



Secteur des sciences de la santé



Pôle d'endocrinologie, diabète et nutrition

GLUCOSE ET STRESS OXYDATIF DANS LES CELLULES β PANCREATIQUES :
RÔLE DU ZINC ET DES METALLOTHIONEINES

Jessica Duprez

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences biomédicales et pharmaceutiques

Promoteur : Professeur Jean-Christophe Jonas

-2013-

REMERCIEMENTS

Une thèse est le fruit d'un travail collectif, merci à tous ceux qui y ont contribué de près comme de loin.

Je remercie en premier lieu mon promoteur, le Professeur Jean-Christophe Jonas pour avoir supervisé mon travail pendant toutes ces années. Sa disponibilité sans fin, sa rigueur et son honnêteté scientifique, ses remises en question et doutes qui nous font avancer au jour le jour, ses inquiétudes quotidiennes sur mes résultats, sa confiance qu'il m'a souvent accordée, ont rendu ces années de thèse particulièrement enrichissantes, tant d'un point de vue scientifique qu'humain. Je me dois de le remercier pour avoir supporté mon « impertinence caractéristique » comme il me l'a souvent dit.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon jury présidé par le Professeur Sonia Brichard et composé des Professeurs Christine Sempoux, Pedro Buc Calderon et Patrick Jacquemin. Merci à vous pour vos remarques, vos précieux conseils, vos suggestions et votre regard externe sur mon projet de thèse lors des comités d'encadrement et lors de la soutenance privée.

Je remercie aussi vivement les membres externes de mon jury, les Professeurs Pierre Maechler et Bernard Knoops pour avoir accepté de juger mon manuscrit et pour s'être déplacés pour ma défense privée. C'est un grand honneur pour moi d'avoir pu bénéficier de leurs commentaires sur mon travail.

Um obrigado imenso a Leticia pela grande amizade, pelos momentos muito bons que passamos no lab, eu acho que nao tem palavras para agradecer voce por tudo que fez para mim que seja pessoalmente ou scientificamente. Sem voce, essa thesis nao tivera sido a mesma, voce foi o raio do sol de todos os dias esses anos.

Un tout grand merci à tous les membres de notre équipe pour avoir partagé de nombreux moments avec moi. Merci à Anne, Séverine et Mohammed qui m'ont initiée aux techniques de laboratoire, merci pour leur aide précieuse dans mes débuts au labo. Merci à mes deux mémorantes, Anne-Françoise et Morgane, pour m'avoir accordé leur confiance et pour les très bons moments passés ensemble, ce fut un réel plaisir de les encadrer dans leurs travaux. Merci à Denis pour son aide précieuse et sa gentillesse et aux membres actuels du labo, Hilton, Laila et Jean-Philippe.

Je tiens aussi à remercier les autres membres de l'équipe ENDO comme le Professeur Henquin, le Professeur Gilon, Fabien et Myriam pour leur aide. Je pense également à Nizar avec qui on a passé des moments de grandes folies, à Rui qui a un cœur gros comme la terre, à Laurence et à Julie avec qui il est si agréable de papoter de nos vies, à Michel toujours de bonne humeur, à Anna et Chloé toujours le sourire aux lèvres, à Nancy et à tous les autres.

Je ne me permettrais pas d'omettre mes petites sbimettes sans qui ces années passées sur Alma n'auraient jamais été si authentiques. Merci Nath, Val, Caro, Alex, Berny, Laura et Auré pour tous ces midis, verres, soirées,... passés ensemble. Leur soutien quotidien m'a permis d'avancer avec le sourire. Je vous donne toute ma force pour la fin de vos thèses, courage à vous. Vous allez tant me manquer.

Un merci tout particulier à mes parents qui ont toujours cru en moi. Ils m'ont donné les ailes pour me permettre de voler toute seule. C'est le plus beau cadeau qu'ils pouvaient me faire. Merci à mon frère pour ses nombreux conseils et pour nos « bouffes ». J'ai suivi finalement son chemin et je peux aussi lui attribuer une aile sur mon dos.

Merci à tous mes proches et amis comme Christine et les enfants, Sophie, Mica et les filles, Mary et Jean, Alice, Isa, Brice, Cec et Flo pour m'avoir soutenue dans mon travail et félicitée pendant toutes ces années.

Un merci spécial à Pat qui remplit mon quotidien de bonheur et qui a supporté mes inquiétudes, doutes, énervements, mais aussi joies et plaisirs aux retours du labo tous les soirs. Et finalement, je dédie cette thèse à ma petite Louane qui en connaît plus que nous tous sur la cellule β , le diabète, le zinc et les métallothionéines, si elle a retenu tout ce que j'ai pu lire pendant les mois où elle séjournait dans mon ventre.

LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	9
<i>I. Pancréas endocrine et homéostasie glucidique</i>	9
1. Le pancréas endocrine	9
2. L'homéostasie glucidique	9
3. Les troubles de l'homéostasie glucidique	10
3.1 Le diabète	10
3.2 Les hypoglycémies	12
<i>II. Effets physiologiques du glucose sur la cellule β</i>	12
1. Stimulation de la sécrétion d'insuline	13
1.1 Caractéristiques de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose	13
1.2 Couplage stimulation-sécrétion	14
1.2.1. Métabolisme du glucose dans la cellule β	15
1.2.2. Voies déclenchante et amplificatrice	16
1.2.3. Modulation de la sécrétion d'insuline	17
2. Autres effets du glucose sur la cellule β	18
2.1 Maintien du phénotype différencié	18
2.2 Maintien de la capacité sécrétoire des cellules β	19
2.3 Maintien de la masse des cellules β	20
<i>III. Effets délétères des concentrations supraphysiologiques de glucose sur la cellule β</i>	23
1. Altérations de l'expression des gènes	23
1.1 Diminution de l'expression de l'insuline	23
1.2 Diminution de l'expression d'autres gènes importants pour la cellule β	24
1.3 Modifications de l'expression de gènes de réponse à différents types de stress	24
2. Altérations de fonction	24
3. Altérations de survie	26
4. Mécanismes impliqués dans les altérations glucotoxiques des cellules β	28
5. Expression des gènes de réponse à un stress dans notre modèle expérimental	30
<i>IV. Le stress oxydatif</i>	31
1. Définition, systèmes de défense et cibles du stress oxydatif	31
1.1 Définition	31
1.2 Systèmes de défense	32
1.3 Cibles du stress oxydatif	35

2. Le stress oxydatif dans la cellule β	35
2.1 Particularités des défenses enzymatiques de la cellule β	35
2.2 Manifestations du stress oxydatif chez le patient diabétique de type 2	37
2.3 Mécanismes de production des ROS	38
2.3.1. En situation d'hyperglycémie	38
2.3.2. En situation d'hypoglycémie	41
2.4 Effets physiologiques des ROS dans la cellule β	42
V. Zinc, métallothionéines et cellules β	43
1. Historique du zinc et de la cellule β	43
2. Diabète de type 2 : déficience en zinc et supplémentation thérapeutique	45
2.1 Chez l'homme	45
2.2 Chez l'animal	45
2.3 In vitro	46
3. Les métallothionéines	46
3.1 Structure	46
3.2 Régulation de l'expression	47
3.3 Rôles	48
3.4 Les métallothionéines, la cellule β et le DT2	49
OBJECTIFS	51
RESULTATS	52
I. Première partie : Mesures du stress oxydatif en condition dynamique dans la cellule β	52
1. Méthodes classiquement utilisées dans la littérature	52
2. Sondes protéiques fluorescentes	52
2.1 HyPer	52
2.2 Reduction-oxidation-sensitive GFPs	54
3. Effets du glucose sur la production des ROS dans la cellule β	56
3.1 Effets des concentrations élevées de glucose	56
3.2 Effets des concentrations faibles de glucose	57
4. Article : Dynamic measurements of mitochondrial hydrogen peroxide concentrations and glutathione redox state in rat pancreatic β -cells using ratiometric fluorescent proteins : confounding effects of pH with HyPer but not roGFP1	59
5. Discussion et résultats complémentaires	60

II. Deuxième partie : Rôle du zinc sur les altérations phénotypiques des cellules β soumises à des concentrations extrêmes de glucose	66
1. Introduction	66
2. Article : Protective antioxidant and antiapoptotic effects of ZnCl_2 in rat pancreatic islets cultured in low and high glucose concentrations	68
3. Discussion	69
III. Troisième partie : Métallothionéines et altérations phénotypiques des cellules β soumises à une concentration faible de glucose	76
1. Introduction	77
1.1 Modèle expérimental utilisé dans cette étude : les souris <i>Mt1/2</i> knock-out	78
2. Matériel et méthodes	79
2.1 Animaux	79
2.2 Isolement des îlots et culture	79
2.3 Mesures de la sécrétion d'insuline et de l'expression des ARNm	79
2.4 Mesures d'apoptose	80
2.5 Mesures de l'équilibre redox dans la mitochondrie	80
2.6 Analyses statistiques	80
3. Résultats	80
3.1 Caractéristiques des souris <i>Mt1/2</i> KO	80
3.2 Effets du glucose et du Zn^{2+} sur l'expression de <i>Mt1</i> dans les îlots de souris <i>Mt1/2</i> KO et WT	81
3.3 Effets du glucose sur l'expression de <i>Hmox1</i> et <i>c-Myc</i> dans les îlots de souris <i>Mt1/2</i> KO et WT	82
3.4 Effets de l'inactivation des gènes <i>Mt1/2</i> sur l'apoptose et l'oxydation du glutathion mitochondrial induites par les concentrations faibles de glucose	83
4. Discussion	84
DISCUSSION GENERALE-PERSPECTIVES	89
CONCLUSIONS	100
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	101
SUMMARY	131
RESUME	132

LISTE DES ABREVIATIONS

Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
AGE	Advanced Glycation End products
AMPK	AMP-activated protein Kinase
ATF	Activating Transcription Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
$[Ca^{2+}]_i$	concentration intracellulaire de Ca^{2+}
Canaux K^+_{ATP}	Canaux potassiques sensibles à l'ATP
c-Myc	cellular-Myelocytomatosis
Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3
DT1	Diabète de Type 1
DT2	Diabète de Type 2
DTT	DiThioThréitol
GADD	Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein
GAP	GlycérAldéhyde-3-Phosphate
GAPDH	GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
GFP	Green Fluorescent Protein
GK	Goto-Kakizaki
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1
GLUT	Glucose Transporter
Gn	n mmol/l de glucose
GPX	Glutathion PeroXidase
GR	Glutathion Réductase
GRX	GlutaRédoXine
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène
HIF	Hypoxia Inducible Factor
Hmox1	Hème oxygénase 1
IL-1 β	Interleukine-1 β
ISR	Integrated Stress Response
LdhA	Lactate déshydrogénase A
MnSOD	SuperOxyde Dismutase Mitochondriale
MnTBAP	manganese(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin
MREs	Metal Response Elements
MT	Métallothionéine
<i>Mt1/2</i> KO	Knock-Out pour les gènes <i>Mt1</i> et <i>Mt2</i>
MTF-1	Metal- regulatory Transcription Factor-1

NAC	N-Acétyl-L-Cystéine
NFκB	Nuclear Factor κB
NOX	NADPH OXydase
$O_2^{\cdot-}$	anion superoxyde
OAA	OxaloAcetic Acid
$OH^{\cdot}$	radical hydroxyle
ONOO $^-$	peroxynitrite
PC	Pyruvate Carboxylase
PDH	Pyruvate DésHydrogénase
PDX-1	Pancreatic Duodenal homeobox-1
PKC	Protéine Kinase C
PRX	PeroxyRédoXine
RD	Regulatory Domain
RE	Réticulum Endoplasmique
roGFP	reduction-oxidation-sensitive GFPs
ROS	Reactive Oxygen Species
SERCA	Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase
SISG	Sécrétion d'Insuline Stimulée par le Glucose
SOD	SuperOxyde Dismutase
STZ	StrepToZotocine
TRX	ThioRédoXine
UPR	Unfolded Protein Response
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wild-Type
XBP1	X-box Binding Protein 1
ZDF	Zucker Diabetic Fatty
$[Zn^{2+}]_i$	concentration intracellulaire en Zn^{2+}
ZnT	Zinc Transporter

INTRODUCTION

I. Pancréas endocrine et homéostasie glucidique

1. Le pancréas endocrine

Le pancréas est une glande mixte à fonction à la fois exocrine et endocrine. La partie exocrine est constituée de glandes acineuses drainées par des canaux excréteurs qui produisent et sécrètent un suc alcalin riche en enzymes digestives. La partie endocrine, qui représente 1-2% de la masse du pancréas, est composée d'îlots de Langerhans (~1 million chez l'homme et ~mille chez le rat) disséminés dans le pancréas. Ces amas de 500 à 5000 cellules sont abondamment irrigués (10-20% du débit sanguin pancréatique). Contrairement au poids du pancréas, la taille des îlots est semblable chez l'homme et le rongeur (Kim et al., 2009). Les îlots de Langerhans sont constitués de 65-80% de cellules β sécrétrices d'insuline, de 15-20% de cellules α à glucagon, de 3-10% de cellules δ à somatostatine, de ~1% de cellules PP à polypeptide pancréatique et de moins de 0,5% de cellules ϵ à ghréline. Chez le rongeur, les cellules β se situent au centre de l'îlot alors que les autres types cellulaires se situent à la périphérie de l'îlot. Chez l'homme, les cellules non β sont localisées le long des vaisseaux alors que les cellules β constituent une couche entre ces autres types cellulaires. Néanmoins, les cellules β possèdent des prolongements capables de s'infiltrer au milieu des cellules non β et d'entrer en contact avec les cellules endothéliales (Bosco et al., 2010). Le sang provenant des îlots est drainé par la veine porte vers le foie puis vers la circulation générale.

2. L'homéostasie glucidique

L'homéostasie glucidique, c'est-à-dire le maintien de la concentration plasmatique de glucose (glycémie) entre 4 et 6 mmol/l chez l'homme est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme. En effet, une glycémie inférieure à 3 mmol/l est néfaste pour les organes qui utilisent quasi exclusivement le glucose comme source d'énergie. A l'opposé, une hyperglycémie prolongée entraîne l'apparition de complications chroniques incluant des pathologies microvasculaires (Brownlee, 2001). Le maintien de la glycémie est donc important et est assuré grâce aux effets opposés de l'insuline, principale hormone hypoglycémiante, et des hormones contre-régulatrices hyperglycémiantes comme le glucagon, le cortisol, l'hormone de croissance et l'adrénaline.

Après un repas, l'élévation de la glycémie et de la concentration plasmatique en acides aminés et en acides gras provoque une augmentation du rapport insuline/glucagon dans la circulation. L'insuline, en se liant à son récepteur au niveau des tissus périphériques comme le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux, stimule la capture, l'utilisation et le stockage de glucose et inhibe sa production. Ces effets permettent une normalisation rapide de la glycémie.

La baisse de la glycémie provoque, elle, une diminution de la sécrétion d'insuline et une augmentation de celle du glucagon. Cette hormone provoque une diminution de l'utilisation et une augmentation de la production hépatique de glucose. En cas de jeûne prolongé, l'action des hormones contre-régulatrices stimule la lipolyse au niveau du tissu adipeux (production

d'acides gras et de glycérol) et la protéolyse (production d'acides aminés) au niveau du muscle squelettique. Les acides gras libérés alimentent les cellules en substrats énergétiques. De plus, le glycérol et les acides aminés alimentent les cellules hépatiques et rénales en substrats de la gluconéogenèse. Ces événements permettent ainsi de maintenir la glycémie.

Etant donné l'importance du maintien de la glycémie, un dérèglement de ce système hormonal conduit à des pathologies comme le diabète ou les hypoglycémies.

3. Les troubles de l'homéostasie glucidique

3.1 Le diabète

Selon un communiqué de presse de l'organisation mondiale de la santé (OMS) dans le courant du mois de mai 2012, un adulte sur dix souffre de diabète et les projections ne sont pas encourageantes. Cette pathologie métabolique est caractérisée par une hyperglycémie chronique. Selon l'OMS, un patient présentant une glycémie à jeun entre 5,55 et 7 mmol/l a une hyperglycémie considérée comme modérée, alors qu'un patient avec une glycémie à jeun au-dessus de 7 mmol/l est diagnostiqué comme diabétique. Il existe deux formes principales de diabète : le diabète de type 1 (DT1) et le diabète de type 2 (DT2).

Le DT1 représente ~10% des cas de diabète et se déclare principalement dans l'enfance et chez les jeunes adultes dont l'indice de masse corporelle est situé entre 20 et 25. Il résulte de la destruction auto-immunitaire progressive des cellules β , ce qui provoque une carence progressive en insuline. Lors de ce processus, les cytokines pro-inflammatoires libérées par les lymphocytes T cytotoxiques et les macrophages jouent un rôle clé dans la destruction des cellules β (pour une revue détaillée, (Cnop et al., 2005)). Ce n'est que lorsqu'il ne reste plus que 10 à 20% de cellules β fonctionnelles que le patient est en hyperglycémie avec acidocétose. A ce stade, le traitement consiste en l'injection quotidienne d'insuline.

Le DT2 représente ~90% des diabétiques. Les causes de cette pathologie sont multifactorielles car elles impliquent des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques. Le DT2 est hétérogène puisqu'il peut toucher tant des patients obèses de plus de 40 ans que des patients maigres ou en léger surpoids (Lawal, 2008).

Dans le cas des patients maigres ou en léger surpoids (~20% des DT2), le diabète résulte principalement d'un déficit fonctionnel ou quantitatif des cellules β .

Dans le cas des patients obèses, le syndrome inflammatoire à bas bruit, l'augmentation des acides gras libres circulants et l'accumulation de triglycérides dans divers tissus entraînent une résistance périphérique à l'insuline. Comme illustré à la figure 1, les cellules β s'adaptent en sécrétant des quantités importantes d'insuline qui permettent de compenser la résistance à l'insuline et de normaliser la glycémie. Ce phénomène de compensation, bien que pas totalement élucidé, semble faire intervenir tant une augmentation de la masse des cellules β qu'une augmentation de leur fonction, c'est-à-dire une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par les nutriments (Prentki & Nolan, 2006). Chez environ 30% des patients obèses, les cellules β n'ont pas cette capacité de compensation ou s'épuisent, ce qui mène à une intolérance au glucose et puis au DT2. Ce phénomène résulte d'une

diminution de la masse (par augmentation inadéquate ou diminution de la masse existante) et de la fonction des cellules β (Kasuga, 2006; Kahn et al., 2009). Une fois l'hyperglycémie déclarée, le déficit sécrétoire des cellules β s'aggrave et la masse continue à diminuer progressivement (diminution donc de la masse fonctionnelle) par un processus de glucotoxicité. De plus, additionné à l'hyperglycémie, l'augmentation des acides gras est également toxique et on parle alors de glucolipotoxicité. Le phénomène de glucotoxicité pourrait déjà se manifester lorsque l'hyperglycémie est modérée et lors des épisodes répétés d'hyperglycémie postprandiale, au stade de prédiabète (Poitout & Robertson, 2008; Kim & Yoon, 2011).

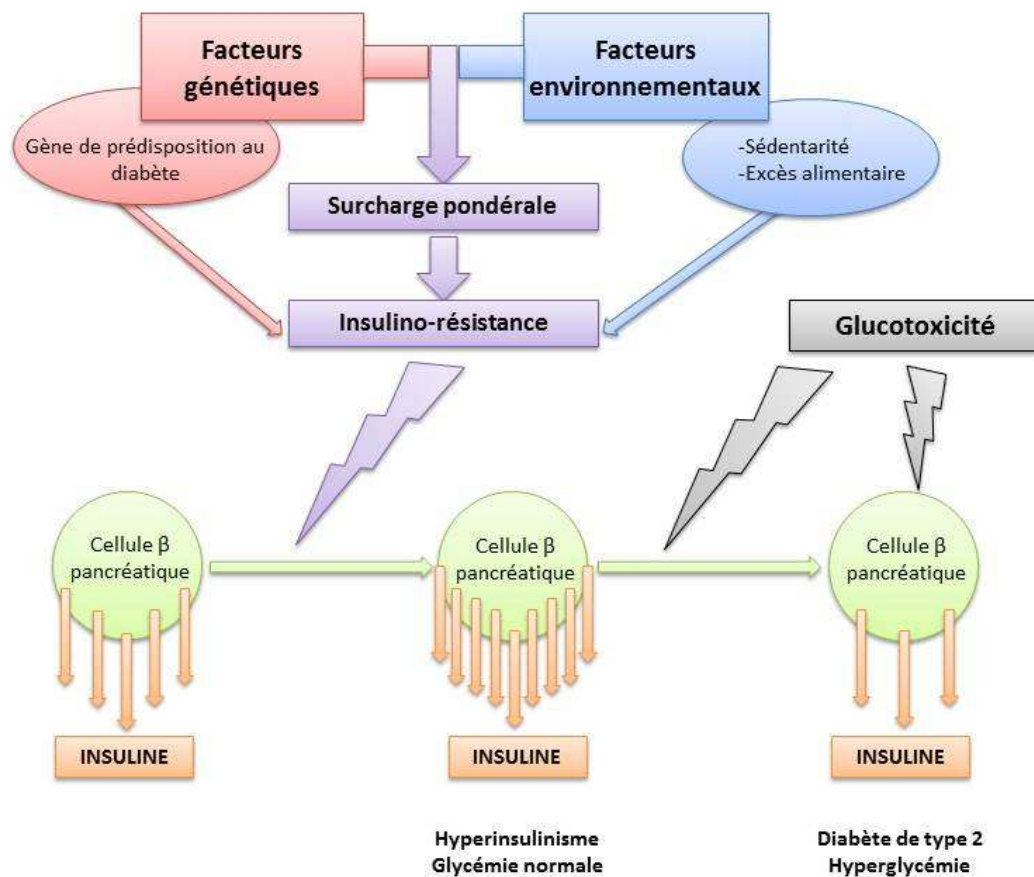


Figure 1. Représentation schématique des événements qui conduisent au DT2. Des facteurs génétiques et environnementaux induisent une insulino-résistance. Celle-ci provoque une hyperinsulinémie qui permet de maintenir la glycémie normale. L'épuisement des cellules β entraîne ensuite un stade de DT2 où la perte de masse fonctionnelle des cellules β est aggravée par des phénomènes de glucotoxicité. Adapté de www.memobio.fr/html/bioc/bi_dni_ph.html (consulté le 16/10/2013).

Actuellement, le premier traitement comprend, si le patient souffre d'obésité, un régime hypocalorique pauvre en sucres à absorption rapide pour diminuer la glycémie ainsi que de l'exercice physique pour augmenter la sensibilité à l'insuline. Si cela est insuffisant, le patient sera soumis à un traitement médicamenteux hypoglycémiant qui permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline (biguanides : metformine, thiazolidinediones) ou de stimuler la sécrétion d'insuline (sulfamidés hypoglycémiants, glinides, agonistes du récepteur au GLP-1

ou gliptines). Dans un stade encore plus avancé de la maladie, l'insulinothérapie sera indispensable (Zimmet et al., 2001). Des traitements actuellement en recherche consistent à moduler la masse des cellules β soit en inhibant les mécanismes destructeurs comme l'apoptose, soit en stimulant les mécanismes de prolifération (Meier, 2008).

3.2 Les hypoglycémies

Il existe également des pathologies impliquant des phénomènes d'hypoglycémie. L'hypoglycémie est diagnostiquée lorsque la glycémie chute à des valeurs inférieures à 2,8 mmol/l, que le patient présente des symptômes caractéristiques de l'hypoglycémie (vertiges, pâleur, palpitations,...) et que les symptômes sont corrigés après la prise de glucose. La manifestation de ces 3 situations est appelée triade de Whipple.

La prise médicamenteuse d'antidiabétiques est la cause la plus fréquente d'hypoglycémie aigüe et cette complication reste un défi pour le suivi des patients. Il est donc important, à ce jour, de développer d'autres médicaments antidiabétiques n'entraînant pas cette complication (Inkster et al., 2012; Snell-Bergeon & Wadwa, 2012).

Les insulinomes sont une autre cause d'hypoglycémie. Ces tumeurs pancréatiques rares et souvent bénignes ont une incidence d'environ quatre cas par million de personnes par an. En comparaison avec les cellules β normalement différenciées, les cellules de l'insulinome continuent à sécréter de l'insuline et de la proinsuline lorsque la glycémie est faible, ce qui entraîne une hypoglycémie (Guettier & Gorden, 2010). Une fois le diagnostic de l'insulinome établi, l'insulinome est localisé dans le pancréas avant de procéder à l'énucléation de la tumeur. Ce traitement aboutit, dans 90% des cas, à la guérison (Mathur et al., 2009).

Chez les jeunes enfants, certaines mutations peuvent entraîner des hyperinsulinismes congénitaux. Il s'agit, principalement, de mutations inactivatrices des sous-unités Sulfonylurea Receptor 1 (SUR1) ou K^+ Inward Rectifier 6.2 (Kir6.2) des canaux potassiques sensibles à l'ATP. Ces mutations entraînent une sécrétion anormale d'insuline en maintenant le canal potassique fermé, un des événements déclenchant la sécrétion d'insuline. D'autres mutations peuvent être à l'origine de cette pathologie comme, par exemple, des mutations activatrices des gènes de la glutamate déshydrogénase et de la glucokinase (Giurgea et al., 2006). Il existe deux formes de cette pathologie : la forme focale qui correspond à une hyperplasie adénomateuse, limitée dans le pancréas, et la forme diffuse qui correspond à un hyperfonctionnement de l'ensemble des cellules β . Contrairement à la forme focale, la forme diffuse requiert une pancréatectomie quasi-totale (Rahier et al., 2000).

II. Effets physiologiques du glucose sur la cellule β

La stimulation de la sécrétion d'insuline est l'effet principal du glucose sur la cellule β . A plus long terme, le glucose contribue également au maintien de la masse et de la fonction des cellules β ainsi qu'au maintien d'un phénotype différencié des cellules β en stimulant l'expression de gènes importants pour ces cellules. A l'opposé de ces effets bénéfiques, le glucose peut avoir des effets néfastes sur les cellules β lorsqu'elles sont exposées de manière prolongée à des concentrations supraphysiologiques de glucose, ce qui sera présenté au point III de cette introduction.

1. Stimulation de la sécrétion d'insuline

1.1 Caractéristiques de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose

Dans des îlots pancréatiques isolés, l'augmentation de la concentration extracellulaire en glucose entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline selon une courbe sigmoïde. Cette stimulation de la sécrétion d'insuline résulte d'une augmentation progressive de la réponse sécrétoire des cellules et, pour les cellules dispersées, du recrutement d'un nombre croissant de cellules β actives (Pipeleers, 1992; Jonkers & Henquin, 2001). Selon l'espèce, cette courbe a des caractéristiques différentes (voir figure 2). Sur base de la littérature, chez l'homme, la concentration seuil pour la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose est de 3-4 mmol/l, la réponse semi-maximale se situe à 6,5 mmol/l, et la stimulation maximale est observée à 15 mmol/l (Henquin et al., 2006a). Chez le rat et la souris, de par la plus faible sensibilité au glucose des cellules β , ces courbes sont déplacées légèrement vers la droite. Les concentrations seuil sont de 6 et 7 mmol/l respectivement chez le rat et la souris alors que les réponses semi-maximales sont de 10 et 15 mmol/l et les valeurs maximales sont atteintes à des concentrations de 20 et 30 mmol/l (Henquin, 2000; Buchwald, 2011).

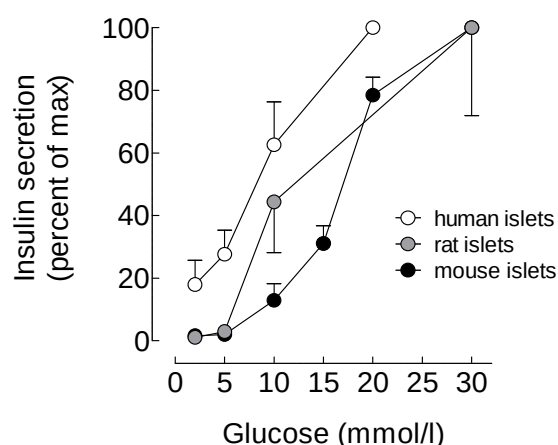


Figure 2 : Relation entre la sécrétion d'insuline et la concentration en glucose. Les îlots ont été précultivés 7 jours en présence de G10 (îlots de rat et de souris) et 8-9 jours en présence de G5 (îlots humains). Ils ont ensuite été cultivés pendant 18h en présence de concentrations croissantes de glucose et la sécrétion d'insuline a été mesurée dans le milieu par RIA, $n=3$. Données adaptées de (Bensellam et al., 2009) et résultats non publiés (JC Jonas). Etant donné les différences dans la durée de la préculture et de l'incubation, les valeurs présentées ici diffèrent légèrement de celles mentionnées dans le texte, mais la sensibilité au glucose des îlots de souris et de rat reste plus faible que celle des îlots humains.

Notons ici que la concentration optimale de glucose habituellement utilisée pour la culture des îlots humains est de 5 mmol/l par rapport à 10 mmol/l pour les îlots de rat et de souris (Ling & Pipeleers, 1996), ce qui correspond, pour chaque espèce, à des valeurs supérieures à la concentration seuil pour la stimulation de la sécrétion d'insuline. Notez également que la glycémie chez le rongeur est légèrement plus élevée (entre 5 et 8 mmol/l) que chez l'homme.

In vitro, suite à une élévation subite de la concentration en glucose, la sécrétion d'insuline présente un profil biphasique. La première phase est caractérisée par une augmentation rapide et transitoire de la sécrétion d'insuline et ne dure qu'environ 5 min. La deuxième phase diffère selon l'espèce ; dans les îlots humains et de souris, elle tend vers un plateau alors qu'elle est ascendante dans les îlots de rat (figure 3). Cette cinétique biphasique résulte de l'augmentation biphasique de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Henquin et al., 2002; Henquin et al., 2006a; Zawalich et al., 2008). La sécrétion d'insuline se maintient pendant 2 à 3h tant que le glucose est présent et s'épuise ensuite lentement, caractérisant la troisième phase aussi appelée désensibilisation des cellules β (Grodsky, 1989).

In vivo, cette sécrétion biphasique ne s'observe cependant qu'après perfusion intraveineuse de glucose tant chez l'homme que chez les rongeurs (Henquin et al., 2006b).

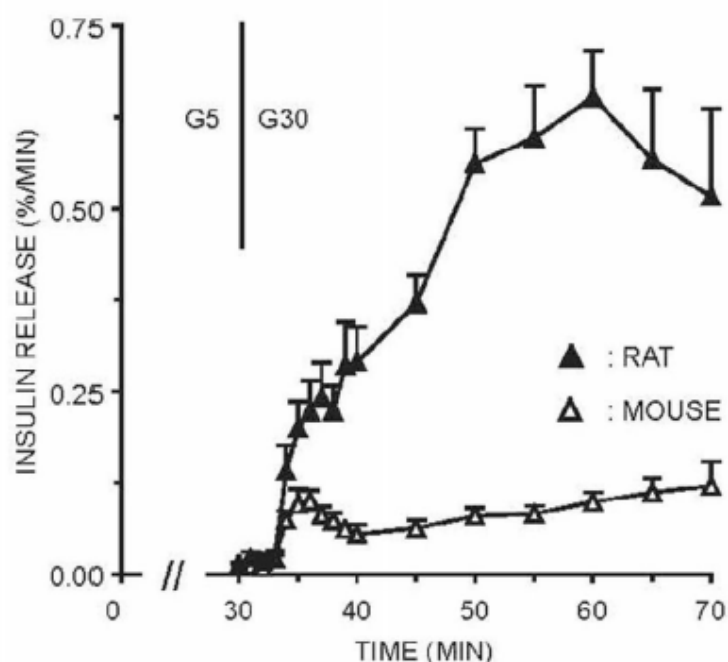


Figure 3 : Sécrétion d'insuline dans des îlots de rat ou de souris fraîchement isolés. Les îlots ont été périfusés pendant 30 min avec 5 mmol/l de glucose (G5) puis pendant 40 min avec 30 mmol/l de glucose (G30). La sécrétion d'insuline est présentée en pourcentage du contenu total en insuline (Zawalich et al., 2008).

1.2 Couplage stimulation-sécrétion

Les cellules β sont des cellules électriquement excitables et les variations des concentrations plasmatiques en nutriments et essentiellement en glucose entraînent des modifications du potentiel de membrane, ce qui induit des variations de la sécrétion d'insuline. Le glucose stimule la sécrétion d'insuline via deux voies : la voie déclenchante et la voie amplificatrice. Pour exercer ces effets, le glucose doit être métabolisé par la cellule β .

1.2.1.Métabolisme du glucose dans la cellule β

Chez le rongeur, le glucose entre passivement dans la cellule β par diffusion facilitée via le transporteur « glucose transporter » (GLUT) 2 de faible affinité ($K_m \sim 17$ mmol/l) et de haute capacité, ce qui mène à un équilibre rapide entre les concentrations de glucose extra- et intracellulaire (Thorens et al., 1988) (se référer à la figure 4). Chez l'homme, le transporteur GLUT1 est exprimé de manière prédominante par rapport à GLUT2 (De Vos et al., 1995; Ferrer et al., 1995). Une fois dans la cellule, le glucose est directement phosphorylé en glucose-6-phosphate par la glucokinase, une hexokinase (de type IV) de basse affinité ($K_m \sim 10-12$ mmol/l) qui n'est pas inhibée par son produit. Cette enzyme permet donc à la cellule β d'adapter la vitesse de la glycolyse en fonction des variations physiologiques de la concentration en glucose ; elle est considérée comme le senseur du glucose dans la cellule β (Matschinsky, 1996). Le glucose phosphorylé est ensuite métabolisé suivant les voies de la glycolyse, ce qui produit du pyruvate, du NADH et de l'ATP. Etant donné que la cellule β exprime peu la lactate déshydrogénase A (LdhA) (Sekine et al., 1994) et le transporteur des acides monocarboxyliques (pyruvate et lactate) (Zhao et al., 2001), le pyruvate est principalement métabolisé dans la mitochondrie par le cycle de Krebs. La réoxydation du NADH cytosolique en NAD^+ nécessaire au maintien de la glycolyse a lieu grâce à l'action de deux navettes mitochondriales : la navette du glycérol-3-phosphate et la navette malate/aspartate qui régénèrent le NAD^+ dans le cytosol et forment du $FADH_2$ et du NADH dans la mitochondrie (MacDonald, 1982; Sekine et al., 1994; Eto et al., 1999). Le pyruvate, de son côté, est transformé en acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) par la pyruvate déshydrogénase (PDH) et en oxaloacétate (OAA) par la pyruvate carboxylase (PC) qui deviennent des substrats du cycle de Krebs, ce qui permet la production de NADH et $FADH_2$. Bien qu'étant une cellule où la gluconéogénèse est peu active, l'activité de la PC est importante dans la cellule β . Ceci s'explique par le fait que des intermédiaires du cycle de Krebs subissent des phénomènes de cataplérose (ils sortent de la mitochondrie pour être utilisés dans d'autres réactions) et qu'il est donc indispensable de réalimenter le cycle de Krebs en OAA (anaplérose) (pour une revue détaillée, (Jitrapakdee et al., 2010)). Les équivalents réduits, NADH et $FADH_2$, ainsi que ceux produits par la glycolyse sont ensuite oxydés par la chaîne mitochondriale de transport des électrons, ce qui induit une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale interne et résulte en une augmentation du rapport ATP/ADP de la cellule (voir figure 5). Il est intéressant de noter que, dans la plupart des cellules, le rapport ATP/ADP reste stable lorsque la concentration de glucose change dans une gamme physiologique alors que, dans la cellule β , le métabolisme est tel que l'augmentation physiologique de la concentration en glucose permet une augmentation du rapport ATP/ADP (Detimary et al., 1998; Khaldi et al., 2004).

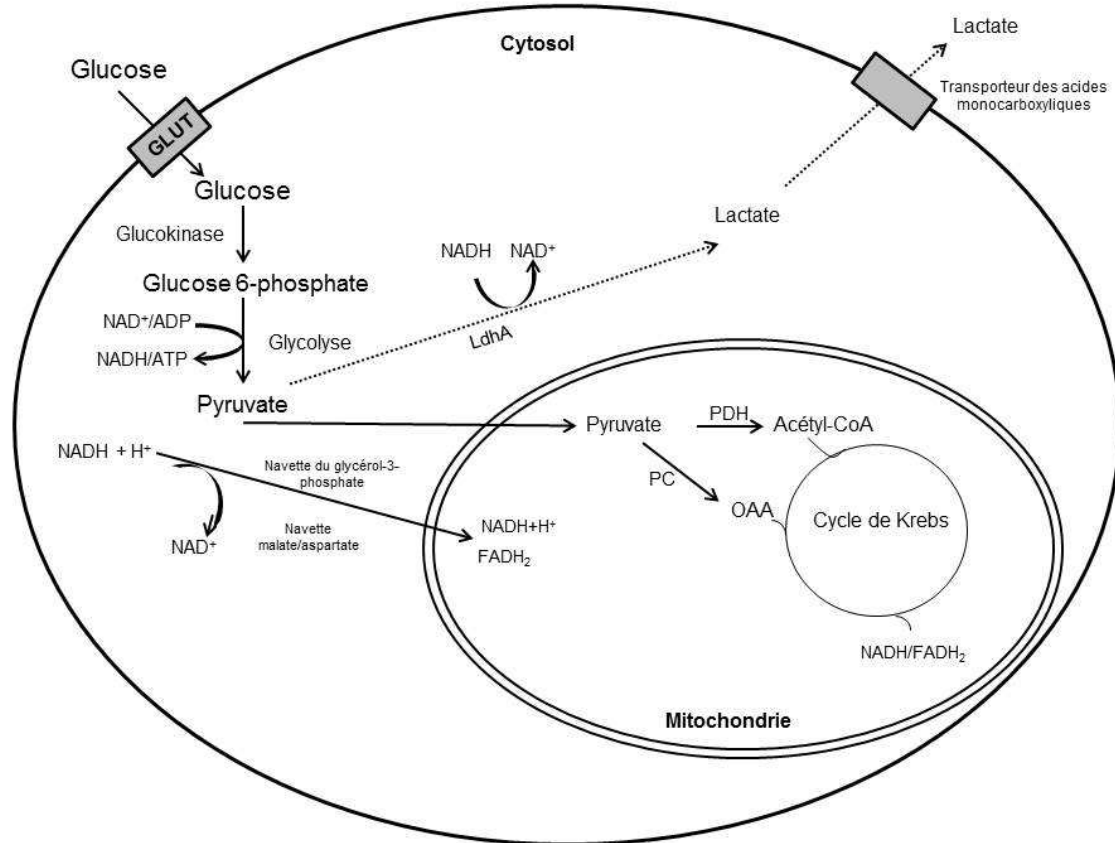


Figure 4 : Métabolisme du glucose dans la cellule β . Le glucose est principalement métabolisé par la glycolyse et le cycle de Krebs afin de produire les équivalents réduits. Le NAD^+ cytosolique est principalement régénéré via les navettes du glycérol-3-phosphate et malate/aspartate $\longrightarrow$ Voies présentes dans la cellule β ; $\cdots \blacktriangleright$ Voies peu présentes dans la cellule β .

1.2.2. Voies déclenchante et amplificatrice

L'augmentation du rapport ATP/ADP en réponse à une stimulation par le glucose provoque la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K^+_{ATP}), la dépolarisation de la membrane plasmique et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant (figure 5). L'influx de Ca^{2+} dans la cellule déclenche l'exocytose des granules d'insuline (Henquin, 2000). Cette séquence d'événements constitue la voie déclenchante de la sécrétion d'insuline par le glucose.

En plus de cet effet, le métabolisme du glucose produit divers signaux capables d'amplifier la sécrétion d'insuline provoquée par une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ce concept a émergé au début des années 90 quand deux études ont montré que, lorsque les canaux K^+_{ATP} sont maintenus ouverts par le diazoxide, le glucose a toujours la capacité d'augmenter la sécrétion d'insuline (Gembal et al., 1992; Sato et al., 1992). Cette voie a pris le nom de voie amplificatrice de la sécrétion d'insuline (Henquin, 2000). Les seconds messagers impliqués dans cette voie ne sont pas encore tout à fait connus. Cependant, pour qu'elle ait lieu, la voie amplificatrice requiert que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ soit élevée et que le glucose soit métabolisé. Elle peut

d'ailleurs être reproduite par d'autres nutriments pour autant que ceux-ci soient métabolisés dans la mitochondrie (Gembal et al., 1993; Maechler, 2002). Alors que l'implication de différents substrats, comme l'AMPc ou l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Gembal et al., 1993), est controversée, un rôle de l'ATP et/ou du GTP semble presque admis. En effet, il existe une bonne corrélation entre les rapports ATP/ADP ou GTP/GDP et la stimulation de la voie amplificatrice (Detimary et al., 1996). Le NADPH, dont le rapport NADPH/NADP⁺ est augmenté par le glucose, semble également être un bon candidat (Ivarsson et al., 2005; Reinbothe et al., 2009). Le rôle d'autres métabolites comme le glutamate reste controversé (Maechler, 2002; Newsholme et al., 2007; Jitrapakdee et al., 2010).

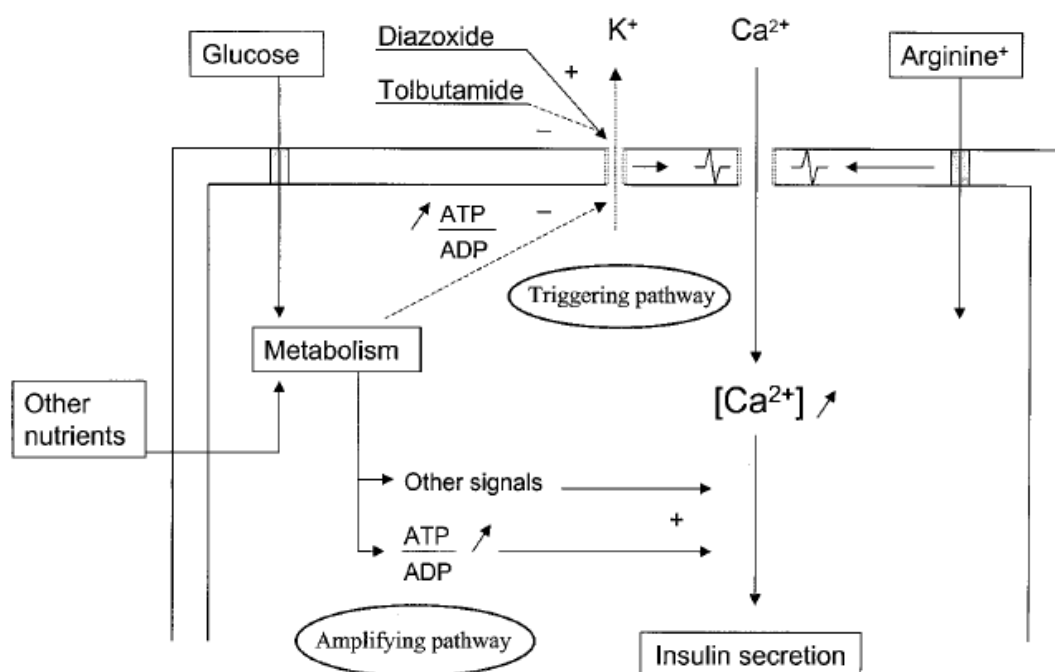


Figure 5. Représentation schématique des mécanismes de stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose ou par les nutriments. les voies déclenchante et amplificatrice participent à ce processus ; + stimulation, - inhibition (Henquin, 2000).

1.2.3. Modulation de la sécrétion d'insuline

D'autres nutriments, des hormones, des neurotransmetteurs ou encore des agents pharmacologiques sont également capables de moduler la sécrétion d'insuline.

Parmi les nutriments, différents acides aminés sont capables d'augmenter la sécrétion d'insuline de manière dose- et glucose-dépendante ainsi que selon leur mode d'administration (seuls ou en combinaison) (Liu et al., 2008b) (pour une revue détaillée (Newsholme & Krause, 2012)). Les acides gras sont également capables d'augmenter la sécrétion d'insuline à condition qu'elle soit déjà stimulée par le glucose. En effet, alors que l'exposition à long

terme des cellules β aux acides gras est délétère, l'exposition aigüe aux acides gras augmente la sécrétion d'insuline tant dans des îlots humains que de rat (Gravena et al., 2002).

Le glucagon-like peptide 1 (GLP-1) et le glucose-dependent insulintropic peptide (GIP), deux hormones incrétines sécrétées par les cellules endocrines de l'intestin lors d'un repas, ont la capacité d'augmenter la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (SISG) (pour une revue détaillée (Phillips & Prins, 2011)). A l'opposé, la somatostatine, sécrétée entre autres par les cellules δ du pancréas endocrine, est capable d'inhiber la sécrétion d'insuline (Schwetz et al., 2013). Un effet inhibiteur semblable est exercé par les catécholamines (Barth et al., 2007).

Le neurotransmetteur parasympathique majeur, l'acétylcholine, est libéré avant le repas et lors de l'absorption intestinale de glucose et amplifie la sécrétion d'insuline (Gilon & Henquin, 2001). A l'inverse, le neuropeptide Y atténue la sécrétion d'insuline (Schwetz et al., 2013).

Il est également possible de moduler la sécrétion d'insuline via des agents pharmacologiques. Par exemple, les sulfamidés hypoglycémiants utilisés dans le traitement du diabète, comme le glibenclamide, stimulent la sécrétion d'insuline en fermant les canaux K^+_{ATP} quelle que soit la concentration en glucose (Henquin, 2004). Comme mentionné précédemment, en ouvrant les canaux K^+_{ATP} , le diazoxide inhibe, lui, la SISG.

2. Autres effets du glucose sur la cellule β

Par rapport à une concentration faible non stimulante, la stimulation par des concentrations physiologiques de glucose contribue au maintien du phénotype différencié des cellules β en stimulant l'expression de gènes importants au bon fonctionnement de ces cellules. Il exerce ainsi, à plus long terme, des effets bénéfiques sur la masse et la fonction des cellules β .

