

Identification de loci suppresseurs du phénotype diabétique lié à la déficience en Hnf1a chez la souris

Claire Carette

▶ **To cite this version:**

Claire Carette. Identification de loci suppresseurs du phénotype diabétique lié à la déficience en Hnf1a chez la souris. Génétique. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T044 . tel-01127471

HAL Id: tel-01127471

https://theses.hal.science/tel-01127471

Submitted on 7 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

Ecole doctorale « Génétique, Cellules, Immunologie, Infectiologie, Développement », ED 157

Identification de loci suppresseurs du phénotype diabétique lié à la déficience en *Hnf1a* chez la souris

Par Claire Carette

Thèse de Doctorat de Génétique

Dirigée par Marco Pontoglio

Equipe de recherche "Expression Génique, Développement et Maladies" (EGDM)
INSERM U1016/ CNRS UMR 8104 / Université Paris-Descartes
Institut Cochin, Département Développement, Reproduction et Cancer
24, Rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France

Présentée et soutenue publiquement le 27 novembre 2014

Devant un jury composé de :

Dr Christine POITOU-BERNERT, MCU-PH, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6) : rapporteur

Dr Martine VAXILLAIRE, DR, Université de Lille 2 : rapporteur

Pr Christian BOITARD, PU-PH, Université Paris Descartes (Paris 5) : examinateur et président du jury

Dr Christine BELLANNE-CHANTELOT, MCU-PH, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6) : examinateur

Pr Sébastien CZERNICHOW, PU-PH, Université de Versailles-Saint Quentin (UVSQ) : examinateur

Résumé : Les souris invalidées pour *Hnf1a* présentent un diabète sévère avec défaut d'insulino-sécrétion proche du phénotype observé chez les patients MODY3 (Maturity Onset Diabetes of te Young). Les mécanismes moléculaires responsables du diabète lié à la déficience en *Hnf1a* ne sont pas clairement compris. Dans ce travail, nous avons montré que des souris congéniques présentant la même délétion de *Hnf1a* dans des fonds génétiques différents présentent des phénotypes radicalement opposés. En effet, la déficience en *Hnf1a* conduit à un diabète sévère dans la plupart des lignées telles que 129, B6, BALB/c ou AJ (lignées sensibles). Mais à l'inverse, aucun diabète n'est observé chez les souris congéniques des lignées CBA et C3H malgré le défaut d'expression de *Hnf1a* (lignées résistantes). Les souris sensibles présentent une altération de leurs îlots de Langerhans avec notamment une diminution de taille de ces îlots. A l'inverse les souris résistantes présentent des îlots beta de taille normale malgré la déficience en *Hnf1a*. Nous avons pu montrer que le ou les variants génétiques présents dans les deux lignées résistantes agissent de façon dominante et, par un balayage du génome, nous avons identifié un locus majeur suppresseur du phénotype diabétique au niveau du chromosome 3. Ce locus majeur contient 11 gènes présentant des variations de SNP non synonymes et il interagit avec cinq autres loci ancillaires au niveau des chromosomes 4, 11 et 18. Notre travail montre finalement que les variations génétiques naturellement présentes dans les lignées de souris de laboratoire peuvent supprimer le phénotype diabétique lié à la déficience en *Hnf1a*.

Mots clés : diabètes monogéniques, MODY3, *HNF1A* MODY, *Hnf1a*

Title: Diabetic phenotype linked to Hnf1a deficiency is suppressed by genetic background in mice.

Abstract: *Hnf1a*$^{-/-}$ mice exhibit a severe diabetes mellitus due to a drastic defect in insulin secretion that closely resembles to the phenotype presented by MODY3 (Maturity Onset Diabetes of the Young type 3) patients. The molecular mechanisms responsible for the diabetes are still poorly understood. Here we show that congenic mice of different genetic backgrounds carrying the same *Hnf1a* deletion presented with drastically different phenotypes. *Hnf1a*-deficiency led to severe diabetes when introgressed into 129, B6, BALB/C or A/J genetic backgrounds (sensitive strains). Conversely, when the same null mutation was introgressed into CBA or C3H genetic backgrounds (resistant strains), the diabetic phenotype was suppressed. In sensitive strains, pancreatic islets did not increase in size compared to control animals and on the other hand average islet-size growth was normal in resistant strains. The genetic variations naturally present in these two resistant strains acted in a dominant way and a genome scan analysis led to the identification of a major suppressor locus on chromosome 3 that accounted for more than 60% of the variance of glycemia. The major locus contained 11 genes with non-synonymous SNPs changes and it interacted with 5 additional ancillary loci on chromosomes 4, 11 and 18. Our study demonstrated that the naturally occurring genetic variation present in distinct mouse laboratory strains is able to suppress the phenotype of a monogenic disorder.

Keywords: monogenic diabetes, MODY3, *HNF1A* MODY, *Hnf1a*

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de thèse Marco Pontoglio qui a bien voulu me faire confiance et accepter l'intrusion d'un médecin clinicien dans son laboratoire de recherche fondamentale. Marco m'a transmis le goût de la recherche et de la discussion en équipe permettant des échanges et des réflexions de très grande qualité scientifique. Il m'a permis également d'améliorer mon anglais scientifique en faisant en sorte que la plupart des discussions et des échanges aient lieu en anglais au quotidien au laboratoire et dans les réunions. Pour toutes ces raisons, je lui suis redevable et infiniment reconnaissante.

Je souhaite associer à ces remerciements la « Diabetes Team » et notamment Miguel Garcia-Gonzalez, post-doctorant au laboratoire, qui m'a montré tous les rouages du travail de recherche de la conception du projet au travail de manipulation avec les souris. Nos communications en anglais étaient parfois franchement difficiles à mon arrivée mais je vois à la fin de ce travail que, malgré son « retour » en Galice, nous communiquons de mieux en mieux. Je suis heureuse que ce projet nous permette de publier ensemble un article de très bon niveau scientifique.

Dans la « Diabetes Team », je n'oublie pas évidemment Magali Chiral qui m'a emmené avec elle à vélo à l'animalerie de l'Institut Pasteur et avec qui nous avons pu expérimenter le travail de recherche chez la souris. Elle a fourni un immense travail d'élevage et de phénotypage des souris sans lequel ce projet n'aurait pas pu aboutir. Je la remercie d'avoir été aussi compétente que souriante ce qui rendait la tâche parfois ingrate du travail d'élevage des souris tellement plus agréable.

Toujours dans la « Diabetes Team », je tiens à remercier tout particulièrement Michel Leibovici qui a été d'un grand secours pour l'écriture de ce manuscrit de thèse ainsi que de l'article scientifique. Je le remercie d'avoir pris le temps de réfléchir aux conclusions de ce travail et à la discussion qui en découle et j'espère qu'il pourra continuer à avancer dans l'identification des loci suppresseurs de diabète au laboratoire. Je le remercie d'avoir un esprit aiguisé parfois frondeur qui contraste avec une extrême gentillesse ce qui rend le travail si agréable avec lui.

Au sein de l'équipe, Alessia Bagattin m'a aussi apporté son concours notamment autour de la réflexion sur le gène *Scl2A2*. Je suis très heureuse qu'elle soit associée à ce travail et je la remercie de sa rigueur scientifique et de son sens de l'organisation exemplaires.

Je remercie également Serge Garbay qui appartient évidemment aussi à la « Diabetes Team ». Ses connaissances en bioinformatique nous ont permis notamment d'identifier de façon rigoureuse et exhaustive les différences génétiques entre les lignées sensibles et résistantes dans les données publiées en ligne par l'Institut Sanger.

Je tiens à remercier les autres membres de l'équipe de Marco Pontoglio qui m'ont tous apporté leur concours avec gentillesse et humour pour travailler tous les jours au laboratoire pendant les deux années de poste d'accueil. Une pensée donc pour Kiko, Jonathan, Evelyne, Filippo, Armelle et pour les nouveaux venus que je ne connais pas… Bonne chance pour vos travaux futurs.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le concours de José Timsit et Danièle Dubois-Laforgue qui m'ont amené pendant mon clinicat à comprendre qu'un médecin ne doit pas se contenter d'être un très bon clinicien mais qu'il doit comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de telle ou telle maladie ainsi que de leur traitement. Je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont transmis de façon formelle et informelle.

José Timsit m'a particulièrement fait confiance en me faisant partager ses connaissances d'expert des MODY. Il m'a permis de débuter un travail de recherche clinique en génétique au sein du laboratoire de Christine Bellanné-Chantelot qui m'a ensuite logiquement amené à candidater dans le laboratoire de Marco Pontoglio. J'ai ainsi pu aborder la génétique des MODY « from bed to bench » selon l'expression consacrée.

Je remercie Christine Bellanné-Chantelot et toute son équipe de laboratoire qui m'ont si bien accueillie pendant mes années de clinicat. J'ai pu dans cette première expérience de génétique des MODY chez l'homme comprendre les enjeux des tests diagnostiques en génétique et commencer à réfléchir aux causes possibles de diabète chez les patients présentant un phénotype MODY sans cause génétique identifiée. Christine a supporté les difficultés que j'ai rencontrées dans mes premiers travaux d'écriture en anglais. Les discussions ont été franches et intéressantes ; elles se poursuivent toujours et je la remercie notamment d'avoir accepté de faire partie de ce jury ainsi que d'avoir donné ses commentaires précis et pertinents sur l'article.

Je remercie tout particulièrement Sébastien Czernichow qui m'a laissé finir ce travail de thèse tout en débutant un travail de clinicien dans la jeune unité de Nutrition de l'Hôpital Ambroise Paré. Je suis heureuse aujourd'hui d'avoir pu lui démontrer ma persévérance en aboutissant enfin à la conclusion de ce « chapitre » de la thèse. J'espère que nous connaîtrons ensemble de grand succès dans les projets qui nous animent maintenant et qui devraient me permettre d'accéder à un titre universitaire. Je le remercie de m'avoir fait confiance et laissé du temps pour avancer tous ces projets.

Je remercie Christine Poitou-Bernert et Martine Vaxillaire d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce projet. Vos commentaires d'expertes en génétique ont été d'une grande aide pour conclure ce travail et finaliser l'article. Merci d'avoir pris le temps de lire et de comprendre notre projet de recherche avec autant de rigueur. J'ai pris le temps d'intégrer vos remarques dans la dernière version du manuscrit qui j'espère répondra à vos attentes.

Je remercie Christian Boitard d'avoir accepté de prendre du temps pour faire partie de ce jury. Nous nous connaissons depuis longemps : j'ai été son interne à Necker en Immunologie clinique puis chef de clinique-assistante dans son service de Diabétologie à Cochin pendant 4 ans. Son enseignement a largement contribué à mon intérêt pour le(s) diabète(s). Il a su transmettre un vif intérêt pour la recherche fondamentale en Immunologie et en Génétique que ce soit chez la souris, l'homme ou la drosophile. J'espère que nous pourrons continuer d'avoir des échanges sur ce terrain scientifique et que nous pourrons collaborer dans des projets futurs.

Je remercie également Michèle Pitte et Marc Delpech de leur soutien logistique et moral pendant ces cinq longues années.

Je ne peux pas conclure ces remerciements sans un mot pour mes proches sans qui rien n'aurait été possible.

Je remercie Taka de m'avoir soutenue indéfectiblement dans ce projet.

J'ai une pensée pour mes deux enfants June et Léo qui sont les « meilleures manip » de ces dernières années de thèse comme aime le dire Marco. Je vous remercie d'être là et de faire mon bonheur tous les jours.

Je remercie tout particulièrement mes parents Françoise et Bernard de leur concours logistique et moral surtout dans ces derniers mois de rédaction de la thèse.

Je remercie également Julien et Loetitia, Alice et Paul, et tous mes amis proches sans lesquels j'aurais peut-être parfois « jeter l'éponge »...

J'ai enfin une pensée particulière pour mes grand-mères « intellectuelles » qui m'ont précédée dans cette entreprise universitaire. Je leur dédie ce travail, si jamais, de là où elles sont, elles daignent y jeter un œil.

http://www.worldcat.org/title/evolution-de-la-cavite-cranienne-chez-les-primates-superieurs/oclc/31301987

« C'est le travail qui peut seul garantir [aux femmes] une liberté concrète. »

Simone De Beauvoir

Table des matières

REMERCIEMENTS **1**

TABLE DES MATIERES **6**

TABLE DES ILLUSTRATIONS **9**

INTRODUCTION **12**

CHAPITRE 1 : LES DIABETES MONOGENIQUES AVEC DEFAUT D'INSULINOSECRETION **12**
1.1 GENERALITES 12
1.1.1 Classification 12
1.1.2 Une hétérogénéité clinique en relation avec une hétérogénéité génétique 14
1.1.3 Importance du diagnostic génétique en pratique clinique 16
1.1.4 Diabètes monogéniques : quelle relation avec la génétique du diabète de type 2 ? 17
1.2 LES DIABETES DE TYPE MODY3 21
1.2.1 Premières descriptions 21
1.2.2 Présentation clinique 22
1.2.3 Description des mutations du gène *HNF1A* 23
1.2.4 Variabilité phénotypique 25
1.2.5 Corrélation génotype-phénotype 26
1.2.6 Gènes modificateurs impliqués dans la variabilité phénotypique 28
CHAPITRE 2 : LES MODELES EXPERIMENTAUX DE DEFICIENCE EN *HNF1A* **30**
2.1. DESCRIPTION DU MODELE MURIN MIS AU POINT AU LABORATOIRE 30
2.1.1 Généralités sur le gène *Hnf1a* 30
2.1.2 Mise au point de souris inactivées pour le gène *Hnf1a* au laboratoire 31
2.1.3 Phénotype des souris homozygotes *Hnf1a*$^{-/-}$ 32
2.1.4 Les autres modèles murins avec déficience en *Hnf1a* 35
2.1.5 Inactivation d'*Hnf1a* dans les lignées cellulaires en culture 38
2.1.6 Les autres modèles animaux de déficience en *Hnf1a* 39
2.1.7 Les modèles animaux sont-ils de bons modèles de la maladie humaine MODY3 ? 39
2.2 EFFET DU FONDS GENETIQUE SUR LA DEFICIENCE EN *HNF1A* 42
2.2.1 Les lignées « classiques » de souris consanguines 42
2.2.2 Les lignées congéniques 42
2.2.3 Introduction de la déficience en *Hnf1a* dans différents fonds génétiques au laboratoire 43
CHAPITRE 3 : LE PROJET DE RECHERCHE **47**
3.1 OBJECTIFS DU PROJET 47
3.2 STRATEGIE 47

PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES **49**

2.1 ELEVAGE DES LIGNEES F1 ET N2 49
2.1.1 Production des F1 49
2.1.2 Phénotypage des F1 49
2.1.3 Production des souris N2 49
2.1.4 Phénotypage des N2 50
2.1.5 Extraction des ADN et génotypage 50
2.2 BALAYAGE DU GENOME 51
2.2.1 Criblage pangénomique sur puce à ADN de haute densité 51
2.2.2 Identification des gènes candidats 52
2.2.3 Analyse des interactions génétiques 52
2.2.4 Second criblage génétique 52

2.3 PHENOTYPAGE PANCREATIQUE 53
2.3.1 Quantification de la masse beta/alpha pancréatique 53
2.3.1.1 Immunohistochimie 53
2.3.1.2 Acquisition des images avec MetaMorph et quantification avec le logiciel ImageJ 53
2.3.2 Nombre, taille et distribution des îlots de Langherans en fonction de leur taille 56
2.3.3 Index de prolifération et d'apoptose 56
2.3.3.1 Ki67 56
2.3.3.2 TUNEL 57
2.3.3.3 Recherche d'une éventuelle néogenèse par le co-marquage DBA/insuline des coupes de pancréas en immuno-histochimie 57
2.3.4 Recherche de l'expression de GLUT2 57
2.3.5 Dosages biochimiques et hormonaux sur plasma congelé 57

PARTIE 3 : RESULTATS 59

CHAPITRE 1 : LOCI ASSOCIES A LA RESISTANCE AU DIABETE 59
3.1.1 TRANSMISSION DE LA RESISTANCE AU DIABETE CHEZ LES F1 59
3.1.2 CORRELATION LINEAIRE ENTRE GLYCEMIES ET POIDS CORPOREL CHEZ LES SOURIS SENSIBLES 62
3.1.3 PRODUCTION DE SOURIS N2 SEGREGEANT LE PHENOTYPE DIABETIQUE 64
3.1.4 SELECTION DES SOURIS N2 RESISTANTES ET SENSIBLES AU DIABETE 65
3.1.5 IDENTIFICATION D'UN LOCUS MAJEUR SUR LE CHROMOSOME 3 (MODA) 68
3.1.6 LOCI ANCILLAIRES INTERAGISSANT AVEC LE LOCUS MAJEUR 70
3.1.6 AFFINAGE DE L'INTERVALLE MODA 72
3.1.7 GENES CANDIDATS DE L'INTERVALLE MODA 72
CHAPITRE 2 : PARTICULARITES DES ILOTS DE LANGERHANS DU PHENOTYPE RESISTANT 75
3.2.1 LA MASSE BETA-CELLULAIRE ET LE NOMBRE D'ILOTS NE SONT PAS DIFFERENTS ENTRE SOURIS SENSIBLES ET RESISTANTES 75
3.2.1.1 Masse beta-cellulaire à la naissance et à J15 75
3.2.1.2 Quantification du nombre d'îlots à J1,5 et J15 77
3.2.2 PRESERVATION DES ILOTS BETA DE GRANDE TAILLE CHEZ LES SOURIS MUTANTES RESISTANTES 78
3.2.2.1 Croissance normale des îlots beta en post-natal chez les souris mutantes résistantes 79
3.2.2.2 Préservation de la taille des îlots beta chez les souris résistantes à J15 79
3.2.2.3 Absence de modification de la taille des cellules 82
3.2.3 ETUDE DE LA PROLIFERATION ET DE L'APOPTOSE DES CELLULES BETA PANCREATIQUES DES SOURIS MUTANTES 83
3.2.3.1 Prolifération des cellules beta par marquage Ki67 83
3.2.3.2 Apoptose des cellules beta par marquage TUNEL 84
3.2.4 ETUDE DE LA NEOGENESE EN POST NATAL PAR LE CO-MARQUAGE DES CELLULES DUCTALES AVEC L'INSULINE 85
3.2.5 PRESENCE DE CELLULES ISOLEES EN GRAND NOMBRE A LA NAISSANCE CHEZ LES SOURIS DEFICIENTES EN *HNF1A* 86
3.2.6 RESULTATS CONCERNANT LES CELLULES ALPHA PANCREATIQUES 87
3.2.6.1 Pas de différence dans la masse alpha-cellulaire entre souris résistantes et sensibles à la naissance 87
3.2.6.2 Anomalie de la répartition des cellules alpha chez les souris déficientes en *Hnf1a* sensibles et résistantes 89
3.2.7 RESULTATS BIOCHIMIQUES ET HORMONAUX 90

PARTIE 4 : DISCUSSION ET PERPECTIVES 91

4.1 EFFET DU FONDS GENETIQUE SUR LE PHENOTYPE 91
4.2 LES FONDS GENETIQUES CBA/JICO ET C3H/HENCRI PORTENT LE LOCUS DE RESISTANCE AU DIABETE 92
4.3 IDENTIFICATION D'UN LOCUS DE RESISTANCE AU DIABETE 93
4.4 CROISSANCE POST-NATALE NORMALE DES ILOTS BETA CHEZ LES SOURIS MUTANTES RESISTANTES AU DIABETE 95

4.4 IMPLICATIONS DE NOS RESULTATS DANS LA VARIABILITE DU PHENOTYPE MODY3 CHEZ L'HOMME 96

CONCLUSION 97

BIBLIOGRAPHIE 98

ANNEXE 1- SCRIPT DEVELOPPE POUR L'ANALYSE DES ILOTS BETA ET DES ILOTS ALPHA AVEC LE LOGICIEL IMAGEJ 107

ANNEXE 2 – ARTICLE EN COURS DE PREPARATION 135

ANNEXE 3 – ARTICLES PUBLIES SUR LE SUJET EN AMONT DU TRAVAIL DE THESE 169

Table des illustrations

Figure 1 : Résumé des caractéristiques cliniques des différents MODY identifiés à ce jour. . 13
Figure 2 : Les grandes étapes ayant permis de découvrir différents diabètes monogéniques avec dysfonctionnement de la cellule β ou défaut d'insulino-sensibilité (adapté de Klupa et al, 2012 [8]) 15
Figure 3 : Diabètes monogéniques : mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans le développement et le fonctionnement de la cellule β. 16
Figure 4 : Liste de loci identifiés par les GWAS comme associés au diabète de type 2 et à différents traits cliniques qui y sont associés [17]. 18
Figure 5 : Représentation des résultats des GWAS présentant la localisation chromosomique des SNP associés au diabète de type 2 avec $p \leq 5 \times 10^{-8}$. 19
Figure 6 : Distribution des mutations dans les différentes régions du gène *HNF1A* : promoteur, 10 exons et sites d'épissage [38]. 24
Figure 7 : Variabilité phénotypique au diagnostic de diabète et au cours du suivi dans une cohorte 196 patients présentant un MODY3 [57]. 25
Figure 8 : La variabilité de l'âge au diagnostic de diabète est liée au type de mutation (tronquante versus faux-sens) et au domaine fonctionnel affecté quand il s'agit de mutation faux-sens [61]. 27
Figure 9 : Variabilité de l'âge au diagnostic chez des probands présentant un MODY3 en rapport avec la même mutation c.872dupC (p.G292fs, anciennement P291fsinsC). 28
Figure 10 : Détection de l'activité de la β-galactosidase sous le contrôle du promoteur endogène de *Hnf1a* dans différents tissus chez les souris hétérozygotes *Hnf1a*$^{+/-}$ (Pontoglio et al, [68]). 32
Figure 11 : Courbe de croissance et taux de survie des souris homozygotes Hnf1a$^{-/-}$ [68]. 33
Figure 12 : Poids corporel, glycémies non à jeun, contenu en insuline et masse beta chez les souris Hnf1a$^{-/-}$ comparées aux sauvages et aux hétérozygotes à 2 et 6 semaines de vie [72]. . 34
Figure 13 : Coupes en paraffine de pancréas de souris sauvages (A et D), hétérozygotes (B et E) et homozygotes (C et F) pour l'invalidation de *Hnf1a* avec marquage en immunohistochimie de l'insuline (A-B-C) et de l'ensemble des hormones glucagon, polypetide pancréatique et somatostatine (D-E-F) [72]. 34
Figure 14 : Défaut de croissance et hyperglycémie chez les souris invalidées pour *Hnf1a* par le système Cre/LoxP [73]. 35
Figure 15 : Glycémies non à jeun chez les souris transgéniques contrôles (exprimant la forme normale du gène humain *HNF1A*) et les souris transgéniques surexprimant *HNF1A* muté (avec 5 copies du transgène dans les souris Tg-1 et 20 copies dans les souris Tg-2) [75]. 36
Figure 16 : Marquage de l'insuline en immunohistochimie de coupes de pancréas de souris sauvages (A) et transgéniques Tg-1 exprimant la forme mutée de *HNF1A* (P291fs) (B) [75]. 37
Figure 17 : Ultrastructure des cellules endocrines des souris transgéniques surexprimant le gène *HNF1A* humain muté en microscopie électronique [76]. 37
Figure 18 : Diminution de l'insulino-sécrétion dans les cultures de cellules INS1 exprimant le dominant négatif P291fs après induction par la doxycycline [77]. 38
Figure 19 : Effet de IGF1 sur la prolifération mesurée par l'incorporation de la thymidine tritiée dans les cellules INS1 exprimant le dominant négatif P291fs sous la stimulation de la doxycycline [79]. 39
Figure 20 : Schéma illustrant les mécanismes physiopathologiques possiblement mis en jeu dans la survenue du diabète en rapport avec la déficience en *Hnf1a*. 41
Figure 21 : Origine des lignées consanguines classiques utilisées en recherche [89]. 42

Figure 22 : Production des différentes lignées de souris congéniques *Hnf1a*$^{-/-}$. 44
Figure 23 : Glycémies en fonction du temps chez les souris 129 et CBA *Hnf1a*$^{-/-}$ (Garcia-Gonzalez M, Carette C et al, en préparation). 46
Figure 24 : Stratégie du projet de recherche avec une partie génétique comprenant un balayage du génome chez des souris N2 issues de rétrocroisements et un phénotypage comprenant une analyse fine des particularités du pancréas endocrine des souris résistantes. 48
Figure 25 : Le protocole de phénotypage des souris N2. 50
Figure 26 : Capture d'écran du travail d'identification de la surface totale du pancréas et de la surface occupée par les îlots beta avec le script développé au laboratoire pour ImageJ..... 55
Figure 27 : Glycémies en fonction du temps chez les souris F1 sensibles au diabète (A, en rouge) et les F1 résistantes (B, en vert). 61
Figure 28 : Glycémie moyenne à jeun en fonction du poids corporel chez les souris congéniques pures 129 et CBA sauvages et déficientes en *Hnf1a*. 62
Figure 29 : Glycémie moyenne à jeun en fonction du poids corporel chez les différentes souris F1 B6x129, B6xCBA, AJxB6, AJxCBA et 129xCBA sauvages (WT) ou déficientes en *Hnf1a* (MUT). 63
Figure 30 : Croisements et rétrocroisements à l'origine des souris N2 ségrégeant le phénotype diabétique. 16 souris mâles F1 CBAx129 ou 129xCBA *Hnf1a*$^{+/-}$ ont été croisées avec 130 souris femelles B6 *Hnf1a*$^{+/-}$. Au total 2120 souris « N2 » sont nées de ces « rétrocroisements » dont 530 mutants *Hnf1a*$^{-/-}$. Le terme N2 est utilisé car dans ce « pseudo-rétrocroisement », la lignée F1 a été croisée avec la lignée B6 présentant un phénotype sensible comme la lignée parentale 129. 64
Figure 31 : Glycémies en fonction du temps chez les 530 souris N2 déficientes en *Hnf1a*. ... 65
Figure 32 : Calcul du score tS permettant de sélectionner les souris N2 résistantes en fonction de la différence entre les glycémies observée et attendue compte-tenu du poids corporel..... 66
Figure 33 : Résultats de la sélection des souris N2 résistantes (carrés verts) et sensibles (triangles rouges) ayant des scores tR (en abscisse) et tS (en ordonnée) supérieurs à 4 et inférieurs à -4 respectivement. 67
Figure 34 : Distribution des résultats glycémiques en fonction du poids chez les 141 souris N2 sélectionnées parmi les 530 souris N2 mutantes *Hnf1a*$^{-/-}$. 67
Figure 35 : Couverture génomique par chromosome de la puce à ADN « Mouse MD Linkage Panel » de Illumina. 68
Figure 36 : QTL (Quantitative Trait Locus) identifié comme lié à la glycémie à jeun des souris N2 au niveau du chromosome 3 (ModA). 69
Figure 37 : Représentation graphique de la dépendance entre le locus ModA (Chr 3) et le locus ModD (Chr11). 71
Figure 38 : Influence du nombre de loci ancillaires portant l'allèle CBA ($^{B6/CBA}$) dans le phénotype des souris portant soit l'allèle 129 (ModA$^{B6/129}$) soit l'allèle CBA au locus ModA (ModA$^{B6/CBA}$). 72
Figure 39 : Les onze gènes candidats du QTL ModA présentant des variations non synonymes en comparant les séquences 129 et CBA. 73
Figure 40 : Perte d'expression de GLUT2 au niveau des îlots pancréatiques à J1,5 et J28 chez des souris déficientes en *Hnf1a*. 74
Figure 41 : Masse beta-cellulaire quantifiée à la naissance et au 15ème jour de vie chez les souris sensibles (129B6 *Hnf1a*$^{-/-}$) et résistantes au diabète (129CBA *Hnf1a*$^{-/-}$). 76
Figure 42 : Moyennes du nombre total d'îlots par lignée à la naissance et au 15ème jour..... 77
Figure 43 : Marquage des îlots par détection de l'insuline sur des sections de pancréas à J15. 78
Figure 44 : Variation de la taille moyenne des îlots beta (µm2) entre la naissance (J1,5) et J15 chez les souris déficientes en *Hnf1a* (MUT) sensibles (129B6) et résistantes (129CBA)..... 79

Figure 45 : Distribution des îlots en quartile selon leur taille à J15. 81
Figure 46 : Distribution des îlots de Q4 en sous-quartile selon leur taille à J15. 81
Figure 47 : Pourcentage de prolifération dans les cellules beta des différentes lignées à J15. 83
Figure 48 : Pourcentage de cellules beta en apoptose dans les sections pancréatiques des différentes lignées sensibles et résistantes à J15. 84
Figure 49 : Immunohistochimie de coupes de pancréas avec comarquage des cellules contenant de l'insuline (rouge), des cellules ductales par le DBA (vert) et des noyaux par le DAPI (bleu). 85
Figure 50 : Distribution des îlots en quartile selon leur taille à la naissance (jour 1,5) 86
Figure 51 : Quantification des masses beta et alpha-cellulaire à la naissance (J1,5). 87
Figure 52 : Pas de différence entre la représentativité des masses alpha (rouge) et beta-cellulaires (bleu) au sein des îlots pour chaque génotype à J1,5. 88
Figure 53 : Immunomarquage des îlots de Langerhans pour les cellules beta par l'insuline (en vert) et les cellules alpha par le glucagon (en rouge). 89
Figure 54 : Dosages biochimiques et hormonaux chez les souris 129B6 et 129CBA déficientes en *Hnf1a*. 90

Introduction

Chapitre 1 : Les diabètes monogéniques avec défaut d'insulinosecrétion

1.1 Généralités

1.1.1 Classification

Les diabètes monogéniques représentent un groupe d'affections génétiques en rapport avec différentes mutations entraînant soit un défaut d'insulino-sécrétion soit une anomalie de la réponse à l'insuline. Les diabètes monogéniques pourraient représenter 1 à 2% des diabètes mais le diagnostic différentiel avec un diabète de type 1 ou 2 n'est pas toujours fait. La classification classique des MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) fait référence aux diabètes monogéniques impliquant un dysfonctionnement de la cellule beta de survenue précoce avec une transmission autosomique dominante. Le nombre de gènes impliqués dans les MODY s'est accru avec le temps et l'avancée de nos connaissances allant maintenant jusqu'au moins 11 (Figure 1). Parmi ceux-ci, les mutations des gènes *GCK* [1][2] et *HNF1A* [3] respectivement responsables des MODY de type 2 et 3, sont de loin les plus fréquents représentant à eux deux environ 80% de ces diabètes [4][5].

MODY	Gène	Année	Caractéristiques cliniques
MODY1	*HNF4A*	1996	Rare Diabète familial de survenue précoce avec réponse aux sulfamides hypoglycémiants proche du MODY3 Poids de naissance élevé et hypoglycémies néonatales
MODY2	*GCK*	1992	Fréquent (forme monogénique la plus fréquente chez l'enfant) Elévation stable et modérée de la glycémie présente dès la naissance et sans évolution avec le temps Faible élévation de la glycémie au cours de l'HGPO (<4,5mM à 2h) Pas de traitement habituellement (en dehors de la grossesse)
MODY3	*HNF1A*	1996	Fréquent (forme monogénique la plus fréquente chez l'adulte) Diabète familial de survenue précoce avec réponse aux sulfamides hypoglycémiants ou diabète insulino-dépendant sans marqueurs d'autoimmunité Hyperglycémie évoluant avec le temps source de complications Elévation de la glycémie au cours de l'HGPO >4,5mM à 2h
MODY4	*PDX1*	1997	Très rare Insuffisance pancréatique exocrine et atrophie du pancréas
MODY5	*HNF1B*	1997	Diabète et/ou anomalies de développement des reins (kystes), du pancréas (atrophie et insuffisance pancréatique exocrine) et des voies uro-génitales Pectus excavatus
MODY6	*NEUROD1*	1999	Très rare
?	*KLF11*	2005	Très rare (manque la coségrégation du diabète avec une mutation du gène dans des familles additionnelles)
?	*PAX4*	2007	Très rare (manque la coségrégation du diabète avec une mutation du gène dans des familles additionnelles)
MODY	*KCNJ11*	2005	Cause fréquente de diabète néonatal et très rare de diabète familial de survenue précoce
MODY	*INS*	2008	Diabète néonatal (<6 mois) ou diabète insulino-dépendant sans marqueurs d'autoimmunité ou diabète familial de survenue précoce proche du MODY3
?	*BLK*	2009	Très rare (manque la coségrégation du diabète avec une mutation du gène dans des familles additionnelles)
MODY	*CEL*	2010	Très rare Insuffisance pancréatique exocrine et atrophie du pancréas
MODY	*ABCC8*	2012	Cause fréquente de diabète néonatal et cause rare de diabète familial de survenue précoce (proche des MODY2 ou 3)

Figure 1 : Résumé des caractéristiques cliniques des différents MODY identifiés à ce jour.
HNF4A, hepatocyte nuclear factor 4α ; GCK, glucokinase ; HNF1A, hepatocyte nuclear factor 1α ; PDX1, pancreatic and duodenal homeobox 1; HNF1B, hepatocyte nuclear factor 1β; NeuroD1, neurogenic differentiation factor 1; KLF11, Kruppel-like factor 11 ; CEL, carboxyl ester lipase ; KCNJ11, potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11 **;** *PAX4, paired box gene 4 ; INS, insuline ; BLK, B lymphoid kinase; ABCC8, ATP-binding cassette transporter sub-family C member 8*. HGPO : hyperglycémie par voie orale avec mesure de la glycémie au temps 0 puis 2h après ingestion orale de 75g de glucose. L'année indiquée correspond à l'année de la publication de la première identification du gène impliqué comme responsable d'un possible MODY.

L'équipe de recherche anglaise du Pr Andrew Hattersley a proposé une classification de ces diabètes monogéniques plus large comprenant toutes les causes génétiques de dysfonctionnement de la cellule β en les classant en fonction de leur présentation clinique [6]. Cette classification a même suggéré d'abandonner le terme de MODY qui sous-entend que ces diabètes sont cliniquement proches des diabètes de type 2 même s'ils sont de survenue précoce et de transmission autosomique dominante. Compte-tenu de l'hétérogénéité clinique et génétique des différents types connus, cet article suggère que le terme MODY n'est plus approprié. Dans cette classification, le groupe des MODY2 est appelé par la description clinique suivante : « *familial mild fasting hyperglycemia* » en rapport avec une mutation du gène de la glucokinase. Concernant les MODY3, ils sont appelés « *HNF1A* MODY » et sont regroupés avec les MODY1 dont ils sont cliniquement proches sous le terme de « *familial young onset diabetes* » sans préjuger de l'origine génétique (mutation du gène *HNF1A* dans le MODY3 et du gène *HNF4A* dans le MODY1).

1.1.2 Une hétérogénéité clinique en relation avec une hétérogénéité génétique

L'ensemble des diabètes monogéniques est hétérogène sur le plan clinique et génétique. Le dénominateur commun de toutes ces affections est l'hyperglycémie et le fait qu'elle soit en rapport avec une mutation d'un seul gène. Mais l'hyperglycémie résulte de différents mécanismes physiopathologiques avec une présentation clinique variable en relation avec de nombreux gènes concernés [7]. Dans ce travail, nous nous attachons à décrire les diabètes monogéniques reliés à un défaut de l'insulino-sécrétion mais d'autres formes monogéniques affectent l'insulino-sensibilité (Figure 2).

Défaut d'insulino-sécrétion		Défaut d'insulino-sensibilité	
Année	**Maladie**	**Année**	**Maladie**
1992-1999	MODY1 MODY2 MODY3 MODY4 MODY5 MODY6	1988	Insulino-résistance de type A Syndrome de Donohue
1992	Diabète mitochondrial		
1998	Syndrome de Wolfram		
2004-2006	Diabète néonatal par anomalies des sous-unités des canaux potassiques	2000	Lipodystrophie partielle familiale
2008	Diabète néonatal par anomalie du gène de l'insuline	2002	Lipodystrophie généralisée

Figure 2 : Les grandes étapes ayant permis de découvrir différents diabètes monogéniques avec dysfonctionnement de la cellule β ou défaut d'insulino-sensibilité (adapté de Klupa et al, 2012 [8])

Sur le plan clinique, ces diabètes monogéniques avec dysfonctionnement de la cellule beta sont extrêmement variables tant sur l'âge d'apparition que sur le mode de transmission avec par exemple des formes autosomiques dominantes (par définition dans les MODY 2 et 3) ou de transmission maternelle (diabète mitochondrial) ; au contraire, dans les MODY5 en rapport avec des mutations de *HNF1B*, les mutations peuvent être transmises de façon autosomique dominante mais elles sont le plus souvent spontanées *de novo* et donc non transmises.

Sur le plan fonctionnel, les gènes impliqués dans les diabètes monogéniques avec défaut d'insulino-sécrétion sont nombreux, mais la plupart de ceux-ci codent pour des facteurs exprimés dans la cellule beta avec un rôle possible et parfois démontré dans la différentiation cellulaire et/ou dans la physiologie de l'insulino-sécrétion (Figure 3).

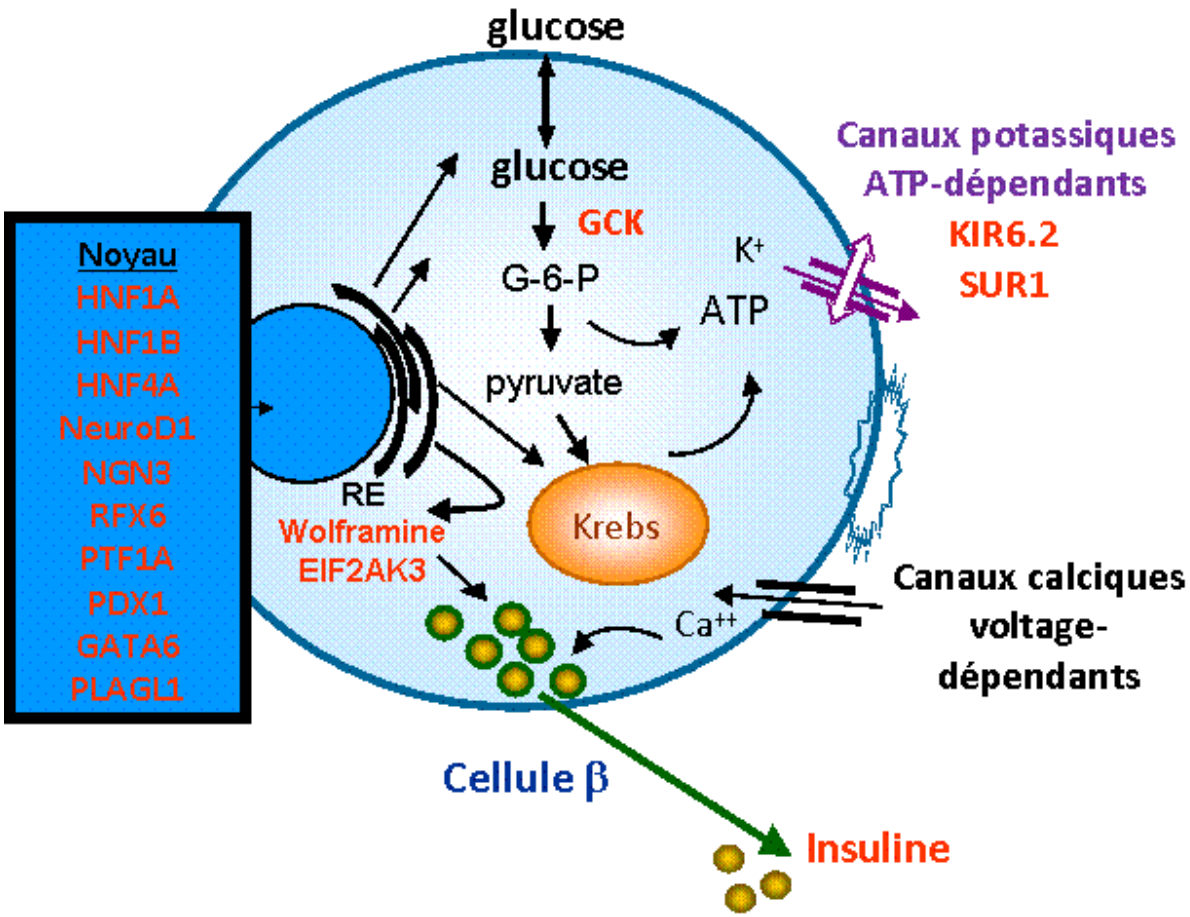


Figure 3 : Diabètes monogéniques : mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans le développement et le fonctionnement de la cellule β.
Ces protéines sont représentées en orange sur cette figure librement adaptée (Van de Bunt et al, 2012 **[9]**). EIF2AK3, eukaryotic translation initiation factor 2α kinase 3; GCK, glucokinase; HNF1A, hepatocyte nuclear factor 1α; HNF1B, hepatocyte nuclear factor 1β; HNF4A, hepatocyte nuclear factor 4α; Kir6.2, ATP-sensitive K^+ channel sub unit 6.2; NeuroD1, neurogenic differentiation factor 1; NGN3, neurogenin 3; PDX1, pancreatic and duodenal homeobox 1; PLAGL1, Pleiomorphic adenoma-like protein 1; PTF1A, pancreas transcription factor 1α; RFX6, regulatory factor X6; SUR1, sulphonylurea receptor isoform 1.

1.1.3 Importance du diagnostic génétique en pratique clinique

Cet ensemble des diabètes monogéniques est donc hétérogène au plan clinique et au plan génétique et certaines formes peuvent être confondues avec des diabètes de type 1 ou de type 2. En 2008, j'ai participé avec d'autres généticiens et cliniciens à une table ronde visant à établir des recommandations guidant le diagnostic moléculaire des diabètes monogéniques [10]. En effet, il est important d'identifier les patients présentant un diabète monogénique pour des raisons tenant à la fois au pronostic, à la prise en charge thérapeutique, à la présence d'anomalies associées au diabète et bien sûr à l'éventualité d'un dépistage familial. L'exemple des diabètes néonatals permanents associés à des mutations des gènes *KCNJ11* ou *ABCC8* est édifiant car il a été montré que les patients affectés pouvaient être traités par des sulfonylurés

et que ce traitement était même plus efficace que l'insulinothérapie pour le contrôle du diabète. Il a donc été possible de remplacer des traitements par insulinothérapie (injections sous-cutanées pluriquotidiennes) par des traitements *per os* par des sulfamides hypoglycémiants avec une amélioration du contrôle glycémique chez ces patients dont la qualité de vie et le pronostic ont été transformés [11][12].

1.1.4 Diabètes monogéniques : quelle relation avec la génétique du diabète de type 2 ?

Même si la prévalence de chacun des différents diabètes monogéniques est modeste, l'éclairage qu'ils peuvent apporter sur la physiopathologie de la cellule beta est important et ce d'autant plus qu'ils affectent un grand nombre de facteurs impliqués dans la fonction et le développement de la cellule beta (Figure 3) [8]. Par opposition, le diabète de type 2 est une maladie très fréquente et multifactorielle même sur le plan génétique (polygénique). L'identification de variants génétiques associés au diabète de type 2 a connu une croissance exponentielle ces dernières années en raison de l'avènement des grandes études d'associations pangénomiques (GWAS ou Genome Wide Association Studies). Celles-ci ont été rendues possibles grâce au développement des puces à haute densité et par la connaissance de la séquence du génome humain depuis le début des années 2000 [13][14] permettant de construire les cartes haplotypiques des variations génétiques fréquentes dans des populations de différents origines géographiques (projet international HapMap http://www.hapmap.org/).
Ainsi les GWAS ont permis d'identifier des loci de susceptibilité au diabète de type 2 par centaines ; plusieurs d'entre eux paraissent robustes car répliqués dans de larges cohortes de patients de même origine géographique mais également d'origine géographique différente. Le locus *TCF7L2* est le facteur génétique le plus répliqué de l'histoire de la génétique du diabète de type 2 [15] ; de nombreuses études fonctionnelles ont ensuite identifié un rôle possible pour TCF4 le produit protéique de *TCF7L2* dans le développement du pancréas et la sécrétion d'insuline [16]. Certains autres des facteurs identifiés (comme *PPARG* et *KCNJ11*) sont déjà connus pour être des cibles des thérapeutiques utilisées dans le diabète de type 2 (thiazolinediones et sulfamides hypoglycémiants respectivement) ouvrant le champ de la pharmacogénomique qui devrait se développer dans les années à venir. Plus récemment des GWAS ont été développés pour rechercher les variants génétiques associés non plus au diabète lui-même mais à des traits cliniques associés au diabète comme la glycémie à jeun,

l'insulinémie, le taux de cholestérol ou l'indice de masse corporelle. Ces nouveaux travaux ont permis d'identifier de nouveaux gènes dont certains sont communs avec ceux précédemment identifiés comme associés au diabète de type 2, et d'autres pas, ouvrant la perspective de découverte de nouvelles voies biologiques de l'homéostasie glucidique. Compte tenu du nombre exponentiel de GWAS publiés dans la littérature, la liste de loci de susceptibilité au diabète de type 2 est réactualisée régulièrement et disponible sur le site du National Institutes of Health (NIH) http://www.genome.gov/gwastudies/ ; une liste récente est présentée dans la Figure 4 et leur localisation chromosomique dans la Figure 5.

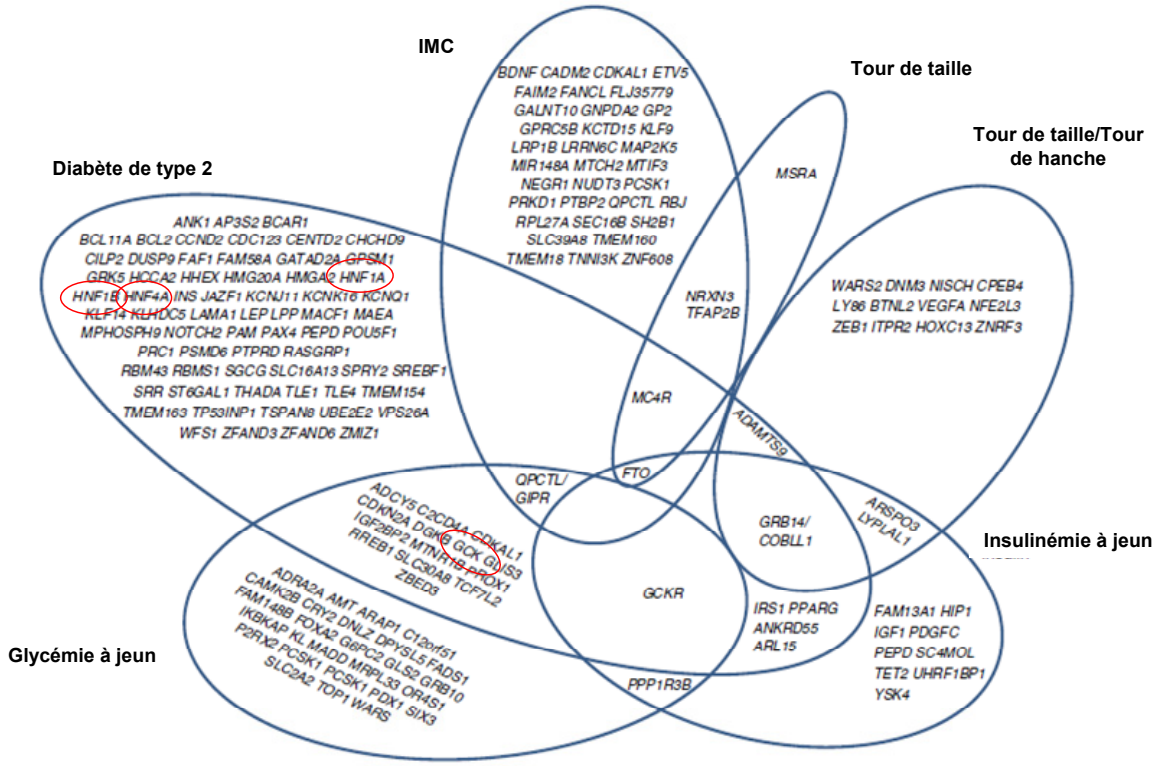


Figure 4 : Liste de loci identifiés par les GWAS comme associés au diabète de type 2 et à différents traits cliniques qui y sont associés [17].
Les gènes présentés sont les gènes qui sont les plus proches des loci identifiés de façon significative dans les GWAS mais ne sont pas nécessairement les gènes responsables. Sont retrouvés dans cette liste parmi les loci associés au diabète de type 2 : différents gènes dont les mutations sont responsables de diabètes monogéniques, tels que *HNF1A* (MODY3), *HNF4A* (MODY1), *HNF1B* (MODY5). Le gène de la glucokinase (*GCK*) dont les mutations entraînent un MODY2 a été retrouvé comme associé à la fois au diabète de type 2 et à la glycémie à jeun.



Figure 5 : Représentation des résultats des GWAS présentant la localisation chromosomique des SNP associés au diabète de type 2 avec $p \leq 5 \times 10^{-8}$.
Chaque locus de susceptibilité au diabète de type 2 est représenté par un rond orange avec un trait noir qui le relie à la région chromosomique. (Figure disponible en ligne à partir du lien suivant : http://www.ebi.ac.uk/fgpt/gwas/#downloadstab)

Il faut cependant garder à l'esprit que si les GWAS ont permis d'identifier de nombreux variants génétiques associés au diabète de type 2 ou à des traits cliniques comme la glycémie à jeu, ces variants n'ont individuellement qu'un effet faible voire très faible sur la survenue du diabète ou sur la variation d'un trait clinique. Ainsi l' « Odds Ratio » (OR) du locus le plus fortement associé au diabète *TCF7L2* n'est que de 1,30 [18]. De plus le gène présenté comme étant associé au locus d'intérêt n'est pas nécessairement le gène responsable de la maladie ; le locus identifié est une région du génome qui porte éventuellement le variant causal qui peut lui-même agir à distance par exemple en modulant l'expression d'un autre gène très distant. Ainsi, si les loci sont souvent présentés par le nom du gène le plus proche du SNP identifié, le rôle fonctionnel causal du gène en question dans la survenue de la maladie n'a pu que rarement être mis en évidence. Les GWAS ont fait avancer l'état de nos connaissances de la génétique et de la physiopathologie du diabète de type 2 en nous rappelant que le diabète de type 2 est une maladie de la cellule β avec un défaut de l'insulino-sécrétion car la plupart des

gènes identifiés pointent vers un dysfonctionnement de la cellule β (comme, par exemple, *TCF7L2* et *SLC30A8*).

Concernant les gènes dont les mutations sont responsables de diabètes monogéniques, ils avaient été pour certains déjà été démontrés comme associés au diabète de type 2 par les anciennes approches « gènes candidats » car ils étaient des facteurs qu'il était logique de tester dans ces premiers travaux. Grâce à ce type d'approche, une équipe japonaise avait montré que le variant commun de *HNF1A* p.I27L (rs1169288) était associé fortement au diabète de type 2 uniquement chez les sujets de poids normal [19]. Plus récemment, l'avènement des GWAS a permis de retrouver des associations pour de nombreux loci dont *HNF1A*. En effet, le locus du gène *HNF1A* a été associé avec de multiples traits cliniques tels que le diabète de type 2 lui-même (avec un $p=2.10^{-8}$) [20], le taux de protéine C-réactive (CRP) [21][22][23], la maladie coronarienne [21][24] et le taux de cholestérol LDL [25]. En tant que facteur de transcription d'expression hépatique, HNF1A régule de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation et dans le métabolisme des lipides dans le foie. Ces démonstrations d'association génétique sont un lien supplémentaire entre ces différents dysfonctionnements métaboliques déjà connus sur le plan épidémiologique. Très récemment, une analyse à très large échelle de l'exome humain dans une population de patients mexicains et latino-américains a identifié un variant rare de *HNF1A* comme étant associé au diabète de type 2 dans cette cohorte [26]. Ce variant rare c.1522G>A (p.E508K) semble spécifique à la population latino-américaine et il a un effet fonctionnel en diminuant l'activité de transactivation de HNF1A. Ces travaux ont identifié pour la première fois un variant rare de *HNF1A* comme associé très fortement au diabète de type 2 dans une population spécifique et avec un OR très élevé (>5). Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'identifier de nouveaux variants rares ayant des effets fonctionnels responsables de diabètes de type 2 que l'on pourrait classifier d'oligogéniques (comme c'est déjà décrit pour les variants du gène *MC4R* dans l'obésité [27]). De plus il est possible, même si cela reste à démontrer, que les patients diabétiques de type 2 porteurs de ce variant, puissent bénéficier de traitements spécifiques car les sulfamides sont connus pour être particulièrement efficaces dans les MODY3 et donc possiblement également chez ces patients.

1.2 Les diabètes de type MODY3

1.2.1 Premières descriptions

En 1974, en Grande-Bretagne, Tattersall a décrit 3 familles présentant un diabète découvert à l'adolescence dont la sensibilité aux sulfamides perdurait 40 ans plus tard et avec une transmission autosomique dominante [28][29]. En 1973, à Paris, Lestradet avait déjà rapporté une première famille avec diabète juvénile non insulino-dépendant de transmission dominante. Enfin, Fajans dans le Michigan avait décrit 45 patients dont le diabète avait été diagnostiqué avant l'âge de 25 ans et qui gardait une sensibilité aux sulfamides jusqu'à 16 ans après la date du diagnostic. En 1975, la collaboration entre Tattersall et Fajans a permis de reconnaître le caractère héréditaire des diabètes « chimiques » du Michigan qu'ils ont nommés par l'acronyme MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) avec la définition initiale suivante « *fasting hyperglycaemia diagnosed under age 25 which could be treated without insulin for more than two years* » [30].

Quand les gènes responsables des MODY 1 et 3 ont été identifiés en 1996 [3][31], on a su que la première famille décrite par Tattersall était en réalité porteuse d'une mutation du gène *HNF4A* responsable d'un diabète MODY1. Le phénotype du diabète MODY1 est très proche de celui du MODY3 mais est beaucoup plus rare que celui-ci. Une caractéristique clinique peut orienter le diagnostic : les sujets porteurs d'une mutation d'*HNF4A* sont parfois macrosomes à la naissance en raison d'un hyperinsulinisme, responsable d'hypoglycémies néonatales quelquefois brèves (quelques jours) mais dans certains cas prolongées jusqu'à plusieurs années et sensibles au diazoxide. L'hyperinsulinisme n'est pas en rapport avec un éventuel diabète maternel car il est également observé chez les enfants qui ont hérité de la mutation d'*HNF4A* de leur père. Le suivi à long terme de certains de ces enfants a montré que l'hyperinsulinisme était spontanément résolutif et que ces enfants pouvaient évoluer ultérieurement vers un diabète. La même mutation d'*HNF4A* peut donc être responsable, par des mécanismes non élucidés, de cette séquence hyperinsulinisme – rémission – diabète, comme cela a été rapporté pour des mutations du gène *ABCC8* et plus récemment même si cela semble plus rare pour *HNF1A*. Des antécédents familiaux ou personnels d'hyperinsulinisme néonatal et/ou de macrosomie peuvent donc, dans un contexte d'histoire familiale de diabète, orienter vers un MODY1 dans lesquels cela est plus fréquemment rapporté que dans le MODY3.

