

Mémoire de Maîtrise en médecine No 243

Rôle des microARNs dans le diabète

Etudiant

Nathalie de Lambilly

Tuteur

Prof. Romano Regazzi

Dpt de Biologie Cellulaire et de Morphologie, Université de Lausanne

Expert

Prof. Dario Diviani

Dpt de Pharmacologie et de Toxicologie, Université de Lausanne

Lausanne, le 15 décembre 2011

I. Problématique.....	2
II. INTRODUCTION.....	3
II. 1. Définition du diabète	3
II.2. Masse des cellules bêta	4
II.3. Gestation : un modèle d'insulinorésistance	5
II.4. Définition d'un microARN	5
II.4.1. Biosynthèse d'un microARN	6
II.4.2. Les microARNs des modulateurs importants de l'expression génique	6
II.5. Quelques exemples du rôle de microARNs impliqués dans les tissus affectés par l'homéostasie du glucose	7
III. OBJECTIF MATERIEL ET METHODE.....	10
IV. RESULTATS.....	13
IV.1. Variations d'expression des miR-325-5p et miR-874 lors de l'analyse par microarray et RT-PCR quantitative	13
IV.2. Effet d'un changement du niveau des miR-325-5p et miR-874 sur la cellule bêta pancréatique	15
IV.3. Effet d'un changement du niveau des miR-325-5p et miR-874 sur la prolifération cellulaire bêta pancréatique	16
IV.4. Effet d'un changement du niveau des miR-325-5p et miR-874 sur la mort/survie cellulaire bêta pancréatique	18
IV.5. Effet de la surexpression du miR-325 et l'inhibition du miR-874 sur l'apoptose et la nécrose	20
V. DISCUSSION.....	24
VI. CONCLUSION.....	27
Remerciements.....	28
VII. REFERENCES.....	29

I. Problématique

Découverts en 1993 dans *Caenorhabditis elegans*, les microARNs sont une nouvelle famille de molécules, simples brin d'ARN non-codant d'environ 20 nucléotides. Ce sont des régulateurs, capables d'inhiber l'expression de gènes dans les cellules eucaryotes. Ils jouent un rôle dans d'importants processus comme la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'inflammation, et la différenciation tissulaire. C'est pour cela que des variations de la quantité de microARNs dans le corps humain peuvent engendrer diverses maladies comme le diabète, le cancer et différentes pathologies cardiovasculaires. Dans le futur, une meilleure compréhension des microARNs et de leurs mécanismes d'action pourrait aider à découvrir de nouveaux outils pour traiter ou prévenir certaines maladies. Les objectifs de ce travail étaient de faire une recherche de littérature sur les microARNs et leurs implications dans le diabète dans un premier temps, puis de poursuivre avec des manipulations de laboratoire pour mesurer l'activité et la fonction de microARNs dans la cellule bêta pancréatique dans le modèle de la gestation. La méthode utilisée pour l'étude bibliographique a été une recherche sur la base de données Pubmed. Pour les manipulations au laboratoire, deux microARNs ont été étudiés **miR-325-5p** et **miR-874**, afin d'évaluer l'impact de la surexpression ou le knock down de ces deux microARNs sur les fonctions de cellules bêta pancréatiques comme la prolifération et l'apoptose. Ces techniques étaient parfaitement au point dans le laboratoire d'accueil. En ce qui me concerne, ce travail m'a permis d'approfondir mes connaissances sur un sujet nouveau et de mettre un pied dans le milieu de la recherche fondamentale.

II. INTRODUCTION

II. 1. Définition du diabète

Aujourd'hui, le diabète touche 285 millions d'individus dans le monde. Plus alarmant, la prévision pour 2030 est une augmentation de 50%, c'est-à-dire que plus de 400 millions de personnes seront touchées par cette maladie, donc il est possible de parler d'une épidémie. Dans les pays de l'Occident, où la prévalence de cette maladie est élevée, le diabète est un problème majeur de santé publique et un fardeau économique ; mais également dans les pays en voie de développement, chez lesquels l'incidence de cette maladie monte en flèche suite à l'adoption d'un style de vie « à l'occidental ».

Le diabète sucré est caractérisé par une concentration élevée et chronique de glucose dans le sang. Ce dernier développe une toxicité sur le long terme sur les capillaires, les nerfs et les artères, ce qui peut provoquer des complications cardio-vasculaires avec des lésions irréversibles des micro-vaisseaux dans la rétine et les reins et des vaisseaux plus larges qui irriguent le cerveau, le cœur et les jambes. Il est pour cela la cause principale de cécité chez l'adulte, d'insuffisance rénale, d'amputations non-traumatiques des membres inférieurs et des décès dus aux maladies cardiovasculaires.

Plusieurs formes de diabète existent; le diabète de type 1, le diabète de type 2, le diabète gestationnel, le diabète secondaire, le diabète mitochondrial, mais nous allons commenter les trois premiers types parce qu'ils sont plus répandus. Le diabète de type 1, aussi appelé diabète insulino-requérant, est caractérisé par une destruction des cellules bêta qui produisent l'insuline dans le pancréas suite à une réaction auto-immune. Ce type de diabète touche essentiellement les enfants et les jeunes adultes. Le diabète de type 2 ou non insulino-requérant est le résultat d'une résistance à l'insuline dans les muscles, le tissu adipeux et le foie, et d'un dysfonctionnement dans le pancréas des cellules bêta qui deviennent incapables de produire l'insuline en quantités nécessaires. Il est associé au style de vie occidental avec l'augmentation de l'obésité, de la sédentarité et également le vieillissement de la population. Ce type de diabète survient surtout chez la personne de plus de 40 ans, mais son incidence s'accroît aussi chez les jeunes. Le diabète gestationnel se définit par une résistance à l'insuline de la femme enceinte afin de suppléer les besoins énergétiques requis pour le fœtus et sa croissance qui n'est pas compensée par une augmentation de la production d'insuline par les cellules bêta. Il apparaît en général au cours du 2ème-3ème trimestre et disparaît rapidement après l'accouchement. Les femmes ayant développé un diabète gestationnel sont plus à risque de manifester ultérieurement un diabète de type 2.

Le diabète de type 2 n'est pas une maladie douce, même si la personne atteinte reste souvent durant une longue période asymptomatique ; l'hyperglycémie chronique cause de multiples complications micro- et macro-vasculaires (énumérées ci-dessus). Aujourd'hui, aucun traitement ne permet de guérir définitivement le diabète de type 2. Plus la maladie est diagnostiquée tôt, plus les mesures de prise en charge seront efficaces et moins grand sera le risque de développer les complications du diabète. Idéalement, le dépistage de manifestations infra cliniques plusieurs années avant que les premiers symptômes apparaissent serait à entrevoir. Sur le fléau qu'est le diabète dans notre société, la recherche focalise son intérêt en essayant de développer des outils qui permettraient une détection précoce et des approches thérapeutiques nouvelles pour retarder ou guérir la maladie. Pour cela, les mécanismes physiologiques impliqués dans l'homéostasie de l'insuline au niveau cellulaire et moléculaire sont en jeux.

II.2. Masse des cellules bêta

Essentielle pour l'absorption du glucose dans les cellules et le maintien de la glycémie à des valeurs physiologiques étroites est l'insuline, hormone produite par les cellules bêta dans les îlots pancréatiques. Il existe trois manières d'aboutir à une sécrétion augmentée d'insuline ; la prolifération des cellules bêta, avec l'élévation de leurs nombres à partir de cellules précurseurs, la sécrétion d'insuline, avec l'augmentation des voies de signalisations et la diminution de l'apoptose ou le renforcement de la survie cellulaire. L'altération de la production d'insuline due à une réduction de la masse fonctionnelle des cellules bêta est une cause importante de diabète.

L'expansion des cellules bêta est activée par de multiples facteurs de croissance, comme le glucose, l'insuline, le GLP-1 (glucagon like peptide 1), le GIP (gastric inhibitory polypeptide), la GH (hormone de croissance), l'IGF 1-2 (facteur de croissance semblable à l'insuline), la prolactine, l'œstrogène, l'EGF (facteur de croissance épidermique) et la gastrine [1,2]. Ces facteurs de croissance agissent sur la masse des cellules bêta via l'activation des voies de signalisation qui aboutissent à l'activation de facteurs de transcription avec des changements d'expression de gènes qui codent pour des programmes de différenciation cellulaire, de prolifération et d'apoptose .

L'administration d'Exendin-4 un analogue fonctionnel du GLP-1 chez la souris prédiabétique db/db âgée de 2 semaines entraîne une augmentation de la prolifération et une diminution de l'apoptose des cellules bêta [1]. Le GLP-1 entraîne l'activation via IRS-2 de la voie de l'AMPc-PKA pour favoriser la réplication des cellules bêta et prévenir leur apoptose [2]. Des approches thérapeutiques impliquant la préservation de la masse fonctionnelle des cellules bêta sont potentiellement des outils dans les traitements futurs du diabète de type 2.

Un stimulus intense et physiologique de l'expansion de la masse des cellules bêta reste la gestation.

II.3. Gestation : un modèle d'insulinorésistance

Au cours de la grossesse, il se développe de manière progressive et transitoire une insulinorésistance associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline des tissus maternels, ce qui résulte en une augmentation de la masse des cellules bêta en parallèle [3-6]. Cette expansion cellulaire répond à une demande physiologique afin d'assurer une glycémie adaptée, suite à un besoin nutritif plus accru pour la croissance du fœtus. Mais dans certains cas, cette réponse physiologique est altérée, la sécrétion d'insuline ne suffit pas et la situation peut évoluer en un état pathologique, un diabète gestationnel. Le même schéma s'observe avec l'insulino-résistance liée à l'obésité pouvant évoluer vers un diabète de type 2, lorsque la production d'insuline n'arrive plus à atteindre le niveau adapté à l'homéostasie correcte du glucose [2,4,5].

