mesurée dans des îlots de souris WT cultivés en G10. B. Les clusters de cellules d'îlots infectés avec la mt-roGFP1 ont été cultivés pendant 18-24h en présence de 2 ou 10 mmol/l de glucose +/- 50  $\mu$ M de  $ZnCl_2$ . Le ratio de fluorescence (405/485 nm) de la mt-roGFP1 a ensuite été mesuré lors de la périfusion d'une solution Krebs contenant la même concentration en glucose que lors de la culture ; ce ratio a été normalisé sur le ratio obtenu en présence de 10 mmol/l de DTT (considéré comme 0%) et sur celui obtenu en présence de 1 mmol/l de  $H_2O_2$  (considéré comme 100%). n=3 ; \*, différence statistiquement significative par rapport à la condition G10 ; #, différence statistiquement significative par rapport aux clusters de cellules d'îlots WT.

#### 4. Discussion

Dans cette étude, j'ai démontré que l'inactivation des gènes *Mt1* et *Mt2* n'a pas d'effet majeur sur l'homéostasie glucidique et le poids ainsi que sur la sécrétion d'insuline et le profil d'expression des gènes *Hmox1* et *c-Myc* lors de la culture en présence de concentrations croissantes de glucose. J'ai également démontré que l'induction de l'expression des gènes *Mt1* et *Mt2* par la culture en présence de 2 mmol/l de glucose n'a pas d'effet protecteur sur la survie des cellules  $\beta$  de souris cultivées dans cette condition. De plus, j'ai pu déterminer que les altérations de survie des cellules  $\beta$  de souris observées après culture en présence de 2 mmol/l de glucose ne semblent pas associées à une augmentation de l'oxydation des thiols mitochondriaux. J'ai également démontré que, contrairement aux observations dans les îlots de rat, le  $Zn^{2+}$  ne diminue pas l'apoptose des cellules  $\beta$  de souris provoquée par la culture en

présence d'une concentration faible de glucose, ce qui m'a empêché de tester le rôle des MT1/2 dans les effets du  $Zn^{2+}$ .

Dans mon étude, les souris *Mt1/2* KO ne présentaient pas de troubles majeurs de l'homéostasie glucidique ni de la prise de poids, ce qui suggère que ces gènes ne sont pas essentiels pour ces paramètres en condition normale. Cependant, Beattie et al. ont observé un surpoids chez les souris *Mt1/2* KO de fond génétique mixte 129/Ola et C57BL/6J par rapport aux souris contrôles dès la sixième semaine de vie, avec une différence particulièrement importante chez les mâles *Mt1/2* KO entre 22 et 39 semaines (Beattie et al., 1998). Chez les mêmes souris, Laychock et al. disent avoir observé que la glycémie des souris *Mt1/2* KO était légèrement plus faible que celle des souris WT. Cette information reste cependant à confirmer étant donné qu'aucune donnée précise n'est montrée. A l'inverse, il a été démontré que les glycémies des souris *Mt1/2* KO et des souris contrôles étaient semblables (Rofe et al., 1996) ce qui a été confirmé dans mon étude avec les souris *Mt1/2* KO de fond génétique 129S1/SvImJ. Cependant cette question mériterait d'être approfondie en réalisant, par exemple, un IPGTT (intraperitoneal glucose tolerance test).