1.2.2 Présentation clinique

La présentation clinique typique du MODY3 est celle d'un adolescent ou jeune adulte présentant une hyperglycémie de degré variable avec une forte histoire familiale de diabète de diagnostic précoce. En réalité, le diagnostic est difficile, du fait de la grande variabilité des phénotypes associés aux mutations d'*HNF1A* et parce que le diagnostic différentiel avec un diabète de type 1 débutant ou avec un diabète de type 2 de survenue précoce peut se poser.
Plusieurs critères permettent d'avancer le diagnostic de MODY3 :

- la négativité des marqueurs d'auto-immunité anti-GAD et anti-IA2 (voire anti-ZnT8) ce qui permet d'écarter le diagnostic de diabète de type 1,
- la présence d'antécédents familiaux dans au moins deux générations de diabète de survenue relativement précoce (avant l'âge de 40 ans),
- la sensibilité aux sulfamides hypoglycémiants ou au répaglinide [32],
- l'aggravation avec le temps du déficit de l'insulino-sécrétion,

Le diagnostic différentiel du diabète de type MODY3 est difficile avec un diabète de type 2 de survenue précoce. A l'échelle d'une population, le MODY3 se caractérise certes par un âge au diagnostic plus bas, un indice de masse corporel (IMC) au diagnostic plus bas, des marqueurs d'insulino-résistance moins fréquents. Cependant, ces critères ou leur combinaison sont mis en défaut à l'échelon individuel, ce d'autant plus que l'obésité et l'insulino-résistance qui l'accompagne progresse dans la population générale et dans la population patients MODY3 qui ne sont pas épargnés.
L'intérêt du diagnostic clinique puis génétique du MODY3 est clair en raison de :

- la sensibilité particulière de ce type de diabète aux sulfamides hypoglycémiants,
- la possibilité d'une polyadénomatose hépatique qui, même si elle est rare, est potentiellement gravissime du fait du risque d'hémorragie et de carcinome hépatocellulaire [33],
- l'intérêt du dépistage familial. En effet, les variations de l'expression phénotypique des mutations du gène *HNF1A* font qu'il est important de dépister les apparentés encore normoglycémiques et ceux dont le diabète, modéré, pourrait être méconnu, en particulier chez les femmes en âge de procréer.

1.2.3 Description des mutations du gène *HNF1A*

Le gène *HNF1A* est situé sur le bras long du chromosome 12 chez l'homme (12q24.2). Il s'étend sur environ 23 kb et il comprend dix exons et un seul promoteur [34]. Le gène présente trois domaines fonctionnels qui sont le domaine de dimérisation comprenant le promoteur et une partie de l'exon 1, le domaine de liaison à l'ADN (fin de l'exon 1, exons 2 et 3 et une partie de l'exon 4) et le domaine de transactivation (fin de l'exon 4 jusqu'à l'exon 10) (Figure 6). Ce gène code pour un facteur de transcription HNF1A comprenant 631 acides aminés exprimé dans l'épithélium du foie, du rein, de l'estomac et du pancréas. Il existe trois isoformes de HNF1A appelés A, B et C qui sont identiques au niveau de l'extrémité 5' mais HNF1A(C) est tronquée dans l'exon 6 et HNF1A(B) se termine au niveau de l'exon 7. HNF1A(A) est l'isoforme prédominante pendant la vie fœtale alors que HNF1A(B) est la plus abondante dans le pancréas adulte [35].

Les mutations de *HNF1A* sont la première cause de MODY en Grande-Bretagne et en France et elles représentent entre 35 et 55 % des MODY chez l'adulte [36][37][38]. La plupart des mutations du gène *HNF1A* sont des mutations de type tronquantes ou faux sens et elles sont réparties tout au long du gène depuis le promoteur jusqu'au dixième exon (Figure 6). Certaines affectent aussi les sites d'épissage dans les régions introniques. La pénétrance de ces mutations est d'environ 63% à l'âge de 25 ans, 93,6 % à l'âge de 50 ans et quasi complète (98,7 %) à l'âge de 75 ans [39]. Ces mutations sont hétérozygotes et responsables d'une haplo-insuffisance avec synthèse d'ARN messagers instables et dégradés ; dans le cas des mutations entraînant un codon stop prématuré (environ 30 % des mutations), il a été démontré que les ARNm étaient dégradés par le système du NMD (Nonsense Mediated Decay ou dégradation des ARNm non-sens) ce qui confirmait que l'haplo-insuffisance de *HNF1A* était bien le mécanisme impliqué dans la survenue du MODY3 [40][41]**.**

Sian Ellard a publié en 2000, en 2006 puis plus récemment en 2013 conjointement avec Christine Bellanné-Chantelot une mise à jour des mutations connues du gène *HNF1A* permettant de faire état de 414 mutations responsables de MODY3 chez 1247 familles [38][42][43]. Dans la vaste majorité des cas (65%), chaque famille a sa propre mutation appelée mutation privée. La mutation c.872dupC (p.G292fs, anciennement P291fsinsC) est connue pour être la seule mutation récurrente ; elle a été décrite chez au moins 234 familles dans le monde entier [38][44]. De nombreux auteurs ont rapporté et rapportent régulièrement de nouvelles mutations réparties tout au long du gène notamment dans des populations d'origine ethnique différente comme dans les populations asiatiques chez lesquelles la

fréquence des MODY serait finalement plus importante qu'attendue au moins au Japon [45][46][47]. En effet, en 2002, trois nouvelles mutations ont été décrites L518fsdelTCCinsA, T521I et V617I chez des familles Japonaises [48]. La mutation L518fsdelTCCinsA était récurrente chez trois familles toutes originaires de la même île d'Okinawa. En 2002 et 2005, cinq nouvelles mutations de *HNF1A* ont été décrites dans des familles Chinoises : Q176X, Q243E, A311D, P379R et P488fsdelC [49][50]. En 2006, une nouvelle mutation de *HNF1A* a été décrite chez un patient Coréen : P393fsdelC [51].

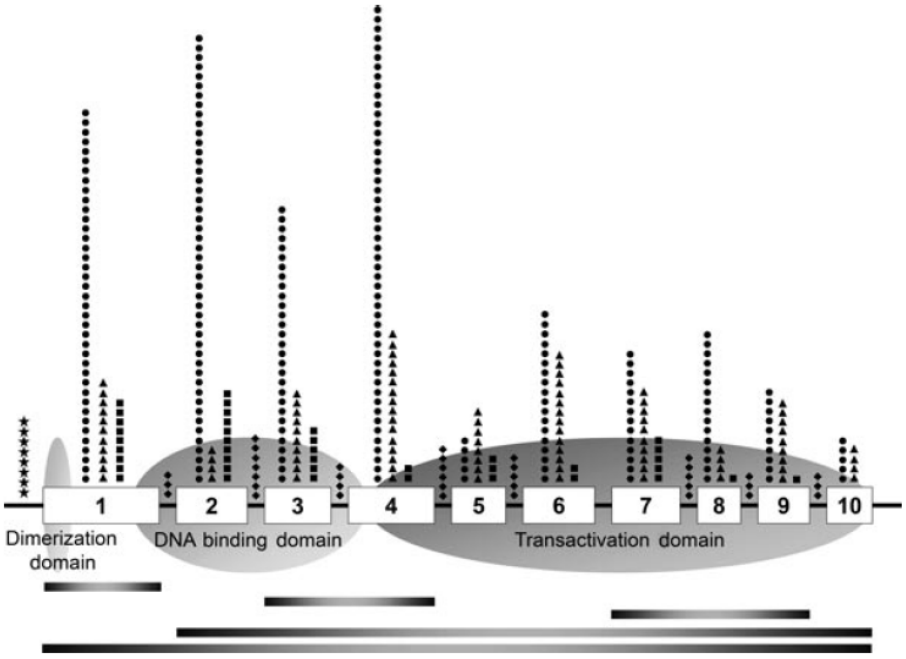


Figure 6 : Distribution des mutations dans les différentes régions du gène *HNF1A* : promoteur, 10 exons et sites d'épissage [38].
Les étoiles représentent les mutations au niveau du promoteur. Les ronds noirs représentent les mutations faux-sens, les triangles noirs : les mutations avec décalage du cadre de lecture, les carrés noirs : les mutations avec codon stop prématuré, et les losanges noirs : les mutations affectant les sites d'épissage. Les domaines fonctionnels du gène sont notés sous la représentation du gène lui-même. Les barres horizontales en bas de la figure représentent les 4 délétions partielles et la délétion totale du gène.

Des délétions ont pu être mises en évidence dans de rares cas de MODY 1 et 3 chez deux patients (larges délétions comprenant respectivement les gènes entiers *HNF1A* et *HNF4A*) [52]. Dans ce travail mené dans le laboratoire de Christine Bellanné-Chantelot, nous avions analysé par MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) 78 patients non apparentés chez lesquels les diagnostics de MODY3 puis de MODY1 avaient été exclus par séquençage de *HNF1A* et *HNF4A*. Cinq autres délétions partielles ou totales du gène *HNF1A* ont été publiées par deux autres équipes [53][54]. Ces résultats montrent que les délétions sont une cause rare de MODY 1 et 3 alors qu'elles sont responsables de la vaste majorité des MODY5 (délétion partielle ou totale du gène *HNF1B*) [55]. Aucune duplication n'avait été mise en évidence pour les gènes *HNF1A* et *HNF4A* alors que nous avions décrit une famille

avec une duplication de *HNF1B* présentant cliniquement un MODY5 sur trois générations [56].

1.2.4 Variabilité phénotypique

Comme cela a déjà été souligné, la présentation clinique du MODY3 est extrêmement variable avec des modes de survenue pouvant évoquer chez certains patients un diabète de type 1, chez d'autres un diabète gestationnel ou le plus souvent un diabète de type 2. Dans le cadre du Groupe d'Etude des MODY de la Société Française de Diabétologie, nous avons analysé les caractéristiques cliniques de 196 patients cas index présentant un MODY3 [57]. L'âge moyen au diagnostic de l'hyperglycémie était de 21 ans mais la distribution des âges au diagnostic était en fait très large (de 5 à 70 ans) (Figure 7).

TABLE 1. Main characteristics of 196 MODY3 and 283 non-MODY3 patients

	MODY3		Non-MODY3		
	n[a]		n		*P* value
At diagnosis					
Female/male	196	120/76 (61.2)[b]	283	131/152 (46.3)	0.0015
Euro-Caucasian/others	192	168/24 (87.5)	278	173/105 (62.2)	<0.0001
Three or more affected generations	193	106/87 (54.9)	272	90/182 (33.1)	<0.0001
Age (yr)	195	21 (5–70)	282	30 (4–69)	<0.0001
BMI (kg/m^2)	137	22.3 (14.2–42.2)	225	24.9 (15.6–48.7)	<0.0001
Symptoms (no/yes)[c]	184	139/45 (75.5)	274	177/97 (64.6)	0.014
HbA1c (%)	65	8 (5.2–13.3)	68	10.4 (5.3–16.7)	0.0001
At last visit					
Age (yr)	192	40 (13–79)	273	45 (12–79)	0.055
Duration of follow-up (yr)	191	15 (0.5–54)	270	11 (0.5–56)	0.0035
BMI (kg/m^2)	189	23.9 (17.1–42.6)	278	25.8 (16.1–43.9)	<0.0001
HbA1c (%)	190	7.1 (4.7–14)	269	7.8 (4.2–16.7)	0.0001
Arterial hypertension (yes/no)[d]	186	62/124 (33.3)	274	119/155 (43.4)	0.033
Dyslipidemia (yes/no)[c]	176	70/106 (39.8)	267	142/125 (53.2)	0.007
HDL cholesterol (mmol/liter)	172	1.44 (0.58–3.18)	263	1.29 (0.46–3)	0.0001
Triglycerides (mmol/liter)	180	1.07 (0.35–4.06)	266	1.13 (0.34–15)	0.0009
Uric acid (μmol/liter)	108	237.5 (105–549)	166	276 (75–651)	0.0028
γGT ratio[e]	129	0.27 (0.07–7.83)	219	0.48 (0.06–7.84)	<0.0001
Ferritin ratio[e]	90	0.28 (0.04–2.68)	178	0.43 (0.03–9.6)	0.0036

Figure 7 : Variabilité phénotypique au diagnostic de diabète et au cours du suivi dans une cohorte 196 patients présentant un MODY3 [57].

Les sujets porteurs d'une mutation d'*HNF1A* n'avaient pas, en moyenne, d'excès pondéral (IMC moyen à 22 kg/m²) mais là encore la distribution des IMC était en fait très large (de 14 à 42). A l'échelle de notre population, les patients MODY3 présentaient un âge au diagnostic plus bas, un IMC au diagnostic plus bas et des marqueurs d'insulino-résistance moins fréquents comparés à des patients chez lesquels n'avaient pas pu être identifiés de mutation de *HNF1A* ni de *HNF4A* (appelés dans notre travail patients non-MODY3). Nous avons pu montrer qu'à l'échelle de l'individu, les critères cliniques « classiques » de sélection des patients chez lesquels un diagnostic génétique de MODY3 est proposé, sont trop stringents et ne permettent pas de distinguer un patient présentant un MODY3 de celui qui présentait un

diabète de type 2 précoce. Dans ce travail, une équation de probabilité prenant en compte les données cliniques au diagnostic était proposée pour calculer la probabilité individuelle pour un patient d'être porteur d'une mutation de *HNF1A* et ainsi améliorer la rentabilité du dépistage génétique.

La variabilité du phénotype chez les patients MODY3 s'est encore complexifiée par des données récentes qui montrent que, comme pour d'autres gènes à l'origine de MODY (*HNF4A, ABCC8*), le gène *HNF1A* peut être impliqué chez des nouveau-nés présentant un hyperinsulinisme congénital [38][58][59][60]. Le phénotype de ces hyperinsulinismes est marqué par des hypoglycémies néonatales avant l'âge de 6 mois qui s'améliorent spontanément avec le temps et évoluent éventuellement vers un défaut d'insulino-sécrétion avec un diabète à l'âge adulte. Cette séquence semble cependant beaucoup plus rare pour *HNF1A* que pour *HNF4A*.

1.2.5 Corrélation génotype-phénotype

Dans le laboratoire de Christine Bellanné-Chantelot, nous avions analysé les mutations identifiées chez 356 patients MODY3 non apparentés et recherché une relation entre l'âge au diagnostic de diabète et les caractéristiques de la mutation [61]. Les mutations avaient été classées en fonction :

- de leur type : mutations faux-sens (substitution d'acide aminé) versus tronquantes incluant les substitutions non-sens, les délétions/insertions et les substitutions sur des sites d'épissage,
- du domaine fonctionnel affecté : dimérisation, liaison à l'ADN et transactivation,
- du nombre d'isoformes affectées : en effet trois isoformes sont générées par épissage alternatif : A (exons 1-10), B (exons 1-7) et C (exons 1-6).

Nous avions ainsi montré que la sévérité du MODY3 illustrée par l'âge au diagnostic de diabète est en partie liée au type de mutation et au domaine du gène affecté par cette mutation (Figure 8). Les mutations tronquantes étaient associées avec un âge médian au diagnostic précoce vers 18 ans quelque soit le domaine fonctionnel affecté par la mutation. Les patients présentant des mutations faux-sens avaient le même âge médian au diagnostic que les patients porteurs de mutations tronquantes si celles-ci affectaient le domaine de dimérisation ou de liaison à l'ADN. Par contre ces mutations faux-sens étaient associées avec un âge au diagnostic plus tardif si c'était le domaine de transactivation qui était affecté. Le fait que les mutations affectent le domaine de dimérisation ou de liaison à l'ADN outrepassait le fait que

les mutations affectent l'ensemble des trois isoformes de *HNF1A* ; en effet, quand on comparait l'âge au diagnostic des patients présentant une mutation qui affectait à la fois les trois isoformes et les domaines de dimérisation et de laison à l'ADN à ceux qui présentaient une mutation qui affectait les trois isoformes mais dans le domaine de transactivation. Au total, nous avions pu montrer que les patients présentant des mutations tronquantes ou des mutations des domaines fonctionnels de dimérisation ou de liaison à l'ADN présentaient les phénotypes les plus sévères.

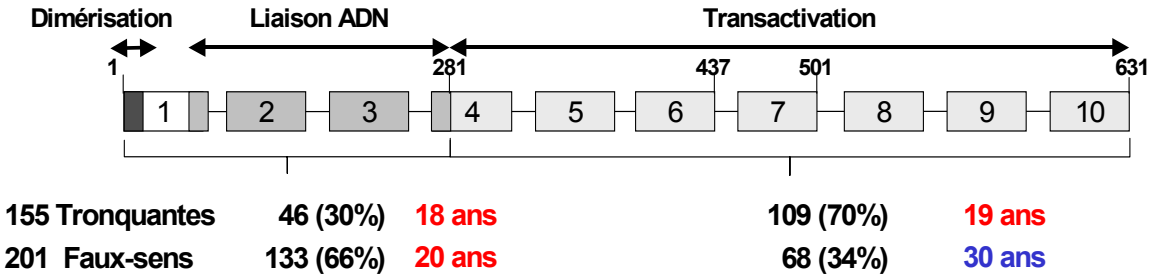


Figure 8 : La variabilité de l'âge au diagnostic de diabète est liée au type de mutation (tronquante versus faux-sens) et au domaine fonctionnel affecté quand il s'agit de mutation faux-sens [61].

1.2.6 Gènes modificateurs impliqués dans la variabilité phénotypique

Bien qu'une partie de la variabilité phénotypique soit expliquée par le type de mutation présentée par les patients, il persiste une grande variabilité qui n'est pas expliquée. En effet chez les patients porteurs de la même mutation récurrente P291Fs, l'âge au diagnostic chez les probands est très variable d'un individu à l'autre : 60 % des patients sont atteints avant 25 ans, et 40 % après l'âge de 25 ans avec une distribution qui va de 25 à 45 ans (Figure 9).

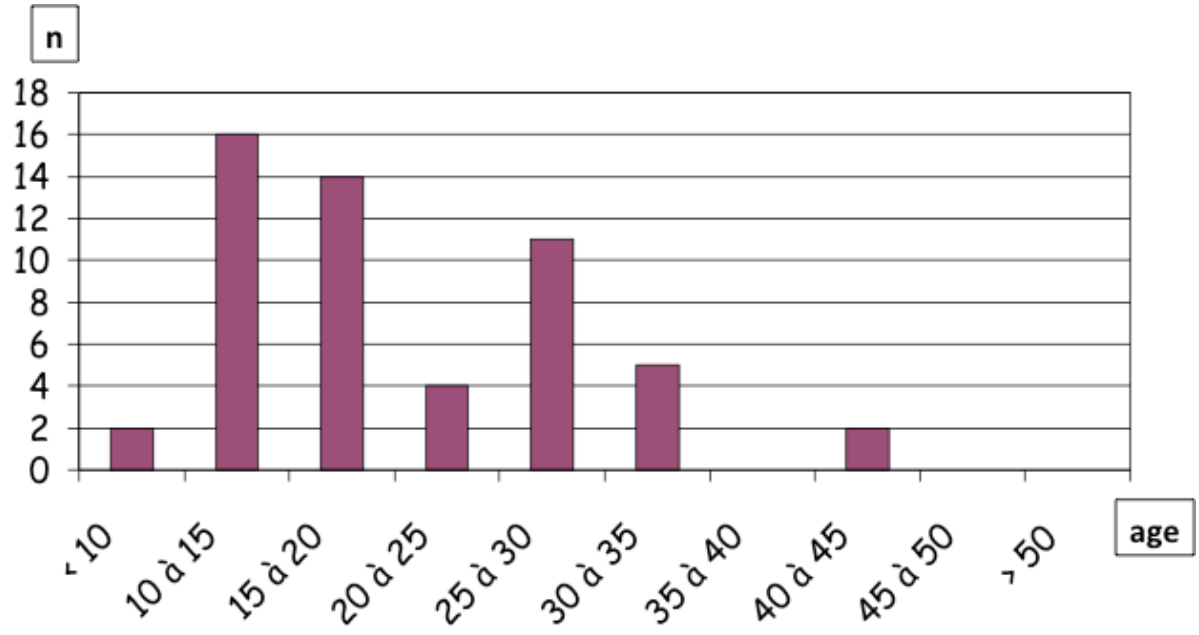


Figure 9 : Variabilité de l'âge au diagnostic chez des probands présentant un MODY3 en rapport avec la même mutation c.872dupC (p.G292fs, anciennement P291fsinsC).
En abscisse est présenté sous forme d'histogramme par tranche d'âge de 5 ans, l'âge au diagnostic de diabète. En ordonnée, en fonction de la hauteur de l'histogramme le nombre de patients atteints (Bellanné-Chantelot, données personnelles).

Ces observations suggèrent qu'en dehors du type de mutation présentée par les patients, le phénotype est modulé par d'autres facteurs modificateurs, qui pourraient être de type environnemental (cela a été démontré pour l'hyperglycémie maternelle et l'environnement intra utérin [62]) mais aussi de type génétique et en rapport avec des gènes modificateurs qui influeraient sur le phénotype MODY3. Une étude de génétique humaine a montré que, dans 13 familles dans lesquelles le diabète coségrégeait avec des mutations de *HNF1A*, l'âge d'apparition du diabète était lié à plusieurs régions génétiques. Parmi celles-ci, la région 14q24 (D14S588; [LOD] = 2.58, $P = 0.0004$) comprenait le gène *SEL1L* un contre-régulateur de la voie de signalisation NOTCH qui pourrait avoir un rôle dans le contrôle du développement des îlots de Langerhans [63]. Par ailleurs, des patients arborant un phénotype

sensiblement plus sévère que les autres membres de la même famille ont été identifiés comme porteurs de mutations digéniques car il présentaient à l'état hétérozygote des mutations sur les gènes *HNF4A* et *HNF1A* [64][65][66].

Toutefois, l'étude de la génétique humaine étant limitée par l'hétérogénéité génétique et le fait que l'environnement soit difficilement contrôlable, nous avons choisi dans ce travail d'étudier des modèles animaux de souris congéniques chez lesquelles le gène *Hnf1a* avait été inactivé.

Chapitre 2 : Les modèles expérimentaux de déficience en Hnf1a

2.1. Description du modèle murin mis au point au laboratoire

2.1.1 Généralités sur le gène *Hnf1a*

Le gène *Hnf1a* de la souris situé sur le chromosome 5 est très conservé entre les différentes espèces (homme, chimpanzé, singe, chien, vache, rat, poulet et zebrafish) [67]. Il code pour le facteur de transcription HNF1alpha dont des sites de liaison sont retrouvés sur les promoteurs de nombreux gènes d'expression hépatique comme celui de l'albumine, l'alpha1-antitrypsine ou les fibrinogènes alpha et beta. Par exemple, HNF1alpha se lie à un site situé à 25 nucléotides en amont d'une boîte TATA au niveau du promoteur du gène de l'albumine, chez la souris, le rat, l'homme et le xénope. Cet élément proximal est à la fois nécessaire et suffisant pour activer une transcription tissulaire spécifique dans des expériences de transfection.

Le gène *Hnf1a* est fortement similaire aux autres gènes présentant une séquence de type homéoboîte. La protéine est cependant caractérisée par la présence de l'insertion de 21 acides aminés entre la seconde et la troisième hélice de l'homéodomaine classique. Ainsi HNF1alpha est composée de trois domaines fonctionnels : un domaine N-terminal de dimérisation protéique, un domaine de liaison à l'ADN (« homeobox-like ») et un domaine C-terminal de transactivation impliqué dans le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. La dimérisation est nécessaire pour la liaison avec l'ADN et la délétion du domaine de dimérisation prévient cette liaison.

Hnf1a est exprimé dans le foie, le rein, l'intestin, le pancréas et l'estomac. A l'inverse de *Hnf1a*, le gène *Hnf1b* est peu exprimé dans le foie mais très abondant dans les voies biliaires et le rein. Au cours du développement embryonnaire, *Hnf1b* est exprimé plus précocément que *Hnf1a*. Les transcrits du gène *Hnf1b* apparaissent dès l'induction de l'endoderme hépatique à partir de l'intestin antérieur de l'embryon alors que la transcription d'*Hnf1a* est activée plus tard au moment de la condensation du parenchyme hépatique. Ainsi, HNF1alpha pourrait être un acteur secondaire du développement et de la différenciation tissulaire permettant le maintien ou l'établissement d'un état correct de différenciation terminale.

2.1.2 Mise au point de souris inactivées pour le gène *Hnf1a* au laboratoire

Le laboratoire a généré un modèle de souris où le gène *Hnf1a* avait été inactivé de façon ubiquitaire [68][69]. Le fonds génétique des souris était C57BL/6x129Sv ou 129SvxDBA2xC57BL/6 [69]. Pour inactiver le gène *Hnf1a*, deux vecteurs de recombinaison homologue différents avaient été utilisés dans la perspective d'une stratégie de sélection positive-négative [68][70][71]. En effet, cette méthode générale permet d'isoler des cellules souches embryonnaires qui contiennent des mutations ciblées de n'importe quel gène indépendamment de sa fonction à condition de disposer d'un fragment cloné du gène.

Dans notre modèle, les deux vecteurs de recombinaison homologue étaient construit de telle façon que la région codante du 1er exon était supprimée avec une différence essentiellement dans l'importance de l'extension de la délétion au 1er intron. La recombinaison homologue entraînait la délétion du premier exon et son remplacement par les cassettes β-galactosidase et néomycine. Cette délétion concernait ainsi les 108 premiers acides aminés de HNF1alpha qui comprennent le domaine de dimérisation et une partie du domaine de liaison à l'ADN. Pour la sélection négative, une cassette thymidine kinase avait été utilisée sous le contrôle du même promoteur PGK. La recombinaison homologue était reconnue par Southern Blot en fonction de la longueur des fragments (8,5 kb pour l'allèle sauvage et 11 kb pour l'allèle contenant la mutation ciblée).

Les souris hétérozygotes *Hnf1a*$^{+/-}$ présentaient un phénotype comparable aux souris sauvages et des expériences d'immunofluorescence dans les tissus d'embryons et d'adultes avaient confirmé que l'expression de la β-galactosidase sous le contrôle du promoteur endogène de *Hnf1a* était telle qu'attendue (Figure 10). Les croisements entre souris hétérozygotes ont généré des souris homozygotes et quelque soit la lignée initiale de cellules souches embryonnaires utilisées, les phénotypes des souris homozygotes étaient semblables.

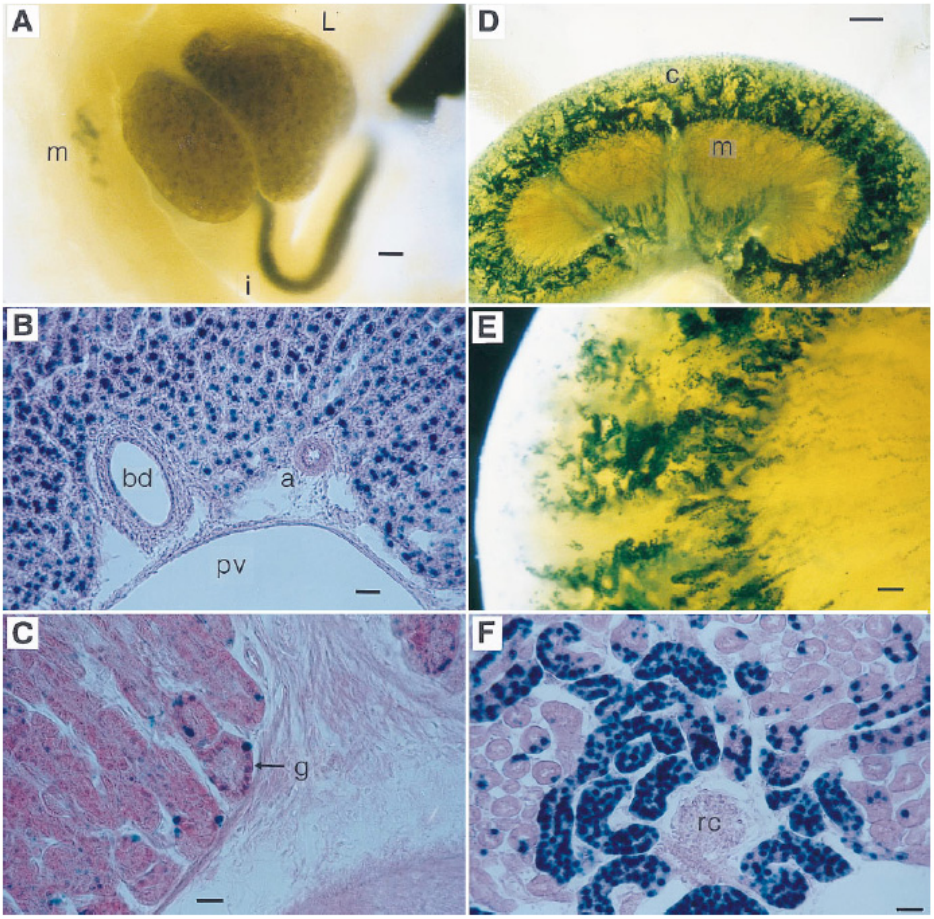


Figure 10 : Détection de l'activité de la β-galactosidase sous le contrôle du promoteur endogène de *Hnf1a* dans différents tissus chez les souris hétérozygotes *Hnf1a*$^{+/-}$ (Pontoglio et al, [68]).
A : Embryon au stade E 11,5. L = foie, I = intestin, M = mésonephros (barre d'échelle 100 µm)
B : Foie de souris adulte au niveau d'un espace porte : l'activité β-galactosidase était détectable dans tous les hépatocytes. bd = canal biliaire, a= artère hépatique, pv= veine porte (barre d'échelle 20 µm)
C : Estomac de souris adulte ; la flèche montre une glande gastrique (g) avec quelques cellules marquées (positivement) (barre d'échelle 20 µm)
D : Rein de souris adulte ; le marquage est surtout présent dans la région corticale. c= corticale, m= médullaire. (barre d'échelle 0,5 µm)
E : Agrandissement d'une section de rein ; les structures tubulaires sont clairement marquées (barre d'échelle 100 µm)
F : Rein de souris adulte : le signal est présent dans les tubules rénaux mais pas dans les corpuscules rénaux ou glomérules (rc). (barre d'échelle 20 µm)

2.1.3 Phénotype des souris homozygotes *Hnf1a*$^{-/-}$

Les premières souris *Hnf1a*$^{-/-}$ rapportées par M. Pontoglio dans Cell en 1996 présentaient une croissance très altérée notable dès la fin de la première semaine de vie et leur poids moyen au moment du sevrage (25ème jour post-natal) était entre 40% et 80% celui de leurs apparentés sauvages (Figure 11) [68]. Au vingtième jour de vie, les mutants présentaient une atrophie musculaire et une perte de la graisse sous-cutanée. Sur 1000 souris homozygotes, seulement 50% ont survécu au delà du 26ème jour, 15% jusqu'au 42ème jour et moins de 1% au delà de 3

mois. De plus les souris étaient polyphagiques et ne supportaient pas le jeûne nocturne. Une hypertrophie du foie était observable dès la deuxième semaine de vie post natale par rapport aux souris sauvages. L'histologie retrouvait une stéatose franche chez 20% des mutants. L'épithélium gastrique était également désorganisé avec une diminution de son épaisseur et une structure moins compacte. La biologie retrouvait une élévation des transaminases et une hypercholestérolémie. Mais le plus notable sur le plan biologique était la présence d'une hyperphénylalaninémie majeure associée à une polyurie, une glycosurie, une aminoacidurie, une phosphaturie, et une déminéralisation osseuse. La glycosurie était détectable précocément dès les premiers jours de vie post-natale et l'importance de la perte urinaire de glucose était d'environ 600mg par jour pour les animaux d'environ 8g. Ces premiers travaux avaient donc montré que les souris inactivées pour *Hnf1a* de façon biallélique présentaient un défaut majeur de croissance (nanisme) associé à une phénylcétonurie et à un syndrome de Fanconi.

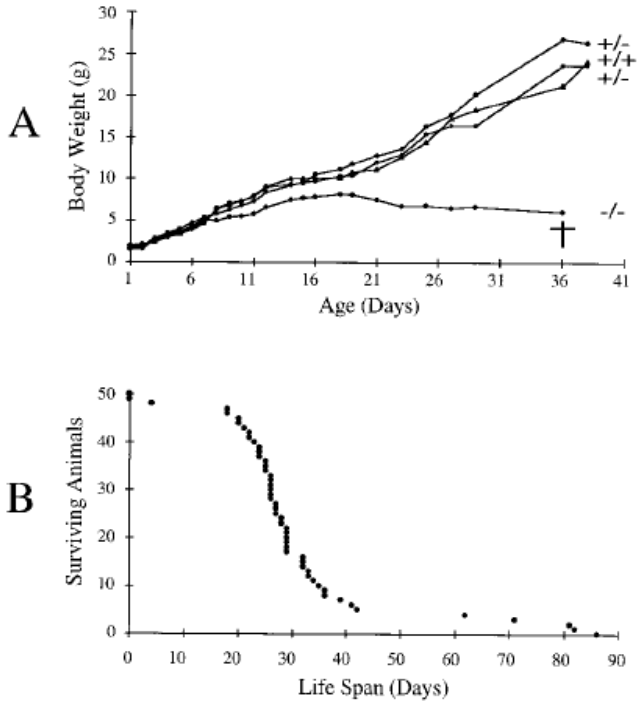


Figure 11 : Courbe de croissance et taux de survie des souris homozygotes Hnf1a$^{-/-}$ [68].
En A, sont présentés les courbes de croissance de 4 souris dont 2 hétérozygotes, 1 sauvage et 1 homozygote qui dans ce cas précis est décédée au 36ème jour de vie avec un poids qui a stagné aux alentours des 5g.
En B, sont présentés les courbes de survie en jour de 50 souris homozygotes Hnf1a$^{-/-}$. Un nombre important de décès surviennent après le sevrage vers le 25ème jour. Sur 1000 souris homozygotes, seulement 1% ont vécu au-delà du 3ème mois.

En 1998, M. Pontoglio a montré que ces souris homozygotes *Hnf1a*$^{-/-}$ présentaient une hyperglycémie marquée (13,1±0,7mM) par rapport aux souris sauvages (7,8±0,2mM) et

hétérozygotes (7,9±0,3mM), et que cette hyperglycémie était associée à un défaut d'insulino-sécrétion (Figure 12) [72]. La masse beta rapportée au poids corporel n'était pas différente chez les mutants et le contenu en insuline du pancréas était discrètement abaissé par rapport aux souris sauvages. Le défaut d'insulino-sécrétion chez les mutants a été mis en évidence grâce à des expériences de stimulation de l'insulino-sécrétion par le glucose et l'arginine dans des pancréas perfusés et des îlots périfusés issus de souris mutantes, sauvages et hétérozygotes. De plus, l'analyse histologique basée sur la détection de l'insuline et des autres hormones du pancréas endocrine (glucagon, polypeptide pancréatique et somatostatine), a montré que les îlots des souris *Hnf1a*$^{-/-}$ étaient de petite taille avec un aspect « mité » du marquage insulinique et une perte de l'aspect en couronne habituel du marquage pour les cellules non beta (Figure 13). Ce travail a ainsi permis de d'établir que le diabète induit dans ce modèle de souris invalidée pour *Hnf1a* était proche du diabète observé chez les patients MODY3 qui présentent une mutation du gène humain *HNF1A*.

	Age	Glucose	Body wt	Pancreatic wt	Insulin content	Insulin content/ pancreatic wt	β cell mass	β cell mass/ body wt
	wk	*mM*	*g*	*mg*	*μg*	*μg/mg*	*mg*	*μg/g*
HNF-1α +/+	2 (n = 4)	6.7±0.5	6.03±0.3	24.6±2.2	6.4±0.5	0.27±0.03	N/A	N/A
	6 (n = 5)	8.7±0.5	21.6±1.2	207±6.2	21.6±1.2	0.1±0.01	0.87±0.1 (n = 4)§	42.4±7.5
HNF-1α +/−	2 (n = 7)	6.5±0.3	6.2±0.1	23.7±1.2	6.7±0.4	0.29±0.01	0.34±0.06 (n = 3)	28.5±4.1
	6 (n = 4)	8.0±0.5	21.2±0.2	307±12.9‡	25.7±2.5	0.08±0.01	0.99±0.2 (n = 4)	44.6±8.4
HNF-1α −/−	2 (n = 5)	8.0±0.7*‡	4.9±0.2*‡	20.6±0.1	3.2±0.5*‡	0.15±0.02*‡	0.16±0.02* (n = 5)	20.4±3.6
	6 (n = 3)	13.2±0.5*‡	8.9±0.3*‡	93±8.2*‡	5.0±0.6*‡	0.06±0.01‡	0.4±0.1*‡ (n = 4)	37.1±5.8

*$P < 0.05$ compared with (+/−) mice. ‡$P < 0.05$ compared with (+/+) mice. §n refers only to right two columns. *N/A*, Not applicable.

Figure 12 : Poids corporel, glycémies non à jeun, contenu en insuline et masse beta chez les souris Hnf1a$^{-/-}$ comparées aux sauvages et aux hétérozygotes à 2 et 6 semaines de vie [72].

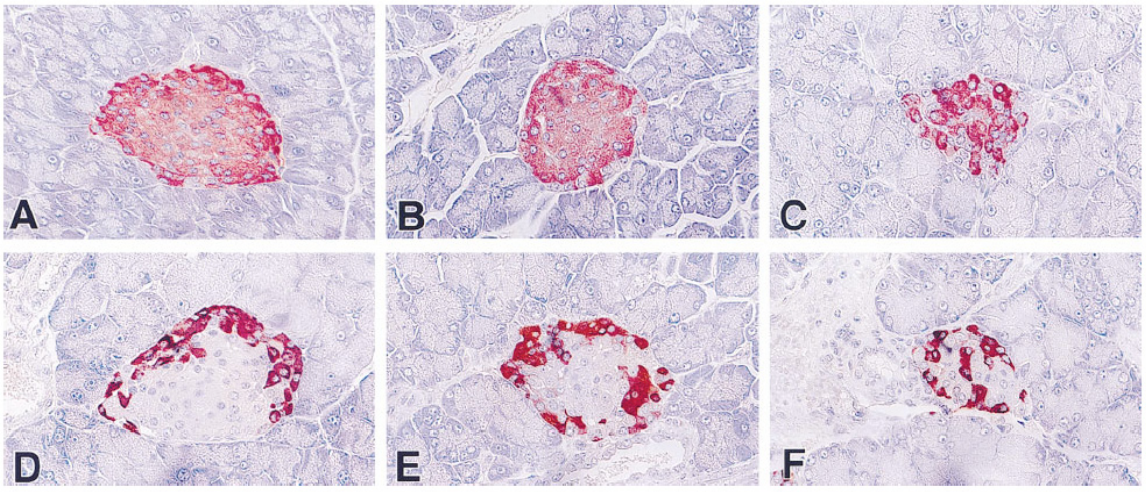


Figure 13 : Coupes en paraffine de pancréas de souris sauvages (A et D), hétérozygotes (B et E) et homozygotes (C et F) pour l'invalidation de *Hnf1a* avec marquage en immunohistochimie de l'insuline (A-B-C) et de l'ensemble des hormones glucagon, polypetide pancréatique et somatostatine (D-E-F) [72].

2.1.4 Les autres modèles murins avec déficience en *Hnf1a*

En 1998, parallèlement aux derniers résultats du laboratoire, Y.H. Lee a rapporté un modèle de souris invalidées pour *Hnf1a* par le système de recombinaison Cre/LoxP [73]. Dans ce modèle, le 1er exon et une partie du 1er intron étaient supprimés à partir de la génération F1 produite par le croisement entre C57BL/6 et FVB/N-TgN(EIIa-Cre). Ces souris présentaient un nanisme marqué et une hyperglycémie après la deuxième semaine de vie sans anomalie rénale majeure et sans excès de mortalité (Figure 14). Les auteurs avaient observé une diminution de l'expression d'IGF1 avec une résistance à la GH responsable du défaut de croissance proche du syndrome de Laron. En effet les taux de GH étaient très augmentés de 45 à 100 fois par rapport aux contrôles. De plus l'insulinémie était abaissée de façon significative avec la déficience en *Hnf1a*. De façon intéressante, en 2003, le même auteur a rapporté un nouveau modèle de souris invalidées pour *Hnf1a* par le système Cre/LoxP mais avec une possibilité de réactivation conditionnelle de l'expression de *Hnf1a* dans le foie sous le contrôle du gène de l'albumine [74]. De cette façon, chez les souris dans lesquelles était réactivée l'expression hépatique de *Hnf1a* après deux semaines de vie, le phénotype était marqué uniquement par le diabète sans défaut de croissance comme cela est observé dans la maladie humaine MODY3. Grâce à cette suprexpression hépatique post-natale de *Hnf1a*, le phénotype des souris ne comprenait pas d'hypertrophie ni d'excès de glycogène hépatiques.

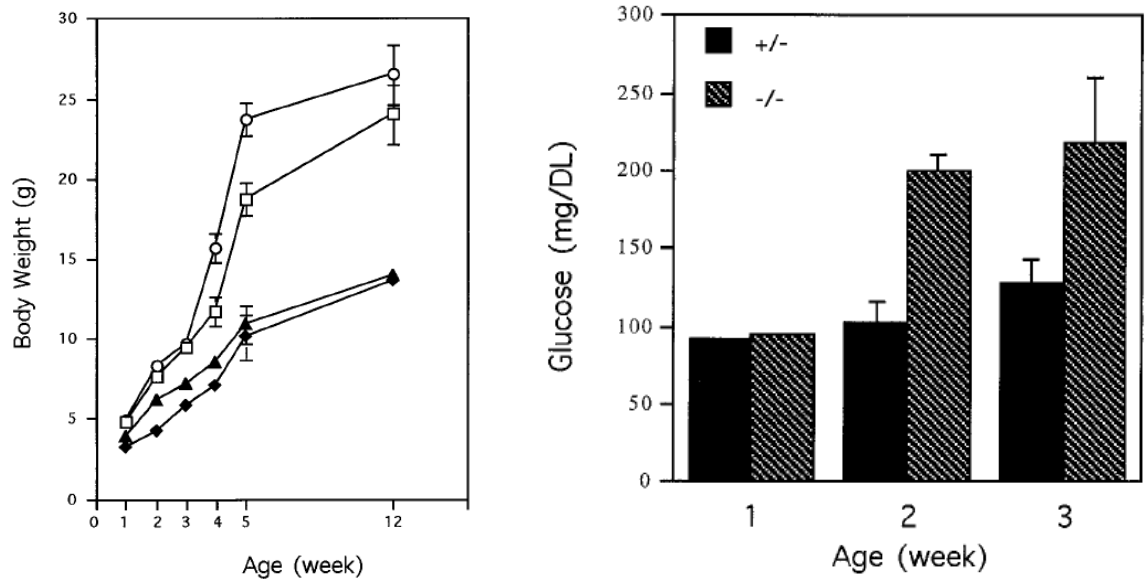


Figure 14 : Défaut de croissance et hyperglycémie chez les souris invalidées pour *Hnf1a* par le système Cre/LoxP [73].
3 à 5 souris avaient été analysées par génotype. A gauche **:** Ronds vides = mâles sauvages, carrés vides = femelles sauvages, triangles pleins=mâles mutants, losanges pleins = femelles mutantes.

En 2002, l'équipe japonaise de K. Yamagata a publié les résultats de souris transgéniques surexprimant le gène humain *HNF1A* portant la mutation récurrente P291fs sous le contrôle du promoteur du gène de l'insuline 2 de rat [75]. Dans ce modèle, deux transgènes possédant 5 ou 20 copies de la construction surexprimaient la mutation humaine P291fs spécifiquement dans les cellules beta. Les lignées de souris étudiées provenaient de rétrocroisement de souris B6xSJL avec des souris B6 (>4 générations). Les souris obtenues après rétrocroisement présentaient une hyperglycémie marquée d'autant plus importante que le transgène était surexprimé (Figure 15). Ces souris présentaient une diminution drastique du contenu en insuline du pancréas ainsi que des anomalies morphologiques avec diminution très nette de la taille des îlots beta (Figure 16). Le nombre de cellules beta dans les îlots semblait diminué alors que les cellules non beta n'étaient pas affectées. L'hyperglycémie était très marquée et la masse beta était diminuée de façon significative même après ajustement sur le poids dans ce modèle qui diffère ainsi des souris invalidées pour *Hnf1a* [72]. De plus, compte-tenu de la surexpression ciblée de *Hnf1a* dans les cellules beta, les souris transgéniques ne présentaient pas de dysfonctionnement hépatique ou rénale ni de défaut majeur de croissance avec nanisme comme cela avait été décrit précédemment dans les modèles knock-out pour *Hnf1a* [68]. L'insulino-sécrétion en réponse au glucose était très altérée alors qu'elle était rétablie sous stimulation par le KCl. De plus il avait été noté une diminution de l'expression de GLUT2 et de la E-cadherin qui précédait l'hyperglycémie dans les îlots de souris transgéniques en comparaison aux contrôles.

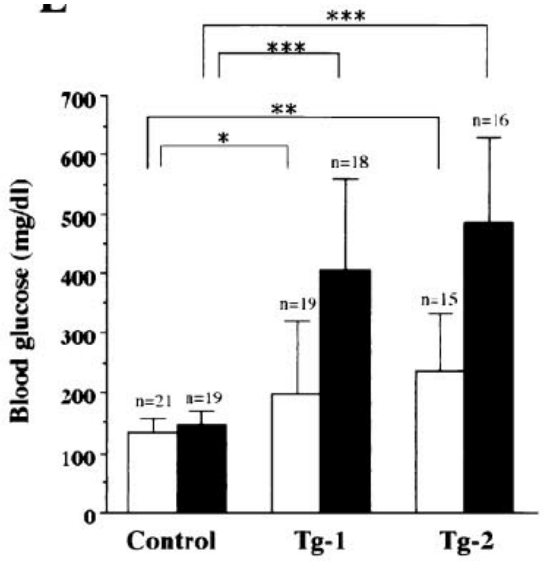


Figure 15 : Glycémies non à jeun chez les souris transgéniques contrôles (exprimant la forme normale du gène humain *HNF1A*) et les souris transgéniques surexprimant *HNF1A* muté (avec 5 copies du transgène dans les souris Tg-1 et 20 copies dans les souris Tg-2) [75].
En blanc sont représentés les résultats des souris mâles âgées de 4 semaines et en noir de 8 semaines.

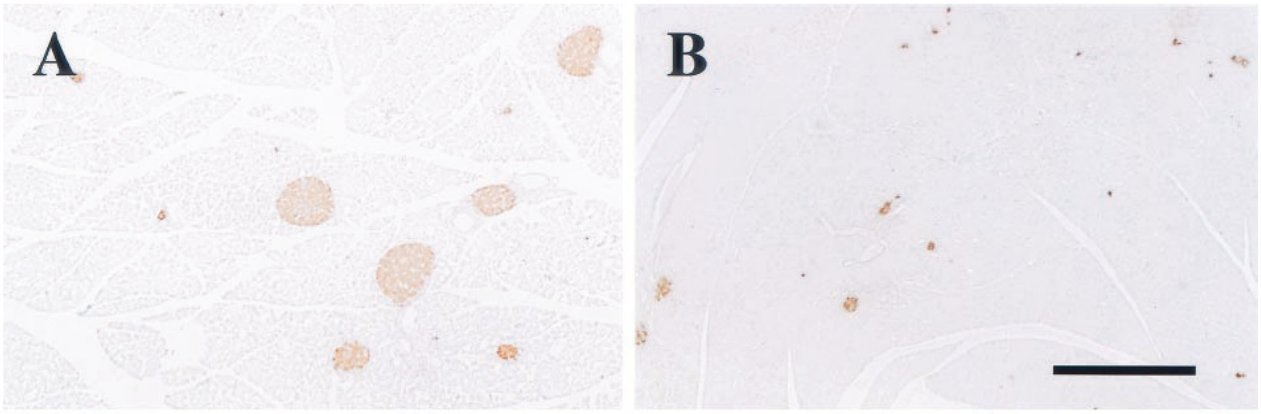


Figure 16 : Marquage de l'insuline en immunohistochimie de coupes de pancréas de souris sauvages (A) et transgéniques Tg-1 exprimant la forme mutée de *HNF1A* (P291fs) (B) [75].
Barre d'échelle = 470 µm. Les souris étaient des mâles âgés de 8 semaines.

En 2001, l'équipe Suisse de Wollheim avait mis au point un autre modèle de souris transgénique exprimant un dominant négatif de *HNF1A* dans les cellules béta pancréatiques sous le contrôle du promoteur du gène de l'insuline de rat [76]. Dans ce travail, le transgène était introduit dans des zygotes issus de croisement entre des F1 B6xCBA/J. Comme chez les souris transgéniques de l'équipe de Yamagata [75], les souris mâles étaient plus atteintes que les femelles, ils devenaient diabétiques avec le temps après 6 semaines avec une diminution de la réponse insulino-sécrétoire au glucose et une diminution du contenu en insuline du pancréas. Par contre, dans ce travail, les cellules alpha pancréatiques avaient été plus finement étudiées et une augmentation du contenu en glucagon du pancréas avait été observée ainsi qu'une augmentation du ratio cellules alpha/cellules beta en post-natal. L'ultrastructure des cellules beta était montrée comme largement détériorée avec notamment un gonflement des mitochondries (Figure 17).

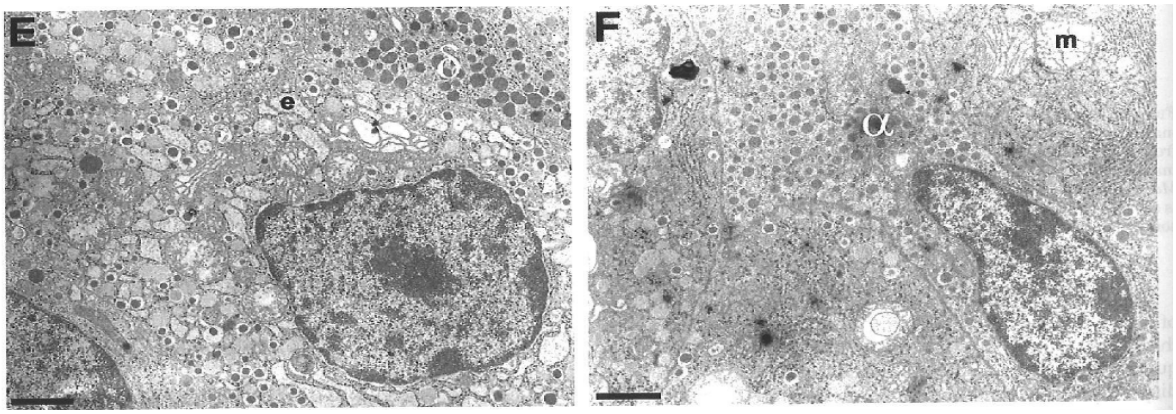


Figure 17 : Ultrastructure des cellules endocrines des souris transgéniques surexprimant le gène *HNF1A* humain muté en microscopie électronique [76].
En E et F sont présentées des cellules delta (E-δ) et alpha (F-α) comme contrôles à côté de cellules beta qui présentent des altérations de leur ultrastructure avec notamment des reticulum endoplasmique dilatés (e-E) et des mitochondries boursouflées (F-m).

2.1.5 Inactivation d'*Hnf1a* dans les lignées cellulaires en culture

La même équipe Suisse de Wollheim a introduit le gène humain *HNF1A* portant la mutation P291fs dans des cellules d'insulinome INS1 en culture avec un système d'induction par la doxycycline [77]. Dans ces cellules en culture, la protéine HNF1alpha tronquée entrait en compétition avec la protéine HNF1alpha endogène avec un effet dominant négatif. Les cellules INS1 montraient une diminution de l'expression des gènes codant l'insuline, GLUT2 et la L-pyruvate kinase. De plus, elles présentaient une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et à la leucine ainsi qu'un défaut de l'utilisation du glucose et de l'oxydation des nutriments dans les mitochondries (Figure 18). Les cibles de HNF1alpha au niveau des mitochondries ont été précisées dans un travail complémentaire qui montrait notamment une augmentation des niveaux de la protéine découplante UCP2 avec l'induction par la doxycycline [78].

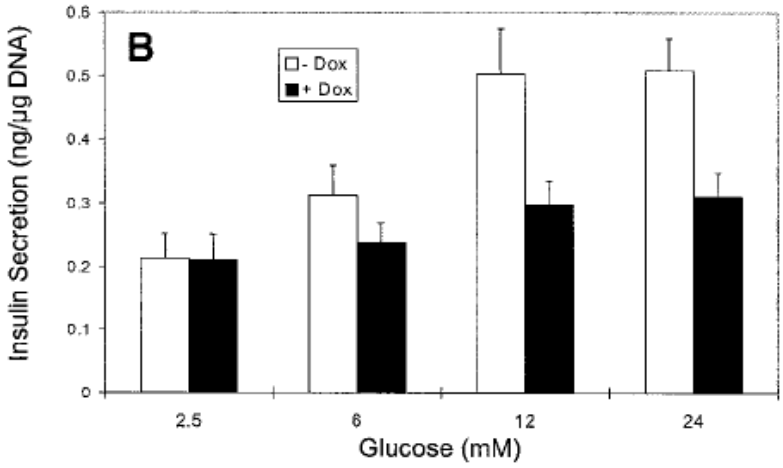


Figure 18 : Diminution de l'insulino-sécrétion dans les cultures de cellules INS1 exprimant le dominant négatif P291fs après induction par la doxycycline [77].
La diminution de l'insulino-sécrétion apparaît avec des concentrations croissantes de glucose dans des conditions proches de ce qui est observé dans le diabète chez la souris (>12mM).

L'équipe de Yamagata a complété ces observations dans le même modèle de cultures cellulaires afin de confirmer le défaut de croissance des îlots observés chez les souris transgéniques [79]. Les cellules INS1 surexprimant le dominant négatif P291fs sous l'effet de la doxycycline montraient en effet une diminution de leur prolifération et une inhibition de la croissance avec des cellules bloquées en phase en G1. L'expression d'IGF1 était fortement diminuée et l'addition d'IGF1 aux cultures cellulaires rétablissait la croissance des cellules

confirmant le rôle majeur d'HNF1alpha dans la croissance des cellules beta via la modulation de l'expression d'IGF1 (Figure 19).