2.1 Maintien du phénotype différencié

A court terme, le glucose stimule la synthèse protéique avec un effet préférentiel sur la synthèse de proinsuline. Ces effets sont observés entre 0 et 10 mmol/l de glucose tant dans des îlots humains que dans des îlots de rat (Ling & Pipeleers, 1996; Bensellam et al., 2009). Ils résultent principalement du recrutement des ARNm de la préproinsuline déjà associés à des ribosomes du cytosol vers le réticulum endoplasmique (RE) (Greenman et al., 2005). Le glucose augmente également la synthèse des enzymes prohormones convertases impliquées dans la conversion de la proinsuline en insuline, comme observé dans la lignée cellulaire MIN6 provenant de cellules β de souris (Skelly et al., 1996), ou dans les îlots de rat (Alarcon et al., 1993). De cette manière, le glucose réapprovisionne la cellule β en insuline et maintient sa capacité de sécrétion en réponse au glucose (Hinke et al., 2004). En plus de ces effets, le glucose stimule le remplissage en Ca^{2+} du RE par activation des pompes « sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase » (SERCA2B) (Tengholm et al., 1999; Ravier et al., 2011). Bien que les changements rapides de la synthèse d'insuline sont principalement dus à l'augmentation de la traduction d'ARNm préexistants, le glucose stimule également très rapidement la transcription du gène de la préproinsuline (il s'ensuit une augmentation des ARNm

immatures), mais ce n'est qu'après plusieurs heures qu'on détecte une augmentation des ARNm codant la préproinsuline (Evans-Molina et al., 2007).

A plus long terme, le glucose stimule donc la transcription du gène de la préproinsuline, la maturation et la stabilisation de ses ARNm, sa traduction en proinsuline ainsi que la conversion de la proinsuline en insuline (Docherty & Clark, 1994; Leibiger et al., 2000; Evans-Molina et al., 2007). Les ARNm de la préproinsuline représentent ~20% des ARNm totaux de la cellule (Van Lommel et al., 2006). Le glucose régule de manière distincte, la fonction de trois facteurs de transcription responsables de la stimulation d'expression du gène de l'insuline: pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1), V-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A (MafA) et neurogenic differentiation 1 (NeuroD1). Ces facteurs sont considérés comme des marqueurs de la différenciation des cellules β et jouent un rôle important dans le développement du pancréas endocrine (principalement PDX-1 et NeuroD1) et la fonction des cellules β (Andrali et al., 2008). Ils agissent sur le promoteur de la préproinsuline de manière synergique chez les rongeurs (Aramata et al., 2005; Matsuoka et al., 2007) et plutôt additive chez l'homme (Docherty et al., 2005).

Outre son effet sur l'expression du gène de la préproinsuline, le glucose stimule également l'expression d'autres gènes dans la cellule β , ce qui permet probablement le maintien de leur phénotype différencié. Parmi ceux-ci, citons GLUT2 (Flamez et al., 2002) et la glucokinase (Leibiger et al., 2001), deux gènes impliqués dans le métabolisme du glucose. Ces effets sur la préproinsuline, GLUT2 et la glucokinase ont été également décrits *in vivo* lors de la réalimentation après un jeûne de 4 jours (Iwashima et al., 1994). A l'opposé, la culture d'îlots de rat en présence de 10 mmol/l de glucose (G10) par rapport à 2 ou 5 mmol/l (G2 ou G5) entraîne une diminution de l'expression de certains gènes de stress comme les gènes de réponse à un stress oxydatif, hème oxygénase 1 (*Hmox1*) et métallothionéine 1a (*Mt1a*) (Jonas et al., 2003; Bensellam et al., 2009), ou encore les gènes participant à la réponse intégrée au stress comme DNA-damage inducible transcript 3 (*Ddit3* (*Chop/Gadd153*)), growth arrest and DNA-damage-inducible protein 34 (*Gadd34*) et activating transcription factor 3 (*Atf3*) (Elouil et al., 2007).

2.2 Maintien de la capacité sécrétoire des cellules β

La stimulation physiologique par le glucose de l'expression des gènes que je viens de mentionner a un lien direct avec le maintien de la capacité sécrétoire des cellules β . Ces gènes sont probablement impliqués dans les modifications de fonction observées dans les cellules β après culture en présence d'une concentration non stimulante de glucose.

In vitro, la culture de cellules β ou d'îlots de rat en présence d'une concentration faible et non stimulante de glucose par rapport à la concentration optimale de 10 mmol/l entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation ultérieure par le glucose (figure 6) (Flamez et al., 2002; Bensellam et al., 2009).

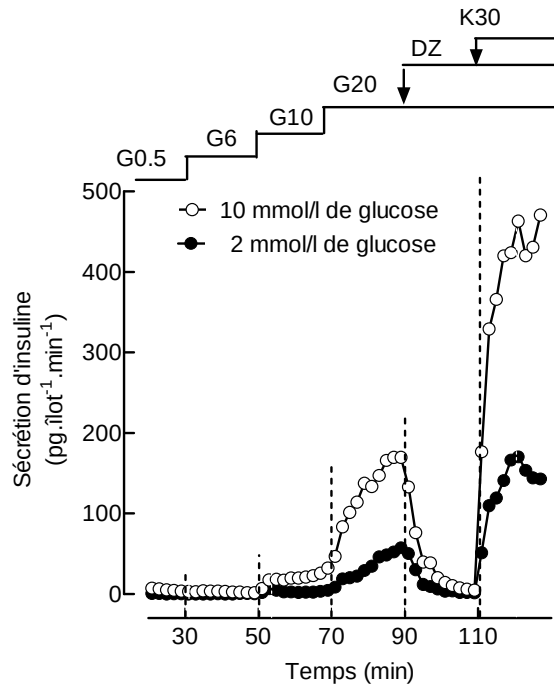


Figure 6 : Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose dans des îlots de rat préalablement cultivés pendant 18h en présence de 2 ou 10 mmol/l de glucose. Après la culture, les îlots ont été périfusés avec un milieu Krebs contenant, comme indiqué en haut de la figure, des concentrations croissantes de glucose (en mmol/l) ; 250 μ mol/l de diazoxide (DZ) ou 30 mmol/l de potassium extracellulaire (K30). Figure adaptée de (Bensellam et al., 2009).

In vivo, le glucose contribue également au maintien de la capacité sécrétoire des cellules β . En effet, les cellules β de rats mis à jeun 2 à 3 jours présentent des altérations de la stimulation de l'influx de Ca^{2+} et de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, accompagnées d'une diminution de la sensibilité au glucose et de l'amplitude maximale de la réponse sécrétoire. Comme pour l'expression des gènes, ces altérations sont corrigées après 24h de réalimentation (Iwashima et al., 1994).

2.3 Maintien de la masse des cellules β

Contrairement à ce que l'on pensait auparavant, le pancréas endocrine est doué d'une plasticité. Celle-ci peut être définie comme la capacité de cet organe à adapter la masse des cellules β suite aux variations de la demande en insuline pour garantir le contrôle de l'homéostasie glucidique (Bernard-Kargar & Ktorza, 2001). Chez l'humain, cette plasticité est observée lors de la grossesse et de l'obésité. En effet, l'augmentation des besoins en insuline pendant la grossesse et la résistance à l'insuline chez les patients obèses sont compensées par une hyperactivité des cellules β ainsi qu'une augmentation de leur masse (Sorenson & Brelje, 1997; Unger & Orci, 2001; Butler et al., 2003). Comme illustré à la figure 7, la masse des cellules β résulte de l'équilibre entre des phénomènes d'expansion (réplication, néogénèse et hypertrophie) et d'involution (apoptose, nécrose, atrophie et autophagie) (Del Prato S. et al., 2004); (Hur et al., 2010; Chen et al., 2011). La rupture de cet équilibre aboutit à une modification de la masse des cellules β , ce qui peut conduire à des pathologies comme le diabète.

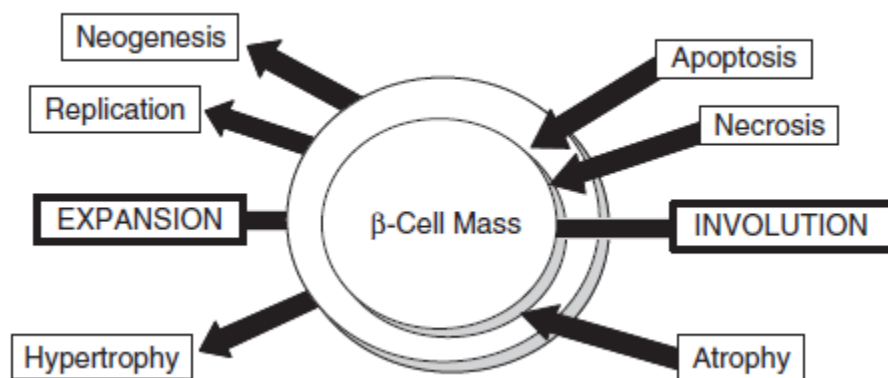


Figure 7. Représentation des mécanismes d'involution et d'expansion impliqués dans la plasticité de la masse des cellules β . Les mécanismes d'expansion comprennent la néogénèse, la réplication et l'hypertrophie ; les mécanismes d'involution comprennent l'apoptose, la nécrose et l'atrophie qui pourrait résulter de l'autophagie (Del Prato S. et al., 2004).

Les mécanismes qui régulent la masse des cellules β ne sont pas complètement élucidés mais le glucose ainsi que tous les nutriments qui stimulent le métabolisme mitochondrial jouent un rôle important dans ce phénomène. Je m'intéresserai ici particulièrement au rôle du glucose, même si l'insuline semble également jouer un rôle important par une action auto- ou paracrine (Lingohr et al., 2006). *In vitro*, il a été démontré que la culture d'îlots de rat en présence de G10 par rapport à une concentration plus faible de G2 à G5 améliore la survie des cellules β en diminuant l'apoptose (Hoorens et al., 1996; Efanova et al., 1998; Van de Casteele et al., 2003; Bensellam et al., 2009). De plus, il a été démontré que l'autophagie joue un rôle important dans la survie des cellules β . En effet, l'ajout d'un inhibiteur de l'autophagie (3-méthyladénine) diminue la survie des cellules INS1-E lors de la culture en présence de 5 mmol/l de glucose (Chen et al., 2013). Ces phénomènes n'ont pas été décrits dans les îlots humains. Comme cité précédemment, la concentration de glucose habituellement utilisée pour la culture d'îlots humains est de 5 mmol/l et il serait donc intéressant de tester l'effet sur la survie de la culture en présence d'une concentration non stimulante de glucose (2 mmol/l). *In vivo*, il a été démontré qu'une infusion de glucose chez le rat induit une augmentation de la masse des cellules β qui serait due, à court terme (24-48h), à une augmentation de la néogénèse (Bernard et al., 1999; Paris et al., 2003) et, à plus long terme (96h), à une augmentation de la réplication et à une hypertrophie des cellules β (Bonner-Weir et al., 1989). Chez la souris, l'infusion de glucose (pendant 2 à 4 jours) augmente aussi le taux de réplication des cellules β sans affecter la masse et la survie des cellules β (Alonso et al., 2007). Après destruction des cellules β , les processus de régénération de celles-ci nécessitent que le glucose soit métabolisé pour effectuer son effet protecteur (Porat et al., 2011).

Ces effets sont à différencier des effets de l'hyperglycémie chronique que je détaillerai plus loin dans cette introduction. Il a également été démontré que, alors que le pancréas de rongeurs normoglycémiques ne présente que de rares cellules apoptotiques, l'hypoglycémie prolongée induite par la transplantation intrapéritonéale d'un insulinome chez le rat ou par des implants sous-cutanés d'insuline bovine chez la souris déclenche l'apoptose des cellules β

endogènes (Blume et al., 1995; Nollevaux et al., 2013). De plus, le nombre de cellules apoptotiques dans des îlots de patients de plus de trois mois souffrant d'hyperinsulinisme est augmenté (Kassem et al., 2000). Dans une autre étude, comme observé sur les immunomarquages, les cellules β voisines de la lésion ne présentaient pas de signes évidents d'apoptose mais une atrophie avec augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique (Sempoux et al., 1998).

L'autophagie semble jouer un rôle physiologique dans la cellule β . En effet, il a été démontré que des souris dont le gène *Atg7* (Autophagy-related 7) a été inactivé spécifiquement dans les cellules β sont hyperglycémiques à jeun et intolérantes au glucose. Les analyses morphologiques montrent une diminution de la masse des cellules β associée à une augmentation de la mort cellulaire et une diminution de la prolifération (Ebato et al., 2008; Jung et al., 2008).

Les mécanismes impliqués dans les effets protecteurs du glucose ne sont pas totalement élucidés, mais plusieurs études proposent différentes hypothèses. Le glucose favoriserait la survie et la croissance des cellules β en augmentant l'expression de l'insulin receptor substrate 2 (IRS2), un phénomène dépendant du $[Ca^{2+}]_i$, et en activant ainsi la voie de la Protéine Kinase B (Lingohr et al., 2006). La diminution du facteur de transcription proapoptotique c-MYC (cellular-Myelocytomatosis) et l'inactivation de la protéine AMP-activated protein kinase (AMPK), un senseur de la déplétion en énergie dans la cellule, semblent aussi impliqués dans les effets protecteurs du glucose (Van de Casteele et al., 2003; Kefas et al., 2003). Hoorens et al. ont suggéré que la stimulation de la synthèse protéique par le glucose supprime un programme apoptotique endogène constitutivement exprimé dans la cellule β (Hoorens et al., 1996). Martens et al. proposent une implication du stress oxydatif dans ces phénomènes. En effet, ils ont démontré que l'accélération du métabolisme induite par le glucose entraîne une diminution des concentrations en espèces réactives de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) associée à une augmentation des taux de NAD(P)H, ce qui augmente les défenses cellulaires face au stress oxydatif (Martens et al., 2005b). Ces phénomènes seront plus amplement décrits par la suite. En plus de l'apoptose, il semble que l'autophagie pourrait être activée lorsque les cellules sont cultivées en présence de concentrations faibles de glucose (Olejnicka et al., 1999). L'étude de Bensellam et al. sur le transcriptome d'îlots de rat cultivés en présence de concentrations croissantes de glucose a révélé une série de gènes dont l'expression est diminuée entre G2 et G10, comme expliqué au chapitre précédent (Bensellam et al., 2009). L'identification du rôle de l'expression de ces gènes pourrait nous aider à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les effets protecteurs du glucose sur la survie des cellules β . Lors de ma thèse, je me suis particulièrement focalisée sur l'implication du stress oxydatif et des gènes *Mt1a* et *Mt2a*.

Il est intéressant d'insister ici sur le fait qu'*in vitro*, le glucose a un effet favorable sur l'expression des gènes, la fonction et la survie des cellules β entre 2 et 10 mmol/l. Par contre, des concentrations de glucose supérieures à 10 mmol/l (20-30 mmol/l) provoquent une diminution de l'expression de gènes importants pour la cellule β , une augmentation de l'expression de gènes normalement peu ou pas exprimés dans la cellule β , ainsi que des altérations de la fonction et de la survie de ces cellules, suggérant ainsi une courbe en V pour

l'évolution de ces différents phénomènes en fonction de la concentration en glucose. Les effets délétères des concentrations supraphysiologiques sont décrits au chapitre suivant.

III. Effets délétères des concentrations supraphysiologiques de glucose sur la cellule β

Le terme glucotoxicité, dont le concept a été introduit pour la première fois en 1985 par Unger et al., définit les effets délétères provoqués par une exposition prolongée des cellules à une concentration trop élevée de glucose (Unger & Grundy, 1985). Dans le contexte des cellules β , ces effets délétères comprennent des modifications de l'expression de certains gènes ainsi que des altérations de la fonction et de la survie des cellules β (Jonas et al., 2009). Une controverse existe dans la définition quant à la durée de l'exposition et à la concentration de glucose requises. Ainsi, alors que, *in vitro*, les effets glucotoxiques s'observent à des concentrations supérieures à 20 mmol/l (30-40 mmol/l) de glucose et pour une durée d'exposition qui varie de quelques heures à plusieurs jours selon les mécanismes (Hoorens et al., 1996; Efanova et al., 1998; Bensellam et al., 2009), *in vivo*, on observe des effets glucotoxiques lors d'une exposition d'une durée de l'ordre de semaines ou de mois à seulement 10 mmol/l de glucose (Jonas et al., 1999; Laybutt et al., 2003; Prentki & Nolan, 2006). Cette différence de seuil glucotoxique s'explique peut-être par l'absence, *in vitro*, de nutriments comme les acides aminés, et des hormones incrélines qui augmentent la sensibilité des cellules β au glucose (Bolea et al., 1997).

1. Altérations de l'expression des gènes

Alors que, paradoxalement, l'expression de l'insuline et de nombreux gènes importants pour le métabolisme du glucose est diminuée lors d'une hyperglycémie prolongée, l'expression de gènes de stress normalement peu ou pas exprimés dans les cellules β est, elle, augmentée.

1.1 Diminution de l'expression de l'insuline

L'altération la mieux caractérisée chez les patients diabétiques ou dans les modèles animaux de DT2 est la réduction de l'expression du gène de la préproinsuline (Jonas et al., 1999; Harmon et al., 1999; Leibowitz et al., 2001; Weir et al., 2001). Ce phénomène est réversible après normalisation de la glycémie par la phlorizine mais ne l'est pas après normalisation des taux de triglycérides circulants par le bezafibrate (Harmon et al., 2001), ce qui suggère le rôle prédominant de la glucotoxicité par rapport à la lipotoxicité dans ces altérations. Cette réduction résulte d'une diminution de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du gène de la préproinsuline (Weir et al., 2001).

In vitro, la diminution d'expression du gène de la préproinsuline initialement décrite dans les lignées cellulaires HIT-T15 (Olson et al., 1993) a également été observée dans des îlots humains (Marshak et al., 1999). Dans les îlots de rat, cette diminution est très faible (10%) après 18h de culture en présence de 30 au lieu de 10 mmol/l de glucose (G30 vs. G10) (Bensellam et al., 2009) et légèrement plus importante et significative (20%) après une semaine de culture dans ces mêmes conditions (Khaldi et al., 2006). Dans les îlots de souris, la diminution est de 40% après trois semaines de culture en présence de G30 (Pascal et al., 2010).

1.2 Diminution de l'expression d'autres gènes importants pour la cellule β

Cette réduction de la transcription du gène de la préproinsuline s'accompagne d'une réduction d'expression d'autres gènes spécifiques des cellules β . Parmi ceux-ci, il a été décrit que l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose comme *Glut2*, la glucokinase et la PC, est diminuée dans des cellules β d'animaux hyperglycémiques. D'autres gènes codant pour des sous-unités des canaux ioniques, des pompes Ca^{2+} -ATPase du RE, des protéines de la machinerie de l'exocytose ou des facteurs de transcription impliqués dans le maintien du phénotype différencié des cellules β voient également leur expression diminuée (Tokuyama et al., 1995; Jonas et al., 1999; Laybutt et al., 2003), ce qui a été partiellement confirmé dans des îlots de patients diabétiques de type 2 (Del Guerra et al., 2005; Marselli et al., 2010). *In vitro*, ces modifications ont été en partie confirmées dans nos préparations d'îlots de rat (Bensellam et al., 2009).

1.3 Modifications de l'expression de gènes de réponse à différents types de stress

En plus de cette diminution d'expression de gènes importants pour la cellule β , il a été décrit que les îlots provenant d'animaux hyperglycémiques ou de patients diabétiques présentent une augmentation de l'expression de gènes normalement peu ou pas exprimés dans les cellules β . Certains d'entre eux sont susceptibles d'altérer la sensibilité au glucose, comme les enzymes de la glycolyse (hexokinase (*Hk*) 1 et *LdhA*), ou de modifier l'équilibre entre métabolisme du glucose et des acides gras (PPAR γ alors que PPAR α est diminué). D'autres sont des gènes classiquement induits par différents stress comme *Hmox1* (pas dans les îlots de patients diabétiques mais bien d'animaux hyperglycémiques), la glutathion peroxidase 1 (*Gpx1*), les *Mt* ou la superoxyde dismutase mitochondriale (MnSOD) pour le stress oxydatif. Des facteurs proapoptotiques comme *Fas* ainsi que le facteur de transcription *c-Myc* voient également leur expression augmenter (Jonas et al., 1999; Laybutt et al., 2002; Laybutt et al., 2003; Marselli et al., 2010).

In vitro, l'augmentation d'expression de certains de ces gènes (*LdhA*, *Hmox1*, *Mt1a*, *MnSOD*, *c-Myc*) a été confirmée. Si l'on se réfère au chapitre précédent et à celui-ci, l'expression des gènes de réponse au stress comme *Atf3*, *Hmox1*, *Mt1a* ou *c-Myc* présente donc un profil en V en fonction de la concentration en glucose présente dans le milieu (minimum à 10 mmol/l) (Bensellam et al., 2009). Etudier les mécanismes d'augmentation de l'expression de ces gènes pourrait nous informer sur le type de stress impliqué dans les effets délétères des concentrations faibles et élevées de glucose. De plus, il serait intéressant de savoir si l'augmentation de leur expression est un simple marqueur de la présence d'un stress ou si elle exerce aussi un rôle protecteur qui permet à la cellule de faire face au stress en question.

2. **Altérations de fonction**

Chez les patients diabétiques de type 2, la sécrétion d'insuline en réponse à une injection intraveineuse de glucose est altérée par rapport à des sujets sains. La première phase du profil biphasique est réduite précocement dans le développement du diabète, ensuite, une perte progressive et partielle de la seconde phase de sécrétion est observée lorsque le diabète est installé (Poitout & Robertson, 1996; Toschi et al., 2002; Kahn et al., 2009). Une

augmentation du ratio plasmatique proinsuline/insuline a également été décrite à des stades précoces du diabète. La stimulation excessive des cellules β , un déficit de conversion de la proinsuline en insuline et la libération de granules immatures d'insuline expliquent cette augmentation (Stumvoll et al., 2001; Ahren, 2005). Ces effets ont également été observés dans des modèles animaux de diabète de type 2 (Ahren, 2005; Poitout & Robertson, 2008).

Ces altérations sont reproduites *in vitro* dans des îlots humains de sujets sains cultivés en présence de 11 mmol/l de glucose (concentration proche de celle observée chez les diabétiques), 20 ou 28 mmol/l par rapport à 5 ou 6 mmol/l (Eizirik et al., 1992; Ling & Pipeleers, 1996; Song et al., 2003). Il est intéressant de noter que la sensibilité des cellules β au glucose est augmentée dans ces conditions expérimentales, comme on peut l'observer par une plus grande sécrétion d'insuline en présence d'une concentration faible de glucose (1,7-2,5 mmol/l) (Eizirik et al., 1992; Ling & Pipeleers, 1996). Dans des cellules β purifiées de rat ou dans des îlots de rat cultivés en présence d'une concentration élevée de glucose (20-30 mmol/l), la stimulation maximale de la sécrétion d'insuline par le glucose est réduite suite à une diminution du contenu en insuline. En effet, dans ces conditions de culture, la stimulation de la sécrétion était plus importante que la production de granules matures d'insuline (Ling et al., 1996; Khaldi et al., 2004). Cependant, il existe une controverse en ce qui concerne l'effet sur la sensibilité des cellules β . Plusieurs études, dont celles de notre laboratoire, décrivent une augmentation de la sensibilité des cellules après culture en présence d'une concentration élevée de glucose, comme l'indique la stimulation de la sécrétion d'insuline en présence de concentrations habituellement non stimulantes de glucose (figure 8) (Purrello et al., 1996; Khaldi et al., 2004; Jonas et al., 2009). Cette augmentation est corrélée avec une augmentation du rapport ATP/ADP, du NAD(P)H et de l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale à 6 mmol/l de glucose suite à une stimulation quasi maximale du métabolisme énergétique et oxydatif. Ces effets pourraient résulter de l'augmentation d'expression de la glucokinase ou de l'hexokinase 1, ou encore de l'accumulation de glycogène pendant la culture et sa dégradation ultérieure lors de la mesure de la sécrétion en périfusion (Malaisse, 1994; Khaldi et al., 2004). Cette augmentation de la sensibilité semble contradictoire avec la réduction de la sécrétion d'insuline observée *in vivo*. Cependant, elle prend son sens si l'on considère que la sécrétion observée après injection intrapéritonéale de glucose correspondrait, *in vitro*, à la réponse observée entre 6 et 20 mmol/l de glucose (voir sur la figure 8) (Jonas et al., 2009).

On ne sait pas encore si ces altérations de fonction sont en lien avec les altérations de survie décrites dans le point suivant. Dans les deux cas, différents types de stress semblent impliqués dans ces altérations.

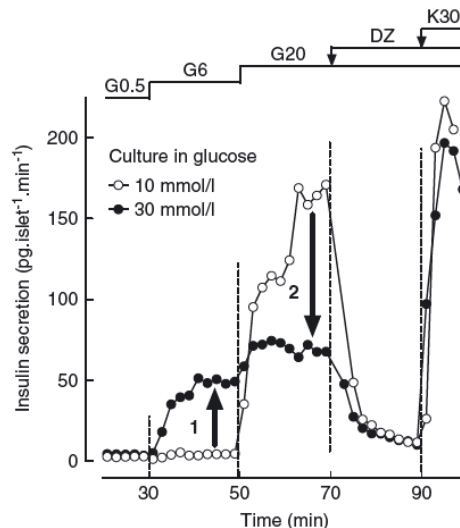


Figure 8. Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose dans des îlots de rat préalablement cultivés pendant 1 semaine en présence de 10 ou 30 mmol/l de glucose. Après la culture, les îlots ont été périfusés avec un milieu Krebs contenant, comme indiqué en haut de la figure, des concentrations croissantes de glucose (en mmol/l) ; 250 μ mol/l de diazoxide (DZ) ou 30 mmol/l de potassium extracellulaire (K30). 1 : augmentation de la sensibilité. 2 : diminution de la réponse maximale au glucose (Jonas et al., 2009).

3. Altérations de survie

Il est aujourd'hui clairement établi que la masse des cellules β de patients diabétiques est réduite de ~25 à 50% probablement suite à des phénomènes apoptotiques (Butler et al., 2003; Marchetti et al., 2004; Marchetti et al., 2007; Rahier et al., 2008), mais il a été récemment suggéré que des phénomènes de dédifférenciation des cellules β pourraient également être à l'origine de cette perte de masse (Talchai et al., 2012). Alors que chez le rongeur l'hyperglycémie provoque une régénération des cellules β (Lipsett & Finegood, 2002; Peshavaria et al., 2006; Nir et al., 2007), ce phénomène ne semble pas présent chez l'homme chez qui une pancréatectomie partielle n'engendre pas de régénération des cellules β (Menge et al., 2008). Une question reste cependant d'actualité : qui, de la détérioration de la fonction ou de la masse, serait responsable de l'installation du diabète ? Certains auteurs plaident plutôt pour un effet important des altérations de fonction dans l'installation et la progression de la maladie. En effet, la réduction de la masse est proportionnelle, non pas à l'âge du diagnostic, mais à la durée de la pathologie, ce qui suggère qu'elle serait une conséquence de l'hyperglycémie une fois le diabète installé plutôt qu'une cause de la pathologie (Rahier et al., 2008). De plus, il semblerait qu'une pancréatectomie partielle (30-50%) ne mènerait que rarement à un diabète (Slezak & Andersen, 2001), alors qu'une réduction de 50% de la fonction est déjà observée dès le début du diabète. L'augmentation de l'apoptose a également été observée dans certains modèles animaux de diabète de type 2 (comme les rats Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ou les souris dont le récepteur à la leptine (Lepr) est muté (*Lepr^{ob/ob}*)) (Ahren, 2005), mais pas dans d'autres (comme les rats Goto-Kakizaki (GK)) (Portha et al., 2001; Portha et al., 2009). En plus de cette modification de la survie, des phénomènes d'hypertrophie des cellules β sont également présents chez les rats pancréatectomisés (Jonas

et al., 1999; Laybutt et al., 2003). Comme évoqué au point précédent, il n'est pas encore établi si cette réduction de la masse peut être responsable des altérations de fonction, si la dysfonction explique la réduction de la masse, ou encore si ces événements sont indépendants. Au vu des données actuelles principalement basées sur des expériences réalisées sur animaux, il semblerait qu'une réduction partielle de la masse comme observée dans le DT2 ne pourrait engendrer le degré de dysfonction observé, mais plus de données sur le sujet sont requises pour répondre à la question (Kahn et al., 2009).

In vitro, les phénomènes de glucotoxicité sur la survie des cellules β ne sont détectables qu'à des concentrations de minimum 20 mmol/l de glucose. En-dessous de cette concentration, mise à part l'étude de Efanova et al., les auteurs n'ont pas décrit d'augmentation de l'apoptose (Ling et al., 1994; Hoorens et al., 1996; Ling et al., 1996; Efanova et al., 1998). Ceci semble en contradiction avec les données observées *in vivo*. Cependant, lorsque l'exposition au glucose est supérieure à 10 jours ou que la concentration dépasse 20 mmol/l, une augmentation des phénomènes apoptotiques est observée. En se rappelant les effets bénéfiques du glucose sur la survie entre G2 et G10 décrits au chapitre précédent, on peut maintenant établir que l'apoptose des îlots de rat en fonction de la concentration en glucose présente un profil en V que nous qualifierons d'asymétrique car l'apoptose est moindre en présence de G30 que de G5 (figure 9) (Bensellam et al., 2009).

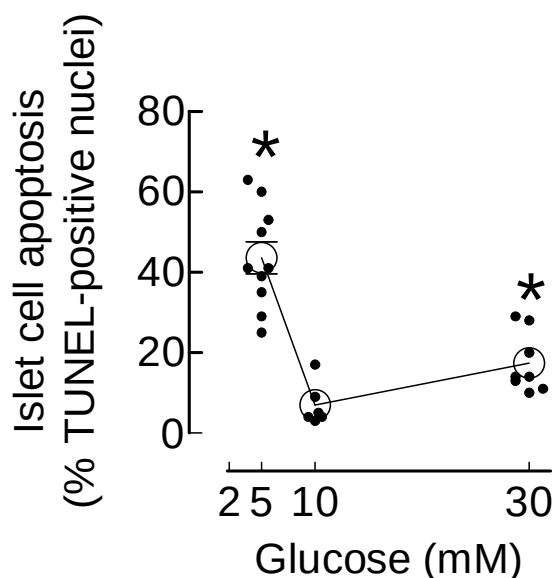


Figure 9. Apoptose des cellules β dans des îlots de rat cultivés une semaine en présence de concentrations croissantes de glucose (5, 10 et 30 mmol/l). L'apoptose a été évaluée en mesurant le pourcentage de noyaux de cellules des îlots positifs au marquage TUNEL (Bensellam et al., 2009).

Il est important ici de préciser qu'il existe une différence de sensibilité des cellules β au glucose selon l'espèce et le fond génétique. En effet, la culture d'îlots de souris en présence de G30 n'entraîne pas d'augmentation du nombre de cellules apoptotiques après une semaine mais augmente bien l'apoptose après trois semaines (Jonas et al., 2009; Pascal et al., 2010; Duprez & Jonas, 2011).

4. Mécanismes impliqués dans les altérations glucotoxiques des cellules β

Alors que de nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer ces altérations de fonction et de masse induites par la glucotoxicité, je vais m'intéresser aux différents types de stress induits dans cette condition. Parmi ces différents stress, le stress du réticulum endoplasmique (RE), l'altération de l'autophagie, l'augmentation des cytokines inflammatoires, l'hypoxie et le stress oxydatif semblent jouer un rôle important dans les mécanismes de glucotoxicité (Bensellam et al., 2012b). Je porterai un intérêt particulier au stress oxydatif qui fera l'objet de mes travaux de thèse. Dans ce point, une brève description du stress du RE, de l'autophagie, de l'augmentation des cytokines inflammatoires et de l'hypoxie sera réalisée en se focalisant principalement sur les données obtenues *in vivo* chez l'homme.

Ces dernières années, différents auteurs se sont intéressés à l'implication du stress du RE dans les mécanismes de glucotoxicité. Le stress du RE est défini comme un déséquilibre entre la quantité de protéines à replier et la capacité du RE à effectuer ce repliement. Dans le cadre de la glucotoxicité, l'augmentation de la quantité de protéines à replier peut provenir de la stimulation importante de synthèse d'insuline en réponse au glucose. La diminution de la capacité de repliement peut, elle, survenir quand le fonctionnement des chaperonnes réticulaires est altéré. Face à ce stress, la cellule a développé une réponse adaptative, la réponse aux protéines mal repliées (UPR pour unfolded protein response). Cette réponse permet l'atténuation transitoire de la traduction des protéines, l'augmentation de l'expression des chaperonnes ainsi que la dégradation des protéines mal repliées. Si ces événements échouent à restaurer l'homéostasie du RE, la cellule entre en apoptose (Scheuner & Kaufman, 2008). La réponse UPR peut activer la réponse ISR (integrated stress response) qui entraîne l'expression de gènes proapoptotiques comme *Ddit3* ou *Atf3* (Harding et al., 2003; Ma & Hendershot, 2004). Différents arguments plaident pour un rôle du stress du RE dans l'apoptose des cellules β observée chez les patients diabétiques. Une étude avait initialement démontré que des îlots fraîchement isolés de patients diabétiques ne présentaient pas de signes majeurs d'activation de la réponse UPR, mais développaient celle-ci après culture en présence d'une concentration élevée de glucose (Marchetti et al., 2007). Deux autres études montrent, elles, une augmentation des marqueurs de stress du RE dans des îlots de patients diabétiques (Laybutt et al., 2007; Huang et al., 2007) alors qu'une dernière, plus récente, ne montre que peu de modifications d'expression des ARNm de la réponse UPR dans des îlots microdisséqués sur coupes congelées de pancréas de patients diabétiques (Marselli et al., 2010). Il est ici intéressant de mentionner que les processus autophagiques semblent jouer un rôle protecteur contre le stress du RE (Quan et al., 2012).

L'autophagie est un mécanisme d'autodigestion de la cellule au cours duquel il y a formation de vésicules cytosoliques appelées autophagosomes qui séquestrent des constituants cellulaires afin de les délivrer aux lysosomes pour entraîner leur dégradation et le recyclage des différents composants. Masini et al. ont démontré que des îlots de patients atteints d'un DT2 présentent des signes d'autophagie altérée (accumulation importante de vacuoles caractéristiques de l'autophagie) et ils suggèrent que cela pourrait contribuer à la perte de la masse des cellules β dans le cadre du DT2 (Masini et al., 2009).

Il y a aujourd'hui certaines données démontrant que l'inflammation participe à la pathogénèse du DT2 (Donath & Shoelson, 2011). En effet, l'état diabétique est caractérisé par une inflammation chronique à bas bruit mise en évidence par l'augmentation plasmatique de différentes cytokines et chémokines inflammatoires sécrétées par le tissu adipeux, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires. L'hyperglycémie semble participer au processus inflammatoire dans différents tissus comme les cellules β , ce qui pourrait contribuer aux altérations de survie et de fonction observées. Ce processus est soutenu par l'observation que, *in vitro*, les cytokines proinflammatoires (Interleukine (IL)-1 β , interféron (IFN) γ , tumor necrosis factor (TNF) α , etc.) altèrent la survie et la fonction des cellules β via différents types de stress comme le stress du RE (Cnop et al., 2005; Eizirik et al., 2008). L'exposition d'îlots humains à des concentrations très élevées de glucose entraîne une augmentation de l'activation de Nuclear Factor κ B (NF κ B), un facteur de transcription classiquement impliqué dans la réponse immunitaire et inflammatoire, et parallèlement de l'expression et de la sécrétion d'interleukine-1 β (IL-1 β) (Maedler et al., 2002). Même si d'autres études chez le rongeur et chez l'humain n'ont pas confirmé que les concentrations élevées de glucose entraînaient l'activation de NF κ B dans les cellules β (Elouil et al., 2005; Welsh et al., 2005), il a été démontré que l'administration d'un antagoniste du récepteur à l'IL-1 β a des effets bénéfiques sur la tolérance au glucose chez des patients souffrant d'un DT2 et que cet effet persiste 39 semaines après l'arrêt du traitement. Toutefois, ces effets bénéfiques pourraient s'exercer via d'autres cellules que les cellules β (Larsen et al., 2007; Larsen et al., 2009).

L'hypoxie est présente lorsque les besoins en O₂ sont supérieurs à l'apport en O₂. Cela mène à une diminution de la production mitochondriale en ATP et une augmentation de la production de ROS, ce qui influence la survie cellulaire. Face à cette situation, la cellule active le facteur de transcription hypoxia inducible factor (HIF), ce qui augmente la survie cellulaire en favorisant le métabolisme anaérobie, en augmentant le flux sanguin, la croissance des capillaires au niveau des tissus et la capacité de transport de l'O₂ dans l'organisme (Semenza, 2010). Dans les cellules β , la stimulation par le glucose stimule la production d'ATP et augmente donc l'utilisation d'oxygène, ce qui pourrait engendrer une situation d'hypoxie dans le cas où le flux sanguin n'augmente pas suffisamment. La réponse à l'hypoxie dans la cellule β pourrait cependant, en plus de favoriser la survie de la cellule et la résistance à des épisodes hypoxiques ultérieurs, altérer sa fonction. Il a en effet été démontré que l'activation prolongée de HIF dans des cellules β normoxiques augmente la sécrétion basale d'insuline et diminue la sécrétion maximale d'insuline induite par le glucose (Zehetner et al., 2008), une situation similaire à celle observée dans des îlots après culture en présence de G30. Ces altérations résultent, pour la sécrétion basale, d'une augmentation de la production d'ATP par la voie glycolytique (par augmentation de l'expression des gènes impliqués dans cette voie sauf celui de la glucokinase) et pour la sécrétion maximum, d'une réduction de l'utilisation du pyruvate et de la production d'ATP par le cycle de Krebs (par inhibition de la PDH et augmentation de la conversion du pyruvate en lactate). *In vivo*, le rôle de l'hypoxie dans le DT2 est controversé. Des auteurs décrivent une diminution de l'expression de régulateurs de la réponse à l'hypoxie dans des îlots de patients diabétiques, ce qui provoquerait la diminution de l'expression de nombreux gènes importants pour la fonction

des cellules β (Gunton et al., 2005). Cependant, ces observations n'ont pas été confirmées par d'autres (Marselli et al., 2010).

Le rôle et les mécanismes du stress oxydatif seront amplement décrits dans le chapitre suivant.

5. Expression des gènes de réponse à un stress dans notre modèle expérimental

Etant donné les effets bénéfiques du glucose entre 2 et 10 mmol/l et les effets délétères des concentrations supraphysiologiques sur la survie et la fonction des cellules β , la comparaison de seulement deux concentrations de glucose peut, selon les concentrations choisies, mener à des conclusions contradictoires. Il nous a donc semblé important d'étudier les effets du glucose sur l'expression des gènes des cellules β dans une large gamme de concentrations. Afin de mieux comprendre la régulation par le glucose des différents types de stress, Bensellam et al., ont publié, en 2009, une étude concernant le transcriptome d'îlots de rat après culture pendant 18h en présence de 2, 5, 10 ou 30 mmol/l de glucose. A partir de tous les gènes dont l'expression était significativement modifiée plus de 1,4 fois entre au moins deux des quatre concentrations de glucose testées, l'analyse de cluster a mis en évidence 18 profils d'expression différents (10 profils unidirectionnels et 8 profils en V ou en V inversé). Plusieurs de ces modifications d'expression ont déjà été mentionnées dans cette introduction et je m'attarderai ici sur les gènes impliqués dans les différents stress. Pour ce faire nous avons sélectionné deux clusters (D1 et V2) présentant un profil proche de celui de l'apoptose à savoir un profil en L ou en V asymétrique (figure 10) (Bensellam et al., 2009).

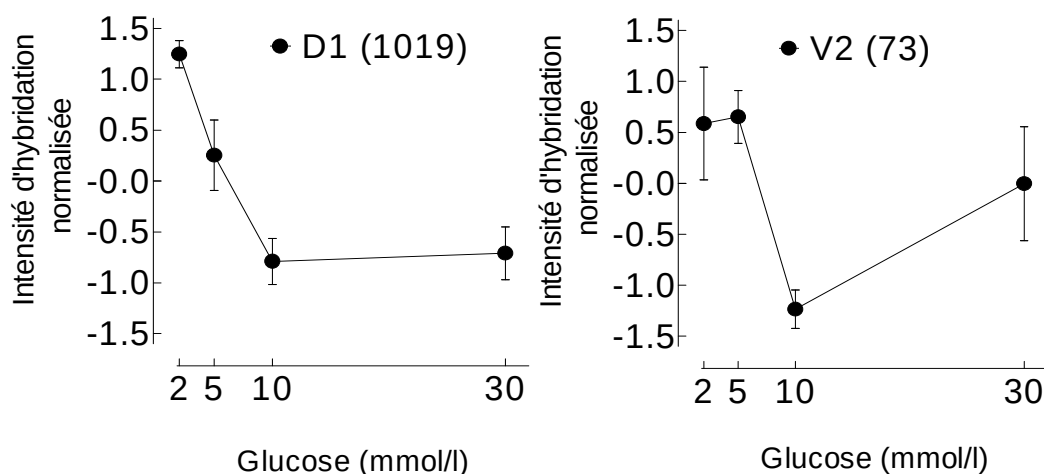


Figure 10. Clusters D1 et V2. Moyenne des valeurs d'hybridation normalisée (moyenne = 0 et déviation standard = 1) de tous les gènes appartenant aux clusters D1 et V2 (1019 et 73 : nombre de probe-sets) (Bensellam et al., 2009).

Le cluster D1 comprend les gènes de la réponse ISR dont certains sont qualifiés de proapoptotiques, comme *Atf3* qui a fait l'objet de mes travaux de Master en sciences biomédicales (Duprez & Jonas, 2011).

Le cluster V2 comprend, entre autres, les gènes de réponse à un stress oxydatif comme *c-Myc*, *Hmox1* et *Mt1a*. Ce dernier m'a particulièrement intéressé lors de ma thèse. L'intérêt de porter mon attention plus particulièrement sur le stress oxydatif est parti de la comparaison des effets du glucose sur la survie et l'expression des gènes de stress dans les îlots de souris vs. les îlots de rat (Jonas et al., 2009). Comme chez le rat, le glucose exerce un effet bénéfique sur la survie et l'expression des gènes du stress oxydatif dans des cellules β de souris entre 2 et 10 mmol/l. Par contre, à l'opposé de ce que nous observons chez le rat, une semaine de culture en présence de G30 vs. G10 n'engendre pas d'augmentation de l'apoptose ni de l'expression des trois gènes de réponse au stress oxydatif alors qu'un marqueur du stress du RE, l'épissage du pré-ARNm X-box binding protein (*Xbp1*) est lui toujours augmenté. Ces résultats plaident donc pour un rôle plus important du stress oxydatif dans les phénomènes de glucotoxicité que nous observons dans les îlots cultivés en présence de G30 (Jonas et al., 2009).

IV. Le stress oxydatif

1. Définition, systèmes de défense et cibles du stress oxydatif

1.1 Définition

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les pro- et les antioxydants en faveur des substances pro-oxydantes. Ce déséquilibre peut provenir soit d'une augmentation de la production des ROS soit d'une diminution des défenses antioxydantes de la cellule (Sies & Cadenas, 1985). Les ROS incluent les radicaux libres de l'oxygène dont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) ainsi que certains dérivés non radicalaires de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le $OH^{\cdot}$ est le ROS le plus réactif, il agit instantanément avec ses molécules voisines, ce qui explique son grand pouvoir destructeur. L'anion superoxyde est moins réactif que le $OH^{\cdot}$ et ne réagit pas directement avec des molécules biologiques mais réagit rapidement avec d'autres radicaux comme le monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$) pour former du peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$) qui est très toxique. L' H_2O_2 est lui-même le moins réactif et peut diffuser à travers les membranes. Toutefois, en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}), il se transforme en $OH^{\cdot}$ par la réaction de Fenton. A concentration physiologique, les ROS sont importants pour le maintien de la fonction cellulaire et pour l'homéostasie redox de la cellule. Ils peuvent agir comme messagers intracellulaires et ce rôle est principalement attribué au H_2O_2 . A concentration plus élevée, les ROS sont essentiels pour la défense de l'organisme contre les agents pathogènes mais peuvent aussi endommager les constituants de la cellule.

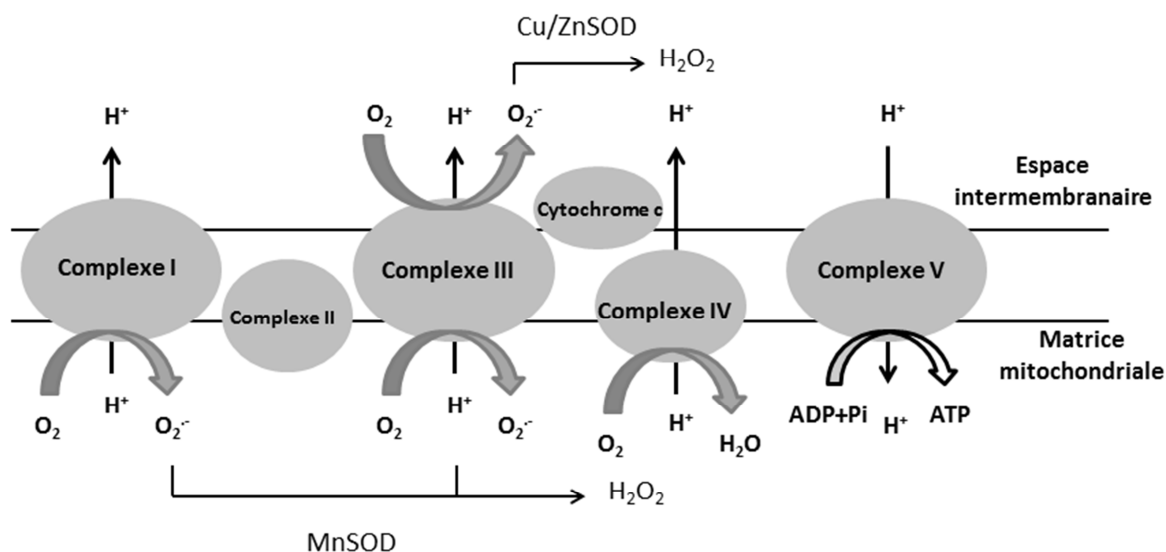


Figure 11. Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons mitochondriale et des sites de production des ROS. Les ROS sont principalement produits au niveau des complexes 1 et 3. Les MnSOD et Cu/ZnSOD dismutent l'anion superoxide en peroxyde d'hydrogène.