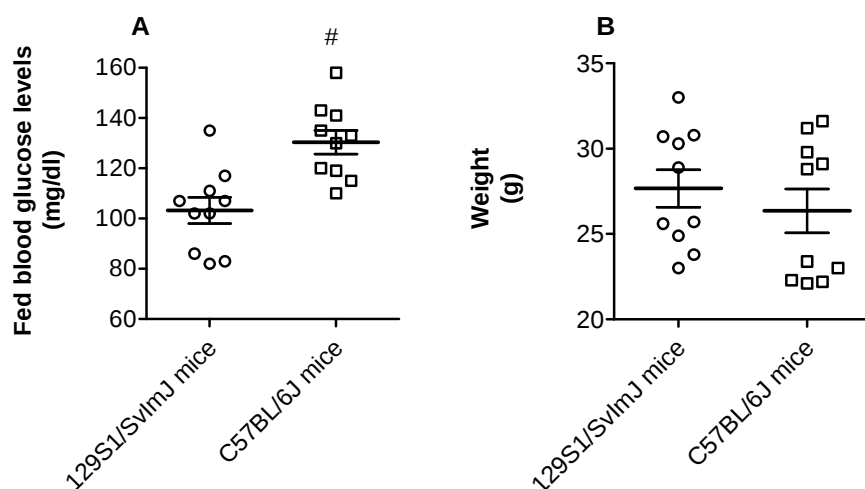
Alors que je n'ai observé aucune différence de SISG entre les îlots de souris *Mt1/2* KO et ceux de souris WT, Laychock et al. avaient démontré une diminution de la sécrétion d'insuline basale et stimulée par 17 mmol/l de glucose dans les îlots de souris *Mt1/2* KO par rapport à ceux de souris C57BL/6J. Ces mesures de sécrétion d'insuline ont été effectuées après 1h d'incubation des îlots alors que les nôtres ont été réalisées après 18h de culture, ce qui pourrait expliquer cette différence. Par contre, les résultats de Laychock ont, tout comme les miens, été normalisés sur le nombre d'îlots et ne tiennent donc pas compte des différences de taille des îlots. Il serait donc intéressant de répéter ces expériences en incubant les îlots pendant 1h et de normaliser les résultats sur le contenu en insuline ou en ADN des îlots comme dans mon étude précédente (Duprez et al., 2012).

Les souris développées par Michalska (Michalska & Choo, 1993) et utilisées par Beattie et Laychock diffèrent de celles développées par Masters (Masters et al., 1994) et utilisées lors de nos expériences par leur fond génétique et la stratégie d'inactivation des gènes *Mt1/2*. Ces deux facteurs pourraient peut-être expliquer les différences observées entre les études.

Alors que l'inactivation des *Mt1/2* dans les souris que j'ai utilisées a été réalisée par l'insertion de codons STOP, celle des souris de Michalska a été obtenue via l'insertion d'un oligonucléotide et d'un gène de résistance. Je ne peux pas exclure que la production de protéines tronquées correspondant au début des gènes *Mt1* et *Mt2* ait un effet dans les souris que j'ai utilisées. Cette production de protéines tronquées pourrait également être la raison pour laquelle j'ai observé un signal fluorescent lors de l'immunodétection des MT1/2 dans les îlots de souris *Mt1/2* KO après culture en présence de  $ZnCl_2$ .

Le background génétique des souches de souris pourrait également être un paramètre important à prendre en considération. A ma connaissance, aucune étude concernant le métabolisme énergétique ou le diabète ne s'est intéressée à comparer ces deux souches de souris. Étant donné que nous possédons les deux souches, j'ai pu comparer le poids et la glycémie de ces souris. Comme vous pouvez le constater sur la figure 37, la glycémie à l'état

nourri des souris C57BL/6J est significativement supérieure à celle des souris 129S1/SvImJ alors que leur poids sont semblables. La tolérance au glucose pourrait donc différer d'une souche de souris à l'autre.



**Figure 37. Glycémies mesurées à l'état nourri (A) et poids (B) des souris 129S1/SvImJ et des souris C57BL/6J.** Les souris sont d'âge semblable (entre 6 mois et 1 an) (50% de souris mâles et 50% de souris femelles). n= 5. #, différence statistiquement significative entre les deux souches (Jessica Duprez, résultats non publiés).