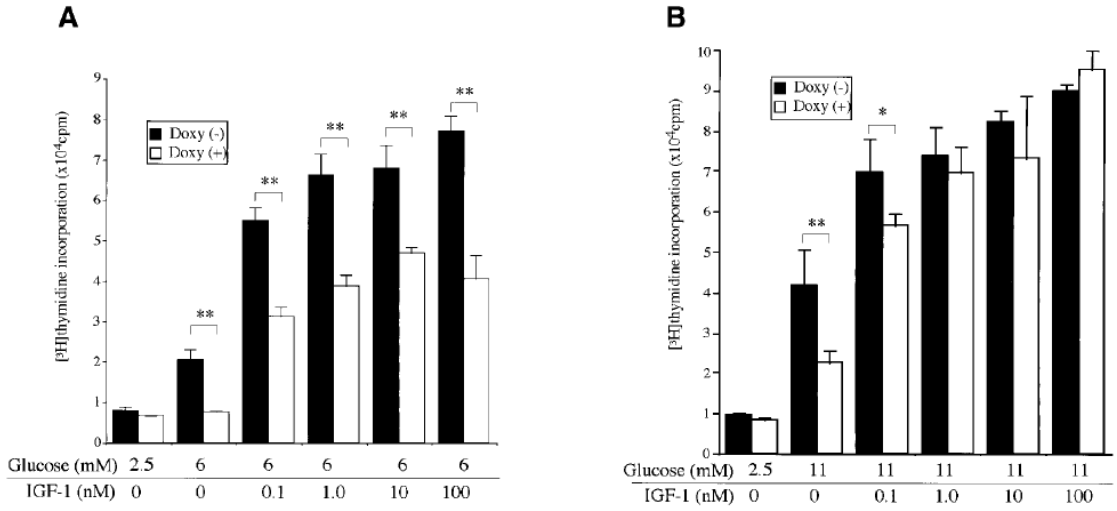


Figure 19 : Effet de IGF1 sur la prolifération mesurée par l'incorporation de la thymidine tritiée dans les cellules INS1 exprimant le dominant négatif P291fs sous la stimulation de la doxycycline [79].
Quand la glycémie est normale vers 6mM (A), il n'y aucun effet de IGF1 sur l'inhibition de la prolifération des cellules par contre quand la glycémie est élevée à 11mM, IGF1 restaure la prolifération des cellules malgré l'induction du dominant négatif de *HNF1A* par la doxycycline.

2.1.6 Les autres modèles animaux de déficience en *Hnf1a*

Une équipe japonaise a rapporté les phénotypes pancréatique et rénal de cochons transgéniques chez lesquels la mutation humaine P291fs a été introduite permettant de générer un modèle proche de la maladie humaine [80][81]. Les 4 cochons qui ont pu survivre de 20 à 296 jours présentaient un diabète sucré avec des glycémies supérieures à 2g/L et sur le plan histologique les mêmes caractéristiques que les îlots de souris déficientes en *Hnf1a* : ilots de petite taille et déchiquetés dans lesquels la sécrétion d'insuline était diminuée.

2.1.7 Les modèles animaux sont-ils de bons modèles de la maladie humaine MODY3 ?

Comme nous l'avons déjà décrit, la maladie MODY3 chez l'homme est caractérisée par plusieurs traits cliniques dont une hyperglycémie d'aggravation progressive associée à une glycosurie qui peut précéder l'hyperglycémie. Cette hyperglycémie est post-natale survenant dans la majorité des cas avant l'âge de 40 ans. A la naissance, il peut exister dans de rares cas des hypoglycémies néonatales. Les différents modèles animaux rapportés par Pontoglio [72],

Lee [73], Yamagata [75] ou Wollheim [76] reprennent ce phénotype diabétique avec des glycémies qui s'élèvent progressivement dans la période post-natale. De plus, Pontoglio a montré que, aussi bien chez la souris que chez l'homme, la déficience en *Hnf1a* entraîne une glycosurie liée à un défaut de réabsorption du glucose par perte de l'expression de *SGLT2* [69]. Par contre, aucun de ces modèles animaux ne présentaient d'hypoglycémies néonatales qui semblent dans tous les cas très rares dans le MODY3 chez l'homme [82]. La sensibilité particulière des patients MODY3 aux sulfamides n'a pas été reproduite chez la souris [32]. De même, il n'a pas été décrit d'adénomes du foie comme chez l'homme chez lesquels les adénomes se développent dans de rares cas de MODY3 à la faveur d'une inactivation biallélique de *HNF1A* dans la tumeur [33]. A l'inverse, dans les modèles animaux, le phénotype est enrichi notamment d'un défaut majeur de croissance en partie liée à la diminution de l'expression de l'IGF1 qui est une cible de *Hnf1a* [73][83]. Ce défaut de croissance n'est pas du tout décrit chez l'homme. Le syndrome de Fanconi décrit dans le modèle murin développé par M. Pontoglio n'est pas retrouvé chez les patients MODY3 qui présentent uniquement une glycosurie par diminution du seuil de réabsorption rénale du glucose [68]. De même les anomalies hépatiques présentées chez la plupart des modèles murins comprenant une hypertrophie du foie avec excès de stockage de glycogène et parfois stéatose ne sont pas classiquement observées chez les patients MODY3. Une hypercholestérolémie avec augmentation de la synthèse de cholestérol a été décrite chez les souris KO pour *Hnf1a* [84] alors que cela ne semble pas être le cas chez les patients MODY3 qui semblent uniquement présenter une augmentation de la synthèse d'acide biliaire sans anomalie du métabolisme du cholestérol [85].

Au-delà de ces différences de phénotype entre la souris et l'homme, le génotype lui-même est très différent car chez la souris une inactivation biallélique du gène *Hnf1a* est nécessaire pour entraîner un phénotype alors que chez l'homme les mutations sont toujours hétérozygotes. Les modèles murins développés par Pontoglio et Lee suppriment les domaines de dimérisation et de liaison à l'ADN alors que, chez l'homme, les différentes mutations décrites peuvent atteindre tous les domaines fonctionnels du gène. Il est vrai que le phénotype semble être plus sévère si ce sont les domaines de dimérisation ou de liaison à l'ADN qui portent la mutation. Dans les modèles murins développés par Yamagata et Wollheim, la surexpression de la mutation humaine P291fs dans les cellules beta permet d'inactiver le gène par un effet dominant négatif. Cet effet dominant négatif a été décrit initialement chez l'homme dans le cas de la mutation récurrente P291fs [86], mais finalement cela ne semble pas être le mécanisme impliqué dans la majorité des mutations humaines [87]. Les mutations de *HNF1A*

sont plutôt responsables d'une haplo-insuffisance avec synthèse d'ARN messagers instables et dégradés ; dans le cas des mutations entraînant un codon stop prématuré, il a été démontré que les ARNm étaient dégradés par le système du NMD ce qui expliquait le fait qu'une mutation hétérozygote « suffise » à produire un phénotype [40][41].

Au final, il n'y a pas de modèle murin reproduisant parfaitement le phénotype MODY3 de l'homme et l'origine génétique de la maladie obtenue. Ceci étant, le diabète d'apparition post-natal reste le phénotype partagé par l'ensemble des modèles et il semble proche de celui qui est observé dans le MODY3. De plus, les cibles de *HNF1A* semblent être largement conservées entre la souris et l'homme [88]. Les mécanismes moléculaires conduisant au diabète lié à la déficience en *Hnf1a* restent mal compris à ce jour mais les modèles animaux ont apporté quelques pistes dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques mis en jeu avec la déficience en *Hnf1a*, tels que la diminution de l'utilisation du glucose, la diminution de l'oxydation dans les mitochondries, la diminution de la réponse insulino-secrétoire au glucose, et l'altération morphologique des îlots de Langerhans (Figure 20).

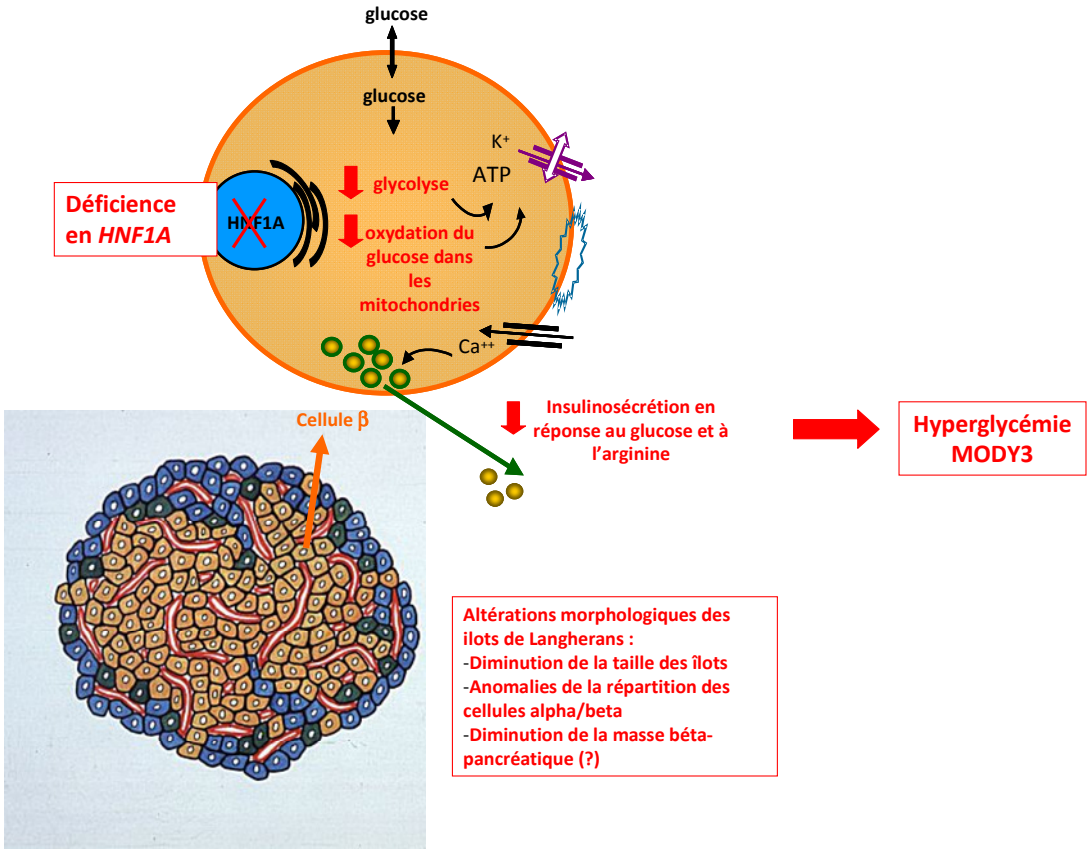


Figure 20 : Schéma illustrant les mécanismes physiopathologiques possiblement mis en jeu dans la survenue du diabète en rapport avec la déficience en *Hnf1a*.

2.2 Effet du fonds génétique sur la déficience en *Hnf1a*

2.2.1 Les lignées « classiques » de souris consanguines

Une lignée de souris est dite consanguine quand elle est issue d'une série de 20 croisements frère-sœur consécutifs. Les individus d'une lignée consanguine sont considérés homozygotes à tous les loci. Première lignée moderne consanguine créée, l'histoire de la DBA débute en 1909 aux USA quand le Dr Little commence un élevage en consanguinité en exerçant une sélection sur la couleur du pelage. En réalité, l'histoire des souris consanguines a débuté au moins 2000 ans en arrière avec l'élevage de souris de compagnie en Asie et en Europe (*fancy mouse*) dont les souris consanguines modernes dérivent. A l'heure actuelle, il existe plus de 400 lignées consanguines recensées et chacune a un fonds génétique qui lui est propre mais qui dériverait pour une majorité d'entre elles de la sous-espèce *Mus domesticus* [89] (Figure 21).

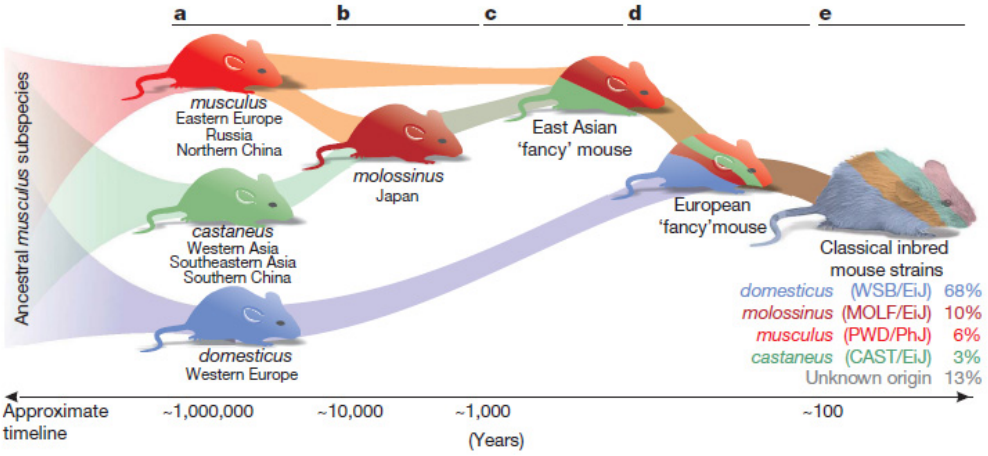


Figure 21 : Origine des lignées consanguines classiques utilisées en recherche [89].

Le projet *Mouse phenome database (http://www.jax.org/phenome)* collecte les informations phénotypiques et génotypiques de plusieurs dizaines de lignées consanguines [90]. De plus plusieurs lignées de souris consanguines ont été maintenant séquencées et les séquences sont accessibles en ligne [91].

2.2.2 Les lignées congéniques

Deux individus d'une même lignée consanguine sont génétiquement identiques ; ainsi si une mutation survient ou si un transgène est introduit à un locus donné, ce sera la seule différence génétique entre la lignée d'origine et la lignée portant la mutation. Mais les animaux

transgéniques sont ou ont été produits bien souvent dans des fonds génétiques hybrides qui permettent de meilleurs rendements de transgénèse. Ces animaux ont un fonds génétique non fixé et non standardisé qui font perdre de la puissance aux comparaisons avec les animaux non transgéniques et surtout avec les données de la littérature [92]. C'est ainsi que l'on préfère transférer le transgène dans une lignée consanguine pour générer une lignée appelée congénique. La souris transgénique est croisée avec une souris d'une lignée consanguine receveuse. Les descendants transgéniques sont identifiés par PCR ou Southern Blot et croisés de nouveau avec une souris de la lignée receveuse. Cette procédure est renouvelée jusqu'à dix croisements en retour avec la lignée receveuse (N10). A chaque croisement avec la lignée receveuse, la proportion du génome des individus qui provient de la lignée donneuse est divisée par deux. Chez les N10, elle atteint la proportion théorique de 0,1 %. Ce calcul ne s'applique pas aux loci situés à proximité du transgène car on sélectionne à chaque étape des animaux hétérozygotes pour le transgène. Le transfert concerne ainsi plutôt un segment chromosomique que le seul transgène et, après dix croisements en retour, la taille de ce segment est d'environ 20 centimorgans ou 40 mégabases soit 1,5 % du génome. Après 10 générations de croisements en retour, on peut réaliser des croisements consanguins dans le but de mettre le transgène à l'état homozygote.

Ainsi les lignées congéniques de souris permettent d'introduire un segment chromosomique dans un fonds génétique consanguin donné afin d'observer le phénotype des souris ainsi générées. Ces manipulations génétiques permettent de comparer les effets de différents allèles à un locus donné dans un même fonds génétique ou ceux de différents fonds génétiques portant la même modification allélique à un locus donné [93].

2.2.3 Introduction de la déficience en *Hnf1a* dans différents fonds génétiques au laboratoire

Afin de connaître l'impact du fonds génétique sur le phénotype des souris déficientes en *Hnf1a*, l'équipe du laboratoire a produit plusieurs lignées de souris congéniques où la même mutation nulle de *Hnf1a* a été introduite dans les différents fonds génétiques suivants : 129S2/SvPasCrl (129), C57BL/6J@Ico (B6), BALB/cByJIco (BALB/C), A/J Ola Hsd (A/J), CBA/JIco (CBA) et C3H/HeNCrI (C3H) (Figure 22).

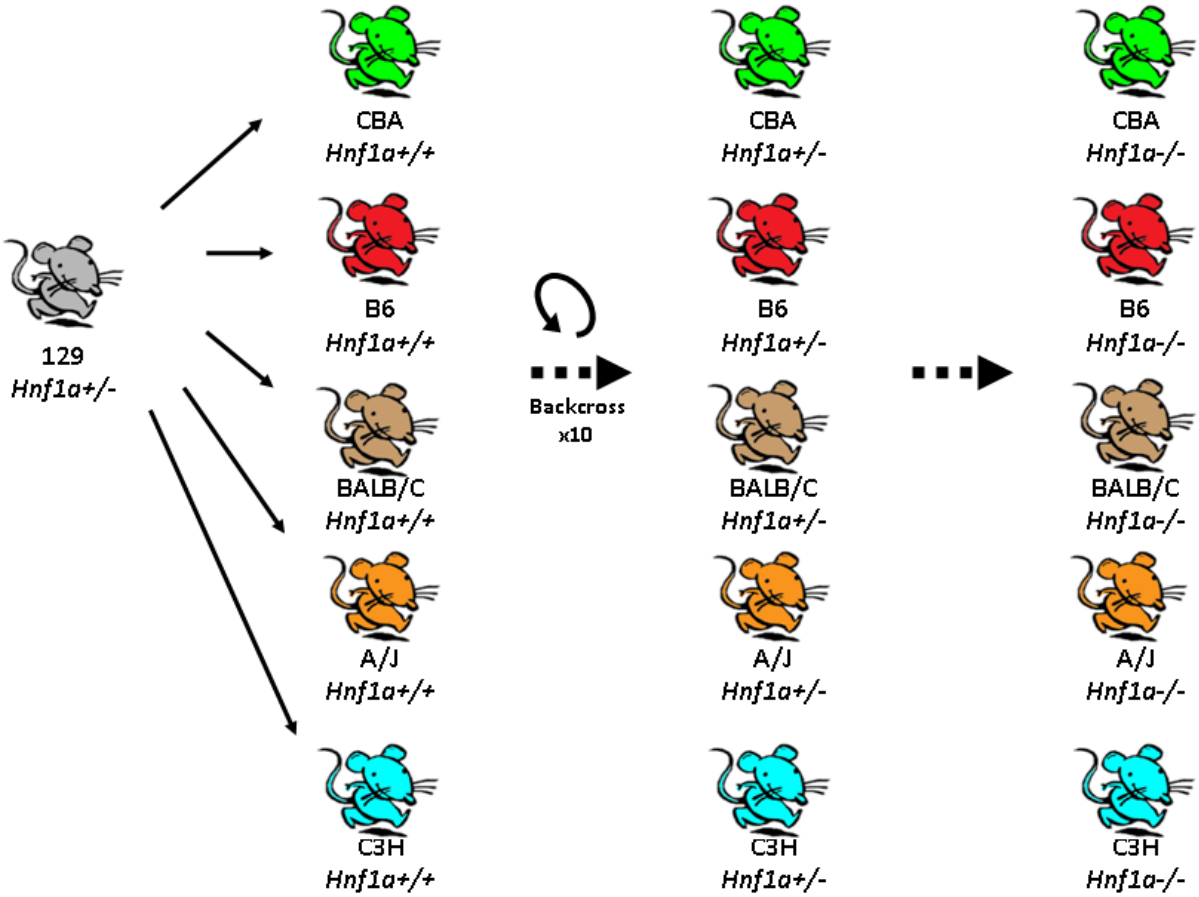


Figure 22 : Production des différentes lignées de souris congéniques *Hnf1a*$^{-/-}$.
Le gène *Hnf1a* a été inactivé en premier lieu dans la lignée de souris 129S2/SvPasCrI (129) avec des rétrocroisements (*backcross*) successifs sur plus de 10 générations pour obtenir une souris congénique 129 déficiente en *Hnf1a*. Puis la même mutation nulle de Hnf1a a été introduite dans les lignées suivantes : CBA/JIco (CBA), C57BL/6J@Ico (B6), BALB/cByJIco (BALB/C), A/J Ola Hsd (A/J) et C3H/HeNCrI (C3H). Des souris congéniques déficientes en *Hnf1a* ont été obtenues pour chaque lignée grâce à des rétrocroisements sur plus de 10 générations. Comme les souris homozygotes *Hnf1a*$^{-/-}$ étaient stériles, ce sont des animaux hétérozygotes qui ont été croisés pour obtenir les souris homozygotes qui ont été analysées.

Les souris 129 inactivées pour *Hnf1a* présentaient une hyperglycémie qui devenait franche avec l'âge notamment après le sevrage maternel. En effet, au-delà du 21ème jour, la plupart des souris 129 *Hnf1a*$^{-/-}$ présentaient des glycémies au-delà de 200 mg/dL alors que les souris sauvages restaient en deçà de ce seuil ($p=8.6x10^{-187}$) (Figure 23, A). L'invalidation de *Hnf1a* chez les souris B6 était létale avec 99% des nouveau-nés qui décèdent dans les 24 heures qui suivent la naissance. De la même façon, la grande majorité des souris BALB/C et A/J *Hnf1a*$^{-/-}$ présentaient un défaut majeur de croissance avec un décès avant le sevrage maternel. Chez les rares souris homozygotes qui arrivaient à survivre au delà du sevrage, on observait une hyperglycémie franche.

De façon très remarquable, la lignée CBA est caractérisée par le fait que la déficience en *Hnf1a* n'entrainait pas de diabète (Figure 23, B). Dans cette lignée le phénotype était complètement supprimé et les souris CBA congéniques pures mutantes étaient

normoglycémiques tout au long de leur vie malgré le défaut d'expression de *Hnf1a*. Nous avons pu observer le même phénomène pour la lignée C3H. Il semble donc que ces deux lignées présentent des variants alléliques d'un ou plusieurs gènes modificateurs suppresseurs du phénotype diabétique que nous allons nous attacher à identifier.

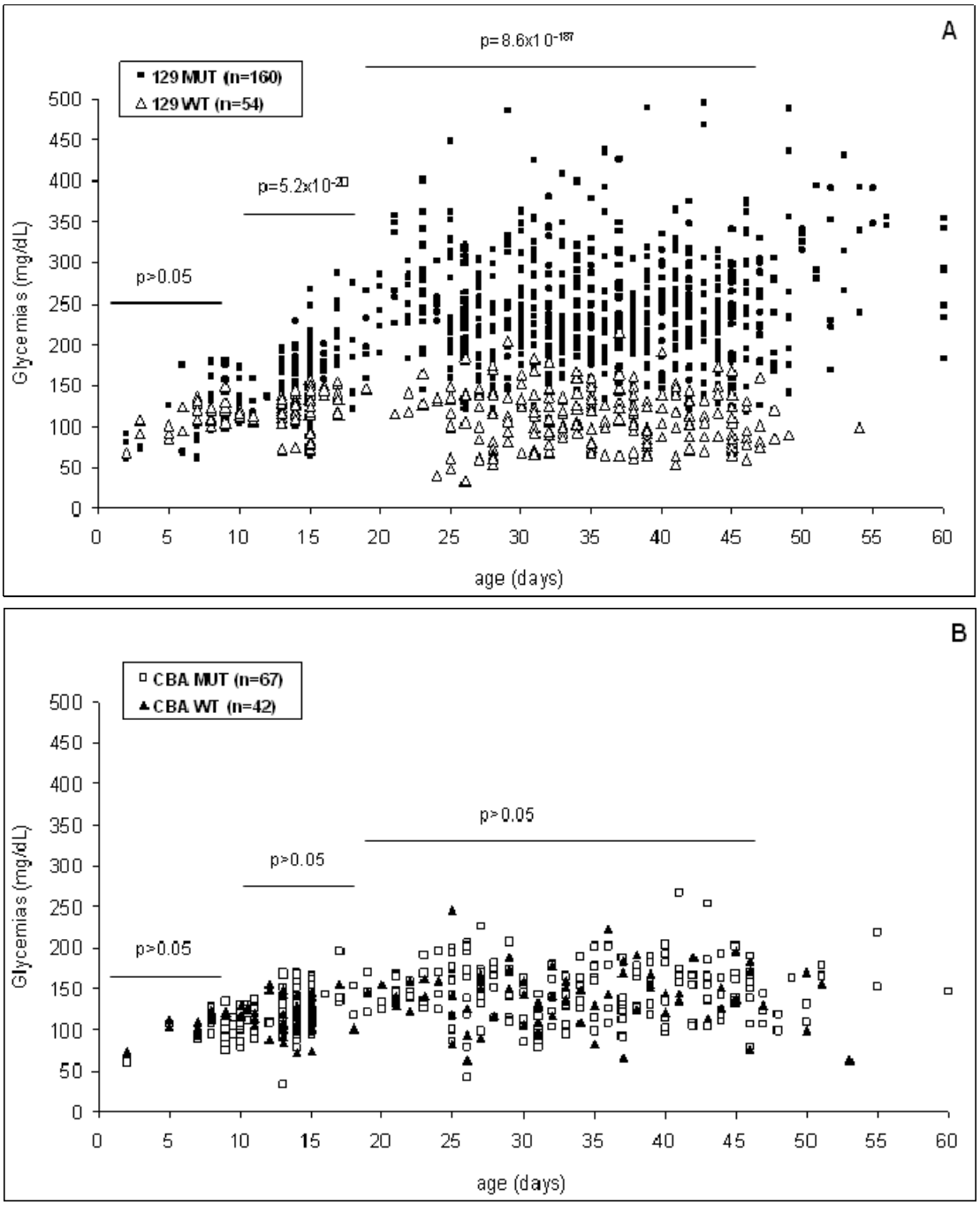


Figure 23 : Glycémies en fonction du temps chez les souris 129 et CBA *Hnf1a*$^{-/-}$ (Garcia-Gonzalez M, Carette C et al, en préparation).

En A : Les glycémies augmentent avec l'âge chez les souris 129 mutantes (129 MUT, carrés pleins). Ces souris sont sensibles au diabète avec des glycémies qui dépassent 200mg/dL après le sevrage (21ème jour) pour la plupart d'entre elles. Au contraire, les souris sauvages (129 WT, triangles vides) restent normoglycémiques quelque soit l'âge. La différence entre les deux groupes mutant et sauvage est très significative à partir du 21ème jour ($p=8.6x10^{-187}$).

En B : Les souris CBA mutantes (CBA MUT, carrés vides) sont résistantes au diabète. Les souris CBA mutantes restent normoglycémiques (<200mg/dL) quelque soit leur âge. La différence avec les souris sauvages (CBA WT, triangles pleins) n'est jamais significative ($p<0,05$).

Plus de 5 glycémies ont été mesurées chez 323 souris 129 et CBA du 3ème jour de vie au 60ème jour. Chaque motif est une mesure de glycémie. n= nombre de souris phénotypées pour chaque lignée. Un test de Student a été utilisé pour comparer souris mutantes et sauvages pour chaque lignée dans 3 groupes d'âge : inférieur à 10 jours, du 10ème au 21ème jour et dans un dernier groupe âgé de plus de 21 jours. p était considéré comme significatif si <0,05.

Chapitre 3 : Le projet de recherche

3.1 Objectifs du projet

L'objectif de ce travail est d'identifier les variants génétiques responsables de la suppression du diabète dans les lignées de souris congéniques *Hnf1a*$^{-/-}$ résistantes. L'identification des variants génétiques suppresseurs du phénotype diabétique dans les lignées CBA et C3H devrait permettre de progresser dans l'identification de tels variants chez les patients MODY3. De plus ils devraient permettre d'avancer dans la connaissance des mécanismes moléculaires responsables du diabète lié à la déficience en *Hnf1a* chez la souris et chez l'homme.

3.2 Stratégie

L'ensemble du projet de recherche présenté dans ce travail s'intéresse uniquement à la lignée CBA chez laquelle l'ensemble des manipulations ont été réalisées. Pour cette raison, aucun résultat produit chez les souris de la lignée C3H ne sera présenté ici.

Afin d'atteindre notre objectif, nous avons utilisé essentiellement deux approches complémentaires (Figure 24) :

1/ une analyse génétique par balayage du génome qui porte sur des souris N2 issus de rétrocroisement ségrégeant le phénotype diabétique

2/ et un phénotypage morphométrique et métabolique orienté vers le pancréas endocrine en comparant souris sensibles et résistantes au diabète (masse des cellules beta, taille des îlots beta, masse des cellules alpha et dosages plasmatiques notamment).

L'ensemble des résultats de chacune des deux parties de ce travail devrait permettre d'identifier un ou plusieurs gènes modificateurs expliquant la suppression du diabète dans la lignée résistante CBA.

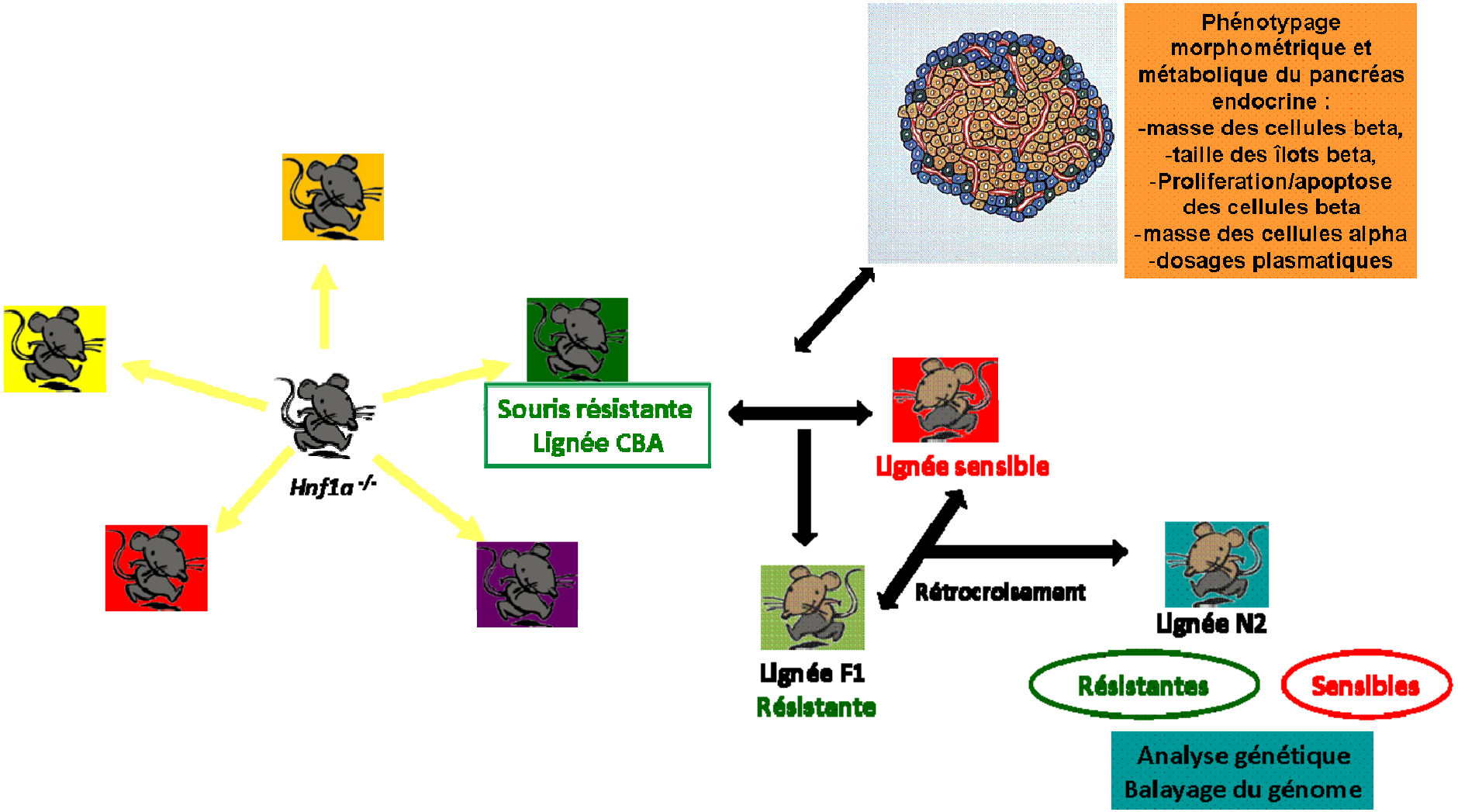


Figure 24 : Stratégie du projet de recherche avec une partie génétique comprenant un balayage du génome chez des souris N2 issues de rétrocroisements et un phénotypage comprenant une analyse fine des particularités du pancréas endocrine des souris résistantes.

Partie 2 : Matériels et méthodes

2.1 Elevage des lignées F1 et N2

L'élevage des souris F1 et N2 a été initié un an avant mon arrivée au laboratoire par Miguel Garcia-Gonzalez chercheur en post-doctorat avec l'aide d'une ingénieure de recherche Magali Chiral et nous avons poursuivi ce travail conjointement ensuite. Au total, le travail d'élevage et de phénotypage de l'ensemble de ces souris a duré trois ans.

2.1.1 Production des F1

Les différentes lignées 129S2/SvPasCrl (129), C57BL/6J@Ico (B6), BALB/cByJIco (BALB/C) et A/J Ola Hsd (A/J) chez lesquelles *Hnf1a* avait été invalidé au laboratoire ont été croisées avec les lignées identifiées comme résistantes au diabète CBA/JIco (CBA) et C3H/HeNCrI (C3H) $Hnf1a^{+/-}$. Les souris utilisées dans ces croisements étaient hétérozygotes pour la déficience en *Hnf1a* car elles sont stériles à l'état homozygote.

2.1.2 Phénotypage des F1

Au total, plus de 500 souris F1 $Hnf1a^{-/-}$ ont été élevées et phénotypées selon le protocole suivant : mesure du poids corporel, de la glycémie et de la glycosurie dès les premiers jours de vie jusqu'au 60ème jour de vie. L'ensemble des souris avait un minimum de 2 mesures à jeun et pour leur vaste majorité 4 à 5 mesures au cours de leur vie. Les glycémies étaient mesurées sur le sang de la queue des souris avec un lecteur de glycémie capillaire Accu CHEK Performa (Laboratoire Roche, France). La glycosurie était recherchée sur les urines des souris avec une bandelette urinaire Keto Diabur Test 5000 (Laboratoire Roche, France). Pour les mesures à jeun, la nourriture était retirée des cages la veille au soir du jour de la mesure.

2.1.3 Production des souris N2

La lignée sensible au diabète 129S2/SvPasCrl (129) $Hnf1a^{+/-}$ a été croisée avec la lignée résistante CBA/JIco (CBA) $Hnf1a^{+/-}$ pour obtenir une lignée F1 soit129xCBA soit CBAx129. Ensuite afin de générer des souris recombinantes N2, un rétrocroisement entre la lignée résistante F1 à l'état hétérozygote $Hnf1a^{+/-}$ et la lignée sensible C57BL/6J@Ico (B6) $Hnf1a^{+/-}$

a été mis en place (Figure 24). Le terme N2 est utilisé car la lignée F1 a été croisée avec une souris d'une souche sensible même si dans ce « pseudo-rétrocroisement » il s'agit de la lignée B6 alors que la lignée parentale sensible était de type 129.

2.1.4 Phénotypage des N2

Les premiers résultats obtenus dans les différentes lignées pures congéniques sensibles au diabète avaient montré que les souris deviennent franchement hyperglycémiques après le sevrage aux alentours du 25ème jour (Figure 23). Ainsi la période de phénotypage dit « intensif » a été définie pendant la fenêtre entre le 25ème jour de vie (après le sevrage maternel qui avait lieu au 21ème jour) jusqu'au 45ème jour de vie. Ce phénotypage comprenait la mesure du poids corporel, de la glycémie et de la glycosurie 3 à 4 fois par semaine avec deux mesures à jeun par semaine (Figure 25). L'ensemble des souris avait un minimum de 4 mesures à jeun et pour leur vaste majorité 5 à 6 mesures à jeun dans la fenêtre temporelle de phénotypage intensif. Au 45ème jour, les souris étaient sacrifiées. Une biopsie de queue était conservée à -80°C. Le foie, la rate et le pancréas étaient conservés en bloc dans un grand tube falcon de 50 ml dans une solution de conservation et de stabilisation de l'ARN (*RNA-later stabilization solution*, Ambion, Life technologies, USA*)* à 4°C. Ensuite ce bloc abdominal était rapidement disséqué avec un microscope et des outils stériles dans la glace pour que le foie, la rate et le pancréas soient conservés dans la solution de stabilisation de l'ARN à -80°C.

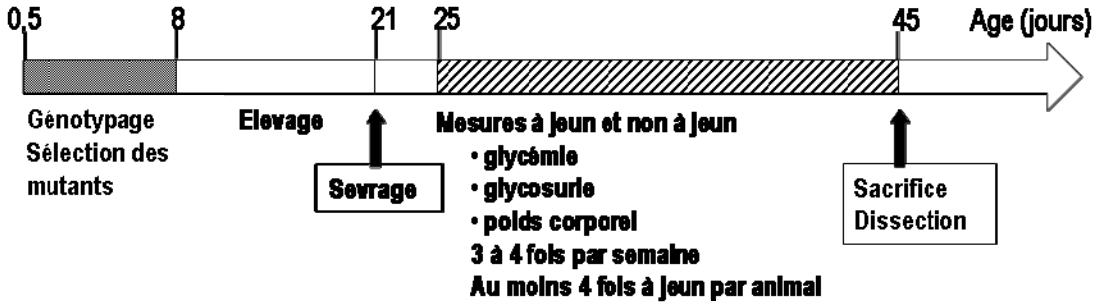


Figure 25 : Le protocole de phénotypage des souris N2.
Les souris étaient génotypées à la naissance et uniquement les mutants étaient élevés. Les mesures débutaient 4 jours après la séparation d'avec la mère au 25ème jour et se poursuivaient jusqu'au 45ème jour de vie pour connaître le statut des souris vis à vis du diabète. Au 45ème jour, les souris étaient sacrifiées avec dissection et conservation des tissus d'intérêt.

2.1.5 Extraction des ADN et génotypage

A la naissance, les souris F1 et N2 étaient génotypées sur de l'ADN extrait à partir des queues des nouveau-nés. Pour le balayage du génome, de l'ADN était extrait et purifié à partir de la rate ou d'un morceau de foie conservés à -80°C dans la solution de stabilisation de l'ARN.

Les extractions d'ADN qui n'ont pas pu être faites à partir de la rate ou du foie ont été réalisées à partir de biopsies de queue de souris d'environ 1 cm qui avaient été conservées à – 80°C. Les tissus ont été laminés à l'aide de lames de rasoir puis digérés dans une solution contenant de la protéinase K et un tampon de lyse sur la nuit en agitation lente (5-10 µl de protéinase K pour 100 µl de tampon de lyse à 37°C pour la rate et le foie ou à 55°C pour les queues). L'ADN était ensuite purifié à l'aide de phénol-chloroforme puis précipité à l'alcool selon un protocole classique.

La PCR était effectuée avec les primers suivants :

-*Hnf1a* forward 5'-TACCTGATGGTTGGAGAGGGTC-3'

-*Hnf1a* reverse 5'-TGAAGACCACATCTCCTAAGG-3'

-*LacZ* forward 5'-TCAATCCGCCGTTTGTTCCC-3'

-*LacZ* reverse 5'-GCATAACCACCACGCTCATC-3'

Les produits de PCR étaient visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose. La taille des bandes attendues était de 532 paires de base pour *LacZ* dans le cas d'un mutant $Hnf1a^{-/-}$ ou de 333 paires de bases pour *Hnf1a* dans le cas d'un sauvage $Hnf1a^{+/+}$.

2.2 Balayage du génome

2.2.1 Criblage pangénomique sur puce à ADN de haute densité

Le balayage du génome a été effectué chez 86 souris N2 $Hnf1a^{-/-}$. Les ADN ont été contrôlés sur un gel d'agarose et mesurés au spectrophotomètre avant envoi à la plate-forme de séquençage Illumina Integragen (Evry, France). Le séquençage a été effectué sur une puce à ADN Illumina de haute densité (Mouse MD Linkage Panel, Illumina, USA) qui contient 1449 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) connus pour au moins les 10 lignées de souris congéniques suivantes : C57BL/6J, NOD/LtJ, 129S1/SvImJ, CBA/J, AKR/J, FVB/NJ, C3H/HeJ, BALB/cJ, DBA/2J, SJL/J. Les SNP sont distribués avec une densité d'environ 3 SNP par intervalle de 5 Mb tout au long du génome de la souris. La moitié de ces SNP environ (707) sont différents entre CBA et 129 permettant de différencier la contribution allélique de chacune de ces lignées. L'analyse à la recherche d'une liaison statistique entre le phénotype (glycémie à jeun) et d'éventuelles régions génétiques (Quantitative Trait Loci ou QTL) a été faite avec l'interface J/QTL pour le logiciel R [94].

2.2.2 Identification des gènes candidats

La région du locus ModA a été analysée avec l'aide de Serge Garbay, bioinformaticien dans le laboratoire, pour rechercher les SNP non synonymes dans l'ensemble de la région génétique du locus avec l'aide des données de séquences des lignées classiques de souris congéniques publiées sur le site du Mouse Genomes Project du Wellcome Trust Sanger Institute au Royaume-Uni (https://www.sanger.ac.uk/sanger/Mouse_SnpViewer/rel-1303).

Les gènes porteurs de SNP identifiés comme non synonymes entre les lignées sensibles et résistantes au diabète ont été étudiés individuellement en faisant une recherche bibliographique notamment via les sites du NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/). De plus, l'expression tissulaire des différents gènes d'intérêts a été explorée avec l'aide du site Expression Atlas (http://www.ebi.ac.uk/gxa/home), leur fonction éventuelle chez la souris sur le site du laboratoire Jackson Mouse Genome Informatics (http://www.informatics.jax.org) et leur localisation sur le génome via Ensembl (http://www.ensembl.org).

2.2.3 Analyse des interactions génétiques

L'analyse des interactions entre le locus ModA et le reste du génome a été réalisée avec l'aide de tableaux de contingence permettant de calculer la probabilité d'appartenir au groupe résistant ou sensible selon qu'on porte tels ou tels SNP spécifiques de la lignée CBA ou de la lignée 129 en plus du locus ModA (test exact de Fischer). Les tableaux de contingence ont été réalisés avec l'aide d'un tableau croisé dynamique dans Excel.

2.2.4 Second criblage génétique

Un second criblage manuel de 26 marqueurs génétiques (sélectionnés à partir des résultats du balayage du génome et de l'analyse des interactions génétiques) a été effectué chez 55 souris N2 *Hnf1a*$^{-/-}$ résistantes et sensibles additionnelles par Géraldine Prévost dans le laboratoire de Yann Hérault (Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Strasbourg). Les analyses statistiques à l'aide de J/QTL ont été refaites ensuite sur l'ensemble des souris soit un total de 141 souris dont 91 sensibles et 50 résistantes. Finalement une liaison génétique a été recherchée entre la moyenne des glycémies à jeun pour l'ensemble des 141 souris et le groupe de marqueurs génétiques comprenant les 26 marqueurs génotypés manuellement et les 707 SNP des puces Illumina différents entre lignées 129 et CBA.

2.3 Phénotypage pancréatique

2.3.1 Quantification de la masse beta/alpha pancréatique

2.3.1.1 Immunohistochimie

Trois souris mâles de chaque lignée 129xB6 *Hnf1a*$^{+/+}$, 129xB6 *Hnf1a*$^{-/-}$, 129xCBA *Hnf1a*$^{+/+}$, 129xCBA *Hnf1a*$^{-/-}$ ont été sacrifiées à 1 jour et demi de vie (J1,5) et après la naissance au quinzième jour de vie (J15). Douze animaux ont donc été étudiés au total pour chaque fenêtre temporelle. Dans tous les cas, les animaux étaient à jeun depuis la veille avec mesure de la glycémie capillaire sur le sang de la queue, de la glycosurie et du poids corporel. Les pancréas ont été disséqués sous microscope (stéréomicroscope Olympus SZH10, Japon) puis pesés (balance d'analyse AE166 Deltarange, Mettler, Suisse) et enfin fixés dans le paraformaldéhyde à 4% pendant la nuit. L'inclusion en paraffine a été réalisée par la plate-forme d'histologie de l'Institut Cochin mais les pancréas étaient orientés avant inclusion pour qu'ils soient toujours étalés dans la longueur depuis la tête jusqu'à la queue. Ensuite des coupes sériées ont été réalisées au microtome (Microm HM335E, GMI, USA) dans les blocs de paraffine tous les 5 µm. Trois sections successives étaient déposées sur les lames numérotées dans l'ordre croissant des sections. Des lames ont été sélectionnées pour les marquages depuis la lame numéro 5 toutes les 15 lames (lame numéro 5, puis numéro 20, etc.) de telle façon que 250 µm environ les séparaient. Les lames sélectionnées étaient ensuite déparaffinées dans deux bains successifs de toluène puis réhydratées dans des bains d'alcool de concentrations décroissantes et enfin longuement lavées dans l'eau. Les marquages ont été faits après un démasquage de l'antigène dans un bain de citrate (Target Retrieval Solution, 10X, Dako, Danemark) à 95°C pendant 15 minutes puis en premier lieu un marquage pour l'insuline (anticorps polyclonal de cochon d'inde anti-insuline, laboratoire Dako, Danemark) et enfin pour les noyaux par le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole, Life Technologies). Chez les souris analysées à la naissance, la quantification de la masse alpha a été réalisée dans la même expérience en ajoutant un anticorps primaire anti-glucagon (anticorps monoclonal de souris, laboratoire Sigma, Allemagne).

2.3.1.2 Acquisition des images avec MetaMorph et quantification avec le logiciel ImageJ

Pour chacune des lames, une coupe de pancréas était choisie pour être entièrement scannée avec un microscope à fluorescence (microscope confocal Leica Microsystems) en s'aidant du logiciel MetaMorph (http://metamorphsoftware.com). Chaque coupe de pancréas était ensuite reconstruite dans sa totalité et analysée avec le logiciel ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/) pour lequel Camille Lebugle (plate-forme d'imagerie cellulaire de l'Institut Cochin) a développé un script permettant de quantifier la surface occupée par le marquage insuline ainsi que la surface totale du pancréas repérée à l'aide du marquage DAPI. Le développement de ce script a pris plusieurs semaines et a été le fruit d'une collaboration étroite. Les ilots beta et la surface totale du pancréas étaient tous manuellement identifiés et vérifiés pour chaque coupe (Figure 26). Toutes les coupes ont été analysées par un seul et même observateur (CC). La masse beta était finalement estimée par la formule suivante [95] :

Masse beta (mg)
= (surface occupée par les cellules beta/surface totale du pancréas) x poids du pancréas (mg)

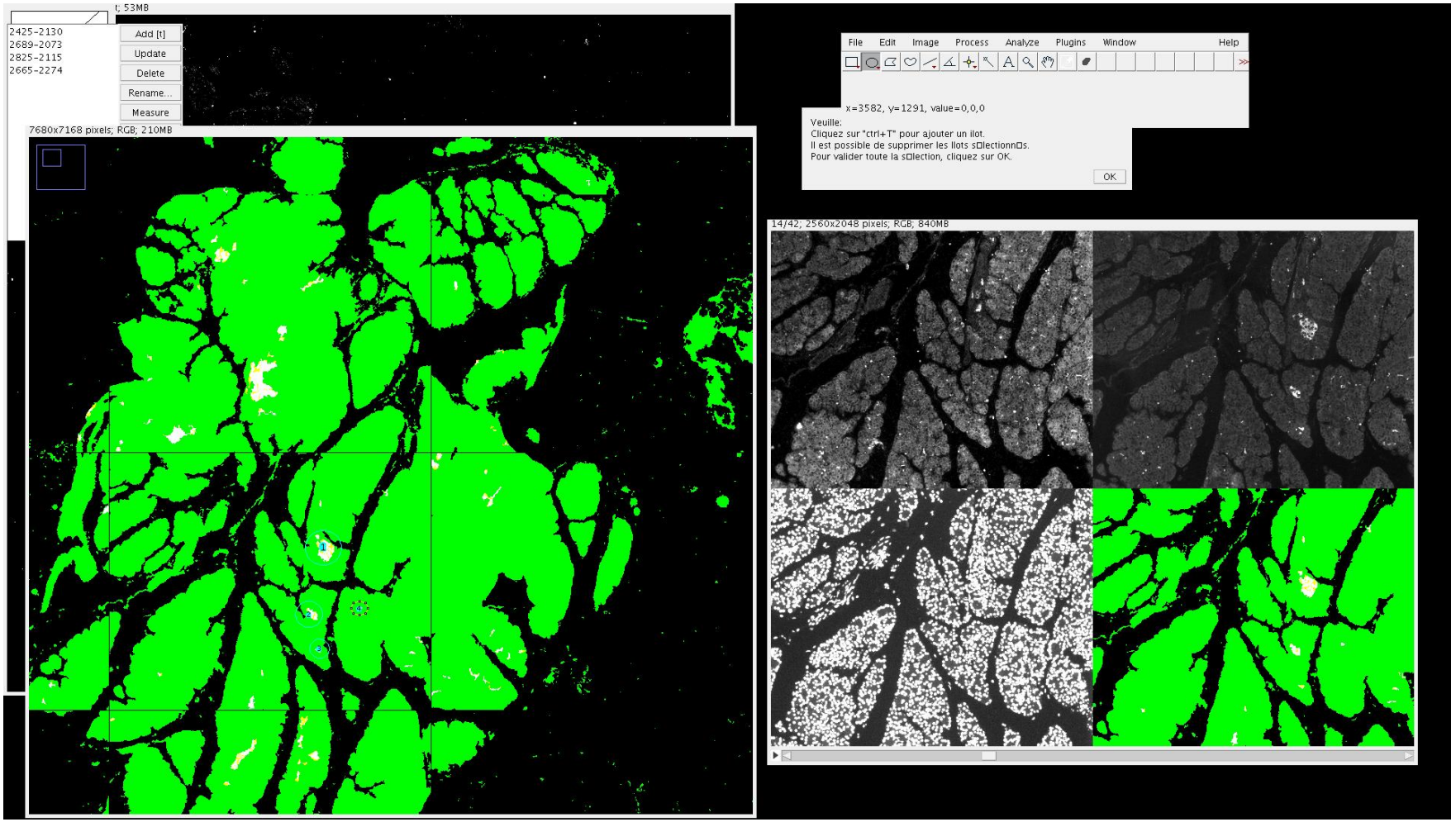


Figure 26 : Capture d'écran du travail d'identification de la surface totale du pancréas et de la surface occupée par les îlots beta avec le script développé au laboratoire pour ImageJ.
Tous les îlots sont manuellement vérifiés avec l'aide des images des différents marquages sur la droite et entourés pour validation finale (visibles en blanc dans l'image de gauche). Ainsi nous disposons non seulement de la surface totale des îlots mais aussi du nombre et de la taille de chacun d'entre eux. La surface totale du pancréas était déterminée avec l'aide du marquage DAPI et est visible en vert sur l'image de gauche.

2.3.2 Nombre, taille et distribution des îlots de Langherans en fonction de leur taille

Le script développé pour ImageJ (annexe 1) permettait d'extraire les données concernant tous les îlots manuellement identifiés avec leur nombre et leur taille dans un fichier Excel. La taille des îlots correspondait à la taille de la surface occupée par le marquage insuline. Cinq à sept sections de pancréas étaient analysées pour chaque souris. La moyenne du nombre d'îlots total par animal et de la taille de ces ilots a été calculée à l'aide d'Excel. Une différence statistique concernant la taille des îlots entre souris déficientes en *Hnf1a* résistantes et sensibles a été recherchée par un test ANOVA.

2.3.3 Index de prolifération et d'apoptose

Les coupes sériées non marquées des mêmes souris 129xB6 $Hnf1a^{+/+}$, 129xB6 $Hnf1a^{-/-}$, 129xCBA $Hnf1a^{+/+}$, 129xCBA $Hnf1a^{-/-}$ ont été utilisées pour la détermination des index de prolifération et d'apoptose. Pour chaque pancréas, les coupes blanches qui suivaient celles qui contenaient le plus d'îlot lors de la quantification de la masse beta étaient analysées afin d'avoir suffisamment de noyaux de cellules beta à compter. Les cellules beta étaient identifiées par la détection de l'insuline et les noyaux par le DAPI comme précédemment décrits. Au moins 800 noyaux de cellules marquées positivement pour l'insuline étaient comptés pour chaque pancréas avec l'aide du plugin « cell counter » pour le logiciel ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html). Toutes les coupes ont été analysées à l'aveugle par un seul et même observateur (CC).

2.3.3.1 Ki67

Un anticorps primaire développé chez le lapin anti-Ki67 (Novocastra) a été utilisé pour le marquage des noyaux des cellules en prolifération. L'antigène Ki67 est présent sur une protéine nucléaire de 360 kDa (numéro d'accession P46013, http://www.uniprot.org/uniprot/P46013) présent dans les cellules prolifératives en phase G1, S, G2 et M. En phase quiescente G0, l'antigène n'est pas détecté. L'incubation avec l'antigène Ki67 était réalisée après déparaffinage et démasquage dans du citrate dans un bain-marie à 95°C pendant 15 min.

2.3.3.2 TUNEL

L'apoptose est marquée par une fragmentation de l'ADN. Le principe du marquage TUNEL (Transferase-mediated dUTP nick-end labeling) est de détecter les brins d'ADN clivés par marquage enzymatique des extrémités 3' libres avec des nucléotides marqués (« in situ cell death detection kit », laboratoire Roche). Après déparaffinage, les lames étaient incubées avec l'enzyme (terminal deoxynucleotidyl transferase) et des nucléotides dUTP marqués à la fluorescéine pendant 60 min à 37°C à l'abri de la lumière selon les recommandations du laboratoire Roche.

2.3.3.3 Recherche d'une éventuelle néogenèse par le co-marquage DBA/insuline des coupes de pancréas en immuno-histochimie

Dans les mêmes conditions que décrites ci-dessus, un co-marquage de l'insuline avec la DBA marquée à la fluorescéine (Fluorescein Dolichos Biflorus Agglutinin, laboratoire Vector) a été réalisé afin d'identifier les cellules ductales produisant de l'insuline qui n'ont pas encore migrées pour s'agréger en îlot beta et qui sont donc les marqueurs d'une possible néogenèse beta-pancréatique.

2.3.4 Recherche de l'expression de GLUT2

La recherche de l'expression de GLUT2 par immunofluorescence a été faite avec un anticorps primaire développé chez le lapin anti-GLUT2 (Millipore, USA).

2.3.5 Dosages biochimiques et hormonaux sur plasma congelé

Dans les mêmes lignées que celles précédemment décrites (129xB6 *Hnf1a*$^{+/+}$, 129xB6 *Hnf1a*$^{-/-}$, 129xCBA *Hnf1a*$^{+/+}$, 129xCBA *Hnf1a*$^{-/-}$), cinq souris mâles ont été sacrifiées une semaine après le sevrage entre le 28ème et le 33ème jour de vie. Au préalable, les animaux étaient mis à jeun 6 à 8 heures. Le sang était collecté dans une seringue héparinée par ponction cardiaque ou de la veine cave inférieure après une profonde anesthésie générale par injection intra-péritonéale de 100 à 200 µl d'un mélange de xylazine et de ketamine. Les tubes de sang étaient centrifugées pour récupérer le plasma (environ 200 µl) qui était congelé à -80°C. Une fois que tous les tubes de plasma ont été collectés, ils ont été adressés au département de Biochimie de la Clinique de la Souris à Strasbourg à Marie-France Champy. Tous les dosages

biochimiques et hormonaux ont été faits à Strasbourg. Les données sont exprimées en moyennes ± DS.