Une source bien connue de production de l' $O_2^{\cdot-}$ est la chaîne mitochondriale de transport des électrons. C'est principalement au niveau du complexe I (NADH déshydrogénase) et du complexe III (cytochrome b-c) que la production s'opère. En effet, lors de la respiration, le transfert des électrons par les différents complexes de la chaîne de transport génère une différence de potentiel à la membrane interne de la mitochondrie. Cela aboutit à la réduction de l' O_2 en H_2O et à la formation d'ATP. Cependant, certains électrons échappent des complexes de la chaîne de transport et sont captés par la molécule d' O_2 . Il y a alors formation d' $O_2^{\cdot-}$ qui est libéré soit au niveau de la matrice mitochondriale, soit au niveau de l'espace intermembranaire (figure 11) (Sivitz & Yorek, 2010). Une autre source bien connue de génération de ROS est le complexe enzymatique de la NADPH oxydase (NOX). Ce complexe a la capacité de transférer les électrons du NADPH à l' O_2 pour former l' $O_2^{\cdot-}$. Cette production intense de ROS au niveau des cellules phagocytaires permet la destruction des pathogènes. Mis à part l'expression de NOX2 dans la membrane de ces cellules immunitaires, certaines isoformes de NOX (NOX1, NOX2, NOX4 et NOX5 exclusivement chez l'homme) sont également exprimées dans les îlots pancréatiques (Uchizono et al., 2006; Guichard et al., 2008; Li et al., 2012). Le rôle physiologique de l'expression des NOX dans les cellules β est actuellement inconnu, mais il a été démontré que dans des souris knock-out pour *Nox2*, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est diminuée (Li et al., 2012).

1.2 Systèmes de défense

Afin de faire face à cette augmentation de ROS, la cellule est équipée d'un système enzymatique et d'un système non enzymatique capables de détoxifier ces espèces réactives.

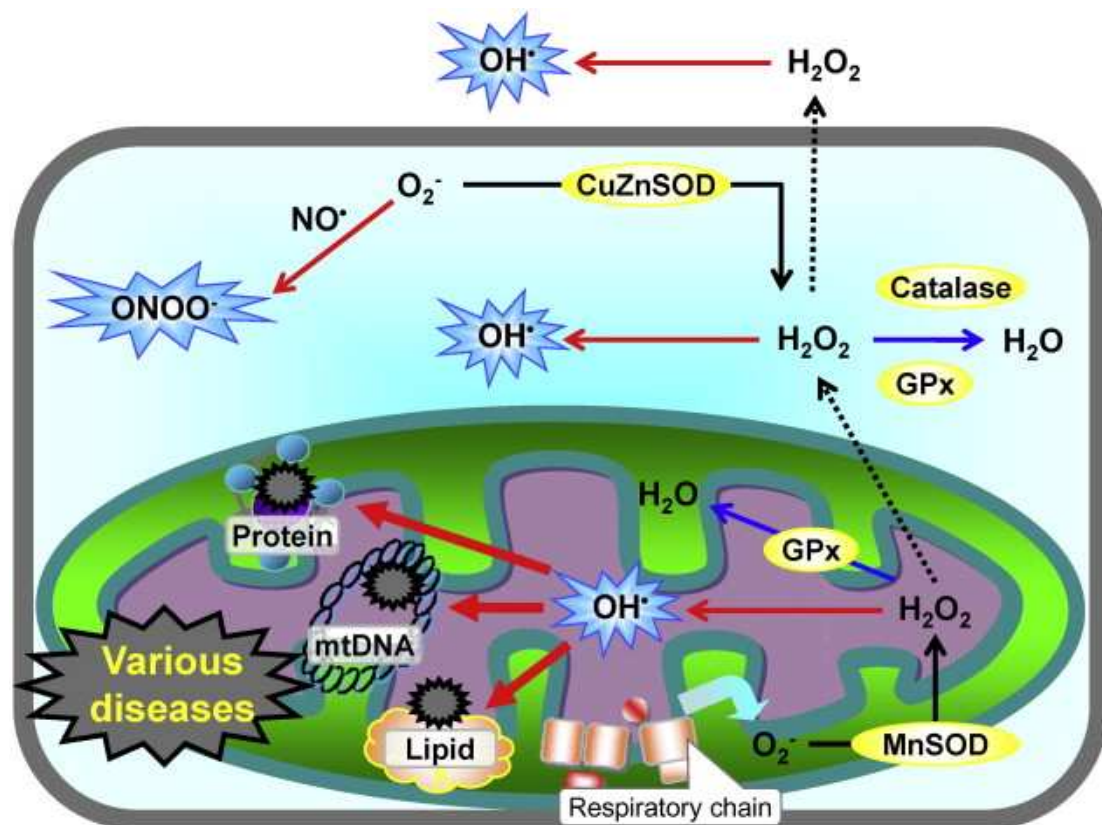


Figure 12. Génération, systèmes de défense et cibles mitochondriales des ROS dans la cellule. Les ROS, principalement générés dans la mitochondrie par la chaîne de transport des électrons peuvent endommager les protéines, l'ADN et les lipides de la mitochondrie. Les MnSOD, Cu/ZnSOD, catalase et GPx représentent le système classique de défenses antioxydantes (Yamada & Harashima, 2008).

Parmi les systèmes enzymatiques, le plus classiquement connu comprend les superoxydes dismutases (SOD) qui détoxifient l' O_2^- en H_2O_2 par une réaction de dismutation. Il en existe trois isoformes qui diffèrent entre eux par leurs cofacteurs (cuivre (Cu), zinc (Zn) et manganèse (Mn)) ainsi que par leur localisation cellulaire : la Cu/ZnSOD dans le cytosol (SOD1 chez l'homme) ou sécrétée dans les espaces intercellulaires (SOD3 chez l'homme) et la MnSOD au niveau de la matrice mitochondriale (SOD2 chez l'homme) (Patel & Day, 1999). Comme illustré aux figures 12 et 13, ce système comprend également des enzymes capables de détoxifier l' H_2O_2 en O_2 et en H_2O : la catalase, principalement au niveau des peroxysomes, et la glutathion peroxydase (GPx) qui peut être intra- ou extracellulaire selon l'isoforme. Contrairement à la catalase, les GPx utilisent un donneur d'électrons, le glutathion qui est ainsi transformé de sa forme réduite (GSH) à sa forme oxydée (GSSG). Le GSSG est ensuite réduit en GSH par la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme cofacteur. En plus de ce système classique, il existe d'autres enzymes impliqués dans la détoxification des éléments cellulaires endommagés par les ROS. Parmi celles-ci, les peroxyrédoxines (PRX), également des peroxydases, réduisent les protéines oxydées par l' H_2O_2 à l'aide de la forme réduite de la thiorédoxine (TRX). Cette dernière est régénérée grâce à la thiorédoxine réductase (TRX-R) et au NADPH. Le NADPH est lui principalement produit par la voie des pentoses phosphates. Il existe également une nouvelle enzyme

antioxydante, la sulfirédoxine, qui catalyse la réduction des résidus protéiques cystéine-acide sulfinique, notamment au site catalytique des PRX hyper oxydées, en résidus thiols.

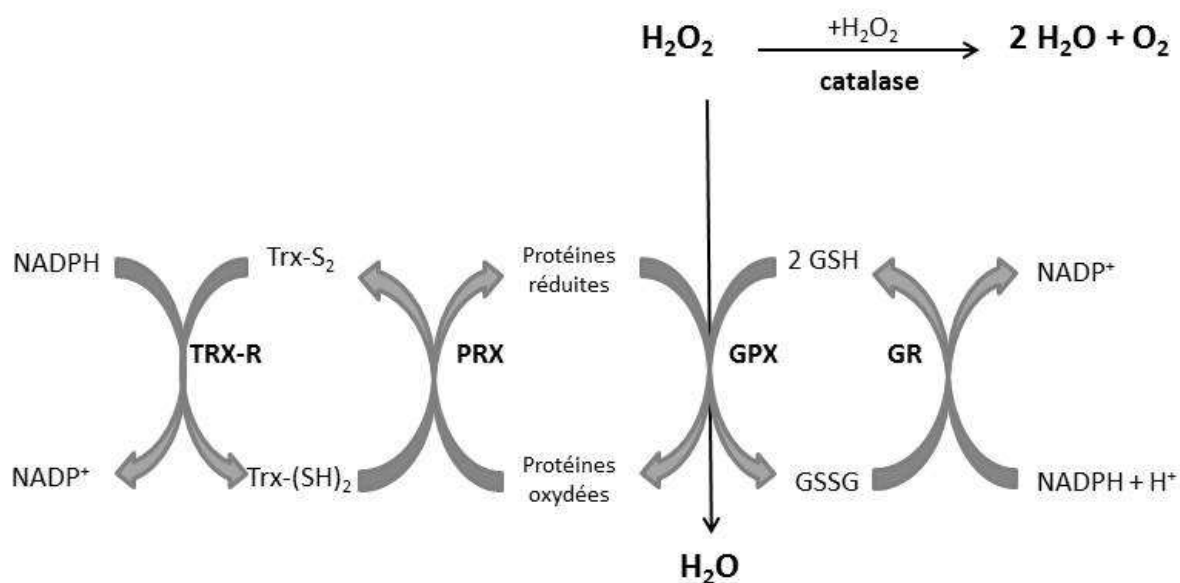


Figure 13. Principaux mécanismes enzymatiques de détoxification du H_2O_2 . Le H_2O_2 est principalement détoxifié par la catalase et la GPX, elle-même réduite par la GR. Les protéines oxydées par le H_2O_2 sont réduites par les PRX, elles-mêmes régénérées par la TRX-R.

Les Glutarédoxines (GRX) sont des petites protéines qui fonctionnent comme des oxydoréductases. Leur rôle le plus documenté est la réduction des protéines via le processus de déglutathionylation (scinder la liaison du GSH avec une cystéine présente dans la protéine, qui résulte habituellement de la liaison du glutathion à une cystéine oxydée par les ROS). Elles sont normalement réduites par le GSH, lui-même régénéré par la GR et le NADPH (Stroher & Millar, 2012).

Comme évoqué précédemment, la cellule possède également d'autres enzymes faisant partie des « gènes de réponse à un stress oxydatif » comme *Hmox1* et les *Mt*. Celles-ci sont augmentées lorsque la cellule souffre d'un stress oxydatif et pourraient l'en protéger. Une description détaillée des MT sera présentée plus loin dans cette introduction.

En plus du système enzymatique, la cellule possède des défenses antioxydantes non enzymatiques. A la différence du système enzymatique, ce système est épuisable et l'alimentation, par exemple, permet de réapprovisionner la cellule en antioxydants non enzymatiques. Ces molécules ont la capacité de fournir un électron aux radicaux libres sans perdre leur stabilité. Parmi celles-ci, le GSH joue un rôle important soit en interagissant directement avec les molécules oxydées, soit, comme expliqué précédemment, en étant substrat de la GPX. Il est intéressant de noter ici que le rapport GSH/GSSG est un bon indicateur du statut redox de la cellule. Egalement les vitamines E (liposoluble) et C (hydrosoluble) sont antioxydantes et sont capables de stopper la réaction de propagation de la peroxydation lipidique et l'oxydation des LDLs (Low-density lipoproteins) (Valko et al., 2007). Certains oligoéléments comme le sélénium, le Cu et le Zn participent indirectement à

la détoxification des ROS. Un intérêt particulier sur le Zn a été porté lors de mes travaux et le rôle de cet élément sera discuté amplement par la suite.

1.3 Cibles du stress oxydatif

Les ROS sont capables d'engendrer des dégâts cellulaires en s'attaquant aux protéines (oxydation, glycation, formation d'adduits, etc), ce qui modifie leur structure et donc leur fonction. Ils s'attaquent également aux lipides et provoquent la peroxydation lipidique, ce qui modifie la fluidité membranaire, et s'attaquent à l'ADN (cassure des brins, oxydations des bases, etc), ce qui provoque des mutations dans l'ADN. Lorsque la cellule ne peut faire face à un stress trop important, elle entre en apoptose ou en nécrose.

Les ROS sont également des modulateurs de l'apoptose. Ce mécanisme a émergé avec l'observation que l'ajout d'oxydants engendrait l'apoptose alors que l'addition d'antioxydants diminuait les phénomènes apoptotiques (Chandra et al., 2000). Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Le H_2O_2 pourrait lui-même perturber le potentiel de membrane mitochondrial et ainsi provoquer la libération du cytochrome c (Stridh et al., 1998). Une fois dans le cytosol, le cytochrome c se lie à Apaf-1 et forme, en présence d'ATP, l'apoptosome. Une fois ce complexe formé, la voie intrinsèque de l'apoptose est enclenchée par l'activation de la caspase 9. Le H_2O_2 pourrait également induire l'apoptose via le système Fas/Fas ligand impliqué dans la voie extrinsèque (Bauer et al., 1998; Cabaner et al., 1999). Cette hypothèse n'est cependant pas admise par tous les auteurs (Hug et al., 1994). De plus, Les ROS pourraient être impliqués dans l'apoptose via le facteur de transcription p53 qui est, lui-même impliqué dans l'expression de gènes producteurs de stress oxydatif ou proapoptotiques comme BAX (Liu et al., 2008a). D'autres facteurs de transcription comme NF κ B sont activés par le H_2O_2 et peuvent réguler la transcription de gènes proapoptotiques. Une étude récente dans la lignée cellulaire MIN6 a démontré que les ROS réduisent l'expression de la glucokinase. La diminution de l'interaction entre la glucokinase et la mitochondrie augmenterait le relargage du cytochrome c dans le cytosol et ainsi les phénomènes apoptotiques (Lee et al., 2009).

2. Le stress oxydatif dans la cellule β

Après cette introduction générale sur le stress oxydatif, je vais maintenant m'attarder au stress oxydatif dans la cellule β en commençant par décrire l'expression particulièrement faible, par rapport à d'autres tissus, de certaines enzymes de détoxification des ROS. Je décrirai ensuite les études montrant l'existence d'un stress oxydatif dans les îlots de patients diabétiques avant de m'attarder aux mécanismes de productions des ROS et aux effets physiologiques de ces molécules sur la cellule β .

2.1 Particularités des défenses enzymatiques de la cellule β

Une des particularités de la cellule β , souvent mise en avant pour expliquer sa sensibilité élevée au stress oxydatif, est l'expression faible des enzymes antioxydantes classiques par rapport au foie et à d'autres tissus. En effet, chez le rongeur, tant l'expression (ARNm et protéine) que l'activité des SOD dans les îlots pancréatiques ne s'élèvent qu'à 30% de ce qui est observé dans le foie. La GPX et la catalase sont également peu présentes (~5% par rapport

au foie) (Lenzen et al., 1996; Tiedge et al., 1997). Suite à la stimulation par le glucose, l'activité de ces enzymes n'est pas augmentée dans les îlots de rat (Tonooka et al., 2007). Cette plus faible expression des enzymes antioxydantes classiques pourrait expliquer la grande sensibilité des îlots de rongeur à des agents qui provoquent la production de ROS, comme l'alloxane ou la streptozotocine. L'activité de la SOD et de la catalase est néanmoins plus importante dans des îlots humains que dans des îlots de rat ; les îlots de souris possédant, eux, une activité encore plus faible de ces deux enzymes (Welsh et al., 1995; Tonooka et al., 2007). Dans ce contexte, il est intéressant ici de noter que les îlots humains sont beaucoup moins sensibles à l'alloxane et la streptozotocine (au niveau de la survie et de la fonction) que les îlots de rat (Eizirik et al., 1994). Il a également été démontré que la cellule β exprime peu la glutathion-S-transférase 3 microsomale (Pullen et al., 2010). Jusqu'à aujourd'hui, il n'y a pas encore d'explications concernant cette expression particulièrement faible des enzymes antioxydantes dans les cellules β . Martens et al. proposent que cette faible expression permet à la cellule, lorsque son utilité est moindre, d'entrer en apoptose. Ils illustrent cela par l'observation que la culture de cellules β en présence de concentrations non stimulantes de glucose entraîne une augmentation de la production de ROS qui ne peut être contrecarrée par les défenses et donc induit l'apoptose (Martens et al., 2005b). Il a même été suggéré qu'en situation de stress, l'augmentation des ROS réduirait la synthèse et la sécrétion d'insuline afin d'orienter le glucose vers les tissus insulino-dépendants comme le cerveau ou le fœtus (Rashidi et al., 2009). D'autres auteurs proposent que cette différence permette une implication du H_2O_2 comme molécule de signalisation pour la sécrétion d'insuline, ils expliquent ainsi pourquoi les SOD seraient plus exprimées que la catalase et la GPX. Ceci sera décrit dans le chapitre « effets physiologiques des ROS dans la cellule β ».

Cette expression plus faible des enzymes antioxydantes classiques, par rapport à celle mesurée dans d'autres tissus, a mené différents auteurs à utiliser des stratégies de surexpression de ces enzymes pour rendre la cellule β moins sensible aux dommages induits par le stress oxydatif. Dans des îlots humains, de porc ou de rat, la surexpression de la catalase apporte une protection contre le stress oxydatif induit par le système xanthine oxydase-hypoxanthine ou par le H_2O_2 (Benhamou et al., 1998). De même, des souris transgéniques exprimant la catalase spécifiquement dans les cellules β montrent une protection des altérations de la sécrétion d'insuline induites par le H_2O_2 et une réduction des effets diabétogènes de la streptozotocine *in vivo* (Xu et al., 1999). De plus, la surexpression de la Cu/Zn SOD dans les cellules β de souris améliore la glycémie des animaux traités à l'alloxane (Kubisch et al., 1994; Kubisch et al., 1997). La surexpression de la GPX dans des îlots de rat prévient certaines altérations (augmentation du H_2O_2 , diminution de l'insuline et de la SISG) induites par le ribose, un sucre au pouvoir glyquant assez élevé (Tanaka et al., 2002a). Cependant, la surexpression des SOD pourrait aboutir à une production accrue de H_2O_2 , ce qui serait délétère pour les cellules β exprimant peu les enzymes de détoxification de cette molécule. C'est pourquoi certains auteurs ont testé la combinaison de la surexpression de la SOD et de la catalase, situation dans laquelle on observe un effet protecteur sur les effets délétères du H_2O_2 et du système xanthine oxydase-hypoxanthine (Lortz & Tiedge, 2003).

Il est intéressant de s'attarder ici sur un modèle de rat spontanément diabétique de type 2, les rats GK/Paris line (Par). Une fois le diabète installé chez ces animaux, les îlots ne présentent pas d'augmentation de marqueurs du stress oxydatif et semblent être protégés de ce stress via une augmentation de l'expression de nombreuses enzymes antioxydantes comme *Gpx*, *Sod* et *Hmox1*. De plus, les îlots de rat GK/Par possèdent un pool de GSH plus élevé. Ce phénotype les rend plus résistants à l'accumulation de ROS, aux altérations de la sécrétion d'insuline et à l'apoptose induites par le H₂O₂ exogène ou par des agents diabétogènes. Ces rats sont donc un bon modèle de réponse adaptative au stress oxydatif (Lacraz et al., 2009; Lacraz et al., 2010).

Cependant, alors que la cellule β exprime peu les SOD, catalase et GPX, elle exprime des quantités importantes d'autres enzymes de protection contre le stress oxydatif comme la glutaredoxine 1 et la thioredoxine 1 (Ivarsson et al., 2005). Il a également été décrit que lors la stimulation métabolique des cellules β , celles-ci augmentent l'expression de la sulfirédoxine (Glauser et al., 2007). L'expression de la GR est également importante dans les cellules β démontrant un rôle important du système redox du GSH (Nagaoka et al., 2004). Il a également été démontré que la cellule β exprime les PRX I et II (Boschero et al., 2002; Bast et al., 2002). Dans une autre étude plus récente, les auteurs montrent que l'expression de la γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS), l'enzyme impliquée dans la première étape de la synthèse de GSH, est importante dans les îlots de souris. Les GRX1, GRX2, GRX5 et les PRX1, PRX3, PRX4 et PRX6 sont également exprimées dans les îlots (Godoy et al., 2011). Il se pourrait donc que la cellule β possède un système antioxydant moins « classique » que d'autres types cellulaires.

2.2 Manifestations du stress oxydatif chez le patient diabétique de type 2

Différentes études chez le patient diabétique ont démontré une augmentation des marqueurs du stress oxydatif au niveau plasmatique (Ghiselli et al., 1992; Gopaul et al., 1995; Nourooz-Zadeh et al., 1995; Rehman et al., 1999; Shin et al., 2001; Sakuraba et al., 2002). Parmi ces marqueurs, le GSH a fait l'objet de plusieurs études. En effet, les érythrocytes de patients diabétiques ont un rapport GSH/GSSG diminué (Murakami et al., 1989). Après traitement améliorant le contrôle glycémique du patient, les taux de GSH sont améliorés et l'activité de la γ -GCS est augmentée (Yoshida et al., 1995; Sharma et al., 2000). Quelques auteurs ont également décrit une augmentation de produits signant un stress oxydatif au niveau des îlots de patients diabétiques comme la nitrotyrosine et le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), un marqueur de l'oxydation de l'ADN (Marchetti et al., 2004; Del Guerra et al., 2005). L'exposition de ces îlots pendant 24h à du GSH ou à de la metformine diminue ces paramètres et améliore leur capacité sécrétoire. De plus, un marqueur de la peroxydation lipidique, le 4-hydroxy-nonéanal (HNE) est également augmenté dans des îlots de patients diabétiques et l'expression des SOD est, elle, diminuée (Sakuraba et al., 2002) alors que l'expression de la catalase et de la GPX est augmentée (Marchetti et al., 2004), signant une tentative de détoxification du H₂O₂.

Bien que ces manifestations biologiques de la présence d'un stress oxydatif dans le DT2 soient bien décrites, un traitement efficace et adapté tentant de prévenir le stress oxydatif et ses dommages n'a pas encore porté ses fruits. Jusqu'à présent, la simple administration d'antioxydants classiques a toujours été inefficace chez l'homme (Golbidi et al., 2011).

2.3 Mécanismes de production des ROS

2.3.1. En situation d'hyperglycémie

Différentes hypothèses ont été émises concernant la production de ROS par l'hyperglycémie dans la cellule β . Tout d'abord, le glucose en excès pourrait dévier de la voie classique de la glycolyse pour emprunter d'autres voies (voies des polyols et des hexosamines, auto-oxydation du glycéraldéhyde, activation de la protéine kinase C et des NADPH oxydases et augmentation de la glycation non enzymatiques des protéines) (voir figure 14). De plus, au niveau de la chaîne de transport des électrons, la réduction partielle de l' O_2 pourrait aboutir à une surproduction d' O_2^- lorsque le glucose est en excès. Enfin, la production accrue d'insuline au niveau du RE pourrait également augmenter la quantité de ROS produits. Je vais maintenant détailler brièvement ces différents mécanismes et leur implication dans le stress oxydatif.

Le glucose excédentaire peut donc emprunter la voie des polyols (ou voie du sorbitol) dans laquelle il est réduit en sorbitol sous l'action de l'aldose réductase en consommant du NADPH. Le sorbitol est ensuite oxydé en fructose par la sorbitol déshydrogénase parallèlement à la réduction du NAD^+ en NADH (figure 14). Cette voie entraîne une accumulation néfaste du sorbitol et du fructose et une diminution en NADPH, ce qui provoque une diminution des défenses antioxydantes de la cellule car la régénération du GSH est moindre. L'implication de cette voie a été mise en évidence dans les complications chroniques du diabète (Brownlee, 2001). En ce qui concerne la cellule β , il a été démontré que la surexpression de l'aldose réductase entraîne l'apoptose qui pourrait être provoquée par une diminution des défenses antioxydantes (Hamaoka et al., 1999).

En plus de la voie des polyols, le glucose en excès peut être pris en charge par la voie des hexosamines. Dans cette voie, le fructose-6-P, en présence de glutamine, est transformé en glucosamine-6-P et en glutamate par la glucosamine fructose-6 phosphate amidotransférase (GFAT), et finalement en uridine diphosphate N-Acétyl glucosamine (UDPGlcNac) (figure 14). Ce dernier est impliqué dans la modulation de différents facteurs de transcription. Il a été démontré que l'activation de cette voie par la surexpression de la GFAT dans des îlots de rat cultivés en présence de 20 mmol/l de glucose entraîne des altérations de la fonction sécrétoire des cellules β qui pourraient résulter de l'induction d'un stress oxydatif car elles sont inhibées par l'addition de N-Acétyl-L-Cystéine (NAC) (Kaneto et al., 2001).

En conditions physiologiques, le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) est phosphorylé par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) lors de la glycolyse et est ensuite orienté vers la production de pyruvate puis la voie du cycle de Krebs. En situation d'hyperglycémie, il a été démontré que l'activité de la GAPDH est diminuée (Sakai et al.,

2003). Il en résulte ainsi une accumulation de GAP qui peut s'auto-oxyder et former un anion radical énediol en présence de métaux lourds. En présence d'oxygène, cet anion va former de l' O_2^- qui, comme je l'ai déjà décrit, est précurseur des autres ROS (Hunt et al., 1988; Robertson et al., 2003).

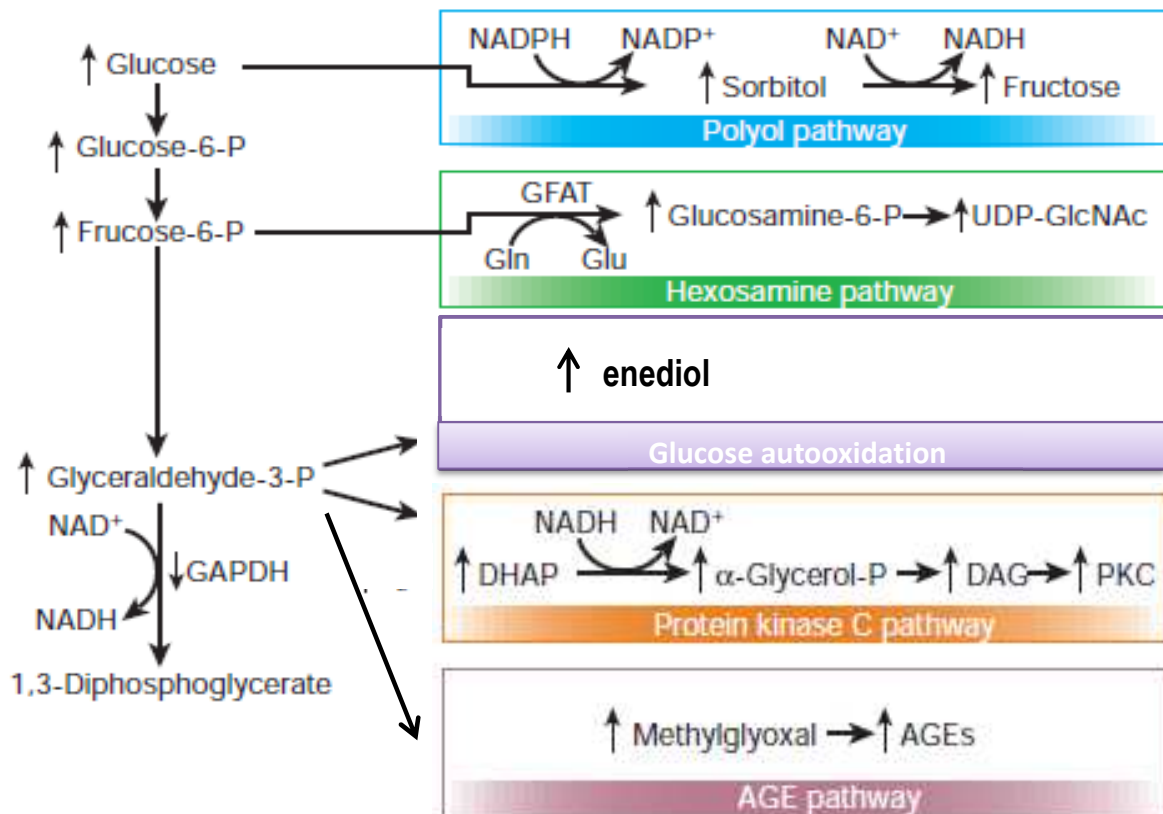


Figure 14. Mécanismes potentiels de production des ROS par l'hyperglycémie. Les mécanismes comprennent la voie des polyols, des hexosamines, l'auto-oxydation du glucose, la voie de la PKC et la glycation non enzymatique ; figure adaptée de (Brownlee, 2001).

En même temps que la formation de GAP, la glycolyse entraîne la formation de dihydroxyacétone phosphate (DHAP), précurseur du diacylglycérol (DAG) connu pour activer la PKC (figure 14). Alors que l'activation de la PKC a été associée à divers processus impliqués dans les complications chroniques du diabète (Brownlee, 2001), il a également été démontré que le glucose active, via la PKC, les NADPH oxydases (NOX) dans les cellules β (Morgan et al., 2007) et qu'un inhibiteur de NOX (le diphényleneiodonium ou un oligonucléotide antisens de la sous-unité $p47^{PHOX}$ de NOX) inhibe la production de ROS par les concentrations élevées de glucose (Tsubouchi et al., 2005; Morgan et al., 2009). Bien que l'activation des NOX par le glucose soit encore controversée, il a été récemment démontré que NOX2 est l'isoforme exprimée dans les îlots humains. En utilisant des îlots de souris knock-out pour *Nox2*, il a été démontré que le glucose stimule la formation de ROS dans les îlots pancréatiques via cette enzyme et que cet effet est responsable d'une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Li et al., 2012).

En situation d'hyperglycémie prolongée, la glycation non enzymatique des protéines est augmentée (Brownlee, 2001). Elle résulte de la réaction entre une fonction amine des protéines et un ose comme le glucose ou le ribose-5-phosphate. Il en résulte la production de produits d'Amadori qui, *in fine*, entraînent la production d'AGEs (Advanced glycation end products). Ces derniers ne sont éliminés que par un système de dégradation impliquant les enzymes de déglycation des protéines, la fructosamine 3-kinase (FN3K) et la FN3K-related protein. Cette réaction de glycation entraîne la production de ROS et la liaison des AGEs à leurs récepteurs (RAGEs) augmentent d'avantage cette production. En effet, cette liaison entraîne l'activation de NFκB qui, en plus de modifier l'expression du vascular endothelial growth factor (VEGF), stimulerait la production de radicaux libres via la NADPH oxydase (Hunt et al., 1993; Yan et al., 1994; Evans et al., 2002). En ce qui concerne les cellules β, il a été démontré que l'hyperglycémie augmente la production d'AGEs dans des îlots de souris et de rat (Tajiri et al., 1997; Pascal et al., 2010). L'implication de cette voie dans les phénomènes de glucotoxicité n'est cependant pas encore certaine.

Bien que le glucose en excès puisse emprunter d'autres voies que la voie classique et augmenter ainsi la production de ROS, la chaîne respiratoire mitochondriale reste un site majeur de la production de ROS lors de l'hyperglycémie. Il a même été suggéré que cette voie de production serait la voie principale de production des ROS lors de l'hyperglycémie et que l'activation des autres processus découlerait de celui-ci (Brownlee, 2005). Comme évoqué précédemment, c'est principalement au niveau des complexes I et III que se forme l'O₂^{•-}. Dans une situation d'hyperglycémie où la chaîne de respiration mitochondriale est particulièrement sollicitée, la différence de potentiel électrochimique générée par le gradient de protons est élevée. Cela entraîne une augmentation du temps de demi-vie des intermédiaires de la chaîne qui sont responsables de la formation d'O₂^{•-}, comme le flavine mononucléotide totalement réduit pour le complexe I, ou la ubisemiquinone pour le complexe III, ce qui accroît la probabilité de former des O₂^{•-} (Brownlee, 2001; Green et al., 2004; Rolo & Palmeira, 2006; Supale et al., 2012). De plus, cette différence de potentiel de membrane provoque un ralentissement du flux d'électrons dans la chaîne, ce qui augmente la probabilité de formation d'O₂^{•-} car les électrons ont ainsi plus de temps pour réagir avec l'O₂ (Newsholme et al., 2012). Le transport inverse des électrons pourrait également expliquer l'augmentation de production de ROS. Il s'enclenche à nouveau par l'augmentation du potentiel de membrane, ce qui force les électrons à emprunter le chemin inverse et à retourner vers le complexe I en favorisant la production de ROS (Gehrmann et al., 2010). Ce phénomène de production de ROS par la chaîne de transport des électrons lors de l'hyperglycémie a été mis en évidence par le fait que la surexpression de la MnSOD ou de la uncoupling protein-1 (UCP-1), une protéine découplante, prévient la formation de ROS par l'hyperglycémie (Brownlee, 2001).

Enfin, la production accrue d'insuline lors de l'hyperglycémie au niveau du RE pourrait également augmenter la quantité de ROS produits dans ce compartiment. En effet, les protéines sécrétées sont synthétisées dans le RE, un compartiment plus oxydant où se déroule la formation des ponts disulfures. Celle-ci requiert l'action de la protéine disulfide isomérase (PDI) et de l'oxydoréductase Ero1 (endoplasmic reticulum oxydoreductase 1) qui, *in fine*,

transfère deux électrons sur la molécule d'O₂ et forme ainsi du H₂O₂ (figure 15). Dans la cellule β soumise à une hyperglycémie, la biosynthèse de l'insuline peut augmenter de ~50 fois, jusqu'à représenter jusqu'à 50% des protéines synthétisées dans la cellule, et le nombre de molécule d'insuline produite par minute peut aller jusqu'à 1 million. Cela pourrait donc aboutir à la production de 3 millions de molécules de H₂O₂ par minute et serait donc la cause possible d'un stress oxydatif (Shimizu & Hendershot, 2009).

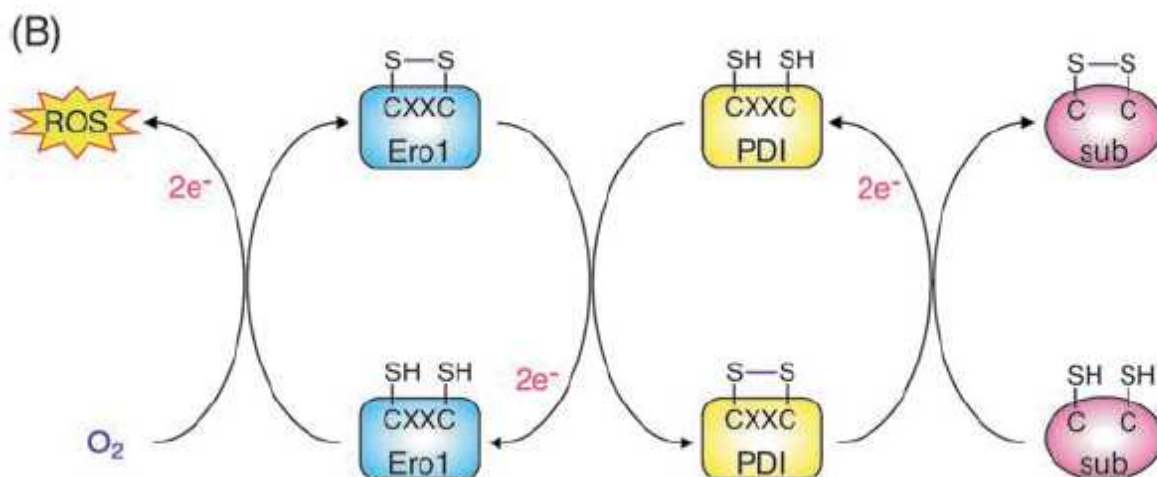


Figure 15. Formation des ponts disulfures dans le RE. Les ponts disulfures au sein des protéines s'oxydent grâce à la PDI, elle-même réoxydée par Ero1 qui transfère deux électrons à l'O₂ et forme du H₂O₂ (Shimizu & Hendershot, 2009).

2.3.2. En situation d'hypoglycémie

Alors que différents mécanismes pourraient expliquer la formation des ROS dans la cellule β soumise à des concentrations élevées de glucose, de nombreux auteurs s'accordent aussi sur la présence d'un stress oxydatif lorsque la cellule β est soumise à une privation de glucose ou cultivée à une concentration de glucose inférieure au K_m de la glucokinase (Martens et al., 2005b; Cai et al., 2007; Hou et al., 2008; Sarre et al., 2012). Il est important de noter ici que les effets délétères sur la survie et la fonction sécrétoire observés en présence de concentrations faibles de glucose sont plus importants et plus rapides que ceux observés en présence de concentrations élevées de glucose (Jonas et al., 2009).

Dans ce contexte, Martens et al. ont décrit, que, dans des cellules β purifiées de rat, le glucose supprime la production du H₂O₂ et d'O₂⁻ parallèlement à une augmentation de la production de NAD(P)H et du FADH₂, de 0 à 20 mmol/l avec un effet majeur entre 0 et 5 mmol/l. Cette production de ROS est cytotoxique vu que l'addition de l'antioxydant « manganese(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin » (MnTBAP) réduit l'apoptose observée en présence de 2,5 mmol/l de glucose. Comme illustré à la figure 16, dans leur conclusion, les auteurs proposent trois mécanismes par lesquels le glucose supprimerait la production de ROS, les deux premiers impliquant des mécanismes de diminution des ROS et le troisième impliquant des mécanismes d'augmentation des défenses antioxydantes de la cellule. Premièrement, l'augmentation de NADH pourrait diminuer la production d'O₂⁻ au niveau du complexe I de la mitochondrie. En effet, lorsque ce complexe est peu alimenté, le FMNH₂

passe à un état semi-réduit (FMN) qui produit des quantités plus importantes d' $O_2^{\cdot-}$. Deuxièmement, le NADH induit l'activation des complexes I, III et IV, ce qui favorise la réduction de l'oxygène en H_2O à la place de la formation d' $O_2^{\cdot-}$. Troisièmement, la production de NAD(P)H permet d'augmenter les défenses antioxydantes de la cellule. En effet, le NAD(P)H est cofacteur de différentes enzymes de protection contre le stress oxydatif et permet de régénérer ces enzymes (Martens et al., 2005b).

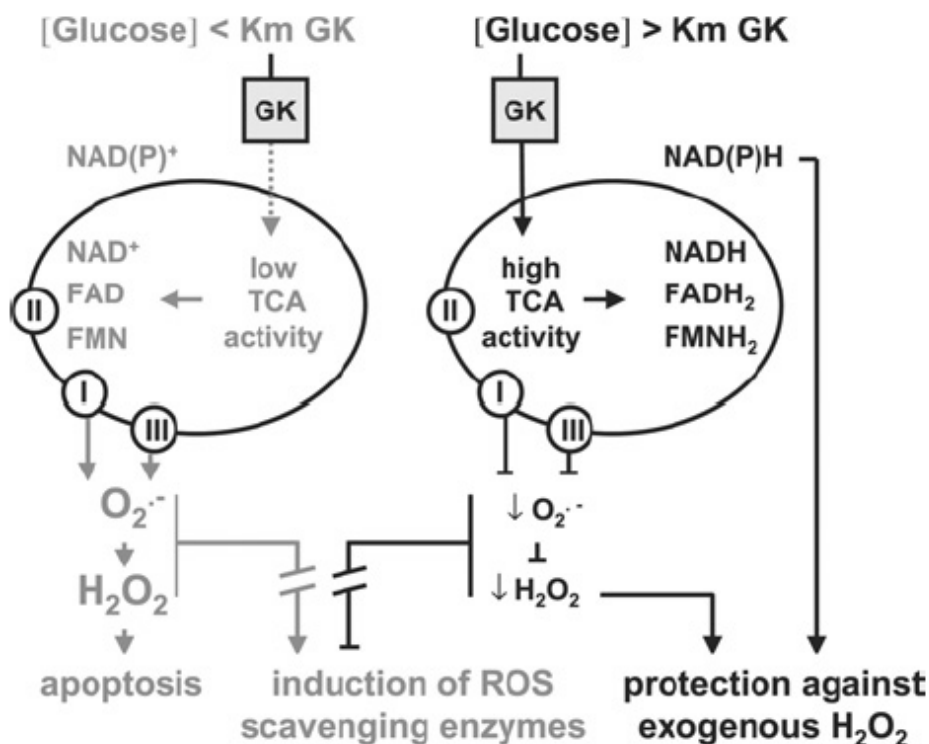


Figure 16. Activité du cycle de Krebs et formation des ROS dans la mitochondrie des cellules β . En présence d'une concentration de glucose en dessous du K_m de la GK, l'activité du cycle de Krebs est diminuée, ce qui provoque une réduction de production des équivalents réduits et une augmentation de la production de ROS par les complexes 1 et 3 de la chaîne de transport des électrons. Les ROS augmentent l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif et provoquent également l'apoptose. En présence d'une concentration de glucose supérieure au K_m de la GK, l'activité du cycle de Krebs augmente ainsi que la production d'équivalents réduits, ce qui diminue la formation de ROS par la chaîne de transport des électrons. De plus, la production de NAD(P)H augmente les défenses antioxydantes de la cellule (Martens et al., 2005a).

L'accumulation de ROS et l'apoptose (activation des caspases et clivage de Bcl-2) induites par les concentrations faibles de glucose ont également été attribuées à une activation prolongée de l'AMPK dans les cellules β (Cai et al., 2007; Sarre et al., 2012).

2.4 Effets physiologiques des ROS dans la cellule β

Comme nous venons de le voir, l'exposition des cellules β aux ROS est principalement associée à des effets délétères sur ces cellules. Il est pourtant étonnant que ces espèces réactives produites au cours du métabolisme du glucose n'exercent que des effets nocifs. Dans de nombreux types cellulaires, le H_2O_2 est accepté comme étant une molécule de

signalisation. Dans ce contexte, Pi et al. décrivent que l'incubation d'îlots de souris ou de cellules INS-1 (832-13) pendant 30 min. en présence d' H_2O_2 (1 à 4 $\mu\text{mol/l}$) augmente la sécrétion d'insuline alors que l'incubation avec une catalase perméable ou avec l'antioxydant NAC diminue la sécrétion d'insuline (Pi et al., 2007). De plus, Leloup et al. plaident également pour un rôle du H_2O_2 dans la SISG. Contrairement aux résultats de notre laboratoire et d'autres auteurs (détaillés ci-dessus), ils démontrent, dans des îlots de rat frais, que l'augmentation de la concentration de glucose de 5,5 à 16,7 mmol/l augmente la production de ROS et que l'addition d'antioxydants, comme le trolox, inhibe la production de ROS ainsi que la sécrétion d'insuline (Leloup et al., 2009). Contrairement à ces études, une étude récente démontre que la surexpression de la catalase dans des cellules INS-1E ou dans des îlots de rat n'altère pas la capacité des cellules β à sécréter de l'insuline en réponse au glucose (Lortz et al., 2013). L'implication du H_2O_2 comme molécule de signalisation dans les cellules β restent donc à confirmer, cependant, la production de ROS par le glucose à court terme pourrait jouer un rôle physiologique alors que la production accrue par l'hyperglycémie, à plus long terme, serait, elle, délétère pour les cellules β (Gray & Heart, 2010). Les concentrations de H_2O_2 utilisées dans les différentes études pourraient aussi expliquer les contradictions dans les résultats et hypothèses qui en découlent. En effet, dans une étude, l'incubation pendant 10 min en présence de 200 $\mu\text{mol/l}$ en H_2O_2 inhibait la sécrétion d'insuline stimulée ultérieurement par 16,7 mmol/l de glucose (Maechler et al., 1999). De plus, l'exposition pendant 30 min en présence de 50 $\mu\text{mol/l}$ de H_2O_2 inhibait également la sécrétion d'insuline stimulée ultérieurement (Sakai et al., 2003).

V. Zinc, métallothionéines et cellules β

Après avoir abordé différentes facettes du stress oxydatif et de la cellule β , je vais maintenant me focaliser plus particulièrement sur le Zn^{2+} , un ion qui exerce des effets antioxydants de manière indirecte et qui augmente fortement l'expression des métallothionéines. Ces petites protéines ont un rôle bien connu de détoxification des métaux lourds mais pourraient également posséder des propriétés antioxydantes.

1. Historique du zinc et de la cellule β

C'est en 1934 que Scott décrit que le zinc induit la formation des cristaux d'insuline (Scott, 1934); en effet, bien plus tard, la structure des cristaux d'insuline a été déterminée comme étant des hexamères liés à deux ions zinc (Emdin et al., 1980; Dodson & Steiner, 1998). Scott a ensuite décrit que le contenu en zinc dans le pancréas d'individus et d'animaux diabétiques était diminué de moitié par rapport au contenu chez les sujets sains, alors que leur contenu hépatique en zinc était semblable (Scott & Fisher, 1938). Ces découvertes ont constitué les premiers pas dans les recherches concernant le lien entre zinc, diabète et cellule β .