Comme décrit précédemment, l'expression des gènes *Mt1*, *Hmox1* et *c-Myc* suit un profil en L en fonction de la concentration en glucose parallèle à celui de l'apoptose dans les îlots de souris (Jonas et al., 2009). Dans les îlots de souris *Mt1/2* KO, comme décrit par les auteurs qui ont développé ce modèle, *Mt1* est toujours transcrit mais pas traduit, ce qui explique que j'ai détecté cet ARNm. Malgré que le transcrit modifié est 15 nucléotides plus long, la technique de PCR en temps réel ne permet pas la distinction des deux types de souris étant donné que les primers utilisés ne ciblent pas les nucléotides insérés. Cependant, ces animaux ont été génotypés et l'analyse des fragments amplifiés sur un gel d'agarose m'a permis de confirmer l'insertion de nucléotides au niveau du gène *Mt1*. L'expression de *Mt1* induite par G2 et G5 est cependant réduite de moitié dans les îlots de souris *Mt1/2* KO. L'inactivation des gènes *Mt1/2* provoque probablement des modifications de l'homéostasie du  $Zn^{2+}$  dans la cellule qui pourraient expliquer un changement dans la régulation de l'expression de *Mt1* par les concentrations faibles de glucose. De plus, les insertions d'oligonucléotides ont pu également modifier des séquences contrôlant l'expression ou la stabilité de ces ARNm. L'expression des gènes *Hmox1* et *c-Myc* induite par G2 et G5 n'est pas modifiée suite à l'inactivation des gènes *Mt1/2*, ce qui montre que les *Mt1/2* ne sont pas impliquées dans la régulation de l'expression de *Hmox1* et *c-Myc* dans ces conditions. Ces résultats montrent également que la cellule ne compense pas le manque des gènes *Mt1/2* par une augmentation d'expression de *Hmox1* et *c-Myc*, ni d'ailleurs de *Mt3* comme je l'ai mesuré.

Contrairement à ce que j'ai observé dans les îlots de rat, la culture pendant une semaine en présence de 5 mmol/l de glucose n'augmente pas significativement la fragmentation de l'ADN. La diminution de la concentration de glucose à 2 mmol/l est requise pour observer cet

effet. A cette concentration, l'inactivation des gènes *Mt1/2* n'augmente pas l'apoptose mesurée, ce qui suggère ainsi que ces gènes n'ont pas d'effet protecteur dans cette situation et seraient plutôt des marqueurs de stress. Cependant, l'oxydation du glutathion mitochondrial ne semble pas augmenté dans cette situation ni affecté par la délétion des *Mt1/2*, comme le montrent les mesures d'oxydation de la sonde mt-roGFP1 dans des clusters de cellules cultivées 18 à 24h en présence de G2. Ceci n'exclut pas l'augmentation d'un stress oxydatif dans un autre compartiment ou encore l'augmentation d'autres types de stress. Rappelons que, dans nos préparations d'îlots de rat, l'expression de *Mt1a* est fortement augmentée lors d'un stress oxydatif mais également lors d'un stress du RE, lors de l'hypoxie ou de l'exposition à des cytokines (Jonas et al., 2009).

L'induction des MTs par le  $Zn^{2+}$  dans les îlots de souris est sujette à controverse. En effet, alors que certains décrivent un effet inducteur des MTs par le  $ZnSO_4$  que ce soit *in vitro* (Ohly & Gleichmann, 1995) ou *in vivo* (Zimny et al., 1993; Ohly et al., 2000), d'autres démontrent le contraire (De Lisle et al., 1996; Minami et al., 1999; Laychock et al., 2000). Dans mon étude, l'expression de *Mt1* est augmentée de manière importante (de ~2,5 fois en G2 à ~20 fois en G10 et G30) dans les îlots de souris 129S1/SvImJ ainsi que dans les îlots de souris C57BL/6J et NMRI (données non publiées). Par contre, l'induction de l'expression protéique des MT1/2 par la culture en présence de  $ZnCl_2$  n'a pas réellement pu être confirmée. En effet, bien que le signal fluorescent obtenu par immunodétection à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-MT1/2 augmente dans les îlots cultivés en présence de  $ZnCl_2$ , ce signal augmente également dans les îlots de souris *Mt1/2* KO. Lors de l'analyse par western blot, les résultats obtenus montrent de nombreuses bandes de poids moléculaires distincts et ne correspondant pas à celui des MTs. De plus, aucune différence n'a été détectée dans des expériences comparant l'expression des MTs dans les hépatocytes de souris *Mt1/2* KO ou ceux de souris WT (résultats non montrés).