Partie 3 : Résultats

Chapitre 1 : Loci associés à la résistance au diabète

De façon remarquable, nous avons observé au laboratoire que, contrairement aux autres lignées de souris consanguines, l'introduction de la déficience en *Hnf1a* n'entraîne pas de diabète chez les souris des lignées CBA et C3H. En effet, les souris CBA congéniques mutantes restaient normoglycémiques tout au long de leur vie malgré l'absence d'expression de *Hnf1a* (Figure 23). La perte d'expression de *Hnf1a* a été confirmée en RT-PCR et aucun ARNmessager résiduel n'était détectable. Les souris des lignées B6, BALB/C et A/J invalidées pour *Hnf1a* présentaient un défaut de croissance majeur avec une létalité dans les 24 premières heures de vie pour B6 et autour du sevrage pour BALB/C et A/J. Compte-tenu de l'ensemble de ces résultats préliminaires, des lignées F1 ont été générées.

3.1.1 Transmission de la résistance au diabète chez les F1

Les souris des lignées F1 *Hnf1a*$^{-/-}$ telles 129xB6, B6x129, A/JxB6 et BALB/CxB6 (Figure 26, A) présentent des glycémies qui augmentent progressivement avec l'âge comme ce qui a pu être observé dans la lignée pure 129 mutante (Figure 23). Par contre, toutes les différentes lignées F1 *Hnf1a*$^{-/-}$ portant le fonds génétique CBA présentent des valeurs de glycémie proches des résultats de celles des 129 sauvages (129 WT), en dessous de 250 mg/dL même après le sevrage maternel (129xCBA, B6xCBA et A/JxCBA, Figure 27, B). Les résultats chez ces F1 sont comparables à ce qui a pu être observé pour les souris CBA pures mutantes (Figure 23). Cette transmission de la résistance au diabète chez les F1 portant le fonds génétique CBA à l'état hétérozygote est un premier résultat important car il montre que la suppression est transmise de façon dominante.

Cependant, même si les glycémies des souris sensibles s'élevent volontiers au-delà de 200 mg/dL avec le temps alors que celles des souris résistantes restent en dessous de 250 mg/dL, de nombreuses valeurs de glycémie se chevauchent notamment dans la zone entre 200 et 250 mg/dL (Figure 27, zone grisée). Cette zone de recouvrement introduit donc une incertitude lors du phénotypage des animaux quant à leur résistance ou sensibilité vis-à-vis de la résistance au diabète. Pour pouvoir classer les souris F1 en tant que résistantes ou sensibles, nous avons observé, chez ces F1, que la moyenne de 3 à 5 glycémies à jeun dans la fenêtre

temporelle entre le 25ème et le 45ème jour permet de distinguer les lignées sensibles des résistantes avec une différence supérieure à 3 déviations standard (DS).

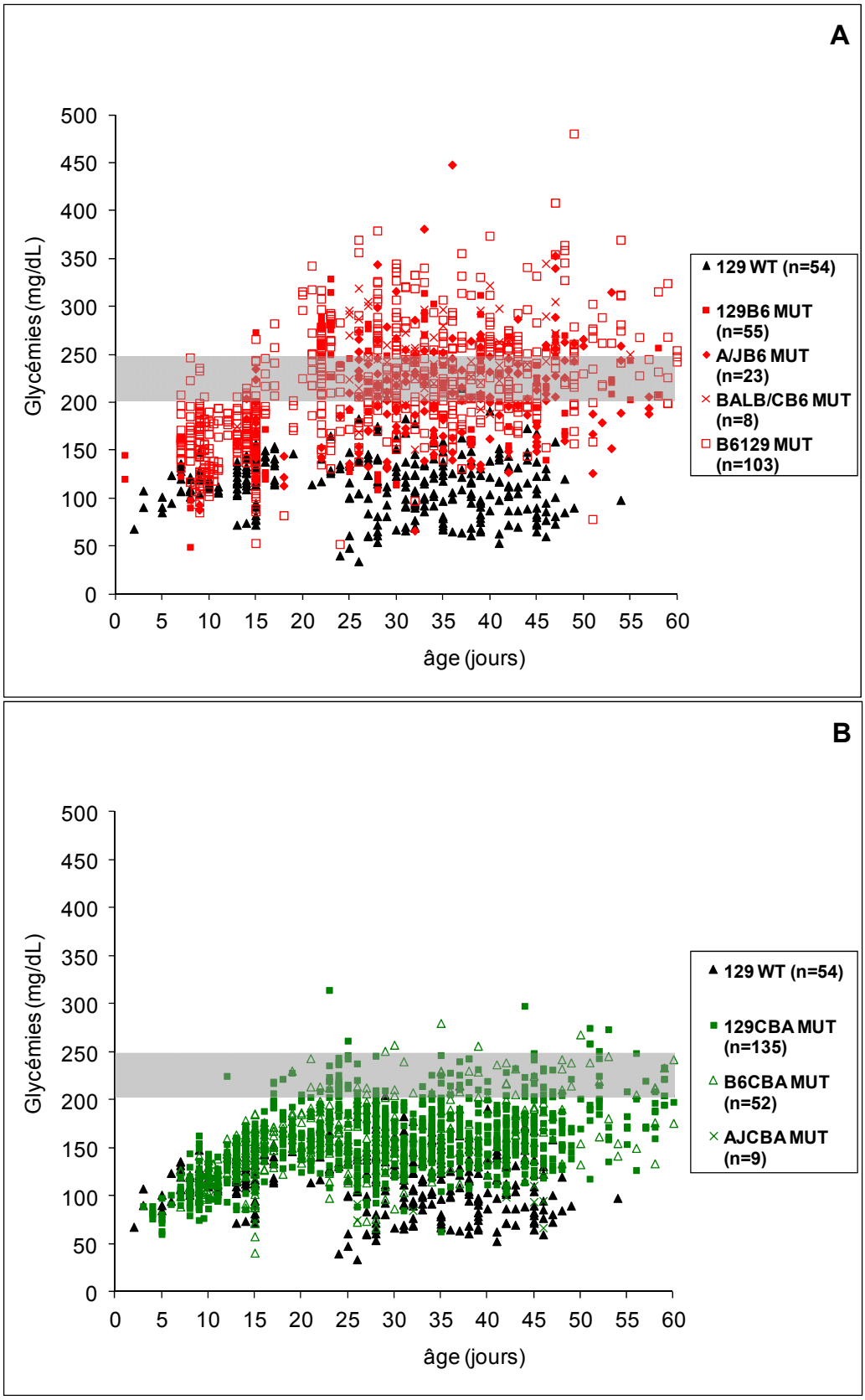


Figure 27 : Glycémies en fonction du temps chez les souris F1 sensibles au diabète (A, en rouge) et les F1 résistantes (B, en vert).
Chaque motif est une mesure de glycémie. n= nombre de souris phénotypées pour chaque lignée pure ou F1. En moyenne 4 à 5 glycémies étaient réalisées chez la majorité des souris qui étaient phénotypées de la naissance jusqu'à plus de 60 jours (données présentées jusqu'au 60ème jour).

3.1.2 Corrélation linéaire entre glycémies et poids corporel chez les souris sensibles

Un second résultat très important est que, chez les lignées pures et les F1, une corrélation entre le poids corporel et le niveau glycémique a été identifiée. En effet le poids corporel est corrélé de façon significative aux valeurs de glycémies chez les souris sensibles 129 mutantes avec un coefficient de corrélation linéaire selon Pearson (R^2 >0,50, p<0,05) (Figure 28). Cette corrélation est plus faible chez les souris résistantes CBA mutantes qui gardent des glycémies moyennes à jeun inférieures à 200 mg/dL quelque soit leur poids corporel. La forte corrélation entre glycémies et poids corporel est présente également chez les souris F1 mutantes sensibles au diabète (B6x129 MUT et AJxB6 MUT, Figure 29). D'une manière générale, c'est seulement au-dessus d'un poids corporel de 8g qu'il devient possible de distinguer clairement les souris sensibles des souris résistantes avec des moyennes de glycémie à jeun qui se répartissent en deux groupes distincts en dessous de 200 mg/dL pour les résistantes et > 250 mg/dL pour les sensibles. Aux vues de ces résultats, il apparait donc clairement qu'il faut tenir compte du poids corporel des souris pour pouvoir les identifier comme sensibles ou résistantes au diabète.

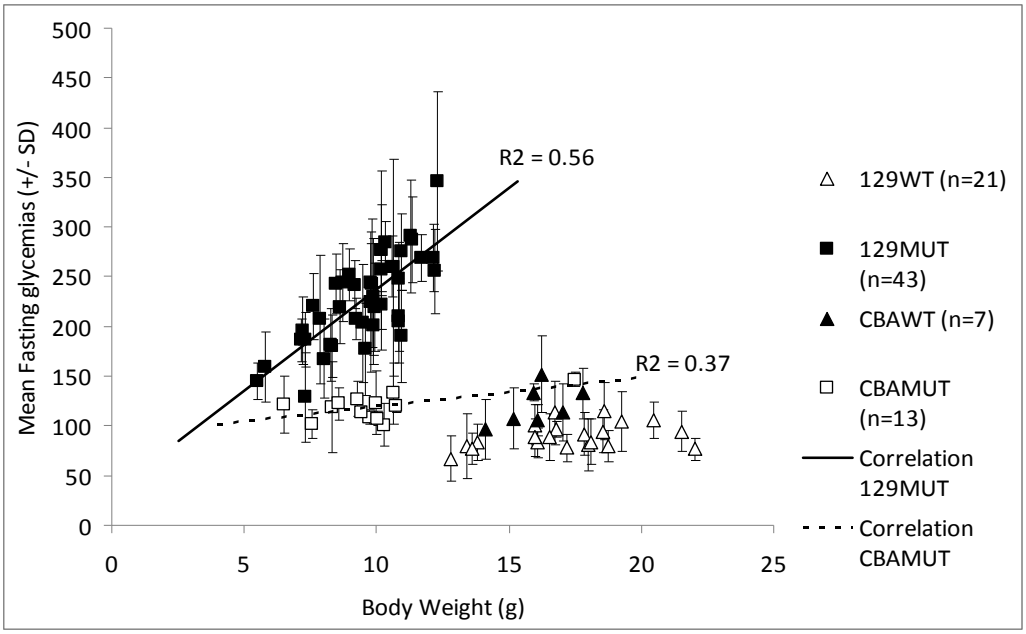
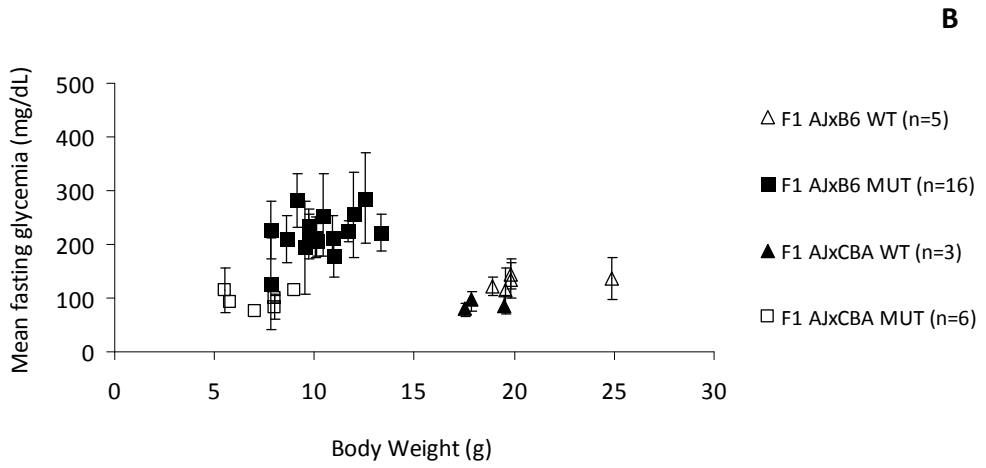
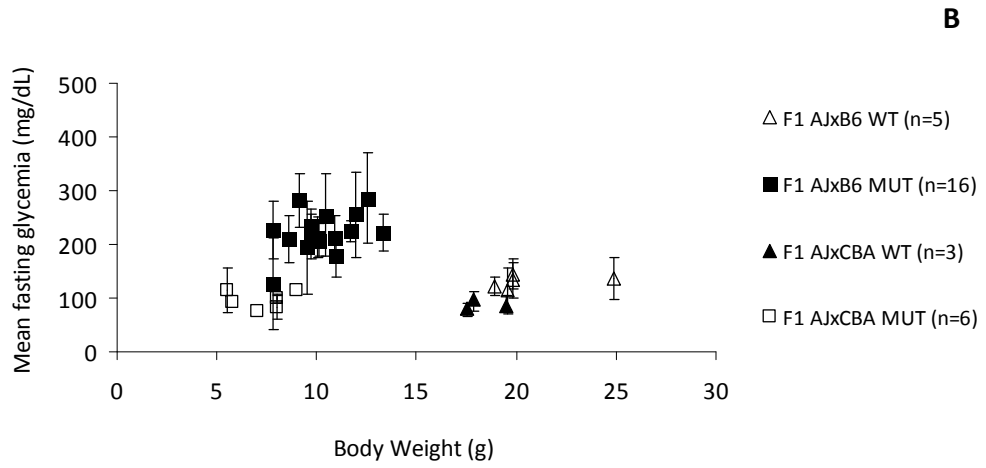


Figure 28 : Glycémie moyenne à jeun en fonction du poids corporel chez les souris congéniques pures 129 et CBA sauvages et déficientes en *Hnf1a*.
Il existe une corrélation linéaire (significative selon Pearson car R2>0,50) entre la moyenne des glycémies à jeun des souris 129 mutantes hyperglycémiques (129MUT, carrés pleins) et leur poids corporel. Au dessous d'un poids corporel de 8g, il n'est pas possible de différencier les glycémies des souris sensibles (129MUT, carrés pleins) de celles des résistantes (CBAMUT, carrés vides). Chaque motif représente une souris.
NB : le poids corporel est un reflet de la croissance des souris qui ne présentent pas d'excès de masse grasse.





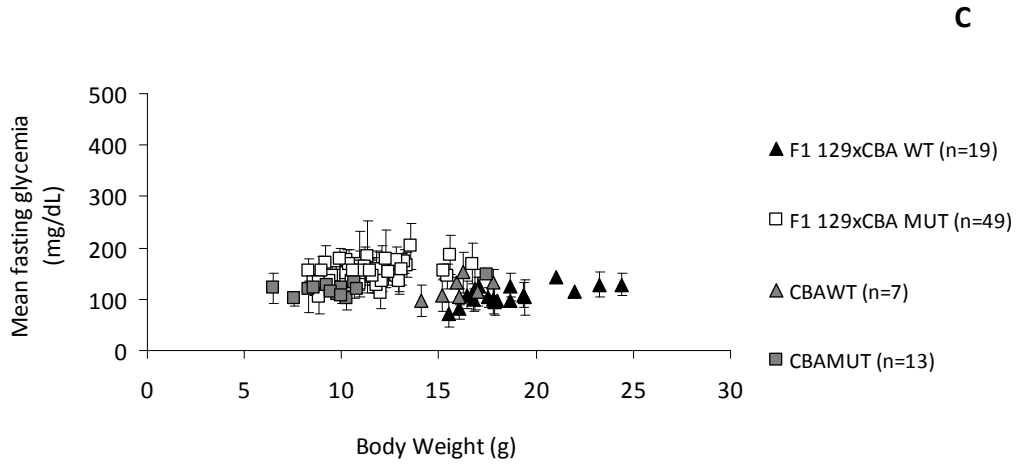


Figure 29 : Glycémie moyenne à jeun en fonction du poids corporel chez les différentes souris F1 B6x129, B6xCBA, AJxB6, AJxCBA et 129xCBA sauvages (WT) ou déficientes en *Hnf1a* (MUT).
Dès lors que les F1 présentent la moitié de leur génome provenant de la souche CBA, elles ont des glycémies qui restent < 200mg/dL quelque soit leur poids corporel et malgré l'invalidation du gène *Hnf1a*. Ces résultats sont comparables aux résultats obtenus chez les souris CBA mutantes pures (en C, carrés grisés). Ces souris sont dites résistantes au diabète. Par opposition les F1 qui ne contiennent pas de génome CBA ont des glycémies d'autant plus élevées que leur poids corporel est important (corrélation linéaire) ; elles sont dites sensibles. Chaque motif représente une souris.

3.1.3 Production de souris N2 ségrégeant le phénotype diabétique

Seize souris mâles F1 129xCBA et CBAx129 *Hnf1a*$^{+/-}$ ont été croisées avec 130 souris femelles B6 *Hnf1a*$^{+/-}$ pour générer 2120 souris N2 dont 530 mutants *Hnf1a*$^{-/-}$ sur une période de plus de deux ans (Figure 30). Le pourcentage de mutants homozygotes nés de ces rétrocroisements de deux lignées de souris hétérozygotes était conforme à ce qui était attendu (25%).

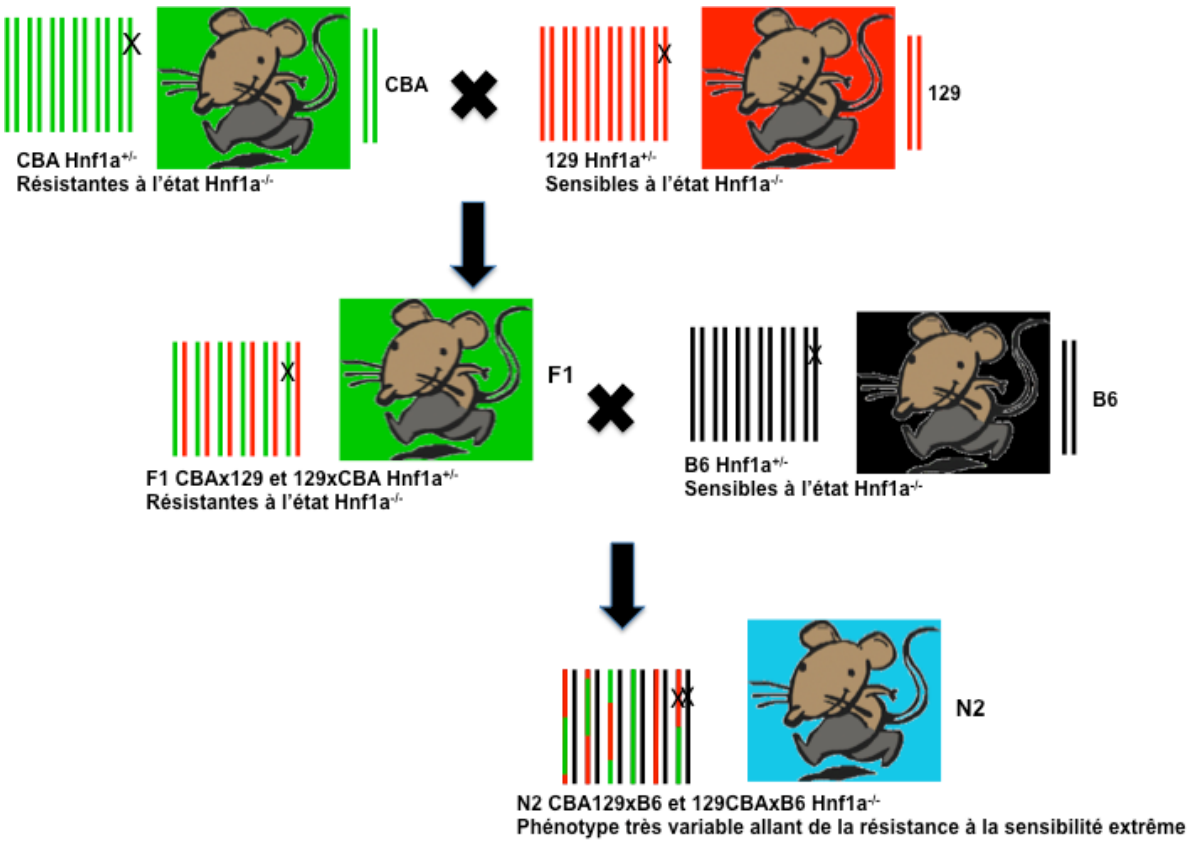


Figure 30 : Croisements et rétrocroisements à l'origine des souris N2 ségrégeant le phénotype diabétique. 16 souris mâles F1 CBAx129 ou 129xCBA *Hnf1a*$^{+/-}$ ont été croisées avec 130 souris femelles B6 *Hnf1a*$^{+/-}$. Au total 2120 souris « N2 » sont nées de ces « rétrocroisements » dont 530 mutants *Hnf1a*$^{-/-}$. Le terme N2 est utilisé car dans ce « pseudo-rétrocroisement », la lignée F1 a été croisée avec la lignée B6 présentant un phénotype sensible comme la lignée parentale 129.

Chez les souris N2, les valeurs de glycémies s'élèvent en moyenne avec le temps comme chez les F1 mais ces souris N2 ségrégent le phénotype diabétique avec des glycémies qui sont réparties de la normoglycémie stricte à l'hyperglycémie sévère (Figure 31). Cette distribution des valeurs de glycémie chez les N2 montre qu'un nombre limité de loci est responsable de la

suppression du phénotype et qu'une analyse génétique de type balayage du génome doit permettre d'identifier ces loci.

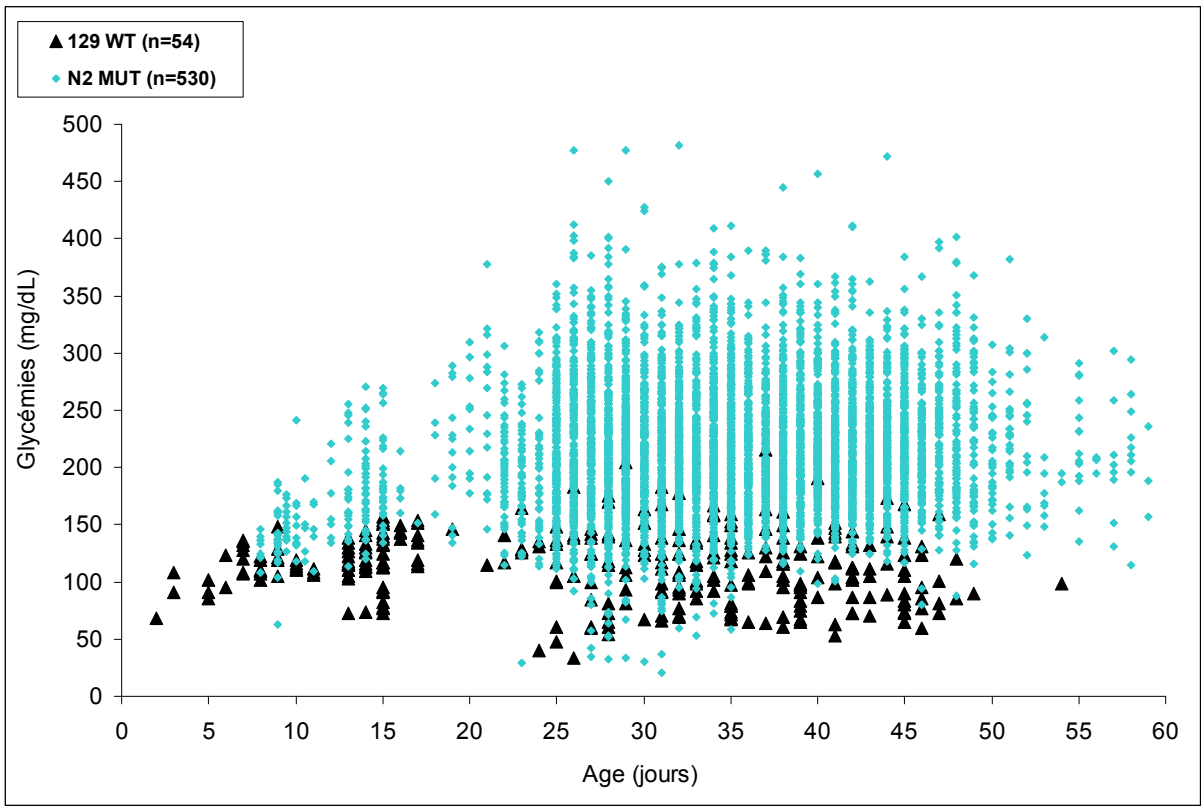


Figure 31 : Glycémies en fonction du temps chez les 530 souris N2 déficientes en *Hnf1a*.
Chaque motif est une mesure de glycémie. n= nombre de souris phénotypées pour chaque lignée.

3.1.4 Sélection des souris N2 résistantes et sensibles au diabète

Le protocole de phénotypage des souris N2 a été mis au point grâce aux résultats obtenus chez les archétypes que sont les F1 résistantes (129xCBA) et les sensibles (129). La fenêtre temporelle choisie entre le 25ème et le 45ème jour a permis d'obtenir au moins 4 glycémies à jeun chez chacune des souris. En effet, nous avions observé chez les F1 sensibles et résistantes que la moyenne de 3 à 5 glycémies à jeun dans cette fenêtre temporelle permettait de distinguer les lignées sensibles des résistantes. De plus, compte-tenu de la de corrélation entre glycémies et poids corporel, il a été décidé de tenir compte du poids des souris dans la sélection des souris N2 extrêmement résistantes et sensibles :

1/ en ne gardant pour les analyses que des souris dont le poids est supérieur à 8g, poids au-delà duquel il est possible de différencier la moyenne des glycémies à jeun des souris sensibles de celles des résistantes,

2/ et en tenant compte du poids dans le calcul de la statistique permettant de sélectionner les souris N2 résistantes et sensibles.

Ainsi, il a été possible de sélectionner parmi les souris N2 celles qui ressemblent le plus aux archétypes constitués par les F1 résistants (129xCBA) et les sensibles (129) en plaçant la moyenne des glycémies à jeun et le poids corporel sur la distribution de ces archétypes et en sélectionnant les animaux qui présentent une différence de >4DS entre la glycémie observée et la glycémie attendue par rapport au phénotype opposé. Par exemple, pour sélectionner les souris N2 résistantes, le calcul est le suivant tS= (glycémie attendue-glycémie observée)/déviation standard de la différence (Figure 32). Le même calcul a été fait pour sélectionner les souris sensibles (tR) en utilisant cette fois la droite de corrélation des souris résistantes. Ce calcul statistique a permis de sélectionner chez les 530 souris N2 mutantes : 90 souris extrêmement sensibles et résistantes dont l'ADN a ensuite été extrait (Figures 33 et 34). Le balayage du génome a été effectué chez les souris des deux groupes sélectionnés dont de l'ADN de qualité suffisante a pu être extrait, c'est à dire finalement 86 souris N2 *Hnf1a*$^{-/-}$. Avec l'objectif d'affiner l'intervalle génétique identifié dans le premier balayage du génome, un second criblage manuel a été effectué chez 55 souris N2 *Hnf1a*$^{-/-}$ résistantes et sensibles additionnelles sélectionnées à l'aide du même calcul statistique et de la même contrainte de poids corporel (>8g).

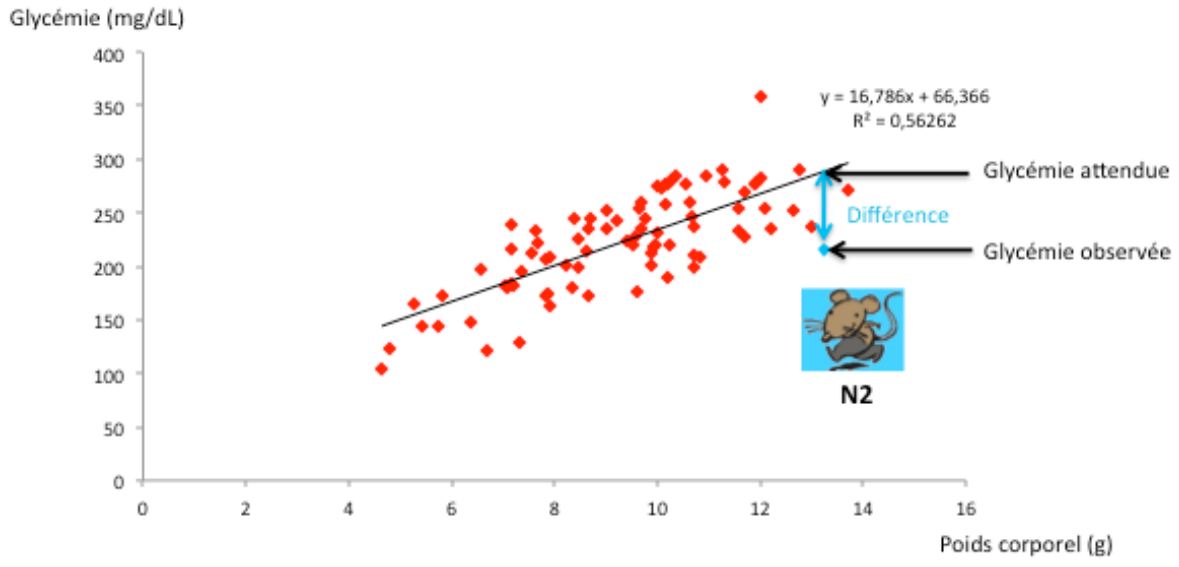


Figure 32 : Calcul du score tS permettant de sélectionner les souris N2 résistantes en fonction de la différence entre les glycémies observée et attendue compte-tenu du poids corporel.
tS= (glycémie observée-glycémie attendue)/déviation standard de la différence. La glycémie attendue est obtenue en fonction du poids corporel par régression sur la droite de corrélation linéaire des souris sensibles 129 mutantes. La glycémie observée est la glycémie moyenne d'au moins 4 glycémies à jeun mesurées du 25 au 45ème jour.

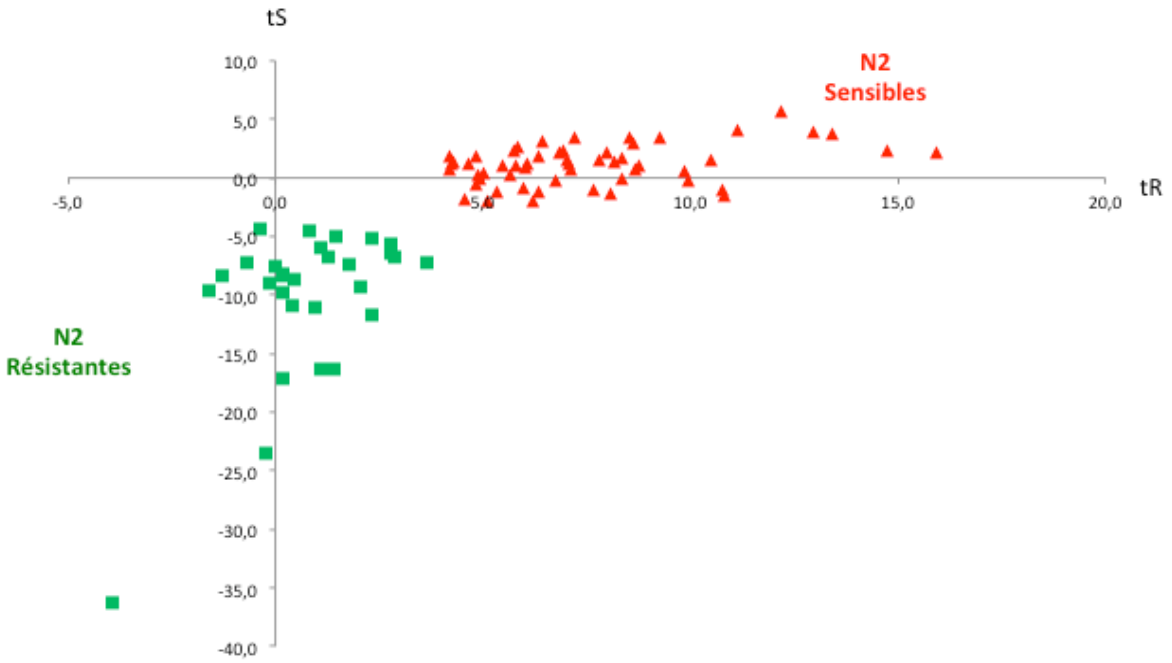


Figure 33 : Résultats de la sélection des souris N2 résistantes (carrés verts) et sensibles (triangles rouges) ayant des scores tR (en abscisse) et tS (en ordonnée) supérieurs à 4 et inférieurs à -4 respectivement.
Ces souris ont été sélectionnées pour l'extraction d'ADN en vue du balayage du génome.

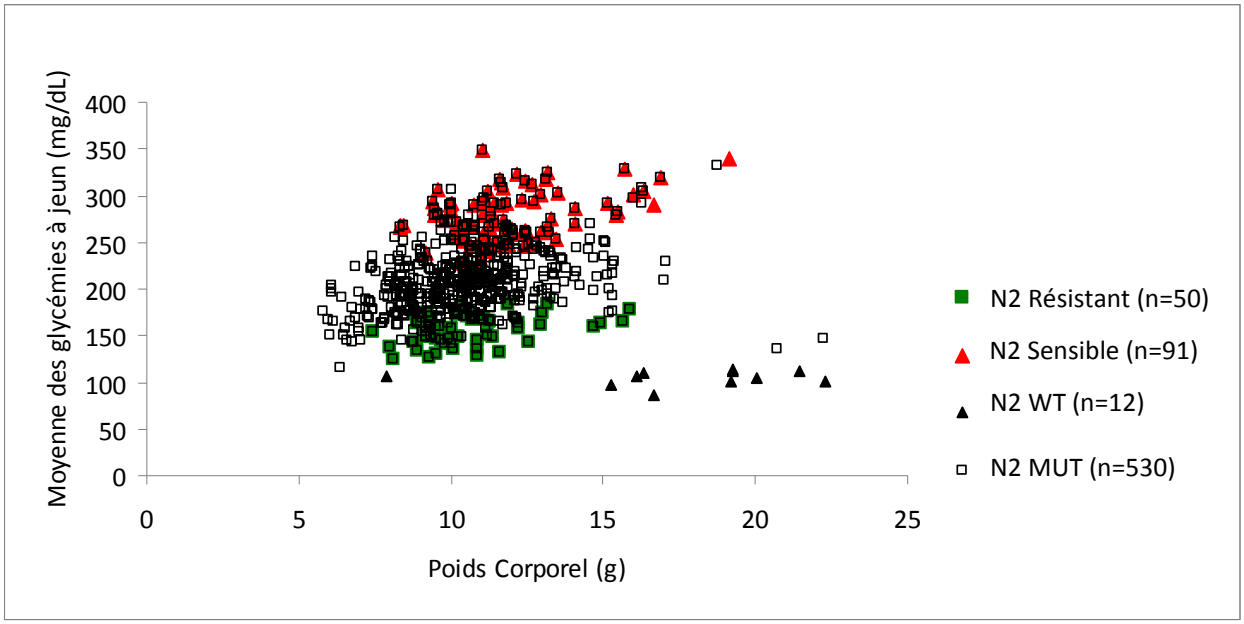


Figure 34 : Distribution des résultats glycémiques en fonction du poids chez les 141 souris N2 sélectionnées parmi les 530 souris N2 mutantes *Hnf1a*$^{-/-}$.
Les souris résistantes (normoglycémiques) et sensibles (hyperglycémiques) sélectionnées sont identifiées respectivement par des carrés verts et des triangles rouges. Chaque motif représente une souris.

3.1.5 Identification d'un locus majeur sur le chromosome 3 (ModA)

Le balayage du génome a été effectué chez les 86 souris N2 mutantes les plus extrêmement sensibles et résistantes avec une puce à ADN pangénomique murine contenant 1449 SNP. Cette puce à ADN commercialisée sour le nom « Mouse MD Linkage Panel » par Illumina contient effectivement 1449 SNP qui sont répartis sur l'ensemble des chromosomes avec environ au moins 3 SNP tous les 5 Mb (Figure 35).

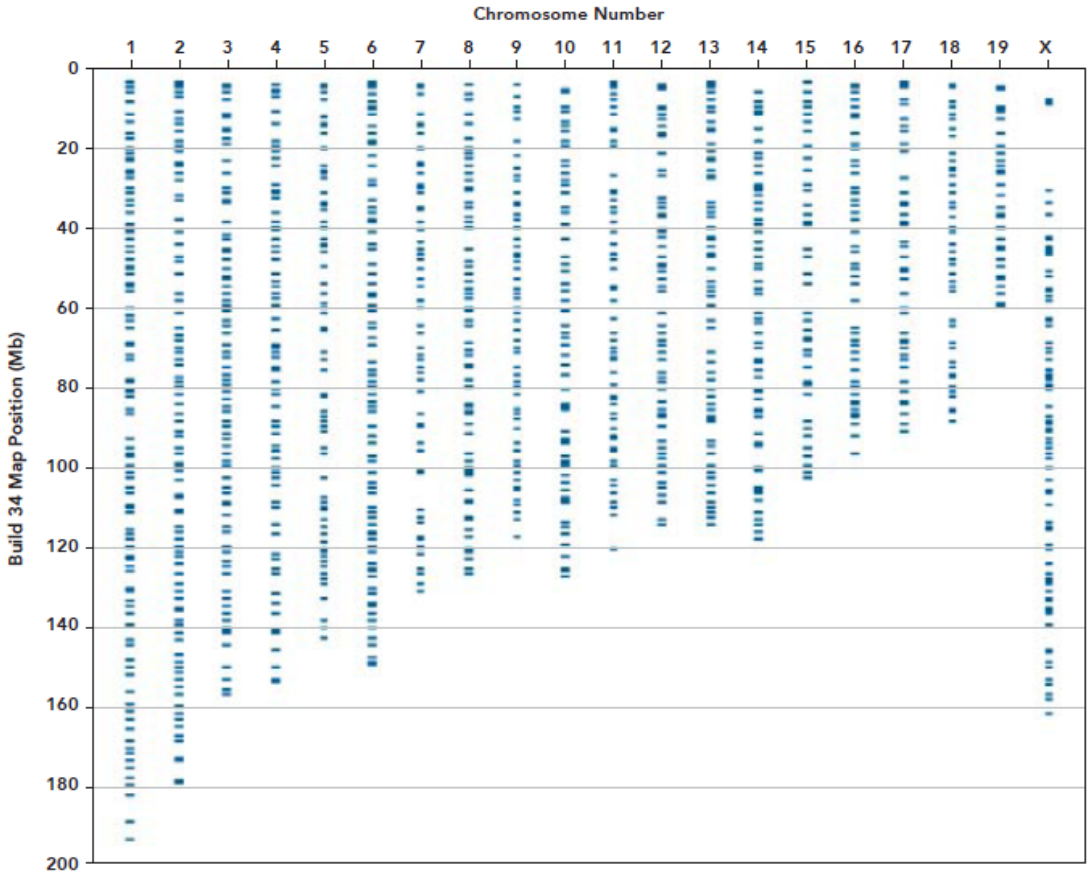


Figure 35 : Couverture génomique par chromosome de la puce à ADN « Mouse MD Linkage Panel » de Illumina.

La recherche d'une liaison génétique entre la moyenne des glycémies à jeun de ces souris et le génotype de ces 1449 SNP a permis d'identifier un locus majeur au niveau du chromosome 3 avec un LOD score supérieur à 20 (Figure 36). Le pic du locus est à 29,79 Mb et présente un intervalle compris entre 21,79 et 37,79 Mb (intervalle de confiance à 95 %, analyse avec J/QTL dans R). Ce résultat signifie que ce locus, que nous avons appelé ModA, contient un ou des variants génétiques impliqué(s) dans la suppression du phénotype diabétique chez les souris N2 mutantes résistantes.

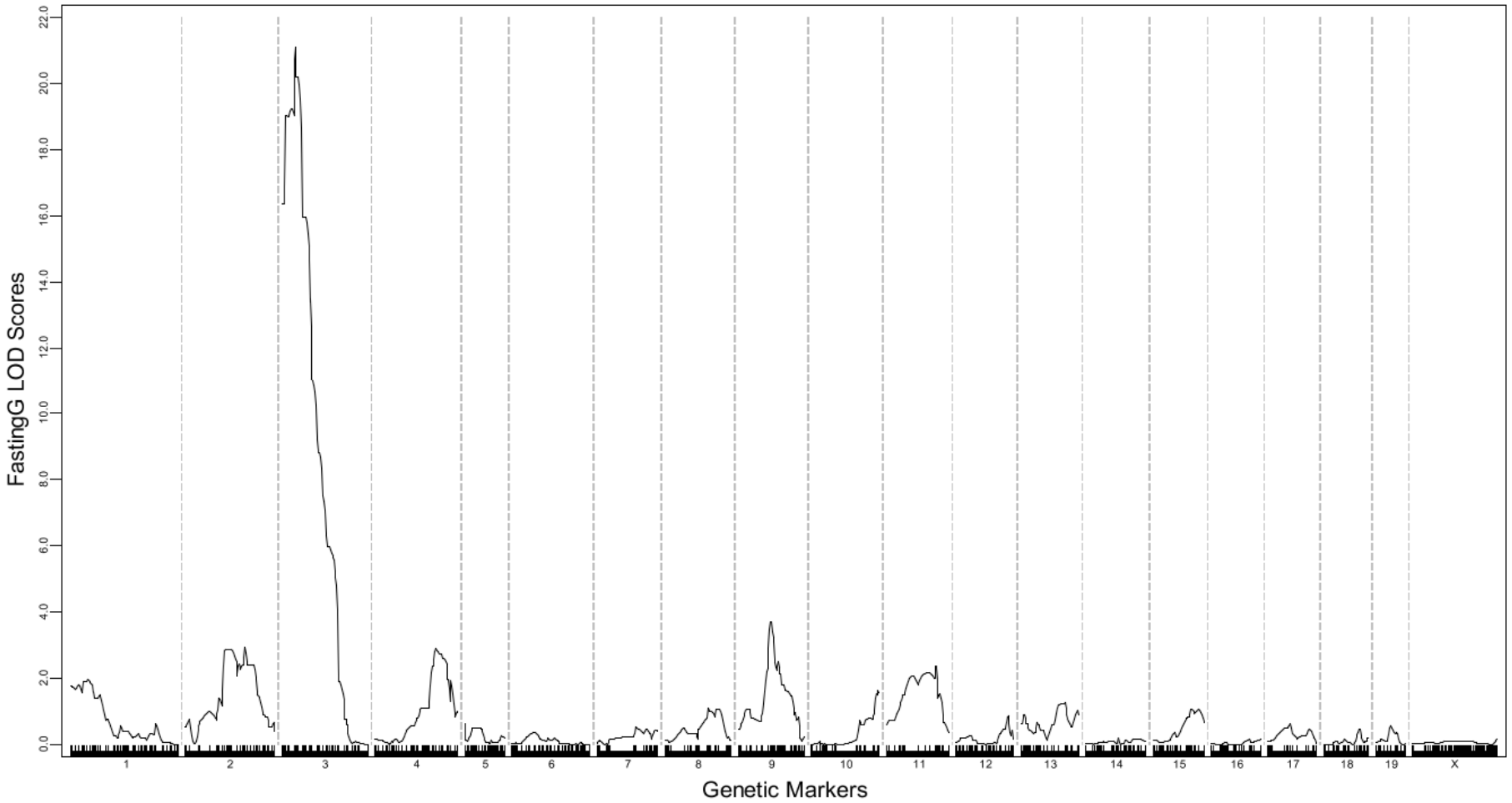


Figure 36 : QTL (Quantitative Trait Locus) identifié comme lié à la glycémie à jeun des souris N2 au niveau du chromosome 3 (ModA).
En abscisse, les différents marqueurs génétiques (SNP) répartis sur les différents chromosomes de la souris. En ordonnée, le LOD score obtenu en analysant la liaison génétique avec la moyenne des glycémies à jeun. Les analyses ont été faites à l'aide de l'interface J/QTL du logiciel R. Une liaison statistique a été recherchée entre la glycémie à jeun des souris N2 et leur génotype sur les 1449 SNP des puces Illumina répartis sur l'ensemble des chromosomes de la souris. Un pic principal est mis en évidence à 29,79 Mb au niveau du chromosome 3 avec un LOD score supérieur à 20.

3.1.6 Loci ancillaires interagissant avec le locus majeur

Plusieurs loci ancillaires ont été identifiés par analyse des interactions entre le locus ModA et le reste du génome en fonction du phénotype de sensibilité ou de résistance au diabète. Le « pseudo-rétrocroisement » de la souche F1 129xCBA avec la souche B6 dans le processus de production des N2 a permis de produire des souris N2 qui portent d'une part des chromosomes entièrement B6 et de l'autre des chromosomes qui portent des allèles soit CBA soit 129 (Figure 30). Des tableaux de contingence ont permis de tester la dépendance entre le locus ModA et d'autres régions génétiques vis-à-vis du risque d'appartenir au groupe résistant ou sensible selon que les SNP soient 129 ou CBA sur l'une et l'autre région génétique. L'analyse de ces interactions génétiques avec le locus ModA a permis d'identifier 5 loci ancillaires appelés ModB, C, D, E et F situés respectivement sur les chromosomes 4, 4, 11, 11 et 18. Un exemple de résultat d'interaction entre le locus ModA du chromosome 3 et le locus ModD du chromosome 11 est présenté dans la figure 37. Dans cet exemple, la probabilité qu'une souris appartienne au groupe résistant plutôt qu'au groupe sensible est nettement plus forte si elle porte un allèle CBA non seulement au locus ModA mais aussi au locus ModD. Cette probabilité est mesurée par le test de Fischer qui est significatif dans cet exemple ($p=0,002$ et $OR=18$).

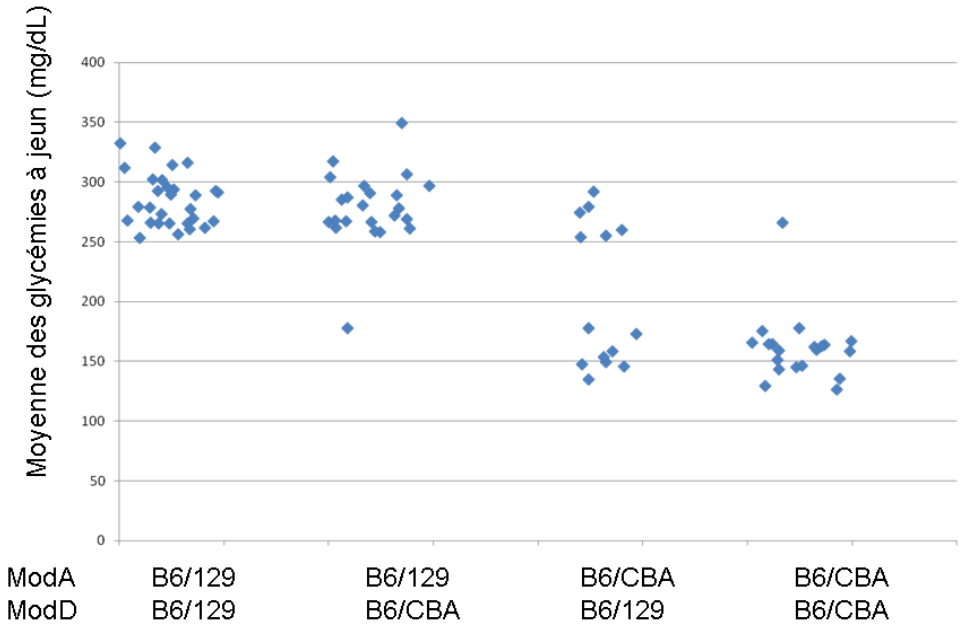


Figure 37 : Représentation graphique de la dépendance entre le locus ModA (Chr 3) et le locus ModD (Chr11).
Chaque losange représente une souris. Les 86 souris N2 ont été incluses dans l'analyse. Le graphique montre dans la première ligne le risque d'appartenir au groupe sensible si l'on est porteur d'un allèle 129 sur le locus ModA et 129 sur le locus ModD (27 souris), ou d'un allèle 129 sur le locus ModA et CBA sur le locus ModD (23 souris), ou d'un allèle CBA sur le locus ModA et d'un allèle 129 sur le locus ModD (6 souris) ou enfin d'un allèle CBA sur le locus ModA et d'un allèle CBA sur le locus ModD (1 souris). Ainsi il apparaît qu'il faut être porteur non seulement d'un allèle CBA sur le locus ModA mais aussi d'un allèle CBA sur le locus ModD pour appartenir au groupe résistant pour 21 souris (groupe en bas à droite). Seule une souris portant deux allèles CBA à ces deux loci appartient au groupe sensible.

De façon plus générale, nous avons analysé le phénotype des 86 souris N2 présentant un locus ModA sensible ($ModA^{B6/129}$) ou résistant ($ModA^{B6/CBA}$) en fonction du nombre de loci ancillaires résistants (ModB, C, D, E et F $^{B6/CBA}$) qu'elles portent (Figure 38). Les souris portant l'allèle 129 (sensible) au locus ModA restent sensibles quelque soit le nombre de loci ancillaires$^{B6/CBA}$. Par contre, les souris portant l'allèle CBA (résistant) au locus ModA sont d'autant plus normoglycémiques et résistantes qu'elles portent un nombre croissant de loci ancillaires$^{B6/CBA}$. En conclusion, le fait que le locus ModA soit de type « résistant », c'est-à-dire $^{B6/CBA}$, est nécessaire mais non suffisant pour conférer la résistance au diabète.

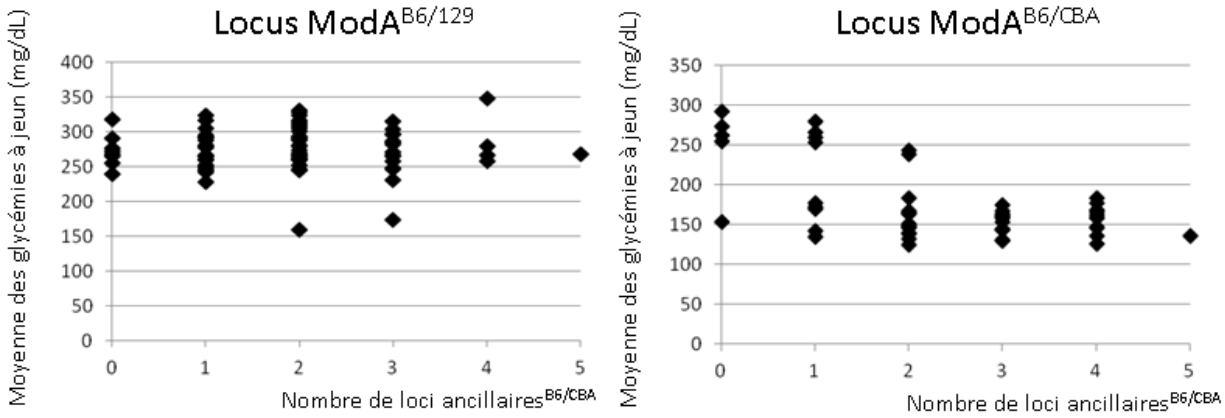


Figure 38 : Influence du nombre de loci ancillaires portant l'allèle CBA ($^{B6/CBA}$) dans le phénotype des souris portant soit l'allèle 129 (ModA$^{B6/129}$) soit l'allèle CBA au locus ModA (ModA$^{B6/CBA}$).
Chaque losange représente une souris. Les 86 souris N2 ont été incluses dans l'analyse. En abscisse, le nombre de loci ancillaires$^{B6/CBA}$ porté par chaque souris. En ordonnée, la moyenne des glycémies à jeun de chaque souris. A gauche, les souris portant l'allèle 129 (sensible) au locus ModA restent sensibles quelque soit le nombre de loci ancillaires$^{B6/CBA}$. A droite, les souris portant l'allèle CBA (résistant) au locus ModA sont d'autant plus normoglycémiques et résistantes qu'elles portent un nombre croissant de loci ancillaires$^{B6/CBA}$. En conclusion le fait que le locus ModA soit $^{B6/CBA}$ est nécessaire mais non suffisant pour qu'une souris soit résistante au diabète.

3.1.6 Affinage de l'intervalle ModA

L'analyse à l'aide J/QTL dans R a été refaite sur l'ensemble des souris résistantes et sensibles génotypées soit un total de 141 souris dont 91 sensibles et 50 résistantes en cherchant une liaison entre glycémie moyenne à jeun et l'ensemble des marqueurs génétiques comprenant les 26 marqueurs additionnels et les 707 SNP qui sont différents entre 129 et CBA parmi les 1449 SNP des puces Illumina. Cette seconde analyse a permis de renforcer la liaison entre glycémie moyenne à jeun et le locus ModA en obtenant un LODscore encore plus élevé que précédemment (au-delà de 30) mais surtout de réduire l'intervalle du QTL ModA au niveau du chromosome 3 à environ 8 Mb (intervalle compris entre 27,79 et 33,86 Mb avec un intervalle de confiance de 95%).

3.1.7 Gènes candidats de l'intervalle ModA

Dans cette région ModA, les séquences de référence des souris 129 et CBA publiées par le site de l'Institut Sanger ont été comparées afin d'identifier les gènes dans lesquels les modifications de séquence pourraient entraîner un changement d'acide aminé (https://www.sanger.ac.uk/sanger/Mouse_SnpViewer/rel-1303) ; sur plusieurs milliers de variations de SNP identifiées, seuls 11 gènes ont été détectés comme porteurs de modifications de SNP non synonymes au niveau du locus ModA (Figure 39). Parmi ces gènes, *Pld1* pourrait être un candidat intéressant car il est exprimé dans les cellules beta et il a

été décrit comme un important régulateur de la réponse insulino-secrétoire au glucose dans les cellules MIN6 [96][97]. De même, le gène *Kcnmb3* semble intéressant car même s'il n'a pas encore été montré de lien avec le diabète, il s'agit d'un gène codant pour un canal potassique qui est exprimé dans le pancréas. Le gène *Smad7* est potentiellement également intéressant car il a été impliqué dans la survenue d'un diabète quand il est exprimé de façon conditionnelle dans des pancréas de souris adultes trangéniques ; ce diabète semble lié à une inhibition de la voie TGFbeta et il est réversible après restauration de celle-ci [98].

Nom du gène	Description	Location	db SNP	Allele CBA	Changement de codon	Changement d'AA	Description du changement
Pld1	Phospholipase D1	28,048,083	rs29602715	G	Cgg/Ggg	R/G	Variant faux-sens
Gm1527	Predicted gene 1527	28,895,732	rs50586704	A	cGt/cAt	R/H	Variant faux-sens
Egfem1	EGF-like and EMI domain containing 1	29,648,265	rs29790718	G	aCt/aGt	T/S	Variant faux-sens
		29,686,728	rs30410185	C	gTt/gCt	V/A	Variant faux-sens
Mecom	MDS1 and EVI1 complex locus	30,238,240	rs47702462	C	gTt/gCt	V/A	Variant faux-sens
Gm10258	Predicted gene 10258	30,268,666	rs29809455	G	Atc/Gtc	I/V	Variant faux-sens
Lrrc31	Leucine rich repeat containing 31	30,689,871	rs37203180	A	Tca/Aca	S/T	Variant faux-sens
Samd7	Sterile alpha motif domain containing 7	30,756,487	rs31381373	G	Aca/Gca	T/A	Variant faux-sens
Kcnmb3	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 3	32,473,689	rs29858283	T	aCc/aTc	T/I	Variant faux-sens
Usp13	Ubiquitin specific peptidase 13	32,902,049	rs29854159	T	aCg/aTg	T/M	Variant faux-sens
Pex5l	Peroxisomal biogenesis factor 5-like	32,956,647	rs29869735	A	aGa/aAa	R/K	Variant faux-sens
Ttc14	Tetratricopeptide repeat domain 14	33,800,535	rs49858437	C	Atg/Ctg	M/L	Variant faux-sens
		33,801,070	rs51789388	G	gaC/gaG	D/E	Variant faux-sens

Figure 39 : Les onze gènes candidats du QTL ModA présentant des variations non synonymes en comparant les séquences 129 et CBA.