L'adaptation des cellules bêta résultant d'une insulino-résistance est certainement associée à une surexpression et/ou une diminution de certains gènes impliqués dans des mécanismes de prolifération et de survie/mort cellulaire. Jusqu'à maintenant beaucoup d'importance avait été accordée aux facteurs de transcription qui régulent l'expression génique dans la cellule. Mais récemment, de nombreuses études ont démontré que le dérèglement du niveau d'une nouvelle classe de molécules appelées microARNs dans le corps de l'homme pourrait avoir un lien avec l'expression des gènes et avec l'apparition et l'évolution de diverses maladies chroniques comme le diabète, le cancer et les problèmes cardiovasculaires, pour ne citer que les pathologies les plus fréquentes dans notre société.

II.4. Définition d'un microARN

Les microARNs ont été découverts pour la première fois en 1993 dans un nématode, *Caenorhabditis elegans*, puis dans diverses cellules eucaryotes [7]. Il est aujourd'hui clair que chaque cellule de mammifères possède des centaines de microARNs.

Les microARNs sont une nouvelle famille de molécules, qui agissent comme régulateurs post-transcriptionnel de l'expression génique en bloquant la translation d'un ARNm cible. Ils sont présents dans les cellules eucaryotes sous la forme d'un microARN simple brin de 21-25 nucléotides [7,8]. Ils jouent un rôle important dans les mécanismes de prolifération, d'apoptose, de différenciation tissulaire, d'inflammation, etc...

II.4.1. Biosynthèse d'un microARN

Dans le noyau de la cellule, le précurseur primaire du microARN est transcrit en un **pri-microARN** par une enzyme, l'**ARN polymérase II**, le plus généralement à partir de gènes indépendants ou, parfois, il peut être généré à partir de séquences introniques.

Il en résulte un **pri-microARN** qui se replie pour obtenir une structure particulière en tige-boucle par complémentarité de bases discontinues de ses deux extrémités. Pris en charge par l'enzyme **Drosha-DGCR8**, le **pri-microARN** est clivé en un **pré-microARN** dans la voie canonique [8]. Dans la voie non-canonique, les différentes étapes aboutissent à un même **pré-microARN**, dont la dernière étape consiste en un épissage par le complexe enzymatique **Splicéosome**. Toujours en structure tige-boucle, le **pré-microARN** est transporté dans le cytosol par l'exportine 5, un transporteur GTP-dépendant. Il est ensuite traité par l'enzyme **Dicer-TRBP** pour devenir un **microARN/microARN***, un duplex long de 22-25 paires de bases dont le **microARN** simple brin 5' est associé à l'**ARN-induced silencing complex**. Généralement, le **microARN** simple brin 5' est conservé et agit sur les ARNm cibles par complémentarité de bases. Le **microARN** simple brin 3' ou * est dégradé. Mais il arrive que ce soit le **microARN** simple brin 3' qui se lie à l'ARNm cible, dans ce cas-là, les deux microARNs simples brins 3' et 5' sont conservés et agissent de manière agoniste ou antagoniste sur les ARNm cibles. Seul un **microARN** simple brin est reconnu fonctionnel par la cellule; si celui-ci reste dans une structure en double brin il est immédiatement repéré et dégradé par la cellule.

II.4.2. Les microARNs des modulateurs importants de l'expression génique

L'extrémité 3' non traduite (3'-UTR) des ARNm sont les cibles des microARNs. Ceux-ci associés au complexe RISC se lient à ces régions 3'-UTR et agissent soit en empêchant la traduction de l'ARNm, soit en dégradant l'ARNm cible, ce qui mène dans les deux cas à la diminution, voire l'arrêt de la synthèse protéique [7,8]. De cette manière, un seul microARN peut agir sur des centaines d'ARNm cibles. Ceci explique comment plus d'un tiers de l'expression génique chez l'homme est potentiellement contrôlée par les microARNs.

II.5. Quelques exemples du rôle de microARNs impliqués dans les tissus affectés par l'homéostasie du glucose

Mir-375 est l'un des premiers microARN trouvé agissant comme régulateur dans les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas. Il est impliqué dans la sécrétion d'insuline glucose-induite par la régulation négative de la myotrophine, protéine importante pour la libération des neurotransmetteurs catécholamines dans le cerveau et de l'insuline dans le pancréas. La myotrophine est une cible directe de miR-375 qui se lie à l'extrémité 3'-UTR de son ARNm et inhibe ainsi l'expression de la protéine.

Chez les souris possédant une délétion homozygote du miR-375, Poy et al. [9] ont mesuré une plus forte concentration de glucose dans le sang. Ceci s'explique parce que non seulement miR-375 inhibe la sécrétion d'insuline et la prolifération des cellules-bêta, mais aussi stimule la sécrétion de glucagon, une molécule avec la fonction antagoniste de l'insuline. De manière plus démonstrative, chez des souris obèses, la suppression de miR-375 conduit à une insuffisance pancréatique endocrine et à un état clinique de diabète grave à cause de l'incapacité des cellules bêta à proliférer [10].

Le contrôle du niveau de myotrophine dans les cellules bêta n'est pas seulement régi par le miR-375. Plusieurs microARNs aident également à coordonner délicatement l'expression de cette protéine, miR-124a est un exemple. MiR-124a est principalement exprimé dans le cerveau et dans le pancréas, où il joue un rôle dans la différenciation des cellules bêta, la sécrétion d'insuline et le métabolisme du glucose [10]. MiR-124a agit sur différentes cibles soit directement comme avec Rab27 en inhibant son expression, soit indirectement comme avec SNAP25, Rab3A, Synapsin-1A en stimulant leur production, ou encore comme avec Noc2 en inhibant son expression [10]. La surexpression du miR-124a dans les cellules MIN6, un modèle de cellules bêta provenant de la souris, conduit à une sécrétion accrue d'insuline en condition basale, mais à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à des stimuli d'élévations de concentrations de glucose, ce qui révèle un dérèglement de l'homéostasie endocrinienne aux variations de glycémies [10].

Mir-124a est également impliqué dans le développement du pancréas et la différenciation des cellules bêta dans les stades précoces de l'embryogenèse. Ainsi, dans les cellules bêta MIN6, miR-124a se lie à un facteur de transcription cible Foxa2 qui régule l'expression de trois protéines spécifiques, PDX-1, Kir6.2 et Sur-1, avec pour rôle le développement des cellules bêta pancréatiques [7,10].

MiR-9, exprimé dans le pancréas et le cerveau, régule l'exocytose de l'insuline glucose-induite en se liant à l'ARNm du facteur de transcription Onecut2 et en réduisant la production de cette protéine qui contrôle le niveau d'un constituant important de la machinerie d'exocytose d'insuline, la protéine Granophilin [7,10,11].

Les microARNs ne jouent pas seulement un rôle pour la production et la sécrétion d'insuline, mais agissent également dans les mécanismes d'absorption du glucose dans les cellules des tissus cibles de l'insuline comme le muscle, le tissu adipeux et le foie.

Les premières études ont montré que deux membres de la famille des miR-29, miR-29a et miR-29b étaient plus exprimés dans les muscles squelettiques de rats Goto kakizaki, un modèle non obèse du diabète de type 2 [13]. Des expériences complémentaires ont montré que les concentrations de miR-29a et miR-29b étaient augmentées dans les trois tissus cibles de l'insuline impliqués dans le transport du glucose, le muscle, le tissu adipeux et le foie des modèles de rats diabétiques. Une exposition à des concentrations élevées de miR-29 produit le même effet qu'une résistance à l'insuline des cellules incubées avec des concentrations élevées de glucose et d'insuline [13]. De même, les concentrations de miR-29a et miR-29b étaient augmentées dans la lignée adipocytaire 3T3-L1 quand elle était exposée à des quantités de glucose et d'insuline élevées. Les molécules Insig1 et CAV2 sont deux cibles directes de miR-29 [13].

Dans le tissu adipeux, l'expression de miR-143 contrôle la différenciation des cellules adipocytaires [14]. Un manque de miR-143 conduit à un métabolisme des graisses diminué, avec une accumulation de triglycérides.

Dans l'article de Trajkovski et al [15], il est démontré que l'expression des microARNs miR-103 et miR-107 sont surexprimés chez le modèle de souris obèses. Mir-103 et miR-107 inhibent de manière directe le gène cible cavéoline-1, un régulateur essentiel du récepteur à l'insuline. La diminution des niveaux d'expression des mir-103 et miR-107 conduit à une amélioration de l'homéostasie du glucose et de la sensibilité des cellules à l'insuline. Dans les adipocytes, la cavéoline est stimulée lors de l'inhibition des miR-103 et miR-107 cela aboutit à une stabilisation du récepteur à l'insuline et une amélioration des voies de signalisation en aval du récepteur à l'insuline, qui se révèle dans le tissu adipeux par une diminution de la taille des cellules grasses et une meilleure absorption du glucose par celles-ci. En revanche, lors de la surexpression des miR-103 et miR-107 dans le foie et la graisse, une altération de l'homéostasie du glucose est induite dans ces deux tissus.

Les niveaux de certains microARNs changent également dans les tissus pathologiques lors de complications dues au diabète de type 2, comme par exemple dans le cœur.

Dans le coeur d'un organisme atteint de diabète, le changement du niveau de miR-133 peut révéler un syndrome du QT long ou une hypertrophie cardiaque [10,12].

Le syndrome du QT long est défini par un allongement de la distance QT sur un électrocardiogramme associé à un haut risque de fibrillation ventriculaire qui peut conduire à une syncope, un arrêt cardiaque, voir même la mort subite. HERG code pour un canal potassique cardiaque et est la cible de miR-133 [10,12]. Lors d'augmentation de la concentration de miR-133, HERG est réprimé par le microARN et conduit ainsi à la diminution de la densité des canaux potassiques, ce qui aboutit à un courant d'ions K⁺ diminué avec une dépolarisation cardiaque défectueuse et des arythmies associées au syndrome du QT long.

L'hypertrophie cardiaque est caractérisée par un épaissement du muscle cardiaque, souvent associée à une tension artérielle élevée, complication majeure du diabète de type 2. Ici, contrairement au syndrome du QT long induit par une augmentation du niveau du miR-133, l'inhibition par des antagonistes de la quantité de miR-133 a une importante et durable conséquence sur l'hypertrophie cardiaque [10,12]. Dans ce cas, le miR-133 cible trois gènes qui agissent dans le développement de l'hypertrophie cardiaque; RhoA et cdc42 deux protéines d'échange GDP-GTP et Nelf-A/WHSC2, un facteur nucléaire.