Alors que le rôle de l'ion Ca^{2+} dans la sécrétion d'insuline a fait l'objet de nombreuses études, ce n'est que dans les années nonante que l'intérêt pour le zinc a refait son apparition. Le développement de sondes fluorescentes spécifiques au Zn^{2+} et la découverte des transporteurs de Zn^{2+} a permis de nouvelles avancées sur le sujet. En 1994, Zalewski observe que le glucose provoque une diminution de la fluorescence de la sonde Zinquin ajoutée dans

le milieu extracellulaire, signant une sécrétion de Zn^{2+} concomitante à celle de l'insuline (Zalewski et al., 1994). Peu après, Palmiter et Findley caractérisent et clonent le premier transporteur de Zn^{2+} ou zinc transporter 1 (ZnT1) qui permet l'efflux de Zn^{2+} du cytosol vers l'espace extracellulaire (Palmiter & Findley, 1995). Un an plus tard, le même groupe identifie la famille des ZnT (ou solute carrier 30A pour SLC30A) en découvrant deux autres membres, les ZnT2 et 3 (Palmiter et al., 1996a; Palmiter et al., 1996b). Cette famille comprend les protéines qui transportent le Zn^{2+} du cytosol vers un autre compartiment cellulaire ou vers l'espace extracellulaire. En 1998, c'est à l'équipe de Eide de découvrir une nouvelle famille de transporteurs de Zn^{2+} , les Zrt-like, Irt-like protein (ZIP) (ou SLC39A) (Grotz et al., 1998). Ces transporteurs permettent d'alimenter le cytosol en Zn^{2+} provenant des espaces extracellulaires ou des organelles intracellulaires (Eide, 2004). Le lien entre Zn^{2+} et diabète a pris davantage d'ampleur lors de la découverte de l'association entre un polymorphisme de ZnT8 (SLC30A8) et le risque de développer un DT2. ZnT8 a un profil d'expression quasi restreint aux cellules β où il est localisé dans la membrane des granules d'insuline, permettant ainsi de fournir le Zn^{2+} pour la maturation et le stockage de l'insuline (Chimienti et al., 2004). C'est en 2007 qu'a été décrite une association entre le polymorphisme (R325W) de ce gène et le risque de développer un DT2 (Sladek et al., 2007; Zeggini et al., 2007). Ce polymorphisme est associé avec une augmentation du risque de développer un DT2 de 53%. Le remplacement de l'acide aminé tryptophane par une arginine en position 325 altère l'activité de transport du Zn^{2+} par ZnT8 (Nicolson et al., 2009). Cette découverte a motivé de nombreux chercheurs à s'intéresser aux souris *ZnT8* knock-out. Alors qu'un consensus semble exister sur le rôle de ZnT8 dans la capacité des îlots à stocker le Zn^{2+} dans les granules d'insuline et la cristallisation de l'insuline, les auteurs ne s'accordent pas tous en ce qui concerne l'effet de la délétion de *ZnT8* sur la SISG. Certains décrivent une diminution de la SISG dans les îlots dont le gène *ZnT8* a été inactivé par rapport aux îlots contrôles (Pound et al., 2009; Wijesekara et al., 2010), d'autres n'observent pas d'effet de la délétion de *ZnT8* (Nicolson et al., 2009; Lemaire et al., 2009). Cette discordance pourrait être expliquée par des différences de background génétique des souris, des différences de genre (Pound et al., 2012) ou encore par des différences provenant du fait que le knock-out est global ou spécifique à un type cellulaire (Hardy et al., 2012).

Enfin, l'importance de l'homéostasie du Zn^{2+} dans le DT2 a également été mise en évidence par l'association entre un polymorphisme de *Mt1a*, un gène impliqué dans la liaison et la libération du Zn^{2+} , et le risque de développer un DT2 (Giacconi et al., 2008). Un chapitre ultérieur sera consacré au rôle des métallothionéines. Dans ce contexte, une revue de la littérature par Mocchegiani suggère que c'est l'altération de mécanismes impliqués dans la distribution subcellulaire du Zn^{2+} plutôt que la déficience en Zn^{2+} en tant que telle qui serait importante dans la pathologie du DT2 (Mocchegiani et al., 2008). Pour une revue détaillée sur l'ensemble de ce chapitre, voir (Chimienti, 2013).

2. Diabète de type 2 : déficience en zinc et supplémentation thérapeutique

2.1 Chez l'homme

Le DT2 est caractérisé par une hypozincémie associée à une hyperzincurie et une diminution de l'absorption intestinale de Zn^{2+} (Chausmer, 1998). Etant donné l'importance du Zn^{2+} dans la cellule β , la déficience en ce métal pourrait détériorer l'équilibre glycémique du patient. De plus, elle pourrait augmenter les espèces oxydantes intracellulaires et la production de ROS en diminuant l'expression ou l'activité d'enzymes antioxydantes dépendantes du Zn^{2+} . Il n'est dès lors pas surprenant qu'une vingtaine de publications s'intéressent à l'effet de la supplémentation en Zn^{2+} chez des individus souffrant d'un DT2. Récemment, deux études de méta-analyse ont été publiées et permettent d'avoir une vision d'ensemble sur ce sujet. La première inclut 22 articles s'intéressant au DT2. Elle décrit une diminution de la glycémie à jeun d'en moyenne 18 mg/dl (1 mmol/l) et de la glycémie post-prandiale d'en moyenne 38 mg/dl (1,94 mmol/l) chez les patients diabétiques ayant reçu un supplément en Zn^{2+} (environ 30 mg/jour pour une durée de 3 semaines à 5 ans) par rapport au groupe ayant reçu un placebo. L'hémoglobine glyquée, un indice de la glycémie moyenne au cours des trois derniers mois, est réduite d'en moyenne 0,54% dans le groupe traité. Certaines études s'intéressent également aux paramètres lipidiques chez les patients diabétiques. En moyenne, le cholestérol total est diminué de 32 mg/dl (Jayawardena et al., 2012). Dans la seconde méta-analyse, les auteurs ont pris en considération 14 études en grande partie différentes des 22 études reprises dans la méta-analyse précédente. Ils décrivent une réduction faible mais significative de la glycémie (0,19 mmol/l) à jeun après supplémentation en Zn^{2+} chez des patients diabétiques. L'hémoglobine glyquée est, elle, diminuée de 0,64% chez les patients ayant reçu un supplément. En ne prenant en compte que les patients souffrant d'un DT2, d'un syndrome métabolique et d'obésité, la supplémentation s'avère plus efficace, avec une réduction de la glycémie de 0,49 mmol/l (Capdor et al., 2012). Il est intéressant de décrire ici qu'un effet de protection contre le stress oxydatif par le Zn^{2+} a également été démontré. En effet, les patients ayant reçu un supplément de 30 mg de Zn^{2+} /jour pendant trois à six mois présentent une réduction d'un marqueur plasmatique de la peroxydation lipidique, les TBARS (Faure et al., 1995; Roussel et al., 2003).

2.2 Chez l'animal

Outre les études de supplémentation en Zn^{2+} chez l'homme, différentes études ont été réalisées sur des animaux diabétiques. Il a ainsi été démontré qu'un supplément en Zn^{2+} améliore la glycémie de rats rendus diabétiques suite à l'injection de streptozotocine (STZ). Cet effet bénéfique pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'expression des MT ou de l'insuline au niveau des îlots (Yang & Cherian, 1994; Cai, 2004; Bolkent et al., 2009). De plus, l'addition de Zn^{2+} dans l'eau de boisson ou l'injection intrapéritonéale quotidienne de Zn^{2+} entraîne une diminution de la glycémie d'animaux rendus diabétiques suite à des injections multiples de faibles doses de STZ. Les auteurs attribuent à nouveau cette protection à une augmentation de l'expression des MT dans les îlots (Ohly et al., 1998; Ohly et al., 2000). Cet effet protecteur pourrait également résulter d'une inhibition de NF κ B, ce qui préviendrait les phénomènes inflammatoires destructeurs (Ho et al., 2001; Schott-Ohly et al., 2004). A l'opposé, un supplément en Zn^{2+} induit l'activation de NF κ B et prévient l'apoptose

dans les îlots de souris spontanément diabétiques et non obèses, ce qui pourrait expliquer l'amélioration par le Zn^{2+} de l'état diabétique de ces animaux (Schott-Ohly et al., 2004). L'administration orale d'un complexe de Zn^{2+} a également des effets bénéfiques chez la souris diabétique KK- A^y en termes de glycémie et d'indicateurs de résistance à l'insuline (Yoshikawa et al., 2007). Chez les souris diabétiques db/db qui présentent une mutation du récepteur à la leptine, la déficience en Zn^{2+} augmente d'avantage la glycémie alors que la supplémentation en Zn^{2+} diminue ce paramètre ainsi que l'hyperinsulinémie (Simon & Taylor, 2001). De la même façon, la supplémentation en Zn^{2+} chez la souris ob/ob (mutation du gène de la leptine) augmente le contenu en insuline des îlots et atténue l'hyperglycémie à jeun (Begin-Heick et al., 1985). Un rôle bénéfique du Zn^{2+} dans la transplantation d'îlots a également été démontré. Dans cette étude, une alimentation riche en Zn^{2+} avant la transplantation d'îlots chez le rat diabétique améliore la glycémie des animaux après la transplantation (Okamoto et al., 2011).

2.3 In vitro

Alors que diverses études ont été réalisées sur l'effet toxique de la déficience en Zn^{2+} dans différents types cellulaires (pour une revue détaillée (Chasapis et al., 2012)), peu s'intéressent aux effets de l'addition de Zn^{2+} *in vitro*. Au début des années quatre-vingt, il avait été démontré que le Zn^{2+} inhibe la SISG, un effet qui pourrait résulter d'une inhibition de l'influx calcique ou de l'effet intracellulaire du Ca^{2+} (Figlewicz et al., 1981; Ghafghazi et al., 1981; Ferrer et al., 1984). Plus tard, il a été démontré que l'ajout de Zn^{2+} au milieu de culture d'îlots de souris induit l'expression des MT et améliore la sécrétion d'insuline après traitement à la STZ (Ohly et al., 1998). Plus récemment, il a également été démontré que l'addition de Zn^{2+} diminue l'apoptose induite par le palmitate dans des îlots humains (Lefebvre et al., 2012), ainsi que l'apoptose et la production de ROS induites par l'hyperglycémie dans des cardiomyoblastes embryonnaires (Kumar et al., 2012). A plus long terme, la supplémentation en Zn^{2+} (parmi d'autres suppléments) dans le milieu de culture d'îlots avant transplantation améliore la survie et la fonction des cellules des îlots (Kerr-Conte et al., 2010). L'équipe de Rutter s'est, elle, intéressée à la régulation du Zn^{2+} intracellulaire par le glucose. Ils ont démontré que la culture en présence de 16,7 mmol/l vs. 3 mmol/l de glucose induit une augmentation de la concentration intracellulaire en Zn^{2+} ($[Zn^{2+}]_i$) et une diminution de l'expression des MT dans des îlots de souris (Bellomo et al., 2011).

3. Les métallothionéines

3.1 Structure

Les métallothionéines, isolées pour la première fois en 1957 par Margoshes et Vallee, sont des petites protéines non-enzymatiques de ~60 acides aminés (61 pour MT1 et 62 pour MT2) dont 1/3 de cystéines mais aucun acide aminé aromatique. On les retrouve chez tous les eucaryotes et chez certains procaryotes (Vasak & Hasler, 2000; Vasak, 2005). Chez l'homme, le nombre de gènes qui codent pour les MTs est de 17 (Mt1a, b, e, f, g, h, i, j, k, l, x ; Mt2 ; Mt3 ; Mt4 ; Mt-like 5 ; Mt-m et Mt-e) sur le chromosome 16 alors qu'il est de quatre chez la souris (Mt1, 2, 3 et 4) et le rat (Mt1a, 2a, 3 et 4) sur les chromosomes 8 et 19 respectivement (Haq et al., 2003). Les protéines MT1 et MT2, qui sont les plus abondantes, sont ubiquitaires,

alors que MT3 est principalement exprimée dans le cerveau (Uchida et al., 1991; Palmiter et al., 1992) et MT4 dans les épithéliums stratifiés (Quaife et al., 1994). Dans la cellule, les MT1 et 2 sont exprimées tant dans le cytoplasme que dans les compartiments subcellulaires comme le noyau et la mitochondrie (Formigari et al., 2007).

3.2 Régulation de l'expression

La transcription des gènes des *Mts* est principalement régulée par le « metal-regulatory transcription factor-1 » (MTF-1) qui est classiquement activé par les métaux lourds et par une augmentation de la concentration intracellulaire en Zn^{2+} . Lorsqu'il est activé, MTF-1 se lie aux « metal response elements » (MREs), séquences présentes dans le promoteur des MT1 et 2 (Ghoshal & Jacob, 2001). De plus, le promoteur des MTs contient également une séquence USF/ARE (upstream stimulatory factor/antioxidant response element) constituée d'une séquence USF qui se superpose en partie avec la séquence consensus ARE (Andrews, 2000). Alors que les séquences MREs sont responsables de l'expression induite par le Zn^{2+} , le H_2O_2 et le Cd^{2+} , la séquence USF/ARE serait responsable de l'expression basale des MTs ainsi que de l'expression induite par le H_2O_2 et le Cd^{2+} . En plus du Zn^{2+} , du Cd^{2+} et du H_2O_2 , il a été démontré que l'exposition des cellules à l'O_2^- et au OH^- augmente l'expression des MTs de manière dose-dépendante (Andrews, 2000). De plus, l'expression de *Mt1a* dans des îlots de rat est induite par les cytokines (IL-1 β), le H_2O_2 , les glucocorticoïdes, la thapsigargine, un inducteur du stress du RE ainsi que par l'hypoxie et, comme je l'ai déjà décrit, par les concentrations faibles et élevées de glucose (Laychock et al., 2000; Jonas et al., 2009).

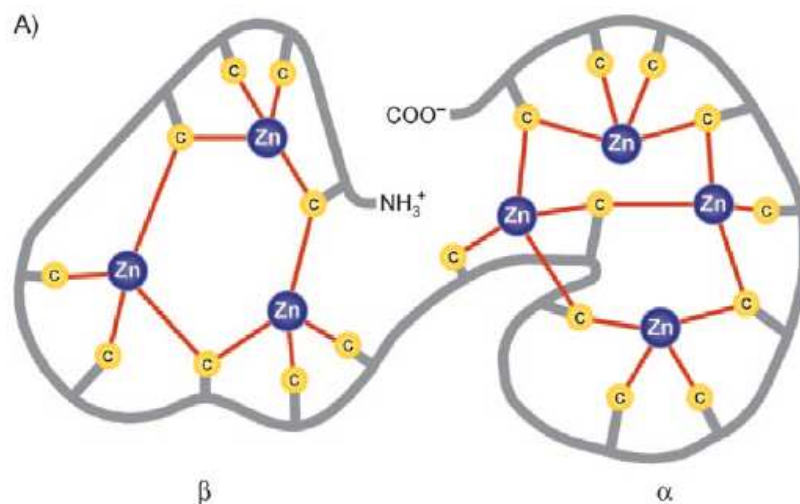


Figure 17. Représentation schématiques de la liaison des 7 atomes de Zn^{2+} par la MT. La MT est constituée d'un domaine α (contenant 11 résidus cystéines) pouvant lier 4 atomes de Zn^{2+} et d'un domaine β (contenant 9 résidus cystéines) pouvant lier 3 atomes de Zn^{2+} (Bell & Vallee, 2009).

3.3 Rôles

Les MTs sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires, mais le seul consensus adopté concerne son rôle dans la détoxification des métaux lourds. *In vivo*, l'apothionéine (forme libre dépourvue de métaux) est capable de lier le Zn^{2+} , le Cu^+ , le Cd^{2+} et le Hg^{2+} alors qu'*in vitro*, d'autres métaux comme l' Ag^+ et l' Au^+ se lient également à l'apothionéine. Cependant, en conditions physiologiques, les MTs contiennent principalement du Zn^{2+} (Haq et al., 2003). En effet, elles jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie du Zn^{2+} en ayant la capacité de lier jusqu'à sept ions Zn^{2+} . Comme illustré à la figure 17, le domaine β situé à l'extrémité amino-terminale contient neuf cystéines pouvant lier jusqu'à trois ions Zn^{2+} alors que le domaine α situé à l'extrémité carboxy-terminale contient lui 11 résidus cystéines qui permettent la liaison de quatre ions Zn^{2+} (Fischer & Davie, 1998). Cette structure confère au Zn^{2+} une stabilité thermodynamique tout en préservant sa mobilité et en maintenant le potentiel redox des thiols (Maret, 2000). En effet, les MTs sont capables de distribuer le Zn^{2+} aux protéines qui l'utilisent comme cofacteur. Ce transfert subit une régulation redox principalement via le ratio GSH/GSSG. Alors que le GSH inhibe la libération de Zn^{2+} des MTs, le GSSG, ou encore d'autres oxydants, induit cette libération et la formation de ponts disulfures au sein des MTs (figure 18) (Jacob et al., 1998; Kang, 2006). En effet, le potentiel redox des MTs étant relativement faible (inférieur à -366 mV), il n'est pas surprenant que de nombreux oxydants physiologiques comme le GSSG puissent affecter l'oxydation des MTs (Maret & Vallee, 1998). Un troisième rôle de protection contre le stress oxydatif, via la séquestration des ROS, a été attribué aux MTs (Thornalley & Vasak, 1985; Miura et al., 1997; Yoshida et al., 2005) et pourrait expliquer l'effet antioxydant de ces protéines.

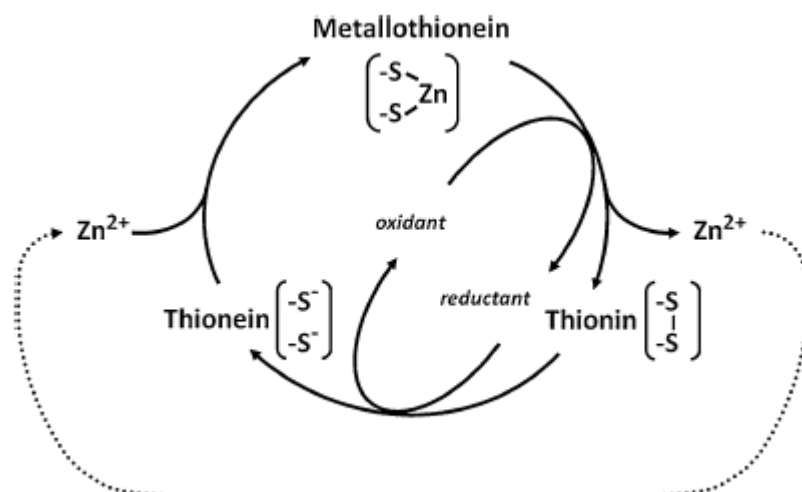


Figure 18. Cycle redox des métallothionéines. L'oxydation des MTs provoque la libération du Zn^{2+} et la formation de la thionine composée de ponts disulfures. Un réducteur génère la forme thionéine qui s'associe au Zn^{2+} et forme la MT, ce qui ferme ainsi le cycle redox (Maret, 2011).

3.4 Les métallothionéines, la cellule β et le DT2

Comme je viens de le décrire, le Zn^{2+} et les MTs semblent jouer un rôle essentiel dans la cellule β . Le schéma de la figure 19 résume la régulation du Zn^{2+} dans cette cellule. Alors que le Zn^{2+} est lié aux MTs en condition normale, un changement de l'état redox mène à l'oxydation des MTs et entraîne la libération du Zn^{2+} qui peut dès lors, soit être transporté dans des compartiments subcellulaires comme les granules d'insuline via ZnT8, soit activer MTF-1 et augmenter ainsi l'expression de ses gènes cibles comme les MTs.

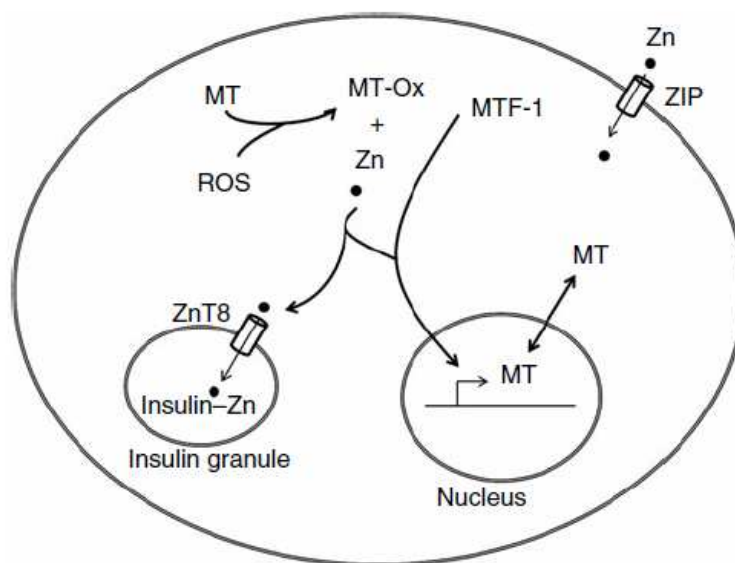


Figure 19. Homéostasie du zinc dans la cellule β . Le Zn^{2+} intracellulaire libre peut provenir soit du milieu extracellulaire et des compartiments intracellulaires via les transporteurs ZIP, soit de sa libération suite à l'oxydation des MTs. Le Zn^{2+} peut dès lors s'accumuler dans les granules d'insuline via ZnT8 ou encore activer le MTF-1 et augmenter ainsi l'expression des Mts. MT-Ox : MT oxydée (Chimienti, 2013).

Récemment, différentes études se sont intéressées au rôle des MTs dans la cellule β et le DT2. Un groupe coréen a développé la « Transactivator of transcription-MT1 », une MT1 capable de traverser la membrane des cellules. A l'aide de cet outil, les auteurs ont démontré que la MT1 protège les cellules β de l'apoptose et des ROS induits par la glucolipotoxicité. Ils ont également montré un effet protecteur de MT1 *in vivo*. En effet, la surexpression de MT1 retarde le développement du DT2 chez la souris et le rat (Park et al., 2011).

L'équipe d'Epstein s'est également intéressée à l'effet de la surexpression de la MT2 dans la pathologie du diabète. Ils ont ainsi démontré que la surexpression de la MT2 humaine sous contrôle du promoteur de l'insuline (augmentation de 30 fois de l'expression basale de MT) protégeait les îlots des altérations morphologiques, des cassures de l'ADN et de la déplétion en NAD^+ provoquées par la STZ. De plus, l'hyperglycémie induite par la STZ était moindre chez les animaux transgéniques par rapport aux animaux contrôles, et les îlots de souris transgéniques injectées à la STZ présentaient moins de signes de mort cellulaire et de dégranulation (Chen et al., 2001). Ils ont également démontré que les îlots dont les cellules β surexpriment la MT2 ont une capacité plus élevée à détoxifier les radicaux libres, qu'ils

produisent moins de ROS et présentent moins de mort cellulaire en situation hypoxique que les îlots de souris contrôles (Li et al., 2004). Ces effets protecteurs de MT2 semblent impliqués dans l'amélioration de différents paramètres après transplantation des îlots dans des souris diabétiques. En effet, alors que le contenu en insuline était amélioré dans les îlots de souris transgéniques après transplantation, la production de ROS était diminuée et la glycémie des animaux diabétiques améliorée (Li et al., 2006).

D'autres auteurs se sont intéressés au rôle des MTs dans la cardiomyopathie associée au diabète. Tant la surexpression spécifique de la MT dans le cœur d'animaux diabétiques que la surexpression dans tous les tissus protégeaient de la cardiomyopathie (Liang et al., 2002; Ye et al., 2003; Cai, 2004; Song et al., 2005; Wold et al., 2006). Ces effets pourraient être attribués à une diminution de la production de ROS, à une augmentation de l'expression cardiaque de HIF-1 α , de l'hexokinase 2 et du VEGF (Ye et al., 2003; Feng et al., 2007; Xue et al., 2012). Néanmoins, la glycémie était semblable dans les souris qui surexpriment la MT spécifiquement dans le cœur et les souris contrôles (Liang et al., 2002). Dans le même ordre d'idées, il a été démontré que la surexpression spécifique de MT2 dans les podocytes protège de la néphropathie induite par le diabète (Zheng et al., 2008).

De plus, des études basées sur un modèle de souris knock-out pour les gènes *Mt1/2* suggèrent également un rôle de ces protéines dans le DT2. Ces études seront détaillées dans la troisième partie de cette thèse.

Les MTs pourraient également être impliquées dans la physiopathologie du DT2 chez l'homme. En effet, l'expression de plusieurs isoformes de *Mt1* et de la *Mt2A* est augmentée dans des cellules β de patients atteints de DT2 (Marselli et al., 2010). De plus, le polymorphisme +647 A/C de la *Mt1a* a été associé à une augmentation de la prévalence du DT2. Ce polymorphisme affecterait la libération du Zn²⁺ associé à la MT1a (Giacconi et al., 2008). Une étude précédente de la même équipe avait déjà établi un lien entre un polymorphisme de *Mt2a* (-209A/G) et un taux élevé d'hémoglobine glyquée (Giacconi et al., 2005).

OBJECTIFS

Mon travail de thèse a eu pour objectif d'élargir nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans les altérations phénotypiques des cellules β provoquées par les concentrations extrêmes de glucose par rapport à la concentration optimale de 10 mmol/l de glucose. En effet, nous avons déjà démontré que tant la culture en présence de concentrations faibles (2 ou 5 mmol/l) qu'élevée (30 mmol/l) de glucose entraîne des altérations de survie et de fonction des cellules β . En d'autres termes que le glucose exerce un effet bénéfique entre 2 et 10 mmol/l, alors qu'il exerce un effet délétère entre 10 et 30 mmol/l. L'expression de la métallothionéine, un gène de réponse au stress oxydatif, suit ce même profil que nous qualifions « en V asymétrique » parce que les altérations observées en présence d'une concentration faible de glucose sont plus importantes que celles observées en présence d'une concentration élevée de glucose. La stimulation de l'expression de ce gène par les concentrations extrêmes de glucose suggère un rôle du stress oxydatif dans ces altérations.

Au début de ma thèse, nous ne possédions pas d'outil fiable pour mesurer l'équilibre redox dans nos conditions expérimentales. Dans une première étude, j'ai collaboré à la mise au point d'une méthode de mesure de cet équilibre redox dans la matrice mitochondriale et le cytosol des cellules β à l'aide de sondes protéiques fluorescentes. Nous avons ainsi testé une sonde sensible au peroxyde d'hydrogène (HyPer) et une autre sonde sensible aux modifications du ratio GSH/GSSG de la cellule, la « redox sensitive GFP », exprimées dans la mitochondrie ou le cytosol de cellules β exposées à différentes concentrations en glucose. Dans une deuxième partie de mon travail, je me suis intéressée aux effets du zinc, un inducteur connu des métallothionéines, sur les altérations phénotypiques des îlots de rat soumis à des concentrations extrêmes de glucose. Enfin, en continuité avec cette deuxième partie, j'ai tenté d'établir le rôle de l'induction des métallothionéines par les concentrations faibles de glucose et par le Zn^{2+} à l'aide d'îlots de souris dont les gènes des métallothionéines 1 et 2 ont été inactivés.

RESULTATS

I. Première partie : Mesures du stress oxydatif en condition dynamique dans la cellule β

1. Méthodes classiquement utilisées dans la littérature

Différentes méthodes, comme les tests enzymatiques, sont habituellement utilisées pour mesurer les couples redox comme le ratio GSH/GSSG ou NADPH/NADP⁺. Bien qu'étant particulièrement spécifique pour le couple redox en question, le désavantage majeur de ces méthodes est qu'elles nécessitent la lyse des cellules. Ceci entraîne des artéfacts d'oxydation des composants cellulaires, empêche des mesures dynamiques et ne fournit qu'une mesure du ratio dans la cellule entière quelle que soit sa variabilité entre les différents compartiments cellulaires. Des méthodes applicables sur cellules vivantes ont également été développées, la plus connue mesurant l'oxydation par le H₂O₂ du composé non fluorescent 2',7'-dihydrodichlorofluorescein (H₂DCF) en un composé fluorescent, le 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Bien que d'utilisation aisée, cette méthode ne permet pas de déterminer la localisation subcellulaire du H₂O₂. De plus, l'oxydation du H₂DCF peut être stimulée en absence de H₂O₂ par le CO₃^{•-} et le NO₂[•], deux espèces formées à partir de peroxynitrite, par le OH[•], la lumière, des métaux, des peroxydases ou par le cytochrome c (Rota et al., 1999; Tarpey et al., 2004; Wrona et al., 2005; Wardman, 2007). Comme les dihydrorhodamines, l'hydroéthidine, l'Amplex red ou d'autres sondes sensibles à l'oxydation, l'H₂DCF doit plutôt être considéré comme un marqueur qualitatif de processus oxydants non définis (Wardman, 2007; Meyer & Dick, 2010). En plus de ces méthodes, il existe également toute une gamme de techniques mesurant les dommages cellulaires induits par une augmentation de ROS. Parmi celles-ci, citons deux mesures classiques de la peroxydation lipidique, la détection des « thiobarbituric acid reactive substances » (TBARS) et du « 4-hydroxynonenal » (HNE). Le dosage de l'oxydation des bases de l'ADN via la mesure du « 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine » (8-OHdG) est également fréquemment utilisé dans la littérature.

2. Sondes protéiques fluorescentes

Le manque de spécificité, les nombreux artéfacts et la limitation de la localisation subcellulaire des sondes souvent utilisées ont motivé les scientifiques à développer de nouvelles sondes encodées génétiquement pour dépasser ces différentes limitations. La plupart d'entre elles sont dérivées de la « green fluorescent protein » (GFP).

2.1 HyPer

Cette protéine fluorescente a été conçue pour être spécifiquement sensible aux changements de concentration en H₂O₂. Cette construction est composée du domaine régulateur (RD) du facteur de transcription bactérien OxyR au sein duquel a été insérée la « circularly permuted yellow fluorescent protein » (cpYFP) (Belousov et al., 2006) (figure 20). Le fait que cette sonde soit encodée génétiquement permet de l'exprimer dans différents compartiments cellulaires en insérant une séquence d'adressage spécifique du compartiment. Lors d'une augmentation en H₂O₂, la cystéine en position 199 du RD d'OxyR s'oxyde en acide sulfénique (S-OH) et forme ensuite un pont disulfure avec la cystéine en position 208

du RD. La formation de ce pont disulfure change la conformation du segment peptidique entre les positions 205 et 222 (Choi et al., 2001). Belousov et al. ont donc inséré la cpYFP entre les acides aminés 205 et 206 du DR de OxyR. La protéine chimérique résultante, cp-YFP-OxyR-RD est appelée HyPer (pour hydrogen peroxide) et possède une longueur d'onde d'émission maximum à 516 nm et deux pics d'excitation à 420 (forme protonée) et 500 nm (forme déprotonée). Un avantage de cette sonde est que la formation du pont disulfure par le H_2O_2 entraîne une diminution de l'émission de fluorescence après excitation à 420 nm et une augmentation de l'émission après excitation à 500 nm (figure 21c). Le ratio de fluorescence 500/420 augmente donc lors d'une augmentation en H_2O_2 (figure 21d). L'avantage de cette mesure ratiométrique est qu'elle est indépendante de la quantité de sondes exprimées, ce qui diminue l'influence du photobleaching ainsi que l'influence de l'épaisseur de la cellule sur la mesure.

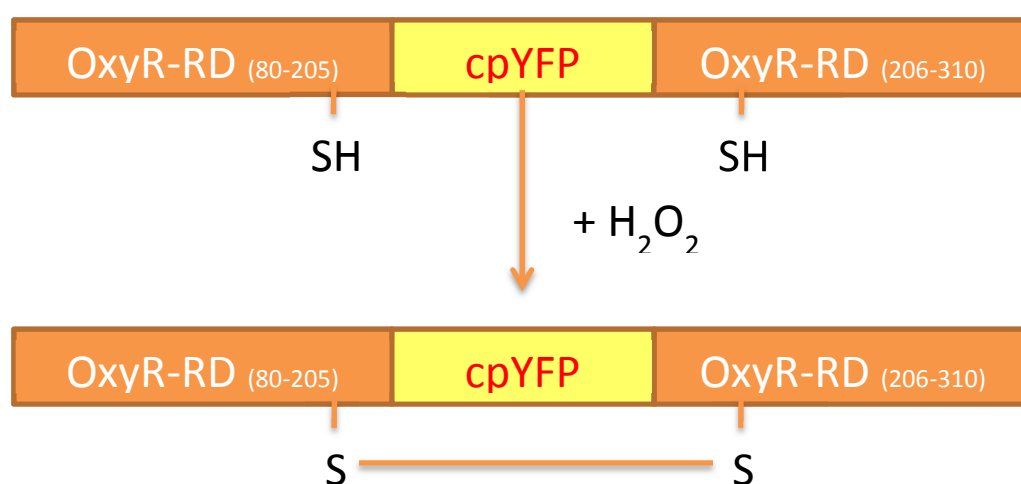


Figure 20. Représentation schématique de la sonde protéique HyPer. La protéine fluorescente cpYFP a été insérée dans le domaine régulateur (RD) du facteur de transcription OxyR entre les acides aminés 205 et 206. Suite à l'augmentation de H_2O_2 , il y a formation d'un pont disulfure entre les cystéines 199 et 208 du RD d'OxyR.

In vitro, HyPer permet la détection de concentrations nanomolaires de H_2O_2 et lorsque HyPer est exprimée dans la cellule, elle répond à l'ajout de concentrations micromolaires de H_2O_2 dans le milieu. En plus de la localisation cellulaire et de la mesure ratiométrique, un autre avantage de cette sonde est sa spécificité au H_2O_2 que lui confère le facteur OxyR. Ainsi, *in vitro*, le ratio de fluorescence n'est pas modifié en présence de GSSG, des espèces réactives de l'azote, du NO, du ONOO⁻, et de l'O₂⁻ (Belousov et al., 2006). Outre son oxydation, il existe également un mécanisme de réduction de HyPer, ce qui permet un équilibre dynamique de la sonde. Chez *Escherichia coli*, le pont disulfure est réduit par le GSH via la GRX1 (Zheng et al., 1998), et c'est probablement via ce même système que HyPer est réduit dans les cellules eucaryotes. Les événements qui influencent ce système (comme les fluctuations de la concentration en GSSG) pourraient être à l'origine d'un changement du ratio de fluorescence de HyPer, même lorsque la concentration en H_2O_2 est constante. Cependant, les concentrations en GSSG présentes dans une cellule sont trop faibles que pour influencer l'état d'oxydation de HyPer et la faible disponibilité locale de la GRX1 rend ce processus très lent (Meyer & Dick, 2010).

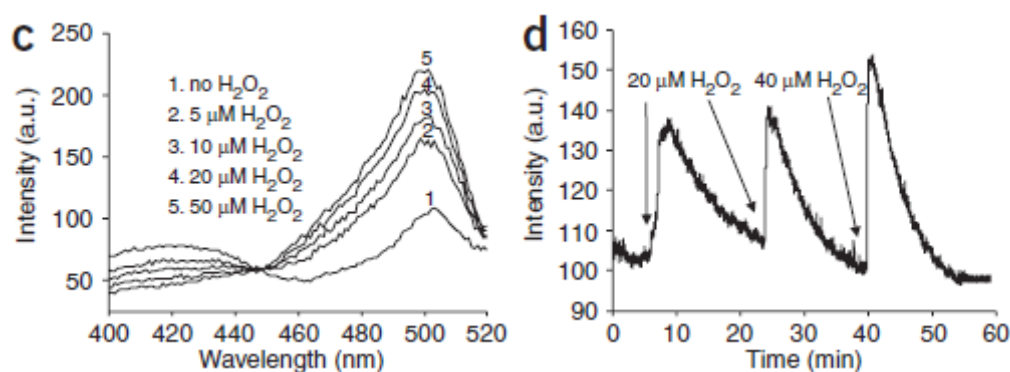


Figure 21. Propriétés de fluorescence de HyPer. c. Spectre d'excitation de HyPer exprimée chez *Escherichia coli* en présence des concentrations en H₂O₂ mentionnées (émission à 530 nm). d. Changements de la fluorescence de HyPer (excitation à 490 nm et émission à 530 nm) exprimée chez *Escherichia coli* lors de l'ajout répété de H₂O₂ en présence de catalase (Belousov et al., 2006).

Un dernier point important à aborder concernant la sonde HyPer est sa sensibilité aux changements de pH dû à la cpYFP. En effet, le ratio de fluorescence est modifié par des changements de pH entre 6,5 et 10. C'est pourquoi il est indispensable de vérifier l'effet des substances à tester sur le pH intracellulaire (Belousov et al., 2006; Meyer & Dick, 2010). Dans ce contexte, Poburko et al. ont créé SypHer, une forme de HyPer dont la cystéine conférant la réponse au H₂O₂ a été mutée (C199S). L'utilisation de cette sonde permet de mesurer les changements du ratio de fluorescence dus non pas à un changement de la concentration en H₂O₂ mais à un changement de pH (Poburko et al., 2011).

2.2 Reduction-oxidation-sensitive GFPs

Une autre classe de sondes protéiques fluorescentes développées par Hanson et al. comprend les « reduction-oxidation-sensitive GFPs » (roGFPs) (Hanson et al., 2004). Tout comme HyPer, ces sondes possèdent différents avantages : elles sont ratiométriques, elles ne mesurent pas un ROS particulier mais mesurent l'équilibre thiol/disulfide de la cellule qui est principalement influencé par le ratio GSH/GSSG, et elles peuvent être adressées à différents compartiments subcellulaires. De plus, ces sondes ont l'avantage d'être moins sensibles à un changement de pH que HyPer. Les roGFPs sont des dérivés de « wild-type (wt) GFP » (pour roGFP1) ou de « enhanced GFP » (pour roGFP2). De ces GFPs, deux acides aminés proches de la région du chromophore ont été remplacés aux positions 147 et 204 par des cystéines (S147C et Q204C) sensibles au couple redox GSH/GSSG. Les roGFPs ont deux pics d'excitation (400 et 475-495 nm) et un pic d'émission à 508 nm. Une diminution du ratio thiol/disulfide entraîne la formation d'un pont disulfure entre les deux cystéines, ce qui provoque un changement de conformation de la protéine, une protonation du chromophore et une augmentation du ratio de fluorescence de la sonde (400/495 pour roGFP1). L'addition de 10 mmol/l de dithiothréitol (DTT) permet de réduire totalement la sonde alors que l'addition de 1 mmol/l de H₂O₂ l'oxyde fortement (figure 22). D'autres oxydants comme l'aldrithiol (2,2-dipyridyl disulfide) et la diamide (1,1-azobis(N,N-diméthylformamide)) sont également capables d'oxyder complètement la sonde en moins de 30 min (Dooley et al., 2004).

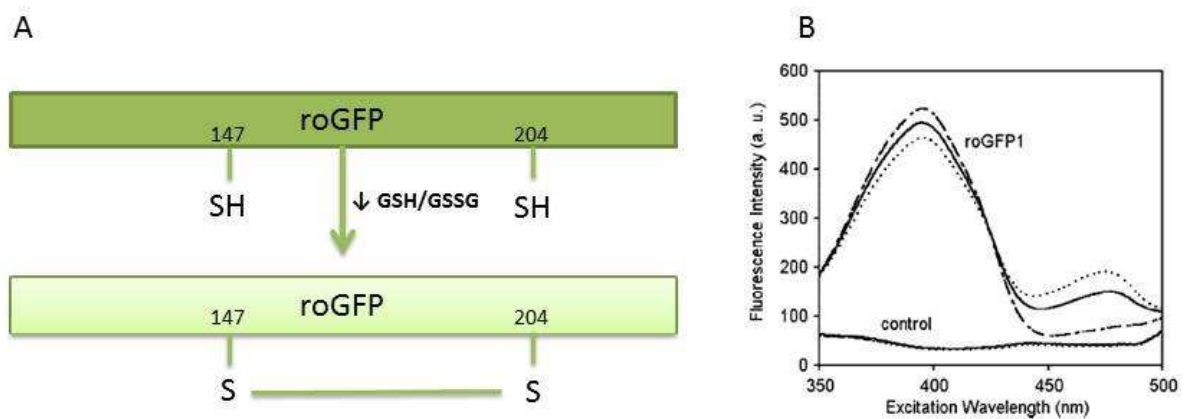


Figure 22. Sonde roGFP1. A. Représentation schématique de la sonde roGFP1. Suite à une diminution du ratio GSH/GSSG, les cystéines aux positions 147 et 204 forment un pont disulfure, ce qui entraîne un changement de conformation de la protéine et une modification de son spectre excitation/émission. B. Spectre d'excitation de la fluorescence de roGFP1 (émission à 508 nm) (trait continu : ligne de base, trait en pointillés : après addition de 10 mmol/l de DTT, trait discontinu : après addition de 1 mmol/l de H₂O₂, control correspond à l'autofluorescence de cellules non transfectées (Hanson et al., 2004).

L'équilibre entre le degré d'oxydation du glutathion et celui de la sonde roGFP n'est pas direct mais requiert l'activité de la GRX endogène (figure 23). En effet, la réponse de roGFP2 au H₂O₂ lorsque qu'elle est en solution dans un tube est relativement lente alors qu'elle est bien plus rapide lorsque la roGFP2 est exprimée dans une cellule, ce qui suggère l'implication d'une protéine redox endogène. Différentes protéines connues pour être actives dans la formation et le clivage des ponts disulfures ont été testées *in vitro*, et il s'est avéré que l'addition de la GRX permet de réduire en moins de 4 min la roGFP2 initialement oxydée (Meyer et al., 2007). Les TRXs, le NADPH ou les PDIs ont été testés mais se sont révélés incapables de moduler le degré d'oxydation de la roGFP (Meyer & Dick, 2010).

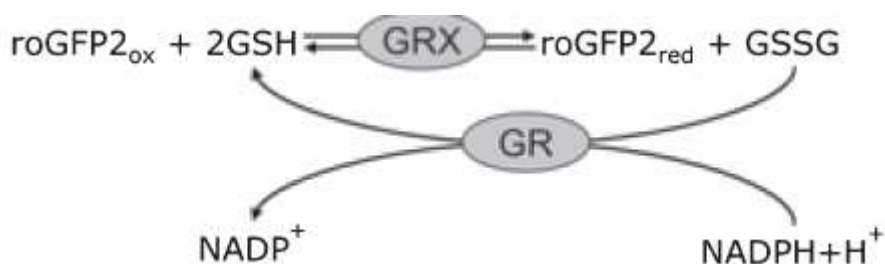


Figure 23. Equilibre redox entre la roGFP2 et le glutathion. L'équilibre dépend de la GRX et la réduction du GSSG s'opère via la GR qui utilise le NADPH comme cofacteur (Meyer et al., 2007).

Un consensus pour le potentiel redox auquel 50% de la roGFP est oxydé (E_{roGFP}) a été déterminé par Dooley et al. qui ont mesuré des valeurs de -294 mV pour roGFP1 et -287 mV pour roGFP2 (Dooley et al., 2004). Comme illustré à la figure 24, la roGFP2 permet la mesure du E_{GSH} dans une fenêtre de 80 mV allant de -240 à -320 mV. Le E_{GSH} cytosolique a été suggéré comme étant à une valeur de -289 mV (Ostergaard et al., 2004), l'utilisation de la sonde roGFP2 semble donc adaptée à ce compartiment ainsi qu'à d'autres compartiments comme la mitochondrie ou le noyau. Elle n'est par contre pas adaptée à des compartiments plus oxydants comme le RE où elle serait totalement oxydée. C'est pourquoi une autre sonde (roGFP1-iX) possédant un potentiel redox moins négatif (entre -229 et -246 mV) a été développée (Lohman & Remington, 2008).

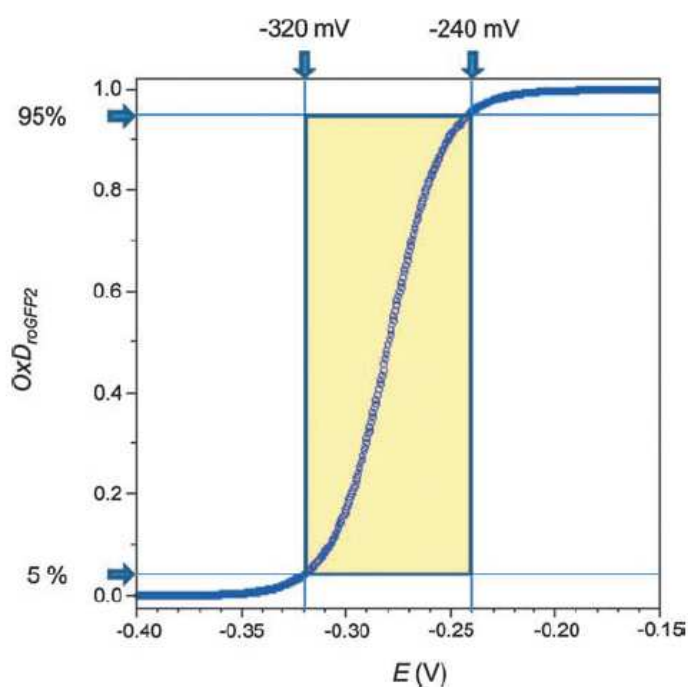


Figure 24. Relation entre le potentiel redox E et le degré d'oxydation de roGFP2. Les changements de fluorescence de la sonde surviennent dans une fenêtre allant de -240 mV à -320 mV et correspondent à l'oxydation de la sonde entre 5 et 95% (Meyer & Dick, 2010).

En contraste avec roGFP1, la fluorescence de roGFP2 est plus sensible aux changements de pH (Hanson et al., 2004), c'est pourquoi nous avons utilisé roGFP1 lors de nos expériences.

3. Effets du glucose sur la production des ROS dans la cellule β

3.1 Effets des concentrations élevées de glucose

Différents auteurs se sont intéressés à la mesure du stress oxydatif à l'aide de la sonde H_2DCF -DA ou de l'hydroéthidine dans les cellules β stimulées par le glucose. Il a ainsi été décrit que l'incubation de cellules MIN6 en présence de 25-30 mmol/l vs. 5 mmol/l de glucose induit une augmentation de la production des ROS (Sakai et al., 2003; Tsubouchi et al., 2005). Rappelons ici que le milieu de maintien de ces cellules contient 25 mmol/l de glucose. De même, dans des cellules INS1 (832/13), des îlots de rat ou de souris, la

production de ROS est augmentée après incubation en présence de concentrations plus élevées de glucose (30 vs. 5 mmol/l ou 10-20 vs. 2-5 mmol/l) (Tanaka et al., 2002a; Bindokas et al., 2003; Morgan et al., 2007; Pi et al., 2007; Leloup et al., 2009). Bindokas et al. ont suggéré que cette augmentation est d'origine mitochondriale. Certaines études se sont également consacrées aux îlots humains dans lesquels il a été démontré que l'augmentation de la concentration en glucose de 5 à 25-30 mmol/l induit une production accrue de ROS (Tanaka et al., 2002a; Sakai et al., 2003).