Par ailleurs, nous avons observé que le gène *Slc2A2* est situé sur le chromosome 3 juste à côté du pic du locus ModA. *Slc2A2* est une cible connue de *Hnf1a* ce qui en fait un gène candidat important ce d'autant plus qu'il a été montré comme associé à la glycémie à jeun dans des GWAS chez l'homme (cf Introduction, Figure 4). Nos résultats ont montré :

1/ qu'il n'y a pas de variation de SNP paraissant modifier la séquence de la protéine GLUT2 entre les souches 129 et CBA décrites par Sanger ;

2/ et que la protéine GLUT2 n'est pas exprimée dans le pancréas chez les souris déficientes en *Hnf1a* qu'elles soient de lignée sensible ou résistante. Cette perte de l'expression est claire

après le 15ème jour de vie en immunohistochimie (Figure 40). A la naissance, l'expression semble être présente mais la localisation est moins clairement spécifique à la membrane. La perte d'expression de GLUT2 avec la déficience en *Hnf1a* a été validée et confirmée en PCR quantitative : GLUT2 est exprimé à la naissance (J1,5) mais son niveau d'expression diminue rapidement chez les souris 129 et CBA mutantes dès J6, puis à J15 et à J28.

Compte-tenu de l'ensemble de ces résultats, nous avons considéré que GLUT2 n'est probablement pas le gène modificateur du locus ModA même si nous ne pouvons pas totalement exclure son implication dans la suppression du phénotype.

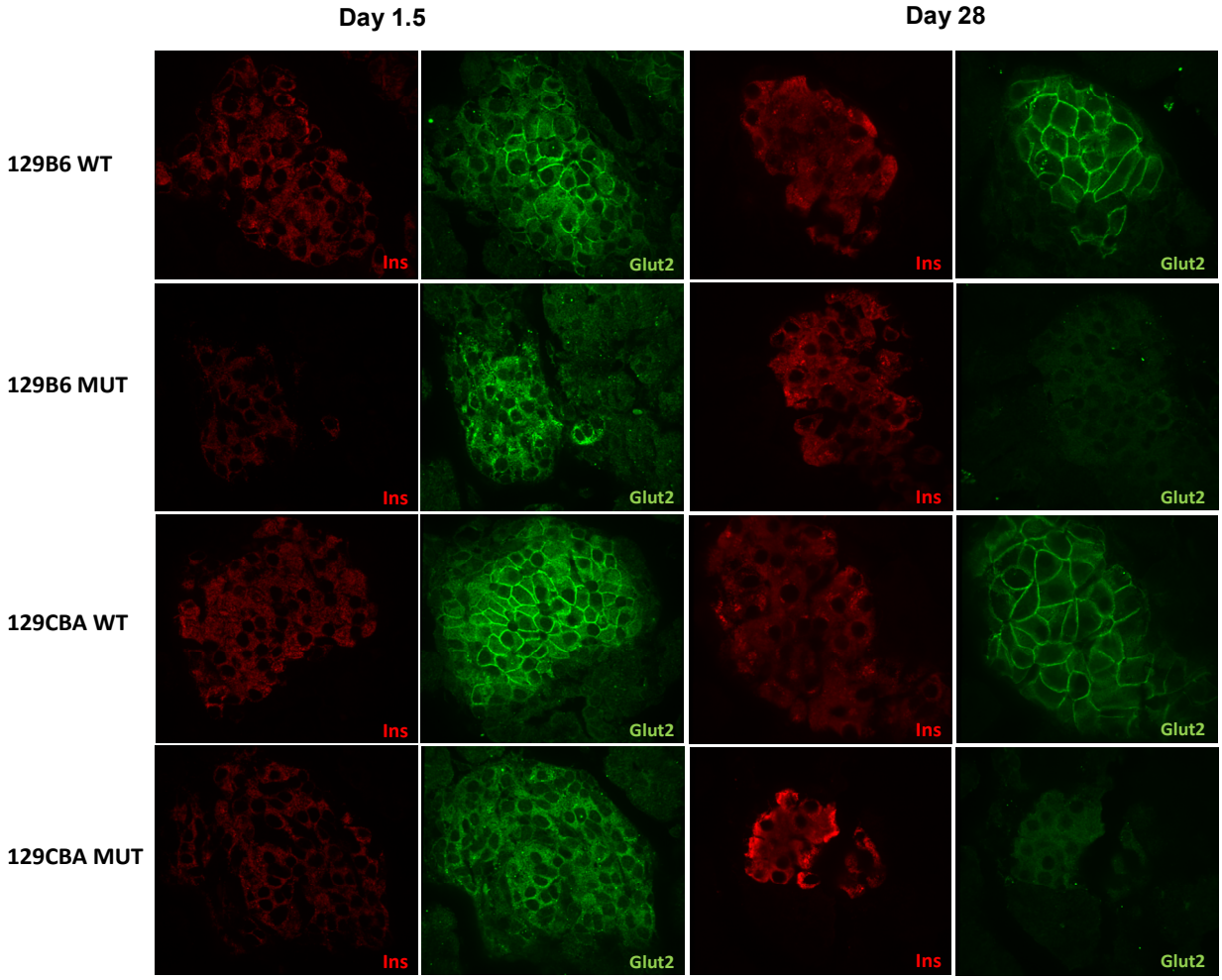


Figure 40 : Perte d'expression de GLUT2 au niveau des îlots pancréatiques à J1,5 et J28 chez des souris déficientes en *Hnf1a*.
Les photos ont été obtenues par immunomarquage de coupes de pancréas de souris 129B6 sauvages (129B6 WT) et mutantes (MUT) et 129CBA sauvages (129CBA WT) et mutantes (MUT) avec l'insuline (Ins) et GLUT2 (Glut2). A J1,5, la protéine GLUT2 est présente à la membrane chez les souris WT alors que cette localisation est partiellement perdue chez les mutants. A J28, l'expression de GLUT2 est absente chez les mutants. La même absence d'expression de GLUT2 en immunohistochimie est observée en post-natal au 15ème jour de vie chez les souris déficientes en *Hnf1a* qu'elles soient de lignée sensible ou résistante (Alessia Bagattin, données non publiées).

Chapitre 2 : Particularités des îlots de Langerhans du phénotype résistant

3.2.1 La masse beta-cellulaire et le nombre d'îlots ne sont pas différents entre souris sensibles et résistantes

3.2.1.1 Masse beta-cellulaire à la naissance et à J15

Nous avons fait le choix de mesurer la masse beta-cellulaire à la naissance (J1,5) pour rechercher des différences acquises pendant le développement entre souris résistantes et sensibles, puis au 15ème jour de vie (J15) afin de connaître le retentissement de la déficience en *Hnf1a* sur la croissance post-natale de la masse beta-cellulaire dans ces deux modèles. Nous avons choisi le 15ème jour de vie car c'est avant le moment où les souris sensibles deviennent franchement hyperglycémiques pour éviter un éventuel retentissement de l'hyperglycémie sur la masse beta-cellulaire (par glucotoxicité notamment).

La quantification de la masse beta-cellulaire à J1,5 et J15 dans les lignées 129xB6 $Hnf1a^{+/+}$, 129xB6 $Hnf1a^{-/-}$, 129xCBA $Hnf1a^{+/+}$, 129xCBA $Hnf1a^{-/-}$ n'a pas montré de différences significatives (Figure 41). Il existe une tendance à la diminution de la masse beta-cellulaire associée à la déficience en *Hnf1a* que ce soit dans les lignées sensibles (129B6) ou résistantes (129CBA) sans différence significative entre les deux lignées mutantes.

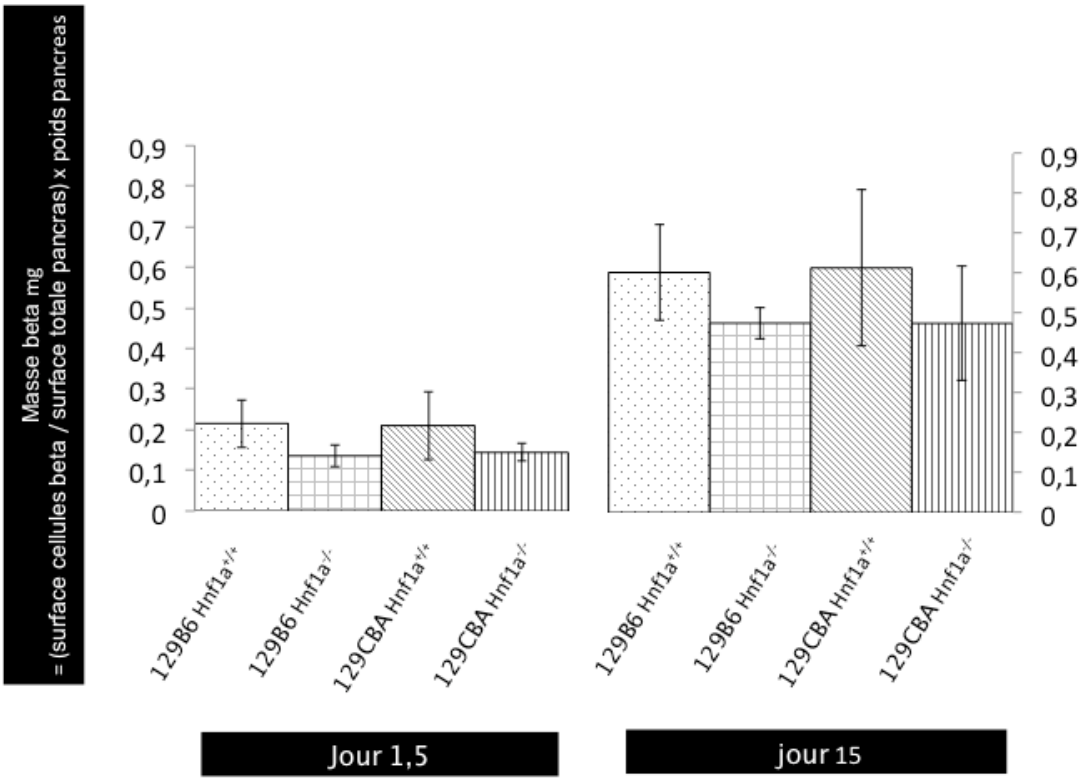


Figure 41 : Masse beta-cellulaire quantifiée à la naissance et au 15ème jour de vie chez les souris sensibles (129B6 *Hnf1a*$^{-/-}$) et résistantes au diabète (129CBA *Hnf1a*$^{-/-}$).
Trois souris ont été analysées à chaque temps pour chaque lignée. La masse beta-cellulaire est exprimée en moyenne ± DS. Aucune différence statistiquement significative n'a pu être montrée.

3.2.1.2 Quantification du nombre d'îlots à J1,5 et J15

A la naissance (J1,5), il n'y avait pas de différence dans le nombre total d'îlots entre les quatre lignées. Par contre, à partir de J15, il existait une légère augmentation du nombre total d'îlots chez les souris sensibles au diabète (129B6 MUT) en comparaison des souris sauvages (129B6 WT) et des souris résistantes (129CBA MUT) qui présentaient toutes deux le même nombre total d'îlots (Figure 42).

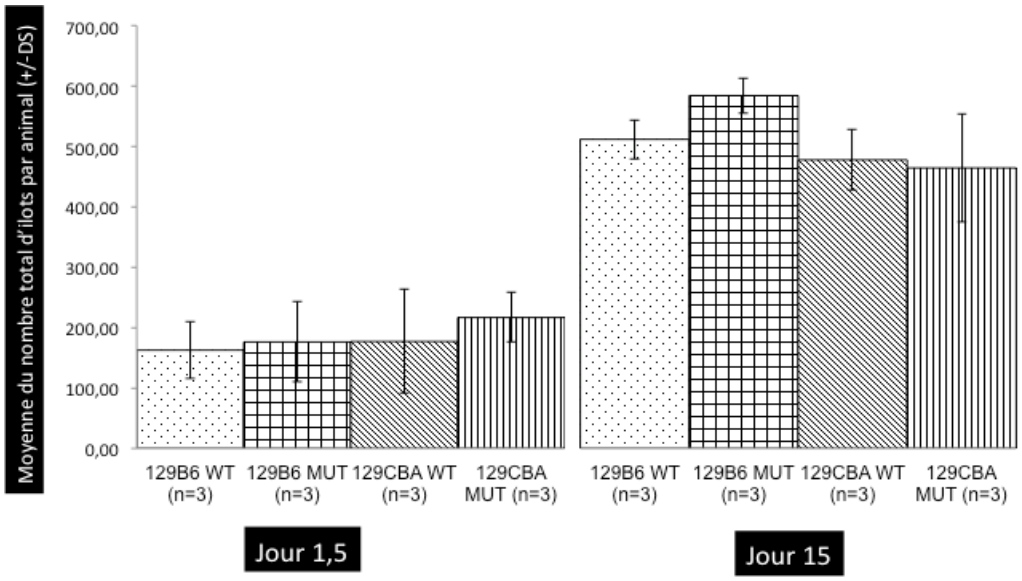


Figure 42 : Moyennes du nombre total d'îlots par lignée à la naissance et au 15ème jour.
Trois souris ont été analysées à chaque temps et pour chaque lignée. Le nombre total d'îlots est exprimé en moyenne ± DS.

3.2.2 Préservation des îlots beta de grande taille chez les souris mutantes résistantes

L'examen au microscope à fluorescence des lames de sections de pancréas marquées pour l'insuline des lignées de souris sauvages et déficientes en *Hnf1a* sensibles et résistantes à J15 montre (Figure 43) :

- chez les souris déficientes en *Hnf1a* sensibles (129B6 MUT) : une diminution de la taille des îlots beta qui semblent plus nombreux et plus dispersés que chez les souris sauvages de la même lignée ;
- chez les souris déficientes en *Hnf1a* résistantes (129CBA MUT) une préservation de la taille des îlots beta évidente par rapport aux souris sensibles (129B6 MUT).

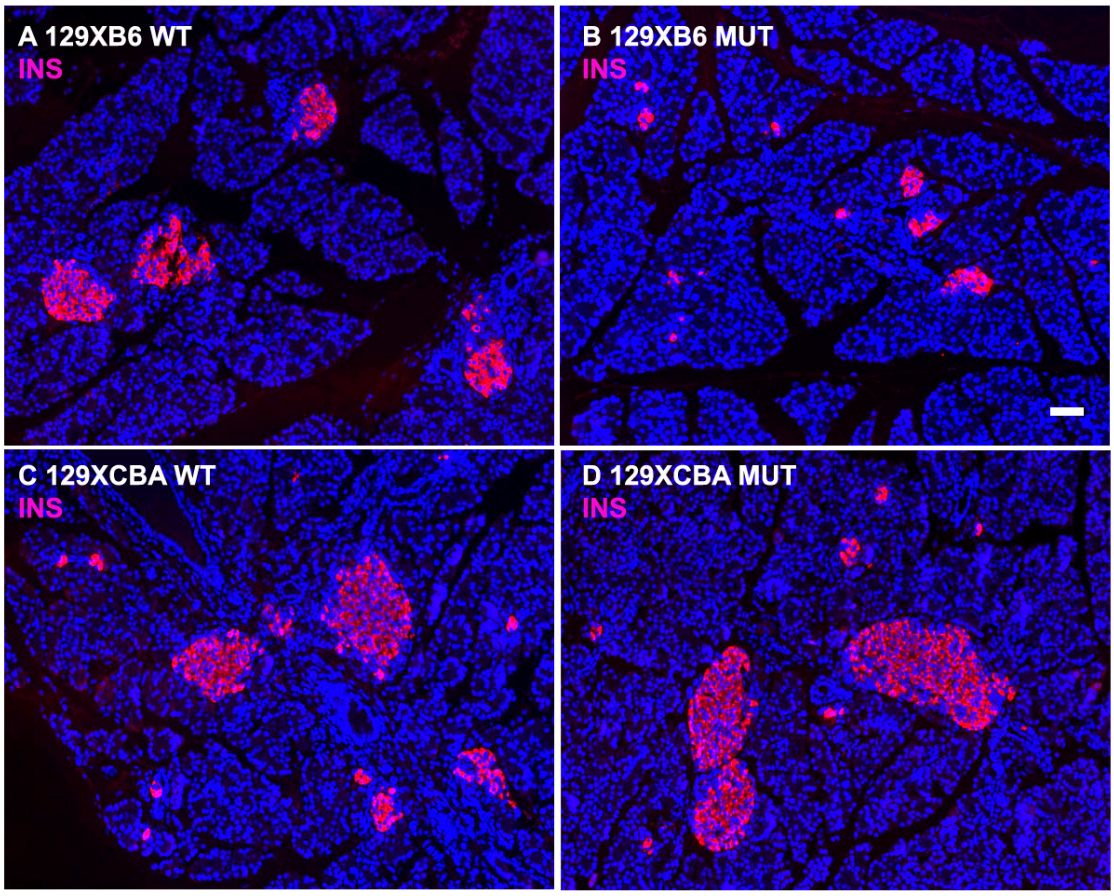


Figure 43 : Marquage des îlots par détection de l'insuline sur des sections de pancréas à J15.
La taille des îlots beta est préservée chez les souris mutantes résistantes (D-129CBA MUT) alors que ceux-ci sont de taille nettement diminuée chez les souris mutantes sensibles (B-129B6 MUT) par rapport aux sauvages (A et C). Les cellules beta sont marquées avec un anticorps anti insuline de cochon d'inde (rose) et les noyaux avec le DAPI (bleu). Les lames ont été analysées au travers d'un objectif x10 d'un microscope à fluorescence (Axiovert 200M, Zeiss, Allemagne). Les images ont été prises avec un appareil photo digital Nikon Coolpix 995. Barre d'échelle = 50 µm.

3.2.2.1 Croissance normale des îlots beta en post-natal chez les souris mutantes résistantes

Les résultats montrent une croissance normale de la taille moyenne des îlots entre la naissance (J1,5) et le 15ème jour (J15) chez les souris résistantes au diabète (129CBA MUT*)* ce qui n'est pas observé chez les souris sensibles au diabète (129B6 MUT) (Figure 44). La différence de taille des îlots entre les deux lignées déficientes en *Hnf1a* n'existe pas à la naissance et semble apparaître durant la vie post-natale pendant les 15 premiers jours de vie.

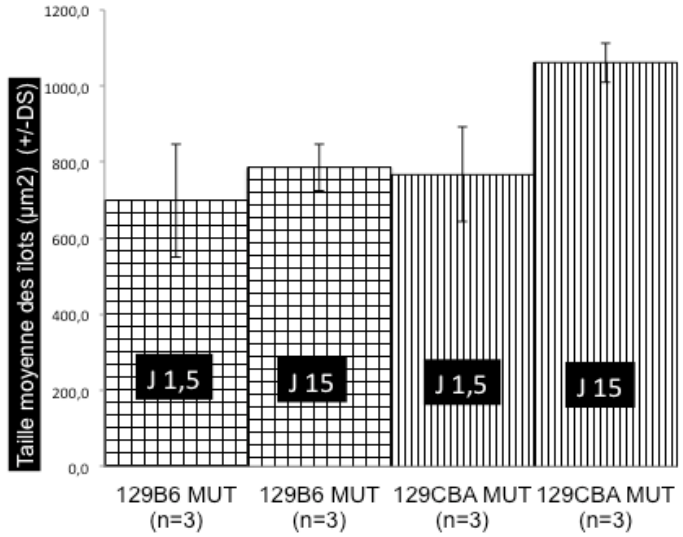


Figure 44 : Variation de la taille moyenne des îlots beta (µm2) entre la naissance (J1,5) et J15 chez les souris déficientes en *Hnf1a* (MUT) sensibles (129B6) et résistantes (129CBA).

3.2.2.2 Préservation de la taille des îlots beta chez les souris résistantes à J15

A J15, nous avons déterminé la distribution en quartiles des valeurs de taille de l'ensemble des îlots identifiés afin de déterminer la valeur des différents quartiles. Ensuite, pour chaque souris, le pourcentage de valeurs appartenant à chaque quartile a été calculé (c'est-à-dire pourcentage d'îlots de taille appartenant au premier quartile, second quartile, etc.). L'analyse de la distribution de la taille des îlots en quartiles confirme la présence d'îlots de grande taille en plus grand nombre. Cette analyse montre également que la présence d'îlots de grande taille chez les souris résistantes concerne les îlots appartenant au quatrième quartile c'est-à-dire plus de 15 cellules beta environ (Figure 45). La même analyse en sous-quartiles a été refaite pour les valeurs du quatrième quartile qui contiennent les îlots de taille supérieure à environ 15 cellules. Dans cette seconde analyse, les îlots de grande taille présents chez les souris résistantes contiennent au moins plus de 30 cellules beta par îlot avec une différence

nettement significative avec les souris sensibles pour les îlots de plus de 60 cellules (Figure 46). Ce résultat est opposé à ce qui est retrouvé chez les souris sensibles dont le nombre d'îlots de grande taille est effondré avec la déficience en *Hnf1a*. En conclusion, la présence d'îlots de grande taille est maintenue à J15 chez les souris résistantes malgré la déficience en *Hnf1a*.

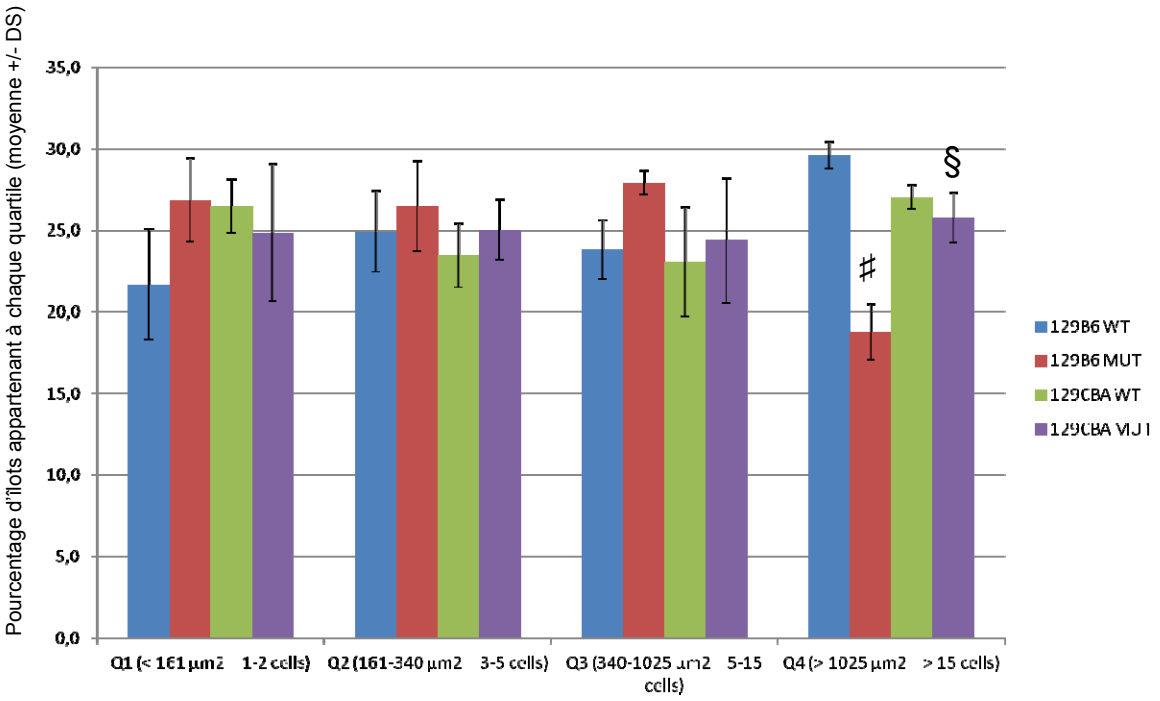


Figure 45 : Distribution des îlots en quartile selon leur taille à J15.
Les souris sensibles 129B6 MUT (#) ont en moyenne moins de 20% de leurs îlots qui appartiennent au quatrième quartile (Q4 soit plus de 15 cellules par îlot) alors que les souris résistantes 129CBA MUT (§) ont plus de 25% de leurs îlots qui appartiennent à ce quartile. La différence entre les souris sensibles et résistantes est statistiquement significative pour Q4. Le test statistique utilisé est un test ANOVA ($p<0,05$).

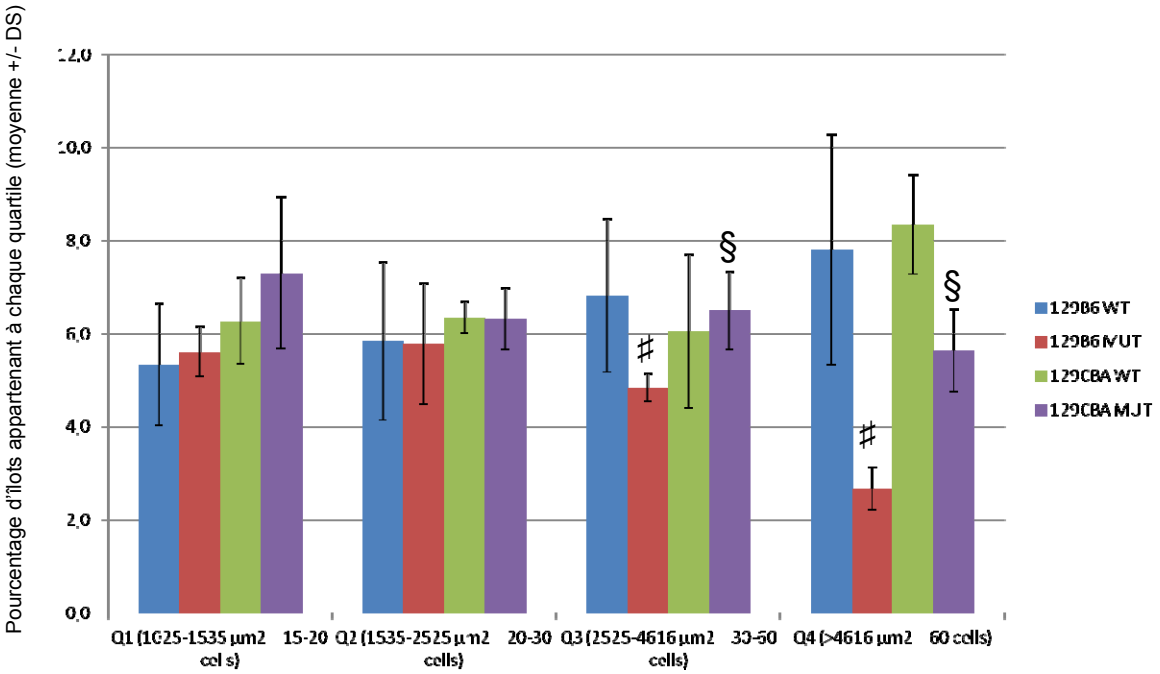


Figure 46 : Distribution des îlots de Q4 en sous-quartile selon leur taille à J15.
Les souris sensibles 129B6 MUT (#) ont en moyenne moins de 3% de leurs îlots qui appartiennent au quatrième sous-quartile (Q4 soit plus de 60 cellules par îlot) alors que les souris résistantes 129CBA MUT (§) ont près de 6% de leurs îlots qui appartiennent à ce sous-quartile. De la même façon dans le troisième quartile (entre et 30 et 60 cellules), les résultats sont déjà statistiquement différents entre souris sensibles et résistantes déficientes en *Hnf1a*. La différence entre les souris sensibles et résistantes est statistiquement significative pour Q3 et Q4. Le test statistique utilisé est un test ANOVA ($p<0,05$).

3.2.2.3 Absence de modification de la taille des cellules

L'augmentation de la taille des îlots n'est pas en rapport avec une augmentation de la taille des cellules chez les souris résistantes comme en témoignent les résultats du tableau suivant :

Lignées de souris	Taille des cellules beta (μm^2)
129B6 WT	70-85
129B6 MUT	74-82
129CBA WT	73-75
129CBA MUT	67-80

La taille des cellules beta est estimée pour plusieurs îlots et pour chaque lignée par le calcul de surface suivant : taille de la surface de l'îlot divisée par le nombre de cellules beta avec l'aide du plugin Cell Counter dans ImageJ. Les intervalles notés dans le tableau correspondent aux écarts entre les différents calculs effectués pour différents îlots de chaque lignée.

3.2.3 Etude de la prolifération et de l'apoptose des cellules beta pancréatiques des souris mutantes

3.2.3.1 Prolifération des cellules beta par marquage Ki67

Les résultats n'ont pas montré de différence du pourcentage de cellules beta en prolifération entre les souris sensibles et résistantes déficientes en *Hnf1a* au 15ème jour de vie (Figure 47). Il semble que le défaut d'expression de *Hnf1a* entraîne une tendance à l'augmentation de la prolifération en comparaison des souris sauvages mais ce résultat n'est différent de façon significative que chez les souris sensibles au diabète.

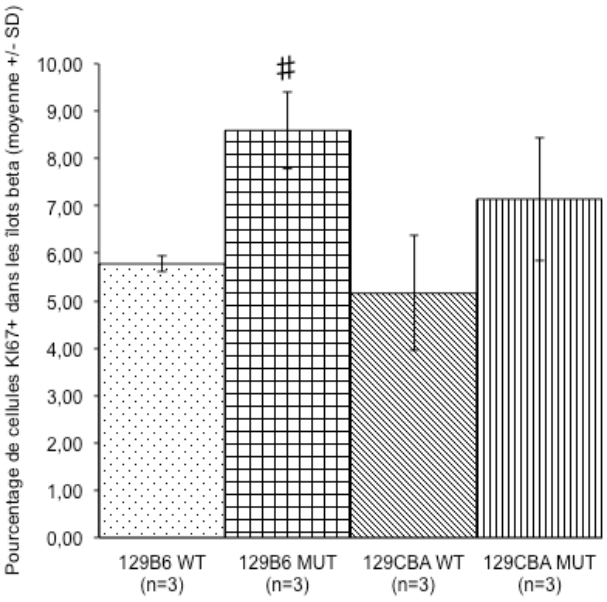


Figure 47 : Pourcentage de prolifération dans les cellules beta des différentes lignées à J15.
Le pourcentage de prolifération est calculé après comptage des cellules dont les noyaux étaient marqués pour Ki67 (Ki67+) parmi les cellules marquées pour l'insuline sur les coupes de pancréas. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne avec la déviation standard (DS). Seules les souris sensibles déficientes en *Hnf1a* (#) présentent une augmentation du taux de prolifération comparées à leurs homologues sauvages.

3.2.3.2 Apoptose des cellules beta par marquage TUNEL

Les résultats montrent une augmentation comparable de l'apoptose dans les cellules beta des souris sensibles et résistantes déficientes en *Hnf1a* (Figure 48). Il faut noter que le taux de cellules en apoptose est très faible dans tous les cas dans les ilots de Langherans au 15ème jour de vie. Sur les mêmes animaux, une expérience contrôle du marquage TUNEL avait été faite dans le tissu intestinal qui présente une activité apoptotique soutenue lieé au renouvellement des cellules intestinales. Ce contrôle permettait d'exclure la présence de faux négatifs dans les îlots.

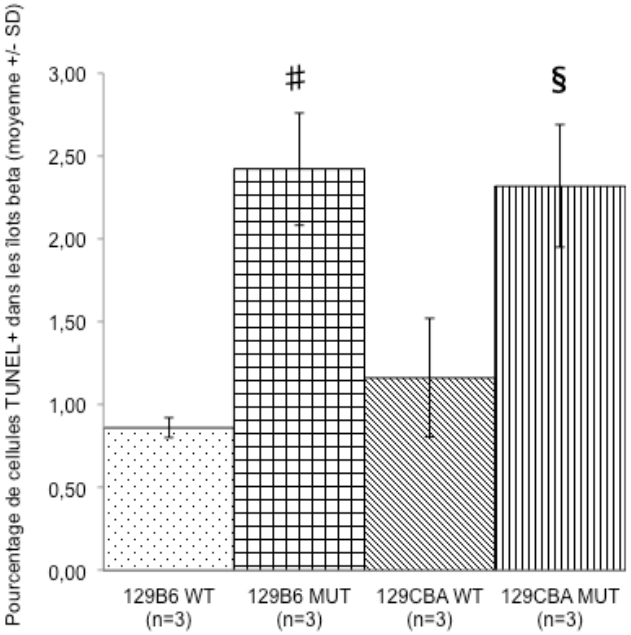


Figure 48 : Pourcentage de cellules beta en apoptose dans les sections pancréatiques des différentes lignées sensibles et résistantes à J15.
Le pourcentage de cellules apoptotiques est calculé après comptage des cellules dont les noyaux étaient marqués pour la méthode TUNEL (TUNEL+) parmi les cellules marquées pour l'insuline sur les coupes de pancréas. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne avec la déviation standard (DS). Les souris sensibles (♯) et résistantes (§) déficientes en *Hnf1a* présentent une augmentation de cellules beta en apoptose comparées à leurs homologues sauvages.

3.2.4 Etude de la néogenèse en post natal par le co-marquage des cellules ductales avec l'insuline

Afin de comprendre la préservation d'une croissance normale des îlots beta chez les souris résistantes, nous avons recherché la possibilité de la présence d'une néogenèse en post-natal avec un recrutement plus important de cellules ductales précurseurs des cellules beta et donc présentant un marquage positif pour l'insuline. Dans l'expérience que nous avons mené, il ne semble pas y avoir de différence dans le nombre de cellules produisant de l'insuline parmi les cellules ductales entre les différentes lignées mais ces cellules doublement marquées sont trop rares pour obtenir une quantification satisfaisante (Figure 49).

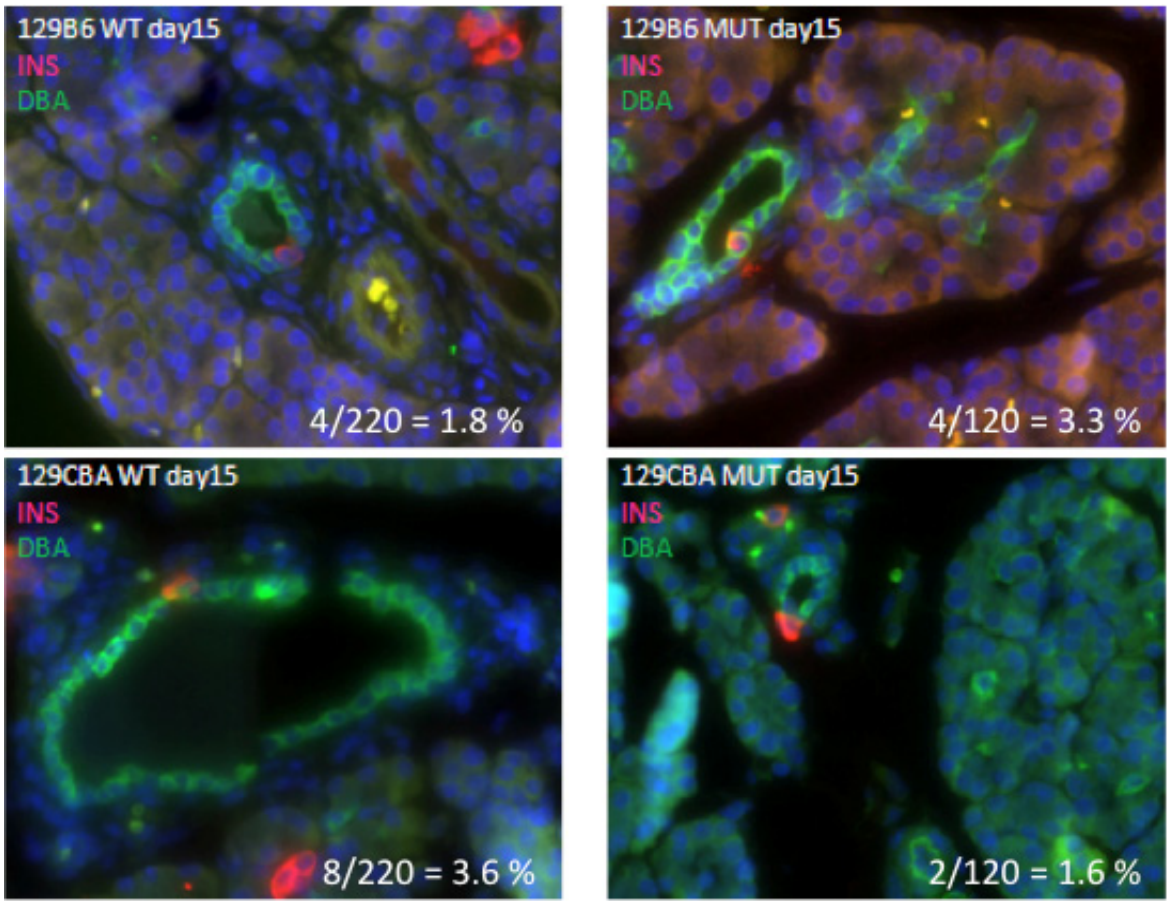


Figure 49 : Immunohistochimie de coupes de pancréas avec comarquage des cellules contenant de l'insuline (rouge), des cellules ductales par le DBA (vert) et des noyaux par le DAPI (bleu).
Ces cellules sont rares et sont donc difficiles à compter pour obtenir une mesure statistique acceptable (souris âgées de 15 jours).

3.2.5 Présence de cellules isolées en grand nombre à la naissance chez les souris déficientes en *Hnf1a*

A la naissance (J1,5), nous avons procédé à la même analyse de la distribution des valeurs de taille d'îlot en quartile que ce qui avait été réalisé à J15 (Figure 50). Nous avons observé que les souris 129B6 ou 129CBA déficientes en *Hnf1a* ont un pourcentage important d'îlots appartenant au 1er quartile qui représente en réalité ne sont pas à proprement parler des îlots mais plutôt des cellules beta isolées (<150 µm^2 soit 1 à 2 cellules). Par ailleurs, contrairement à J15, les souris résistantes ne semblent pas avoir particulièrement plus de valeurs d''îlots de grande taille appartenant au 4ème quartile (>1050 µm^2 soit des îlots contenant plus de 15 cellules). Ce résultat montre que la grande taille des îlots des souris résistantes à J15 est le résultat d'une croissance « anormalement » normale pendant la période post-natale. La présence de nombreuses cellules beta isolées à la naissance pourrait être un élément favorable à cette croissance. En effet, les cellules isolées présentes à la naissance pourraient s'agréger dans la période post-natale et former des îlots de grande taille. A l'inverse, les nombreuses cellules isolées des lignées sensibles ne semblent pas disposer de cette possibilité puisqu'elles ne conduisent pas à la formation de grands îlots beta.

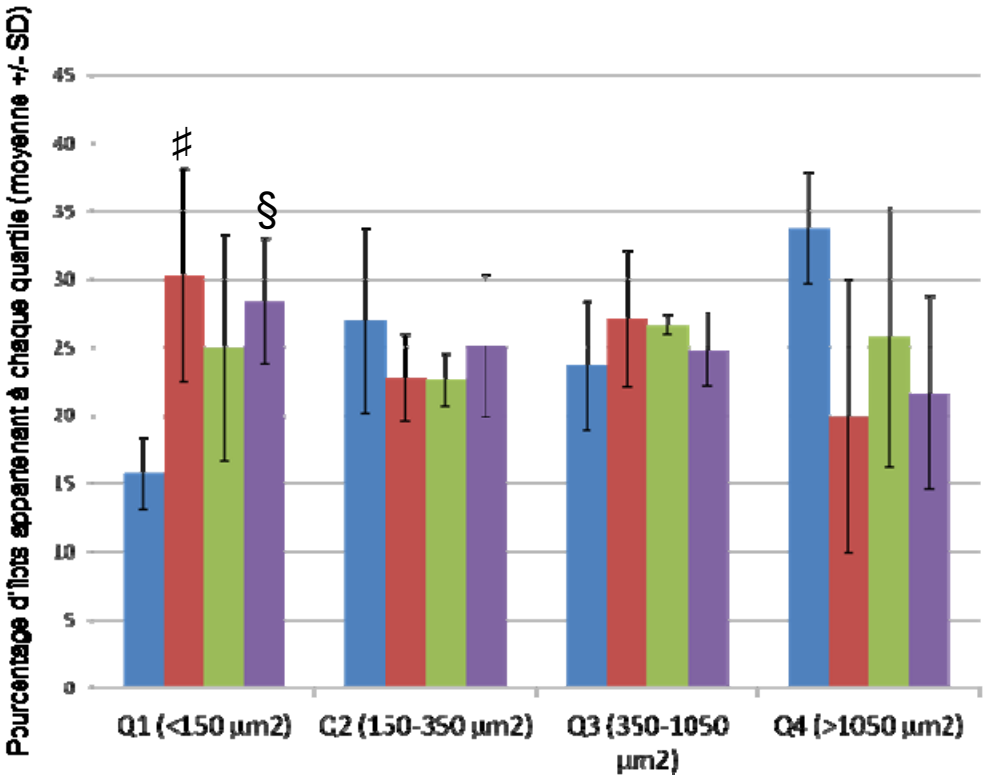


Figure 50 : Distribution des îlots en quartile selon leur taille à la naissance (jour 1,5)
Au total plus de 1000 îlots beta ont été analysés soit de 44 à 136 îlots par animal. Il semble que les souris déficientes en *Hnf1a* qu'elles soient 129B6 (#) ou 129CBA (§) ont un pourcentage important d'îlots

appartenant au 1er quartile qui représente en réalité des cellules beta isolées (<150 µm^2 soit 1 à 2 cellules). Ce pourcentage est statistiquement différent de celui des souris 129B6 sauvages. A ce stade, les souris 129CBA ne semblent pas avoir particulièrement plus d'îlots appartenant au 4ème quartile (>1050 µm^2 soit des îlots contenant plus de 15 cellules). Le test statistique utilisé est un test ANOVA ($p<0,05$). En bleu : les souris 129B6 WT. En rouge : 129B6 MUT. En vert : 129CBA WT. En violet : 129CBA MUT.

3.2.6 Résultats concernant les cellules alpha pancréatiques

3.2.6.1 Pas de différence dans la masse alpha-cellulaire entre souris résistantes et sensibles à la naissance

La quantification de la masse alpha-cellulaire a uniquement été analysée à la naissance dans notre travail et elle n'a pas pu mettre en évidence de différence statistiquement significative notamment entre les deux lignées de souris résistantes et sensibles au diabète (Figure 51). Il pourrait exister une tendance à la diminution de la masse alpha-cellulaire avec la déficience en *Hnf1a* dans notre modèle mais cela est vrai chez les souris déficientes en *Hnf1a* qu'elles soient sensibles ou résistantes. De plus nous n'avons pas observé de modification du rapport entre cellules beta et alpha en pourcentage au sein des îlots quantifiés pour les masses beta et alpha-cellulaire (Figure 52).

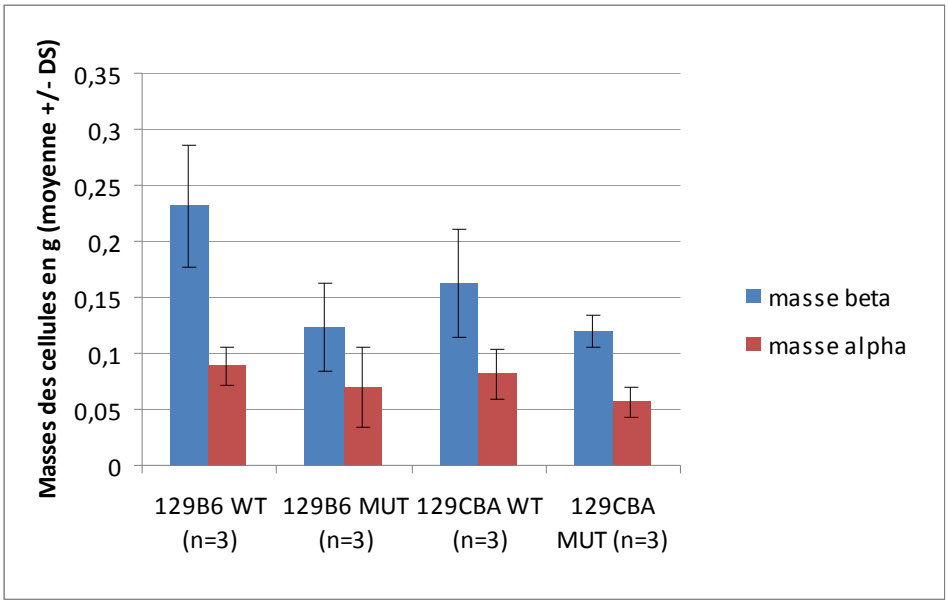


Figure 51 : Quantification des masses beta et alpha-cellulaire à la naissance (J1,5).
Les lignées notées 129B6 sont les 129SvxC57BL/6 et 129CBA les 129SvxCBA. WT signifie sauvage et MUT signifie déficient en *Hnf1a*. Trois souris ont été analysées à chaque temps pour chaque lignée (n=3). Les masses beta et alpha-cellulaire sont exprimées en moyenne ± DS.

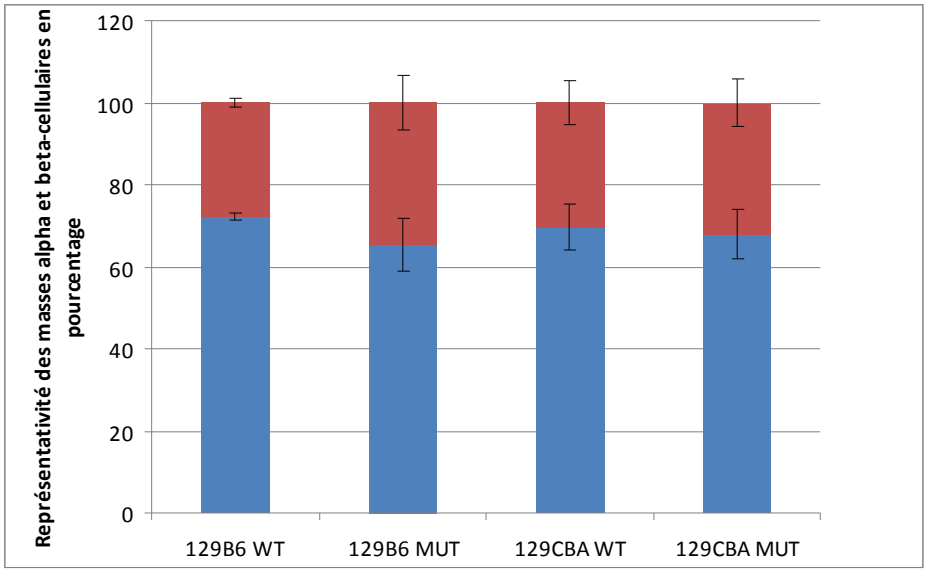


Figure 52 : Pas de différence entre la représentativité des masses alpha (rouge) et beta-cellulaires (bleu) au sein des îlots pour chaque génotype à J1,5.

3.2.6.2 Anomalie de la répartition des cellules alpha chez les souris déficientes en *Hnf1a* sensibles et résistantes

L'immunomarquage des îlots de F1 sensibles et résistants au diabète au 15ème jour de vie a montré une altération de la répartition des cellules alpha qui sont disséminées au sein des îlots beta alors qu'elles sont réparties en couronne autour des cellules beta chez les souris sauvages (Figure 53). Cette altération adéjà été décrite dans les modèles de souris KO pour *Hnf1a* (cf introduction) et les souris mutantes résistantes ne paraissent pas différentes du point de vue de cette anomalie.

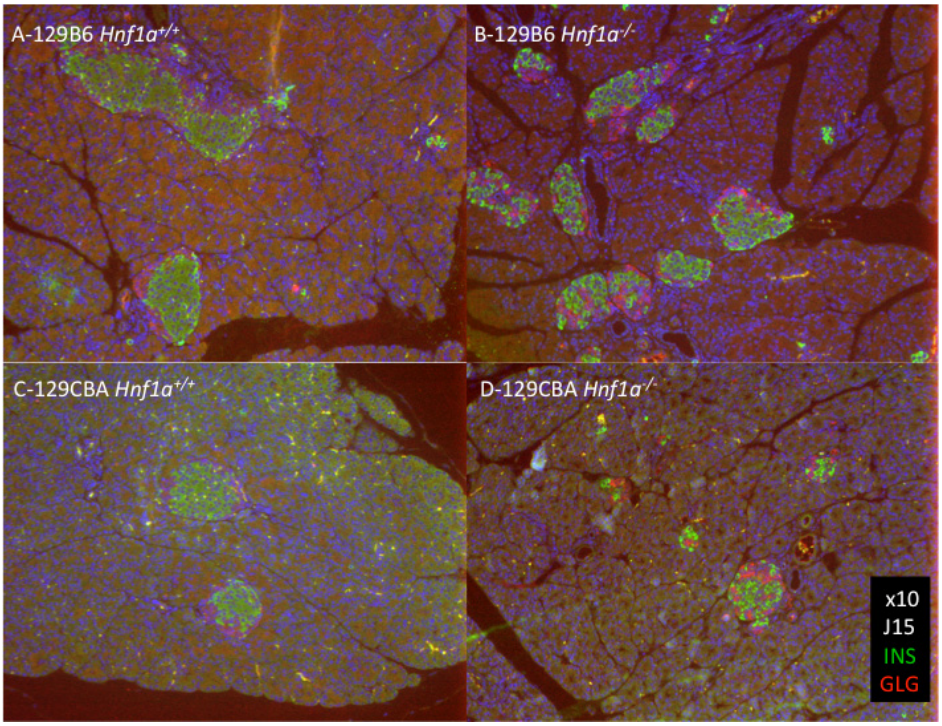


Figure 53 : Immunomarquage des îlots de Langerhans pour les cellules beta par l'insuline (en vert) et les cellules alpha par le glucagon (en rouge).
On note que la déficience en *Hnf1a* (B et D) s'accompagne d'une désorganisation de l'îlot avec perte de l'aspect classique en couronne des cellules alpha qui entourent les cellules beta bien visibles dans les lignées sauvages (A et C). Les photos ont été prises avec un objectif à grossissement x10 chez des souris au 15ème jour de vie des lignées sensibles (129SvxC57BL/6) et résistantes (129SvxCBA) à l'état sauvage ou déficient en *Hnf1a*. A la naissance, il n'a pas pu être montré la même modification de l'architecture des îlots probablement en raison de la taille des îlots qui sont nettement plus petits.

3.2.7 Résultats biochimiques et hormonaux

Nous avons analysé des marqueurs biochimiques et hormonaux de base dans le plasma des différents modèles de souris mutantes sensibles et résistantes au 28ème jour de vie (J28). Les marqueurs utilisés permettent de rechercher des anomalies de fonctionnement du foie (ALAT), du rein (créatininémie) et une dyslipidémie comme cela a déjà été décrit dans différents modèles d'invalidation de *Hnf1a*. De plus, le dosage hormonal d'IGF1 a été effectué car son défaut d'expression est une conséquence de la déficience en *Hnf1a*. La seule différence statistiquement significative entre souris sensibles et résistantes déficientes en *Hnf1a* est comme attendue la glycémie à jeun qui est nettement plus basse chez les souris résistantes comparativement aux sensibles (10,8mM versus 22,2mM, p=0,010) (Figure 54). Le poids corporel et le dosage d'IGF1 sont significativement abaissés chez les souris déficientes en *Hnf1a* (p<0,05) mais ces résultats sont similaires que les souris soient sensibles ou résistantes au diabète (p >0,05). Il semble donc que le défaut de croissance des souris déficientes en *Hnf1a* est relié à ce défaut d'expression de l'IGF1 mais que ces deux défauts sont tout à fait comparables entre souris résistantes et sensibles sans lien avec le phénotype diabétique.

	129B6 WT (n=5)	**129B6 MUT (n=5)**	**129CBA WT (n=5)**	**129CBA MUT (n=5)**	**p 129B6MUT vs 129B6WT**	**p 129CBAMUT vs 129B6MUT**
Poids corporel (g)	**19,0 +/- 1,9**	**11,2 +/- 3,1**	**18,4 +/- 2,5**	**9,7 +/- 1,4**	**0,017**	NS
Glycémie à jeun (mmol/L)	**12,4 +/- 3,6**	**22,2 +/- 4,0**	**12,3 +/- 2,6**	**10,8 +/- 3,0**	**0,014**	**0,010**
ALAT (UI/L)	116 +/- 127	90 +/- 79	47 +/- 33	88 +/- 92	NS	NS
Cholestérol total (mmol/L)	2,28 +/- 0,16	3,80 +/-1,34	2,54 +/- 0,34	4,79 +/- 1,05	NS	NS
Triglycérides (mmol/L)	0,56 +/- 0,17	0,81 +/-0,30	0,58 +/- 0,13	0,47 +/- 0,26	NS	NS
Créatinine (µmol/L)	10,5 +/- 2,9	9,8 +/- 2,4	10,5 +/- 2,2	13,3 +/- 6,8	NS	NS
IGF-1 (ng/mL)	**409,6 +/- 57,4**	**115,3 +/- 55,9**	**456,6 +/- 99,0**	**99,4 +/- 26,8**	**0,003**	NS

Figure 54 : Dosages biochimiques et hormonaux chez les souris 129B6 et 129CBA déficientes en *Hnf1a*.
Les données sont exprimées en moyennes ± DS. p est calculé à l'aide du test de Student et est considéré significatif si <0,05 (chiffre noté en gras). NS = Non significatif. n = nombre de souris analysées. vs = versus.

Partie 4 : Discussion et Perpectives

Dans ce travail, nous avons pu montrer que le fonds génétique des souris a un impact majeur sur le phénotype lié à la déficience en *Hnf1a* et que, finalement, il existe deux lignées congéniques (CBA/J et C3H) dans lesquelles le défaut d'expression du gène *Hnf1a* n'entraîne pas de diabète. Nous avons pu identifier une région génétique de environ 8 Mb, ModA, située sur le chromosome 3 responsable de la suppression du phénotype diabétique. Des interactions génétiques avec des loci ancillaires ont pu également être mises en évidence. Dans cette région du locus majeur ModA, des gènes candidats ont été identifiés sur la base de modification de SNP non synonymes entre souches résistantes et sensibles.

4.1 Effet du fonds génétique sur le phénotype

Dans la littérature, il a été déjà montré dans d'autres pathologies que le diabète que le fonds génétique pouvait avoir un effet fort sur le phénotype [93]. Un exemple bien documenté est celui de la mutation murine Apc^{Min} (*multiple intestine neoplasia*) qui affecte le gène *Apc* (*adenomatous polyposis coli*) homologue du gène *APC* de l'homme. Les souris de fonds génétique C57Bl/6 hétérozygotes pour cette mutation développent en moyenne 28 tumeurs intestinales alors que leurs descendants F1 hétérozygotes issus d'un croisement avec la lignée AKR présentent un phénotype atténué (en moyenne 6 tumeurs) [99]. Cette différence de phénotype en relation avec le fonds génétique a permis d'identifier par analyse de liaison un QTL avec un LOD score de 4,7 confirmé par plusieurs rétrocroisements et enfin un gène candidat *PIa2s* (*secretory type II phospholipase A2*) dont l'expression était abrogée dans les lignées sensibles à la maladie [100].