Puisque le miR-133 est globalement plus exprimé dans le coeur d'une personne atteinte de diabète, cela conduit à envisager que le syndrome du QT long est une complication du diabète plus directement en lien avec l'altération du niveau du miR-133.

III.1. Objectif

Le projet dans lequel je m'intègre est celui d'une doctorante Cécile Jacovetti. Il concerne l'expansion de la masse des cellules bêta des îlots de Langerhans et le rôle des microARNs possiblement impliqués dans ce processus d'adaptation à l'insulino-résistance transitoire développée pendant la période gestationnelle. Chez la ratte, le pic d'expansion de la masse des cellules bêta apparaît au 14^{ème} jour de gestation. La comparaison entre les îlots de Langerhans isolés au 14^{ème} jour chez quatre rattes gestantes et quatre rattes non-gestantes a permis d'identifier par microarray et real-time qPCR les microARNs dont le niveau d'expression change durant la grossesse. Ainsi, six microARNs sont caractérisés, miR-144, miR-325-5p et miR-451 dont les niveaux sont augmentés et miR-218, miR-338-3p et miR-874 dont les niveaux sont diminués. Un microARN miR-338-3p attire particulièrement l'attention. En effet le niveau de celui-ci diminue non seulement chez le modèle de la ratte gestante mais également chez le modèle prédiabétique de la souris db/db qui n'exprime pas de récepteur à la leptine et où une insulino-résistance est attendue. Dans ce travail de master, nous étudierons deux microARNs miR-325-5p et miR-874 et leur impact sur la fonction de la cellule bêta en ce qui concerne la prolifération et la mort/survie cellulaire. Nous utiliserons des oligonucléotides modifiés mimant miR-325-5p et antisens miR-874 pour augmenter et respectivement diminuer leur expression dans des cellules cultivées in vitro afin de reproduire les conditions trouvées in vivo durant la gestation.

III.2. Matériel et méthode

Nous travaillons in vitro sur des cellules INS832/13 fournies par le Dr. Chris Newgard (Duke University Medical Center, Durham, NC). Il s'agit d'une lignée tumorale d'insulinome de rat qui garde les propriétés des cellules bêta du pancréas en ce qui concerne la prolifération, la survie/l'apoptose et la sécrétion d'insuline. Nous avons cultivés les INS832/13 au nombre de 55'000-100'000 cellules par puit sur plaque 24-well. Le milieu utilisé est RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté avec pénicilline à 50 U/ml, Streptomycine à 50 microg/ml, Fetal Calf Serum à 10%, Sodium Pyruvate à 1 mM, bêta-Mercaptoethanol à 50 microM et Hepes à 10 mM.

Transfection des cellules. Nous avons transfecté les cellules INS832/13 via Lipofectamine 2000 (Invitrogen) avec 30 pmol d'oligonucléotides. Nous avons utilisé afin de surexprimer miR325-5p un oligonucléotide double brin (OligomiR) dont la séquence sens est 5' -CCU-AGU-AGG-UGC-UCA-GUA-AGU-GU- 3' et la séquence antisens 5' -ACA-CUU-ACU-GAG-CAC-CUA-GG- 3' (Eurogentec) et afin d'inhiber miR-874 un oligonucléotide simple brin antisens (anti-miR) permettant de spécifiquement cibler le miR-874 (Anti-hsa-miR-874) dont la séquence sens est 5' -

CUG-CCC-UGG-CCC-GAG-GGA-CCG-A- 3' (Qiagen). Pour les expériences avec l'anti-miR nous avons utilisé comme contrôle le miScript Inhibitor Negative Control dont le numéro de catalogue est MSY0002505 (Qiagen). Comme contrôle pour les expériences avec les duplex nous avons utilisé un siRNA dirigé contre la Green Fluorescent Protein (siGFP) dont la séquence sens est **5' - GAC-GUA-AAC-GGC-CAC-AAG-UUC- 3'** et la séquence antisens est **5' -ACU-UGU-GGC-CGU-UUA-CGU-CGC- 3'** (Eurogentec). Dans certaines expériences nous avons aussi testé en parallèle l'effet d'un duplex permettant la surexpression de miR-451 dont la séquence sens est **5' -AAA-CCG-UUA-CCA-UUA-CUG-AGU-U- 3'** et la séquence antisens est **5' -AAC-UCA-GUA-AUG-GUA-ACG-GUU-U- 3'** (Eurogentec).

Test de l'apoptose avec Hoechst 33342. Les cellules INS832/13 sont cultivées à une densité de 100'000 cellules par puits sur plaque 24-well. Puis de manière transitoire, les cellules INS832/13 sont transfectées avec les OligomiRs, Anti-control, **Anti-hsa-miR-874**, siGFP, **miR-325-5p** et miR-451. Pour induire l'apoptose, nous avons ajouté pendant 24 heures un mélange de cytokines comportant TNF-alpha 10 ng/ml, IL-1-bêta 0,1 ng/ml et IFN-gamma 30 ng/ml, ces concentrations se rapprochent de valeurs physiologiques afin de mimer le stress que subissent les cellules dans leur environnement in vivo dans le cas d'une inflammation chronique. Puis, les cellules INS832/13 sont incubées pendant 1 minute dans Hoechst 33342 (Invitrogen) à la dilution de 1/1000 et PBS, un tampon phosphate isotonique contenant NaCl à 135 mM, KCl à 1,3 mM, Na₂HPO₄ à 3,2 mM, KH₂PO₄ à 0,5 mM et pH de 7,4. Les noyaux pycnotiques s'allument au microscope à fluorescence car le Hoechst 33342 se lie aux histones de l'ADN des cellules en apoptose. A l'objectif x40, nous avons compté le nombre de cellules fluorescentes et le nombre total de cellules dans 5 champs différents par condition. Nous calculons finalement le pourcentage de cellules INS832/13 apoptotiques.

Test de prolifération. Les cellules INS832/13 sont cultivées sur lamelle de verre (coverslip) à une densité de 55'000 cellules par puits sur plaque 24-well. La PRL qui est utilisée comme contrôle positif pour notre test est un puissant stimulus de la prolifération des cellules bêta. De manière transitoire, les cellules INS832/13 sont transfectées avec les OligomiRs, Anti-control, **Anti-hsa-miR-874**, siGFP et **miR-325-5p**. Nous avons ajoutés la PRL dont le numéro de catalogue est L6520 (Sigma) à 500ng/ml pendant 48h dans une des cinq conditions. Nous avons ensuite effectué une analyse immunocytochimique des cellules. Nous avons fixé les cellules INS832/13 au méthanol froid, puis nous les avons incubées pendant 30 minutes avec 1% BSA (albumine sérique bovine) dans un tampon PBST contenant NaCl à 135 mM, KCl à 1.3 mM, Na₂HPO₄ à 3.2 mM, KH₂PO₄ à 0.5 mM, Tween 20 à 0.05% et pH à 7.4. Nous les avons ensuite incubées avec l'anticorps primaire

dirigé contre la protéine Ki67 (Abcam, numéro de catalogue ab66155) à la dilution de 1/1500 pour 1 heure à température ambiante. La protéine Ki67 est produite lors de la prolifération cellulaire au cours des phases tardives du cycle cellulaire G1, S, G2 et M, alors que dans la phase G0 cet antigène n'est pas exprimé. Il est principalement localisé dans le noyau, dans le chromosome dans la phase G1 et dans la région périnucléolaire dans les phases ultérieures. Puis nous avons ajouté un anticorps secondaire Alexa Fluor 448 (Invitrogen) à la dilution de 1/400 pendant 1 heure à température ambiante dans le noir afin de marquer par immunofluorescence les sites de fixation de l'anticorps primaire Ki67. Nous avons pour finir incubé pendant 10 minutes les cellules avec le Hoechst 33342 (Invitrogen) à une dilution de 1/1000 pour marquer et compter les noyaux, donc le nombre total de cellules. Les cellules en mitose s'allument au microscope à fluorescence car le Ki67 se lie aux chromosomes en division. A l'objectif x40, nous avons compté le nombre de cellules fluorescentes et le nombre total de cellules dans 5 champs différents par condition. Nous avons finalement calculé en ration % de cellules INS832/13 prolifératives/totales.

Test d'apoptose. Les cellules INS832/13 sont cultivées sur lamelle de verre (coverslip) à une densité de 60'000 cellules par puits sur plaque 24-well. Puis de manière transitoire, les cellules INS832/13 sont transfectées avec les OligomiRs, Anti-control, **Anti-hsa-miR-874**, siGFP, **miR-325-5p** et miR-451. Pour induire l'apoptose, nous avons ajouté pendant 24 heures un mélange de cytokines comportant TNF-alpha 10 ng/ml, IL-1-bêta 0,1 ng/ml et IFN-gamma 30 ng/ml. Ensuite, les cellules INS832/13 sont incubées pendant 5 minutes à température ambiante, dans le noir, avec de l'Annexine V-EGFP (Biovision) à une dilution de 1/100, Iodure de Propidium (Biovision) à une dilution de 1/100, Hoechst 33342 (Invitrogen) à une dilution de 1/1000 dans du « Binding Buffer » (Biovision). A l'objectif x40, avec différents filtres (GFP, Rhodamine et DAPI) nous avons compté le nombre de cellules fluorescentes marquées en vert par l'annexine V-EGFP (cellules en apoptose) et en rouge par l'Iodure de Propidium (cellules en nécrose) et l'avons rapporté au nombre total de cellules présentes dans 5 champs différents par condition. Nous avons ensuite calculé le pourcentage de cellules INS832/13 en apoptose/totales et en nécrose/totales.

Statistiques. Analyse de la variance (ANOVA) et test de Dunnet. Résultats significatifs avec $p < 0,05$.

IV. RESULTATS

IV.1. Variations d'expression des **miR-325-5p** et **miR-874** lors de l'analyse par microarray et RT-PCR quantitative

Pour étudier l'implication des microARNs dans l'expansion compensatoire de la masse des cellules bêta, une analyse par biopuce Microarray a d'abord été effectuée afin d'obtenir le profil d'expression des microARNs dont le niveau change dans les îlots pancréatiques chez les rattes au 14^{ème} jour de gestation (pic d'expansion de la masse des cellules-bêta) par rapport aux rattes non-gestantes. Cette approche permet de mesurer le niveau d'un grand nombre de microARNs différents (environ 400) et a permis d'identifier **miR-325-5p** et **miR-874**, les deux microARNs étudiés dans ce travail, dont l'expression augmente de 2,86 fois (**miR-325-5p**) et diminue de 6,45 fois (**miR-874**) durant la gestation dans le modèle du rat.