Le lien entre glucose et production de ROS a également été mis en évidence par diverses études décrivant un rôle protecteur des antioxydants sur la glucotoxicité. Ainsi, des études sur des lignées de cellules β , des îlots isolés ou encore des animaux diabétiques démontrent que des antioxydants comme le NAC ou l'aminoguanidine, un inhibiteur de la glycation, protège les cellules β des effets délétères provoqués par les concentrations élevées de glucose. Parmi ces effets délétères, les auteurs se sont intéressés à la survie des cellules, à la sécrétion d'insuline, au contenu en insuline et à l'expression de ce gène (Kaneto et al., 1996; Tajiri et al., 1997; Kaneto et al., 1999; Tanaka et al., 1999; Tajiri & Grill, 2000). De plus, il a été démontré, dans des lignées de cellules β , des îlots isolés et des îlots d'animaux diabétiques ou de sujets diabétiques, que la surexpression de diverses enzymes antioxydantes comme la catalase, la GPX1, Hmox1, les SOD1 et 2, les MTs ou encore la PRX3 protège les cellules β de la toxicité induite par les ROS (Hotta et al., 1998; Chen et al., 2001; Tobiasch et al., 2001; Tanaka et al., 2002b; Lortz & Tiedge, 2003; Lortz et al., 2005; Wolf et al., 2010; Park et al., 2011).

Toutes ces études semblent donc indiquer que les cellules β souffrent d'un stress oxydatif lorsqu'elles sont mises en présence de concentrations supraphysiologiques de glucose de façon prolongée.

3.2 Effets des concentrations faibles de glucose

Quelques auteurs se sont également intéressés à la mesure du stress oxydatif (à l'aide de l' $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ et de l'hydroéthidine) dans des cellules β soumises à des concentrations non stimulantes de glucose. En effet, comme déjà décrit dans l'introduction, il a été démontré, dans des cellules β purifiées de rat ou des cellules MIN6, qu'une augmentation de la concentration en glucose de 0 à 10 mmol/l (25 mmol/l pour les MIN6) entraîne une diminution de la concentration en H_2O_2 et en $\text{O}_2^{\cdot-}$, avec un effet prédominant entre 0 et 5 mmol/l pour les cellules β purifiées. Dans ces études, l'addition de différents antioxydants (Vitamine E, NAC, MnTBAP) diminuait la production de ROS induite par la culture en présence de concentrations faibles de glucose (Martens et al., 2005b; Cai et al., 2007; Hou et al., 2008). Une étude plus récente a également démontré que des cellules INS1E en présence de 0-5 mmol/l de glucose produisent une quantité plus importante de ROS que lorsqu'elles sont en présence de 5-20 mmol/l de glucose. L'addition de MnTBAP inhibait la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ ainsi que l'activation de l'AMPK, suggérant un rôle de cette kinase dans les effets délétères des concentrations faibles de glucose (Sarre et al., 2012).

Les deux sections que je viens de décrire pourraient paraître contradictoires, certains auteurs démontrant un effet délétère de l'augmentation de la concentration en glucose et d'autres décrivant un effet bénéfique. A nouveau, un regard particulier doit être porté sur les concentrations de glucose utilisées ainsi que les temps d'incubation et les différences de modèles. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser une large gamme de concentrations en glucose dans nos études ainsi que d'étudier tant la régulation aigüe par le glucose que la régulation après culture plus ou moins prolongée. En plus de ce conflit, et comme décrit précédemment, les outils utilisés pour la mesure du stress oxydatif sont peu fiables et presque aucune localisation subcellulaire n'a été mentionnée. C'est pourquoi la première partie de ma thèse a porté sur l'évaluation de divers outils pour mesurer l'équilibre redox dans le cytosol et la matrice mitochondriale des cellules β soumises à des concentrations croissantes de glucose, ainsi que sur la régulation aigüe de cet équilibre par le glucose dans la cellule β .

4. Article : Dynamic measurements of mitochondrial hydrogen peroxide concentrations and glutathione redox state in rat pancreatic β -cells using ratiometric fluorescent proteins : confounding effects of pH with HyPer but not roGFP1

Leticia P. Roma, **Jessica Duprez**, Hilton K. Takahashi, Patrick Gilon, Andreas Wiederkehr, Jean-Christophe Jonas. *Biochem.J.* 2012 Feb 1;441(3):971-8.

But : Cette étude avait deux buts principaux. Le premier était la mise au point d'une méthode pour mesurer l'équilibre redox dans les mitochondries de cellules β soumises à différentes concentrations en glucose. Alors qu'il existe un conflit dans la littérature sur la régulation par le glucose de la production de ROS dans la cellule β , le deuxième but de ce travail était d'étudier cette régulation dans des cellules β soumises à des changements aigus de la concentration de glucose.

Résultats : Dans des clusters de cellules d'îlots de rat qui expriment la sonde mt-HyPer, les changements du ratio de fluorescence en réponse au glucose reflètent principalement les changements importants du pH mitochondrial induits par le glucose. En effet, les résultats obtenus sont semblables à ceux obtenus avec deux sondes spécifiques du pH mitochondrial : mt-SypHer et mt-AlpHi. A l'opposé, le ratio de fluorescence de la sonde mesurant l'équilibre thiol/disulfide dans la matrice mitochondriale, la mt-roGFP1, est peu sensible aux variations de pH. A l'aide de cette sonde, nous avons pu déterminer qu'une réduction aigüe de la concentration de glucose de 10 à 2 mmol/l dans des clusters de cellules d'îlots de rat provoque une augmentation de l'oxydation de la sonde dans la mitochondrie. Cette augmentation est inhibée par l'ajout de l'antioxydant MnTBAP, mais pas par la NAC. A l'inverse, une augmentation aigüe de la concentration de glucose de 10 à 30 mmol/l n'entraîne pas de modification de l'équilibre redox mitochondrial de la cellule β .

Conclusions : De par sa grande sensibilité au pH, HyPer ne peut être utilisée pour mesurer la concentration en H_2O_2 dans des cellules β soumises à des variations de la concentration en glucose. Par contre, mt-roGFP1 est peu sensible à des changements de pH et permet de mesurer la régulation du statut redox mitochondrial par le glucose dans la cellule β . Nos résultats montrent également que le glucose, de manière aigüe, n'augmente pas mais bien au contraire diminue l'oxydation de la sonde mt-roGFP1 dans la cellule β .

5. Discussion et résultats complémentaires

Dans cette étude, nous avons démontré que mt-HyPer, à cause de sa grande sensibilité au pH, n'est pas un outil fiable pour la mesure des changements de concentration en H_2O_2 dans des cellules β soumises à diverses concentrations en glucose. La sonde mt-roGFP1 est, elle, peu sensible à des variations de pH et peut être utilisée pour mesurer l'équilibre redox mitochondrial de la cellule β dans ces mêmes conditions. Les résultats obtenus à l'aide de cette sonde montrent que la diminution du glucose de 10 à 2 mmol/l entraîne une augmentation de l'oxydation des thiols dans la mitochondrie alors qu'une augmentation de la concentration en glucose de 10 à 30 mmol/l n'affecte pas ce paramètre en 40 min.

Pour cette étude, nous avons utilisé des cellules dispersées d'îlots de rat. En effet, l'infection virale ne permet d'infecter que les deux ou trois couches externes d'un îlot entier. Etant donné que les cellules non- β d'un îlot de rat se situent principalement à la périphérie, il nous a semblé plus opportun de ne pas travailler sur îlots entiers. Notons cependant que si trois couches externes sont infectées, cela peut représenter jusqu'à 70% des cellules totales d'un îlot de 100 μm de diamètre, ce qui est non négligeable. De plus, j'ai eu l'occasion, dans la suite de ce projet, de réaliser certaines expériences sur îlots entiers infectés avec la mt-roGFP1 et les résultats étaient sensiblement semblables à ceux observés dans les cellules dispersées. Comme décrit dans l'article, l'utilisation des cellules dispersées permet que 80 à 90% des cellules infectées par les sondes soient des cellules β . De plus, lors de nos expériences, nous ne sélectionnons pas les cellules isolées faiblement fluorescentes qui correspondent souvent à des cellules non β . Il est également intéressant de noter ici que les cellules α ne sont pas facilement infectables (Ravier et al., 2010). Tous ces arguments nous permettent de conclure qu'une grande partie des mesures ont été effectuées dans les cellules β de l'îlot. Bien que nous procurant cet avantage, l'utilisation de cellules dispersées vs. des îlots entiers comporte certaines différences. Lors de ma thèse, nous avons tenté de caractériser ce modèle. Les mesures d'apoptose ainsi que de l'expression de différents gènes (comme ceux de réponse au stress oxydatif) dans des cellules dispersées après culture en présence d'une concentration faible de glucose sont semblables à celles des îlots, comme vous pouvez l'observer sur la figure 25 pour la mesure de l'expression de *Mt1a*. Par contre les effets observés en présence de concentrations élevées de glucose sont plus difficiles à reproduire, probablement car les cellules dispersées ne peuvent pas être maintenues en culture pendant plus de 5 jours.

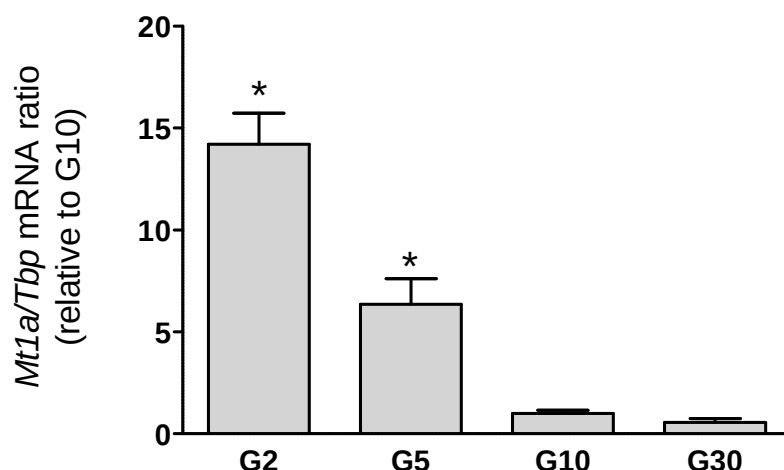


Figure 25. Expression de *Mt1a* dans des cellules dispersées d'îlots de rat. Après dispersion et 1 jour de préculture en G10, les cellules ont été cultivées pendant 18h en présence de 2, 5, 10 ou 30 mmol/l de glucose (G2, G5, G10 ou G30) ; ensuite les ARNm ont été extraits et l'ARNm des gènes *Mt1a* et *Tbp* a été mesuré par RT-PCR semi-quantitative en temps réel. Le ratio *Mt1a/Tbp* a été normalisé sur la moyenne des ratios obtenus dans les cellules cultivées en G10. *, différence statistiquement significative par rapport à la condition G10 avec un test ANOVA à une voie (Leticia Roma, résultats non publiés).

Toutes les mesures effectuées dans cet article ont été réalisées avec des sondes exprimées dans la matrice mitochondriale. Nous avons également construit les adénovirus exprimant HyPer et roGFP1 dans le cytosol. Etant donné l'effet du pH sur HyPer, je me consacre ici aux résultats obtenus avec la sonde roGFP1. Nos données montrent qu'elle est fortement réduite en présence de 10 mmol/l de glucose et que la culture en présence de 5 mmol/l de glucose n'induit pas de changement significatif du ratio de fluorescence de la sonde (figure 26). Il est possible que, comme dans la levure, le cytosol soit protégé d'une oxydation des thiols par plusieurs systèmes redondants (Morgan et al., 2013). Nous ne pouvons néanmoins pas conclure qu'une diminution de la concentration en glucose n'entraîne pas de changements de l'oxydation des thiols cytosoliques de la cellule car, la sonde n'étant oxydée que d'environ 5% (voir figure 26), le potentiel redox du cytosol est probablement inférieur à -300 mV, gamme dans laquelle la sonde n'est pas adaptée pour détecter de petites variations de ce paramètre (se référer à la figure 24 page 56).

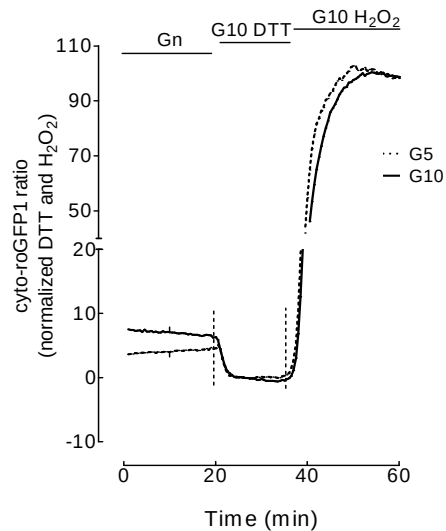


Figure 26. Effet chronique du glucose sur l'équilibre thiol/disulfide cytosolique. Des clusters de cellules d'îlots de rat infectés avec un virus exprimant la sonde roGFP1 dans le cytosol ont été cultivés pendant 18 à 24 h en présence de 5 ou 10 mmol/l de glucose. Les cellules ont ensuite été périfusées avec du Krebs contenant 5 ou 10 mmol/l de glucose suivi de G10 + 10 mmol/l de DTT et de G10 + 1 mmol/l d' H_2O_2 (Roma et al., 2012b).

Un autre point intéressant à aborder ici est la localisation des sondes. Dans l'article, nous avons montré une distribution de la sonde (au microscope confocal) compatible avec sa localisation mitochondriale. Pour plus de certitudes, Morgane Wéry a récemment étudié la colocalisation de la sonde mt-roGFP1 avec le mito-tracker Red. Comme vous pouvez le constater sur la figure 27, les deux signaux fluorescents (mt-roGFP1 en vert et mito-tracker en rouge) sont bien superposés, ce qui confirme la localisation mitochondriale de la sonde.

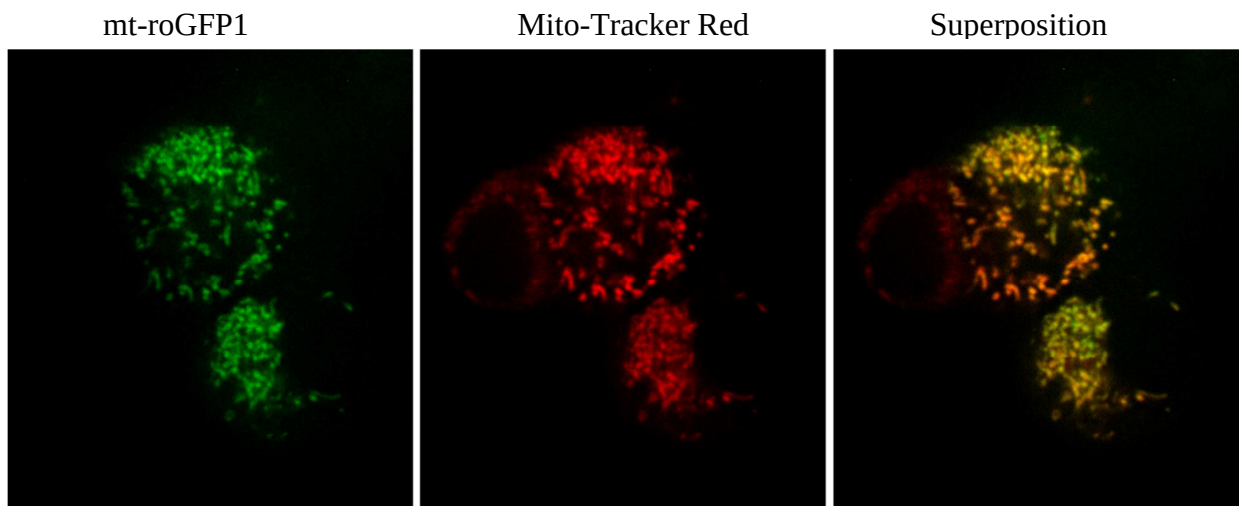


Figure 27. Fluorescence de la sonde mt-roGFP1 et du mito-tracker Red dans des cellules dispersées de rats cultivées en G10. Les clusters de cellules ont été infectés avec un adénovirus codant la mt-roGFP1 ; le lendemain, 200 nmol/l de mitotracker ont été ajoutés au milieu de culture. La fluorescence des cellules a ensuite été analysée au microscope confocal. L'image de droite représente la superposition des deux autres (Morgane Wéry, mémoire en sciences biomédicales, mars 2013).

Comme décrit dans l'introduction, l'utilisation des sondes HyPer et roGFP1 procure différents avantages par rapport aux sondes classiquement utilisées comme l'H₂DCF-DA ou l'hydroéthidine. En effet, ces sondes génétiquement encodées peuvent être adressées à différents compartiments cellulaires, fournissent une mesure d'un type de ROS précis ou du ratio GSH/GSSG et sont ratiométriques (Meyer & Dick, 2010). Cependant, comme attendu des sondes dérivées de la cpYFP, HyPer est sensible aux variations de pH. En effet, l'alcalinisation du pH (entre 6 et 10) induit une augmentation du ratio de fluorescence 500/420 de cette sonde, des variations aussi faibles que 0,2 unités pH dans cette gamme modifiant significativement ce ratio (Belousov et al., 2006). D'autre part, la stimulation d'îlots pancréatiques de souris par le glucose (de 0 à 10 mmol/l) induit une alcalinisation du pH cytosolique de 6,9 à 7,1 qui résulte de l'équilibre entre un effet alcalinisant du métabolisme mitochondriale et un effet acidifiant de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (Shepherd & Henquin, 1995). A l'aide de la sonde mt-AlpHi, il a également été démontré que le pH mitochondrial des cellules β est d'environ 7,25 en présence de concentrations faibles de glucose et que la stimulation par le glucose alcalinise davantage la matrice mitochondriale jusqu'à des valeurs habituellement observées dans d'autres types cellulaires (pH ~7,7) (Wiederkehr et al., 2009). Ces observations indiquent que les variations de pH provoquées par le glucose sont dans une gamme et d'une ampleur susceptibles de modifier la fluorescence de la sonde HyPer. Nos résultats montrent que les changements du ratio de fluorescence de HyPer sous l'action du glucose, de l'acétate de sodium et de l'azide sont similaires à ceux observés avec les sondes sensibles au pH, mt-AlpHi et SypHer. De plus, les changements du ratio de fluorescence en réponse au glucose ne sont pas affectés par les antioxydants MnTBAP et NAC, ce qui suggère qu'ils ne résultent pas d'un changement de la $[H_2O_2]$ mais d'un autre paramètre. Considérés dans leur ensemble, ces résultats montrent que l'utilisation de la sonde HyPer dans des cellules β soumises à des variations de la concentration en glucose n'est pas adaptée pour mesurer la $[H_2O_2]$. Ils renforcent également la nécessité d'utiliser la sonde SypHer comme contrôle des mesures réalisées avec HyPer.

En comparaison avec HyPer, roGFP est peu influencée par une variation de pH entre 6 et 8. Cette sonde ne mesure pas directement la production de ROS mais reflète plutôt l'équilibre entre les effets pro- et antioxydants sur les thiols de la cellule. Cet équilibre est principalement influencé par le ratio GSH/GSSG de la cellule qui lui-même dépend indirectement de la $[H_2O_2]$. Il a été démontré que le prétraitement avec un inhibiteur de la synthèse de GSH, le buthionine sulfoximine (BSO), entraîne une oxydation légère mais significative de la sonde ainsi qu'une augmentation de la sensibilité de la sonde au H₂O₂ (Dooley et al., 2004). De plus, une étude détaillée de roGFP2 dans la plante *Arabidopsis thaliana* a identifié que roGFP2 est un senseur de l'équilibre GSH/GSSG grâce à l'action de la GRX (Meyer et al., 2007). Outre les changements de production de ROS, une modification de la production de NADPH ou de la disponibilité en GRX est donc susceptible d'entraîner un changement du ratio de fluorescence de la sonde. De plus, une augmentation du ratio de fluorescence pourrait résulter d'une diminution du contenu en glutathion total dans le compartiment où la roGFP est exprimée sans pour autant que l'état d'oxydation du glutathion ne soit modifié (Meyer & Dick, 2010). Cependant, ce phénomène est peu probable lors de changements aigus de la concentration en glucose ; il pourrait néanmoins s'observer après plusieurs heures de culture.

La disponibilité de la GRX pourrait, elle, varier selon les compartiments, le type cellulaire, les conditions expérimentales, etc. De plus, cette dépendance à une protéine endogène rend la réaction plus lente, avec des temps pour atteindre l'équilibre de plus de 10 minutes (Cannon & Remington, 2006). C'est pourquoi Gutscher et al. ont développé la sonde GRX1-roGFP2. Cette sonde, qui résulte de la fusion de la GRX1 humaine avec la roGFP2, répond plus rapidement aux changements du ratio GSH/GSSG de la cellule (Gutscher et al., 2008). Elle permettrait donc une analyse plus précise de la régulation de l'équilibre thiol/disulfide de la cellule β lors de changements aigus de la concentration en glucose. C'est pourquoi, nous avons construit les virus exprimant cette sonde dans le cytosol et dans la mitochondrie. Comme illustré à la figure 28, le ratio de fluorescence de la sonde GRX1-roGFP2 exprimée dans le cytosol n'est pas influencé par les changements de la concentration en glucose dans le milieu. L'addition de DTT ne permet pas de réduire plus amplement la sonde, ce qui suggère à nouveau que celle-ci est dans un état réduit. Dans la mitochondrie, une privation de glucose entraîne une augmentation importante de l'oxydation du glutathion. L'augmentation progressive de la concentration en glucose jusqu'à 30 mmol/l diminue progressivement cette oxydation (Takahashi et al., 2013).

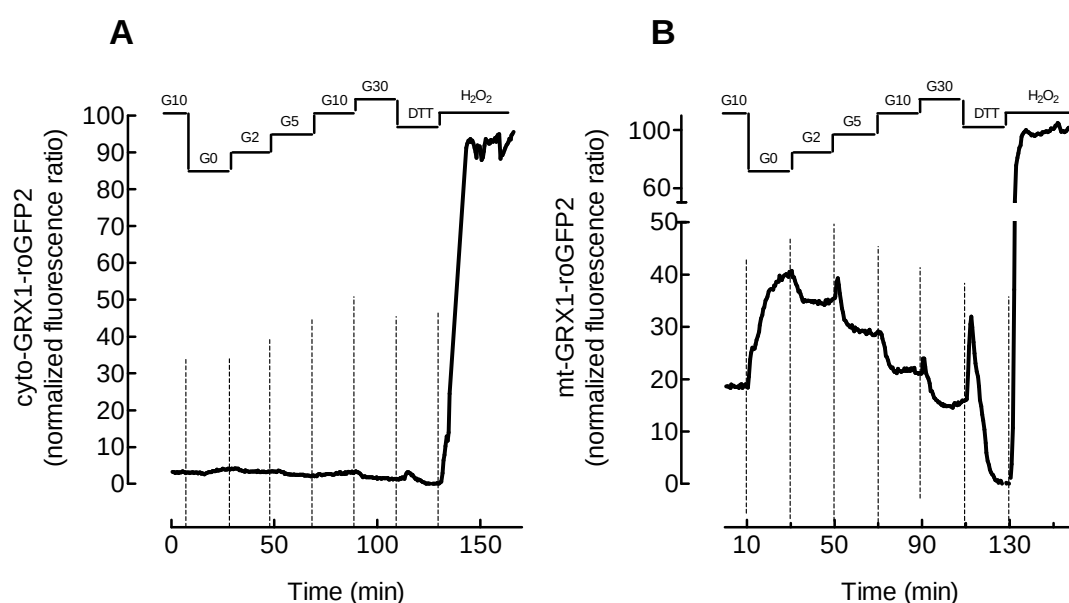


Figure 28. Effet du glucose sur l'équilibre thiol/disulfide cytosolique et mitochondrial. Des clusters de cellules d'îlots de rat infectés avec un virus exprimant la GRX1-roGFP2 cytosolique (A) ou mitochondriale (B) ont été périfusés successivement avec du Krebs contenant 10, 0, 2, 5, 10 puis 30 mmol/l de glucose suivi de G10 + 10 mmol/l de DTT (0%) et de G10 + 1 mmol/l d'H₂O₂ (100%) (Takahashi et al., 2013).

Alors que l'effet du glucose sur le stress oxydatif dans la cellule β est sujet à controverse, nos résultats présentés dans l'article ainsi que ceux obtenus avec la GRX1-roGFP2 confirment que, de manière aigüe, le glucose diminue plutôt qu'il n'augmente le stress oxydatif mitochondrial, comme cela avait été observé à l'aide des sondes H₂DCF-DA et hydroéthidine (Martens et al., 2005b; Sarre et al., 2012). Il reste cependant possible que, à plus long terme (culture de plusieurs heures), les concentrations élevées de glucose induisent

un stress oxydatif dans les cellules β , comme cela a été décrit par différents auteurs (Tanaka et al., 2002a; Bindokas et al., 2003; Morgan et al., 2007).

Dans notre étude, dans celle de Martens et dans une autre étude du laboratoire, l'antioxydant MnTBAP diminue la production de ROS et l'apoptose induites par les concentrations faibles de glucose (Martens et al., 2005b; Sarre et al., 2012; Roma et al., 2012b). A l'opposé, la NAC ne prévient pas ces effets délétères (Roma et al., 2012b). Cette différence d'efficacité est peut-être due au type de ROS produits et à leur site de production qui ne pourrait être atteint par la NAC. Dans ce contexte, il serait intéressant de surexprimer les enzymes antioxydantes SOD et catalase dans différents compartiments cellulaires afin d'approfondir la caractérisation du stress oxydatif induit par les changements de concentration de glucose dans la cellule β .

En première partie de cette thèse et après de nombreuses tentatives, nous avons donc mis au point un outil fiable pour la mesure de l'équilibre thiol/disulfide dans la cellule β , la sonde roGFP1. Cet outil est maintenant couramment utilisé dans notre laboratoire principalement pour les mesures à plus long terme alors que les GRX1-roGFP2 sont les sondes de choix pour les mesures dynamiques. Nous avons également démontré que, de manière aigüe, le glucose diminue plutôt qu'il n'augmente l'oxydation des thiols mitochondriaux, un effet qui semble être l'image en miroir des effets du glucose sur l'autofluorescence du NAD(P)H (Martens et al., 2005b).

II. Deuxième partie : Rôle du zinc sur les altérations phénotypiques des cellules β soumises à des concentrations extrêmes de glucose

1. Introduction

Comme décrit dans l'introduction de cette thèse, la culture prolongée d'îlots de rat en présence de concentrations extrêmes de glucose par rapport à la concentration optimale de 10 mmol/l entraîne une diminution importante de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose et une augmentation de l'apoptose des cellules β . Ces altérations de fonction et de survie sont précédées de changements similaires de l'expression des ARNm *Mt1a/2a* qui suit un profil en V asymétrique avec un minimum après culture en présence de G10, une augmentation importante après culture en présence de G2 ou G5 et une augmentation plus modérée après culture en présence de G30 (Bensellam et al., 2009).

Les MTs sont des protéines d'environ 60 acides aminés dont un tiers sont des cystéines. Elles ont un rôle bien connu de détoxification des métaux lourds et de transport du Zn^{2+} dans la cellule. En effet, elles sont capables de lier jusqu'à sept ions Zn^{2+} (Fischer & Davie, 1998). De plus, elles pourraient avoir un rôle protecteur contre le stress oxydatif. L'équilibre redox (principalement le ratio GSH/GSSG) régule les processus de liaison/libération du Zn^{2+} par les MTs. Alors qu'une élévation de la concentration en GSSG induit la libération du Zn^{2+} , l'augmentation de la concentration en GSH permet sa liaison aux MTs (Jacob et al., 1998; Kang, 2006). La transcription de ces gènes (ainsi que du transporteur du Zn^{2+} *ZnT1*) est régulée par le facteur de transcription MTF-1, lui-même activé par une augmentation de la concentration en Zn^{2+} intracellulaire (Ghoshal & Jacob, 2001).

Dans la cellule β , le Zn^{2+} participe à la cristallisation de l'insuline et est sécrété simultanément avec l'insuline. Il a été décrit que les patients atteints d'un DT2 présentent une diminution du contenu en Zn^{2+} pancréatique ainsi qu'une hypozincémie et une hyperzincurie (Scott & Fisher, 1938; Chausmer, 1998). Le lien entre Zn^{2+} et DT2 a pris davantage d'ampleur lors de la découverte d'une association entre un polymorphisme du gène *ZnT8* (transporteur granulaire au Zn^{2+} des cellules β) et le risque de développer un DT2 (Sladek et al., 2007; Zeggini et al., 2007). De plus, une association entre un polymorphisme de *Mt1a* et le risque de développer un DT2 a également été décrite (Giacconi et al., 2008). En plus de ces associations, il a été décrit que la supplémentation en Zn^{2+} chez un patient diabétique de type 2 améliore la glycémie (Capdor et al., 2012; Jayawardena et al., 2012). Chez l'animal diabétique également, la supplémentation en Zn^{2+} induit une diminution de la glycémie. Certains auteurs ont suggéré que les mécanismes sous-jacents impliquaient l'augmentation d'expression des MTs (Begin-Heick et al., 1985; Yang & Cherian, 1994; Ohly et al., 1998; Ohly et al., 2000; Simon & Taylor, 2001; Cai, 2004; Yoshikawa et al., 2007; Bolkent et al., 2009). *In vitro*, il a également été démontré que l'addition de Zn^{2+} protège les îlots humains de l'apoptose induite par le palmitate (Lefebvre et al., 2012). A plus long terme, l'ajout de Zn^{2+} dans le milieu de culture d'îlots humains améliore leur survie et leur fonction sécrétoire après transplantation (Kerr-Conte et al., 2010). Malgré ces nombreuses données sur l'effet protecteur du Zn^{2+} dans la cellule β , les mécanismes sous-jacents sont encore inconnus.

Dans cette étude, nous avons testé l'effet de l'addition de Zn^{2+} sur les altérations de fonction et de survie d'îlots de rat provoquées par la culture en présence de concentrations extrêmes de glucose. Nous avons également testé l'effet de la culture de clusters de cellules d'îlots de rat en présence de concentrations croissantes de glucose avec ou sans Zn^{2+} sur l'oxydation de la sonde mt-roGFP1.

2. Article : Protective antioxidant and antiapoptotic effects of ZnCl₂ in rat pancreatic islets cultured in low and high glucose concentrations

Jessica Duprez, Leticia P. Roma, Anne-Françoise Close, Jean-Christophe Jonas

PLoS One. 2012 ;7(10) : e46831.

But : Le but de cette étude était de tester l'effet de l'addition de Zn²⁺, un inducteur connu des MT1a et 2a, sur les altérations des cellules des îlots de rat induites par les concentrations extrêmes de glucose. Ces altérations comprennent des modifications de l'expression de certains gènes, une augmentation de l'apoptose et de l'oxydation du glutathion mitochondrial, ainsi que des modifications de la SISG.

Résultats : Alors que le TPEN, un chélateur de Zn²⁺, diminue l'expression des *Mt1a/2a* induite par G5 ainsi que l'expression de *ZnT1* et *ZnT8*, l'addition de 100 µM de ZnCl₂ au milieu de culture augmente l'expression des MT1a/2a (ARNm et protéines) et de *ZnT1* mais pas de *ZnT8* dans toutes les conditions de glucose testées (G5, G10 et G30). L'ajout de 50 µM de ZnCl₂ à des clusters de cellules d'îlots de rat inhibe partiellement l'oxydation des thiols mitochondriaux provoquée par G5 et a tendance à diminuer celle induite par G30. L'apoptose provoquée par une culture prolongée en présence de G5 (3 jours ou 1 semaine) ou de G30 (1 semaine) est également diminuée par l'addition de 100 µM de ZnCl₂. Enfin, les altérations de la sécrétion d'insuline induites par 3 jours de culture en présence de G5 ou par 1 semaine de culture en présence de G30 ne sont pas améliorées par l'augmentation du ZnCl₂ dans le milieu de culture.

Conclusions : Le ZnCl₂ a un effet protecteur sur l'apoptose des cellules β d'îlots de rat observée en présence de concentrations faibles ou élevées de glucose. Les mécanismes impliqués pourraient faire intervenir une augmentation de l'expression des MT1a/2a ainsi qu'une diminution de l'oxydation du glutathion mitochondrial. Le ZnCl₂ n'a par contre pas d'effet bénéfique sur les altérations de la fonction des cellules β provoquées par les concentrations extrêmes de glucose.

3. Discussion

La culture prolongée d'îlots de rat en présence de concentrations extrêmes de glucose provoque des altérations bien caractérisées de l'expression des gènes, de la survie et de la fonction des cellules β (voir introduction de la thèse) alors que les mécanismes impliqués ne sont pas totalement élucidés. L'effet du Zn^{2+} sur ces altérations n'avait pas encore été décrit.

Dans cette étude, j'ai démontré que les effets délétères provoqués par les concentrations extrêmes de glucose dans des îlots de rat sur la survie et la fonction sécrétoire sont associés à des changements similaires concernant l'oxydation de la sonde mt-roGFP1. Dans ces conditions, j'ai également démontré que le ZnCl_2 , un inducteur connu des *Mt1a* et *Mt2a*, exerce un effet protecteur sur l'oxydation des thiols mitochondriaux et sur l'apoptose des cellules β sans améliorer leur fonction.

Dans la première étude, nous avons démontré qu'une diminution aiguë de la concentration en glucose de 10 à 2 mmol/l entraînait une augmentation du signal mt-roGFP1 alors qu'une augmentation de la concentration de glucose de 10 à 30 mmol/l ne modifiait pas le statut oxydatif de la mitochondrie des cellules β . En comparaison, 18h de culture en présence d'une concentration faible de glucose provoque aussi une augmentation de l'oxydation du glutathion dans la matrice mitochondriale. Par contre, contrairement à ce que nous avons observé lors d'une stimulation aiguë par G30, la culture de clusters de cellules d'îlots de rat en présence de 30 mmol/l de glucose provoque une augmentation de l'oxydation de la sonde mt-roGFP1 par rapport à la condition optimale de 10 mmol/l de glucose. Lors de la culture d'îlots de rat en présence de 5 à 30 mmol/l de glucose, l'oxydation du glutathion mitochondrial suit donc un profil en V asymétrique semblable aux profils de l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif, de l'apoptose et des altérations de fonction (figure 29). Comme cela avait été décrit pour les phénomènes apoptotiques (Bensellam et al., 2009), les processus intervenant dans l'augmentation du stress oxydatif mitochondrial par les concentrations élevées de glucose sont donc plus lents que ceux provoqués par les concentrations faibles de glucose. Ceci pourrait être expliqué par l'intervention de mécanismes de production de ROS distincts lors de la culture en présence de concentrations faibles et élevées de glucose (voir chapitre IV.2.3 de l'introduction). De plus, alors que l'augmentation de l'oxydation du glutathion semble commune dans les deux situations, l'intervention d'autres stress pourraient expliquer les différences dans les altérations provoquées par les concentrations faibles et élevées de glucose. En effet, alors qu'une augmentation du stress du RE ou de l'hypoxie pourrait survenir en présence de concentrations supraphysiologiques de glucose, la réponse ISR serait, elle, principalement impliquée dans les altérations provoquées par les concentrations faibles de glucose (Jonas et al., 2009). Alors que l'on pourrait imaginer que l'oxydation des thiols mesurée serait la conséquence de l'augmentation de l'apoptose, ce scénario reste peu probable étant donné que les phénomènes oxydatifs ont été observés avant que l'apoptose ne soit détectable.

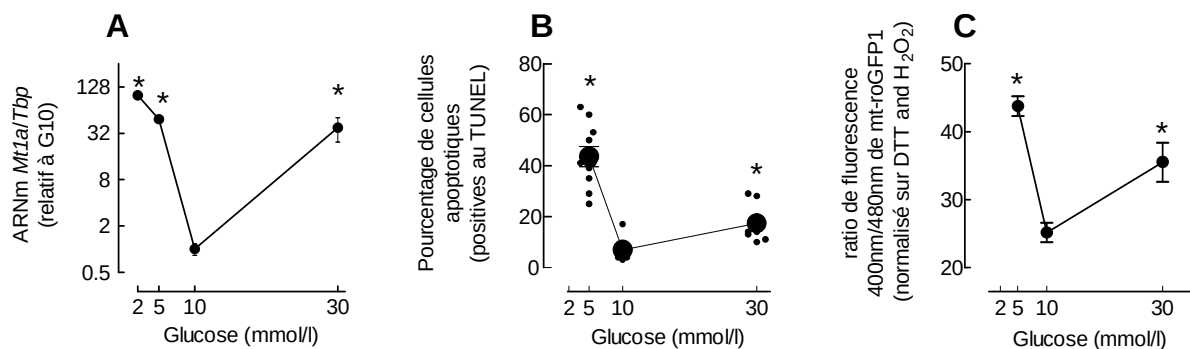


Figure 29. Profils en V asymétrique de l'expression de *Mt1a* (A), de l'apoptose (B) et de l'équilibre redox dans la mitochondrie (C). Des îlots de rat (A, B) ou des clusters de cellules d'îlots de rat (C) ont été cultivés 18h (A, C) ou 1 semaine (B) en présence de concentrations croissantes de glucose. L'expression de *Mt1a* a été mesurée par RT-PCR en temps réel, l'apoptose avec la méthode TUNEL, et l'oxydation du glutathion mitochondrial avec la sonde mt-roGFP1 (Bensellam et al., 2009; Duprez et al., 2012).

Alors que différents points concernant la sonde roGFP ont déjà été abordés dans la discussion de la première partie, il reste cependant quelques points à discuter pour bien interpréter les résultats. Alors qu'une diminution du contenu en glutathion total était peu probable lors de la stimulation aigüe par le glucose, ce phénomène pourrait être présent après plusieurs heures de culture et augmenter ainsi le ratio de fluorescence de la sonde sans pour autant modifier l'oxydation du glutathion (Meyer et al., 2007). J'ai cependant pu écarter cette possibilité car le contenu en glutathion total des îlots est, non pas diminué, mais doublé après 18 à 72h de culture en présence de G5 par rapport à la condition contrôle (figure 30) et la concentration mitochondriale de glutathion est semblable à celle dans le cytosol dans d'autres types cellulaires (Lash, 2005). Si le glutathion total n'avait pas augmenté, le ratio de fluorescence de la sonde après culture en G5 aurait donc été supérieur à celui que j'ai mesuré.

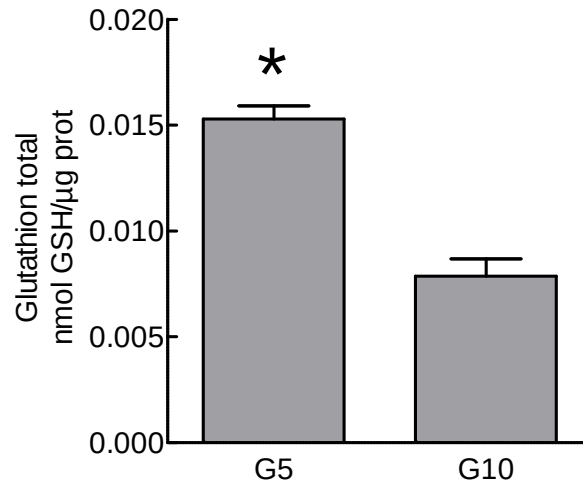


Figure 30. Effets de la culture en présence de G5 ou de G10 sur la glutathion total. Après 18 à 72h de culture d'îlots de rat en présence de G5 ou de G10, le glutathion total a été mesuré à l'aide du kit « glutathione fluorescent detection kit ». n=4, test t non pairé. (Roma et al., 2012b).

Le début de mon étude s'intéresse à l'expression des *Mt1a/2a* ainsi qu'à celle des *ZNT1* et *ZNT8* en présence de diverses concentrations de glucose et de Zn^{2+} ou de TPEN, un chélateur de Zn^{2+} . Bien que je n'aie pas approfondi l'étude des mécanismes de régulation de l'expression des *Mt1a/2a* dans les îlots de rat, je propose l'hypothèse suivante : l'augmentation de ROS induite par la culture en G5 entraîne l'oxydation des MT1a/2a, ce qui provoque la libération de Zn^{2+} . Ce dernier active le MTF-1 qui peut ainsi augmenter l'expression de ses gènes cibles *Mt1a*, *Mt2a* et *ZnT1* (Andrews, 2001) (figure 31).

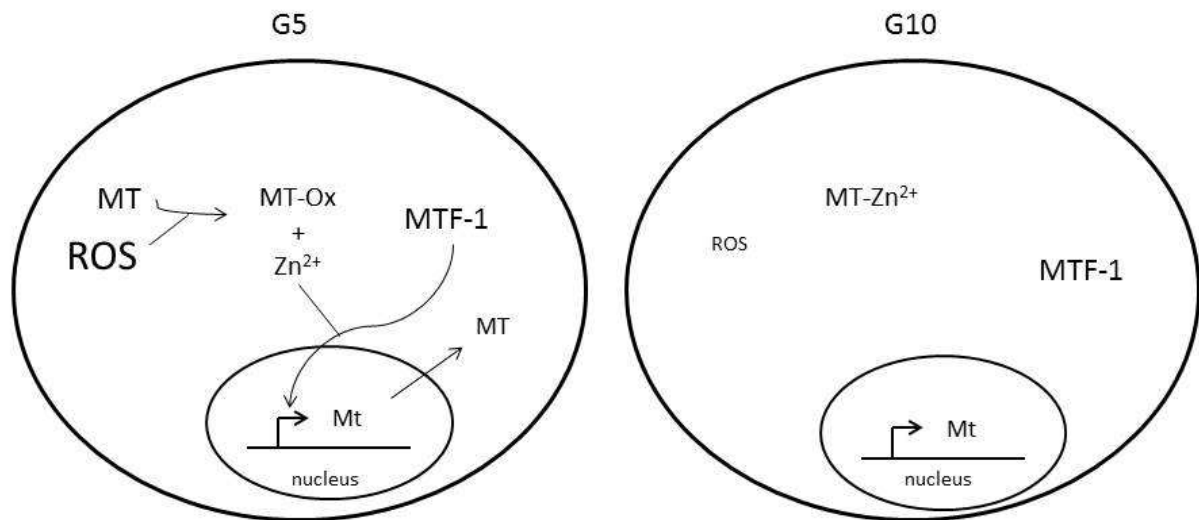


Figure 31. Hypothèse des mécanismes d'induction de Mt par G5. Lors de la culture de cellules β en présence de G5, l'augmentation de la production de ROS oxyde les MTs qui libèrent ainsi le Zn^{2+} qui active MTF-1, ce qui augmente l'expression de son gène cible Mt. Lors de la culture en présence de G10, le Zn^{2+} est principalement lié aux MTs dans la cellule. Schéma inspiré de (Chimienti, 2013)

Mon hypothèse est soutenue par le fait que l'addition de TPEN entraîne une inhibition quasi totale de l'expression des *Mt1a/2a* induite par G5, alors qu'il ne modifie pas l'expression basale des *Mt1a/2a*. Ceci confirme que, dans cette dernière situation, l'expression des *Mt1a/2a* est indépendante d'une activation de MTF1 par le Zn^{2+} . Il a en effet été proposé que c'est la séquence USF/ARE qui est impliquée dans l'expression basale des *Mt1a/2a* (Andrews, 2000). Cependant, mon hypothèse n'est pas soutenue par une étude démontrant qu'après 24h de culture en présence de 3 à 16,7 mmol/l de glucose, la $[Zn^{2+}]_i$ d'îlots de souris augmente de ~400 à ~800 pmol/l alors que l'expression des *Mt1* et *Mt2* diminue (Bellomo et al., 2011). L'augmentation de la $[Zn^{2+}]_i$ pourrait résulter de la diminution d'expression des MTs et donc d'une diminution de sa capacité à lier le Zn^{2+} libre de la cellule. Néanmoins, la régulation de la $[Zn^{2+}]_i$ par le glucose pourrait être différente dans le cytosol et le noyau (Mocchegiani et al., 2008), et les différences entre les modèles utilisés pourraient expliquer cette discordance.

Etant donné le rôle émergent du transporteur granulaire au Zn^{2+} ZnT8 dans le DT2, l'expression de son ARNm a également été mesurée dans nos conditions. A l'opposé des autres ARNm mesurés, l'expression de *ZnT8* est diminuée après culture en présence de G5 et G30 vs. G10. D'autres groupes avaient également démontré que le glucose ou l'exposition à des cytokines entraîne une diminution de l'expression de *ZnT8* dans des cellules INS-1 ou MIN6 (Egefjord et al., 2009; Smidt et al., 2009; El et al., 2010). De plus, l'expression de *ZnT8* est également diminuée dans les cellules β de souris à un stade précoce du diabète (Tamaki et al., 2009). Cependant, dans des îlots humains cultivés en présence de différentes concentrations en glucose, l'expression de *ZnT8* n'était pas différente (Lefebvre et al., 2012), ce qui renforce à nouveau l'importance de la différence entre les modèles utilisés. Mon étude, ainsi que d'autres, démontrent également que la chélation du Zn^{2+} inhibe partiellement l'expression de *ZnT8* alors que l'addition de Zn^{2+} n'augmente pas l'expression de ce gène (Smidt et al., 2009; Lefebvre et al., 2012). La diminution de l'expression de *ZnT8* par le TPEN pourrait cependant résulter de l'apoptose provoquée par ce chélateur. Ce scénario est d'autant plus probable que l'expression de *ZnT8* est importante dans la cellule β . Je peux donc conclure que l'expression de *ZnT8* n'est pas régulée en parallèle avec celles des gènes cibles de MTF-1 : *Mt1a/2a* et *ZnT1*.