En ce qui concerne l'effet du fonds génétique sur le diabète, de nombreux modèles de souris congéniques ont été utilisés permettant dans certains cas l'identification de gènes modificateurs comme par exemple le gène *Sorcs (sortilin-related VPS10 domain containing receptor 1)* sur le chromosome 19. En effet, *Sorcs1* a été identifié comme le gène responsable de l'association entre le QTL *T2dm2* et l'insulinémie à jeun chez des souris obèses femelles déficientes en leptine issues de croisements entre les lignées C57BL/6 et BTBR T^+ tf/J [101][102]. L'introgression du segment chromosomique de 7 Mb du chromosome 19 de la lignée C57BL/6 dans le fonds génétique BTBR T^+ tf/J reproduit le phénotype avec défaut d'insulino-secrétion et altération de la morphologie des îlots. La production de lignées de

souris sous-congéniques a permis de réduire le segment chromosomique à un intervalle de 242 kb qui comprend le promoteur, le premier exon et une partie du premier intron du gène *Sorcs1*. Ce gène existe chez l'homme et *SORCS1* a été retrouvé comme associé à l'insulinémie à jeun et à l'insulino-sécrétion dans une cohorte d'individus d'origine latino-américaine [103].Comme chez la souris, l'association était plus forte chez les femmes obèses. De plus, dans une seconde cohorte de patients diabétiques, *SORCS1* était également associé au risque de diabète et à l'âge d'apparition de celui-ci chez les femmes. C'est la première fois qu'un gène identifié par un modèle murin a pu être répliqué comme associé au diabète chez l'homme montrant bien que non seulement les modèles murins peuvent permettre l'avancée de nos connaissances dans la physiopathologie du diabète mais que ces mécanismes physiopathologiques identifiés chez la souris peuvent être également impliqués dans le diabète chez l'homme.

Notre stratégie de recherche consistait à croiser les souris F1 129xCBA ou CBAx129 *Hnf1a*$^{+/-}$ résistantes au diabète avec des souris de lignée sensible B6 *Hnf1a*$^{+/-}$ et ainsi produire des N2 *Hnf1a*$^{-/-}$ dont l'hétérogénéité génétique et phénotypique était suffisamment importante pour envisager d'identifier un locus de résistance au diabète par un balayage du génome. Dans notre modèle, le défaut d'expression de *Hnf1a* entraîne un défaut d'insulinosecrétion en dehors de tout contexte d'obésité et il ne s'agit pas de démasquer un locus de susceptibilité au diabète dans des modèles de souris congéniques obèses comme cela a largement déjà été fait [104].

4.2 Les fonds génétiques CBA/JIco et C3H/HeNCrl portent le locus de résistance au diabète

Le fait que les deux lignées congéniques CBA et C3H déficientes en *Hnf1a* présentent la même suppression du phénotype diabétique peut s'expliquer en partie par leur origine. En effet, ces deux lignées dérivent du même croisement entre une femelle Bagg albinos et un mâle DBA en 1928 et elles sont toutes deux élevées au laboratoire Jackson depuis 1948. La souche CBA a été sélectionnée sur la faible incidence de tumeurs mammaires (http://jaxmice.jax.org/strain/000656.html) alors que la souche C3H a été sélectionnée sur la forte incidence de ces tumeurs (http://jaxmice.jax.org/strain/000659.html). Ces tumeurs mammaires ont en fait été reliées à une infection virale dont les souris actuellement commercialisées sont exemptes. Finalement ces deux lignées restent génétiquement très

proches et, en particulier, sont identiques concernant la séquence du locus majeur ModA (séquences de référence disponibles en ligne sur le site de l'Institut Sanger).

4.3 Identification d'un locus de résistance au diabète

Notre modèle de rétrocroisements permettant la ségrégation du phénotype diabétique est relativement classique en dehors du choix de la production de souris « pseudo-N2 » en raison de la vigueur de l'hybride. En effet, les animaux "N2" portent sur tout le génome un allèle B6 (sensible) en regard d'un allèle 129 (sensible) ou CBA (résistant) ou bien encore un allèle recombinant 129/CBA. Ainsi la population de souris N2 présentait une croissance importante avec une ségrégation du phénotype diabétique et nous avons sélectionné les phénotypes les plus clairement identifiés comme sensibles ou résistants au diabète pour le balayage du génome. Le phénotypage a été particulèrement soigneux et orienté par les résultats obtenus dans les archétypes (lignées mutantes pures ou F1). Le choix des puces à haute densité Illumina présentant 1449 SNP a permis d'étudier un nombre conséquent de SNP (707) pour lesquels les séquences de référence étaient différentes entre souches 129 (sensible) et CBA (résistante) permettant d'étudier la contribution allélique de chacune des deux lignées. Le nombre important de SNP mais surtout le phénotypage fin des souris N2 expliquent que le locus ModA ait été identifié avec un LOD score aussi important : au-delà de 20 dans la première analyse chez les 86 souris du balayage du génome avec la puce à ADN Illumina et ensuite au-delà de 30 dans la seconde analyse qui comprenait 26 marqueurs et 55 souris additionnels. Grâce à ce second criblage, le locus majeur identifié sur le chromosome 3 (ModA) a pu être restreint dans son intervalle à environ 8 Mb (intervalle compris entre 27 et 34 Mb avec un intervalle de confiance de 95%). En sus de l'importance du LOD score qui permet d'identifier le QTL avec une certaine probabilité statistique, on peut évaluer la force de l'effet de ce QTL sur le caractère étudié en mesurant la part de la variance génétique qu'il contrôle. Dans notre cas, ce QTL semble très important car il contrôle plus de 60 % de la variance de la moyenne des glycémies à jeun. De plus, grâce à l'analyse des interactions génétiques, nous avons pu observer que présenter un locus $ModA^{B6/CBA}$ est nécessaire mais non suffisant pour que l'ensemble des souris présente un phénotype de résistance au diabète. Ainsi les cinq loci ancillaires identifiés interagissent avec ModA pour conférer la résistance au diabète.

La présence d'un QTL à une position donnée du génome est définie en termes de probabilité avec un certain risque de faux positifs. Plus le LOD score est élevé, plus la probabilité de

présence du QTL à cette position est grande. De plus, même si la position du QTL ne peut être donnée avec certitude et que l'on calcule un intervalle de confiance dont les bornes sont définies en fonction d'un compromis entre une taille raisonnable et un risque d'erreur consenti, la position la plus probable du QTL se trouve au point culminant de la courbe de LOD score (cf. Figure 36). Dans le cas du locus ModA, la présence du gène *Slc2A2* près du pic a retenu notre attention. Ce gène ne fait pas partie des 11 gènes candidats identifiés car il ne porte pas de modifications de SNP non synonymes entre les lignées 129 et CBA selon les séquences de référence disponibles en ligne sur le site de l'Institut Sanger. Cependant, le gène *Slc2A2* code pour la protéine GLUT2 dont l'importance est majeure dans la régulation du métabolisme du glucose dans le pancréas et dans le foie notamment. De plus *Slc2A2* est une cible directe de *Hnf1a* [105][106]. Nous avons écarté une différence d'expression pancréatique de GLUT2 entre souris mutantes sensibles et résistantes au diabète car la déficience en *Hnf1a* supprime l'expression pancréatique de GLUT2 de façon symétrique dans les deux modèles. Le rôle du foie dans le diabète lié à la déficience en *Hnf1a* ne semble pas au premier plan car dans le modèle murin de Lee qui présentait une surexpression d'un dominant négatif de *HNF1A* dans le foie à l'âge adulte, les animaux présentaient un phénotype marqué uniquement par le diabète [74]. Pour cette raison, même si nous ne pouvons pas l'exclure formellement, il nous semble peu probable que la suppression du diabète lié à *Hnf1a* soit en rapport avec un mécanisme hépatique et en particulier à une anomalie de GLUT2 dans le foie.

Une première perspective de travail est l'analyse qualitative et quantitative du transcriptome des pancréas de souris mutantes résistantes et sensibles. Ce travail a déjà débuté au laboratoire mais est rendu difficile par la petite taille des souris et de leur pancréas ainsi que par la présence de quantités de RNases très importantes dans le pancréas. Une fois le protocole d'extraction des ARNm de pancréas mis au point, il sera possible par la technique Solexa d'obtenir des données concernant la séquence de ces ARNm ainsi que de leur niveau d'expression. Ces résultats devraient permettre d'avancer une liste de gènes dont l'expression est modifiée dans le pancréas des souris résistantes par rapport aux sensibles. Cette liste de gènes sera croisée avec les gènes identifiés sur le locus majeur ModA et les cinq loci ancillaires ce qui devrait permettre de restreindre le nombre de gènes candidats et d'avancer dans la connaissance des acteurs de la suppression du phénotype diabétique. Pour confirmer l'éventuelle identification du(des) variant(s) génétique(s) responsable(s) de la suppression du phénotype diabétique, il est possible d'introduire le ou les variant(s) suspecté(s) dans des modèles de souris congéniques sensibles au diabète pour voir si le variant supprime le phénotype malgré l'invalidation du gène *Hnf1a*.

L'utilisation de lignées de souris consomiques pourrait également être une perpective intéressante [107]. En effet, une lignée consomique (Chromosome Substitution Strain) porte un chromosome entier unique du génome donneur sur le fonds génétique du génome receveur. L'existence de ces lignées permettrait par exemple de produire des souris B6 déficientes en *Hnf1a* dont le chromosome 3 aurait été remplacé par un chromosome 3 CBA et d'étudier les souris chez lesquelles ce remplacement induit un phénotype de résistance. Ensuite, les recombinaisons homologues inhérentes aux rétrocroisements entre ces souris consomiques devraient permettre de restreindre l'intervalle du QTL sur le chromosome 3.

4.4 Croissance post-natale normale des îlots beta chez les souris mutantes résistantes au diabète

Dans notre travail, nous n'avons pas observé de modification statistiquement significative de la masse beta-cellulaire avec la déficience en *Hnf1a* même si une tendance à la diminution est observée comme dans ce qui a été publié auparavant [72]. Dans tous les cas, il semble que la résistance au diabète n'est pas associée à une moindre diminution de la masse beta-cellulaire car les résultats sont les mêmes que les souris mutantes soient sensibles ou résistantes au diabète. Par contre, nous avons pu observer que les souris mutantes résistantes au diabète présentent une croissance normale de la taille des îlots beta entre la naissance et J15 alors que ce n'est pas le cas chez les souris mutantes sensibles au diabète. Ce dernier résultat chez les souris mutantes hyperglycémiques avait déjà été montré dans différents modèles d'inactivation du gène *Hnf1a* [72][75]. La préservation de la croissance post-natale des îlots beta chez les souris résistantes pourrait améliorer l'efficience de ces îlots dont on sait que, plus ils contiennent de cellules beta, plus celles-ci sont synchronisées et, l'insulino-secrétion étant pulsatile, plus celles-ci produisent d'insuline pour un même niveau de glycémie [108].

Nous avons montré que cette préservation des îlots de grande taille chez les souris mutantes résistantes n'est pas liée à une différence de développement embryonnaire car elle n'est pas observée à la naissance. A J15, la taille des cellules beta est identique entre les différentes lignées et n'explique donc pas la différence de taille des îlots entre les deux lignées mutantes. Cette croissance normale des îlots malgré la déficience en *Hnf1a* n'est pas non plus due à une augmentation de la prolifération ni à une diminution de l'apoptose dans les cellules beta comme nous l'avons mesuré à J15. Mais, à la naissance, nous avons pu observer qu'il existe un plus grand nombre de cellules beta isolées (cellule unique ou groupement de deux cellules) dans les lignées résistantes et sensibles déficientes en *Hnf1a*. Cette présence accrue de cellules

isolées pourrait permettre chez les souris mutantes résistantes d'accroître l'agrégation de ces cellules pour former des îlots beta. Cette agrégation serait altérée chez les souris mutantes sensibles au diabète qui présentent des îlots de petite taille, plus nombreux et dispersés à J15. Cette hypothèse plaiderait pour un gène modificateur dont l'effet fonctionnel serait de favoriser cette agrégation post-natale des cellules beta entre elles malgré le défaut d'expression de *Hnf1a*. Nous n'avons pas pu montrer la présence d'une éventuelle néogenèse dans nos modèles animaux. Une des limitations de cette expérience est le faible nombre de cellules insulino-positives comptées au sein des cellules ductales. De plus, l'existence d'une néogenèse des cellules beta chez les souris adultes, que ce soit dans notre modèle ou dans des études publiées par d'autres auteurs, reste un phénomène largement débattu au sein de la communaité scientifique [109][110][111].

4.4 Implications de nos résultats dans la variabilité du phénotype MODY3 chez l'homme

Nous avons indiqué plus haut la variabilité phénotypique du MODY3 rencontrée chez l'homme (cf. Introduction). Une partie de cette variabilité est d'origine génétique car nous avons pu établir que des patients porteurs de mutations touchant le domaine de dimérisation ou de liaison à l'ADN de *HNF1A* présentaient un diagnostic sévère de diabète (âge d'apparition précoce). Mais chez des patients porteurs de la même mutation récurrente P291fs ou chez des apparentés présentant la même mutation, le phénotype est également extrêmement variable. Dans un travail d'analyse de liaison dans des familles MODY3, l'âge au diagnostic a été montré comme associé à des QTL, mais aucune de ces régions génétiques humaines identifiées ne correspond aux régions génétiques murines identifiées sur le chromosome 3 et sur les loci ancillaires dans nos résultats [63].

Une perspective de travail serait de rechercher des mutations ou des variations génétiques dans des gènes d'intérêts identifiés par le balayage du génome chez la souris et de regarder s'ils peuvent retarder l'âge au diagnostic chez des probands présentant la même mutation P291fs et/ou chez des apparentés portant la même mutation dans des grandes familles. Le mécanisme impliqué dans la suppression du diabète lié à *Hnf1a* chez la souris et dans l'apparition d'un diabète MODY3 plus tardif chez l'homme pourrait être d'intérêt majeur pour le développement de nouvelles thérapeutiques pour les patients MODY3 mais aussi pour les patients présentant un diabète de type 2.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons montré que des souris congéniques portant la même délétion de *Hnf1a* dans des fonds génétiques différents présentent des phénotypes radicalement opposés. En effet, la déficience en *Hnf1a* conduit à un diabète sévère dans la plupart des lignées telles que 129, B6, BALB/c ou AJ (lignées sensibles). Mais à l'inverse, aucun diabète n'est observé chez les souris congéniques des lignées CBA et C3H malgré le défaut d'expression de *Hnf1a* (lignées résistantes). Par un balayage du génome, nous avons identifié un locus majeur suppresseur du phénotype diabétique au niveau du chromosome 3 qui interagit avec cinq autres loci ancillaires au niveau des chromosomes 4, 11 et 18. De plus, nous avons pu observer que les souris résistantes présentent une croissance normale des îlots beta malgré la déficience en *Hnf1a*, ce qui pourrait expliquer le maintien d'une homéostasie glucidique.

Finalement, notre travail montre que les variations génétiques naturellement présentes dans les lignées de souris de laboratoire peuvent supprimer le phénotype diabétique lié à la déficience en *Hnf1a*. D'une façon plus générale, il est possible que le(s) variant(s) du locus ModA ou des loci ancillaires identifiés comme associés à la suppression du diabète dans notre modèle puissent être associés à une protection vis-à-vis du diabète MODY3 chez l'homme.

Bibliographie

1. Velho G, Froguel P, Clement K, et al. (1992) Primary pancreatic beta-cell secretory defect caused by mutations in glucokinase gene in kindreds of maturity onset diabetes of the young. Lancet 340:444–448.

2. Page R, Hattersley A, Turner R (1992) Beta-cell secretory defect caused by mutations in glucokinase gene. Lancet 340:1162–1163.

3. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, et al. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). Nature 384:455–458. doi: 10.1038/384455a0

4. Timsit J, Bellanné-Chantelot C, Dubois-Laforgue D, Velho G (2005) Diagnosis and management of maturity-onset diabetes of the young. Treat Endocrinol 4:9–18.

5. Colclough K, Saint-Martin C, Timsit J, et al. (2014) Clinical utility gene card for: Maturity-onset diabetes of the young. Eur J Hum Genet. doi: 10.1038/ejhg.2014.14

6. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT (2008) Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 4:200–213. doi: 10.1038/ncpendmet0778

7. Hattersley AT (1998) Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. Diabet Med J Br Diabet Assoc 15:15–24. doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(199801)15:1<15::AID-DIA562>3.0.CO;2-M

8. Klupa T, Skupien J, Malecki MT (2012) Monogenic models: what have the single gene disorders taught us? Curr Diab Rep 12:659–666. doi: 10.1007/s11892-012-0325-0

9. Van de Bunt M, Gloyn AL (2012) A tale of two glucose transporters: how GLUT2 re-emerged as a contender for glucose transport into the human beta cell. Diabetologia 55:2312–2315. doi: 10.1007/s00125-012-2612-3

10. Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT (2008) Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. Diabetologia 51:546–553. doi: 10.1007/s00125-008-0942-y

11. Pearson ER, Flechtner I, Njølstad PR, et al. (2006) Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. N Engl J Med 355:467–477. doi: 10.1056/NEJMoa061759

12. Babenko AP, Polak M, Cavé H, et al. (2006) Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. N Engl J Med 355:456–466. doi: 10.1056/NEJMoa055068

13. McPherson JD, Marra M, Hillier L, et al. (2001) A physical map of the human genome. Nature 409:934–941. doi: 10.1038/35057157

14. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. (2001) The sequence of the human genome. Science 291:1304–1351. doi: 10.1126/science.1058040

15. Grant SFA, Thorleifsson G, Reynisdottir I, et al. (2006) Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. Nat Genet 38:320–323. doi: 10.1038/ng1732

16. Cauchi S, Froguel P (2008) TCF7L2 genetic defect and type 2 diabetes. Curr Diab Rep 8:149–155.

17. Grarup N, Sandholt CH, Hansen T, Pedersen O (2014) Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: from genome-wide association studies to rare variants and beyond. Diabetologia 57:1528–1541. doi: 10.1007/s00125-014-3270-4

18. Billings LK, Florez JC (2010) The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? Ann N Y Acad Sci 1212:59–77. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05838.x

19. Morita K, Saruwatari J, Tanaka T, et al. (2014) Associations between the common HNF1A gene variant p.I27L (rs1169288) and risk of type 2 diabetes mellitus are influenced by weight. Diabetes Metab. doi: 10.1016/j.diabet.2014.04.009

20. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, et al. (2010) Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. Nat Genet 42:579–589. doi: 10.1038/ng.609

21. Elliott P, Chambers JC, Zhang W, et al. (2009) Genetic Loci associated with C-reactive protein levels and risk of coronary heart disease. JAMA J Am Med Assoc 302:37–48. doi: 10.1001/jama.2009.954

22. Reiner AP, Barber MJ, Guan Y, et al. (2008) Polymorphisms of the HNF1A gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha are associated with C-reactive protein. Am J Hum Genet 82:1193–1201. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.03.017

23. Ridker PM, Pare G, Parker A, et al. (2008) Loci related to metabolic-syndrome pathways including LEPR,HNF1A, IL6R, and GCKR associate with plasma C-reactive protein: the Women's Genome Health Study. Am J Hum Genet 82:1185–1192. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.03.015

24. Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, et al. (2009) New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. Nat Genet 41:280–282. doi: 10.1038/ng.307

25. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, et al. (2009) Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. Nat Genet 41:56–65. doi: 10.1038/ng.291

26. SIGMA Type 2 Diabetes Consortium, Estrada K, Aukrust I, et al. (2014) Association of a low-frequency variant in HNF1A with type 2 diabetes in a Latino population. JAMA J Am Med Assoc 311:2305–2314. doi: 10.1001/jama.2014.6511

27. Valette M, Bellisle F, Carette C, et al. (2013) Eating behaviour in obese patients with melanocortin-4 receptor mutations: a literature review. Int J Obes 2005 37:1027–1035. doi: 10.1038/ijo.2012.169

28. Tattersall RB (1974) Mild familial diabetes with dominant inheritance. Q J Med 43:339–357.

29. Tattersall R (1998) Maturity-onset diabetes of the young: a clinical history. Diabet Med J Br Diabet Assoc 15:11–14. doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(199801)15:1<11::AID-DIA561>3.0.CO;2-0

30. Tattersall RB, Fajans SS (1975) A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. Diabetes 24:44–53.

31. Yamagata K, Furuta H, Oda N, et al. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). Nature 384:458–460. doi: 10.1038/384458a0

32. Hansen T, Eiberg H, Rouard M, et al. (1997) Novel MODY3 mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene: evidence for a hyperexcitability of pancreatic beta-cells to intravenous secretagogues in a glucose-tolerant carrier of a P447L mutation. Diabetes 46:726–730.

33. Jeannot E, Mellottee L, Bioulac-Sage P, et al. (2010) Spectrum of HNF1A somatic mutations in hepatocellular adenoma differs from that in patients with MODY3 and suggests genotoxic damage. Diabetes 59:1836–1844. doi: 10.2337/db09-1819

34. HNF1A HNF1 homeobox A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/gene/6927. Accessed 13 Apr 2014

35. Harries LW, Ellard S, Stride A, et al. (2006) Isomers of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. Hum Mol Genet 15:2216–2224. doi: 10.1093/hmg/ddl147

36. Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, et al. (1997) Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor–1α Gene Are a Common Cause of Maturity-Onset Diabetes of the Young in the U.K. Diabetes 46:720–725. doi: 10.2337/diab.46.4.720

37. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, et al. (2010) Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? Diabetologia 53:2504–2508. doi: 10.1007/s00125-010-1799-4

38. Colclough K, Bellanne-Chantelot C, Saint-Martin C, et al. (2013) Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha and 4 alpha in maturity-onset diabetes of the young and hyperinsulinemic hypoglycemia. Hum Mutat 34:669–685. doi: 10.1002/humu.22279

39. Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, et al. (2001) beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. Diabetes 50 Suppl 1:S94–100.

40. Thomas H, Badenberg B, Bulman M, et al. (2002) Evidence for haploinsufficiency of the human HNF1alpha gene revealed by functional characterization of MODY3-associated mutations. Biol Chem 383:1691–1700. doi: 10.1515/BC.2002.190

41. Harries LW, Hattersley AT, Ellard S (2004) Messenger RNA transcripts of the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene containing premature termination codons are subject to nonsense-mediated decay. Diabetes 53:500–504.

42. Ellard S (2000) Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF-1 alpha) mutations in maturity-onset diabetes of the young. Hum Mutat 16:377–385. doi: 10.1002/1098-1004(200011)16:5<377::AID-HUMU1>3.0.CO;2-2

43. Ellard S, Colclough K (2006) Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young. Hum Mutat 27:854–869. doi: 10.1002/humu.20357

44. Kaisaki PJ, Menzel S, Lindner T, et al. (1997) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4. Diabetes 46:528–535.

45. Porter JR, Rangasami JJ, Ellard S, et al. (2006) Asian MODY: are we missing an important diagnosis? Diabet Med J Br Diabet Assoc 23:1257–1260. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01958.x

46. Kagami-Takasugi M, Katsumata N, Tanaka T, et al. (2006) Molecular genetic analysis of MODY candidate genes in Japanese patients with non-obese juvenile onset diabetes mellitus. J Pediatr Endocrinol Metab JPEM 19:143–148.

47. Yorifuji T, Fujimaru R, Hosokawa Y, et al. (2012) Comprehensive molecular analysis of Japanese patients with pediatric-onset MODY-type diabetes mellitus. Pediatr Diabetes 13:26–32. doi: 10.1111/j.1399-5448.2011.00827.x

48. Ikema T, Shimajiri Y, Komiya I, et al. (2002) Identification of three new mutations of the HNF-1 alpha gene in Japanese MODY families. Diabetologia 45:1713–1718. doi: 10.1007/s00125-002-0972-9

49. Xu JY, Chan V, Zhang WY, et al. (2002) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Chinese MODY families: prevalence and functional analysis. Diabetologia 45:744–746. doi: 10.1007/s00125-002-0814-9

50. Xu JY, Dan QH, Chan V, et al. (2005) Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young in Chinese patients. Eur J Hum Genet EJHG 13:422–427. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201347

51. Hwang JS, Shin CH, Yang SW, et al. (2006) Genetic and clinical characteristics of Korean maturity-onset diabetes of the young (MODY) patients. Diabetes Res Clin Pract 74:75–81. doi: 10.1016/j.diabres.2006.03.002

52. Carette C, Dubois-Laforgue D, Saint-Martin C, et al. (2010) Familial young-onset forms of diabetes related to HNF4A and rare HNF1A molecular aetiologies. Diabet Med J Br Diabet Assoc 27:1454–1458.

53. Ellard S, Thomas K, Edghill EL, et al. (2007) Partial and whole gene deletion mutations of the GCK and HNF1A genes in maturity-onset diabetes of the young. Diabetologia 50:2313–2317. doi: 10.1007/s00125-007-0798-6

54. Stern E, Strihan C, Potievsky O, et al. (2007) Four novel mutations, including the first gross deletion in TCF1, identified in HNF-4alpha, GCK and TCF1 in patients with MODY in Israel. J Pediatr Endocrinol Metab JPEM 20:909–921.

55. Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Chauveau D, et al. (2005) Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. Diabetes 54:3126–3132.

56. Carette C, Vaury C, Barthélémy A, et al. (2007) Exonic duplication of the hepatocyte nuclear factor-1beta gene (transcription factor 2, hepatic) as a cause of maturity onset diabetes of the young type 5. J Clin Endocrinol Metab 92:2844–2847. doi: 10.1210/jc.2007-0286

57. Bellanné-Chantelot C, Lévy DJ, Carette C, et al. (2011) Clinical characteristics and diagnostic criteria of maturity-onset diabetes of the young (MODY) due to molecular anomalies of the HNF1A gene. J Clin Endocrinol Metab 96:E1346–1351. doi: 10.1210/jc.2011-0268

58. Stanescu DE, Hughes N, Kaplan B, et al. (2012) Novel presentations of congenital hyperinsulinism due to mutations in the MODY genes: HNF1A and HNF4A. J Clin Endocrinol Metab 97:E2026–2030. doi: 10.1210/jc.2012-1356

59. Snider KE, Becker S, Boyajian L, et al. (2013) Genotype and phenotype correlations in 417 children with congenital hyperinsulinism. J Clin Endocrinol Metab 98:E355–363. doi: 10.1210/jc.2012-2169

60. Proverbio MC, Mangano E, Gessi A, et al. (2013) Whole genome SNP genotyping and exome sequencing reveal novel genetic variants and putative causative genes in congenital hyperinsulinism. PloS One 8:e68740. doi: 10.1371/journal.pone.0068740

61. Bellanné-Chantelot C, Carette C, Riveline J-P, et al. (2008) The type and the position of HNF1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3. Diabetes 57:503–508. doi: 10.2337/db07-0859

62. Klupa T, Warram JH, Antonellis A, et al. (2002) Determinants of the Development of Diabetes (Maturity-Onset Diabetes of the Young-3) in Carriers of HNF-1α Mutations Evidence for parent-of-origin effect. Diabetes Care 25:2292–2301. doi: 10.2337/diacare.25.12.2292

63. Kim S-H, Ma X, Klupa T, et al. (2003) Genetic modifiers of the age at diagnosis of diabetes (MODY3) in carriers of hepatocyte nuclear factor-1alpha mutations map to chromosomes 5p15, 9q22, and 14q24. Diabetes 52:2182–2186.

64. Shankar RK, Ellard S, Standiford D, et al. (2013) Digenic heterozygous HNF1A and HNF4A mutations in two siblings with childhood-onset diabetes. Pediatr Diabetes 14:535–538. doi: 10.1111/pedi.12018

65. Forlani G, Zucchini S, Di Rocco A, et al. (2010) Double heterozygous mutations involving both HNF1A/MODY3 and HNF4A/MODY1 genes: a case report. Diabetes Care 33:2336–2338. doi: 10.2337/dc10-0561

66. Beijers HJBH, Losekoot M, Odink RJ, Bravenboer B (2009) Hepatocyte nuclear factor (HNF)1A and HNF4A substitution occurring simultaneously in a family with maturity-onset diabetes of the young. Diabet Med J Br Diabet Assoc 26:1172–1174. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02855.x

67. Hnf1a HNF1 homeobox A [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/gene/21405. Accessed 13 Apr 2014

68. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, et al. (1996) Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. Cell 84:575–585.

69. Pontoglio M, Prié D, Cheret C, et al. (2000) HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. EMBO Rep 1:359–365. doi: 10.1093/embo-reports/kvd071

70. Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR (1988) Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. Nature 336:348–352. doi: 10.1038/336348a0

71. Capecchi MR (2005) Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. Nat Rev Genet 6:507–512. doi: 10.1038/nrg1619

72. Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, et al. (1998) Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. J Clin Invest 101:2215–2222. doi: 10.1172/JCI2548

73. Lee Y-H, Sauer B, Gonzalez FJ (1998) Laron Dwarfism and Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in the Hnf-1α Knockout Mouse. Mol Cell Biol 18:3059–3068.

74. Lee Y-H, Magnuson MA, Muppala V, Chen S-S (2003) Liver-specific reactivation of the inactivated Hnf-1alpha gene: elimination of liver dysfunction to establish a mouse MODY3 model. Mol Cell Biol 23:923–932.

75. Yamagata K, Nammo T, Moriwaki M, et al. (2002) Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear fctor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes. Diabetes 51:114–123.

76. Hagenfeldt-Johansson KA, Herrera PL, Wang H, et al. (2001) Beta-cell-targeted expression of a dominant-negative hepatocyte nuclear factor-1 alpha induces a maturity-onset diabetes of the young (MODY)3-like phenotype in transgenic mice. Endocrinology 142:5311–5320. doi: 10.1210/endo.142.12.8592

77. Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB (1998) Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. EMBO J 17:6701–6713. doi: 10.1093/emboj/17.22.6701

78. Wang H, Antinozzi PA, Hagenfeldt KA, et al. (2000) Molecular targets of a human HNF1 alpha mutation responsible for pancreatic beta-cell dysfunction. EMBO J 19:4257–4264. doi: 10.1093/emboj/19.16.4257

79. Yang Q, Yamagata K, Fukui K, et al. (2002) Hepatocyte Nuclear Factor-1α Modulates Pancreatic β-Cell Growth by Regulating the Expression of Insulin-Like Growth Factor-1 in INS-1 Cells. Diabetes 51:1785–1792. doi: 10.2337/diabetes.51.6.1785

80. Umeyama K, Watanabe M, Saito H, et al. (2009) Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic-cloned pigs. Transgenic Res 18:697–706. doi: 10.1007/s11248-009-9262-3

81. Hara S, Umeyama K, Yokoo T, et al. (2014) Diffuse Glomerular Nodular Lesions in Diabetic Pigs Carrying a Dominant-Negative Mutant Hepatocyte Nuclear Factor 1-Alpha, an Inheritant Diabetic Gene in Humans. PLoS ONE 9:e92219. doi: 10.1371/journal.pone.0092219

82. Stanescu DE, Hughes N, Kaplan B, et al. (2012) Novel presentations of congenital hyperinsulinism due to mutations in the MODY genes: HNF1A and HNF4A. J Clin Endocrinol Metab 97:E2026–2030. doi: 10.1210/jc.2012-1356

83. Yang Q, Yamagata K, Fukui K, et al. (2002) Hepatocyte nuclear factor-1alpha modulates pancreatic beta-cell growth by regulating the expression of insulin-like growth factor-1 in INS-1 cells. Diabetes 51:1785–1792.

84. Shih DQ, Bussen M, Sehayek E, et al. (2001) Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. Nat Genet 27:375–382. doi: 10.1038/86871

85. Ekholm E, Nilsson R, Groop L, Pramfalk C (2013) Alterations in bile acid synthesis in carriers of hepatocyte nuclear factor 1α mutations. J Intern Med 274:263–272. doi: 10.1111/joim.12082

86. Yamagata K, Yang Q, Yamamoto K, et al. (1998) Mutation P291fsinsC in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1alpha is dominant negative. Diabetes 47:1231–1235.

87. Rose RB, Bayle JH, Endrizzi JA, et al. (2000) Structural basis of dimerization, coactivator recognition and MODY3 mutations in HNF-1alpha. Nat Struct Biol 7:744–748. doi: 10.1038/78966

88. Boj SF, Servitja JM, Martin D, et al. (2009) Functional targets of the monogenic diabetes transcription factors HNF-1alpha and HNF-4alpha are highly conserved between mice and humans. Diabetes 58:1245–1253. doi: 10.2337/db08-0812

89. Frazer KA, Eskin E, Kang HM, et al. (2007) A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. Nature 448:1050–1053. doi: 10.1038/nature06067

90. MPD - Home page ... Mouse Phenome Database at The Jackson Laboratory. http://phenome.jax.org/. Accessed 1 May 2014

91. Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, et al. (2011) Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. Nature 477:289–294. doi: 10.1038/nature10413

92. Montagutelli X, Abitbol M (2004) Utilisation des lignées congéniques chez la souris. MS Médecine Sci 20:887–893.

93. Montagutelli X (2000) Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. J Am Soc Nephrol JASN 11 Suppl 16:S101–105.

94. Smith R, Sheppard K, DiPetrillo K, Churchill G (2009) Quantitative trait locus analysis using J/qtl. Methods Mol Biol Clifton NJ 573:175–188. doi: 10.1007/978-1-60761-247-6_10

95. Bonner-Weir S (2001) beta-cell turnover: its assessment and implications. Diabetes 50 Suppl 1:S20–24.

96. Hughes WE, Elgundi Z, Huang P, et al. (2004) Phospholipase D1 regulates secretagogue-stimulated insulin release in pancreatic beta-cells. J Biol Chem 279:27534–27541. doi: 10.1074/jbc.M403012200

97. Ma W, Park S-Y, Han J-S (2010) Role of phospholipase D1 in glucose-induced insulin secretion in pancreatic Beta cells. Exp Mol Med 42:456–464. doi: 10.3858/emm.2010.42.6.047

98. Smart NG, Apelqvist ÅA, Gu X, et al. (2006) Conditional Expression of Smad7 in Pancreatic β Cells Disrupts TGF-β Signaling and Induces Reversible Diabetes Mellitus. PLoS Biol 4:e39. doi: 10.1371/journal.pbio.0040039

99. Dietrich WF, Lander ES, Smith JS, et al. (1993) Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. Cell 75:631–639.

100. Cormier RT, Hong KH, Halberg RB, et al. (1997) Secretory phospholipase Pla2g2a confers resistance to intestinal tumorigenesis. Nat Genet 17:88–91. doi: 10.1038/ng0997-88

101. Stoehr JP, Nadler ST, Schueler KL, et al. (2000) Genetic obesity unmasks nonlinear interactions between murine type 2 diabetes susceptibility loci. Diabetes 49:1946–1954.

102. Clee SM, Yandell BS, Schueler KM, et al. (2006) Positional cloning of Sorcs1, a type 2 diabetes quantitative trait locus. Nat Genet 38:688–693. doi: 10.1038/ng1796

103. Goodarzi MO, Lehman DM, Taylor KD, et al. (2007) SORCS1: a novel human type 2 diabetes susceptibility gene suggested by the mouse. Diabetes 56:1922–1929. doi: 10.2337/db06-1677

104. Joost H-G, Schürmann A (2014) The genetic basis of obesity-associated type 2 diabetes (diabesity) in polygenic mouse models. Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc. doi: 10.1007/s00335-014-9514-2

105. Shih DQ, Screenan S, Munoz KN, et al. (2001) Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. Diabetes 50:2472–2480.

106. Servitja J-M, Pignatelli M, Maestro MÁ, et al. (2009) Hnf1α (MODY3) Controls Tissue-Specific Transcriptional Programs and Exerts Opposed Effects on Cell Growth in Pancreatic Islets and Liver. Mol Cell Biol 29:2945–2959. doi: 10.1128/MCB.01389-08

107. Nadeau JH, Singer JB, Matin A, Lander ES (2000) Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. Nat Genet 24:221–225. doi: 10.1038/73427

108. Benninger RKP, Piston DW (2014) Cellular communication and heterogeneity in pancreatic islet insulin secretion dynamics. Trends Endocrinol Metab TEM 25:399–406. doi: 10.1016/j.tem.2014.02.005

109. Bonner-Weir S, Guo L, Li W-C, et al. (2012) Islet neogenesis: a possible pathway for beta-cell replenishment. Rev Diabet Stud RDS 9:407–416. doi: 10.1900/RDS.2012.9.407

110. Mezza T, Kulkarni RN (2014) The regulation of pre- and post-maturational plasticity of mammalian islet cell mass. Diabetologia 57:1291–1303. doi: 10.1007/s00125-014-3251-7

111. Xiao X, Chen Z, Shiota C, et al. (2013) No evidence for β cell neogenesis in murine adult pancreas. J Clin Invest 123:2207–2217. doi: 10.1172/JCI66323