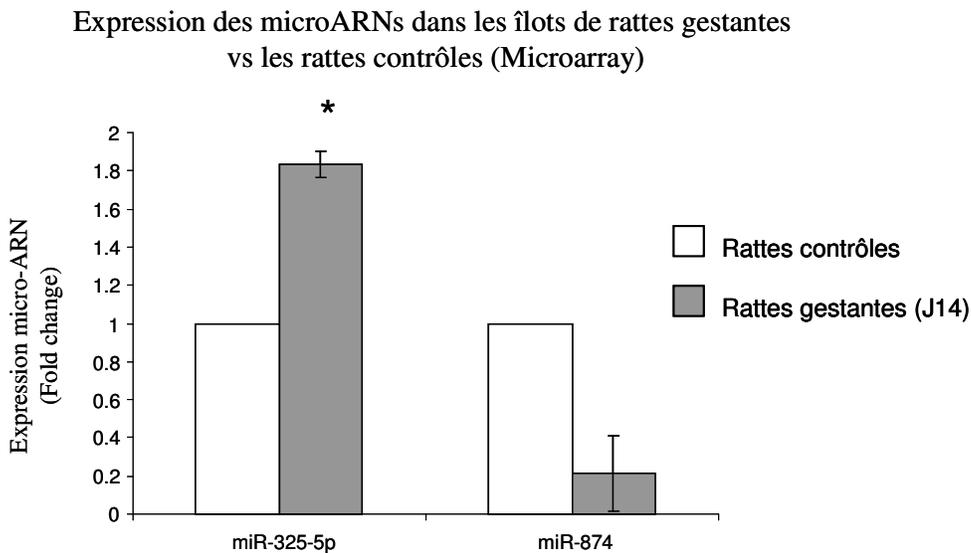


Figure 1. Variations d'expression des **miR-325-5p et **miR-874** détectées lors de l'analyse par microarray des îlots de rattes gestantes au 14^{ème} jour de gestation versus ceux de rattes non gestantes.** Les résultats sont exprimés en fold change. Les îlots pancréatiques isolés de 4 rattes gestantes sont indiqués en blanc et de 4 rattes non-gestantes en gris. Les astérisques * indiquent que les résultats sont significatifs par rapport au contrôle avec $p < 0.05$.

Les résultats obtenus par analyse sur micropuce ont été confirmés par une analyse RT-PCR quantitative pour **miR-325-5p** et **miR874**.

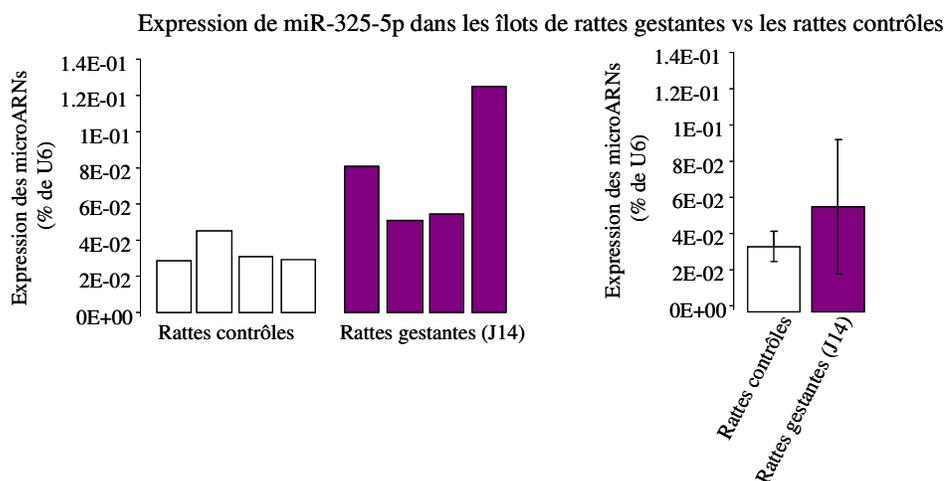


Figure 2. Variations d'expression du miR-325-5p par analyse RT-PCR quantitative chez les rattes gestantes versus non gestantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage du niveau de U6 (valeur normalisée), en logE. Les résultats des quatre rats pris séparément à gauche et la moyenne des 4 rats avec déviation standard à droite. Le test statistique a été réalisé par une analyse de la variance (ANOVA) et un test de Dunnett.

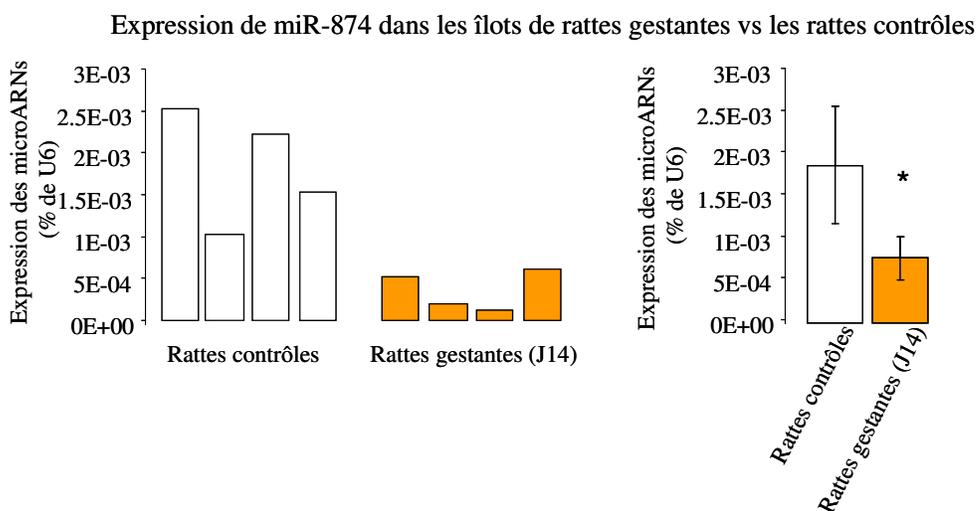


Figure 3. Variations d'expression du miR-874 par analyse RT-PCR quantitative chez les rattes gestantes versus non gestantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage du niveau de U6 (valeur normalisée), en logE. Les résultats des quatre rats pris séparément à gauche et la moyenne des 4 rats avec déviation standard à droite. L'analyse statistique a été réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) et un test de Dunnett. L'astérisque * indique que le résultat est significativement différent par rapport au contrôle avec $p < 0.05$.

Les résultats sur la figure 2 montrent que l'expression de miR-325-5p augmente de 1,39 fois chez les rattes gestantes par rapport aux rattes contrôles non-gestantes. Ils ne sont pas significatifs parce que nous avons obtenu une grande variabilité interindividuelle. Les résultats sur la figure 3 montrent que l'expression de miR-874 diminue significativement de 2,5 fois chez les rattes gestantes par rapport aux rattes contrôles non-gestantes.

IV.2. Effet d'un changement du niveau des **miR-325-5p** et **miR-874** sur la cellule bêta pancréatique

Afin de tester le rôle fonctionnel de ces deux microARNs dans les cellules insulino-sécrétrices nous avons d'abord vérifié si à l'aide d'oligonucléotides il était possible de surexprimer ou de diminuer spécifiquement le niveau des microARNs d'intérêt. Nous avons donc quantifié l'expression du **miR-325-5p** et du **miR-874** dans le modèle de lignée cellulaire INS832/13 issu du rat, préalablement transfectées avec les **OligomiR 325-5p** ou avec l'**anti-miR-874**.

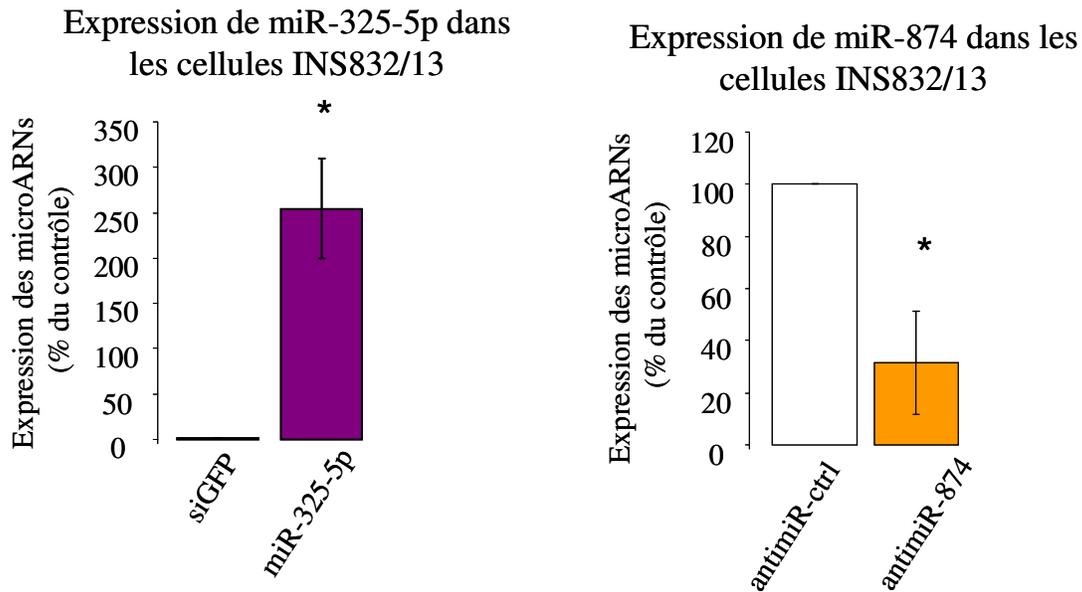


Figure 4. Efficacité de la surexpression du **miR-325-5p et de la diminution du **miR-874** dans les cellules INS832/13.** A gauche : la moyenne des résultats de 3 expériences indépendantes avec déviation standard. Le contrôle est siGFP. A droite : la moyenne des résultats de 4 expériences indépendantes avec déviation standard. Le contrôle est anti-miR-ctrl. L'analyse statistique a été réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) et un test de Dunnett. L'astérisque * indique que le résultat est significativement différent par rapport au contrôle avec $p < 0.05$.