Dans ce cadre, il serait intéressant de tester une nouvelle méthode proposée par l'équipe de Nagamine. Ces chercheurs ont développé un ELISA permettant de détecter les MT1 et MT2 tant chez l'homme que dans diverses espèces animales dont la souris (Nakajima et al., 2010). La détection des MT1/2 se réalise via un anticorps polyclonal dont l'épitope reconnu est l'extrémité  $NH_2$  de MTs (similaire dans MT1 et MT2) avec une méthionine acétylée (Nakazato et al., 2008). Cette méthode a été validée dans les cellules hépatiques, rénales et cérébrales de souris WT, *Mt1/2* KO et *Mt3* KO. Les souris *Mt1/2* KO étaient les mêmes que celles que j'ai utilisées. Alors que la détection des MT1/2 se situait entre ~4 et ~30  $\mu g/g$  de tissu frais dans les souris WT et *Mt3* KO, elle était bien plus faible dans les souris *Mt1/2* KO. L'induction des MT1/2 par le Cd dans les hépatocytes de souris WT est détectée et augmente de manière dose-dépendante alors qu'elle est très faible, mais pas absente, dans les hépatocytes de souris *Mt1/2* KO. Les auteurs attribuent les faibles quantités de MTs détectées dans les souris *Mt1/2* KO à la présence de MTs « high molecular weight ». Ces MTs pourraient être soit des protéines précurseurs ou encore des agrégats de protéines (Nakazato et al., 2012). Bien que ces auteurs ont déjà confirmé l'absence ou du moins une grande diminution de MT1/2 dans les cellules de foie, de rein et du cerveau des souris *Mt1/2* KO

développées par Master et al., il serait intéressant d'effectuer cette validation dans les îlots pancréatiques.

A l'opposé de ce que j'ai observé dans les îlots de rat, j'ai démontré dans cette étude que, dans des îlots de souris, l'addition de  $\text{ZnCl}_2$  ne semble protéger les cellules  $\beta$  ni de l'apoptose induite par une concentration faible de glucose, ni de l'oxydation des thiols mitochondriaux. L'hypothèse d'un rôle de l'expression des *MT1/2* dans les effets protecteurs du  $\text{ZnCl}_2$  n'a donc pas pu être testée, étant donné que cet effet n'est pas observé dans les îlots de souris. Cependant, en considérant que le  $\text{Zn}^{2+}$  augmente l'expression de *Mt1*, comme observé par les mesures de taux d'ARNm, je peux conclure que cette augmentation d'expression ne semble pas protectrice contre l'apoptose provoquée par la culture en présence de G2. Ceci est en accord avec le fait que l'inactivation des gènes *M1/2* ne modifie pas l'apoptose des cellules  $\beta$  de souris dans cette même condition. Je peux donc conclure que, lors de la culture d'îlots de souris en présence de G2, tant l'inactivation des gènes *Mt1/2* que l'augmentation de leur expression par le  $\text{Zn}^{2+}$  ne modifie pas l'apoptose des cellules  $\beta$ . Les différences observées entre les résultats obtenus à partir des îlots de rat et des îlots de souris seront plus longuement abordées lors de la discussion générale de cette thèse.

En conclusion, l'inactivation des gènes *Mt1* et *Mt2* ne semble pas avoir d'effet majeur sur l'homéostasie glucidique et le poids ainsi que sur la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose. Dans des îlots de souris WT, la culture en présence de G2 augmente l'apoptose par un mécanisme qui ne semble pas faire intervenir l'oxydation des thiols mitochondriaux. De plus, l'inactivation des gènes *Mt1/2* ne modifie pas l'apoptose provoquée par la culture en présence de G2 dans les îlots de souris. Enfin, contrairement aux îlots de rat, le  $\text{Zn}^{2+}$ , bien qu'il augmente l'expression de *Mt1*, ne protège pas les îlots de souris WT de l'apoptose induite par la culture en présence d'une concentration faible de glucose.