Annexe 1- Script développé pour l'analyse des îlots beta et des îlots alpha avec le logiciel ImageJ

```
//Plate-Forme Cochin Imagerie
//05 Aout 2011
//Camille Lebugle
//source : 3 stacks issus de la lame virtuelle.
//Macro : Mesure d'aire de surface d'ilots pancréatiques.
//Pour : Claire Carette (équipe Pontoglio)
//version ImageJ : 1.44f

//------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
--------------------------------
//------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
--------------------------------
//-----------------------------------------------------------------Macros
Analyse des Images-----------------------------------------------------
----------------------
//------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
--------------------------------
//------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
--------------------------------

//Macro permettant de mesurer la surface de deux types cellulaires.
//Cette macro est composée de deux parties. La première est une
détection automatique des cellules. La seconde partie permet une
sélection manuelle spécifique des zones d'intérêt.


macro "Analyse_Clarette Action Tool -
C000C111C222C333C444C555D37D38D39D3aD3bD46D47D48D49D4aD4bD4cD55D56D57D5
8D59D5aD5bD5cD64D65D66D67D68D69D6aD6bD6cD73D74D75D76D77D78D79D7aD7bD7cD
83D84D85D86D87D88D89D8aD8bD8cD93D94D95D96D97D98D99D9aD9bDa3Da4Da5Da6Da7
Da8Da9DaaDb3Db4Db5Db6Db7Db8Dc3Dc4Dc5Dc6Dc7Dd4Dd5" {

// Dans cette première partie, les deux types cellulaires vont être
détectés automatiquement. En entrée, trois canaux sont à ouvrir. Deux
pour les différentes types, et un pour les noyaux.
// Pour rejeter les zones autofluorescentes, une comparaison entre les
canaux des deux types cellulaires est effectuée. Si il y a concordance
dans les objets détectés (colocalisation au moins de 90%) l'objet n'est
pas pris en compte.
// De plus, pour valider les cellules, la présence d'au moins un noyau
est nécéssaire.
// En sortie, une image Contours en RGB est générée. Sur cette image
est représentée de façon binaire chaque objet trouvé. Chaque canal du
RGB correspond à un canal. Le rouge pour la CY3. Le vert pour la GFP et
le bleu pour le DAPI.
```

```
// C'est sur image contours que sera ensuite mesuré les aires pour
chaque cellule.


	requires("1.44f");

	//Mode permettant de ne pas afficher les images lors du
traitement.
	setBatchMode(true);

	//Fermeture de toutes les images déjà ouverte avec ImageJ
	run("Close All");

	//Path des images à ouvrir
	path_cy3=File.openDialog("Ouvrir CY3");
	path_dapi=File.openDialog("Ouvrir DAPI");
	path_gfp=File.openDialog("Ouvrir GFP");


	//Paramètres de la mozaique
	Dialog.create("Paramètres Mozaïque");
	Dialog.addNumber("Nombre de lignes:", 5);
	Dialog.addNumber("Nombre de colonnes:", 9);
	Dialog.show();
	nb_lignes=Dialog.getNumber();
	nb_colonnes=Dialog.getNumber();

	//Paramètres utilisateurs de l'analyse
	Dialog.create("Paramètres de Seuillage");
	Dialog.addNumber("Seuillage Image Vide", 10);
	Dialog.addNumber("Seuil min CY3", 105);
	Dialog.addNumber("Taille min des ilots:", 150);
	Dialog.addNumber("Taille max des ilots:", 0);
	Dialog.addNumber("Seuil min GFP", 100);
	Dialog.addNumber("Taille min GFP:", 10);
	Dialog.addNumber("Seuillage du DAPI:", 192);
	Dialog.addNumber("Taille min des noyaux:", 25);
	Dialog.addNumber("Taille moyenne des noyaux:", 100);
	Dialog.show();
	seuil_histo=Dialog.getNumber();
	seuil_min_cy3=Dialog.getNumber();
	taille_min=Dialog.getNumber();
	taille_max=Dialog.getNumber();
	if(taille_max==0){
		taille_max="Infinity";
	}
	seuil_min_gfp=Dialog.getNumber();
	taille_min_gfp=Dialog.getNumber();
	seuillage_dapi=Dialog.getNumber();
	taille_min_noyaux=Dialog.getNumber();
	taille_noyaux=Dialog.getNumber();

	//Variable pour afficher le temps d'exécution de l'analyse.
	tmps1=getTime();

	//Ouverture des images
	open(path_cy3);
	save_directory=File.directory;
```

```
	rename("CY3");
	id_cy3=getImageID();
	Stack.getDimensions(width, height, channels, slices, frames)
	largeur=width;
	longueur=height;
	num_plane=slices;

	open(path_dapi);
	rename("DAPI");

	open(path_gfp);
	rename("GFP");


	selectWindow("CY3");

	nb_cells=0;

	//Création de la fenêtre qui va permettre de représenter la
position de chaque ilot et de chaque noyaux.
	//On va représenter en gris les cellules alpha, en rouge les ilots
et en bleu les noyaux.
	newImage("Contours", "RGB Black", largeur, longueur, num_plane);

	//-----------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------------
----
	//-----------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------------
----
	//-------------------------------------------------Traitement------
-------------------------------------------------------------------------
	//-----------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------------
----
	//-----------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------------
----

	//On effectue le traitement pour chaque plan.

	for(pos_plane=1;pos_plane<num_plane+1;pos_plane++){

	//for(pos_plane=15;pos_plane<16;pos_plane++){

		// Création des trois images pour dessiner les cellules
alpha, les ilots et les noyaux.
		newImage("Contours_Alpha", "8-bit Black", largeur, longueur,
1);
		newImage("Contours_Ilots", "8-bit Black", largeur, longueur,
1);
		newImage("Contours_Noyaux", "8-bit Black", largeur,
longueur, 1);

		// Vérification de la présence de Tissus dans l'image.
		selectWindow("CY3");
		Stack.setSlice(pos_plane);
		getStatistics(area, mean, min, max, std, histogram);
```

```
		ecart_type_image=std;

		if(ecart_type_image>seuil_histo){


			//Initialisation des variables
			run("Colors...", "foreground=white background=white
selection=yellow");
			run("Select None");
			roiManager("Reset");
			nombre_ilots=0;

			aire_ilots=0;
			aire_alpha=0;
			aire_noyaux=0;
			nb_noyaux=0;

			//Traitement de l'image CY3
			selectWindow("CY3");
			Stack.setSlice(pos_plane);
			duplicate_cmd="title=CY3_Seuillée";
			run("Duplicate...", duplicate_cmd);
			setThreshold(seuil_min_cy3,64000);
			run("Convert to Mask");
			run("Median...", "radius=2");
			run("Dilate", "slice");
			run("Dilate", "slice");
			run("Fill Holes", "slice");
			run("Erode", "slice");
			run("Erode", "slice");
			run("Watershed", "slice");


			//Traitement du stack DAPI.
			selectWindow("DAPI");
			Stack.setSlice(pos_plane);
			duplicate_cmd="title=DAPI_Seuillée";
			run("Duplicate...", duplicate_cmd);
			run("Unsharp Mask...", "radius=3 mask=0.99");
			if(seuillage_dapi==0){
				setAutoThreshold("Huang dark");
			} else {
				setThreshold(seuillage_dapi, 64000);
			}
			run("Convert to Mask");
			run("Fill Holes");
			run("Options...", "iterations=1 count=1 edm=32-bit
do=Open");
			run("Distance Map");
			selectWindow("DAPI_Seuillée");
			close();
			selectWindow("EDM of DAPI_Seuillée");
			getStatistics(area, mean, min, max, std, histogram);
			setThreshold(1,max);
			run("Find Maxima...", "noise=2 output=[Segmented
Particles] above light");
			rename("DAPI_Seuillée");
			selectWindow("EDM of DAPI_Seuillée");
```

```
                close();

                //Traitement de l'image GFP
                selectWindow("GFP");
                Stack.setSlice(pos_plane);
                duplicate_cmd="title=GFP_Seuillée";
                run("Duplicate...", duplicate_cmd);
                setThreshold(seuil_min_gfp,64000);
                run("Convert to Mask");
                run("Median...", "radius=2");
                run("Dilate", "slice");
                run("Dilate", "slice");
                run("Fill Holes", "slice");
                run("Erode", "slice");
                run("Erode", "slice");
                run("Watershed", "slice");


////////////////////////////////////////////////////////////////////
//////://// Analyse sur les cellules beta
////////////////////////////////////////////////////////////////////
//////////////////////

                //Analyse de particule pour trouver les ilots dans
l'image de CY3.
                selectWindow("CY3_Seuillée");
                run("Set Measurements...", "area center redirect=None
decimal=3");
                analyse_cmd="size=" + taille_min + "-" + taille_max + "
circularity=0.00-1.00 show=Nothing clear add";
                run("Analyze Particles...", analyse_cmd);
                nb_analyse_ilot=roiManager("count");

                //Pour chaque ilot trouvé en CY3 on va dupliquer la
sélection sur l'image GFP et lancer une analyse
                //de particule sur l'image. Ensuite on va comparer la
taille de de la structure trouvée en GFP. Si cette structure est
                //supèrieure à 50% de la taille de l'ilot, alors l'ilot
n'en est pas un et n'est pas compté. On vérifie ensuite si l'ilot
trouvé
                //possède bien un noyau. Si ce n'est pas le cas, l'ilot
n'est alors pas compté.

                count_gfp_ilot=nb_analyse_ilot;
                for
(pos_ilots_CY3=0;pos_ilots_CY3<nb_analyse_ilot;pos_ilots_CY3++){

                      aire_ilot_CY3=getResult("Area", pos_ilots_CY3);
                      selectWindow("GFP_Seuillée");
                      roiManager("Select",pos_ilots_CY3);
                      duplicate_cmd="title=GFP_Ilots";
                      run("Duplicate...", duplicate_cmd);
                      run("Clear Outside");
                      run("Select None");

                      //Après avoir dupliqué l'image de la sélection on
réalise une analyse de particule sur l'image.
```

```
                        analyse_cmd="size=0-Infinity circularity=0.00-
1.00 show=Nothing display";
                        run("Analyze Particles...", analyse_cmd);

                        taille_ilot_gfp=0;

                        for
(pos_ilots_GFP=count_gfp_ilot;pos_ilots_GFP<nResults();pos_ilots_GFP++)
{

      taille_ilot_gfp=taille_ilot_gfp+getResult("Area", pos_ilots_GFP);
                        }
                        count_gfp_ilot=nResults();

                        if (taille_ilot_gfp<aire_ilot_CY3*0.9){

                              //Il n'y a donc pas de correspondance en
GFP de l'ilot CY3. On vérifie désormais la présence de noyaux.


                              run("Colors...", "foreground=white
background=white selection=yellow");

                              //On compte désromais le nombre de cellule
dans l'ilot. Pour cela on compte le nombre de noyaux.
                              selectWindow("DAPI_Seuillée");
                              roiManager("Select",pos_ilots_CY3);
                              duplicate_cmd="title=Noyaux_Ilot";
                              run("Duplicate...", duplicate_cmd);
                              run("Clear Outside");
                              run("Select None");

                              analyse_cmd="size=" + taille_min_noyaux +
"-Infinity circularity=0-1 show=Nothing display add";
                              run("Analyze Particles...", analyse_cmd);

                              if(nResults()>count_gfp_ilot){

                                    // Il y a au moins un noyau. C'est
donc bien un ilot.
                                    // Incrémentation du nombre d'ilot et
de la taille des ilots pour la slide.
                                    nombre_ilots=nombre_ilots+1;
                                    aire_ilots=aire_ilots+aire_ilot_CY3;


                                    //On représente sur l'image Contours
pour chaque slide la position de chaque ilot en rouge.
                                    selectWindow("Contours_Ilots");
                                    setBackgroundColor(255, 255, 255);
                                    roiManager("Select",pos_ilots_CY3);
                                    run("Make Inverse");
                                    run("Clear Outside", "slice");

                                    //On mesure ensuite l'aire de tous les
noyaux dans l'ilots.
```

```
                                    //On stock de plus dans
x_rect_ilot_CY3 et y_rect_ilot_CY3 les coordonnées de l'images
dupliquée de l'ilot dans l'image totale.
                                    selectWindow("DAPI_Seuillée");
                                    roiManager("Select",pos_ilots_CY3);
                                    getSelectionBounds(x, y, width,
height);
                                    x_rect_ilot_CY3=x;
                                    y_rect_ilot_CY3=y;
                                    selectWindow("Noyaux_Ilot");



      for(pos_noyaux=nb_analyse_ilot+nb_noyaux;pos_noyaux<roiManager("co
unt");pos_noyaux++){

                                          roiManager("Select",pos_noyaux);
                                          getSelectionBounds(x, y, width,
height);
                                          x_rect_noyau=x;
                                          y_rect_noyau=y;

                                          //On représente sur l'image
Contours pour chaque slide la position de chaque noyau en bleu.
                                          selectWindow("Contours_Noyaux");
                                          setBackgroundColor(255, 255,
255);
                                          roiManager("Select",pos_noyaux);

      setSelectionLocation(x_rect_ilot_CY3+x_rect_noyau,
y_rect_ilot_CY3+y_rect_noyau);
                                          run("Make Inverse");
                                          run("Clear Outside", "slice");
                                          run("Colors...",
"foreground=white background=white selection=yellow");

                                    }

                                    nb_noyaux=nb_noyaux+nResults()-
count_gfp_ilot;
                                    count_gfp_ilot=nResults();
                              }

                              selectWindow("Noyaux_Ilot");
                              close();
                        }
                        selectWindow("GFP_Ilots");
                        close();

                  }
                  run("Select None");

                  roiManager("Reset");

//////////////////////////////////////////////////////////////////////
//// Analyse sur les cellules alpha
//////////////////////////////////////////////////////////////////////
//////////////
```

```
                nb_noyaux=0;

                //Analyse de particule pour trouver les cellules alpha
dans l'image de GFP.
                selectWindow("GFP_Seuillée");
                run("Set Measurements...", "area center redirect=None
decimal=3");
                analyse_cmd="size=" + taille_min_gfp + "-" + taille_max
+ " circularity=0.00-1.00 show=Nothing clear add";
                run("Analyze Particles...", analyse_cmd);
                nb_analyse_alpha=roiManager("count");

                //Pour chaque cellule alpha trouvée en GFP on va
dupliquer la sélection sur l'image CY3 et lancer une analyse
                //de particule sur l'image. Ensuite on va comparer la
taille de de la structure trouvée en CY3. Si cette structure est
                //supèrieure à 50% de la taille de la cellule alpha,
alors la cellule n'en est pas une et n'est pas comptée. On vérifie
ensuite si la cellule trouvée
                //possède bien un noyau. Si ce n'est pas le cas, la
cellule n'est alors pas comptée.

                count_cy3_alpha=nb_analyse_alpha;
                for
(pos_alpha_gfp=0;pos_alpha_gfp<nb_analyse_alpha;pos_alpha_gfp++){

                      aire_alpha_GFP=getResult("Area", pos_alpha_gfp);
                      selectWindow("CY3_Seuillée");
                      roiManager("Select",pos_alpha_gfp);
                      duplicate_cmd="title=CY3_alpha";
                      run("Duplicate...", duplicate_cmd);
                      run("Clear Outside");
                      run("Select None");

                      //Après avoir dupliqué l'image de la sélection on
réalise une analyse de particule sur l'image.
                      analyse_cmd="size=0-Infinity circularity=0.00-
1.00 show=Nothing display";
                      run("Analyze Particles...", analyse_cmd);

                      taille_alpha_cy3=0;

                      for
(pos_alpha_CY3=count_cy3_alpha;pos_alpha_CY3<nResults();pos_alpha_CY3++
){

     taille_alpha_cy3=taille_alpha_cy3+getResult("Area",
pos_alpha_CY3);
                      }
                      count_cy3_alpha=nResults();

                      if (taille_alpha_cy3<aire_alpha_GFP*0.9){

                            //Il n'y a donc pas de correspondance en
CY3 de la cellule GFP. On vérifie désormais la présence de noyaux.
```

```
                              run("Colors...", "foreground=white
background=white selection=yellow");

                              //On compte désromais le nombre de noyaux
dans la cellule.
                              selectWindow("DAPI_Seuillée");
                              roiManager("Select",pos_alpha_gfp);
                              duplicate_cmd="title=Noyaux_Cellule";
                              run("Duplicate...", duplicate_cmd);
                              run("Clear Outside");
                              run("Select None");

                              analyse_cmd="size=" + taille_min_noyaux +
"-Infinity circularity=0-1 show=Nothing display add";
                              run("Analyze Particles...", analyse_cmd);

                              if(nResults()>count_cy3_alpha){

                                    // Il y a au moins un noyau. C'est
donc bien une cellule alpha.

                                    //On représente sur l'image Contours
pour chaque slide la position de chaque cellule en vert.
                                    selectWindow("Contours_Alpha");
                                    setBackgroundColor(255, 255, 255);
                                    roiManager("Select",pos_alpha_gfp);
                                    run("Make Inverse");
                                    run("Clear Outside", "slice");

                                    //On mesure ensuite l'aire de tous les
noyaux dans l'ilots.
                                    //On stock de plus dans
x_rect_cellule_GFP et y_rect_cellule_GFP les coordonnées de l'images
dupliquée de l'ilot dans l'image totale.
                                    selectWindow("DAPI_Seuillée");
                                    roiManager("Select",pos_alpha_gfp);
                                    getSelectionBounds(x, y, width,
height);
                                    x_rect_cellule_GFP=x;
                                    y_rect_cellule_GFP=y;
                                    selectWindow("Noyaux_Cellule");



     for(pos_noyaux=nb_analyse_alpha+nb_noyaux;pos_noyaux<roiManager("c
ount");pos_noyaux++){
                                          roiManager("Select",pos_noyaux);
                                          getSelectionBounds(x, y, width,
height);
                                          x_rect_noyau=x;
                                          y_rect_noyau=y;

                                          //On représente sur l'image
Contours pour chaque slide la position de chaque noyau en bleu.
                                          selectWindow("Contours_Noyaux");
                                          setBackgroundColor(255, 255,
255);
                                          roiManager("Select",pos_noyaux);
```

```
      setSelectionLocation(x_rect_cellule_GFP+x_rect_noyau,
y_rect_cellule_GFP+y_rect_noyau);
                                        run("Make Inverse");
                                        run("Clear Outside", "slice");
                                        run("Colors...",
"foreground=white background=white selection=yellow");

                                  }

                                  nb_noyaux=nb_noyaux+nResults()-
count_cy3_alpha;
                                  count_cy3_alpha=nResults();
                            }

                            selectWindow("Noyaux_Cellule");
                            close();
                      }
                      selectWindow("CY3_alpha");
                      close();

                }
                run("Select None");

                selectWindow("CY3_Seuillée");
                close();
                selectWindow("DAPI_Seuillée");
                close();
                selectWindow("GFP_Seuillée");
                close();
                roiManager("Reset");
          }
          else{


          }

          //Création du merge de l'image contours des trois canaux. Et
on la stocke dans le stack contours.

          run("Merge Channels...", "red=Contours_Ilots
green=Contours_Alpha blue=Contours_Noyaux gray=*None*");
          rename("Merge_Contours");
          selectWindow("Merge_Contours");
          run("Cut");
          selectWindow("Contours");
          Stack.setSlice(pos_plane);
          run("Paste");

          selectWindow("Merge_Contours");
          close();

     }

     //-------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------
-------------------------------------
```

```
      //-------------------------------------------------Enregistrement
de l'image Contours-----------------------------------------------------
--------------------------
      //-----------------------------------------------------------------
-----------------------------------------------------------------------
-----------------------------------


      selectWindow("Contours");

      save_cmd=save_directory + File.separator + "contours.tif";
      saveAs("Tiff", save_cmd);

      run("Clear Results");
      run("Set Measurements...", " redirect=None decimal=3");

      tmps2=getTime();
      deltaT=tmps2-tmps1;
      print("Temps exec en ms : " + deltaT);

      Dialog.create("Analyse Finie");
      Dialog.show();




}


//-----------------------------------------------------------------------
-----------------------------------------------------------------------
---------------------------------
//-----------------------------------------------------------------------
-----------------------------------------------------------------------
---------------------------------
//-------------------------------------------------------------Macros
Sélection ROI-----------------------------------------------------------
-------------------------
//-----------------------------------------------------------------------
-----------------------------------------------------------------------
---------------------------------
//-----------------------------------------------------------------------
-----------------------------------------------------------------------
---------------------------------

macro "Analyse_Ilots Action Tool -
C000C111C222C333C444C555C666C777C888C999CaaaCbbbCcccCdddCeeeCfffD00D01D
02D03D04D05D06D07D08D09D0aD0bD0cD0dD0eD0fD10D11D12D13D14D15D16D17D18D19
D1aD1bD1cD1dD1eD1fD20D21D22D23D24D25D26D27D28D29D2aD2bD2cD2dD2eD2fD30D3
1D32D33D34D35D36D37D38D3cD3dD3eD3fD40D41D42D43D44D45D46D47D4aD4bD4dD4eD
4fD50D51D52D53D54D55D58D59D5aD5bD5dD5eD5fD60D61D62D63D67D68D69D6aD6bD6d
D6eD6fD70D71D72D75D76D77D78D79D7aD7bD7dD7eD7fD80D81D84D85D86D87D88D89D8
aD8bD8dD8eD8fD90D91D93D94D95D96D97D98D99D9aD9bD9dD9eD9fDa0Da1Da4Da5Da6D
a7Da8Da9DaaDadDaeDafDb0Db1Db2Db4Db5Db6Db7Db8Db9DbaDbcDbdDbeDbfDc0Dc1Dc2
Dc4Dc5Dc6Dc7Dc8Dc9DcaDccDcdDceDcfDd0Dd1Dd2Dd6Dd7Dd8DdcDddDdeDdfDe0De1De
2De3De4DeaDebDecDedDeeDefDf0Df1Df2Df3Df4Df5Df6Df7Df8Df9DfaDfbDfcDfdDfeD
ff" {
```

```
//Macro permettant de sélectionner manuellement les zones d'intéret sur
l'image contours. En sortie différent tableaux sont générés pour
représenter les résultats.

	//Fermeture de toutes les images
	run("Close All");

	//-------------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------
-----------------------------------
	//-----------------------------------------------------------
Initialisation des variables-----------------------------------------
---------------------------------
	//-------------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------
-----------------------------------

	roiManager("Reset");

	setForegroundColor(0, 0, 0);

	posIlot=newArray(1);
	posAlpha=newArray(1);
	surfIlots=newArray(1);
	surfAlpha=newArray(1);

	//-------------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------
-----------------------------------
	//-------------------------------------------------------------------
-----Corps de la macro-----------------------------------------------
-------------------------------
	//-------------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------
-----------------------------------


	setBatchMode(false);

	//Path des images à ouvrir
	path_cy3=File.openDialog("Ouvrir CY3");
	path_dapi=File.openDialog("Ouvrir DAPI");
	path_gfp=File.openDialog("Ouvrir GFP");
	path_contours=File.openDialog("Ouvrir l'image Contours");

	Dialog.create("Paramètres Mozaïque");
	Dialog.addNumber("Nombre de lignes:", 0);
	Dialog.addNumber("Nombre de colonnes:", 0);
	Dialog.show();
	nbLignesMozaique=Dialog.getNumber();
	nbColonnesMozaique=Dialog.getNumber();

	Dialog.create("Paramètres Histogramme");
	Dialog.addNumber("Entrer le nombre de catégories pour la
segmentation des cellules beta :", 4);
	Dialog.show();
	nbHisto=Dialog.getNumber() + 1;
```

```
	arrayRepartIlot=newArray(nbHisto);
	histo=newArray(nbHisto);
	Dialog.create("Histogramme Aire Beta");
	for(numColHisto=0;numColHisto<(nbHisto-1);numColHisto++){
		Dialog.addNumber("Surface max de la catégorie " +
(numColHisto+1) + " : ", 0);
	}
	Dialog.show();
	for(numColHisto=0;numColHisto<(nbHisto-1);numColHisto++){
		arrayRepartIlot[numColHisto]=Dialog.getNumber();
	}

	Dialog.create("Paramètres Histogramme");
	Dialog.addNumber("Entrer le nombre de catégories pour la
segmentation des cellules alpha en aire :", 4);
	Dialog.show();
	nbHistoAlpha=Dialog.getNumber() + 1;

	arrayRepartAlpha=newArray(nbHistoAlpha);
	histoAlpha=newArray(nbHistoAlpha);
	Dialog.create("Histogramme Aire Alpha");
	for(numColHistoAlpha=0;numColHistoAlpha<(nbHistoAlpha-
1);numColHistoAlpha++){
		Dialog.addNumber("Surface max de la catégorie " +
(numColHistoAlpha+1) + " : ", 0);
	}
	Dialog.show();
	for(numColHistoAlpha=0;numColHistoAlpha<(nbHistoAlpha-
1);numColHistoAlpha++){
		arrayRepartAlpha[numColHistoAlpha]=Dialog.getNumber();
	}

	Dialog.create("Paramètres Histogramme");
	Dialog.addNumber("Entrer le nombre de catégories pour la
segmentation des ilots :", 4);
	Dialog.show();
	nbHistoIlotTot=Dialog.getNumber() + 1;

	arrayRepartIlotTot=newArray(nbHistoIlotTot);
	histoIlotTot=newArray(nbHistoIlotTot);
	Dialog.create("Histogramme Aire Ilots");
	for(numColHistoIlotTot=0;numColHistoIlotTot<(nbHistoIlotTot-
1);numColHistoIlotTot++){
		Dialog.addNumber("Nombre max de noyaux de la catégorie " +
(numColHistoIlotTot+1) + " : ", 0);
	}
	Dialog.show();
	for(numColHistoIlotTot=0;numColHistoIlotTot<(nbHistoIlotTot-
1);numColHistoIlotTot++){
		arrayRepartIlotTot[numColHistoIlotTot]=Dialog.getNumber();
	}

	open(path_cy3);
	rename("CY3");

	open(path_dapi);
	rename("DAPI");
```

```
	open(path_gfp);
	rename("GFP");

	run("Brightness/Contrast...");
	waitForUser("Réglage Intensité", "Veuillez ajuster le contraste
des différentes images.\nCliquez ensuite sur OK.");

	selectWindow("GFP");
	getMinAndMax(min, max);
	minGFP=min;
	maxGFP=max;

	//-----------------------------------------------------------------
-----------------------------------------------------------------------
---------------------------------------
	//---------------------------------------Création de l'image à 4
Canaux et de la mozaique Contours-------------------------------------
--------------------
	//-----------------------------------------------------------------
-----------------------------------------------------------------------
---------------------------------------

	selectWindow("DAPI");
	run("8-bit");
	run("RGB Color");

	selectWindow("CY3");
	run("8-bit");
	run("RGB Color");

	open(path_contours);
	rename("contours");
	save_directory=File.directory;

	selectWindow("contours");
	Stack.getDimensions(width, height, channels, slices, frames)
	nbSlice=slices;
	//Nombre de colonnes
	longueurImage=width;
	//Nombre de lignes
	largeurImage=height;

	selectWindow("GFP");
	run("8-bit");
	run("RGB Color");


	selectWindow("contours");
	run("Duplicate...", "title=contours_Stack duplicate range=1-" +
nbSlice);


	//run("Stack Combiner", "stack1=[GFP] stack2=[CY3]");
	run("Combine...", "stack1=[GFP] stack2=[CY3]");
	rename("Combined1");


	//run("Stack Combiner", "stack1=[DAPI] stack2=[contours_Stack]");
```

```
	run("Combine...", "stack1=[DAPI] stack2=[contours_Stack]");
	rename("Combined2");

	//run("Stack Combiner", "stack1=[Combined1] stack2=[Combined2]
combine");
	run("Combine...", "stack1=[Combined1] stack2=[Combined2]
combine");
	setBatchMode(false);

	//Mozaique pour sélectionner les ilots.

	selectWindow("contours");
	run("Make Montage...", "columns="+ nbColonnesMozaique +" rows="+
nbLignesMozaique +" scale=1 first=1 last=" + nbSlice + " increment=1
border=0 font=12");
	rename("Montage");
	id_montage=getImageID();
	longueurMozaique=longueurImage*nbColonnesMozaique;
	largeurMozaique=largeurImage*nbLignesMozaique;

	selectWindow("contours");
	close();

	setBatchMode(false);

	//-------------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------------
-------------------------------------
	//-------------------------------------------------------------------
-----Analyse-------------------------------------------------------------
-----------------------------------
	//-------------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------------
-------------------------------------

	run("Colors...", "foreground=white background=white
selection=yellow");
	waitForUser("Sélection des Ilots", "Veuillez sélectionner les
ilots d'intérets à l'aide d'un des outils dessins.\nCliquez sur
\"ctrl+T\" pour ajouter un ilot.\nIl est possible de supprimer les
Ilots sélectionnés.\nPour valider toute la sélection, cliquez sur
OK.");
	nbIlotsSelect=roiManager("count");

	//Fermeture de toutes les images
	run("Close All");

	setBatchMode(true);

	open(path_contours);
	rename("contours");
	//Mozaique que l'on va sauvegarder avec Identifiant des ilots.
	selectWindow("contours");
	run("Make Montage...", "columns="+ nbColonnesMozaique +" rows="+
nbLignesMozaique +" scale=1 first=1 last=" + nbSlice + " increment=1
border=0 font=12");
	rename("Selection Contours");
```

```
	selectWindow("contours");
	run("Split Channels");
	//run("Merge Channels...", "red=[contours (red)] green=*None*
blue=[contours (blue)] gray=*None* keep");
	//run("8-bit");
	//rename("Contours Ilots");

	selectWindow("contours (red)");
	run("8-bit");
	rename("Contours Ilots");
	//close();

	selectWindow("contours (blue)");
	rename("Contours Noyaux");

	selectWindow("contours (green)");
	rename("Contours Alpha");

	run("Set Measurements...", "  center bounding redirect=None
decimal=3");
	IJ.deleteRows(0, 1);

	//-------------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------------
-------------------------------------
	//-------------------------------------------------------------------
Analyse des ilots et des noyaux----------------------------------------
----------------------------
	//-------------------------------------------------------------------
-------------------------------------------------------------------------
-------------------------------------

	// Image vierge où l'on va dessiner les différentes ROI de
l'utilisateur. Chaque ROI à un niveau de gris différent ce qui permet
d'identifier dans quelle
	//ROI se trouvent les ilots.

	newImage("MontageVide", "8-bit Black", longueurMozaique,
largeurMozaique, 1);

	//Tableau pour enregistrer l'aire par Ilot
	surTotIlot=newArray(nbIlotsSelect);
	//Tableau pour enregistrer le nombre de noyau pour chaque Ilot.
	noyauxTotIlots=newArray(nbIlotsSelect);
	//Tableau pour enregistrer l'aire de noyaux pour chaque Ilot.
	aireNoyauxIlots=newArray(nbIlotsSelect);

	//Tableau pour enregistrer l'aire par Cellule Alpha
	surTotAlpha=newArray(nbIlotsSelect);

	//Taille max du rectangle entourant les lilots:
	widthMax=0;
	heightMax=0;

	for(posRoi=0;posRoi<nbIlotsSelect;posRoi++){

		//On initialise l'aire de chaque ilot.
		surTotIlot[posRoi]=0;
```

```
            //On initialise le nombre de noyau de chaque ilot.
            noyauxTotIlots[posRoi]=0;
            //On initialise l'aire de noyau de chaque ilot.
            aireNoyauxIlots[posRoi]=0;

            //On dessine la ROI en incrémentant le niveau de gris
            selectWindow("MontageVide");
            setForegroundColor(posRoi+1, posRoi+1, posRoi+1);
            roiManager("select", posRoi);
            run("Fill", "slice");

            //On écrit le numéro de la ROI dans l'image Selection
Contours.
            IJ.deleteRows(0, 1);
            selectWindow("Selection Contours");
            setForegroundColor(255,255,255);
            roiManager("select", posRoi);
            run("Draw");
            roiManager("Measure");
            posX=getResult("XM",0);
            posY=getResult("YM",0);
            drawStringCmd="" + (posRoi+1) ;
            drawString(drawStringCmd, posX, posY);

            widthIlot=getResult("Width",0);
            heightIlot=getResult("Height",0);
            //Cherche le rectangle le plus grand pour sauvegarder
ensuite les ilots et noyaux dans un hyperstack.
            if(widthIlot>widthMax){
                  widthMax=widthIlot;
            }
            if(heightIlot>heightMax){
                  heightMax=heightIlot;
            }

      }

      selectWindow("Selection Contours");
      save_cmd=save_directory + File.separator +
"selection_contours.tif";
      saveAs("Tiff", save_cmd);
      close();

      run("Select None");
      selectWindow("MontageVide");
      run("Duplicate...", "title=Montage");

      selectWindow("MontageVide");
      close();

      //Création du stack pour enregistrer Ilots+ Noyaux
      run("Hyperstack...", "title=Hyperstack_Ilots_Noyaux type=8-bit
display=Composite width=" + widthMax + " height=" + heightMax + "
channels=2 slices=" + nbIlotsSelect + " frames=1 ");

      //Création du stack pour enregistrer Alpha+ Noyaux
```

```
	run("Hyperstack...", "title=Hyperstack_Alpha_Noyaux type=8-bit
display=Composite width=" + widthMax + " height=" + heightMax + "
channels=2 slices=" + nbIlotsSelect + " frames=1 ");


	//Création d'un montage CY3, GFP et DAPI:

	open(path_cy3);
	rename("CY3");
	run("Make Montage...", "columns="+ nbColonnesMozaique +" rows="+
nbLignesMozaique +" scale=1 first=1 last=" + nbSlice + " increment=1
border=0 font=12");
	rename("MontageCY3");
	resetMinAndMax();
	run("8-bit");
	selectWindow("CY3");
	close();

	open(path_gfp);
	rename("GFP");
	run("Make Montage...", "columns="+ nbColonnesMozaique +" rows="+
nbLignesMozaique +" scale=1 first=1 last=" + nbSlice + " increment=1
border=0 font=12");
	rename("MontageGFP");
	resetMinAndMax();
	run("8-bit");
	selectWindow("GFP");
	close();

	open(path_dapi);
	rename("DAPI");
	run("Make Montage...", "columns="+ nbColonnesMozaique +" rows="+
nbLignesMozaique +" scale=1 first=1 last=" + nbSlice + " increment=1
border=0 font=12");
	rename("MontageDAPI");
	resetMinAndMax();
	run("8-bit");
	selectWindow("DAPI")
	close();

	for(posRoi=0;posRoi<nbIlotsSelect;posRoi++){
		selectWindow("MontageCY3");
		roiManager("select", posRoi);
		duplicate_cmd="title=Cy3_Ilots_Select";
		run("Duplicate...", duplicate_cmd);
		run("Copy");
		selectWindow("Hyperstack_Ilots_Noyaux");
		Stack.setChannel(1);
		Stack.setSlice((posRoi +1));
		run("Paste");

		selectWindow("MontageGFP");
		roiManager("select", posRoi);
		duplicate_cmd="title=GFP_Ilots_Select";
		run("Duplicate...", duplicate_cmd);
		run("Copy");
		selectWindow("Hyperstack_Alpha_Noyaux");
		Stack.setChannel(1);
```

```
            Stack.setSlice((posRoi +1));
            run("Paste");

            selectWindow("MontageDAPI");
            roiManager("select", posRoi);
            duplicate_cmd="title=DAPI_Ilots_Select";
            run("Duplicate...", duplicate_cmd);
            run("Copy");
            selectWindow("Hyperstack_Ilots_Noyaux");
            Stack.setChannel(2);
            Stack.setSlice( (posRoi +1) );
            run("Paste");
            selectWindow("Hyperstack_Alpha_Noyaux");
            Stack.setChannel(2);
            Stack.setSlice( (posRoi +1) );
            run("Paste");

            selectWindow("Cy3_Ilots_Select");
            close();
            selectWindow("DAPI_Ilots_Select");
            close();
      }

      selectWindow("Hyperstack_Ilots_Noyaux");
      save_cmd=save_directory + File.separator + "StackIlotsNoyaux.tif";
      saveAs("Tiff", save_cmd);
      close();

      selectWindow("Hyperstack_Alpha_Noyaux");
      save_cmd=save_directory + File.separator + "StackAlphaNoyaux.tif";
      saveAs("Tiff", save_cmd);
      close();


      //-----------------------------------------------------------------
----------------Selection Ilots----------------------------------------
-----------------------------------


      selectWindow("Contours Ilots");
      setThreshold(1,255);
      run("Set Measurements...", "area center stack redirect=None
decimal=3");
      run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00
show=Nothing display clear stack");

      //aire Totale des Ilots
      aireTotIlots=0;

      //On récupère les infos des ilots, position et aire et on ne garde
que ceux qui sont dans une des ROI dessinées par l'utilisateur.
      for(posIlots=0;posIlots<nResults;posIlots++){

            numSlice=getResult("Slice",posIlots);
            resteCol=(numSlice/nbColonnesMozaique)-
floor(numSlice/nbColonnesMozaique);
            if(resteCol>0){
                  //Cela signifie que l'image ne se trouve pas sur la
dernière colonne.
```

```
                ligneImage=floor(numSlice/nbColonnesMozaique) + 1;

                colonneImage=round(resteCol*nbColonnesMozaique);
          }else{
                //Cela signifie que l'image se trouve sur la dernière
colonne.
                ligneImage=floor(numSlice/nbColonnesMozaique);
                colonneImage=nbColonnesMozaique;
          }
          aireIlot=getResult("Area",posIlots);
          posXmIlot=getResult("XM",posIlots);
          posXmIlot=posXmIlot+(colonneImage-1)*longueurImage;
          posYmIlot=getResult("YM",posIlots);
          posYmIlot=posYmIlot+(ligneImage-1)*largeurImage;

          selectWindow("Montage");
          valuePixel=getPixel(posXmIlot,posYmIlot);
          if(valuePixel>0){
                posIlot=concaArrayNum(posIlot, valuePixel);

                surfIlots=concaArrayNum(surfIlots, aireIlot);
                print("Ilot Nul " +  valuePixel + " aire "+ aireIlot);
                aireTotIlots=aireTotIlots+aireIlot;
                surTotIlot[valuePixel-1]=surTotIlot[valuePixel-
1]+aireIlot;
          }
     }

     sizeArrayIlots=posIlot.length;
     posIlot=endOfArray(posIlot,sizeArrayIlots-1);
     surfIlots=endOfArray(surfIlots,sizeArrayIlots-1);

     selectWindow("Contours Ilots");
     close();

     //-----------------------------------------------------------------
----------------Selection Alpha-----------------------------------------
-----------------------------------

     selectWindow("Contours Alpha");
     setThreshold(1,255);
     run("Set Measurements...", "area center stack redirect=None
decimal=3");
     run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00
show=Nothing display clear stack");

     //aire Totale des cellules Alpha
     aireTotAlpha=0;

     //On récupère les infos des cellules alpha, position et aire et on
ne garde que ceux qui sont dans une des ROI dessinées par
l'utilisateur.
     for(posAl=0;posAl<nResults;posAl++){

          numSlice=getResult("Slice",posAl);
          resteCol=(numSlice/nbColonnesMozaique)-
floor(numSlice/nbColonnesMozaique);
          if(resteCol>0){
```

```
                //Cela signifie que l'image ne se trouve pas sur la
dernière colonne.
                ligneImage=floor(numSlice/nbColonnesMozaique) + 1;

                colonneImage=round(resteCol*nbColonnesMozaique);
          }else{
                //Cela signifie que l'image se trouve sur la dernière
colonne.
                ligneImage=floor(numSlice/nbColonnesMozaique);
                colonneImage=nbColonnesMozaique;
          }
          aireAlpha=getResult("Area",posAl);
          posXmIlot=getResult("XM",posAl);
          posXmIlot=posXmIlot+(colonneImage-1)*longueurImage;
          posYmIlot=getResult("YM",posAl);
          posYmIlot=posYmIlot+(ligneImage-1)*largeurImage;

          selectWindow("Montage");
          valuePixel=getPixel(posXmIlot,posYmIlot);
          if(valuePixel>0){
                posAlpha=concaArrayNum(posAlpha, valuePixel);

                surfAlpha=concaArrayNum(surfAlpha, aireAlpha);
                aireTotAlpha=aireTotAlpha+aireAlpha;
                surTotAlpha[valuePixel-1]=surTotAlpha[valuePixel-
1]+aireAlpha;
          }
     }

     sizeArrayAlpha=posAlpha.length;
     posAlpha=endOfArray(posAlpha,sizeArrayAlpha-1);
     surfAlpha=endOfArray(surfAlpha,sizeArrayAlpha-1);

     selectWindow("Contours Alpha");
     close();


     //-----------------------------------------------------------------
-----------------Selection Noyaux-------------------------------------
---------------------------------

     selectWindow("Contours Noyaux");
     setThreshold(1,255);
     run("Set Measurements...", "area center stack redirect=None
decimal=3");
     run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00
show=Nothing display clear stack");

     //On récupère les infos des ilots, position et aire et on ne garde
que ceux qui sont dans une des ROI dessinées par l'utilisateur.
     for(posNoyaux=1;posNoyaux<nResults;posNoyaux++){

          numSlice=getResult("Slice",posNoyaux);
          resteCol=(numSlice/nbColonnesMozaique)-
floor(numSlice/nbColonnesMozaique);
          if(resteCol>0){
                //Cela signifie que l'image ne se trouve pas sur la
dernière colonne.
```

```
                ligneImage=floor(numSlice/nbColonnesMozaique) + 1;

                colonneImage=round(resteCol*nbColonnesMozaique);
            }else{
                //Cela signifie que l'image se trouve sur la dernière
colonne.
                ligneImage=floor(numSlice/nbColonnesMozaique);
                colonneImage=nbColonnesMozaique;
            }
            posXmIlot=getResult("XM",posNoyaux);
            posXmIlot=posXmIlot+(colonneImage-1)*longueurImage;
            posYmIlot=getResult("YM",posNoyaux);
            posYmIlot=posYmIlot+(ligneImage-1)*largeurImage;

            aireNoyaux=getResult("Area",posNoyaux);

            selectWindow("Montage");
            valuePixel=getPixel(posXmIlot,posYmIlot);
            if(valuePixel>0){
                noyauxTotIlots[valuePixel-1]=noyauxTotIlots[valuePixel-
1]+1;
                aireNoyauxIlots[valuePixel-
1]=aireNoyauxIlots[valuePixel-1]+aireNoyaux;
            }
      }

      selectWindow("Montage");
      close();

      //-------------------------------------------------------------------
-----------------Histogramme de la surface totale des ilots par taille-
-------------------------------------------------------------------


      for(posRoi=0;posRoi<nbIlotsSelect;posRoi++){

            colHistoIlotTot=0;
            if((surTotIlot[posRoi]+surTotAlpha[posRoi])
>arrayRepartIlotTot[colHistoIlotTot]){
                sortie=0;
            }else{
                sortie=1;
            }
            while(sortie==0){
                colHistoIlotTot++;
                if(colHistoIlotTot>nbHistoIlotTot-2){
                      sortie=1;
                }else{
                      if((surTotIlot[posRoi]+surTotAlpha[posRoi])
>arrayRepartIlotTot[colHistoIlotTot]){
                            sortie=0;
                      }else{
                            sortie=1;
                      }
                }
            }
            histoIlotTot[colHistoIlotTot]++;
      }
```

```
      //-----------------------------------------------------------------
-----------------Histogramme des cellules alpha par taille-------------
-------------------------------------------------


      for(posRoi=0;posRoi<nbIlotsSelect;posRoi++){

            colHisto=0;
            if(surTotIlot[posRoi]>0){
                  if(surTotIlot[posRoi] >arrayRepartIlot[colHisto]){
                        sortie=0;
                  }else{
                        sortie=1;
                  }
                  while(sortie==0){
                        colHisto++;
                        if(colHisto>nbHisto-2){
                              sortie=1;
                        }else{
                              if(surTotIlot[posRoi]
>arrayRepartIlot[colHisto]){
                                    sortie=0;
                              }else{
                                    sortie=1;
                              }
                        }
                  }
                  histo[colHisto]++;
            }
      }

      //-----------------------------------------------------------------
-----------------Histogramme des Cellules Alpha par taille-------------
-------------------------------------------------


      for(posRoi=0;posRoi<nbIlotsSelect;posRoi++){

            colHistoAlpha=0;
            if(surTotAlpha[posRoi]>0){
                  if(surTotAlpha[posRoi]
>arrayRepartAlpha[colHistoAlpha]){
                        sortie=0;
                  }else{
                        sortie=1;
                  }
                  while(sortie==0){
                        colHistoAlpha++;
                        if(colHistoAlpha>nbHistoAlpha-2){
                              sortie=1;
                        }else{
                              if(surTotAlpha[posRoi]
>arrayRepartAlpha[colHistoAlpha]){
                                    sortie=0;
                              }else{
                                    sortie=1;
                              }
```

```
                        }
                  }
                  histoAlpha[colHistoAlpha]++;
            }
      }


      //-----------------------------------------------------------------
-----------------------------------------------------------------------
-------------------------------------
      //-------------------------------------------------------
Affichage des Tableau de Résultats-----------------------------------
---------------------------------
      //-----------------------------------------------------------------
-----------------------------------------------------------------------
-------------------------------------


      run("Clear Results");
      run("Set Measurements...", " redirect=None decimal=3");

      title1 = "Résultats Ilots";
      title2 = "[" + title1 + "]";
      title3 = "Résultats Généraux";
      title4 = "[" + title3 + "]";
      title5 = "Histogramme Cellules Beta";
      title6 = "[" + title5 + "]";
      title7 = "Histogramme Cellules Alpha";
      title8 = "[" + title7 + "]";
      title9 = "Histogramme Ilots";
      title10 = "[" + title9 + "]";

      if(isOpen(title1)){
            print(title2, "\\Clear");
      }
      else{
            table_cmd="name=" + title2 + " width=500 height=600";
            run("Table...", table_cmd);
      }
      print(title2, "\\Headings:Num Ilot\tSurface Cellules Beta");
      for(posTable=0;posTable<sizeArrayIlots-1;posTable++){
            print(title2,posIlot[posTable] + "\t" +
surfIlots[posTable]);
      }


      if(isOpen(title3)){
            print(title4, "\\Clear");
      }
      else{
            table_cmd="name=" + title4 + " width=500 height=600";
            run("Table...", table_cmd);
      }
      print(title4, "\\Headings:Num Ilot\tSurface Beta\tSurface
Alpha\tSurface Totale\tNombre Noyaux\tAireTotale Noyaux");
      for(posTable=0;posTable<nbIlotsSelect;posTable++){
            print(title4, (posTable+1) + "\t" +surTotIlot[posTable] +
"\t" +surTotAlpha[posTable] + "\t" + ( surTotIlot[posTable] +
```

```
surTotAlpha[posTable] ) + "\t" + noyauxTotIlots[posTable] + "\t" +
aireNoyauxIlots[posTable]);
      }
      print(title4," " + "\t" + " ");
      print(title4, "Taille Totale Cellules Beta" + "\t" +
aireTotIlots);
      print(title4," " + "\t" + " ");
      print(title4, "Taille Totale Cellules Alpha" + "\t" +
aireTotAlpha);

      if(isOpen(title5)){
            print(title6, "\\Clear");
      }
      else{
            table_cmd="name=" + title6 + " width=500 height=600";
            run("Table...", table_cmd);
      }
      if(arrayRepartIlot[0]>1){
            headerRow="1-" + arrayRepartIlot[0];
      }else{
            headerRow="1";
      }
      for(colHisto=1;colHisto<(nbHisto-1);colHisto++){
            if(arrayRepartIlot[colHisto]>arrayRepartIlot[colHisto-1]
+1){
                  headerRow=headerRow + "\t" + (arrayRepartIlot[colHisto-
1] +1)+ "-" + arrayRepartIlot[colHisto];
            }else{
                  headerRow=headerRow + "\t" + arrayRepartIlot[colHisto];
            }
      }
      headerRow=headerRow + "\t" + ">" + arrayRepartIlot[nbHisto-2];
      print(title6, "\\Headings:" + headerRow);

      row="" + histo[0];
      for(colHisto=1;colHisto<nbHisto;colHisto++){
            row=row + "\t" + histo[colHisto];
      }
      print(title6, row);

      if(isOpen(title7)){
            print(title8, "\\Clear");
      }
      else{
            table_cmd="name=" + title8 + " width=500 height=600";
            run("Table...", table_cmd);
      }
      if(arrayRepartAlpha[0]>1){
            headerRow="1-" + arrayRepartAlpha[0];
      }else{
            headerRow="1";
      }
      for(colHistoAlpha=1;colHistoAlpha<(nbHistoAlpha-
1);colHistoAlpha++){

      if(arrayRepartAlpha[colHistoAlpha]>arrayRepartAlpha[colHistoAlpha-
1] +1){
```

```
                headerRow=headerRow + "\t" +
(arrayRepartAlpha[colHistoAlpha-1] +1)+ "-" +
arrayRepartAlpha[colHistoAlpha];
           }else{
                headerRow=headerRow + "\t" +
arrayRepartAlpha[colHistoAlpha];
           }
     }
     headerRow=headerRow + "\t" + ">" + arrayRepartAlpha[nbHistoAlpha-
2];
     print(title8, "\\Headings:" + headerRow);

     row="" + histoAlpha[0];
     for(colHistoAlpha=1;colHistoAlpha<nbHistoAlpha;colHistoAlpha++){
          row=row + "\t" + histoAlpha[colHistoAlpha];
     }
     print(title8, row);

     if(isOpen(title9)){
          print(title10, "\\Clear");
     }
     else{
          table_cmd="name=" + title10 + " width=500 height=600";
          run("Table...", table_cmd);
     }
     if(arrayRepartIlotTot[0]>1){
          headerRow="1-" + arrayRepartIlotTot[0];
     }else{
          headerRow="1";
     }
     for(colHistoIlotTot=1;colHistoIlotTot<(nbHistoIlotTot-
1);colHistoIlotTot++){

     if(arrayRepartIlotTot[colHistoIlotTot]>arrayRepartIlotTot[colHisto
IlotTot-1] +1){
                headerRow=headerRow + "\t" +
(arrayRepartIlotTot[colHistoIlotTot-1] +1)+ "-" +
arrayRepartIlotTot[colHistoIlotTot];
           }else{
                headerRow=headerRow + "\t" +
arrayRepartIlotTot[colHistoIlotTot];
           }
     }
     headerRow=headerRow + "\t" + ">" +
arrayRepartIlotTot[nbHistoIlotTot-2];
     print(title10, "\\Headings:" + headerRow);

     row="" + histoIlotTot[0];
     for(colHistoIlotTot=1;colHistoIlotTot<nbHistoIlotTot;colHistoIlotT
ot++){
          row=row + "\t" + histoIlotTot[colHistoIlotTot];
     }
     print(title10, row);

     while (nImages>0) {
          selectImage(nImages);
              close();
          }
```

```
      Dialog.create("Analyse Finie");
      Dialog.show();

}




//------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
---
//------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
---
//-----------------------------------------------------------Fonction
Utilisateurs ----------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
--
//------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
---
//------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
------------------------------------------------------------------------
---

function concaArrayArray(Array1, Array2){

      sizeArray1=Array1.length;
      sizeArray2=Array2.length;
      sizeNewArray=sizeArray1+sizeArray2;

      nouveauTableau=newArray(sizeNewArray);
      for(posArray=0;posArray<sizeArray1;posArray++){
            nouveauTableau[posArray]=Array1[posArray];
      }
      for(posArray=0;posArray<sizeArray2;posArray++){
            nouveauTableau[posArray + sizeArray1]=Array2[posArray];
      }

      return nouveauTableau;

}

function concaArrayNum(Array1, Number){
```

```
	sizeArray1=Array1.length;
	sizeNewArray=sizeArray1+1;

	nouveauTableau=newArray(sizeNewArray);
	for(posArray=0;posArray<sizeArray1;posArray++){
		nouveauTableau[posArray]=Array1[posArray];
	}

	nouveauTableau[posArray]=Number;


	return nouveauTableau;

}

function endOfArray(Array1,nbElement){

	Array1=Array.invert(Array1) ;
	Array1=Array.trim(Array1, nbElement);
	Array1=Array.invert(Array1) ;

	return Array1;

}
```

Annexe 2 – Article en cours de préparation

A suppressor locus for *Hnf1a*-diabetes in mice

Miguel A. Garcia-Gonzalez[1,4], Claire Carette[1,5], Magali Chiral[1], Alessia Bagattin[1], Serge Garbay[1], Géraldine Prévost[2], Cécile Madaras[1], Antonia Doyen[3], Michel Leibovici[1], Yann Hérault[2] and Marco Pontoglio[1]

[1]Expression Génique, Développement et Maladies (EGDM) Team, INSERM, U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Institut Cochin, Paris, France

[2]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U964, CNRS UMR7104, Illkirch, France

[3]Génétique des Interactions Macromoléculaires, Institut Pasteur, CNRS UMR3525, Paris, France

[4]Present address: Complexo Hospitalario de Santiago de Compostela (CHUS), Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS), Laboratorio de Nefrología, Grupo de Genética y Biología del Desarrollo de las Enfermedades Renales, Travesía da Choupana s/n, 15706, Santiago de Compostela, España.

[5]Present address: Département de Nutrition, Hôpital Ambroise Paré, AP-HP, Boulogne-Billancourt, France

Correspondence should be addressed to Marco Pontoglio
Tel: +33 1 53 73 27 44
E mail: marco.pontoglio@inserm.fr

Abstract

Hnf1a$^{-/-}$ mice exhibit a severe diabetes mellitus due to a drastic defect in insulin secretion that closely resembles to the phenotype presented by *HNF1A*-MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young type 3 or MODY3) patients. The molecular mechanisms responsible for the diabetes are still poorly understood. MODY3 patients are characterized by a considerable variability in the expressivity and penetrance of the disease suggesting the existence of modifier loci. Here we showed that congenic mice of different genetic backgrounds, carrying the same *Hnf1a* null mutation, presented with drastically different phenotypes. *Hnf1a*-deficiency led to severe diabetes when it was introgressed into 129, B6, BALB/C or A/J genetic backgrounds (sensitive strains). Conversely, when the same null mutation was introgressed into close related CBA or C3H genetic backgrounds, the diabetic phenotype was suppressed (resistant strains). In sensitive strains, pancreatic islets did not increase in size compared to control animals and on the other hand average islet-size growth remained preserved in resistant strains. The genetic variations naturally present in the two resistant strains acted in a dominant way and a genome scan analysis led to the identification of a major suppressor locus on chromosome 3 that accounted for more than 60% of the variance of glycemia. The major locus contained 11 genes with non-synonymous SNPs changes and it interacted with 5 additional ancillary loci on chromosomes 4, 11 and 18. Our study demonstrated that the naturally occurring genetic variation present in distinct mouse laboratory strains is able to suppress the phenotype of a monogenic disorder.

Main text

Introduction

HNF1A-MODY (*HNF1A*-Maturity Onset Diabetes of the Young) also called MODY type 3 (MODY3) is the most prevalent form of monogenic diabetes (1). Clinical presentation is typically close to type 2 diabetes but with a dominant inherited transmission and a young age at diagnosis (2)(3). *HNF1A* gene heterozygous mutations are responsible for the disease that is characterized by an important phenotypic variability (4). Indeed, in the same kindred, patients carrying the very same mutation may develop diabetes already at the end of their childhood whereas other members of the family may develop hyperglycemia only after 50 years of age (4). It has been postulated that these variations may be ascribed to the effect of modifier genes that may modulate the severity of the disease. In fact, a genome scan identified the existence of loci (5p15, 9q22 and 14q24) associated to age at diagnosis in 13 extended MODY3 families (5). One of the limitations of MODY3 human genetics is the fact that the vast majority of *HNF1A* mutations are private usually found in a single family with already described phenotypic correlation with their type and localization (6). To circumvent human genetics limitation, we took advantage of a mouse model that recapitulates the main phenotypic traits of *HNF1A*-MODY.

It has been previously shown that *Hnf1a*$^{-/-}$ mice exhibit a complex set of dysfunctions including a dwarfism and a profound defect in glucose-dependent insulin secretion comparable to that presented by *HNF1A*-MODY patients (7)(8)(9)(10). *Hnf1a*$^{-/-}$ dwarfism in mice is due to a loss of expression of IGF1, a direct target of *Hnf1a* in liver (11). In the kidney, a specific set of sodium dependent co-transporters including *Slc5a2* is defectively expressed leading to renal Fanconi syndrome characterized by massive glucose, phosphate and amino acid urinary wasting (12). In a similar way, *HNF1A*-MODY

patients have a reduced maximal renal reabsorption capacity for glucose (12). In humans, the disease is due to haploinsufficiency (13)(14) whereas both copies of *Hnf1a* gene have to be inactivated in mice to elicit a diabetic phenotype. In *Hnf1a*-deficient mice, a reduced nutrient-induced insulin release has been evidenced and linked to impaired beta islet glycolysis (15). *Hnf1a* deficiency is known to lead to a significant loss of pancreatic expression of numerous genes implicated in glucose homeostasis, such as *Slc2a2* (16)(17)(18). Even if our knowledge of *Hnf1a* target genes has significantly increased in the last twenty years, the molecular mechanisms responsible for the insulin secretion defect have not been completely elucidated yet.

Here we report the drastic effect of the natural occurring genetic variations present in different inbred mouse strains on the diabetic phenotype linked to *Hnf1a*-deficiency. *Hnf1a* inactivation resulted in severe dysfunctions including noteworthy diabetes mellitus and glucosuria in most congenic strains that we have generated including: 129S2/SvPasCrl (129), C57BL/6J@Ico (B6), BALB/cByJIco (BALB/C), and A/J Ola Hsd (A/J) and the corresponding F1. Interestingly, CBA/JIco (CBA), C3H/HeNCrI (C3H), such as F1 animals containing CBA or C3H background, remained healthy and notably normoglycemic without glucosuria throughout their life in spite of the loss of expression of *Hnf1a.* Although there was no significant difference in beta cell mass, resistant 129xCBA $Hnf1a^{-/-}$ mice presented higher proportion of large beta islets than sensitive diabetic 129xB6 $Hnf1a^{-/-}$ mice. A genome wide scan identified a QTL linked to resistant phenotype in $Hnf1a^{-/-}$ N2 progeny resulting from 129xCBA and B6 intercross. This QTL called ModA (for Modifier locus A) mapped to chromosome 3. These results provided evidence that a major locus and several additional loci contain genetic variations that affect the penetrance of the diabetic phenotype linked to *Hnf1a* deficiency. The identification of the molecular mechanisms involved in the suppression of diabetes

related to *Hnf1a* deficiency might shed a novel light on the physiopathology of a still poorly understood disease.

Results

1) **The phenotype of *Hnf1a* deficient mice is profoundly affected by the genetic background.**

It has been previously shown that the lack of *Hnf1a* gene in a mixed genetic background 129 and B6 leads to a complex set of dysfunctions including diabetes mellitus linked to severe insulin secretion defect (7)(8)(9)(10). When we carefully studied the hyperglycemic phenotype in a pure 129S2/SvPasCrl (129) background, we initially observed that homozygous null mice (129 MUT, n=160) were born with a normal glycemia. With the time, these pups gradually developed hyperglycemia with values that exceed 200 mg/dl after weaning occurring at P21 (Figure 1A). From this age (P21), the difference between 129 mutant and wild-type (129 WT, n=54) glycemias was strongly significant (p value=$8.58x10^{-187}$, Student test). In spite of this significant difference, the extent of hyperglycemia was characterized by a non-negligible variability that was illustrated by the fact that a small fraction of 129 mutant mice presented with normal glycemias throughout their life. One of the striking phenotypes also presented by homozygous null mutant mice is the marked defective growth that is known to be, at least in part, explained by the defective expression of IGF1, a direct target of HNF1alpha (11). In addition, the extent of the defective body growth varies considerably from animal to animal (from 5 to 18g), even in the same pure 129 genetic background, indicating that environmental factors can have a dramatically impact on the expressivity of this trait. Interestingly, we could assess a strong positive linear correlation between body growth and hyperglycemia in 129 mutant mice (Pearson R^2>0.50) (Figure 2). In this respect, we

could see that the small fraction of 129 mutant animals that did not reach a body weight of 8g could remain normoglycemic.

In order to assess the possible impact of the genetic background on the onset and the expressivity of the diabetic phenotype we introgressed the *Hnf1a* null mutation into different genetic backgrounds. Our results showed that *Hnf1a* inactivation in pure C57BL/6J@Ico (B6) strain led to a dramatic and drastic perinatal lethality with more than 99% of *Hnf1a*$^{-/-}$ newborns dying in the first 24 hours. In a similar way, the vast majority of BALB/cByJIco (BALB/C), and A/J Ola Hsd (A/J) mice died before weaning (data not shown). Nevertheless, in the small percentage of animals that could survive weaning in all these three strains, we could detect a marked degree of hyperglycemia that was grossly comparable to that observed in the pure 129 strain. On the contrary, CBA/JIco (CBA) and C3H/HeNCrI (C3H) *Hnf1a*$^{-/-}$ congenic mice could survive with a life span comparable to that of 129 strain and surprisingly, we found that in these two strains, the diabetic phenotype was suppressed. Indeed, the glycemias of CBA mutant mice (CBA MUT, n=67) were not significantly different from those of wild-type controls (CBA WT, n=42) across all age ranges (p value>0.05, Student test) (Figure 1B). The diabetes suppression could not be ascribed to a potential residual expression of HNF1alpha in this particular strain since RT-PCR ruled out the existence of any residual level of mRNA for this gene (data not shown).

Since a marked defect in growth could hinder the development of hyperglycemia in 129 mutant mice, we monitored the possible impact of the defective growth in the resistant strains. Our results showed that, on average, CBA mutant mice (CBA MUT, n=13) have a growth comparable to 129 mutant mice (p value=0.64, Student test) ruling out that growth defect might be responsible of the normoglycemia in this strain (Figure 2). Another potentially important consideration was related to the fact that it is known that

HNF1alpha deficiency leads to a dramatic impairment of renal glucose reabsorption with a glucosuria even in normoglycemic conditions (12). In this context, we could not dismiss that a potentially more severe renal glucose loss could have normalized the glycemia of CBA and C3H Hnf1a$^{-/-}$ mice. However, our results showed that glucosuria was not detected in these two resistant strains indicating that the degree of renal glucose loss was not increased (data not shown).

All these results indicated that the genetic variability that is present in the CBA and C3H strains has the ability to suppress the diabetic phenotype elicited by the inactivation of *Hnf1a.*

2) F1 intercrosses revealed that the resistance is inherited as a dominant trait.

In order to characterize the nature of the suppression of the diabetic phenotype, we monitored F1 *Hnf1a*-null mice issued from a cross between resistant and sensitive strains. F1 homozygous mutant animals carrying either B6xCBA (n=9), AJxCBA (n=6) or 129xCBA (n=49) remained normoglycemic after weaning (Figure 3) and presented with low glucosuria (if any). On the contrary, F1 homozygous mutant animals that did not carry resistant background, such as B6x129 (n=9) or AJxB6 (n=16) presented with a clear hyperglycemia accompanied by an important and systematic glucosuria. Similarly to what we observed in pure strains, the body weight was decreased in all F1 mutant animals (Figure 3). Hormonal measurements confirmed that IGF1 serum level was decreased equally in both 129B6 and 129CBA mutant animals (Table 1). The sole significant difference between these last two strains in biochemical and hormonal serum measurements was, as expected, the dosage of the glycemia ($p<0.05$, Student test).

The results that we obtained in these F1 animals indicated that the CBA genetic background contains one or more alleles for modifier loci that act in a dominant way on the suppression of the diabetes mellitus related to *Hnf1a*-deficiency.

3) **Beta cell mass and islet size growth changes**

In order to characterize the nature of the suppression of the diabetic phenotype, we inspected the extent of development of beta cells in the pancreas of resistant and sensitive mice. A histological morphometric analysis was performed at P1.5 and P15. At both ages, we could show that *Hnf1a*-deficient mice had a slight decrease in beta cell mass that, however, was not statistically significant (Figure 4). Remarkably, the extent of this trend was similar in mutant sensitive (129B6 MUT) and resistant (129CBA MUT) mice. As previously shown (9), one of the morphological features of *Hnf1a*-deficiency in mice is the fact that islets tend to be smaller than in wild-type controls. To verify a possible impact of resistance on this feature, we carried out a careful inspection of the apparent size of pancreatic islets in resistant and sensitive mutant mice at P15. Immunofluorescence (IF) experiments on pancreas sections with insulin staining confirmed the fact that the sensitive mutant mice (129B6 MUT) had, on average, smaller beta islets compared to wild-type. In addition, the total number of islets seemed to be increased in the 129B6 MUT mice compared to controls (data not shown). On the contrary, the resistant mutant strain (129CBA MUT) displayed beta islets that were globally similar in number and size to that of both 129B6 and 129CBA wild-type controls (Figures 5 and 6). This preservation of islet-size in resistant mice was quantified by the analysis of the distribution of the population of beta islet expressed as quartile (Figure 6). Each quartile contains islets of increasing size from Q1 to Q4**.** The distribution analysis at P15 indicated that, contrary to sensitive 129B6 mutant mice, resistant 129CBA mutant mice presented with a significant enrichment in beta islets from the last quartile with more than 15 cells. The different size of beta islets observed between mutant sensitive and resistant mice was not due to a different size of the beta cells indicating that the

increased islet-size was due to an increased number of cells that compose islets (data not shown). Finally, the appearance of islets in wild-type animals of the two different backgrounds was not significantly different, indicating that the observed morphological differences were visible only in *Hnf1a*-null mice.

Next we wanted to assess if a possible difference in the balance between proliferation and apoptosis could account for the observed difference in morphology. Our results showed that mutant sensitive mice presented with a significantly increase in both beta-cell proliferation and apoptosis (Figure 7). However, this increase was perfectly comparable to that observed in mutant resistant strain. Interestingly, when we inspected the distribution of beta islet sizes right after birth, (P1.5), we found that mutant sensitive and mutant resistant mice had similar islet morphology (data not shown). These results indicated that the phenotype concerning the apparent large beta islet size observed in resistant mutant mice at P15 is linked to a phenomenon that occurred after birth in post-natal period.

4) The genetic analysis of the resistance to develop diabetes

The diabetes resistant phenotype of *Hnf1a*-deficient animals is observed in F1 animals derived from the crossing of CBA congenic with the sensitive strains such as 129 and B6. These data indicate that one or more CBA modifier alleles have a dominant effect that rescues the diabetic phenotype induced by the lack of HNF1alpha. We hypothesized that these variants must be specific of the CBA genetic background and were not found in the sensitive 129 and B6 mouse strains. In order to identify what chromosomal regions are associated with the resistance to diabetes, we carried out a genetic analysis of the progeny obtained from a backcross. Given the important effect of body growth on the development of diabetes in the sensitive strain, we wanted to improve as much as

possible the heterosis (or hybrid vigor) of the N2 animals that should have segregated the resistant alleles. To this end, we decided to take advantage of an outbreeding enhancement in the backcross scheme. In this way, we backcrossed the initial F1 *Hnf1a*$^{+/-}$ animals (129xCBA) towards a different but nevertheless sensitive strain (*Hnf1a*$^{+/-}$ B6) (Figure 8). Since homozygous *Hnf1a*-deficient mice are sterile, in order to obtain homozygous, we had to mate heterozygous animals. Finally, all N2 mice received a uniform B6 chromosome complement set and, on the other hand, a CBA or 129 or a recombined chromosome set (Figure 8). The backcross generated a population of 2100 mice from either a 129CBAxB6 or B6x129CBA scheme. Among these mice, 530 were homozygous for the *Hnf1a*-null mutation and were phenotyped with respect of body weight growth and glycemia (Figure 9). N2 intensive phenotyping between P25 and P45 included three to four measurements per week of body weight, glycemia and glucosuria and at least 4 fasting glycemia measurements per mouse. Our results revealed that the glycemia of mutant N2 *Hnf1a*$^{-/-}$ mice were quite heterogeneous (Figure 10). Some animals were strictly normoglycemic whereas others developed severe diabetes mellitus. These data suggested that a relatively small number of loci controlled the suppression of the disease and that an approach such as a genome scan could proficiently be used to identify the loci that cosegregate with resistance.

In order to identify the chromosomal regions that cosegregated with normoglycemia in mutant resistant, we selected a population of N2 mice that presented with glycemias at the two extremes of the distribution (Figure 10). Since we knew that hyperglycemia in sensitive strains develops very solidly in mice that had reached a minimal body weight of 8g, we systematically considered mice that had extreme values of glycemia and with a body weight of at least 8g. In the first round, we selected 28 N2 mice that were phenotypically indistinguishable from the corresponding F1 resistant genetic background.

In a similar way, we selected 58 N2 animals that presented with body-weight and glycemic values compatible with those of sensitive F1 strain. In this first set of 86 mice, a first genome scan was performed with the Illumina 1,449 SNPs mouse medium density linkage microarray. This analysis led to the identification of a major QTL for fasting glycemia on chromosome 3 called ModA (Modifier locus A). The statistical analysis found QTL peak at 29.79Mb with a confidence interval between 21.79 and 37.79Mb and LOD score at 20 (confidence interval 95%)(Figure 11). Interestingly, the analysis of the genotype of N2 animals issued from the backcross clearly indicated that all normoglycemic mice had inherited ModA from the CBA strain ($ModA^{CBA/B6}$) and that conversely, all the animals that had ModA inherited from the 129 strain ($ModA^{129/B6}$) were systematically hyperglycemic. However, a considerable number of N2 animals that carried the resistance conferring locus $ModA^{CBA/B6}$ were found hyperglycemic, indicating that the CBA allele of ModA was necessary but not sufficient to completely suppress diabetes. In order to identify the possible additional loci that interacted with ModA to suppress diabetes, we screened the combinatorial distribution of alleles in the whole population of N2 mice that we genotyped. Our results showed that 5 distinct loci interacted in a statistical significant way (Fisher's exact test) with ModA. These loci, called ModB, ModC, ModD, ModE and ModF mapped on chromosomes 4, 4, 11, 11 and 18, respectively. For an example, see (Figure 12). Finally, in N2 mice carrying $ModA^{CBA/B6}$, the global number of CBA ancillary loci allele had a significant effect in glycemia (Figure 13). Conversely, in the N2 animals that inherited a $ModA^{129/B6}$ locus, glycemia was not significantly affected by the presence of the ancillary loci (Figure 13). In order to replicate the first set of results, we further extended our genomic analysis on an additional population of 55 N2 sensitive and resistant mice with 26 of polymorphic markers distributed on ModA and on each of these ancillary loci. When all the data were

pooled, our final LOD score was increased to 32 and the interval was reduced to 27.79-33.86Mb (confidence interval 95%).

5) ModA locus

ModA locus encompasses thousands of SNP variations but finally, using reference sequences available in Mouse Genome Project (https://www.sanger.ac.uk/sanger/Mouse_SnpViewer/rel-1303), only 11 genes presented non-synonymous SNP changes in the resistant CBA strain that were different when compared to the sensitive 129 strain (Table 2).

Interestingly, *Slc2a2* gene is included in the QTL interval with a position close to its peak. Indeed, specific haplotypes for this gene have been found to be strongly associated with fasting glycemia in several genome wide association studies (GWAS) in humans (19)(20). Surprisingly, the resistant and sensitive strains do not differ in any respect in the primary sequence of the protein GLUT2 (No non-synonymous SNP were found between sensitive and resistant strains). This gene has been described as a crucial direct target of HNF1alpha in pancreatic beta cells. Notably, the absence of expression of this gene is thought to dramatically impair glucose sensing of beta cells. When we monitored the expression of this gene in mutant mice by either immunofluorescence (IF) or quantitative PCR (qPCR) experiments at P2, P15 and P28 (Supplemental data), we observed that the expression of this gene progressively declines with the same rate in both sensitive and resistant strains. All these results indicated that it is unlikely that this gene might be able to play any role in the suppression of diabetes in the CBA strain.

Discussion

The first part of the disussion focused on C3H mice models and we do not show any results on C3H. This is a weak point.

I think we have to re-organize the discussion concerning beta cell mass and discussed hypotheses such as fission/fusion, migration and aggregation of islets because even if we do not have any evidence for this it could explain the difference between mutant sensitive and mutant resistant.