Les résultats présentés dans les figures 1 à 4 ont été obtenus par Cécile Jacovetti, une étudiante en doctorat qui supervisait mon travail, en amont de mon arrivée au laboratoire.

Mon travail a consisté à déterminer si les microARNs **miR-325-5p** et **miR-874** sur-exprimé et sous-exprimé respectivement durant la gestation, ont un impact fonctionnel concernant la prolifération et la mort/survie cellulaire de la cellule bêta du pancréas. La surexpression du niveau du microARN **miR-325-5p** a été réalisée en transfectant de manière transitoire les cellules INS832/13 avec un duplex d'ARN correspondant à la forme mature du microARN **miR-325-5p**. L'inhibition du niveau du microARN **miR-874** a été obtenue en transfectant de manière transitoire

les cellules avec un oligonucléotide antisens simple brin, correspondant à la séquence inverse et complémentaire du **miR-874** pouvant ainsi l'appareiller et inhiber son expression et son activité.

IV.3. Effet d'un changement du niveau des **miR-325-5p** et **miR-874** sur la prolifération cellulaire bêta pancréatique

Afin d'évaluer l'influence d'un changement de niveau du **miR-325-5p** et du **miR-874** sur la prolifération, nous avons effectué un test (Ki67) avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine Ki67 exclusivement exprimée dans le noyau des cellules lorsqu'elles prolifèrent.

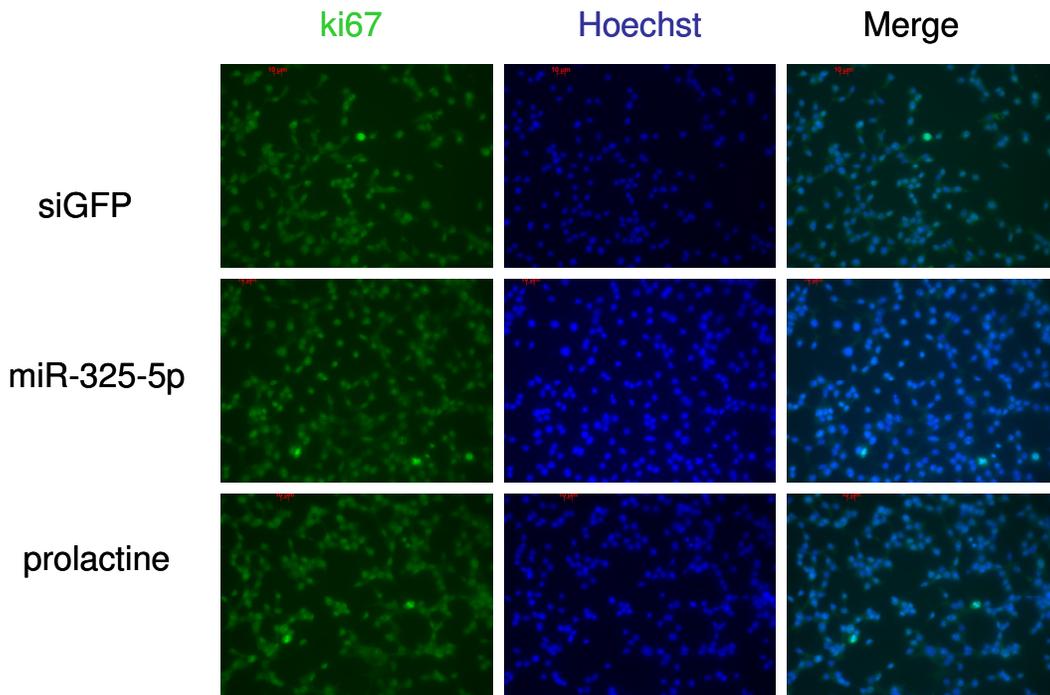


Image 1. Impact de la surexpression du **miR-325-5p sur la prolifération des cellules INS832/13.** Après transfection avec le **miR-325-5p** à 30 pmol, les cellules sont fixées sur des lamelles de verre. Les cellules prolifératives sont détectées grâce à un anticorps primaire ki67 couplé à un anticorps secondaire Alexa Fluor 448 fluorescent (fluorescence verte). Les noyaux sont marqués avec du Hoechst 33342 couplé au DAPI (fluorescence bleue). Les cellules sont observées par microscopie à épifluorescence à l'objectif x40. Nb: Toutes les cellules montrent un faible marquage vert même si elles ne prolifèrent pas car les cellules-bêta auto-fluorescent en vert.

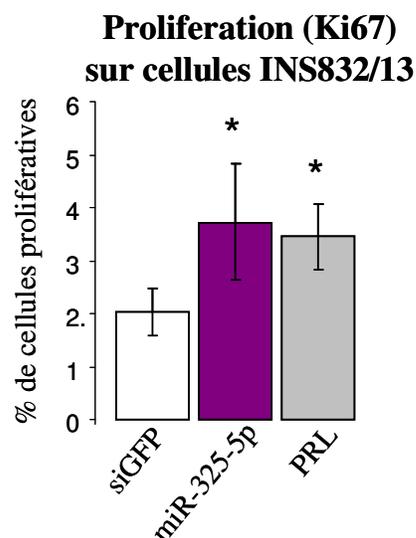


Figure 5. Impact de la surexpression du miR-325-5p sur la prolifération des cellules INS832/13. La prolactine (500ng/ml, pendant 48h) qui est connue pour promouvoir la prolifération cellulaire, est utilisée comme contrôle positif. Les résultats sont la moyenne des valeurs brutes avec déviation standard pour 4 expériences indépendantes. Les conditions avec le miR-325-5p surexprimé et la PRL sont significativement différentes par rapport au contrôle siGFP. L'analyse statistique a été réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) et un test de Dunnett. Les astérisques * indiquent que les résultats sont significativement différents par rapport au contrôle siGFP avec $p < 0.05$.

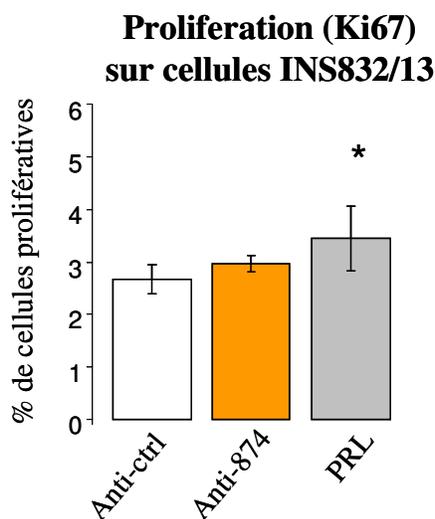


Figure 6. Impact de l'inhibition du miR-874 sur la prolifération des cellules INS832/13. La prolactine (500ng/ml, pendant 48h) qui est connue pour promouvoir la prolifération cellulaire, est utilisée comme contrôle positif. Les résultats sont la moyenne des valeurs brutes avec déviation standard de 4 expériences indépendantes. La condition avec le miR-874 inhibé ne montre pas de différence significative par rapport au contrôle anti-miR-ctrl. L'analyse statistique a été réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) et un test de Dunnett. L'astérisque * indique les résultats significativement différents par rapport au contrôle siGFP avec $p < 0.05$.

Parmi les résultats obtenus (figures 5 et 6), la surexpression du niveau de **miR-325-5p** conduit de manière intéressante à une augmentation significative de 1,85 fois du pourcent de cellules entrant en prolifération par rapport à la condition contrôle avec siGFP. Tandis que l'inhibition du **miR-874** n'a pas eu d'incidence sur la prolifération cellulaire, alors que comme attendu nous avons obtenu une augmentation de la prolifération cellulaire avec la PRL.

IV.4. Effet d'un changement du niveau des **miR-325-5p** et **miR-874** sur la mort/survie cellulaire bêta pancréatique

Afin d'évaluer l'influence d'un changement du niveau du **miR-325-5p** et du **miR-874** sur la mort/survie cellulaire, nous avons effectué un test au Hoechst 33342. Le Hoechst 33342 est un colorant fluorescent qui marque les histones de l'ADN dans les noyaux des cellules en apoptose. Pour tester le rôle protecteur potentiel des microARNs que nous étudions, nous avons mis les cellules INS832/13 en condition de stress, en les incubant pendant 24 heures avec un mix de cytokines comprenant TNF-alpha, IL-1-bêta et IFN-gamma. La fraction des cellules apoptotiques est déterminée en comptant les cellules présentant un noyau pycnotique sur les cellules totales.

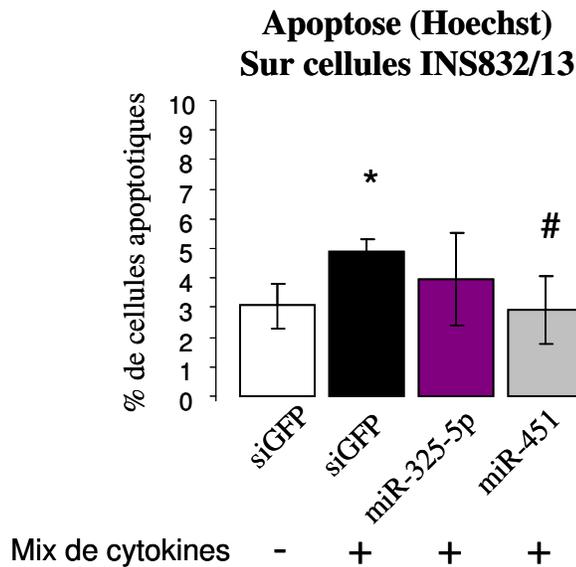


Figure 7. Impact de la surexpression du **miR-325-5p sur la survie des cellules INS832/13.** Les cellules ont été transfectées avec les oligonucléotides indiqués et ensuite incubées en absence (-) ou en présence d'un mix de cytokines (+) pendant 24h. Les résultats sont la moyenne des valeurs brutes avec la déviation standard de 4 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) et un test de Dunnett. L'astérisque * indique que les résultats sont significativement différents par rapport au contrôle siGFP- avec $p < 0.05$. Le dièse # indique que le résultat est significativement différent par rapport au contrôle positif siGFP+ avec $p < 0.05$.