Outre les mesures d'expression des ARNm *Mt1a/2a*, j'ai également étudié l'expression des protéines MT1a/2a. Alors que le $ZnCl_2$ augmente de manière importante l'expression protéique des MT1a/2a, aucune différence d'expression protéique n'a été détectée entre les trois concentrations de glucose testées. Ceci pourrait s'expliquer par un manque de sensibilité de l'anticorps anti-MT1a/2a. De plus, je ne peux pas exclure qu'une diminution des mécanismes responsables de la traduction des protéines en présence d'une concentration faible de glucose explique cette discordance entre expression des ARNm et des protéines. D'autres auteurs ont également observé que l'expression des ARNm ne reflète pas toujours celle des protéines MT1a/2a (Vasconcelos et al., 2002). Ceci suggère qu'une régulation post-transcriptionnelle n'est pas à exclure (Formigari et al., 2007). Celle-ci pourrait faire intervenir des microARNs qui, en s'appariant aux ARNm des *Mts*, pourraient induire la répression de

leur traduction en maintenant les taux d'ARNm. Cependant, ceci n'est qu'une hypothèse et, à ma connaissance, aucune donnée dans la littérature n'existe pour la confirmer ou l'infirmer.

Comme décrit dans l'introduction, la supplémentation en Zn^{2+} semble avoir des effets bénéfiques tant sur la glycémie des patients diabétiques et d'animaux diabétiques que sur la survie d'îlots transplantés ou, *in vitro*, sur la toxicité de la STZ sur les cellules β (Ohly et al., 1998; Ohly et al., 2000; Simon & Taylor, 2001; Bolkent et al., 2009; Kerr-Conte et al., 2010; Okamoto et al., 2011; Jayawardena et al., 2012; Capdor et al., 2012). Dans mon étude, j'ai démontré un effet protecteur de l'addition de 50-100 μM de ZnCl_2 sur les altérations de survie et l'oxydation des thiols mitochondriaux observées dans des îlots de rat cultivés en présence de concentrations extrêmes de glucose. Une étude précédente avait démontré que l'addition de 90 $\mu\text{mol/l}$ de ZnSO_4 n'augmentait pas le contenu intracellulaire en Zn^{2+} (Chimienti et al., 2006). Cependant, une étude plus récente utilisant une nouvelle méthode de détection du Zn^{2+} intracellulaire a démontré que l'addition de 50 $\mu\text{mol/l}$ de ZnCl_2 doublait la $[\text{Zn}^{2+}]_i$ et augmentait l'expression de *Mt1* dans des îlots de souris (Bellomo et al., 2011). Ceci soutient l'idée que les effets observés dans mon étude sont la conséquence d'une augmentation de la $[\text{Zn}^{2+}]_i$ et ne sont probablement pas attribuables à la faible augmentation de l'ion Cl^- dans le milieu, ion déjà présent dans le milieu RPMI alors que le Zn^{2+} est lui étonnement absent de ce milieu. Dans une étude où les auteurs utilisent un milieu contenant 5 mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA), comme dans la mienne, ~75% du Zn^{2+} était lié à la BSA (Ferrer et al., 1984). Les effets protecteurs que j'ai observés se déroulent donc à une concentration de Zn^{2+} libre semblable à celle observée dans le plasma des rongeurs (Ferrer et al., 1984) mais plus faible que celles qui exercent des effets pro-oxydants et pro-apoptotiques (Sensi et al., 1999; Hamatake et al., 2000; Untergasser et al., 2000; Chimienti et al., 2006). Afin d'éviter l'apoptose des cellules dispersées, j'ai dû diminuer la concentration en ZnCl_2 de 100 à 50 $\mu\text{mol/l}$. Ceci pourrait être expliqué par les différences de quantité en Zn^{2+} lié par le milieu contenant de la BSA (pour les îlots entiers) ou du sérum de fœtus bovin (FBS) (pour les cellules dispersées), ou par la meilleure diffusion du ZnCl_2 au sein des clusters que des îlots entiers.

L'effet bénéfique du Zn^{2+} sur l'oxydation du glutathion dans la mitochondrie provoquée par les concentrations extrêmes de glucose pourrait contribuer à son effet antiapoptotique. En effet, alors que plusieurs études démontrent un effet pro-oxydant de la déficience en Zn^{2+} (Oteiza et al., 1995; Kraus et al., 1997; Oteiza et al., 2000; Song et al., 2009; Eide, 2011; Zhao et al., 2011), certaines constatent une diminution du stress oxydatif par le Zn^{2+} (Perez & Cederbaum, 2003; Kelishadi et al., 2010; Kumar et al., 2012; Zheng et al., 2013). Les mécanismes impliqués pourraient faire intervenir l'augmentation d'expression des MTs. Comme décrit dans l'introduction de cette partie, les MTs sont responsables du transport de Zn^{2+} intracellulaire et pourraient exercer leur effet antioxydant en distribuant le Zn^{2+} aux protéines qui en requièrent (Truong-Tran et al., 2001; Maret, 2011). Les MTs sont également connues pour détoxifier les ROS. En effet, elles auraient une capacité 50 fois plus élevée que le GSH pour lier le $\text{OH}^\cdot$ (Thornalley & Vasak, 1985; Miura et al., 1997; Yoshida et al., 2005). Cependant, ces études sont basées sur des expériences réalisées *in vitro* et requièrent une confirmation *in vivo*. Outre l'activation de l'expression des MTs, le Zn^{2+} est également un

cofacteur de la SOD1 et pourrait donc améliorer ainsi les défenses antioxydantes de la cellule β . Néanmoins, il a été démontré que l'activité de la SOD1 est plutôt augmentée que diminuée lors de la déficience en Zn^{2+} (Oteiza et al., 1996; Parat et al., 1997; Song et al., 2009). De plus, il a été proposé que le Zn^{2+} pourrait entrer en compétition avec d'autres métaux comme le fer ce qui induirait une inhibition de la réaction de Fenton (Zago et al., 2000; Zago & Oteiza, 2001). Enfin, il a été suggéré que le Zn^{2+} pourrait se lier aux groupes sulfhydryles des protéines et ainsi les protéger des dommages induits par un stress oxydatif (Eide, 2011). En plus de son action antioxydante indirecte, le Zn^{2+} exerce un effet anti-apoptotique via l'inhibition des caspases 3, 6 et 9. L'action antioxydante indirecte du Zn^{2+} et son effet inhibiteur des caspases pourraient être liés. En effet, l'activation des caspases est influencée par l'état redox de la cellule et le Zn^{2+} pourrait jouer son rôle anti-apoptotique en masquant les groupes sulfhydryles des caspases (Maret et al., 1999; Truong-Tran et al., 2001). Dans une étude récente, Liang et al. suggèrent que le Zn^{2+} inhibe l'apoptose des cellules précurseurs d'ostéoblastes provoquée par le H_2O_2 via les voies des Mitogen-activated protein kinases et de la phosphoinositide-3-kinase/AKT (Liang et al., 2012), ce qui constitue l'implication de nouvelles voies dans l'effet protecteur du Zn^{2+} .

Malgré un effet protecteur sur la survie des cellules β et une augmentation du contenu en insuline significative en G30, le Zn^{2+} n'améliore pas la fonction sécrétoire des îlots de rat cultivés en présence de concentrations extrêmes de glucose. En effet, trois jours de culture en présence de G5 vs. G10 provoque une inhibition quasi-totale de la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation aigüe par le glucose. D'autre part, une semaine de culture en présence de G30 induit une légère augmentation de la sensibilité des cellules β caractérisée par une augmentation de la sécrétion d'insuline lors de la stimulation ultérieure par G6 ainsi qu'une inhibition importante de la sécrétion d'insuline stimulée par G10 et G20. L'addition de ZnCl_2 lors de la culture n'améliore pas ces effets mais au contraire, le Zn^{2+} diminue la sécrétion d'insuline en présence de G10, un effet plus prononcé lorsque la sécrétion d'insuline est normalisée sur le contenu en insuline. Il avait été démontré, au début des années quatre-vingt, que le Zn^{2+} inhibe la SISG (Figlewicz et al., 1981; Ghafghazi et al., 1981; Ferrer et al., 1984). Cet effet pourrait résulter d'une inhibition de l'influx calcique ou de l'effet intracellulaire du Ca^{2+} , ou encore d'une inhibition de l'activité de la GAPDH (Maret et al., 1999). Je ne peux pas non plus exclure que l'inhibition de la sécrétion d'insuline par le Zn^{2+} résulte indirectement d'une inhibition de la sécrétion de glucagon par les cellules α (Hardy et al., 2011) et donc de la [AMPC] dans les cellules β .

Le manque d'effet protecteur d'autres substances antiapoptotiques sur la fonction des cellules β a également été observé dans d'autres études (Lefebvre et al., 2012; Roma et al., 2012b). Dans ces études, l'addition de l'antioxydant catalytique MnTBAP protège les îlots de rat de l'apoptose provoquée par la culture prolongée en présence de G5, et le ZnSO_4 protège les îlots humains de l'apoptose induite par le palmitate. Dans ces deux études ainsi que dans la mienne, aucune amélioration de fonction n'a été observée. Deux hypothèses pourraient expliquer ces résultats. La fonction des cellules β pourrait être sensible aux niveaux de stress oxydatif encore présent en présence des antioxydants. En effet, les facteurs de transcription spécifiques des cellules β , MAF-A et PDX-1, sont très sensibles au stress oxydatif (Kaneto et

al., 1999; Harmon et al., 2005). De plus, le métabolisme mitochondrial est, lui aussi, particulièrement sensible au stress oxydatif (Li et al., 2009). En effet, les complexes I et IV de la chaîne de transport des électrons ainsi que l'aconitase et la PDH subissent la S-glutathionylation lors d'un stress oxydatif, ce qui provoque leur inhibition (Garcia et al., 2010). La seconde hypothèse que je ne peux pas exclure est que les altérations de la SISG ne sont pas liées au changement du statut redox mitochondrial. Bien qu'une amélioration de la masse des cellules β par le Zn^{2+} pourrait expliquer ses effets bénéfiques dans le DT2, mes résultats confirment qu'il est important de tester l'effet de tout traitement potentiel aussi bien sur la masse que sur la fonction des cellules β .

En conclusion, cette étude a permis de démontrer que le Zn^{2+} a un effet protecteur sur l'oxydation du glutathion dans la mitochondrie et sur l'apoptose provoqués par les concentrations extrêmes de glucose dans des îlots de rat sans amélioration de leur fonction sécrétoire. Les mécanismes impliqués pourraient faire intervenir l'expression des MTs, ce qui fut l'hypothèse émise pour la troisième étude présentée dans cette thèse.

DISCUSSION GENERALE-PERSPECTIVES

A court terme, il est bien établi que le glucose régule finement la sécrétion d'insuline par les cellules β . A plus long terme, la concentration en glucose est un paramètre important pour le maintien de la fonction, de la survie et de l'expression d'une batterie de gènes dans la cellule β . En effet, tant l'hypo- que l'hyperglycémie *in vivo* ainsi que l'exposition prolongée à des concentrations faibles ou élevées de glucose *in vitro* entraînent des altérations de la SISG, de la survie et de l'expression de différents gènes dans les cellules β . Les mécanismes moléculaires sous-jacents pourraient impliquer le stress du RE, la réponse ISR, l'hypoxie, la production de cytokines ou encore le stress oxydatif qui a fait plus particulièrement l'objet de mon travail de thèse (Jonas et al., 2009). Comme les trois études ont déjà été individuellement discutées, je ne vais aborder ici que les éléments reprenant une vue d'ensemble concernant les types de stress impliqués dans les altérations des cellules β provoquées par la culture en présence de concentrations extrêmes de glucose. Mais avant d'aborder cette question, j'aimerais répondre à une première question concernant l'intérêt de tester l'effet de la culture de cellules β en présence d'une large gamme de concentrations en glucose. Ensuite, je vais tenter de répondre aux diverses questions que j'avais imaginé au début de ma thèse ainsi qu'à celles que mes résultats ont suscitées. Pour une meilleure compréhension de cette discussion, un schéma récapitulatif est proposé à la figure 40 de la page 95.

Quel est l'intérêt d'étudier les effets de la culture de cellules β en présence d'une large gamme de concentrations de glucose ?

Alors que de nombreux auteurs s'intéressent aux effets du glucose sur la cellule β en ne comparant que deux concentrations, il nous a semblé plus opportun de tester l'effet d'une large gamme de concentrations en glucose allant de 2 à 30 mmol/l. L'utilisation de cette large gamme prend tout son intérêt lorsqu'on analyse les conclusions tirées par les auteurs sur les effets du glucose. En effet, ces dernières sont parfois contradictoires alors que les concentrations de glucose utilisées diffèrent fortement d'une étude à l'autre.

D'un autre côté, certains me demanderont l'importance de s'attarder sur les effets des concentrations faibles de glucose alors que le diabète est caractérisé par une hyperglycémie. Dans ce contexte, il est intéressant de remarquer que l'augmentation d'expression de certains gènes de stress observés dans les îlots d'animaux diabétiques est reproduite *in vitro* en présence d'une concentration faible de glucose. Parmi ceux-ci, citons l'augmentation d'expression de *c-Myc*, *Atf3*, *Hmox1*, *Gpx1* ou encore *Fas*. Cependant, d'autres gènes comme les gènes cibles de HIF (facteur de transcription activé en situation hypoxique) ou encore la « thioredoxin-interacting protein » sont typiquement induits *in vitro* en présence de concentrations élevées de glucose ainsi que, *in vivo*, dans les cellules β d'animaux rendus diabétiques (Jonas et al., 1999; Laybutt et al., 2002; Kjørholt et al., 2005; Chen et al., 2008; Bensellam et al., 2009).

De plus, alors que la réduction de la sécrétion d'insuline par les cellules β de patients diabétiques est bien documentée, les mécanismes sous-jacents sont peu connus et font l'objet

de nombreuses recherches actuelles. Dans ce cadre, différents auteurs se sont intéressés aux effets des activateurs de la glucokinase comme thérapie potentielle pour le DT2 (Matschinsky, 2009). Rappelons que cette enzyme est l'isoforme de l'hexokinase exprimée dans les cellules β et les hépatocytes. Elle phosphoryle le glucose après son entrée dans la cellule et est considérée comme le senseur du glucose dans la cellule β . Il a été démontré que l'activation de la glucokinase lors de la périfusion des cellules permet de restaurer la consommation d'oxygène altérée dans des îlots issus de patients atteints d'un DT2 et d'augmenter considérablement la sécrétion d'insuline ainsi que la réponse calcique (Doliba et al., 2012). Ces résultats montrent donc que la diminution de la sécrétion d'insuline observée dans des cellules β de patients atteints d'un DT2 est la conséquence d'une réduction du métabolisme du glucose. Cette réduction du métabolisme du glucose peut être mimée *in vitro* par la culture en présence d'une concentration faible de glucose.

Dans une étude récente réalisée au laboratoire et à laquelle j'ai contribué, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'activation de la glucokinase dans nos conditions expérimentales (manuscrit en préparation). L'addition de 3 μ M d'un activateur de la glucokinase (Ro 28-0450) dans le milieu de culture contenant G5 mime totalement les effets bénéfiques de la culture d'îlots de rat en présence de G10 sur la fonction, la survie, l'oxydation du glutathion mitochondrial et l'expression de gènes (préproinsuline, *Mt1a* et *Gadd153*). Ceci suggère que l'activation de la glucokinase permet de rétablir la survie et la fonction des cellules β soumises à des conditions menant à une diminution de la sensibilité au glucose. Par contre, l'ajout de cet activateur de la glucokinase pendant la culture en présence de G10 mime les effets délétères de la culture en présence de G30. Tous ces arguments montrent l'importance de tester l'effet du glucose dans une large gamme de concentrations.

Les concentrations extrêmes de glucose provoquent-elles un stress oxydatif dans les cellules β de rat qui expliquerait les modifications de survie et de fonction observées dans ces conditions ?

Au début de ma thèse, nous avons observé une certaine disparité dans la réponse au glucose entre les îlots de rat et ceux de souris. En effet, comme illustré à la figure 38, nous avons qualifié le profil des altérations phénotypiques des cellules β de rat en « V asymétrique » avec des altérations importantes après culture en présence d'une concentration faible de glucose et moindre après culture en présence d'une concentration élevée de glucose. Dans des îlots de souris, ce profil est plutôt en « L » avec une absence d'effets délétères après une semaine de culture en présence d'une concentration élevée de glucose. Dans les deux types d'îlots, le profil d'expression des gènes de réponse au stress oxydatif *c-Myc*, *Hmox1* et *Mt1a/2a* corrèle particulièrement bien avec ceux des altérations de fonction et de survie des cellules β , ce qui explique pourquoi j'avais décidé de me focaliser d'avantage sur le stress oxydatif plutôt que sur le stress du RE.

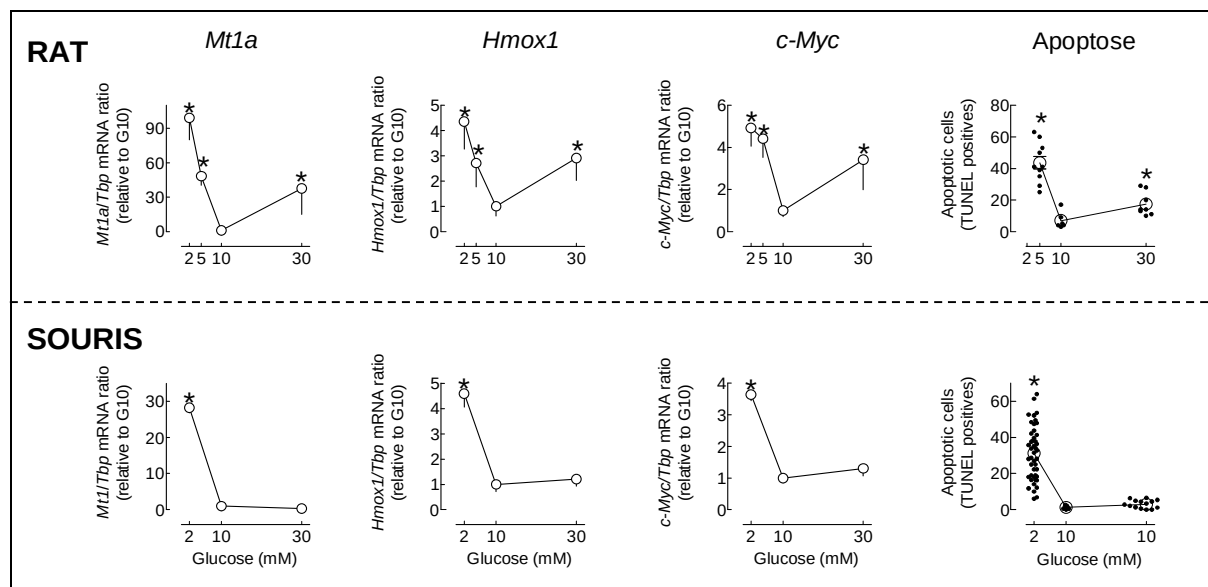


Figure 38. Effets d'une culture d'îlots de rat ou de souris en présence de concentrations croissantes de glucose sur l'expression des ARNm *Mt1a*, *Hmox1* et *c-Myc* et sur l'apoptose. L'expression des gènes a été mesurée par RT-PCR en temps réel après 18h de culture et l'apoptose a été mesurée par la méthode TUNEL après 1 semaine de culture. n=3, 4. Figure adaptée de (Jonas et al., 2009).

A partir de ces données et des données de la littérature, nous avons, à cette époque, émis l'hypothèse que la culture de cellules β en présence de concentrations extrêmes de glucose provoque une augmentation du stress oxydatif mais nous n'avions pas d'outil pour le mesurer. La première étude présentée dans cette thèse a permis la mise au point d'une méthode de mesure de l'équilibre redox dans nos conditions expérimentales à l'aide de la sonde mt-roGFP1.

Il semble ici intéressant de préciser ce que mesure spécifiquement cette sonde. L'oxydation de mt-roGFP1 augmente lors de la diminution du ratio GSH/GSSG. Ce processus est dépendant de la GRX endogène. De plus, le ratio GSH/GSSG est lui-même dépendant de la GR et de la concentration en NADPH dans la cellule. Cette sonde mesure donc plutôt le statut redox des thiols dans la cellule, ou, dans le cadre de la mt-roGFP1, dans la matrice mitochondriale. Ce statut redox peut être un indicateur du stress oxydatif mais ne mesure en aucun cas les dommages cellulaires provoqués par ce stress (Meyer & Dick, 2010).

Malgré tous les avantages déjà discutés à propos de cette sonde, je ne peux faire l'impasse sur le fait qu'il serait intéressant de disposer d'un autre outil de mesure du stress oxydatif au laboratoire. En effet, jusqu'à présent, la sonde roGFP1 ne permet de mesurer l'oxydation des thiols que dans la mitochondrie. La mise au point d'autres sondes est actuellement en cours au laboratoire. Parmi celles-ci, la sonde roGFP2-Orp1 exprimée dans le cytosol et la mitochondrie est spécifiquement sensible au H_2O_2 et pourra nous fournir de plus amples informations sur la régulation par le glucose de la production de H_2O_2 dans la cellule β .

Dans notre première étude, nous avons démontré que, de manière aiguë, le glucose diminue l'oxydation de la sonde mt-roGFP1. Dans ma deuxième étude, j'ai confirmé que la culture de clusters de cellules d'îlots de rat en présence de concentrations extrêmes de glucose (G5 et G30) entraîne une augmentation de l'oxydation des thiols dans la mitochondrie avec un effet plus important après culture en présence d'une concentration faible de glucose qu'en présence d'une concentration élevée de glucose (figure 39). Dans les cellules β de rat cultivées en présence de concentrations croissantes de glucose, l'oxydation du glutathion mitochondrial suit donc un profil en V asymétrique semblable à ceux de l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif, de l'apoptose et des altérations de fonction.

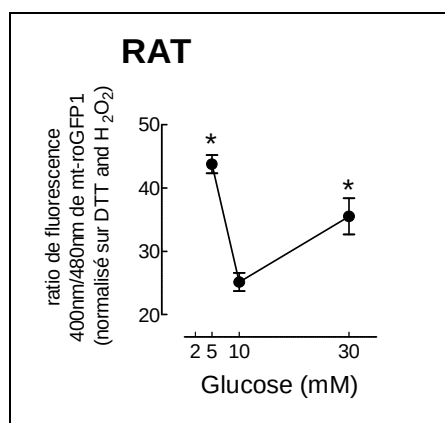


Figure 39. Oxydation des thiols mitochondriaux dans des clusters de cellules d'îlots de rat cultivés 18 à 24h en présence de 5, 10 ou 30 mmol/l de glucose. La mesure a été effectuée à l'aide de la sonde mt-roGFP1. n=3. (Duprez et al., 2012).

La présence d'une augmentation de l'oxydation du glutathion dans ces conditions est renforcée par l'observation que l'ajout de substances aux propriétés antioxydantes permet de diminuer l'oxydation de la sonde mt-roGFP1 ainsi que l'apoptose.

Nous avons publié une étude s'intéressant aux effets des antioxydants NAC et MnTBAP dans les altérations phénotypiques des cellules β de rat provoquées par la culture en présence de G5 (Roma et al., 2012b). Dans cette étude, nous avons démontré que l'ajout de MnTBAP mais pas de NAC permet de réduire l'apoptose et l'oxydation des thiols mitochondriaux provoqués par la culture en présence de G5. L'absence d'effet du NAC sur la survie et l'oxydation de la sonde mt-roGFP1, alors qu'il réduit l'expression des gènes *Hmox1* et *Mt1a*, pourrait venir du fait que cet antioxydant n'atteint pas la matrice mitochondriale. Il serait dès lors intéressant d'approfondir nos connaissances sur la présence d'un stress oxydatif dans un autre compartiment que la mitochondrie ou encore sur le type de ROS produits dans cette condition délétère. Lors de ma thèse, j'ai également pu tester l'effet de l'ajout de NAC et de MnTBAP sur l'apoptose et l'oxydation de la sonde mt-roGFP1 dans des cellules β de rat provoquées par la culture en présence de G30. J'ai ainsi mesuré que la NAC et le MnTBAP ne réduisent pas l'apoptose dans cette condition (Jessica Duprez, résultats non publiés). Par contre, l'addition de ces antioxydants diminue considérablement l'oxydation de la sonde mt-roGFP1 dans des clusters de cellules d'îlots de rat provoquée par 18 à 24h de culture en présence de G30 (Leticia P. Roma, Jessica Duprez, résultats non publiés). Ces résultats

remettent en question l'implication du stress oxydatif mitochondrial dans les effets délétères provoqués par la culture en présence de G30. L'implication d'autres stress sera abordée dans la suite de cette discussion.

Dans ma deuxième étude, j'ai démontré que l'ajout de ZnCl_2 au milieu de culture diminue significativement l'oxydation des thiols mitochondriaux et l'apoptose des cellules β de rat provoquées par la culture en présence de G5. De plus, j'ai démontré que le Zn^{2+} réduit significativement le nombre de cellules β apoptotiques en présence de G30 bien qu'il ne diminue que légèrement le signal fluorescent de la mt-roGFP1. A nouveau ceci m'amène à imaginer l'implication d'autres stress, comme le stress du RE, dans les effets délétères provoqués par la culture de cellules β en présence d'une concentration élevée de glucose. Ceci sera également abordé ultérieurement dans la discussion.

Bien que le Zn^{2+} possède de nombreuses propriétés, il a été suggéré que son effet protecteur pourrait faire intervenir des mécanismes antioxydants via l'augmentation d'expression des MT1/2 (Ohly et al., 1998; Ohly et al., 2000; Cai, 2004). Ceci fut à l'origine de mon hypothèse émise pour ma troisième étude. Cependant, les disparités observées pour les effets du Zn^{2+} entre les îlots de rat et de souris m'ont empêchée de confirmer ou d'infirmer mon hypothèse. Dans ce cadre, il serait intéressant de tester dans les îlots de rat une méthode développée par Lefebvre et al. qui utilise la technologie de la microporation et permet d'améliorer l'efficacité de transfection de plasmides dans des îlots pancréatiques sans modifier la fonction et la viabilité des îlots (Lefebvre et al., 2010). Les auteurs ont ainsi réussi à diminuer l'expression de ZnT8 à l'aide de siRNA et à le surexprimer dans des îlots humains. Il serait donc intéressant d'utiliser cette méthode pour diminuer l'expression de gènes dans des îlots de rat et tester ainsi si les effets du Zn^{2+} que j'ai observés sont dépendants ou non des MT1a/2a. L'utilisation de rats transgéniques est également imaginable. La création et l'élevage de ces modèles sont cependant coûteux.

Lors de la troisième étude par contre, j'ai démontré que la culture de clusters de cellules β de souris en présence d'une concentration faible de glucose n'augmente pas l'oxydation des thiols dans la mitochondrie. A ce jour, les mesures concernant la culture en présence de concentrations élevées de glucose dans les cellules β de souris n'ont pas été réalisées. Ceci suggère donc que l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques d'îlots de souris observée après une semaine de culture en présence de 2 mmol/l de glucose ne résulte pas d'une augmentation de l'oxydation du glutathion mitochondrial.

A ce stade, je ne peux pas exclure la présence d'un stress oxydatif dans un autre compartiment cellulaire ou encore de phénomènes m'empêchant d'observer une augmentation du ratio de fluorescence de la sonde mt-roGFP1. En effet, le ratio de fluorescence de la roGFP, qui reflète le ratio GSH/GSSG, est influencé par la réduction de la sonde par la GRX qui utilise le NADPH comme agent réducteur. Une modification de la production de NADPH ou de la disponibilité de la GRX est donc susceptible d'entraîner un changement du ratio de fluorescence de la sonde. Dans ce cadre, il serait intéressant de tester les effets du glucose dans la cellule β de souris sur le signal fluorescent de la sonde GRX1-roGFP2, cette dernière n'étant pas sensible à des modifications d'expression ou de disponibilité de la GRX endogène.

De plus, l'augmentation du ratio de fluorescence de mt-roGFP1 pourrait être la conséquence d'une diminution du contenu en glutathion total dans le compartiment où la roGFP est exprimée sans pour autant que l'état d'oxydation du glutathion ne soit modifié (Meyer & Dick, 2010). Comme réalisé sur les cellules d'îlots de rat, il serait intéressant de mesurer l'effet du glucose sur le glutathion total dans les cellules d'îlots de souris, voire dans leurs mitochondries.

Alors que j'ai tenté de répondre à la question concernant l'implication du stress oxydatif dans les altérations de survie des cellules β de rat et de souris provoquées par la culture en présence de concentrations extrêmes de glucose, il me reste à aborder l'implication du stress oxydatif dans les altérations de fonction observées dans ces conditions. Les résultats obtenus lors de ma deuxième étude ainsi que dans une étude précédente (Roma et al., 2012b) ont démontré que la diminution du stress oxydatif mitochondrial provoqué par la culture en présence de G5 par le MnTBAP ou par la culture en présence de G5 et G30 par le ZnCl₂ ne permet pas d'améliorer les altérations de fonction observées. Ces résultats suggèrent que soit les altérations de fonction sont sensibles au stress oxydatif résiduel car l'inhibition par le MnTBAP et le ZnCl₂ n'est pas totale, soit que les deux phénomènes (stress oxydatif et altérations de fonction) sont indépendants.

Les différents résultats que je viens de développer amènent à poser les deux questions suivantes :

- Comment expliquer les disparités observées entre les îlots de rat et ceux de souris ?
- Le stress oxydatif est-il le seul acteur responsable des modifications de survie observées en présence d'une concentration faible ou élevée de glucose ?

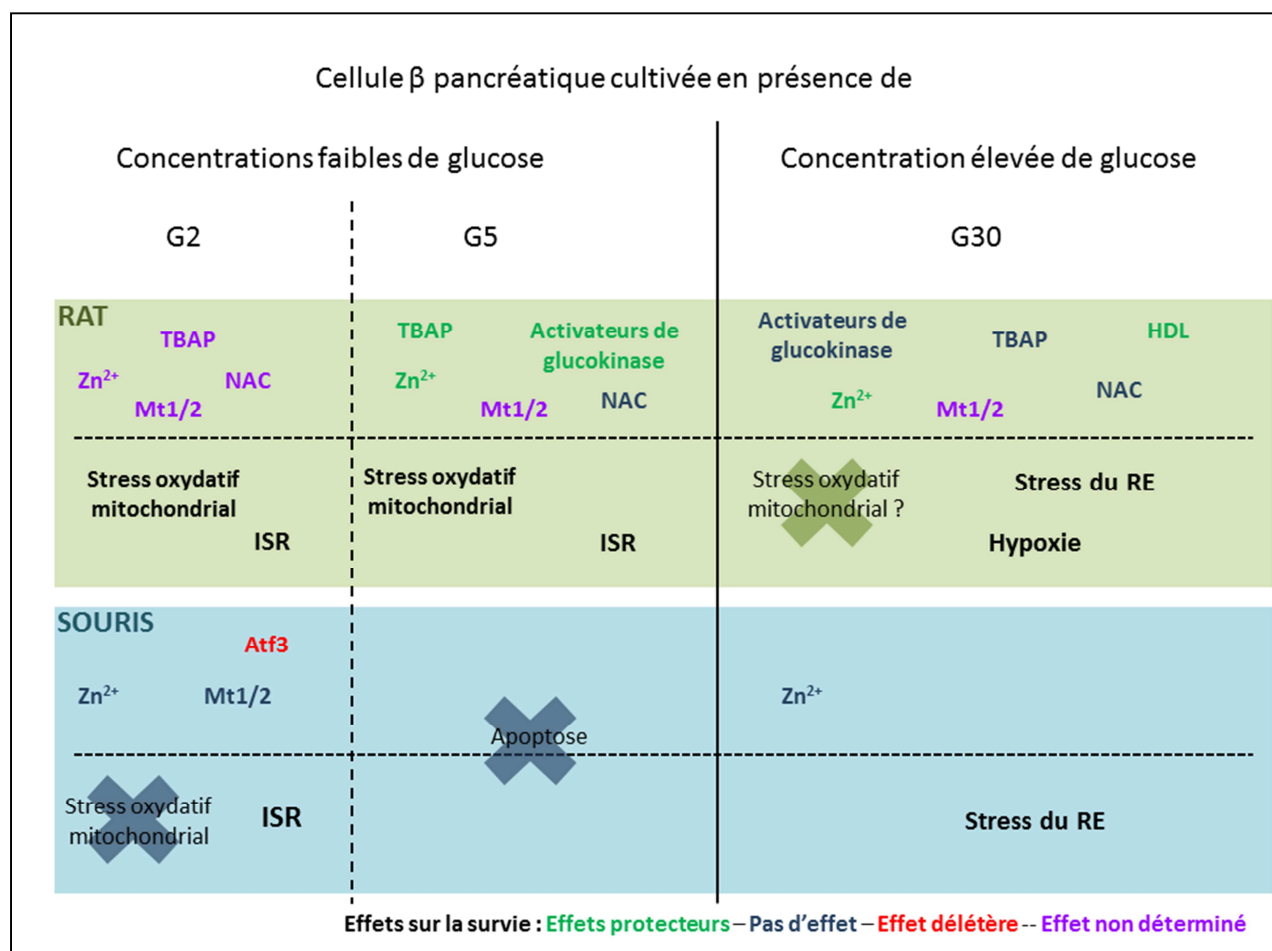


Figure 40. Schéma récapitulatif reprenant l'effet de diverses substances sur l'apoptose des cellules β de rat (encadré vert) ou de souris (encadré bleu) provoquée par la culture en présence de concentrations extrêmes de glucose par rapport à G10, et les stress potentiellement impliqués. NB : L'effet des activateurs de glucokinase en présence de G10 est délétère.

Comment expliquer les différences observées entre les îlots de rat et de souris ?

Les îlots de souris présentent moins de signes d'apoptose lors de la culture en présence de G5 et de G30 que les îlots de rat. En effet, comme démontré dans ma troisième étude, la culture en présence de 5 mmol/l de glucose n'augmente pas l'apoptose des cellules des îlots de souris alors qu'elle augmente bien l'apoptose des cellules d'îlots de rat. De plus, alors qu'une semaine de culture en présence de G30 provoque des altérations de la fonction des cellules β , une augmentation du nombre de cellules β apoptotiques et une augmentation de l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif (*Mt1a*, *Hmox1* et *c-Myc*) dans les îlots de rat, il est nécessaire de cultiver les îlots de souris pendant trois semaines pour observer ces effets délétères (Pascal et al., 2010). Ces différences observées concernant la culture en présence de G30 pourraient être expliquées par l'absence d'hypoxie dans les îlots de souris. En effet, alors que l'expression des gènes cibles de HIF et la formation d'adduits pimonidazole-protéines, un marqueur de l'hypoxie, sont augmentés dans des îlots de rat après 18h de culture en présence de G30 et de 20% d' O_2 (Bensellam et al., 2012a), il est nécessaire de diminuer le pourcentage d'oxygène à 10% pour observer des signes d'hypoxie dans des

îlots de souris (Sato et al., 2011). L'hypoxie pouvant entraîner une activation du stress oxydatif comme le montre l'augmentation d'expression des gènes *Mt1a* et *Hmox1* (Jonas et al., 2009), ceci pourrait expliquer l'absence de glucotoxicité lors de la culture d'îlots de souris pendant une semaine en G30 et à 20% d'O₂.

Afin d'essayer de comprendre au mieux les différences observées en terme de stress oxydatif entre les îlots de rat et de souris, j'ai comparé les mesures d'oxydation de la sonde mt-roGFP1 après culture en G10 de clusters de cellules issues d'îlots de ces deux espèces (voir figure 41). Comme vous pouvez le constater, l'oxydation des thiols mitochondriaux après culture en présence de G10 est supérieure dans les cellules de souris comparée à celle mesurée dans les cellules de rat. Le fait que je n'observe pas d'augmentation de l'oxydation des thiols mitochondriaux après culture de cellule β de souris en présence de G2 pourrait provenir du fait que l'oxydation est déjà relativement importante dans la condition contrôle. Néanmoins, comme déjà discuté précédemment, cette augmentation de l'oxydation de la sonde dans les îlots de souris cultivés en présence de G10 par rapport aux îlots de rat pourrait refléter des divergences entre les deux espèces en ce qui concerne le contenu en glutathion total. La mesure de l'oxydation de la mt-roGFP1 s'effectuant dans la mitochondrie, les mécanismes de transport du glutathion du cytosol vers la mitochondrie pourraient également différer d'une espèce à l'autre et expliquer ce résultat. De plus, comme déjà abordé, la disponibilité en GRX influence l'oxydation de la sonde mt-roGFP1 et pourrait être à l'origine des différences observées à la figure 41.

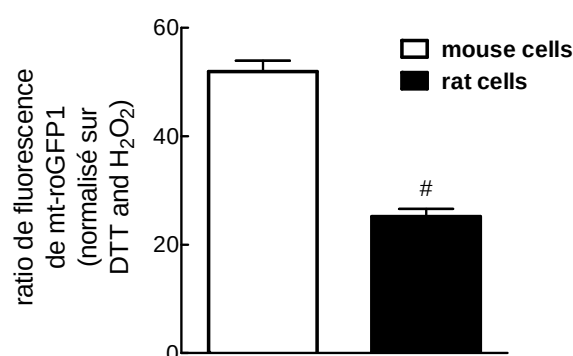


Figure 41. Comparaison de l'oxydation de la sonde mt-roGFP1 dans des cellules β de souris et de rat. Des clusters de cellules d'îlots de souris 129S1/SvImJ ou d'îlots de rat ont été cultivés pendant 18 à 24h en présence de G10. Le ratio de fluorescence de la sonde mt-roGFP1 a ensuite été mesuré et normalisé comme expliqué à la figure 36. n=3 ; # ; différence statistiquement significative par rapport aux cellules d'îlots de souris ; test ANOVA à une voie suivi d'un post test de Newman Keuls (Duprez et al., 2012), (Jessica Duprez, résultats non publiés).

Si l'on considère que ce résultat démontre une augmentation du stress oxydatif mitochondrial dans les cellules β de souris par rapport à celles de rat en condition contrôle, on pourrait imaginer que, dans cette condition, les défenses antioxydantes de la cellule β de souris sont plus faibles que celles de la cellule β de rat. Dans ce cadre, il serait intéressant d'étudier de manière plus approfondie le statut des défenses antioxydantes dans la cellule β de rat et de souris en mesurant, par exemple, l'expression et l'activité de diverses enzymes antioxydantes ou encore la réduction du GSH ou du NADPH. Dans ce contexte, Welsh et al.

ont montré que l'addition de 100-200 μM de H_2O_2 dans le milieu de culture d'îlots de rat et de souris entraîne une diminution plus importante du GSH dans les îlots de souris (60 à 70%) que dans les îlots de rat (20 à 30%). De plus, l'activité de la SOD et de la catalase lors de la culture d'îlots en présence de 11,1 mmol/l de glucose est plus faible dans les îlots de souris que dans ceux de rat (Welsh et al., 1995). Les îlots de souris possèdent donc un niveau plus faible de défenses antioxydantes classiques. Cependant, il serait intéressant d'évaluer si d'autres systèmes de défenses antioxydantes (PRX, TRX, GRX,...) permettent de compenser cette diminution des défenses antioxydantes classiques.

Il a également été démontré que les îlots de souris sont dépourvus d'enzyme malique (MacDonald, 2002). Cette enzyme est impliquée dans la navette pyruvate/malate et entraîne la production de NADPH dans le cytosol (MacDonald, 1995). Cette production est relativement importante au niveau de la cellule β car, dans cette dernière, la voie des pentoses phosphates, génératrice de NADPH, est peu présente. On pourrait donc imaginer que la production de NADPH est moindre dans la cellule β de souris comparée à celle de rat, diminuant ainsi les défenses antioxydantes de la cellule en condition contrôle. Cependant, d'autres voies pourraient permettre d'augmenter le NADPH dans le cytosol (isocitrate déshydrogénase, glucose-6-phosphate déshydrogénase, voie de l'isocitrate) et aucune étude ne démontre une différence de production de NADPH dans les cellules β de souris par rapport à celles de rat. De plus, la production de NADPH par l'enzyme malique est cytosolique alors que les mesures effectuées dans mes expériences se situent dans la matrice mitochondriale.

Etant donné le peu d'informations disponibles dans la littérature, il est difficile d'expliquer les différences observées entre les îlots de souris et de rat et je n'ai pu qu'imaginer quelques hypothèses.

Le stress oxydatif est-il le seul acteur responsable des modifications de survie des cellules β observées en présence d'une concentration faible de glucose ?

Alors que l'augmentation de l'oxydation des thiols mitochondriaux a été confirmée dans les cellules β de rat après culture en présence de G5, ce phénomène n'a pas été observé dans les cellules β de souris même après culture en présence de G2 (troisième étude). Le type de stress impliqué dans ces deux situations pourrait donc différer. En effet, alors que la culture en G2 se rapproche d'une situation de privation en glucose, la culture en G5 provoque juste une diminution du métabolisme du glucose dans la cellule β .

Dans ce contexte, la privation en glucose est associée à une phosphorylation du facteur général d'initiation de la traduction eIF2 α (eukaryotic initiation factor α) comme classiquement observé dans la réponse ISR. Il en résulte une inhibition générale de la traduction protéique et une augmentation, un peu paradoxale, de la traduction de l'ARNm du facteur de transcription *Atf4* (Lu et al., 2004; Vattem & Wek, 2004). Ce dernier augmente l'expression des gènes proapoptotiques *Chop* et *Atf3*.

Lors d'une étude précédente, j'ai étudié le rôle de l'augmentation d'expression d'*Atf3* par la culture d'îlots de souris en présence de G2. Dans des îlots de souris KO pour le gène *Atf3*, l'induction de l'apoptose par la culture en présence de G2 était diminuée. J'ai donc

conclu que l'induction d'*Atf3* par la culture en présence de G2 contribue légèrement à la stimulation de l'apoptose dans cette condition (Duprez & Jonas, 2011). Ceci signifie donc que les effets délétères provoqués par la culture en présence de G2 dans des îlots de souris pourraient faire intervenir en partie la réponse ISR plutôt que le stress oxydatif. Cette hypothèse est soutenue par les résultats obtenus lors de ma troisième étude démontrant que l'inactivation des protéines antioxydantes *Mt1/2* n'altère pas l'apoptose observée dans cette condition.

Cependant, la réponse ISR et le stress oxydatif semblent liés. En effet, il a été démontré que des cellules déficientes en *Atf4*, gène en amont d'*Atf3* dans la voie ISR, accumulent des quantités importantes de ROS (Harding et al., 2003). De plus, nous avons démontré que l'induction du stress du RE et de l'ISR par la thapsigargine entraînait une augmentation de l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif (Jonas et al., 2009). C'est pourquoi j'avais mesuré les effets de la délétion d'*Atf3* sur l'expression de *Mt1* dans des îlots de souris. Après 18h de culture en présence de G2, l'expression de *Mt1* était augmentée dans les îlots de souris dont le gène *Atf3* a été inactivé, ce qui pourrait refléter la présence d'un stress oxydatif plus intense dans ces îlots sans pour autant déterminer si cette augmentation d'expression aurait un effet protecteur ou non (Duprez J., résultats non publiés).

Afin d'approfondir la recherche d'un lien possible entre l'ISR et le stress oxydatif, il serait néanmoins intéressant de tester l'effet de l'inactivation des *Mt1/2* sur l'apoptose des cellules β de souris provoquée par un inducteur du stress du RE.

Le stress oxydatif est-il le seul acteur responsable des modifications de survie des cellules β observées en présence d'une concentration élevée de glucose ?

Comme évoqué précédemment, l'implication du stress oxydatif dans les altérations de survie des cellules β observées après culture en présence de G30 pourrait être remise en question. En effet, alors que les antioxydants MnTBAP et NAC inhibent totalement l'oxydation des thiols mitochondriaux, ils ne permettent pas de rétablir la survie lors de la culture en présence de G30. De plus, alors que le Zn^{2+} inhibe partiellement l'apoptose des cellules β provoquée par la culture en présence de G30, il ne diminue que légèrement l'oxydation des thiols mitochondriaux.

Ces résultats suggèrent l'implication d'autres types de stress dans l'apoptose des cellules β de rat provoquée par la culture en présence de G30. Dans ce contexte, j'ai eu l'opportunité, lors de ma thèse, de contribuer à une étude s'intéressant à l'effet des lipoprotéines de haute densité (HDLs pour high-density lipoproteins) dans l'apoptose des cellules β soumises à un stress du RE. Nos résultats ont déterminé que l'addition de HDLs au milieu de culture d'îlots de rat inhibait totalement l'apoptose induite par l'inducteur du stress du RE, la thapsigargine ou par la culture en présence de G30. Cette inhibition est attribuée à une amélioration du trafic des protéines du RE vers le golgi et à une amélioration du repliement des protéines au sein du RE (Petremand et al., 2012). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que le stress du RE plutôt que le stress oxydatif, pourrait être responsable de l'apoptose des cellules d'îlots de rat observée en présence d'une concentration élevée de glucose.

De plus, l'augmentation de la concentration de glucose pourrait provoquer des phénomènes hypoxiques dans la cellule β . Dans une étude réalisée au laboratoire, il a été démontré que la culture en présence de G30 vs. G5 provoque de l'hypoxie ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes cible de HIF dans les cellules β d'îlots de rat ou dans des INS-1E. Il a également été démontré que, dans une moindre mesure, les îlots de souris diabétiques db/db présentaient des signes d'hypoxie par rapport aux îlots de souris contrôles (Bensellam et al., 2012a). L'hypoxie est donc également un stress à prendre en considération dans les altérations des cellules β provoquées par les concentrations élevées de glucose.

Ceci m'amène à la dernière question abordée dans cette discussion :

Quelle est la situation *in vivo*, chez un patient diabétique ?

La réponse à cette question ne pourra bien évidemment pas être complète étant donné qu'elle fait l'objet de nombreuses recherches actuelles. Cependant, je vais aborder brièvement ici quelques données disponibles et déjà évoquées dans l'introduction.