Apoptose (Hoechst) Sur cellules INS832/13

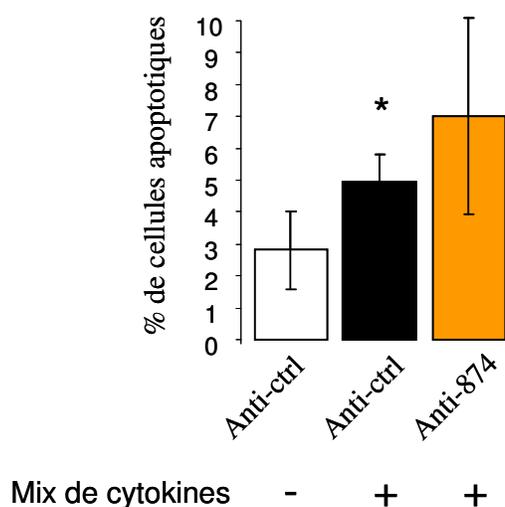


Figure 8. Impact de l'inhibition du miR-874 sur la survie des cellules INS832/13. Les cellules ont été transfectées avec les anti-miRs indiqués et ont ensuite été incubées en absence (-) ou en présence du mix de cytokines (+) pendant 24h. Les résultats sont la moyenne des valeurs brutes avec la déviation standard de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) et un test de Dunnett. Le résultat est non significatif, Anti-874 n'est pas différent d'anti-ctrl +.

Parmi les résultats obtenus (figures 7 et 8), la surexpression du niveau du **miR-325-5p** montre une tendance sensible sans pour autant qu'elle ne soit significative à protéger de la mort cellulaire induite par les cytokines, en diminuant de 1,23 fois le nombre des cellules en apoptose (en %) en comparaison avec son contrôle positif siGFP avec le mélange de cytokines. Nous voyons que le traitement aux cytokines avec l'inhibition du **miR-874** n'a pas eu d'incidence sur la survie cellulaire.

En parallèle du test au Hoechst 33342, nous avons réalisé le test à l'Annexine V-EGFP et à l'Iodure de Propidium. Ce test, en plus de valider les résultats obtenus par comptage des noyaux pycnotiques, permet de discriminer spécifiquement les cellules en apoptose de celles en nécrose.

IV.5. Effet de la surexpression du miR-325 et l'inhibition du miR-874 sur l'apoptose et la nécrose

Afin de valider les effets obtenus par le test au Hoechst 33342, concernant l'influence d'un changement du niveau du miR-325-5p et du miR-874 sur la mort cellulaire, nous avons effectué un test à l'Annexine V-EGFP. L'Annexine V est une protéine qui a une forte affinité pour la phosphatidylsérine, un phospholipide situé principalement sur la face interne de la membrane plasmique. Lorsque la cellule est en apoptose, elle perd l'intégrité de sa membrane plasmique et la phosphatidylsérine se trouve exposée à la surface de la cellule permettant son marquage par la protéine verte fluorescente EGFP liée à l'Annexine V. L'Iodure de Propidium est un agent intercalant de l'ADN et est utilisé comme marqueur nucléaire fluorescent rouge lors de la nécrose cellulaire. L'apoptose qui correspond à une mort cellulaire programmée se différencie nettement de la nécrose où les organites cellulaires et l'ADN de la cellule seront déversés dans le milieu extracellulaire après lyse totale de la cellule. Afin d'induire la mort, nous avons ajouté aux cellules INS832/13 un mélange de cytokines pendant 24 heures comprenant TNF-alpha, IL-1-bêta et IFN-gamma. Ainsi, dans ce test, nous distinguons les cellules apoptotiques marquées à l'Annexine V et les cellules nécrotiques marquées seulement à l'Iodure de Propidium. Nous avons également marqué tous les noyaux avec le Hoechst afin de déterminer le nombre total de cellules. La détection est effectuée par microscopie à épifluorescence avec différents filtres (Alexa 488, Alexa 494, Hoechst33342). La fraction des cellules apoptotiques est déterminée en comptant les cellules présentant un marquage à l'Annexine V-EGFP sur les cellules totales. Et la fraction des cellules nécrotiques est déterminée en comptant les cellules présentant un marquage à l'Iodure de Propidium sur les cellules totales. (4 manipulations avec n=1).

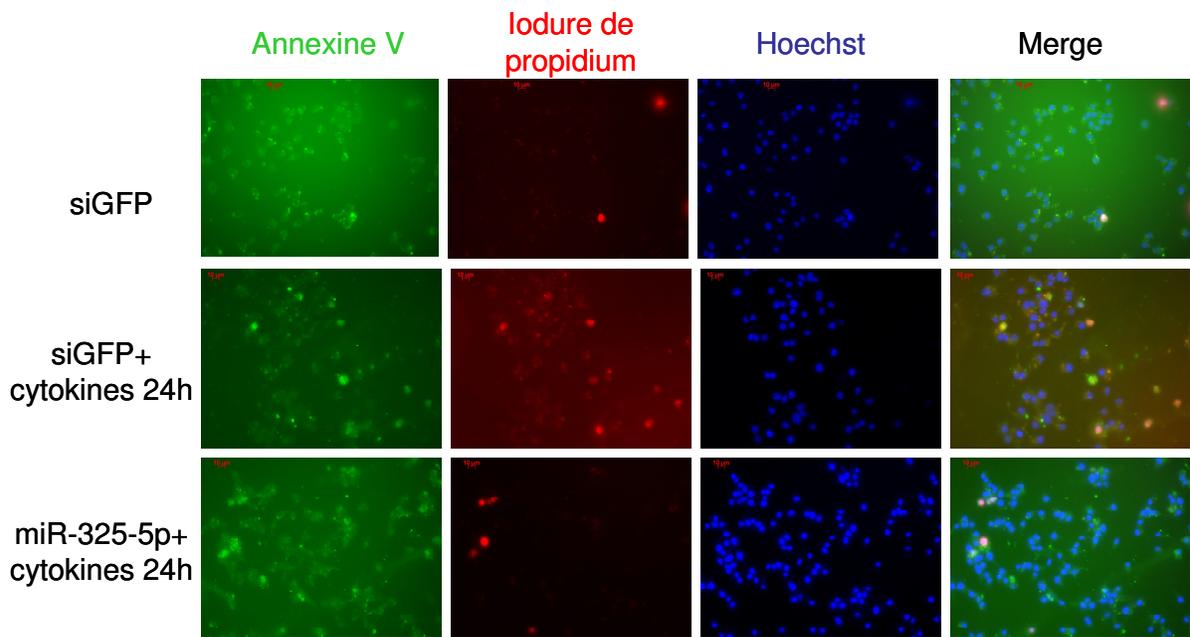


Image 2. Impact de la surexpression du **miR-325-5p** sur l'apoptose et la nécrose des cellules INS832/13. Après transfection avec le **miR-325-5p** à 30 pmol, les cellules sont mises en suspension sur des lamelles de verre. Les cellules apoptotiques sont détectées grâce à l'Annexine V couplé au GFP (fluorescence verte). Les cellules nécrotiques sont marquées avec l'Iodure de Propidium (fluorescence rouge). Les noyaux sont marqués avec le Hoechst 33342 (fluorescence bleue). La fluorescence est observée par microscopie à épifluorescence à l'objectif x40.

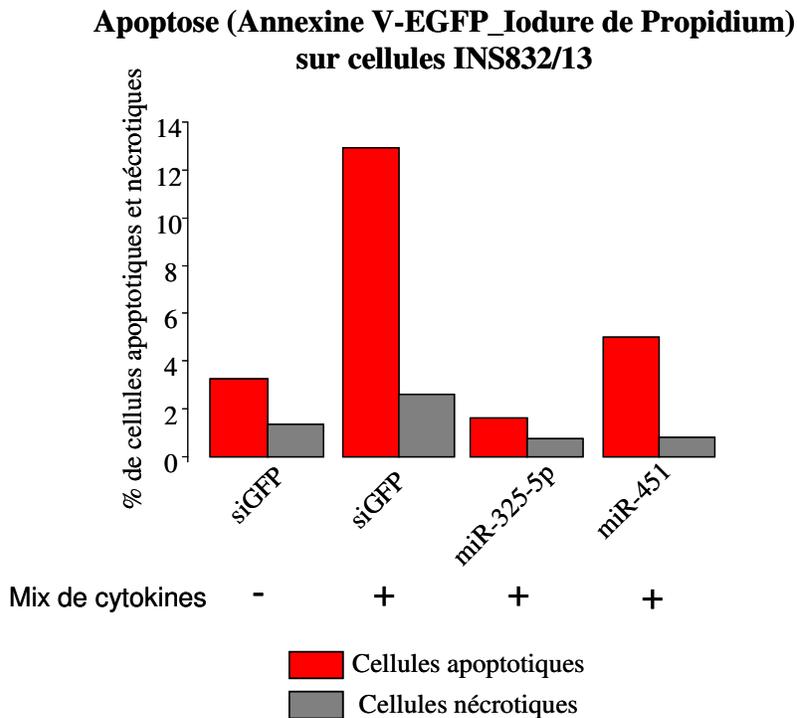


Figure 9. Impact de la surexpression du **miR-325-5p** sur l'apoptose et la nécrose des cellules INS832/13. Première manipulation, les cellules ont été transfectées avec les oligonulcéotides indiqués et ensuite incubées en absence (-) ou en présence de cytokines (+) pendant 24h. Les résultats correspondent aux valeurs brutes d'une seule expérience.

**Apoptose (Annexine V-EGFP_Iodure de Propidium)
sur cellules INS832/13**

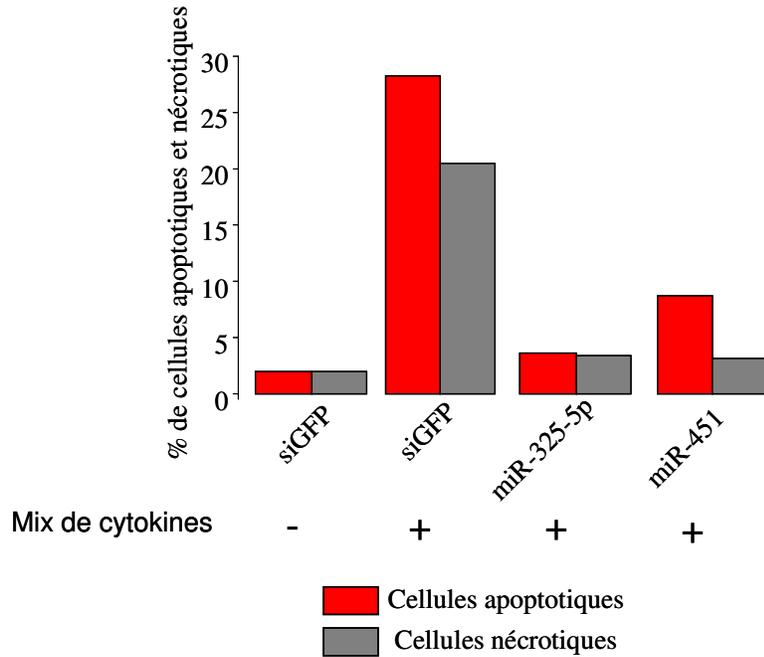


Figure 10. Impact de la surexpression du miR-325-5p sur l'apoptose et la nécrose des cellules INS832/13. Seconde manipulation, les cellules ont été transfectées avec les oligonucéotides indiqués et ensuite incubées en absence (-) ou en présence de cytokines (+) pendant 24h. Les résultats correspondent aux valeurs brutes d'une seule expérience.

**Apoptose (Annexine V-EGFP_Iodure de Propidium)
sur cellules INS832/13**

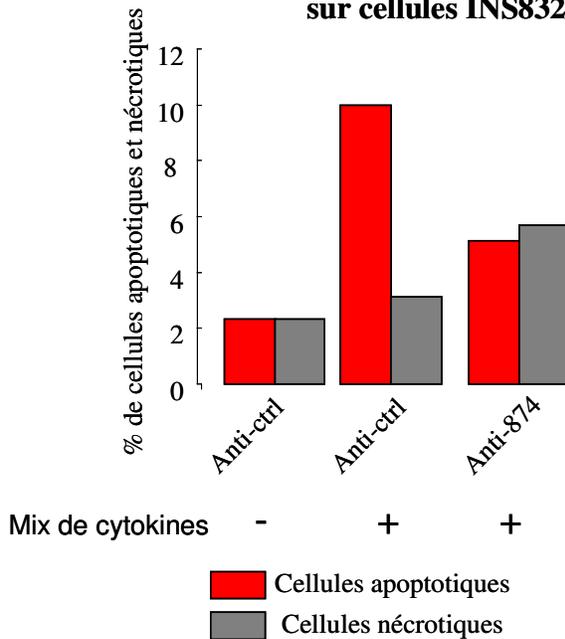


Figure 11. Impact de l'inhibition du miR-874 sur l'apoptose et la nécrose des cellules INS832/13. Première manipulation, les cellules ont été transfectées avec les anti-miR indiqués et ensuite incubées en absence (-) ou en présence de cytokines (+) pendant 24h. Les résultats correspondent aux valeurs brutes d'une seule expérience.

**Apoptose (Annexine V-EGFP_Iodure de Propidium)
sur cellules INS832/13**

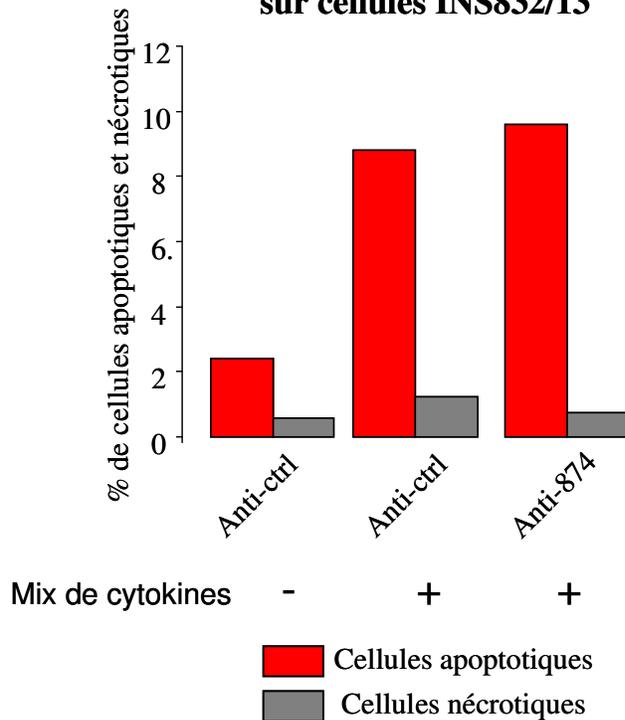


Figure 12. Impact de l'inhibition du miR-874 sur l'apoptose et la nécrose des cellules INS832/13. Seconde manipulation, les cellules ont été transfectées avec les anti-miR indiqués et ensuite incubées en absence (-) ou en présence de cytokines (+) pendant 24h. Les résultats correspondent aux valeurs brutes d'une seule expérience.

Parmi les résultats obtenus (figure 9 à 12), nous voyons que la nécrose reste relativement stable entre les diverses conditions, à l'exception d'une forte augmentation suite au traitement cytokines dans la figure 10. Cette relative stabilité de la nécrose démontre bien que les changements dans le taux de cellules qui meurent que nous observons et quantifions résultent de mécanismes moléculaires qui touchent à l'apoptose. Les résultats des deux expériences réalisées avec l'Annexin V-EGFP lorsque le miR-874 est inhibé en présence des cytokines donnent deux tendances antagonistes et ne nous permettent donc pas de pouvoir conclure un rôle évident de ce microARN sur la survie cellulaire. La surexpression du miR-325-5p montre à nouveau une tendance à protéger de la mort cellulaire induite par les cytokines. Ceci semble appuyer les résultats obtenus avec la technique du marquage au Hoechst.

V. DISCUSSION

La résistance à l'insuline associée à la gestation ou à l'obésité conduit à un accroissement des besoins en insuline qui est compensé par une augmentation de la masse des cellules bêta pancréatiques. Le but du projet initial est de déterminer quels sont les microARNs dont les niveaux d'expression diffèrent dans les îlots pancréatiques de rattes gestantes au 14^{ème} jour en comparaison avec des îlots de rattes non gestantes. Ainsi, nous espérons pouvoir identifier les microARNs potentiellement impliqués dans l'expansion de la masse des cellules bêta.

Le projet de recherche effectué dans le laboratoire est basé sur l'utilisation de rats comme modèle d'étude. Le phénomène d'expansion de la masse des cellules bêta pendant la gestation a été démontré chez le rat, la souris et l'humain (Rieck & Kaestner; Butler *et al.*). Plusieurs explications justifient le choix de travailler chez le rat. La première étape du projet a été l'isolation des îlots pancréatiques afin d'en extraire l'ARN pour réaliser le microarray et identifier l'expression des microARNs qui changent dans les îlots pancréatiques pendant la gestation. Un premier avantage de ce modèle expérimental est que la chirurgie permettant l'extraction des îlots pancréatiques est plus facile à effectuer chez le rat (les organes étant plus visible à l'œil nu, la chirurgie ne nécessite pas d'être exécutée sous une loupe binoculaire) que chez la souris. Ensuite, nous avons choisi un modèle *in vitro* de lignée cellulaire de rat INS832/13 pour les essais fonctionnels. Celui-ci présente plusieurs avantages; premièrement, les cellules INS832/13 répondent bien à une stimulation au glucose et peuvent être obtenues en quantité pratiquement illimitée [16]. D'autres lignées cellulaires auraient aussi pu être utilisées mais le microarray ayant été réalisé dans des îlots de rats, le choix d'une lignée cellulaire également issu du rat était le plus cohérent.

Dans ce travail de master, j'ai étudié deux microARNs **miR-325-5p** et **miR-874** et leur impact sur la fonction de la cellule bêta, à travers la réalisation de divers test fonctionnels concernant la prolifération et la survie cellulaires, pour lesquels les niveaux des microRNAs ont été modifiés *in vitro* afin de reproduire les changements observés *in vivo* pendant la gestation. Dans le microarray, le **miR-874** était diminué de 6,45 fois dans les îlots des rattes gestantes par rapport aux rattes contrôles. Cependant les données obtenues montrent que l'inhibition du **miR-874** n'induit pas de changement sur la fonction de la cellule bêta, tant sur sa prolifération que sur sa survie. Les résultats obtenus ne correspondent donc pas à l'hypothèse de départ basée sur le fait que l'inhibition du **miR-874** puisse avoir un effet proliférateur et/ou protecteur sur la masse des cellules-bêta. Nohata et al. ont montré que le **miR-874** fonctionne potentiellement comme un suppresseur de tumeur par inhibition de la prolifération et de l'invasion des cellules cancéreuses dans les carcinomes à cellules squameuses en se liant directement sur la molécule cible oncogène PPP1CA

[17]. Dans leur étude, Nohata et al ont démontré que la prolifération cellulaire diminue en augmentant l'expression du **miR-874**. Notre hypothèse qu'une inhibition de l'expression du **miR-874** pouvait entraîner une augmentation de la prolifération cellulaire était donc en accord avec les observations de ces auteurs. Nos résultats (voir figure 6 ci-dessus) n'ont pas permis de démontrer une influence de **miR-874** sur la prolifération cellulaire. Il est possible d'envisager plusieurs causes qui pourraient expliquer nos données. Les propriétés des cellules squameuses carcinomateuses sont probablement différentes en termes de croissance, division, survie et fonction de celles des cellules- β pancréatiques même si nous avons travaillé sur des cellules de lignée tumorale. Les molécules intervenant dans ces mécanismes et surtout celles ciblées par le **miR-874** divergent possiblement lorsqu'elles se trouvent dans la cellule squameuse carcinomateuse versus la cellule- β . De plus, chaque molécule peut jouer un rôle tissu-spécifique différent. Il est donc pour finir difficile de superposer un schéma linéaire « **miR-874** entraîne diminution de la prolifération cellulaire » à notre situation où les conditions ne sont pas identiques.