Différents arguments plaident pour un rôle du stress du RE dans l'apoptose des cellules β observée chez les patients diabétiques. En effet, il avait été démontré que des îlots de patients diabétiques présentaient une augmentation des marqueurs de stress du RE ou une sensibilité plus importante à présenter des signes majeurs d'activation de la réponse UPR lors de la culture en présence d'une concentration élevée de glucose que les îlots de patients non diabétiques (Marchetti et al., 2007; Laybutt et al., 2007; Huang et al., 2007). Cependant, une autre étude ne montrait que peu de modification d'expression des ARNm de la réponse UPR dans des îlots microdissequés sur coupes congelées de pancréas de patients diabétiques (Marselli et al., 2010). Le rôle de l'hypoxie dans le DT2 est controversé. Des auteurs décrivent une diminution de l'expression de régulateurs de la réponse à l'hypoxie dans des îlots de patients diabétiques, ce qui provoquerait la diminution de l'expression de nombreux gènes importants pour la fonction des cellules β (Gunton et al., 2005). Cependant, ces observations n'ont pas été confirmées par d'autres (Marselli et al., 2010). Il a également été montré que les îlots de patients diabétiques présentent une augmentation de marqueurs d'un stress oxydatif (nitrotyrosine, 8-OHdG, HNE) (Sakuraba et al., 2002; Marchetti et al., 2004; Del Guerra et al., 2005). De plus, l'expression de la SOD semble diminuée (Sakuraba et al., 2002) alors que l'expression de la catalase et de la GPX est augmentée (Marchetti et al., 2004) signant une tentative de détoxification du H_2O_2 .

Il semblerait donc que les altérations phénotypiques observées dans les cellules β de patients diabétiques pourraient être le résultat de l'activation de ces différents stress qui pourraient être liés l'un à l'autre. Les résultats obtenus lors de ma thèse, basés sur des modèles *in vitro*, m'incitent également à penser que je ne peux considérer l'implication d'un seul stress dans les altérations observées mais qu'il est important d'intégrer les différents stress évoqués. Il est également difficile de dire à ce stade si les altérations phénotypiques observées dans les cellules β de patients diabétiques résultent de la présence d'une concentration élevée de glucose dans le sang ou d'une diminution du métabolisme du glucose.

CONCLUSIONS

Les travaux de ma thèse ont permis de faire un petit pas dans la compréhension de la régulation de l'équilibre redox par le glucose dans les cellules β . Toutes les différences observées nous invitent à approfondir davantage les recherches dans ce domaine avec, toujours comme but final, une compréhension plus pointue de la cellule β , ce qui permettra peut-être la découverte de nouveaux traitements pour le DT2.

En conclusion, lors de ces quatre années de recherche, nous avons mis au point une méthode de mesure de l'état redox de la mitochondrie à l'aide de la sonde mt-roGFP1. Cette sonde mesure plus précisément l'oxydation du glutathion dans la mitochondrie et est actuellement utilisée en routine au laboratoire. A l'aide de cette sonde, j'ai démontré que dans des cellules β de rat cultivées en présence de concentrations croissantes de glucose, l'oxydation du glutathion mitochondrial suit un profil en V asymétrique semblable à ceux de l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif, de l'apoptose et des altérations de fonction. Dans ma deuxième étude, j'ai pu déterminer que le Zn^{2+} a un effet protecteur contre l'apoptose et l'oxydation de la sonde mt-roGFP1 des cellules β de rat provoqués par la culture en présence de concentrations extrêmes de glucose sans pour autant améliorer leur fonction. Dans ma troisième étude, j'ai démontré que, dans des îlots de souris, l'induction des *Mt1/2* par la culture en présence d'une concentration faible de glucose n'a pas d'effet protecteur contre l'apoptose observée dans cette condition. Le rôle des MT1/2 dans les effets protecteurs du Zn^{2+} n'a cependant pas pu être déterminé à l'aide des souris dont les gènes *Mt1/2* ont été inactivés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahren, B. (2005) Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass. *Curr.Mol.Med.* 5, 275-286
- Alarcon, C., Lincoln, B., & Rhodes, C. J. (1993) The biosynthesis of the subtilisin-related proprotein convertase PC3, but not that of the PC2 convertase, is regulated by glucose in parallel to proinsulin biosynthesis in rat pancreatic islets. *J.Biol.Chem.* 268, 4276-4280
- Alonso, L. C., Yokoe, T., Zhang, P., Scott, D. K., Kim, S. K., O'Donnell, C. P., & Garcia-Ocana, A. (2007) Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication. *Diabetes* 56, 1792-1801
- Andrali, S. S., Sampley, M. L., Vanderford, N. L., & Ozcan, S. (2008) Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochem.J.* 415, 1-10
- Andrews, G. K. (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem.Pharmacol.* 59, 95-104
- Andrews, G. K. (2001) Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Biometals* 14, 223-237
- Apostolova, M. D., Choo, K. H., Michalska, A. E., & Tohyama, C. (1997) Analysis of the possible protective role of metallothionein in streptozotocin-induced diabetes using metallothionein-null mice. *J.Trace Elem.Med.Biol.* 11, 1-7
- Aramata, S., Han, S. I., Yasuda, K., & Kataoka, K. (2005) Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1. *Biochim.Biophys.Acta* 1730, 41-46
- Barth, E., Albuszies, G., Baumgart, K., Matejovic, M., Wachter, U., Vogt, J., Radermacher, P., & Calzia, E. (2007) Glucose metabolism and catecholamines. *Crit Care Med.* 35, S508-S518
- Bast, A., Wolf, G., Oberbaumer, I., & Walther, R. (2002) Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 45, 867-876
- Bauer, M. K., Vogt, M., Los, M., Siegel, J., Wesselborg, S., & Schulze-Osthoff, K. (1998) Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. *J.Biol.Chem.* 273, 8048-8055
- Beattie, J. H., Wood, A. M., Newman, A. M., Bremner, I., Choo, K. H., Michalska, A. E., Duncan, J. S., & Trayhurn, P. (1998) Obesity and hyperleptinemia in metallothionein (-I and -II) null mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 358-363
- Begin-Heick, N., Dalpe-Scott, M., Rowe, J., & Heick, H. M. (1985) Zinc supplementation attenuates insulin secretory activity in pancreatic islets of the ob/ob mouse. *Diabetes* 34, 179-184
- Bell, S. G. & Vallee, B. L. (2009) The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *Chembiochem.* 10, 55-62

- Bellomo, E. A., Meur, G., & Rutter, G. A. (2011) Glucose regulates free cytosolic Zn^{2+} concentration, Slc39 (ZiP), and metallothionein gene expression in primary pancreatic islet beta-cells. *J.Biol.Chem.* 286, 25778-25789
- Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V., & Lukyanov, S. (2006) Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat.Methods* 3, 281-286
- Benhamou, P. Y., Moriscot, C., Richard, M. J., Beatrix, O., Badet, L., Pattou, F., Kerr-Conte, J., Chroboczek, J., Lemarchand, P., & Halimi, S. (1998) Adenovirus-mediated catalase gene transfer reduces oxidant stress in human, porcine and rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41, 1093-1100
- Bensellam, M., Duvillie, B., Rybachuk, G., Laybutt, D. R., Magnan, C., Guiot, Y., Pouyssegur, J., & Jonas, J. C. (2012a) Glucose-induced O_2 consumption activates hypoxia inducible factors 1 and 2 in rat insulin-secreting pancreatic beta-cells. *PLoS.One.* 7, e29807
- Bensellam, M., Laybutt, D. R., & Jonas, J. C. (2012b) The molecular mechanisms of pancreatic beta-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol.Cell Endocrinol.* 364, 1-27
- Bensellam, M., Van, L. L., Overbergh, L., Schuit, F. C., & Jonas, J. C. (2009) Cluster analysis of rat pancreatic islet gene mRNA levels after culture in low-, intermediate- and high-glucose concentrations. *Diabetologia* 52, 463-476
- Bernard, C., Berthault, M. F., Saulnier, C., & Ktorza, A. (1999) Neogenesis vs. apoptosis As main components of pancreatic beta cell changes in glucose-infused normal and mildly diabetic adult rats. *FASEB J.* 13, 1195-1205
- Bernard-Kargar, C. & Ktorza, A. (2001) Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. *Diabetes* 50 Suppl 1, S30-S35
- Bindokas, V. P., Kuznetsov, A., Sreenan, S., Polonsky, K. S., Roe, M. W., & Philipson, L. H. (2003) Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J.Biol.Chem.* 278, 9796-9801
- Blume, N., Skouv, J., Larsson, L. I., Holst, J. J., & Madsen, O. D. (1995) Potent inhibitory effects of transplantable rat glucagonomas and insulinomas on the respective endogenous islet cells are associated with pancreatic apoptosis. *J.Clin.Invest* 96, 2227-2235
- Bolea, S., Pertusa, J. A., Martin, F., Sanchez-Andres, J. V., & Soria, B. (1997) Regulation of pancreatic beta-cell electrical activity and insulin release by physiological amino acid concentrations. *Pflugers Arch.* 433, 699-704
- Bolkent, S., Yanardag, R., Bolkent, S., & Mutlu, O. (2009) The influence of zinc supplementation on the pancreas of streptozotocin-diabetic rats. *Dig.Dis.Sci.* 54, 2583-2587
- Bonner-Weir, S., Deery, D., Leahy, J. L., & Weir, G. C. (1989) Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 38, 49-53

- Boschero, A. C., Stoppiglia, L. F., Collares-Buzato, C. B., Bosqueiro, J. R., Delghingaro-Augusto, V., Leite, A., Carvalho, C. P., Netto, L. E., & Carneiro, E. M. (2002) Expression of a thioredoxin peroxidase in insulin-producing cells. *Diabetes Metab* 28, 3S25-3S28
- Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y. D., Giovannoni, L., Parnaud, G., & Berney, T. (2010) Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* 59, 1202-1210
- Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820
- Brownlee, M. (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625
- Buchwald, P. (2011) A local glucose-and oxygen concentration-based insulin secretion model for pancreatic islets. *Theor.Biol.Med.Model.* 8, 20
- Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102-110
- Cabaner, C., Gajate, C., Macho, A., Munoz, E., Modolell, M., & Mollinedo, F. (1999) Induction of apoptosis in human mitogen-activated peripheral blood T-lymphocytes by the ether phospholipid ET-18-OCH₃: involvement of the Fas receptor/ligand system. *Br.J.Pharmacol.* 127, 813-825
- Cai, L. (2004) Metallothionein as an adaptive protein prevents diabetes and its toxicity. *Nonlinearity.Biol.Toxicol.Med.* 2, 89-103
- Cai, Y., Martens, G. A., Hinke, S. A., Heimberg, H., Pipeleers, D., & Van de Casteele, M. (2007) Increased oxygen radical formation and mitochondrial dysfunction mediate beta cell apoptosis under conditions of AMP-activated protein kinase stimulation. *Free Radic.Biol.Med.* 42, 64-78
- Cannon, M. B. & Remington, S. J. (2006) Re-engineering redox-sensitive green fluorescent protein for improved response rate. *Protein Sci.* 15, 45-57
- Capdor, J., Foster, M., Petocz, P., & Samman, S. (2012) Zinc and glycemic control: A meta-analysis of randomised placebo controlled supplementation trials in humans. *J.Trace Elem.Med.Biol.*
- Chandra, J., Samali, A., & Orrenius, S. (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.* 29, 323-333
- Chasapis, C. T., Loutsidou, A. C., Spiliopoulou, C. A., & Stefanidou, M. E. (2012) Zinc and human health: an update. *Arch.Toxicol.* 86, 521-534
- Chausmer, A. B. (1998) Zinc, insulin and diabetes. *J.Am.Coll.Nutr.* 17, 109-115
- Chen, H., Carlson, E. C., Pellet, L., Moritz, J. T., & Epstein, P. N. (2001) Overexpression of metallothionein in pancreatic beta-cells reduces streptozotocin-induced DNA damage and diabetes. *Diabetes* 50, 2040-2046

- Chen, J., Saxena, G., Mungrue, I. N., Lusis, A. J., & Shalev, A. (2008) Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes* 57, 938-944
- Chen, Z. F., Li, Y. B., Han, J. Y., Wang, J., Yin, J. J., Li, J. B., & Tian, H. (2011) The double-edged effect of autophagy in pancreatic beta cells and diabetes. *Autophagy*. 7, 12-16
- Chen, Z. F., Li, Y. B., Han, J. Y., Yin, J. J., Wang, Y., Zhu, L. B., & Xie, G. Y. (2013) Liraglutide prevents high glucose level induced insulinoma cells apoptosis by targeting autophagy. *Chin Med.J.(Engl.)* 126, 937-941
- Chimienti, F. (2013) Zinc, pancreatic islet cell function and diabetes: new insights into an old story. *Nutr.Res.Rev.* 1-11
- Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A., & Seve, M. (2004) Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 53, 2330-2337
- Chimienti, F., Devergnas, S., Pattou, F., Schuit, F., Garcia-Cuenca, R., Vandewalle, B., Kerr-Conte, J., Van, L. L., Grunwald, D., Favier, A., & Seve, M. (2006) In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J.Cell Sci.* 119, 4199-4206
- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., & Ryu, S. E. (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* 105, 103-113
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J. C., Jorns, A., Lenzen, S., & Eizirik, D. L. (2005) Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2, S97-107
- De Lisle, R. C., Sarras, M. P., Jr., Hidalgo, J., & Andrews, G. K. (1996) Metallothionein is a component of exocrine pancreas secretion: implications for zinc homeostasis. *Am.J.Physiol* 271, C1103-C1110
- De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D., & Schuit, F. (1995) Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J.Clin.Invest* 96, 2489-2495
- Del Guerra, S., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Bugliani, M., Sbrana, S., Torri, S., Pollera, M., Boggi, U., Mosca, F., Del, P. S., & Marchetti, P. (2005) Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 727-735
- Del Prato S., Wishner, W. J., Gromada, J., & Schluchter, B. J. (2004) Beta-cell mass plasticity in type 2 diabetes. *Diabetes Obes.Metab* 6, 319-331
- Detimary, P., Gilon, P., & Henquin, J. C. (1998) Interplay between cytoplasmic Ca^{2+} and the ATP/ADP ratio: a feedback control mechanism in mouse pancreatic islets. *Biochem.J.* 333 (Pt 2), 269-274
- Detimary, P., Van den Berghe, G., & Henquin, J. C. (1996) Concentration dependence and time course of the effects of glucose on adenine and guanine nucleotides in mouse pancreatic islets. *J.Biol.Chem.* 271, 20559-20565

- Docherty, H. M., Hay, C. W., Ferguson, L. A., Barrow, J., Durward, E., & Docherty, K. (2005) Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter. *Biochem.J.* 389, 813-820
- Docherty, K. & Clark, A. R. (1994) Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB J.* 8, 20-27
- Dodson, G. & Steiner, D. (1998) The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 8, 189-194
- Doliba, N. M., Qin, W., Najafi, H., Liu, C., Buettger, C. W., Sotiris, J., Collins, H. W., Li, C., Stanley, C. A., Wilson, D. F., Grimsby, J., Sarabu, R., Naji, A., & Matschinsky, F. M. (2012) Glucokinase activation repairs defective bioenergetics of islets of Langerhans isolated from type 2 diabetics. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 302, E87-E102
- Donath, M. Y. & Shoelson, S. E. (2011) Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat.Rev.Immunol.* 11, 98-107
- Dooley, C. T., Dore, T. M., Hanson, G. T., Jackson, W. C., Remington, S. J., & Tsien, R. Y. (2004) Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J.Biol.Chem.* 279, 22284-22293
- Duprez, J. & Jonas, J. C. (2011) Role of activating transcription factor 3 in low glucose- and thapsigargin-induced apoptosis in cultured mouse islets. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 415, 294-299
- Duprez, J., Roma, L. P., Close, A. F., & Jonas, J. C. (2012) Protective antioxidant and antiapoptotic effects of ZnCl₂ in rat pancreatic islets cultured in low and high glucose concentrations. *PLoS.One.* 7, e46831
- Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., Kawamori, R., Fujitani, Y., & Watada, H. (2008) Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab* 8, 325-332
- Efanova, I. B., Zaitsev, S. V., Zhivotovsky, B., Kohler, M., Efendic, S., Orrenius, S., & Berggren, P. O. (1998) Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular Ca²⁺ concentration. *J.Biol.Chem.* 273, 33501-33507
- Egefjord, L., Jensen, J. L., Bang-Berthelsen, C. H., Petersen, A. B., Smidt, K., Schmitz, O., Karlsen, A. E., Pociot, F., Chimienti, F., Rungby, J., & Magnusson, N. E. (2009) Zinc transporter gene expression is regulated by pro-inflammatory cytokines: a potential role for zinc transporters in beta-cell apoptosis? *BMC.Endocr.Disord.* 9, 7
- Eide, D. J. (2004) The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch.* 447, 796-800
- Eide, D. J. (2011) The oxidative stress of zinc deficiency. *Metallomics.* 3, 1124-1129
- Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., & Cnop, M. (2008) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr.Rev.* 29, 42-61

- Eizirik, D. L., Korbitt, G. S., & Hellerstrom, C. (1992) Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations in vitro impairs the beta-cell function. *J.Clin.Invest* 90, 1263-1268
- Eizirik, D. L., Pipeleers, D. G., Ling, Z., Welsh, N., Hellerstrom, C., & Andersson, A. (1994) Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 9253-9256
- El, M. M., Billings, L. K., Raja, M. R., Zhang, X., Park, P. J., Newman, M. V., Kaufman, D. B., O'Halloran, T. V., & Lowe, W. L., Jr. (2010) Acute cytokine-mediated downregulation of the zinc transporter ZnT8 alters pancreatic beta-cell function. *J.Endocrinol.* 206, 159-169
- Elouil, H., Bensellam, M., Guiot, Y., Vander, M. D., Pascal, S. M., Schuit, F. C., & Jonas, J. C. (2007) Acute nutrient regulation of the unfolded protein response and integrated stress response in cultured rat pancreatic islets. *Diabetologia* 50, 1442-1452
- Elouil, H., Cardozo, A. K., Eizirik, D. L., Henquin, J. C., & Jonas, J. C. (2005) High glucose and hydrogen peroxide increase c-Myc and haeme-oxygenase 1 mRNA levels in rat pancreatic islets without activating NFkappaB. *Diabetologia* 48, 496-505
- Emdin, S. O., Dodson, G. G., Cutfield, J. M., & Cutfield, S. M. (1980) Role of zinc in insulin biosynthesis. Some possible zinc-insulin interactions in the pancreatic β -cell. *Diabetologia* 19, 174-182
- Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Sugiyama, T., Kishimoto, T., Takahashi, N., Yamauchi, N., Kubota, N., Murayama, S., Aizawa, T., Akanuma, Y., Aizawa, S., Kasai, H., Yazaki, Y., & Kadowaki, T. (1999) Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 283, 981-985
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr.Rev.* 23, 599-622
- Evans-Molina, C., Garmey, J. C., Ketchum, R., Brayman, K. L., Deng, S., & Mirmira, R. G. (2007) Glucose regulation of insulin gene transcription and pre-mRNA processing in human islets. *Diabetes* 56, 827-835
- Faure, P., Benhamou, P. Y., Perard, A., Halimi, S., & Roussel, A. M. (1995) Lipid peroxidation in insulin-dependent diabetic patients with early retina degenerative lesions: effects of an oral zinc supplementation. *Eur.J.Clin.Nutr.* 49, 282-288
- Feng, W., Wang, Y., Cai, L., & Kang, Y. J. (2007) Metallothionein rescues hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity in cardiomyocytes under diabetic conditions. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 360, 286-289
- Ferrer, J., Benito, C., & Gomis, R. (1995) Pancreatic islet GLUT2 glucose transporter mRNA and protein expression in humans with and without NIDDM. *Diabetes* 44, 1369-1374
- Ferrer, R., Soria, B., Dawson, C. M., Atwater, I., & Rojas, E. (1984) Effects of Zn^{2+} on glucose-induced electrical activity and insulin release from mouse pancreatic islets. *Am.J.Physiol* 246, C520-C527

- Figlewicz, D. P., Heldt, A., Forhan, S. E., & Grodsky, G. M. (1981) Effect of exogenous zinc on insulin secretion in vitro. *Endocrinology* 108, 730-732
- Fischer, E. H. & Davie, E. W. (1998) Recent excitement regarding metallothionein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 3333-3334
- Flamez, D., Berger, V., Kruhoffer, M., Orntoft, T., Pipeleers, D., & Schuit, F. C. (2002) Critical role for cataplerosis via citrate in glucose-regulated insulin release. *Diabetes* 51, 2018-2024
- Formigari, A., Irato, P., & Santon, A. (2007) Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol.* 146, 443-459
- Garcia, J., Han, D., Sancheti, H., Yap, L. P., Kaplowitz, N., & Cadenas, E. (2010) Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates. *J.Biol.Chem.* 285, 39646-39654
- Gehrmann, W., Elsner, M., & Lenzen, S. (2010) Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Diabetes Obes.Metab* 12 Suppl 2, 149-158
- Gembal, M., Detimary, P., Gilon, P., Gao, Z. Y., & Henquin, J. C. (1993) Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K^+ channels in mouse β cells. *J.Clin.Invest* 91, 871-880
- Gembal, M., Gilon, P., & Henquin, J. C. (1992) Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K^+ channels in mouse B cells. *J.Clin.Invest* 89, 1288-1295
- Ghafghazi, T., McDaniel, M. L., & Lacy, P. E. (1981) Zinc-induced inhibition of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 30, 341-345
- Ghiselli, A., Laurenti, O., De, M. G., Maiani, G., & Ferro-Luzzi, A. (1992) Salicylate hydroxylation as an early marker of in vivo oxidative stress in diabetic patients. *Free Radic.Biol.Med.* 13, 621-626
- Ghoshal, K. & Jacob, S. T. (2001) Regulation of metallothionein gene expression. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 66, 357-384
- Giacconi, R., Bonfigli, A. R., Testa, R., Sirolla, C., Cipriano, C., Marra, M., Muti, E., Malavolta, M., Costarelli, L., Piacenza, F., Tesei, S., & Mocchegiani, E. (2008) +647 A/C and +1245 MT1A polymorphisms in the susceptibility of diabetes mellitus and cardiovascular complications. *Mol.Genet.Metab* 94, 98-104
- Giacconi, R., Cipriano, C., Muti, E., Costarelli, L., Maurizio, C., Saba, V., Gasparini, N., Malavolta, M., & Mocchegiani, E. (2005) Novel -209A/G MT2A polymorphism in old patients with type 2 diabetes and atherosclerosis: relationship with inflammation (IL-6) and zinc. *Biogerontology.* 6, 407-413
- Gilon, P. & Henquin, J. C. (2001) Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr.Rev.* 22, 565-604

- Giurgea, I., Bellanne-Chantelot, C., Ribeiro, M., Hubert, L., Sempoux, C., Robert, J. J., Blankenstein, O., Hussain, K., Brunelle, F., Nihoul-Fekete, C., Rahier, J., Jaubert, F., & de, L. P. (2006) Molecular mechanisms of neonatal hyperinsulinism. *Horm.Res.* 66, 289-296
- Glauser, D. A., Brun, T., Gauthier, B. R., & Schlegel, W. (2007) Transcriptional response of pancreatic beta cells to metabolic stimulation: large scale identification of immediate-early and secondary response genes. *BMC.Mol.Biol.* 8, 54
- Godoy, J. R., Funke, M., Ackermann, W., Haunhorst, P., Oesteritz, S., Capani, F., Elsasser, H. P., & Lillig, C. H. (2011) Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse. *Biochim.Biophys.Acta* 1810, 2-92
- Golbidi, S., Ebadi, S. A., & Laher, I. (2011) Antioxidants in the treatment of diabetes. *Curr.Diabetes Rev.* 7, 106-125
- Gopaul, N. K., Anggard, E. E., Mallet, A. I., Betteridge, D. J., Wolff, S. P., & Nourooz-Zadeh, J. (1995) Plasma 8-epi-PGF_{2α} levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 368, 225-229
- Gravena, C., Mathias, P. C., & Ashcroft, S. J. (2002) Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *J.Endocrinol.* 173, 73-80
- Gray, J. P. & Heart, E. (2010) Usurping the mitochondrial supremacy: extramitochondrial sources of reactive oxygen intermediates and their role in beta cell metabolism and insulin secretion. *Toxicol.Mech.Methods* 20, 167-174
- Green, K., Brand, M. D., & Murphy, M. P. (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1, S110-S118
- Greenman, I. C., Gomez, E., Moore, C. E., & Herbert, T. P. (2005) The selective recruitment of mRNA to the ER and an increase in initiation are important for glucose-stimulated proinsulin synthesis in pancreatic beta-cells. *Biochem.J.* 391, 291-300
- Grodsky, G. M. (1989) A new phase of insulin secretion. How will it contribute to our understanding of beta-cell function? *Diabetes* 38, 673-678
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M. L., & Eide, D. (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 7220-7224
- Guettier, J. M. & Gorden, P. (2010) Insulin secretion and insulin-producing tumors. *Expert.Rev.Endocrinol.Metab* 5, 217-227
- Guichard, C., Moreau, R., Pessayre, D., Epperson, T. K., & Krause, K. H. (2008) NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? *Biochem.Soc.Trans.* 36, 920-929
- Gunton, J. E., Kulkarni, R. N., Yim, S., Okada, T., Hawthorne, W. J., Tseng, Y. H., Roberson, R. S., Ricordi, C., O'Connell, P. J., Gonzalez, F. J., & Kahn, C. R. (2005) Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 122, 337-349

- Gutscher, M., Pauleau, A. L., Marty, L., Brach, T., Wabnitz, G. H., Samstag, Y., Meyer, A. J., & Dick, T. P. (2008) Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat.Methods* 5, 553-559
- Hamaoka, R., Fujii, J., Miyagawa, J., Takahashi, M., Kishimoto, M., Moriwaki, M., Yamamoto, K., Kajimoto, Y., Yamasaki, Y., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., & Taniguchi, N. (1999) Overexpression of the aldose reductase gene induces apoptosis in pancreatic beta-cells by causing a redox imbalance. *J.Biochem.* 126, 41-47
- Hamatake, M., Iguchi, K., Hirano, K., & Ishida, R. (2000) Zinc induces mixed types of cell death, necrosis, and apoptosis, in molt-4 cells. *J.Biochem.* 128, 933-939
- Hanson, G. T., Aggeler, R., Oglesbee, D., Cannon, M., Capaldi, R. A., Tsien, R. Y., & Remington, S. J. (2004) Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J.Biol.Chem.* 279, 13044-13053
- Haq, F., Mahoney, M., & Koropatnick, J. (2003) Signaling events for metallothionein induction. *Mutat.Res.* 533, 211-226
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M., & Ron, D. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol.Cell* 11, 619-633
- Hardy, A. B., Serino, A. S., Wijesekara, N., Chimienti, F., & Wheeler, M. B. (2011) Regulation of glucagon secretion by zinc: lessons from the beta cell-specific Znt8 knockout mouse model. *Diabetes Obes.Metab* 13 Suppl 1, 112-117
- Hardy, A. B., Wijesekara, N., Genkin, I., Prentice, K. J., Bhattacharjee, A., Kong, D., Chimienti, F., & Wheeler, M. B. (2012) Effects of high-fat diet feeding on Znt8-null mice: differences between beta-cell and global knockout of Znt8. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 302, E1084-E1096
- Harmon, J. S., Gleason, C. E., Tanaka, Y., Oseid, E. A., Hunter-Berger, K. K., & Robertson, R. P. (1999) In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression. *Diabetes* 48, 1995-2000
- Harmon, J. S., Gleason, C. E., Tanaka, Y., Poitout, V., & Robertson, R. P. (2001) Antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content and decreased insulin gene mRNA level in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 50, 2481-2486
- Harmon, J. S., Stein, R., & Robertson, R. P. (2005) Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. *J.Biol.Chem.* 280, 11107-11113
- Heding, L. G. (1972) Determination of total serum insulin (IRI) in insulin-treated diabetic patients. *Diabetologia* 8, 260-266
- Henquin, J. C. (2000) Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751-1760

- Henquin, J. C. (2004) Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes* 53 Suppl 3, S48-S58
- Henquin, J. C., Dufrane, D., & Nenquin, M. (2006a) Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* 55, 3470-3477
- Henquin, J. C., Ishiyama, N., Nenquin, M., Ravier, M. A., & Jonas, J. C. (2002) Signals and pools underlying biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1, S60-S67
- Henquin, J. C., Nenquin, M., Stiernet, P., & Ahren, B. (2006b) In vivo and in vitro glucose-induced biphasic insulin secretion in the mouse: pattern and role of cytoplasmic Ca^{2+} and amplification signals in beta-cells. *Diabetes* 55, 441-451
- Hinke, S. A., Hellemans, K., & Schuit, F. C. (2004) Plasticity of the beta cell insulin secretory competence: preparing the pancreatic beta cell for the next meal. *J.Physiol* 558, 369-380
- Ho, E., Quan, N., Tsai, Y. H., Lai, W., & Bray, T. M. (2001) Dietary zinc supplementation inhibits NFkappaB activation and protects against chemically induced diabetes in CD1 mice. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 226, 103-111
- Hoorens, A., Van de Casteele, M., Kloppel, G., & Pipeleers, D. (1996) Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *J.Clin.Invest* 98, 1568-1574
- Hotta, M., Tashiro, F., Ikegami, H., Niwa, H., Ogihara, T., Yodoi, J., & Miyazaki, J. (1998) Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J.Exp.Med.* 188, 1445-1451
- Hou, N., Torii, S., Saito, N., Hosaka, M., & Takeuchi, T. (2008) Reactive oxygen species-mediated pancreatic beta-cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-Jun N-terminal kinase, and mitogen-activated protein kinase phosphatases. *Endocrinology* 149, 1654-1665
- Huang, C. J., Lin, C. Y., Haataja, L., Gurlo, T., Butler, A. E., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2007) High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes* 56, 2016-2027
- Hug, H., Enari, M., & Nagata, S. (1994) No requirement of reactive oxygen intermediates in Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett.* 351, 311-313
- Hunt, J. V., Bottoms, M. A., & Mitchinson, M. J. (1993) Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. Some fundamental differences in proposed mechanisms of glucose oxidation and oxidant production. *Biochem.J.* 291 (Pt 2), 529-535
- Hunt, J. V., Dean, R. T., & Wolff, S. P. (1988) Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem.J.* 256, 205-212

- Hur, K. Y., Jung, H. S., & Lee, M. S. (2010) Role of autophagy in beta-cell function and mass. *Diabetes Obes.Metab* 12 Suppl 2, 20-26
- Inkster, B., Zammitt, N. N., & Frier, B. M. (2012) Drug-induced hypoglycaemia in type 2 diabetes. *Expert.Opin.Drug Saf* 11, 597-614
- Ivarsson, R., Quintens, R., Dejonghe, S., Tsukamoto, K., in, '., V, Renstrom, E., & Schuit, F. C. (2005) Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes* 54, 2132-2142
- Iwashima, Y., Kondoh-Abiko, A., Seino, S., Takeda, J., Eto, M., Polonsky, K. S., & Makino, I. (1994) Reduced levels of messenger ribonucleic acid for calcium channel, glucose transporter-2, and glucokinase are associated with alterations in insulin secretion in fasted rats. *Endocrinology* 135, 1010-1017
- Jacob, C., Maret, W., & Vallee, B. L. (1998) Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 3489-3494
- Jayawardena, R., Ranasinghe, P., Galappaththy, P., Malkanthi, R., Constantine, G., & Katulanda, P. (2012) Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol.Metab Syndr.* 4, 13
- Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., Wallace, J. C., & MacDonald, M. J. (2010) Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* 53, 1019-1032
- Jonas, J. C., Bensellam, M., Duprez, J., Elouil, H., Guiot, Y., & Pascal, S. M. (2009) Glucose regulation of islet stress responses and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes Obes.Metab* 11 Suppl 4, 65-81
- Jonas, J. C., Guiot, Y., Rahier, J., & Henquin, J. C. (2003) Haeme-oxygenase 1 expression in rat pancreatic beta cells is stimulated by supraphysiological glucose concentrations and by cyclic AMP. *Diabetologia* 46, 1234-1244
- Jonas, J. C., Sharma, A., Hasenkamp, W., Ilkova, H., Patane, G., Laybutt, R., Bonner-Weir, S., & Weir, G. C. (1999) Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J.Biol.Chem.* 274, 14112-14121
- Jonkers, F. C. & Henquin, J. C. (2001) Measurements of cytoplasmic Ca^{2+} in islet cell clusters show that glucose rapidly recruits beta-cells and gradually increases the individual cell response. *Diabetes* 50, 540-550
- Jung, H. S., Chung, K. W., Won, K. J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., Nguyen, Y. H., Kang, T. M., Yoon, K. H., Kim, J. W., Jeong, Y. T., Han, M. S., Lee, M. K., Kim, K. W., Shin, J., & Lee, M. S. (2008) Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab* 8, 318-324
- Kahn, S. E., Zraika, S., Utzschneider, K. M., & Hull, R. L. (2009) The beta cell lesion in type 2 diabetes: there has to be a primary functional abnormality. *Diabetologia* 52, 1003-1012
- Kaneto, H., Fujii, J., Myint, T., Miyazawa, N., Islam, K. N., Kawasaki, Y., Suzuki, K., Nakamura, M., Tatsumi, H., Yamasaki, Y., & Taniguchi, N. (1996) Reducing sugars trigger

oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem.J.* 320 (Pt 3), 855-863

Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Matsuoka, T., Fujitani, Y., Umayahara, Y., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Yamasaki, Y., & Hori, M. (1999) Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 48, 2398-2406

Kaneto, H., Xu, G., Song, K. H., Suzuma, K., Bonner-Weir, S., Sharma, A., & Weir, G. C. (2001) Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. *J.Biol.Chem.* 276, 31099-31104

Kang, Y. J. (2006) Metallothionein redox cycle and function. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 231, 1459-1467

Kassem, S. A., Ariel, I., Thornton, P. S., Scheimberg, I., & Glaser, B. (2000) Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* 49, 1325-1333

Kasuga, M. (2006) Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J.Clin.Invest* 116, 1756-1760

Kefas, B. A., Cai, Y., Ling, Z., Heimberg, H., Hue, L., Pipeleers, D., & Van de Casteele, M. (2003) AMP-activated protein kinase can induce apoptosis of insulin-producing MIN6 cells through stimulation of c-Jun-N-terminal kinase. *J.Mol.Endocrinol.* 30, 151-161

Kelishadi, R., Hashemipour, M., Adeli, K., Tavakoli, N., Movahedian-Attar, A., Shapouri, J., Poursafa, P., & Rouzbahani, A. (2010) Effect of zinc supplementation on markers of insulin resistance, oxidative stress, and inflammation among prepubescent children with metabolic syndrome. *Metab Syndr.Relat Disord.* 8, 505-510

Kerr-Conte, J., Vandewalle, B., Moerman, E., Lukowiak, B., Gmyr, V., Arnalsteen, L., Caiazzo, R., Sterkers, A., Hubert, T., Vantyghem, M. C., & Pattou, F. (2010) Upgrading pretransplant human islet culture technology requires human serum combined with media renewal. *Transplantation* 89, 1154-1160

Khalidi, M. Z., Elouil, H., Guiot, Y., Henquin, J. C., & Jonas, J. C. (2006) Antioxidants N-acetyl-L-cysteine and manganese(III)tetrakis (4-benzoic acid)porphyrin do not prevent beta-cell dysfunction in rat islets cultured in high glucose for 1 wk. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 291, E137-E146

Khalidi, M. Z., Guiot, Y., Gilon, P., Henquin, J. C., & Jonas, J. C. (2004) Increased glucose sensitivity of both triggering and amplifying pathways of insulin secretion in rat islets cultured for 1 wk in high glucose. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 287, E207-E217

Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., & Hara, M. (2009) Islet architecture: A comparative study. *Islets.* 1, 129-136

Kim, J. W. & Yoon, K. H. (2011) Glucolipotoxicity in Pancreatic beta-Cells. *Diabetes Metab J.* 35, 444-450

- Kjorholt, C., Akerfeldt, M. C., Biden, T. J., & Laybutt, D. R. (2005) Chronic hyperglycemia, independent of plasma lipid levels, is sufficient for the loss of beta-cell differentiation and secretory function in the db/db mouse model of diabetes. *Diabetes* 54, 2755-2763
- Kraus, A., Roth, H. P., & Kirchgessner, M. (1997) Supplementation with vitamin C, vitamin E or beta-carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc-deficient rats. *J.Nutr.* 127, 1290-1296
- Kubisch, H. M., Wang, J., Bray, T. M., & Phillips, J. P. (1997) Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic beta-cells against oxidative stress. *Diabetes* 46, 1563-1566
- Kubisch, H. M., Wang, J., Luche, R., Carlson, E., Bray, T. M., Epstein, C. J., & Phillips, J. P. (1994) Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 9956-9959
- Kumar, S. D., Vijaya, M., Samy, R. P., Dheen, S. T., Ren, M., Watt, F., Kang, Y. J., Bay, B. H., & Tay, S. S. (2012) Zinc supplementation prevents cardiomyocyte apoptosis and congenital heart defects in embryos of diabetic mice. *Free Radic.Biol.Med.* 53, 1595-1606
- Lacraz, G., Figeac, F., Movassat, J., Kassis, N., Coulaud, J., Galinier, A., Leloup, C., Bailbe, D., Homo-Delarche, F., & Portha, B. (2009) Diabetic beta-cells can achieve self-protection against oxidative stress through an adaptive up-regulation of their antioxidant defenses. *PLoS.One.* 4, e6500
- Lacraz, G., Figeac, F., Movassat, J., Kassis, N., & Portha, B. (2010) Diabetic GK/Par rat beta-cells are spontaneously protected against H₂O₂-triggered apoptosis. A cAMP-dependent adaptive response. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 298, E17-E27
- Larsen, C. M., Faulenbach, M., Vaag, A., Ehse, J. A., Donath, M. Y., & Mandrup-Poulsen, T. (2009) Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32, 1663-1668
- Larsen, C. M., Faulenbach, M., Vaag, A., Volund, A., Ehse, J. A., Seifert, B., Mandrup-Poulsen, T., & Donath, M. Y. (2007) Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.* 356, 1517-1526
- Lash, L. H. (2005) Role of glutathione transport processes in kidney function. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 204, 329-342
- Lawal, M. (2008) Management of diabetes mellitus in clinical practice. *Br.J.Nurs.* 17, 1106-1113
- Laybutt, D. R., Glandt, M., Xu, G., Ahn, Y. B., Trivedi, N., Bonner-Weir, S., & Weir, G. C. (2003) Critical reduction in beta-cell mass results in two distinct outcomes over time. Adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes. *J.Biol.Chem.* 278, 2997-3005
- Laybutt, D. R., Preston, A. M., Akerfeldt, M. C., Kench, J. G., Busch, A. K., Biankin, A. V., & Biden, T. J. (2007) Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 50, 752-763

- Laybutt, D. R., Sharma, A., Sgroi, D. C., Gaudet, J., Bonner-Weir, S., & Weir, G. C. (2002) Genetic regulation of metabolic pathways in beta-cells disrupted by hyperglycemia. *J.Biol.Chem.* 277, 10912-10921
- Laychock, S. G., Duzen, J., & Simpkins, C. O. (2000) Metallothionein induction in islets of Langerhans and insulinoma cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 165, 179-187
- Lee, J. W., Kim, W. H., Lim, J. H., Song, E. H., Song, J., Choi, K. Y., & Jung, M. H. (2009) Mitochondrial dysfunction: glucokinase downregulation lowers interaction of glucokinase with mitochondria, resulting in apoptosis of pancreatic beta-cells. *Cell Signal.* 21, 69-78
- Lefebvre, B., Vandewalle, B., Balavoine, A. S., Queniat, G., Moerman, E., Vantyghem, M. C., Le, B. O., Gmyr, V., Pawlowski, V., Kerr-Conte, J., & Pattou, F. (2012) Regulation and functional effects of ZNT8 in human pancreatic islets. *J.Endocrinol.* 214, 225-232
- Lefebvre, B., Vandewalle, B., Longue, J., Moerman, E., Lukowiak, B., Gmyr, V., Maedler, K., Kerr-Conte, J., & Pattou, F. (2010) Efficient gene delivery and silencing of mouse and human pancreatic islets. *BMC.Biotechnol.* 10, 28
- Leibiger, B., Leibiger, I. B., Moede, T., Kemper, S., Kulkarni, R. N., Kahn, C. R., de Vargas, L. M., & Berggren, P. O. (2001) Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol.Cell* 7, 559-570
- Leibiger, B., Wahlander, K., Berggren, P. O., & Leibiger, I. B. (2000) Glucose-stimulated insulin biosynthesis depends on insulin-stimulated insulin gene transcription. *J.Biol.Chem.* 275, 30153-30156
- Leibowitz, G., Yuli, M., Donath, M. Y., Nesher, R., Melloul, D., Cerasi, E., Gross, D. J., & Kaiser, N. (2001) beta-cell glucotoxicity in the Psammomys obesus model of type 2 diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1, S113-S117
- Leloup, C., Turrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A. L., Ktorza, A., Casteilla, L., & Penicaud, L. (2009) Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58, 673-681
- Lemaire, K., Ravier, M. A., Schraenen, A., Creemers, J. W., Van de Plas, R., Granvik, M., Van, L. L., Waelkens, E., Chimienti, F., Rutter, G. A., Gilon, P., In't Veld, P. A., & Schuit, F. C. (2009) Insulin crystallization depends on zinc transporter ZnT8 expression, but is not required for normal glucose homeostasis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106, 14872-14877
- Lenzen, S., Drinkgern, J., & Tiedge, M. (1996) Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic.Biol.Med.* 20, 463-466
- Li, N., Brun, T., Cnop, M., Cunha, D. A., Eizirik, D. L., & Maechler, P. (2009) Transient oxidative stress damages mitochondrial machinery inducing persistent beta-cell dysfunction. *J.Biol.Chem.* 284, 23602-23612
- Li, N., Li, B., Brun, T., Deffert-Delbouille, C., Mahiout, Z., Daali, Y., Ma, X. J., Krause, K. H., & Maechler, P. (2012) NADPH oxidase NOX2 defines a new antagonistic role for

reactive oxygen species and cAMP/PKA in the regulation of insulin secretion. *Diabetes* 61, 2842-2850

Li, X., Chen, H., & Epstein, P. N. (2004) Metallothionein protects islets from hypoxia and extends islet graft survival by scavenging most kinds of reactive oxygen species. *J.Biol.Chem.* 279, 765-771

Li, X., Chen, H., & Epstein, P. N. (2006) Metallothionein and catalase sensitize to diabetes in nonobese diabetic mice: reactive oxygen species may have a protective role in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 55, 1592-1604

Liang, D., Yang, M., Guo, B., Cao, J., Yang, L., Guo, X., Li, Y., & Gao, Z. (2012) Zinc inhibits H₂O₂-induced MC3T3-E1 cells apoptosis via MAPK and PI3K/AKT pathways. *Biol.Trace Elem.Res.* 148, 420-429

Liang, Q., Carlson, E. C., Donthi, R. V., Kralik, P. M., Shen, X., & Epstein, P. N. (2002) Overexpression of metallothionein reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 51, 174-181

Ling, Z., Hannaert, J. C., & Pipeleers, D. (1994) Effect of nutrients, hormones and serum on survival of rat islet beta cells in culture. *Diabetologia* 37, 15-21

Ling, Z., Kiekens, R., Mahler, T., Schuit, F. C., Pipeleers-Marichal, M., Sener, A., Kloppel, G., Malaisse, W. J., & Pipeleers, D. G. (1996) Effects of chronically elevated glucose levels on the functional properties of rat pancreatic beta-cells. *Diabetes* 45, 1774-1782

Ling, Z. & Pipeleers, D. G. (1996) Prolonged exposure of human beta cells to elevated glucose levels results in sustained cellular activation leading to a loss of glucose regulation. *J.Clin.Invest* 98, 2805-2812

Lingohr, M. K., Briaud, I., Dickson, L. M., McCuaig, J. F., Alarcon, C., Wicksteed, B. L., & Rhodes, C. J. (2006) Specific regulation of IRS-2 expression by glucose in rat primary pancreatic islet beta-cells. *J.Biol.Chem.* 281, 15884-15892

Lipsett, M. & Finegood, D. T. (2002) beta-cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats. *Diabetes* 51, 1834-1841

Liu, B., Chen, Y., & St Clair, D. K. (2008a) ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic.Biol.Med.* 44, 1529-1535

Liu, Z., Jeppesen, P. B., Gregersen, S., Chen, X., & Hermansen, K. (2008b) Dose- and Glucose-Dependent Effects of Amino Acids on Insulin Secretion from Isolated Mouse Islets and Clonal INS-1E Beta-Cells. *Rev.Diabet.Stud.* 5, 232-244

Lohman, J. R. & Remington, S. J. (2008) Development of a family of redox-sensitive green fluorescent protein indicators for use in relatively oxidizing subcellular environments. *Biochemistry* 47, 8678-8688

Lortz, S., Gurgul-Convey, E., Lenzen, S., & Tiedge, M. (2005) Importance of mitochondrial superoxide dismutase expression in insulin-producing cells for the toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. *Diabetologia* 48, 1541-1548