Contrairement au **miR-874** nos données suggèrent que **miR-325-5p** pourrait effectivement contribuer à augmenter la prolifération des cellules β au cours de la gestation, étant donné l'augmentation du niveau de ce microARN mesurée par microarray et RT-PCR quantitative lors d'un état altéré d'insulino-résistance chez les rattes gestantes versus non-gestantes. Puis ce même microARN a un effet significatif sur la prolifération des cellules INS832/13. Ensuite, le test de l'apoptose a montré dans trois expériences sur quatre avec la méthode basée sur un marquage des noyaux pycnotiques avec le colorant Hoechst et dans les deux expériences effectuées avec l'Annexine V une protection de la mort cellulaire. Même si à présent les résultats ne permettent pas encore de donner une réponse définitive, en augmentant le nombre d'expériences, il est fort probable que nous pourrions confirmer un effet significatif du **miR-325-5p** sur la survie des cellules. Cela nous étonne peu, car ces deux mécanismes de prolifération et de survie cellulaire vont souvent de paire et impliquent en partie des voies de signalisation communes. Le **miR-325-5p** pourrait être impliqué dans le mécanisme compensatoire intervenant dans les îlots du pancréas pour que l'organe conserve une masse de cellules- β fonctionnelle afin de produire une quantité d'insuline physiologiquement suffisante et efficace lors d'un état altéré d'insulino-résistance. Le **miR-325-5p** révèle donc un probable effet prolifératif et une tendance à la protection des cellules mises en condition de stress, bien que cet effet reste encore à confirmer de manière définitive. Les résultats obtenus semblent donc valider l'hypothèse de départ. Une grande limite à ces résultats reste cependant le fait que nous avons travaillé avec une lignée cellulaire (INS832/13) qui prolifère très facilement puisqu'elle est issue de carcinomes pancréatiques de rats. Les mécanismes qui contrôlent la prolifération dans ces cellules pourraient donc être altérés. Nos résultats devraient donc être

confirmés avec des expériences réalisées avec cellules bêta primaires obtenues d'îlots pancréatiques.

Les résultats issus des essais fonctionnels ciblés sur la survie des cellules sont peu concluants du fait du nombre restreint d'expériences réalisées. Pour le Hoechst avec **antimiR-874**, la première manipulation sur les 4 effectuées n'a pas pu être utilisée à cause de problèmes techniques liés au comptage des noyaux pycnotiques au microscope à fluorescence (le comptage était trop lent et la fluorescence avait diffusée sur les noyaux environnants). A la suite de cette première expérience peu convaincante, nous avons décidé de réaliser en parallèle un test à l'Annexine V. Cette méthode est plus précise et spécifique puisqu'elle permet la distinction des cellules en apoptose (la mort programmée) de celles en nécrose, tandis que le marquage des noyaux au Hoechst ne différencie pas l'apoptose de la nécrose. De plus, le colorant Hoechst marque les noyaux avec une certaine morphologie correspondant à une étape unique et tardive de l'apoptose et certainement une part des cellules en voie de mort programmée n'est pas comptée. Peut-être rétrospectivement, commencer avec le test à l'Annexine V aurait été mieux pour évaluer la mort cellulaire programmée.

Nous n'avons pas testé l'impact de la diminution du **miR-874** ou de l'augmentation du **miR-325-5p** sur la sécrétion d'insuline, qui est pourtant le rôle fondamental des cellules bêta. En effet, nous nous appuyons sur le modèle de départ choisi, la gestation. Pendant la gestation, il a été démontré une augmentation de la masse des cellules bêta, une augmentation de leur taille, une diminution de leur apoptose et une augmentation de leur sécrétion d'insuline. Le critère que nous avons étudié était le rôle de ces microARNs sur la prolifération et la survie des cellules-bêta car elles sont connues pour avoir de très faibles capacités de plasticité en termes de prolifération et de survie cellulaire, sauf en cas de résistance à l'insuline se produisant pendant la gestation et l'obésité. Pour cela, nous avons axé notre recherche sur ces deux rôles fonctionnels. Cependant, le test ELISA permettant d'évaluer la sécrétion d'insuline des cellules en réponse au glucose, serait le prochain test fonctionnel à réaliser lors de la poursuite de ce projet. Ainsi nous pourrions étudier quel est l'impact des microARNs étudiés sur la sécrétion basale et stimulée des cellules. Il est majeur de garder à l'esprit que toute stratégie visant à augmenter la prolifération et/ou la survie des cellules β se doit de pouvoir conserver des cellules fonctionnelles c'est-à-dire sécrétrices d'insuline avant tout.

VI. CONCLUSION

Pour conclure ce travail de master, il aura fallu en l'espace de quatre semaines répondre à deux questions pointues et simples. **MiR-325-5p** et **miR-874** ont-ils un effet sur la cellule-bêta pancréatique en ce qui concerne la prolifération et la mort cellulaire? Obtenir une réponse significative a été difficile en un mois pour ce travail en laboratoire de recherche. Je n'ai peut être pas eu assez de temps pour me mettre au point dans la maîtrise des techniques et pour répéter plusieurs fois les manipulations afin de finaliser les résultats. Mais mon expérience en laboratoire de recherche a été très enrichissante, et je me suis sentie privilégiée de faire ce projet. J'y ai découvert l'importance du choix de départ d'un sujet de recherche, la délicatesse et le rythme de croissance des cellules cultivées in vitro et auxquelles il faut s'adapter, la rigueur requise pour toute manipulation et la persévérance lors de la récolte des données.

Remerciements

Je tiens à remercier Pr. Romano Regazzi d'avoir accepté d'être le tuteur de mon travail de master et pour son accueil au sein de son laboratoire. Merci aussi pour son enseignement, sa disponibilité, sa bienveillance et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier Pr. Dario Diviani qui a accepté d'être l'expert de mon travail de master et pour la lecture de ce mémoire de maîtrise.

Je tiens à remercier Cécile Jacovetti qui m'a supervisée et prise sous son aile en arrivant au laboratoire le long du mois d'août. Tu m'as appris les manipulations, la lecture des images de microscopie, le traitement des données, ... Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ton dynamisme. Je te souhaite de belles choses pour la suite de ton doctorat.

VII. REFERENCES

1. Mira M. Sachdeva and Doris A. Stoffers. Minireview: Meeting the Demand for Insulin: Molecular Mechanisms of Adaptive Postnatal β -Cell Mass Expansion. *Molecular Endocrinology* 2009 23: 747-758.
2. Eelco J.P. de Koning, Susan Bonner-Weir, Ton J. Rabelink. Preservation of β -cell function by targeting β -cell mass. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29(4):218-227.
3. Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, et al. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med* 2010; 16: 804–808.
4. Sebastian Rieck, Peter White, Jonathan Schug, Alan J. Fox, Olga Smirnova, Nan Gao, Rana K. Gupta, Zhao V. Wang, Philipp E. Scherer, Mark P. Keller, Alan D. Attie, and Klaus H. Kaestner. The Transcriptional Response of the Islet to Pregnancy in Mice. *Molecular Endocrinology* 2009 23: 1702-1712.
5. Rieck S, Kaestner KH. Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 151–158.
6. A. E. Butler, L. Cao-Minh, R. Galasso, R. A. Rizza, A. Corradin, C. Cobelli and P. C. Butler. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia* (2010) 53:2167–2176.
7. Pascal Lovis and Romano Regazzi. Noncoding miRNAs as key controllers of pancreatic β -cell functions. *Endocrinol. Metab.* (2007) 2(4), 461-468.
8. Jacek Krol, Inga Loedige and Witold Filipowicz. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics* 11, 597-610 (September 2010).
9. Matthew N. Poy, Lena Eliasson, Jan Krutzfeldt, Satoru Kuwajima, Xiaosong Ma, Patrick E. MacDonald, Sébastien Pfeffer, Thomas Tuschl, Nikolaus Rajewsky, Patrik Rorsman and Markus Stoffel. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226-230 (11 November 2004).
10. Kolfshoten IG, Roggli E, Nesca V, Regazzi R. Role and therapeutic potential of microRNAs in diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2009; 11(Suppl 4): 118-129.
11. Claudiane Guay, Elodie Roggli, Valeria Nesca, Cécile Jacovetti, Romano Regazzi. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Translational Research*, Volume 157, Issue 4, April 2011, Pages 253-264.
12. Xiaoqing Tang, Guiliang Tang, Sabire Özcan. Role of microRNAs in diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, Volume 1779, Issue 11, November 2008, Pages 697-701.

13. Aibin He, Liuluan Zhu, Nishith Gupta, Yongsheng Chang and Fude Fang. Overexpression of Micro Ribonucleic Acid 29, Highly Up-Regulated in Diabetic Rats, Leads to Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes. 2007 21: 2785-2794.
14. Christine Esau, Xiaolin Kang, Eigen Peralta, Elaine Hanson, Eric G. Marcusson, Lingamanaidu V. Ravichandran, Yingqing Sun, Seongjoon Koo, Ranjan J. Perera, Ravi Jain, Nicholas M. Dean, Susan M. Freier, C. Frank Bennett, Bridget Lollo, and Richard Griffey. MicroRNA-143 Regulates Adipocyte Differentiation. 2004 279: 52361-52365. First Published on October 25, 2004.
15. Mirko Trajkovski, Jean Hausser, Jürgen Soutschek, Bal Bhat, Akinc Akin, Mihaela Zavolan, Markus H. Heim and Markus Stoffel. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. Nature 474, 649–653 (30 June 2011).
16. H E Hohmeier, H Mulder, G Chen, R Henkel-Rieger, M Prentki, and C B Newgard. Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. Diabetes March 2000 49:424-430.
17. N Nohata, T Hanazawa, N Kikkawa, D Sakurai, L Fujimura, T Chiyomaru, K Kawakami, H Yoshino, H Enokida, M Nakagawa, A Katayama, Y Harabuchi, Y Okamoto and N Seki. Tumour suppressive microRNA-874 regulates novel cancer networks in maxillary sinus squamous cell carcinoma. British Journal of Cancer 105, 833-841 (6 September 2011).