- Lortz, S., Gurgul-Convey, E., Naujok, O., & Lenzen, S. (2013) Overexpression of the antioxidant enzyme catalase does not interfere with the glucose responsiveness of insulin-secreting INS-1E cells and rat islets. *Diabetologia* 56, 774-782
- Lortz, S. & Tiedge, M. (2003) Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radic.Biol.Med.* 34, 683-688
- Lu, P. D., Harding, H. P., & Ron, D. (2004) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J.Cell Biol.* 167, 27-33
- Ma, Y. & Hendershot, L. M. (2004) Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways. *J.Biol.Chem.* 279, 13792-13799
- MacDonald, M. J. (1982) Evidence for the malate aspartate shuttle in pancreatic islets. *Arch.Biochem.Biophys.* 213, 643-649
- MacDonald, M. J. (1995) Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J.Biol.Chem.* 270, 20051-20058
- MacDonald, M. J. (2002) Differences between mouse and rat pancreatic islets: succinate responsiveness, malic enzyme, and anaplerosis. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 283, E302-E310
- Maechler, P. (2002) Mitochondria as the conductor of metabolic signals for insulin exocytosis in pancreatic beta-cells. *Cell Mol.Life Sci.* 59, 1803-1818
- Maechler, P., Jornot, L., & Wollheim, C. B. (1999) Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J.Biol.Chem.* 274, 27905-27913
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H. I., Spinas, G. A., Kaiser, N., Halban, P. A., & Donath, M. Y. (2002) Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J.Clin.Invest* 110, 851-860
- Malaisse, W. J. (1994) Physiology and pathology of islet metabolism. *Diabete Metab* 20, 95-98
- Marchetti, P., Bugliani, M., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Boggi, U., Filipponi, F., Weir, G. C., Eizirik, D. L., & Cnop, M. (2007) The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* 50, 2486-2494
- Marchetti, P., Del, G. S., Marselli, L., Lupi, R., Masini, M., Pollera, M., Bugliani, M., Boggi, U., Vistoli, F., Mosca, F., & Del, P. S. (2004) Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89, 5535-5541
- Maret, W. (2000) The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J.Nutr.* 130, 1455S-1458S

- Maret, W. (2011) Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. *J.Biol.Inorg.Chem.* 16, 1079-1086
- Maret, W., Jacob, C., Vallee, B. L., & Fischer, E. H. (1999) Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 1936-1940
- Maret, W. & Vallee, B. L. (1998) Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 3478-3482
- Marselli, L., Thorne, J., Dahiya, S., Sgroi, D. C., Sharma, A., Bonner-Weir, S., Marchetti, P., & Weir, G. C. (2010) Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. *PLoS.One.* 5, e11499
- Marshak, S., Leibowitz, G., Bertuzzi, F., Socci, C., Kaiser, N., Gross, D. J., Cerasi, E., & Melloul, D. (1999) Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes* 48, 1230-1236
- Martens, G., Cai, Y., Hinke, S., Stange, G., Van de Casteele, M., & Pipeleers, D. (2005a) Nutrient sensing in pancreatic beta cells suppresses mitochondrial superoxide generation and its contribution to apoptosis. *Biochem.Soc.Trans.* 33, 300-301
- Martens, G. A., Cai, Y., Hinke, S., Stange, G., Van de Casteele, M., & Pipeleers, D. (2005b) Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic beta cells. *J.Biol.Chem.* 280, 20389-20396
- Masini, M., Bugliani, M., Lupi, R., Del, G. S., Boggi, U., Filipponi, F., Marselli, L., Masiello, P., & Marchetti, P. (2009) Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia* 52, 1083-1086
- Masters, B. A., Kelly, E. J., Quaife, C. J., Brinster, R. L., & Palmiter, R. D. (1994) Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 584-588
- Mathur, A., Gorden, P., & Libutti, S. K. (2009) Insulinoma. *Surg.Clin.North Am.* 89, 1105-1121
- Matschinsky, F. M. (1996) Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45, 223-241
- Matschinsky, F. M. (2009) Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nat.Rev.Drug Discov.* 8, 399-416
- Matsuoka, T. A., Kaneto, H., Stein, R., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Henderson, E., Kojima, I., Matsuhisa, M., Hori, M., & Yamasaki, Y. (2007) MafA regulates expression of genes important to islet beta-cell function. *Mol.Endocrinol.* 21, 2764-2774
- Meier, J. J. (2008) Beta cell mass in diabetes: a realistic therapeutic target? *Diabetologia* 51, 703-713
- Menge, B. A., Tannapfel, A., Belyaev, O., Drescher, R., Muller, C., Uhl, W., Schmidt, W. E., & Meier, J. J. (2008) Partial pancreatectomy in adult humans does not provoke beta-cell regeneration. *Diabetes* 57, 142-149

- Meyer, A. J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J. P., & Hell, R. (2007) Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J.* 52, 973-986
- Meyer, A. J. & Dick, T. P. (2010) Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid.Redox.Signal.* 13, 621-650
- Michalska, A. E. & Choo, K. H. (1993) Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 8088-8092
- Minami, T., Shimizu, M., Tanaka, H., Okazaki, Y., & Cherian, M. G. (1999) Metallothionein does not protect mouse endocrine cells from damage induced by alloxan injection. *Toxicology* 132, 33-41
- Miura, T., Muraoka, S., & Ogiso, T. (1997) Antioxidant activity of metallothionein compared with reduced glutathione. *Life Sci.* 60, L-9
- Mocchegiani, E., Giacconi, R., & Malavolta, M. (2008) Zinc signalling and subcellular distribution: emerging targets in type 2 diabetes. *Trends Mol.Med.* 14, 419-428
- Morgan, B., Ezerina, D., Amoako, T. N., Riemer, J., Seedorf, M., & Dick, T. P. (2013) Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat.Chem.Biol.* 9, 119-125
- Morgan, D., Oliveira-Emilio, H. R., Keane, D., Hirata, A. E., Santos da, R. M., Bordin, S., Curi, R., Newsholme, P., & Carpinelli, A. R. (2007) Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia* 50, 359-369
- Morgan, D., Rebelato, E., Abdulkader, F., Graciano, M. F., Oliveira-Emilio, H. R., Hirata, A. E., Rocha, M. S., Bordin, S., Curi, R., & Carpinelli, A. R. (2009) Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 150, 2197-2201
- Murakami, K., Kondo, T., Ohtsuka, Y., Fujiwara, Y., Shimada, M., & Kawakami, Y. (1989) Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism* 38, 753-758
- Nagaoka, Y., Iuchi, Y., Ikeda, Y., & Fujii, J. (2004) Glutathione reductase is expressed at high levels in pancreatic islet cells. *Redox.Rep.* 9, 321-324
- Nakajima, K., Kodaira, T., Kato, M., Nakazato, K., Tokita, Y., Kikuchi, H., Sekine, H., Suzuki, K., & Nagamine, T. (2010) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for metallothionein-I and -II in plasma of humans and experimental animals. *Clin.Chim.Acta* 411, 758-761
- Nakazato, K., Nakajima, K., Kusakabe, T., Suzuki, K., & Nagamine, T. (2008) Immunohistochemical staining with newly developed metallothionein fragment antibodies against NH₂-terminal, middle-regional and COOH-terminal peptides in rabbits. *Pathol.Int.* 58, 765-770

Nakazato, K., Nakajima, K., Nakano, T., Kodaira, T., Nakayama, K., Satoh, M., & Nagamine, T. (2012) Metallothionein (MT) 1/2 expression in MT 1/2 and MT 3 knock-out mice and Long-Evans Cinnamon (LEC) rats. *J.Toxicol.Sci.* 37, 169-175

Newsholme, P., Bender, K., Kiely, A., & Brennan, L. (2007) Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochem.Soc.Trans.* 35, 1180-1186

Newsholme, P. & Krause, M. (2012) Nutritional regulation of insulin secretion: implications for diabetes. *Clin.Biochem.Rev.* 33, 35-47

Newsholme, P., Rebelato, E., Abdulkader, F., Krause, M., Carpinelli, A., & Curi, R. (2012) Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and beta-cell function: a critical role for amino acids. *J.Endocrinol.* 214, 11-20

Nicolson, T. J., Bellomo, E. A., Wijesekara, N., Loder, M. K., Baldwin, J. M., Gyulxhandanyan, A. V., Koshkin, V., Tarasov, A. I., Carzaniga, R., Kronenberger, K., Taneja, T. K., da, S., X, Libert, S., Froguel, P., Scharfmann, R., Stetsyuk, V., Ravassard, P., Parker, H., Gribble, F. M., Reimann, F., Sladek, R., Hughes, S. J., Johnson, P. R., Masseboeuf, M., Burcelin, R., Baldwin, S. A., Liu, M., Lara-Lemus, R., Arvan, P., Schuit, F. C., Wheeler, M. B., Chimienti, F., & Rutter, G. A. (2009) Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. *Diabetes* 58, 2070-2083

Nir, T., Melton, D. A., & Dor, Y. (2007) Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J.Clin.Invest* 117, 2553-2561

Nolleaux, M. C., Rahier, J., Marchandise, J., Thurion, P., Godecharles, S., Van den Steen, G., Jamart, J., Sempoux, C., Jacquemin, P., & Guiot, Y. (2013) Characterization of beta-cell plasticity mechanisms induced in mice by a transient source of exogenous insulin. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 304, E711-E723

Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., McCarthy, S., Betteridge, D. J., & Wolff, S. P. (1995) Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes* 44, 1054-1058

Ohly, P., Dohle, C., Abel, J., Seissler, J., & Gleichmann, H. (2000) Zinc sulphate induces metallothionein in pancreatic islets of mice and protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. *Diabetologia* 43, 1020-1030

Ohly, P. & Gleichmann, H. (1995) Metallothionein: in vitro induction with zinc and streptozotocin in pancreatic islets of mice. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 103 Suppl 2, 79-82

Ohly, P., Wang, Z., Abel, J., & Gleichmann, H. (1998) Zinc sulphate induced metallothionein in pancreatic islets and protected against the diabetogenic toxin streptozotocin. *Talanta* 46, 355-359

Okamoto, T., Kuroki, T., Adachi, T., Ono, S., Hayashi, T., Tajima, Y., Eguchi, S., & Kanematsu, T. (2011) Effect of zinc on early graft failure following intraportal islet transplantation in rat recipients. *Ann.Transplant.* 16, 114-120

- Olejnicka, B. T., Andersson, A., Tyrberg, B., Dalen, H., & Brunk, U. T. (1999) Beta-cells, oxidative stress, lysosomal stability, and apoptotic/necrotic cell death. *Antioxid.Redox.Signal.* 1, 305-315
- Olson, L. K., Redmon, J. B., Towle, H. C., & Robertson, R. P. (1993) Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J.Clin.Invest* 92, 514-519
- Ostergaard, H., Tachibana, C., & Winther, J. R. (2004) Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J.Cell Biol.* 166, 337-345
- Oteiza, P. I., Clegg, M. S., Zago, M. P., & Keen, C. L. (2000) Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radic.Biol.Med.* 28, 1091-1099
- Oteiza, P. I., Olin, K. L., Fraga, C. G., & Keen, C. L. (1995) Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J.Nutr.* 125, 823-829
- Oteiza, P. L., Olin, K. L., Fraga, C. G., & Keen, C. L. (1996) Oxidant defense systems in testes from zinc-deficient rats. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 213, 85-91
- Palmiter, R. D., Cole, T. B., & Findley, S. D. (1996a) ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J.* 15, 1784-1791
- Palmiter, R. D., Cole, T. B., Quaife, C. J., & Findley, S. D. (1996b) ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 14934-14939
- Palmiter, R. D. & Findley, S. D. (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* 14, 639-649
- Palmiter, R. D., Findley, S. D., Whitmore, T. E., & Durnam, D. M. (1992) MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 6333-6337
- Parat, M. O., Richard, M. J., Beani, J. C., & Favier, A. (1997) Involvement of zinc in intracellular oxidant/antioxidant balance. *Biol.Trace Elem.Res.* 60, 187-204
- Paris, M., Bernard-Kargar, C., Berthault, M. F., Bouwens, L., & Ktorza, A. (2003) Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. *Endocrinology* 144, 2717-2727
- Park, L., Min, D., Kim, H., Chung, H. Y., Lee, C. H., Park, I. S., Kim, Y., & Park, Y. (2011) Tat-enhanced delivery of metallothionein can partially prevent the development of diabetes. *Free Radic.Biol.Med.* 51, 1666-1674
- Pascal, S. M., Veiga-da-Cunha, M., Gilon, P., Van, S. E., & Jonas, J. C. (2010) Effects of fructosamine-3-kinase deficiency on function and survival of mouse pancreatic islets after prolonged culture in high glucose or ribose concentrations. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 298, E586-E596
- Patel, M. & Day, B. J. (1999) Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trends Pharmacol.Sci.* 20, 359-364

- Perez, M. J. & Cederbaum, A. I. (2003) Metallothionein 2A induction by zinc protects HEPG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity. *Free Radic.Biol.Med.* 34, 443-455
- Peshavaria, M., Larmie, B. L., Lausier, J., Satish, B., Habibovic, A., Roskens, V., Larock, K., Everill, B., Leahy, J. L., & Jetton, T. L. (2006) Regulation of pancreatic beta-cell regeneration in the normoglycemic 60% partial-pancreatectomy mouse. *Diabetes* 55, 3289-3298
- Petremand, J., Puyal, J., Chatton, J. Y., Duprez, J., Allagnat, F., Frias, M., James, R. W., Waeber, G., Jonas, J. C., & Widmann, C. (2012) HDLs protect pancreatic beta-cells against ER stress by restoring protein folding and trafficking. *Diabetes* 61, 1100-1111
- Phillips, L. K. & Prins, J. B. (2011) Update on incretin hormones. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1243, E55-E74
- Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L. M., Daniel, K., Reece, J. M., Deeney, J. T., Andersen, M. E., Corkey, B. E., & Collins, S. (2007) Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56, 1783-1791
- Pipeleers, D. G. (1992) Heterogeneity in pancreatic beta-cell population. *Diabetes* 41, 777-781
- Poburko, D., Santo-Domingo, J., & Demareux, N. (2011) Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations. *J.Biol.Chem.* 286, 11672-11684
- Poitout, V. & Robertson, R. P. (1996) An integrated view of beta-cell dysfunction in type-II diabetes. *Annu.Rev.Med.* 47, 69-83
- Poitout, V. & Robertson, R. P. (2008) Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr.Rev.* 29, 351-366
- Porat, S., Weinberg-Corem, N., Tornovsky-Babaey, S., Schyr-Ben-Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., Dadon, D., Granot, Z., Ben-Hur, V., White, P., Girard, C. A., Karni, R., Kaestner, K. H., Ashcroft, F. M., Magnuson, M. A., Saada, A., Grimsby, J., Glaser, B., & Dor, Y. (2011) Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab* 13, 440-449
- Portha, B., Giroix, M. H., Serradas, P., Gangnerau, M. N., Movassat, J., Rajas, F., Bailbe, D., Plachot, C., Mithieux, G., & Marie, J. C. (2001) beta-cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat: information from the GK/Par colony. *Diabetes* 50 Suppl 1, S89-S93
- Portha, B., Lacraz, G., Kergoat, M., Homo-Delarche, F., Giroix, M. H., Bailbe, D., Gangnerau, M. N., Dolz, M., Turrel-Cuzin, C., & Movassat, J. (2009) The GK rat beta-cell: a prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes? *Mol.Cell Endocrinol.* 297, 73-85
- Pound, L. D., Sarkar, S. A., Benninger, R. K., Wang, Y., Suwanichkul, A., Shadoan, M. K., Printz, R. L., Oeser, J. K., Lee, C. E., Piston, D. W., McGuinness, O. P., Hutton, J. C., Powell, D. R., & O'Brien, R. M. (2009) Deletion of the mouse Slc30a8 gene encoding zinc transporter-8 results in impaired insulin secretion. *Biochem.J.* 421, 371-376

- Pound, L. D., Sarkar, S. A., Ustione, A., Dadi, P. K., Shadoan, M. K., Lee, C. E., Walters, J. A., Shiota, M., McGuinness, O. P., Jacobson, D. A., Piston, D. W., Hutton, J. C., Powell, D. R., & O'Brien, R. M. (2012) The physiological effects of deleting the mouse SLC30A8 gene encoding zinc transporter-8 are influenced by gender and genetic background. *PLoS.One.* 7, e40972
- Prentki, M. & Nolan, C. J. (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J.Clin.Invest* 116, 1802-1812
- Pullen, T. J., Khan, A. M., Barton, G., Butcher, S. A., Sun, G., & Rutter, G. A. (2010) Identification of genes selectively disallowed in the pancreatic islet. *Islets.* 2, 89-95
- Purrello, F., Rabuazzo, A. M., Anello, M., & Patane, G. (1996) Effects of prolonged glucose stimulation on pancreatic beta cells: from increased sensitivity to desensitization. *Acta Diabetol.* 33, 253-256
- Quaife, C. J., Findley, S. D., Erickson, J. C., Froelick, G. J., Kelly, E. J., Zambrowicz, B. P., & Palmiter, R. D. (1994) Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33, 7250-7259
- Quan, W., Hur, K. Y., Lim, Y., Oh, S. H., Lee, J. C., Kim, K. H., Kim, G. H., Kim, S. W., Kim, H. L., Lee, M. K., Kim, K. W., Kim, J., Komatsu, M., & Lee, M. S. (2012) Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice. *Diabetologia* 55, 392-403
- Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R. M., Sempoux, C., & Henquin, J. C. (2008) Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes.Metab* 10 Suppl 4, 32-42
- Rahier, J., Guiot, Y., & Sempoux, C. (2000) Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy: a heterogeneous syndrome unrelated to nesidioblastosis. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* 82, F108-F112
- Rashidi, A., Kirkwood, T. B., & Shanley, D. P. (2009) Metabolic evolution suggests an explanation for the weakness of antioxidant defences in beta-cells. *Mech.Ageing Dev.* 130, 216-221
- Ravier, M. A., Cheng-Xue, R., Palmer, A. E., Henquin, J. C., & Gilon, P. (2010) Subplasmalemmal Ca^{2+} measurements in mouse pancreatic beta cells support the existence of an amplifying effect of glucose on insulin secretion. *Diabetologia* 53, 1947-1957
- Ravier, M. A., Daro, D., Roma, L. P., Jonas, J. C., Cheng-Xue, R., Schuit, F. C., & Gilon, P. (2011) Mechanisms of control of the free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum of mouse pancreatic beta-cells: interplay with cell metabolism and $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and role of SERCA2b and SERCA3. *Diabetes* 60, 2533-2545
- Rehman, A., Nourooz-Zadeh, J., Moller, W., Tritschler, H., Pereira, P., & Halliwell, B. (1999) Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 448, 120-122
- Reinbothe, T. M., Ivarsson, R., Li, D. Q., Niazi, O., Jing, X., Zhang, E., Stenson, L., Bryborn, U., & Renstrom, E. (2009) Glutaredoxin-1 mediates NADPH-dependent stimulation of calcium-dependent insulin secretion. *Mol.Endocrinol.* 23, 893-900

- Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O., Tanaka, Y., & Takahashi, H. (2003) Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52, 581-587
- Rofe, A. M., Philcox, J. C., & Coyle, P. (1996) Trace metal, acute phase and metabolic response to endotoxin in metallothionein-null mice. *Biochem.J.* 314 (Pt 3), 793-797
- Rolo, A. P. & Palmeira, C. M. (2006) Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 212, 167-178
- Roma, L. P., Duprez, J., Takahashi, H. K., Gilon, P., Wiederkehr, A., & Jonas, J. C. (2012a) Dynamic measurements of mitochondrial hydrogen peroxide concentration and glutathione redox state in rat pancreatic beta-cells using ratiometric fluorescent proteins: confounding effects of pH with HyPer but not roGFP1. *Biochem.J.* 441, 971-978
- Roma, L. P., Pascal, S. M., Duprez, J., & Jonas, J. C. (2012b) Mitochondrial oxidative stress contributes differently to rat pancreatic islet cell apoptosis and insulin secretory defects after prolonged culture in a low non-stimulating glucose concentration. *Diabetologia* 55, 2226-2237
- Rota, C., Chignell, C. F., & Mason, R. P. (1999) Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic.Biol.Med.* 27, 873-881
- Roussel, A. M., Kerkeni, A., Zouari, N., Mahjoub, S., Matheau, J. M., & Anderson, R. A. (2003) Antioxidant effects of zinc supplementation in Tunisians with type 2 diabetes mellitus. *J.Am.Coll.Nutr.* 22, 316-321
- Sakai, K., Matsumoto, K., Nishikawa, T., Suefuji, M., Nakamaru, K., Hirashima, Y., Kawashima, J., Shirotani, T., Ichinose, K., Brownlee, M., & Araki, E. (2003) Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 300, 216-222
- Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C., & Yagihashi, S. (2002) Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45, 85-96
- Sarre, A., Gabrielli, J., Vial, G., Leverve, X. M., & Assimacopoulos-Jeannet, F. (2012) Reactive oxygen species are produced at low glucose and contribute to the activation of AMPK in insulin-secreting cells. *Free Radic.Biol.Med.* 52, 142-150
- Sato, Y., Aizawa, T., Komatsu, M., Okada, N., & Yamada, T. (1992) Dual functional role of membrane depolarization/ Ca^{2+} influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes* 41, 438-443
- Sato, Y., Endo, H., Okuyama, H., Takeda, T., Iwahashi, H., Imagawa, A., Yamagata, K., Shimomura, I., & Inoue, M. (2011) Cellular hypoxia of pancreatic beta-cells due to high levels of oxygen consumption for insulin secretion in vitro. *J.Biol.Chem.* 286, 12524-12532
- Scheuner, D. & Kaufman, R. J. (2008) The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr.Rev.* 29, 317-333

- Schott-Ohly, P., Lgssiar, A., Partke, H. J., Hassan, M., Friesen, N., & Gleichmann, H. (2004) Prevention of spontaneous and experimentally induced diabetes in mice with zinc sulfate-enriched drinking water is associated with activation and reduction of NF-kappa B and AP-1 in islets, respectively. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 229, 1177-1185
- Schwetz, T. A., Ustione, A., & Piston, D. W. (2013) Neuropeptide Y and somatostatin inhibit insulin secretion through different mechanisms. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 304, E211-E221
- Scott, D. A. (1934) Crystalline insulin. *Biochem.J.* 28, 1592-1602
- Scott, D. A. & Fisher, A. M. (1938) The insulin and the zinc content of normal and diabetic pancreas. *J.Clin.Invest* 17, 725-728
- Sekine, N., Cirulli, V., Regazzi, R., Brown, L. J., Gine, E., Tamarit-Rodriguez, J., Girotti, M., Marie, S., MacDonald, M. J., Wollheim, C. B., & . (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
- Semenza, G. L. (2010) Oxygen homeostasis. *Wiley.Interdiscip.Rev.Syst.Biol.Med.* 2, 336-361
- Sempoux, C., Guiot, Y., Dubois, D., Nollevaux, M. C., Saudubray, J. M., Nihoul-Fekete, C., & Rahier, J. (1998) Pancreatic B-cell proliferation in persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy: an immunohistochemical study of 18 cases. *Mod.Pathol.* 11, 444-449
- Sensi, S. L., Yin, H. Z., Carriedo, S. G., Rao, S. S., & Weiss, J. H. (1999) Preferential Zn^{2+} influx through Ca^{2+} -permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 2414-2419
- Sharma, A., Kharb, S., Chugh, S. N., Kakkar, R., & Singh, G. P. (2000) Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E supplementation in diabetic patients. *Metabolism* 49, 160-162
- Shepherd, R. M. & Henquin, J. C. (1995) The role of metabolism, cytoplasmic Ca^{2+} , and pH-regulating exchangers in glucose-induced rise of cytoplasmic pH in normal mouse pancreatic islets. *J.Biol.Chem.* 270, 7915-7921
- Shimizu, Y. & Hendershot, L. M. (2009) Oxidative folding: cellular strategies for dealing with the resultant equimolar production of reactive oxygen species. *Antioxid.Redox.Signal.* 11, 2317-2331
- Shin, C. S., Moon, B. S., Park, K. S., Kim, S. Y., Park, S. J., Chung, M. H., & Lee, H. K. (2001) Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care* 24, 733-737
- Sies, H. & Cadenas, E. (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 311, 617-631
- Simon, S. F. & Taylor, C. G. (2001) Dietary zinc supplementation attenuates hyperglycemia in db/db mice. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 226, 43-51

Sivitz, W. I. & Yorek, M. A. (2010) Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid.Redox.Signal.* 12, 537-577

Skelly, R. H., Schuppin, G. T., Ishihara, H., Oka, Y., & Rhodes, C. J. (1996) Glucose-regulated translational control of proinsulin biosynthesis with that of the proinsulin endopeptidases PC2 and PC3 in the insulin-producing MIN6 cell line. *Diabetes* 45, 37-43

Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., Hadjadj, S., Balkau, B., Heude, B., Charpentier, G., Hudson, T. J., Montpetit, A., Pshezhetsky, A. V., Prentki, M., Posner, B. I., Balding, D. J., Meyre, D., Polychronakos, C., & Froguel, P. (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445, 881-885

Slezak, L. A. & Andersen, D. K. (2001) Pancreatic resection: effects on glucose metabolism. *World J.Surg.* 25, 452-460

Smidt, K., Jessen, N., Petersen, A. B., Larsen, A., Magnusson, N., Jeppesen, J. B., Stoltenberg, M., Culvenor, J. G., Tsatsanis, A., Brock, B., Schmitz, O., Wogensen, L., Bush, A. I., & Rungby, J. (2009) SLC30A3 responds to glucose- and zinc variations in beta-cells and is critical for insulin production and in vivo glucose-metabolism during beta-cell stress. *PLoS.One.* 4, e5684

Snell-Bergeon, J. K. & Wadwa, R. P. (2012) Hypoglycemia, diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes Technol.Ther.* 14 Suppl 1, S51-S58

Song, S. H., Rhodes, C. J., Veldhuis, J. D., & Butler, P. C. (2003) Diazoxide attenuates glucose-induced defects in first-phase insulin release and pulsatile insulin secretion in human islets. *Endocrinology* 144, 3399-3405

Song, Y., Leonard, S. W., Traber, M. G., & Ho, E. (2009) Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J.Nutr.* 139, 1626-1631

Song, Y., Wang, J., Li, Y., Du, Y., Arteel, G. E., Saari, J. T., Kang, Y. J., & Cai, L. (2005) Cardiac metallothionein synthesis in streptozotocin-induced diabetic mice, and its protection against diabetes-induced cardiac injury. *Am.J.Pathol.* 167, 17-26

Sorenson, R. L. & Brelje, T. C. (1997) Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm.Metab Res.* 29, 301-307

Stridh, H., Kimland, M., Jones, D. P., Orrenius, S., & Hampton, M. B. (1998) Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 429, 351-355

Stroher, E. & Millar, A. H. (2012) The biological roles of glutaredoxins. *Biochem.J.* 446, 333-348

Stumvoll, M., Fritsche, A., Stefan, N., Hardt, E., & Haring, H. (2001) Evidence against a rate-limiting role of proinsulin processing for maximal insulin secretion in subjects with impaired glucose tolerance and beta-cell dysfunction. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86, 1235-1239

Supale, S., Li, N., Brun, T., & Maechler, P. (2012) Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol.Metab* 23, 477-487

Tajiri, Y. & Grill, V. (2000) Aminoguanidine exerts a beta-cell function-preserving effect in high glucose-cultured beta-cells (INS-1). *Int.J.Exp.Diabetes Res.* 1, 111-119

Tajiri, Y., Moller, C., & Grill, V. (1997) Long-term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits B cell function. *Endocrinology* 138, 273-280

Takahashi, H. K., Prates Roma, L., Duprez, J., & Jonas, J.-C. Effets aigus des nutriments sur l'état d'oxydation des thiols dans le cytosol et la matrice mitochondriale de cellules d'îlots pancréatiques de rat : mesures dynamiques à l'aide de la sonde GRX1-roGFP2. *Diabetes and Metabolism* 39[Special issue 1], A97 P2122. 2013.

Ref Type: Abstract

Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V., Sussel, L., & Accili, D. (2012) Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell* 150, 1223-1234

Tamaki, M., Fujitani, Y., Uchida, T., Hirose, T., Kawamori, R., & Watada, H. (2009) Downregulation of ZnT8 expression in pancreatic beta-cells of diabetic mice. *Islets.* 1, 124-128

Tanaka, Y., Gleason, C. E., Tran, P. O., Harmon, J. S., & Robertson, R. P. (1999) Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 10857-10862

Tanaka, Y., Tran, P. O., Harmon, J., & Robertson, R. P. (2002a) A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 12363-12368

Tanaka, Y., Tran, P. O., Harmon, J., & Robertson, R. P. (2002b) A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 12363-12368

Tarpey, M. M., Wink, D. A., & Grisham, M. B. (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 286, R431-R444

Tengholm, A., Hellman, B., & Gylfe, E. (1999) Glucose regulation of free Ca²⁺ in the endoplasmic reticulum of mouse pancreatic beta cells. *J.Biol.Chem.* 274, 36883-36890

Thorens, B., Sarkar, H. K., Kaback, H. R., & Lodish, H. F. (1988) Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55, 281-290

Thornalley, P. J. & Vasak, M. (1985) Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim.Biophys.Acta* 827, 36-44

- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., & Lenzen, S. (1997) Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46, 1733-1742
- Tobiasch, E., Gunther, L., & Bach, F. H. (2001) Heme oxygenase-1 protects pancreatic beta cells from apoptosis caused by various stimuli. *J.Investig.Med.* 49, 566-571
- Tokuyama, Y., Sturis, J., DePaoli, A. M., Takeda, J., Stoffel, M., Tang, J., Sun, X., Polonsky, K. S., & Bell, G. I. (1995) Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 44, 1447-1457
- Tonooka, N., Oseid, E., Zhou, H., Harmon, J. S., & Robertson, R. P. (2007) Glutathione peroxidase protein expression and activity in human islets isolated for transplantation. *Clin.Transplant.* 21, 767-772
- Toschi, E., Camastra, S., Sironi, A. M., Masoni, A., Gastaldelli, A., Mari, A., Ferrannini, E., & Natali, A. (2002) Effect of acute hyperglycemia on insulin secretion in humans. *Diabetes* 51 Suppl 1, S130-S133
- Truong-Tran, A. Q., Carter, J., Ruffin, R. E., & Zalewski, P. D. (2001) The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals* 14, 315-330
- Tsubouchi, H., Inoguchi, T., Inuo, M., Kakimoto, M., Sonta, T., Sonoda, N., Sasaki, S., Kobayashi, K., Sumimoto, H., & Nawata, H. (2005) Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic beta-cell line, MIN6-a role of NAD(P)H oxidase in beta-cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 326, 60-65
- Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y., & Tomonaga, M. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7, 337-347
- Uchizono, Y., Takeya, R., Iwase, M., Sasaki, N., Oku, M., Imoto, H., Iida, M., & Sumimoto, H. (2006) Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. *Life Sci.* 80, 133-139
- Unger, R. H. & Grundy, S. (1985) Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia* 28, 119-121
- Unger, R. H. & Orci, L. (2001) Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J.* 15, 312-321
- Untergasser, G., Rumpold, H., Plas, E., Witkowski, M., Pfister, G., & Berger, P. (2000) High levels of zinc ions induce loss of mitochondrial potential and degradation of antiapoptotic Bcl-2 protein in in vitro cultivated human prostate epithelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 279, 607-614
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 39, 44-84

- Van de Casteele, M., Kefas, B. A., Cai, Y., Heimberg, H., Scott, D. K., Henquin, J. C., Pipeleers, D., & Jonas, J. C. (2003) Prolonged culture in low glucose induces apoptosis of rat pancreatic beta-cells through induction of c-myc. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 312, 937-944
- Van Lommel, L., Janssens, K., Quintens, R., Tsukamoto, K., Vander, M. D., Lemaire, K., Deneef, C., Jonas, J. C., Martens, G., Pipeleers, D., & Schuit, F. C. (2006) Probe-independent and direct quantification of insulin mRNA and growth hormone mRNA in enriched cell preparations. *Diabetes* 55, 3214-3220
- Vasak, M. (2005) Advances in metallothionein structure and functions. *J.Trace Elem.Med.Biol.* 19, 13-17
- Vasak, M. & Hasler, D. W. (2000) Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 4, 177-183
- Vasconcelos, M. H., Tam, S. C., Hesketh, J. E., Reid, M., & Beattie, J. H. (2002) Metal- and tissue-dependent relationship between metallothionein mRNA and protein. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 182, 91-97
- Vattem, K. M. & Wek, R. C. (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 11269-11274
- Wardman, P. (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic.Biol.Med.* 43, 995-1022
- Weir, G. C., Laybutt, D. R., Kaneto, H., Bonner-Weir, S., & Sharma, A. (2001) Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1, S154-S159
- Welsh, N., Cnop, M., Kharroubi, I., Bugliani, M., Lupi, R., Marchetti, P., & Eizirik, D. L. (2005) Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes* 54, 3238-3244
- Welsh, N., Margulis, B., Borg, L. A., Wiklund, H. J., Saldeen, J., Flodstrom, M., Mello, M. A., Andersson, A., Pipeleers, D. G., Hellerstrom, C., & . (1995) Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets: implications for the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Mol.Med.* 1, 806-820
- Wiederkehr, A., Park, K. S., Dupont, O., Demaurex, N., Pozzan, T., Cline, G. W., & Wollheim, C. B. (2009) Matrix alkalization: a novel mitochondrial signal for sustained pancreatic beta-cell activation. *EMBO J.* 28, 417-428
- Wijesekara, N., Dai, F. F., Hardy, A. B., Giglou, P. R., Bhattacharjee, A., Koshkin, V., Chimienti, F., Gaisano, H. Y., Rutter, G. A., & Wheeler, M. B. (2010) Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. *Diabetologia* 53, 1656-1668
- Wold, L. E., Ceylan-Isik, A. F., Fang, C. X., Yang, X., Li, S. Y., Sreejayan, N., Privratsky, J. R., & Ren, J. (2006) Metallothionein alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced

diabetes: role of Ca^{2+} cycling proteins, NADPH oxidase, poly(ADP-Ribose) polymerase and myosin heavy chain isozyme. *Free Radic.Biol.Med.* 40, 1419-1429

Wolf, G., Aumann, N., Michalska, M., Bast, A., Sonnemann, J., Beck, J. F., Lendeckel, U., Newsholme, P., & Walther, R. (2010) Peroxiredoxin III protects pancreatic β cells from apoptosis. *J.Endocrinol.* 207, 163-175

Wrona, M., Patel, K., & Wardman, P. (2005) Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic.Biol.Med.* 38, 262-270

Xu, B., Moritz, J. T., & Epstein, P. N. (1999) Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse β cells. *Free Radic.Biol.Med.* 27, 830-837

Xue, W., Liu, Y., Zhao, J., Cai, L., Li, X., & Feng, W. (2012) Activation of HIF-1 by metallothionein contributes to cardiac protection in the diabetic heart. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 302, H2528-H2535

Yamada, Y. & Harashima, H. (2008) Mitochondrial drug delivery systems for macromolecule and their therapeutic application to mitochondrial diseases. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 60, 1439-1462

Yan, S. D., Schmidt, A. M., Anderson, G. M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y. S., Pinsky, D., & Stern, D. (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J.Biol.Chem.* 269, 9889-9897

Yang, J. & Cherian, M. G. (1994) Protective effects of metallothionein on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sci.* 55, 43-51

Ye, G., Metreveli, N. S., Ren, J., & Epstein, P. N. (2003) Metallothionein prevents diabetes-induced deficits in cardiomyocytes by inhibiting reactive oxygen species production. *Diabetes* 52, 777-783

Yoshida, K., Hirokawa, J., Tagami, S., Kawakami, Y., Urata, Y., & Kondo, T. (1995) Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 38, 201-210

Yoshida, M., Saegusa, Y., Fukuda, A., Akama, Y., & Owada, S. (2005) Measurement of radical-scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spin resonance spectroscopy. *Toxicology* 213, 74-80

Yoshikawa, Y., Adachi, Y., & Sakurai, H. (2007) A new type of orally active anti-diabetic Zn(II)-dithiocarbamate complex. *Life Sci.* 80, 759-766

Zago, M. P. & Oteiza, P. I. (2001) The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic.Biol.Med.* 31, 266-274

Zago, M. P., Verstraeten, S. V., & Oteiza, P. I. (2000) Zinc in the prevention of Fe^{2+} -initiated lipid and protein oxidation. *Biol.Res.* 33, 143-150

Zalewski, P. D., Millard, S. H., Forbes, I. J., Kapaniris, O., Slavotinek, A., Betts, W. H., Ward, A. D., Lincoln, S. F., & Mahadevan, I. (1994) Video image analysis of labile zinc in

viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J.Histochem.Cytochem.* 42, 877-884

Zawalich, W. S., Yamazaki, H., & Zawalich, K. C. (2008) Biphasic insulin secretion from freshly isolated or cultured, perfused rodent islets: comparative studies with rats and mice. *Metabolism* 57, 30-39

Zeggini, E., Weedon, M. N., Lindgren, C. M., Frayling, T. M., Elliott, K. S., Lango, H., Timpson, N. J., Perry, J. R., Rayner, N. W., Freathy, R. M., Barrett, J. C., Shields, B., Morris, A. P., Ellard, S., Groves, C. J., Harries, L. W., Marchini, J. L., Owen, K. R., Knight, B., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Morris, A. D., Doney, A. S., McCarthy, M. I., & Hattersley, A. T. (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316, 1336-1341

Zehetner, J., Danzer, C., Collins, S., Eckhardt, K., Gerber, P. A., Ballschmieter, P., Galvanovskis, J., Shimomura, K., Ashcroft, F. M., Thorens, B., Rorsman, P., & Krek, W. (2008) PVHL is a regulator of glucose metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Genes Dev.* 22, 3135-3146

Zhao, C., Wilson, M. C., Schuit, F., Halestrap, A. P., & 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., Tan, Y., Dai, J., Li, B., Guo, L., Cui, J., Wang, G., Shi, X., Zhang, X., Mellen, N., Li, W., & Cai, L. (2011) Exacerbation of diabetes-induced testicular apoptosis by zinc deficiency is most likely associated with oxidative stress, p38 MAPK activation, and p53 activation in mice. *Toxicol.Lett.* 200, 100-106

Zheng, J., Zhang, Y., Xu, W., Luo, Y., Hao, J., Shen, X., Yang, X., Li, X., & Huang, K. (2013) Zinc protects HepG2 cells against the oxidative damage and DNA damage induced by ochratoxin A. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*

Zheng, M., Aslund, F., & Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279, 1718-1721

Zheng, S., Carlson, E. C., Yang, L., Kralik, P. M., Huang, Y., & Epstein, P. N. (2008) Podocyte-specific overexpression of the antioxidant metallothionein reduces diabetic nephropathy. *J.Am.Soc.Nephrol.* 19, 2077-2085

Zimmet, P., Alberti, K. G., & Shaw, J. (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787

Zimny, S., Gogolin, F., Abel, J., & Gleichmann, H. (1993) Metallothionein in isolated pancreatic islets of mice: induction by zinc and streptozotocin, a naturally occurring diabetogen. *Arch.Toxicol.* 67, 61-65

SUMMARY

Glucose stimulation of insulin secretion by pancreatic β cells is essential to maintain glucose homeostasis. In addition to this short-term effect, glucose is also important to maintain β cell survival and differentiated phenotype. Indeed, both chronic hypo- and hyper-glycemia alter β -cell gene expression, survival and function. Similarly, *in vitro*, rat β -cell gene expression, function and survival are optimally preserved by culture in the presence of 10 mM glucose (G10) and markedly impaired by culture in either lower (2 or 5 mmol/l glucose, G2 or G5) or higher (30 mmol/l glucose, G30) glucose concentrations. It therefore seems that glucose stimulation exerts beneficial effects on β cell function and survival between G2 and G10 and a deleterious effect on these parameters between G10 and G30. The precise molecular mechanisms behind such phenotypical plasticity are poorly understood, but they could involve an increase in oxidative stress. Indeed, mRNA levels of oxidative stress-response genes like Metallothionein 1a/2a (*Mt1a/2a*), Heme oxygenase 1 (*Hmox1*) or *c-Myc* follow an asymmetric V-shaped profile similar to that of β cell dysfunction and apoptosis. We therefore hypothesized that extreme glucose concentrations increases oxidative stress in β cells.

In a first study, we developed a method to measure the β cell redox status in our experimental conditions. Our results showed that mt-HyPer, besides its expected sensitivity to H_2O_2 , was also highly pH-sensitive. As glucose stimulation increases mitochondrial pH in β cells, that probe could not be used in our experimental model. In contrast, the fluorescence ratio of mt-roGFP1, which measures the thiol/disulfide equilibrium, was only slightly affected by pH. Using that probe, we demonstrated that mitochondrial thiol oxidation in rat β cells reversibly increases when glucose is lowered from 10 to 2 mmol/l. In contrast, acutely increasing glucose concentration from 10 to 30 mmol/l did not increase mt-roGFP1 oxidation in β cell.

In a second study, I first demonstrated that 18 to 24h culture of rat islet cell clusters in the présence of G5 or G30 vs. G10 increases mitochondrial glutathione oxidation, thereby confirming our initial hypothesis. I also tested the effect of $ZnCl_2$, a potent inducer of *Mt1a*, on β cell alterations induced by prolonged exposure to low and high glucose concentrations. My results show that addition of 50 μM $ZnCl_2$ partially reduced mt-roGFP oxidation after 18-24h culture in G5, and tended to do so after culture in G30. Addition of 100 μM $ZnCl_2$ also significantly decreased late β -cell apoptosis after prolonged culture in G5 or G30. Theses protective effects of $ZnCl_2$ did not correct β cell dysfunction induced by culture in G5 and G30.

In a third study, using islets from *Mt1/2* knock-out mice, I wanted to determine the role of MT1/2 on the beneficial effects of Zn^{2+} . I also wanted to test whether the deficiency in *Mt1/2* increases β cell apoptosis and mitochondrial glutathione oxidation induced by culture in a low glucose concentration. In contrast with what I observed in rat islets, $ZnCl_2$, despite increasing *Mt1* expression, did not protect wild-type mouse islets from apoptosis induced by culture in a low glucose concentration, thereby preventing me from studying the role of MT1/2 expression in this effect. Moreover, deficiency in *Mt1/2* in mouse islets did not increase apoptosis induced by culture in a low glucose concentration.

These results help us to understand the molecular mechanisms underlying the plasticity of the β cell phenotype and may help in the development of new therapeutic strategies for T2D.

RESUME

La stimulation par le glucose de la synthèse et de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques est essentielle au maintien de l'homéostasie glucidique. Outre ces effets à court terme, le glucose est aussi impliqué, à plus long terme, dans la survie et le maintien du phénotype différencié des cellules β . En effet, *in vivo*, tant l'hypoglycémie soutenue que l'hyperglycémie chronique altèrent l'expression de certains gènes, la survie et la fonction des cellules β . De même, *in vitro*, l'expression des gènes, la capacité à sécréter l'insuline en réponse aux nutriments, et la survie des cellules β sont préservées de façon optimale par la culture en présence de 10 mM de glucose (G10), alors qu'elles se détériorent tant lors de la culture en présence de 2 à 5 mmol/l (G2-G5) que de 30 mmol/l de glucose (G30). Il semble donc que le glucose exerce à la fois un effet favorable sur la fonction et la survie des cellules β de rat entre 2 et 10 mmol/l, et un effet délétère sur ces mêmes paramètres entre 10 et 30 mmol/l. Les mécanismes moléculaires responsables de ces effets du glucose sur le phénotype des cellules β sont encore mal connus mais pourraient faire intervenir une augmentation du stress oxydatif. En effet, l'expression des gènes de réponse au stress oxydatif *Mt1a/2a*, *Hmox1* et *c-Myc* suit un profil en V asymétrique semblable à ceux des altérations de fonction et de survie des cellules β . Nous avons donc émis l'hypothèse que les concentrations extrêmes de glucose provoquent une augmentation du stress oxydatif dans la cellule β .

Dans un premier temps, nous avons mis au point une méthode de mesure du statut redox dans notre modèle expérimental. Nos résultats montrent que la fluorescence de la sonde mt-HyPer est, en plus d'être sensible au H_2O_2 , sensible à des modifications du pH mitochondrial des cellules β . Les changements de concentration de glucose modifiant le pH mitochondrial, cette sonde ne peut être utilisée dans notre modèle. A l'opposé, le ratio de fluorescence de la sonde mt-roGFP1 qui mesure l'équilibre thiol/disulfide dans la matrice mitochondriale est peu sensible aux variations de pH. Nous avons déterminé qu'une réduction aigüe de la concentration de glucose de 10 à 2 mmol/l dans des clusters de cellules d'îlots de rat provoque une augmentation de l'oxydation de la sonde mt-roGFP1 exprimée dans la mitochondrie. A l'inverse, une augmentation aigüe de la concentration de glucose de 10 à 30 mmol/l n'entraîne pas de modification de l'oxydation de la sonde dans la mitochondrie de la cellule β .

Dans une deuxième étude, j'ai tout d'abord démontré que 18 à 24h de culture de clusters de cellules d'îlots de rat en présence de G5 ou de G30 vs. G10 augmente l'oxydation des thiols mitochondriaux, ce qui confirme mon hypothèse de départ. J'ai également testé l'effet de l'addition de Zn^{2+} , un inducteur connu des MT1/2, sur les altérations phénotypiques des cellules β de rat induites par les concentrations extrêmes de glucose. Nos résultats montrent que l'ajout de 50 μM de $ZnCl_2$ à des cellules d'îlots de rat inhibe partiellement l'oxydation des thiols mitochondriaux provoquée par G5 et tend à diminuer celle induite par G30. L'apoptose provoquée par une culture plus prolongée en présence de G5 ou de G30 est également diminuée par l'addition de 100 μM de $ZnCl_2$. Par contre, l'effet protecteur du $ZnCl_2$ sur la survie ne corrige pas les altérations de la sécrétion d'insuline induites par la culture en présence de G5 et de G30.

Le but de ma troisième étude était de déterminer, à l'aide d'îlots de souris knock-out pour les gènes *Mt1/2* (*Mt1/2* KO), si les effets protecteurs du Zn^{2+} observés dans des îlots de rat dépendent de la stimulation d'expression des MT1/2 qu'il provoque. Je voulais également 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. Le $ZnCl_2$, bien qu'il conserve son effet inducteur de *Mt1* comme chez le rat, ne protège pas les îlots de souris contrôles de l'apoptose provoquée par la culture en présence d'une concentration faible de glucose, m'empêchant ainsi d'étudier l'impact de l'expression des MT1/2 sur cet effet. 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.

Ces résultats nous permettent d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à la plasticité du phénotype des cellules β et pourraient aider au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le DT2.