In this report, we have shown that the genetic background has a strong impact on the penetrance and expressivity of diabetes related to *Hnf1a*-deficiency. Indeed we found a severe diabetic phenotype in pure 129 mice and opposite phenotype in pure CBA and C3H mice that remained healthy with notably no hyperglycemia and no glucosuria after weaning. The fact that CBA and C3H mutant mice present the same phenotype reinforce the hypothesis of modifier gene(s) because these two strains are genetically very similar since they are coming from the same intercross between a Bagg albinos female and a DBA male in 1928 (http://jaxmice.jax.org). Interestingly it has been shown that the C3H mouse is resistant to streptozotocine-induced diabetes and experimental observations realized in intercrosses between C3H and B6 shown that F1 mice were also resistant (21). The same authors showed that C3H mice were the most glucose tolerant compared to notably B6 mice that were the less glucose tolerant during intra-peritoneal tolerance test amongst several inbred mice, but remarkably fasting glycemia was not different between strains (22). Finally these two reports demonstrated that C3H mice contain modifier gene(s) that protect these mice from hyperglycemia induced either by a glucose-tolerance test or a streptozotocine-induced defect in insulin-secretion. These last results claimed for the fact that glucose-stimulated insulin-secretion is preserved in such C3H mice. Interestingly in other models of diabetic mice such as *Irs2*$^{-/-}$ mice, the severity of diabetes (related to liver insulin-resistance) depends on genetic background such as *Irs2*$^{-/-}$ CBA and B6 mice never developed diabetes although backcrosses with 129 inbred mice increased the prevalence of diabetes in progeny (23). Many congenic mouse model

intercrosses have been used to identify modifier QTL related to diabetes but finally few modifier genes have been precisely identified (24). A rare example is the identification of *Sorcs1* as the gene responsible for the association between the QTL *T2dm2* and fasting insulinemia in leptin-deficient obese female mice which were the progeny of an intercross between B6 and BTBR T^+ tf/J strains (25)(26). In the vast majority of published works, lean mouse strains are used to unmask their susceptibility to diabetes genes by intercrosses with obese or insulin-resistant mice such as *leptin* or *Irs2* deficient mice. Our model is quite different because we used a known lean mouse model of insulin-secretion defect (*Hnf1a* deficient mice) and unmasked a resistance to diabetes QTL in two closely related genetic backgrounds in spite of this *Hnf1a*-deficiency.

We did not evidence any modification of beta cell mass in resistant 129CBA mutant mice but we identified that they displayed a preservation of large beta islets although sensitive 129B6 mutant mice presented smaller and scattered beta islets as we had already published (9). The absence of beta cell mass change could be related to the young age of quantified mice but we made the choice to analyze beta cell mass before weaning (P15) to avoid the possible confounding deleterious effect of hyperglycemia in sensitive mice. The growth preservation leading to large beta islet size in resistant mice seemed to occur in postnatal life since we have shown that it was absent at birth in both mutants. We did not find any implication of modification of either beta cell proliferation or apoptosis. An increase in aggregation of beta cells after birth could explain this growth of large beta islets and this hypothesis is reinforced by the increase of single beta cells at birth in mutant resistant mice. Preliminary results did not permit to identify a possible increase in beta cell neogenesis quantifying insulin-positive beta cells in pancreatic ducts even if the implication of neogenesis in beta islet growth after birth remains controversial (27)(28).

Our genome scan strategy led us to identify the major locus ModA on chromosome 3 encompassing finally eleven candidate genes containing non synonymous SNP changes between resistant and sensitive inbred strains. Finally, we could not precisely identify the gene(s) responsible for the QTL association with fasting glycemia in our model and further studies are needed do identify precisely the genetic variation responsible for the suppression of diabetes. The nature of this genetic variation could shed a novel light for better understanding the mechanism that lead to diabetes related to *Hnf1a*-deficiency. In addition, a better comprehension of this particular form of the disease could be extremely useful in dissecting the molecular mechanisms of human type 2 diabetes in the general population.

Research Design and Methods

1) Production of *Hnf1a*$^{-/-}$ congenic and F1 strains

By repeated backcrossing for more than 10 generations, we have introgressed the same null mutation of *Hnf1a* in several mouse congenic strains: 129S2/SvPasCrl (129), C57BL/6J@Ico (B6), BALB/cByJIco (BALB/C), A/J Ola Hsd (A/J) CBA/JIco (CBA) and C3H/HeNCrI (C3H). All mice were obtained from Charles River Laboratories excepted A/J from Harlan. Since homozygous *Hnf1a*-deficient mice are sterile, heterozygous animals were mated in order to obtain homozygous. Since pure strains are difficult to breed, we chose to study F1 animals such as 129xCBA, 129XB6, B6x129, B6xCBA, A/JxB6, A/JxCBA. Pure and F1 mutant animals were housed in cages at room temperature with a 12h light/dark cycle. Mice were weaned at P21 and given ad libitum access to water and rodent chow that was pulled out 12h before for fasting conditions. Between P3 and P60, we measured body weight, glycemia and glucosuria regularly with 5 measurements per mouse on average including at least 3 in fasting conditions.

Glycemia was measured on tail blood with Accu CHEK Performa glucose meter (Roche). Glucosuria was monitored with Diabur-test 5000 strips (Roche).

2) Mouse genotyping

Tail tips were used for genomic DNA extraction and genotyping at birth. Tail clippings were minced in 50 mM Tris, 100 mM Nacl and 0.5 % Tween and digested overnight with 10 % proteinase K. Then proteinase K was denaturated at 90°C 10 min and PCR was done on the supernatant with a mix of the following primers: *Hnf1a* forward (5'-TACCTGATGGTTGGAGAGGGTC-3'), *Hnf1a* reverse (5'-TGAAGACCACATCTCCTAAGG-3'), *LacZ* forward (5-TCAATCCGCCGTTTGTTCCC-3') and *LacZ* reverse (5'-GCATAACCACCACGCTCATC-3'). Products were electrophoresed on agarose gels. Expected band size was of 532 bp (*LacZ*) in the case of a mutant $Hnf1a^{-/-}$ or 333 bp (*Hnf1a*) in the case of $Hnf1a^{+/+}$. For more convenient reading in main text and figures, we used the following abbreviations: MUT for $Hnf1a^{-/-}$ and WT for $Hnf1a^{+/+}$.

3) Beta cell mass quantification and islet size distribution

Three males were processed for each of the following strains: 129xB6 WT, 129xB6 MUT, 129xCBA WT and 129xCBA MUT. Glycemia, glucosuria and total body weight in non fasting conditions were determined before sacrificing by cervical dislocation. A first set of animals was aged of P15 and a second set of P1.5 i.e. 12 animals per set or 24 animals in total. Pancreata were dissected, weighed and fixed in paraformaldehyde 4% overnight and then processed for paraffin sections. Pancreata were oriented such that the sections were cut along the head-tail axis. Serial sections of paraffin block were executed each 5 µm and 3 sections were deposed on each numbered slide. We selected slides for immunostaining every 15 slides such as there were around 250 µm between each stained slides. Slides were deparaffinized in xylene, rehydrated through a graded washes of

alcohol in water, ending in H_2O before staining for insulin (pure polyclonal guinea pig anti insulin, Dako) and DAPI. Then one pancreas section of each stained slide was chosen to be scanned using a fluorescence confocal microscope (Leica Microsystems). The overall images were stitched using MetaMorph software (Universal Imaging Corp., USA) to reconstitute a unique pancreas section. Each pancreas section was analyzed with ImageJ software (http://imagej.nih.gov/ij/) to quantify beta cell area (outlined with insulin staining) and total tissue area (outlined with DAPI staining) (script for ImageJ developed by Camille Lebugle, Cellular Imaging Platform, Cochin Institute, Paris, France). Beta cell mass was estimated by the following formula: beta cell mass = (beta cell area / total tissue area) x pancreas weight (29). All sections were read and analyzed by the same observer. Islet area data of all mice were extracted and analyzed with Microsoft Excel software. First, we did analysis of the distribution in quartiles of all the islet area results and then looked for the percentage of islets in each islet area quartile. Then, we did again analysis of the distribution in sub-quartiles of the fourth quartile (Q4) and looked for the percentage of islets in each islet area sub-quartile. Results are expressed as mean ± SD. We searched for statistical differences in means between sensitive and resistant mutant mice using ANOVA test. Differences were considered significant at $p<0.05$.

4) Apoptosis and proliferation index in beta cells and DBA-insulin co-staining in duct cells

We used unstained slides from pancreas serial sections that have been initially prepared for beta cell mass quantification at P15. For each mouse (n=12), we chose the pancreas slide just next to the one that contained the greatest area of beta islets in order to have sufficient beta cells to count. In brief, the sections were deparaffinized and rehydrated in graded alcohols. Transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining was performed on pancreatic sections using the in situ cell death detection kit according to the

manufacturer's instructions (Roche); slides were incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase and fluorescein-dUTP for 60 minutes at 37°C in darkness. Rabbit anti-Ki67 (Novocastra) was used to measure proliferation index after unmasking by citrate. Fluorescein DBA (Dolichos Biflorus Agglutinin) was used to identify pancreatic duct cells (Vector Laboratories). Beta cells were identified by co-staining with guinea pig anti insulin (Dako). Each slide was scanned using fluorescence microscope (Axiovert 200M, Zeiss) and Metamorph software. Quantitative data were obtained manually using the cell counter plugin in ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html). From 600 to 1200 insulin-positive cells were counted on each pancreas section to assess the percentage of TUNEL or Ki67 positive cells among insulin-positive cells. All sections were read and analyzed by one observer. All data are means ± SD. We searched for statistical differences using Student test. Differences were considered significant at $p<0.05$.

5) Biochemical and hormonal measurements in serum

Five male animals were selected from each following strain: 129xB6 WT, 129xB6 MUT, 129xCBA WT and 129xCBA MUT. Mice were sacrificed 1 week after weaning between P28 and P33 in fasting conditions. Blood was collected by cardiac or inferior vena cava puncture after deep anesthesia (xylazine and ketamine). Serum samples (200 µl) were frozen at -80°C and then send to the clinical chemistry department in Mouse Clinical Institute (Strasbourg, France) for biochemical and hormonal measurements. All data are means ± SD. We searched for statistical differences using Student test. Differences were considered significant at $p<0.05$.

6) Breeding and phenotyping N2 mutant animals

Firstly we have intercrossed congenic CBA *Hnf1a*$^{+/-}$ mice with 129 *Hnf1a*$^{+/-}$ and obtained the corresponding F1 animal set. In a second step, we have backcrossed the F1 129CBA

Hnf1a$^{+/-}$ mice with B6 *Hnf1a*$^{+/-}$ mice and produced a N2 generation of 2,100 mice in a total of 24 months long breeding program. As expected, we observed 530 mutant animals within all N2 (25%). Both male and female mutant animals were housed in cages at room temperature with a 12h light/dark cycle. They were weaned at P21 and given ad libitum access to water and rodent chow that was pulled out 12h before measurement in fasting conditions. Between P25 and P45, intensive phenotyping included three to four measurements per week of body weight, glycemia and glucosuria. At least two glycemia measurements per week were done in fasting conditions to obtain at least 4 fasting glycemia measurements per mouse. Glycemia was measured on tail blood with Accu CHEK Performa glucose meter (Roche). Glucosuria was monitored with Diabur-test 5000 strips (Roche). At P45, mice were sacrificed in fasting conditions; tails were stored at -80°C and pancreas, liver and spleen were dissected under stereoscope on ice and stored in RNA-later stabilization solution (Ambion, Life technologies) at -20°C for further studies.

7) Genome scan

Genomic DNA was extracted from spleen or liver stored in RNA-later stabilization solution. A genome scan was performed on the most resistant and sensitive 86 N2 mutant mice using a panel of 1,449 polymorphic SNPs available in the Illumina medium density linkage panel. Half of the SNPs (n=707) are different between 129 and CBA strain allowing discriminating allelic contribution of each strain. SNP genotyping was carried out on the *Integragen Illumina* microarray *platform* (*Evry, France*). A second set of 55 resistant and sensitive N2 mutant animals were manually genotyped for 26 polymorphic markers selected in the major and minor QTL regions. Statistical analyses were performed with J/QTL for R software.

8) Genetic interaction analysis

We tested for genetic interactions between the major QTL and the rest of the genotyped SNPs that permits allelic discrimination between 129 and CBA. We built contingency tables with SNP data (identified as 129 or CBA) and phenotype data (identified as sensitive or resistant) and used Fischer's exact test for statistical significance (p value <0.05).

9) Identification of candidate genetic variations

Non-synonymous SNPs, deletions/insertions and structural variants were bioinformatically searched for sensitive and resistant strains in the QTL interval region with publicly available SNP data from the last version of the Mouse Genomes Project (https://www.sanger.ac.uk/sanger/Mouse_SnpViewer/rel-1303) (30). Non-synonymous SNPs were selected if they were annotated as leading to stop codon gain or loss, frameshift or missense variant. Candidate genes were studied individually by selective bibliography notably with NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/).

Acknowledgments: Camille Lebugle and Pierre Bourdoncle, Cellular Imaging Platform, Cochin Institute, Paris, France; Marie-France Champy, Mouse Clinical Institute, Strasbourg, France. Claire Carette received a grant from Société Française de Diabétologie (SFD) and a grant from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) for this work. ANR

References:

1. **Pearson ER, Velho G, Clark P, Stride A, Shepherd M, Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, Froguel P, Hattersley AT.** beta-cell genes and diabetes: quantitative and qualitative differences in the pathophysiology of hepatic nuclear factor-1alpha and glucokinase mutations. *Diabetes* 2001;50(suppl 1):S101.
2. **Murphy R, Ellard S, Hattersley AT.** Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4(4):200–213.

3. **Ellard S, Bellanné-Chantelot C, Hattersley AT.** Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetologia* 2008;51(4):546–553.
4. **Bellanné-Chantelot C, Lévy DJ, Carette C, Saint-Martin C, Riveline J-P, Larger E, Valéro R, Gautier J-F, Reznik Y, Sola A, Hartemann A, Laboureau-Soares S, Laloi-Michelin M, Lecomte P, Chaillous L, Dubois-Laforgue D, Timsit J.** Clinical characteristics and diagnostic criteria of maturity-onset diabetes of the young (MODY) due to molecular anomalies of the HNF1A gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96(8):E1346–1351.
5. **Kim S-H, Ma X, Klupa T, Powers C, Pezzolesi M, Warram JH, Rich SS, Krolewski AS, Doria A.** Genetic modifiers of the age at diagnosis of diabetes (MODY3) in carriers of hepatocyte nuclear factor-1alpha mutations map to chromosomes 5p15, 9q22, and 14q24. *Diabetes* 2003;52(8):2182–2186.
6. **Bellanné-Chantelot C, Carette C, Riveline J-P, Valéro R, Gautier J-F, Larger E, Reznik Y, Ducluzeau P-H, Sola A, Hartemann-Heurtier A, Lecomte P, Chaillous L, Laloi-Michelin M, Wilhem J-M, Cuny P, Duron F, Guerci B, Jeandidier N, Mosnier-Pudar H, Assayag M, Dubois-Laforgue D, Velho G, Timsit J.** The type and the position of HNF1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3. *Diabetes* 2008;57(2):503–508.
7. **Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, Yaniv M.** Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 1996;84(4):575–585.
8. **Dukes ID, Sreenan S, Roe MW, Levisetti M, Zhou YP, Ostrega D, Bell GI, Pontoglio M, Yaniv M, Philipson L, Polonsky KS.** Defective pancreatic beta-cell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1alpha-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 1998;273(38):24457–24464.
9. **Pontoglio M, Sreenan S, Roe M, Pugh W, Ostrega D, Doyen A, Pick AJ, Baldwin A, Velho G, Froguel P, Levisetti M, Bonner-Weir S, Bell GI, Yaniv M, Polonsky KS.** Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 1998;101(10):2215–2222.
10. **Pongratz RL, Kibbey RG, Kirkpatrick CL, Zhao X, Pontoglio M, Yaniv M, Wollheim CB, Shulman GI, Cline GW.** Mitochondrial dysfunction contributes to impaired insulin secretion in INS-1 cells with dominant-negative mutations of HNF-1alpha and in HNF-1alpha-deficient islets. *J. Biol. Chem.* 2009;284(25):16808–16821.
11. **Lee Y-H, Sauer B, Gonzalez FJ.** Laron Dwarfism and Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in the Hnf-1α Knockout Mouse. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18(5):3059–3068.
12. **Pontoglio M, Prié D, Cheret C, Doyen A, Leroy C, Froguel P, Velho G, Yaniv M, Friedlander G.** HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep.* 2000;1(4):359–365.
13. **Thomas H, Badenberg B, Bulman M, Lemm I, Lausen J, Kind L, Roosen S, Ellard S, Hattersley AT, Ryffel GU.** Evidence for haploinsufficiency of the human HNF1alpha gene revealed by functional characterization of MODY3-associated mutations. *Biol. Chem.* 2002;383(11):1691–1700.
14. **Harries LW, Hattersley AT, Ellard S.** Messenger RNA transcripts of the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene containing premature termination codons are subject to nonsense-mediated decay. *Diabetes* 2004;53(2):500–504.
15. **Dukes ID, Sreenan S, Roe MW, Levisetti M, Zhou Y-P, Ostrega D, Bell GI, Pontoglio M, Yaniv M, Philipson L, Polonsky KS.** Defective Pancreatic β-Cell Glycolytic Signaling in Hepatocyte Nuclear Factor-1α-deficient Mice. *J. Biol. Chem.* 1998;273(38):24457–24464.

16. **Shih DQ, Screenan S, Munoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, Polonsky KS, Stoffel M.** Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes* 2001;50(11):2472–2480.
17. **Boj SF, Parrizas M, Maestro MA, Ferrer J.** A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98(25):14481–14486.
18. **Servitja J-M, Pignatelli M, Maestro MÁ, Cardalda C, Boj SF, Lozano J, Blanco E, Lafuente A, McCarthy MI, Sumoy L, Guigó R, Ferrer J.** Hnf1α (MODY3) Controls Tissue-Specific Transcriptional Programs and Exerts Opposed Effects on Cell Growth in Pancreatic Islets and Liver. *Mol. Cell. Biol.* 2009;29(11):2945–2959.
19. **Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, Wheeler E, Glazer NL, Bouatia-Naji N, Gloyn AL, Lindgren CM, Mägi R, Morris AP, Randall J, Johnson T, Elliott P, Rybin D, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Henneman P, Grallert H, Dehghan A, Hottenga JJ, Franklin CS, Navarro P, Song K, Goel A, Perry JRB, Egan JM, Lajunen T, Grarup N, Sparsø T, Doney A, Voight BF, Stringham HM, Li M, Kanoni S, Shrader P, Cavalcanti-Proença C, Kumari M, Qi L, Timpson NJ, Gieger C, Zabena C, Rocheleau G, Ingelsson E, An P, O'Connell J, Luan J, Elliott A, McCarroll SA, Payne F, Roccasecca RM, Pattou F, Sethupathy P, Ardlie K, Ariyurek Y, Balkau B, Barter P, Beilby JP, Ben-Shlomo Y, Benediktsson R, Bennett AJ, Bergmann S, Bochud M, Boerwinkle E, Bonnefond A, Bonnycastle LL, Borch-Johnsen K, Böttcher Y, Brunner E, Bumpstead SJ, Charpentier G, Chen Y-DI, Chines P, Clarke R, Coin LJM, Cooper MN, Cornelis M, Crawford G, Crisponi L, Day INM, de Geus EJC, Delplanque J, Dina C, Erdos MR, Fedson AC, Fischer-Rosinsky A, Forouhi NG, Fox CS, Frants R, Franzosi MG, Galan P, Goodarzi MO, Graessler J, Groves CJ, Grundy S, Gwilliam R, Gyllensten U, Hadjadj S, Hallmans G, Hammond N, Han X, Hartikainen A-L, Hassanali N, Hayward C, Heath SC, Hercberg S, Herder C, Hicks AA, Hillman DR, Hingorani AD, Hofman A, Hui J, Hung J, Isomaa B, Johnson PRV, Jørgensen T, Jula A, Kaakinen M, Kaprio J, Kesaniemi YA, Kivimaki M, Knight B, Koskinen S, Kovacs P, Kyvik KO, Lathrop GM, Lawlor DA, Le Bacquer O, Lecoeur C, Li Y, Lyssenko V, Mahley R, Mangino M, Manning AK, Martínez-Larrad MT, McAteer JB, McCulloch LJ, McPherson R, Meisinger C, Melzer D, Meyre D, Mitchell BD, Morken MA, Mukherjee S, Naitza S, Narisu N, Neville MJ, Oostra BA, Orrù M, Pakyz R, Palmer CNA, Paolisso G, Pattaro C, Pearson D, Peden JF, Pedersen NL, Perola M, Pfeiffer AFH, Pichler I, Polasek O, Posthuma D, Potter SC, Pouta A, Province MA, Psaty BM, Rathmann W, Rayner NW, Rice K, Ripatti S, Rivadeneira F, Roden M, Rolandsson O, Sandbaek A, Sandhu M, Sanna S, Sayer AA, Scheet P, Scott LJ, Seedorf U, Sharp SJ, Shields B, Sigurethsson G, Sijbrands EJG, Silveira A, Simpson L, Singleton A, Smith NL, Sovio U, Swift A, Syddall H, Syvänen A-C, Tanaka T, Thorand B, Tichet J, Tönjes A, Tuomi T, Uitterlinden AG, van Dijk KW, van Hoek M, Varma D, Visvikis-Siest S, Vitart V, Vogelzangs N, Waeber G, Wagner PJ, Walley A, Walters GB, Ward KL, Watkins H, Weedon MN, Wild SH, Willemsen G, Witteman JCM, Yarnell JWG, Zeggini E, Zelenika D, Zethelius B, Zhai G, Zhao JH, Zillikens MC, DIAGRAM Consortium, GIANT Consortium, Global BPgen Consortium, Borecki IB, Loos RJF, Meneton P, Magnusson PKE, Nathan DM, Williams GH, Hattersley AT, Silander K, Salomaa V, Smith GD, Bornstein SR, Schwarz P, Spranger J, Karpe F, Shuldiner AR, Cooper C, Dedoussis GV, Serrano-Ríos M, Morris AD, Lind L, Palmer LJ, Hu FB, Franks PW, Ebrahim S, Marmot M, Kao WHL, Pankow JS, Sampson MJ, Kuusisto J, Laakso M, Hansen T, Pedersen O, Pramstaller PP, Wichmann HE, Illig T, Rudan I, Wright AF, Stumvoll M, Campbell H, Wilson JF, Anders Hamsten on behalf of Procardis Consortium, MAGIC investigators, Bergman RN, Buchanan TA, Collins FS, Mohlke KL, Tuomilehto J, Valle TT, Altshuler D, Rotter JI, Siscovick DS, Penninx**

BWJH, Boomsma DI, Deloukas P, Spector TD, Frayling TM, Ferrucci L, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, van Duijn CM, Aulchenko YS, Cao A, Scuteri A, Schlessinger D, Uda M, Ruokonen A, Jarvelin M-R, Waterworth DM, Vollenweider P, Peltonen L, Mooser V, Abecasis GR, Wareham NJ, Sladek R, Froguel P, Watanabe RM, Meigs JB, Groop L, Boehnke M, McCarthy MI, Florez JC, Barroso I. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* 2010;42(2):105–116.

20. **Scott RA, Lagou V, Welch RP, Wheeler E, Montasser ME, Luan J, Mägi R, Strawbridge RJ, Rehnberg E, Gustafsson S, Kanoni S, Rasmussen-Torvik LJ, Yengo L, Lecoeur C, Shungin D, Sanna S, Sidore C, Johnson PCD, Jukema JW, Johnson T, Mahajan A, Verweij N, Thorleifsson G, Hottenga J-J, Shah S, Smith AV, Sennblad B, Gieger C, Salo P, Perola M, Timpson NJ, Evans DM, Pourcain BS, Wu Y, Andrews JS, Hui J, Bielak LF, Zhao W, Horikoshi M, Navarro P, Isaacs A, O'Connell JR, Stirrups K, Vitart V, Hayward C, Esko T, Mihailov E, Fraser RM, Fall T, Voight BF, Raychaudhuri S, Chen H, Lindgren CM, Morris AP, Rayner NW, Robertson N, Rybin D, Liu C-T, Beckmann JS, Willems SM, Chines PS, Jackson AU, Kang HM, Stringham HM, Song K, Tanaka T, Peden JF, Goel A, Hicks AA, An P, Müller-Nurasyid M, Franco-Cereceda A, Folkersen L, Marullo L, Jansen H, Oldehinkel AJ, Bruinenberg M, Pankow JS, North KE, Forouhi NG, Loos RJF, Edkins S, Varga TV, Hallmans G, Oksa H, Antonella M, Nagaraja R, Trompet S, Ford I, Bakker SJL, Kong A, Kumari M, Gigante B, Herder C, Munroe PB, Caulfield M, Antti J, Mangino M, Small K, Miljkovic I, Liu Y, Atalay M, Kiess W, James AL, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Palmer CNA, Doney ASF, Willemsen G, Smit JH, Campbell S, Polasek O, Bonnycastle LL, Hercberg S, Dimitriou M, Bolton JL, Fowkes GR, Kovacs P, Lindström J, Zemunik T, Bandinelli S, Wild SH, Basart HV, Rathmann W, Grallert H, DIAbetes Genetics Replication and Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium, Maerz W, Kleber ME, Boehm BO, Peters A, Pramstaller PP, Province MA, Borecki IB, Hastie ND, Rudan I, Campbell H, Watkins H, Farrall M, Stumvoll M, Ferrucci L, Waterworth DM, Bergman RN, Collins FS, Tuomilehto J, Watanabe RM, de Geus EJC, Penninx BW, Hofman A, Oostra BA, Psaty BM, Vollenweider P, Wilson JF, Wright AF, Hovingh GK, Metspalu A, Uusitupa M, Magnusson PKE, Kyvik KO, Kaprio J, Price JF, Dedoussis GV, Deloukas P, Meneton P, Lind L, Boehnke M, Shuldiner AR, van Duijn CM, Morris AD, Toenjes A, Peyser PA, Beilby JP, Körner A, Kuusisto J, Laakso M, Bornstein SR, Schwarz PEH, Lakka TA, Rauramaa R, Adair LS, Smith GD, Spector TD, Illig T, de Faire U, Hamsten A, Gudnason V, Kivimaki M, Hingorani A, Keinanen-Kiukaanniemi SM, Saaristo TE, Boomsma DI, Stefansson K, van der Harst P, Dupuis J, Pedersen NL, Sattar N, Harris TB, Cucca F, Ripatti S, Salomaa V, Mohlke KL, Balkau B, Froguel P, Pouta A, Jarvelin M-R, Wareham NJ, Bouatia-Naji N, McCarthy MI, Franks PW, Meigs JB, Teslovich TM, Florez JC, Langenberg C, Ingelsson E, Prokopenko I, Barroso I.** Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nat. Genet.* 2012;44(9):991–1005.

21. **Kaku K, McGill J, Province M, Permutt MA.** A single major gene controls most of the difference in susceptibility to streptozotocin-induced diabetes between C57BL/6J and C3H/HeJ mice. *Diabetologia* 1989;32(10):716–723.

22. **Kaku K, Fiedorek FT, Province M, Permutt MA.** Genetic analysis of glucose tolerance in inbred mouse strains. Evidence for polygenic control. *Diabetes* 1988;37(6):707–713.

23. **Terauchi Y, Matsui J, Suzuki R, Kubota N, Komeda K, Aizawa S, Eto K, Kimura S, Nagai R, Tobe K, Lienhard GE, Kadowaki T.** Impact of genetic background and

ablation of insulin receptor substrate (IRS)-3 on IRS-2 knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 2003;278(16):14284–14290.
24. **Joost H-G, Schürmann A.** The genetic basis of obesity-associated type 2 diabetes (diabesity) in polygenic mouse models. *Mamm. Genome* 2014. doi:10.1007/s00335-014-9514-2.
25. **Stoehr JP, Nadler ST, Schueler KL, Rabaglia ME, Yandell BS, Metz SA, Attie AD.** Genetic obesity unmasks nonlinear interactions between murine type 2 diabetes susceptibility loci. *Diabetes* 2000;49(11):1946–1954.
26. **Clee SM, Yandell BS, Schueler KM, Rabaglia ME, Richards OC, Raines SM, Kabara EA, Klass DM, Mui ET-K, Stapleton DS, Gray-Keller MP, Young MB, Stoehr JP, Lan H, Boronenkov I, Raess PW, Flowers MT, Attie AD.** Positional cloning of Sorcs1, a type 2 diabetes quantitative trait locus. *Nat. Genet.* 2006;38(6):688–693.
27. **Bonner-Weir S, Guo L, Li W-C, Ouziel-Yahalom L, Lysy PA, Weir GC, Sharma A.** Islet neogenesis: a possible pathway for beta-cell replenishment. *Rev Diabet Stud* 2012;9(4):407–416.
28. **Xiao X, Chen Z, Shiota C, Prasadan K, Guo P, El-Gohary Y, Paredes J, Welsh C, Wiersch J, Gittes GK.** No evidence for β cell neogenesis in murine adult pancreas. *J. Clin. Invest.* 2013;123(5):2207–2217.
29. **Bonner-Weir S.** beta-cell turnover: its assessment and implications. *Diabetes* 2001;50 Suppl 1:S20–24.
30. **Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, White MA, Wong K, Yalcin B, Heger A, Agam A, Slater G, Goodson M, Furlotte NA, Eskin E, Nellåker C, Whitley H, Cleak J, Janowitz D, Hernandez-Pliego P, Edwards A, Belgard TG, Oliver PL, McIntyre RE, Bhomra A, Nicod J, Gan X, Yuan W, van der Weyden L, Steward CA, Bala S, Stalker J, Mott R, Durbin R, Jackson IJ, Czechanski A, Guerra-Assunção JA, Donahue LR, Reinholdt LG, Payseur BA, Ponting CP, Birney E, Flint J, Adams DJ.** Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature* 2011;477(7364):289–294.

Tables

Table 1. Biochemical and hormonal measurements in serum of sensitive and resistant mice. Blood of five mice were sampled 1 week after weaning in fasting conditions for each following strain: 129B6 WT and MUT and 129CBA WT and MUT. All data are mean +/- SD. We searched for statistical differences using Student test. Differences were considered significant at $p<0.05$. Significant results are in bold. NS means Non Significant ($p>0.05$).

	129B6 WT (n=5)	129B6 MUT (n=5)	129CBA WT (n=5)	129CBA MUT (n=5)	p 129B6MUT vs 129B6WT	p 129CBAMUT vs 129B6MUT
Body weight (g)	**19.0 +/- 1.9**	**11.2 +/- 3.1**	**18.4 +/- 2.5**	**9.7 +/- 1.4**	**0.017**	NS
Fasting glucose (mmol/L)	**12.4 +/- 3.6**	**22.2 +/- 4.0**	**12.3 +/- 2.6**	**10.8 +/- 3.0**	**0.014**	**0.010**
Total cholesterol (mmol/L)	2.28 +/- 0.16	3.80 +/-1.34	2.54 +/- 0.34	4.79 +/- 1.05	NS	NS
Triglycerides (mmol/L)	0.56 +/- 0.17	0.81 +/-0.30	0.58 +/- 0.13	0.47 +/- 0.26	NS	NS
Creatinine (µmol/L)	10.5 +/- 2.9	9.8 +/- 2.4	10.5 +/- 2.2	13.3 +/- 6.8	NS	NS
IGF-1 (ng/mL)	**409.6 +/- 57.4**	**115.3 +/- 55.9**	**456.6 +/- 99.0**	**99.4 +/- 26.8**	**0.003**	NS

Table 2: List of ModA locus genes carrying non synonymous SNP changes between CBA and 129 strains. Non-synonymous SNPs, deletions/insertions and structural variants were bioinformatically searched for sensitive and resistant strains in the QTL interval region with publicly available SNP data from the last version of the Mouse Genomes Project (mmp10).

Gene name	Gene description	Location	db SNP	CBA allele	Codon change	Amino acid change	Change description
Pld1	Phospholipase D1	28,048,083	rs29602715	G	Cgg/Ggg	R/G	Missense variant
Gm1527	Predicted gene 1527	28,895,732	rs50586704	A	cGt/cAt	R/H	Missense variant
Egfem1	EGF-like and EMI domain containing 1	29,648,265	rs29790718	G	aCt/aGt	T/S	Missense variant
		29,686,728	rs30410185	C	gTt/gCt	V/A	Missense variant
Mecom	MDS1 and EVI1 complex locus	30,238,240	rs47702462	C	gTt/gCt	V/A	Missense variant
Gm10258	Predicted gene 10258	30,268,666	rs29809455	G	Atc/Gtc	I/V	Missense variant
Lrrc31	Leucine rich repeat containing 31	30,689,871	rs37203180	A	Tca/Aca	S/T	Missense variant
Samd7	Sterile alpha motif domain containing 7	30,756,487	rs31381373	G	Aca/Gca	T/A	Missense variant
Kcnmb3	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 3	32,473,689	rs29858283	T	aCc/aTc	T/I	Missense variant
Usp13	Ubiquitin specific peptidase 13	32,902,049	rs29854159	T	aCg/aTg	T/M	Missense variant
Pex5l	Peroxisomal biogenesis factor 5-like	32,956,647	rs29869735	A	aGa/aAa	R/K	Missense variant
Ttc14	Tetratricopeptide repeat domain 14	33,800,535	rs49858437	C	Atg/Ctg	M/L	Missense variant
		33,801,070	rs51789388	G	gaC/gaG	D/E	Missense variant

Figure legends

Figures

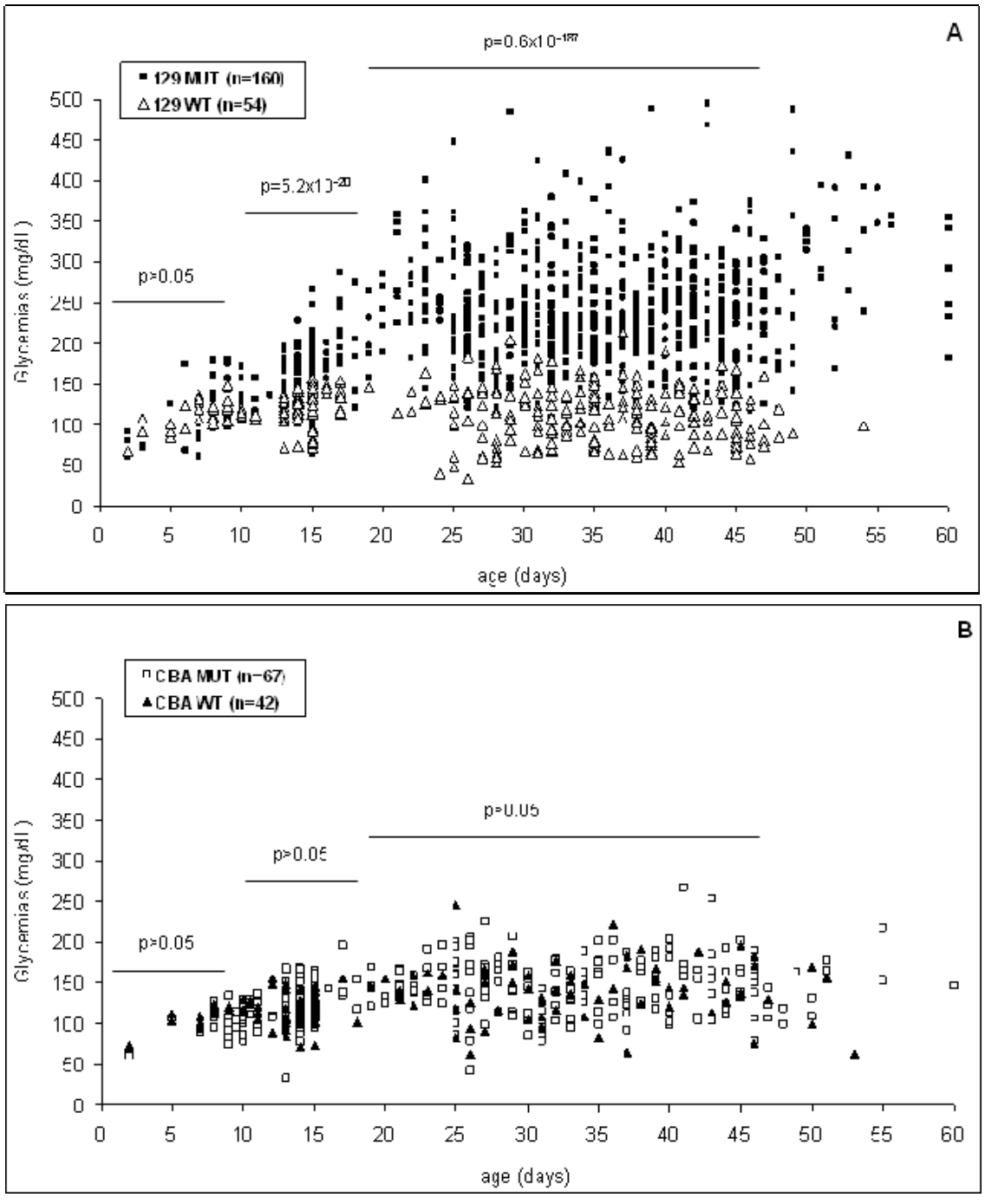


Figure 1: Evolution of glycemia with time in 129 and CBA Hnf1a$^{-/-}$ mice. Panel A: Glycemia increased with time in 129 mutant mice (129 MUT, filled squares). These mice were sensitive to diabetes with glycemias exceeding 200 mg/dL after weaning (P21) in most of them. By contrary, wild-type mice (129 WT, unfilled triangles) remained normoglycemic. **Panel B: CBA mutant (CBA MUT, unfilled squares) mice are resistant to diabetes.** CBA mutant mice remained normoglycemic (<200mg/dL) in spite of ageing. We measured more than 5 glycemias per mouse in a total of 323 129 and CBA mice from P3 until P60. Each pattern is a measurement. n=number of phenotyped mice for each strain. Student test was used to compare mutant to resistant in each figure for three ranges of ages: <10 days, 10-21 days and > 21 days. p value was considered as significant when<0.05.

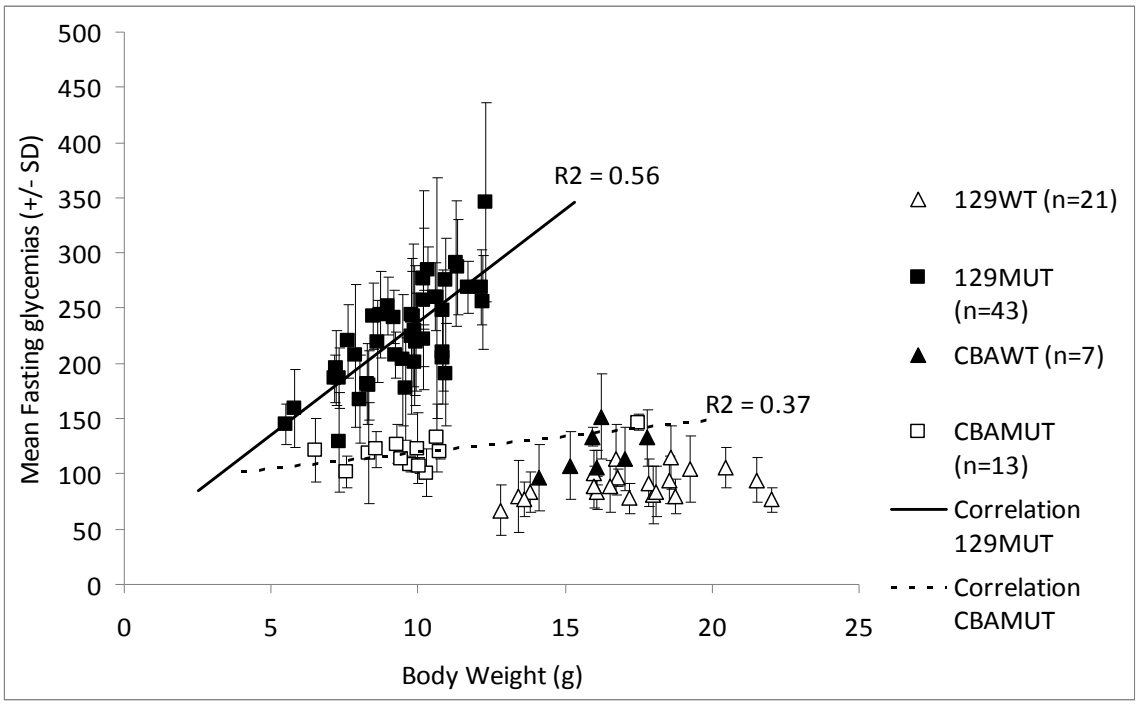


Figure 2: The phenotype is affected by the body weight in sensitive mutant mice. 129 MUT mice (filled squares) are hyperglycemic while CBA MUT mice (unfilled squares) remain normoglycemic with fasting glycemias close to 129 WT and CBA WT ones (unfilled and filled triangles respectively). The two types of mutant presented a reduced body weight compared with wild-type and a strong linear correlation between glycemia and body weight is observed in sensitive mutant mice (129 MUT) (Pearson R^2=0.56). The linear correlation is not significant in resistant mice (CBA MUT) (Pearson R^2=0.37). Fasting glycemias were measured after weaning from P25 to P45 with at least 3 fasting measurements for each mouse. Data are mean +/- standard deviation. n=number of phenotyped mice for each strain.

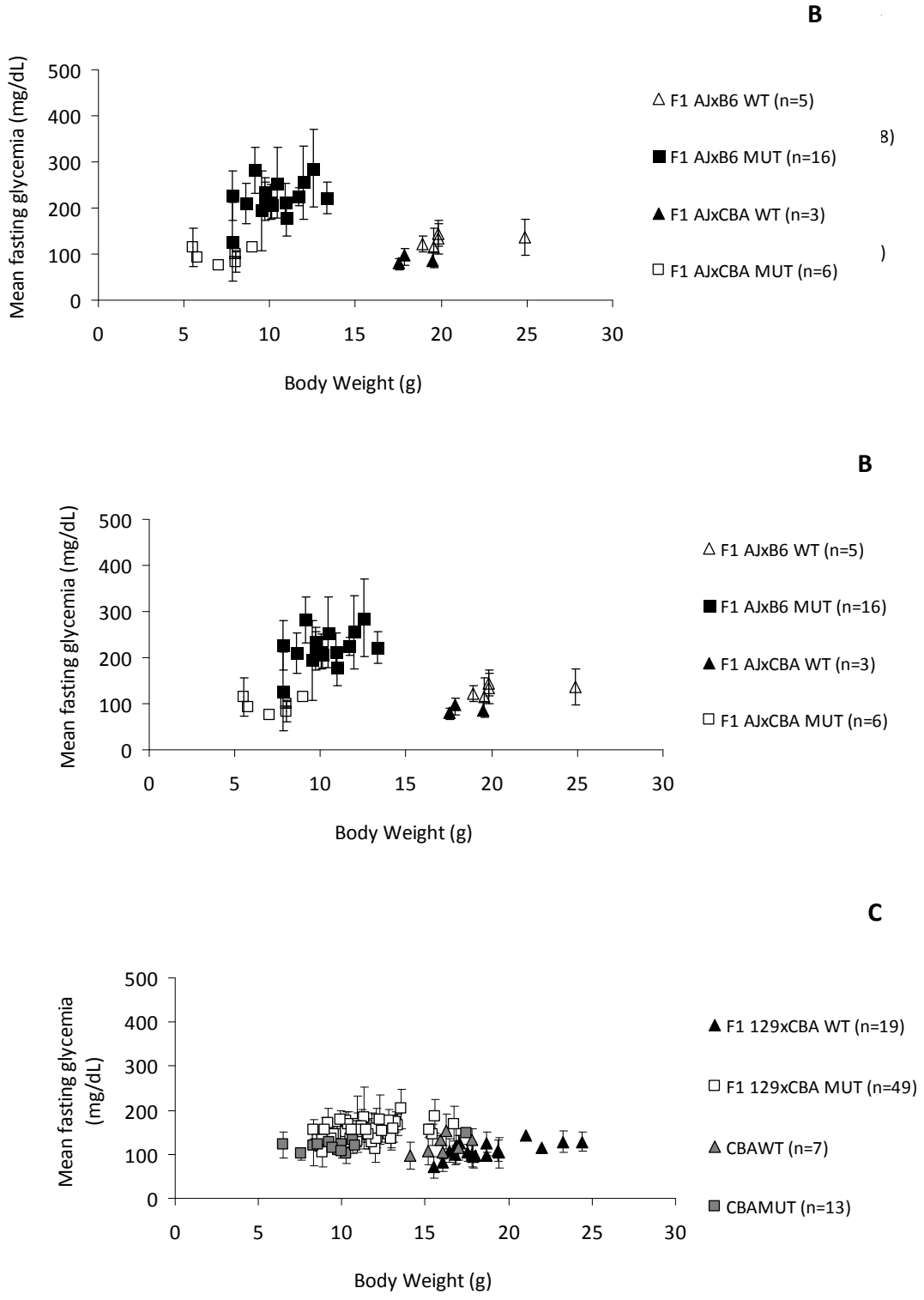


Figure 3: F1 mice containing CBA genetic background remained normoglycemic after weaning. F1 homozygous mutant animals carrying a CBA background (B6xCBA-Panel A, AJxCBA-Panel B and 129xCBA-Panel C, unfilled squares in all charts) were normoglycemic after weaning. By contrast F1 homozygous mutant animals B6x129 and AJxB6 (black filled squares) had a clear hyperglycemia. Even if all the mutant mice presented a reduced body weight compared with wild-type (Panel A, B and C), body weight was increased in F1 129xCBA mice compared with pure CBA (grey filled squares) (Panel C). Data are mean +/- standard deviation. n=number of phenotyped mice for each strain. Conditions for fasting glycemia measurements were as in Figure 2.

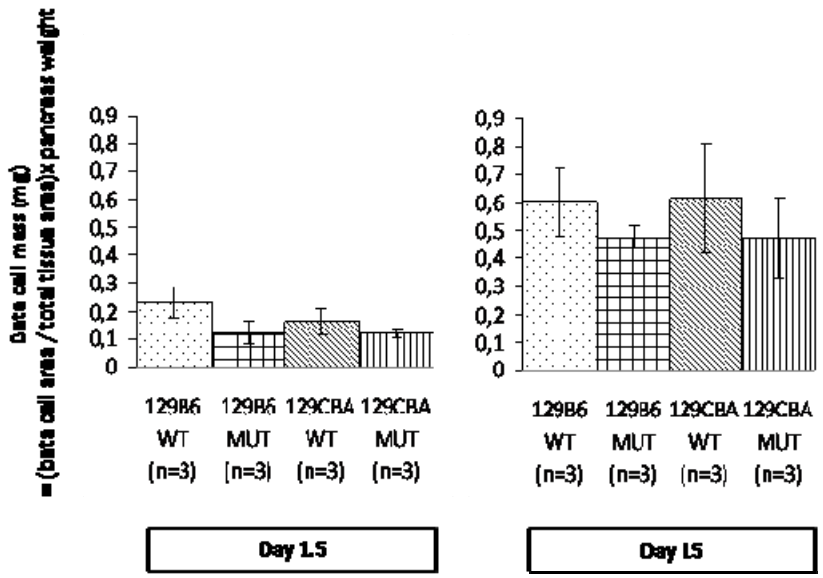


Figure 4: Beta cell mass is not significantly different between 129B6 mutant and 129CBA mutant mice at at P1.5 and before weaning at P15. For each genotype, pancreas sections were stained for insulin and DAPI and resulting pictures were analyzed with a script developed for ImageJ to quantify beta cell area (outlined with insulin staining) and total tissue area (outlined with DAPI staining). Beta cell mass was estimated by the following formula: beta cell mass = (beta cell area / total tissue area) x pancreas weight. Results are expressed as mean ± SD. n=number of mice used for each strain.

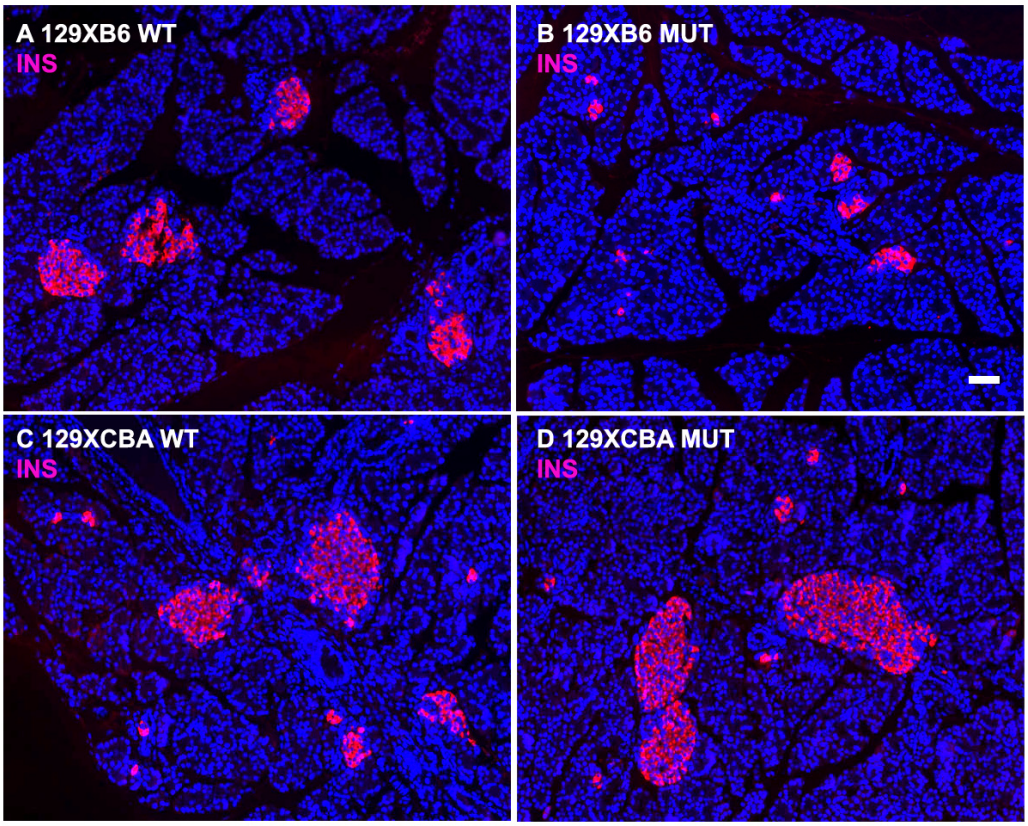


Figure 5: Islet size is preserved in resistant *Hnf1a*-deficient mice (129CBA MUT) but not in sensitive mice (129B6 MUT). Beta cells are labeled with anti insulin antibody (red staining) and nuclei are stained with DAPI (blue). These selected representative views show that islets in WT (A and C) and in resistant mutant mice (D) are of a similar size while islets observed in sensitive mutant (B) are smaller and scattered. Scale bar is 50µm.

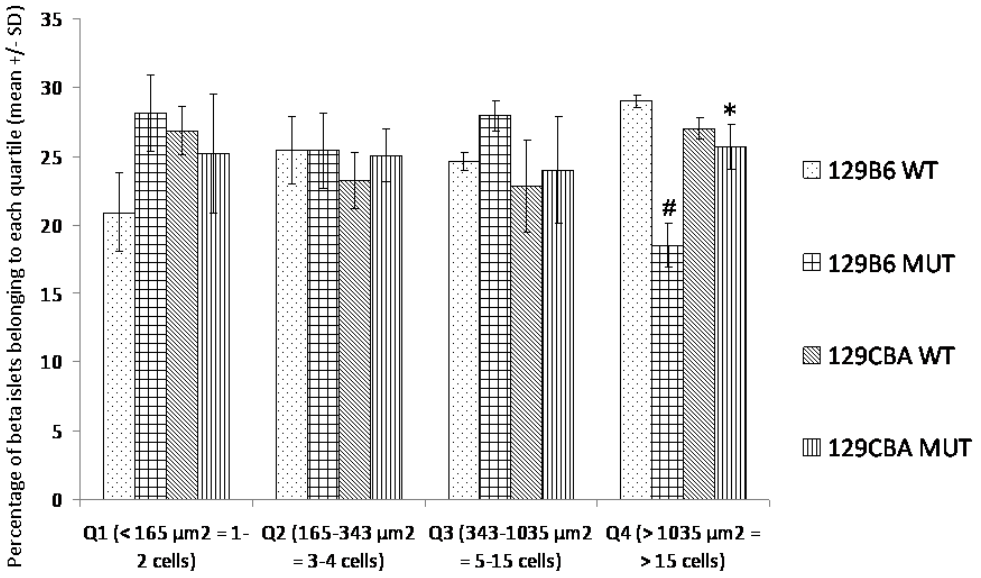


Figure 6: Preservation of large islets in resistant mutant mice (129CBA MUT) at P15. The islet population was divided into four quartiles (Q1 to Q4). Each quartile contained islets of increasing size from Q1 to Q4. A significant difference in islet size between resistant and sensitive mutant mice was observed in the quartile containing larger islets (Q4) ($p<0.05$, ANOVA test). All data are means ± SD.

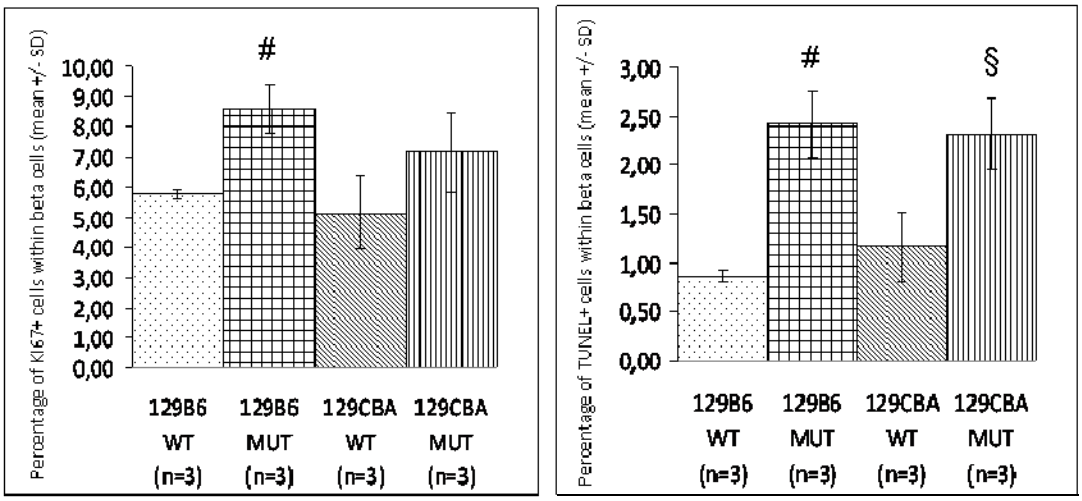


Figure 7: Proliferation and apoptosis do not contribute to the presence of large islets in mutant resistant mice at P15. Proliferation was determined by counting insulin and Ki67 expressing cells. Apoptosis was ascertained by using the TUNEL assay on insulin positive cells. Quantitative data were obtained using the cell counter plug-in in ImageJ. In both experiments, no significant differences where found between resistant and sensitive mutant. All data are means ± SD. We searched for statistical differences using Student test ($p<0.05$). **Left panel:** Only sensitive 129B6 MUT mice (♯) showed a significant increase of percentage of proliferation compared to 129B6 WT mice. The same trend was observed in 129CBA MUT mice. **Right panel**: Both sensitive 129B6 MUT (♯) and resistant 129CBA MUT (§) mice showed a significant increase of percentage of apoptosis compared to WT.
Bring to front error bar on 129CBAMUT, left panel.

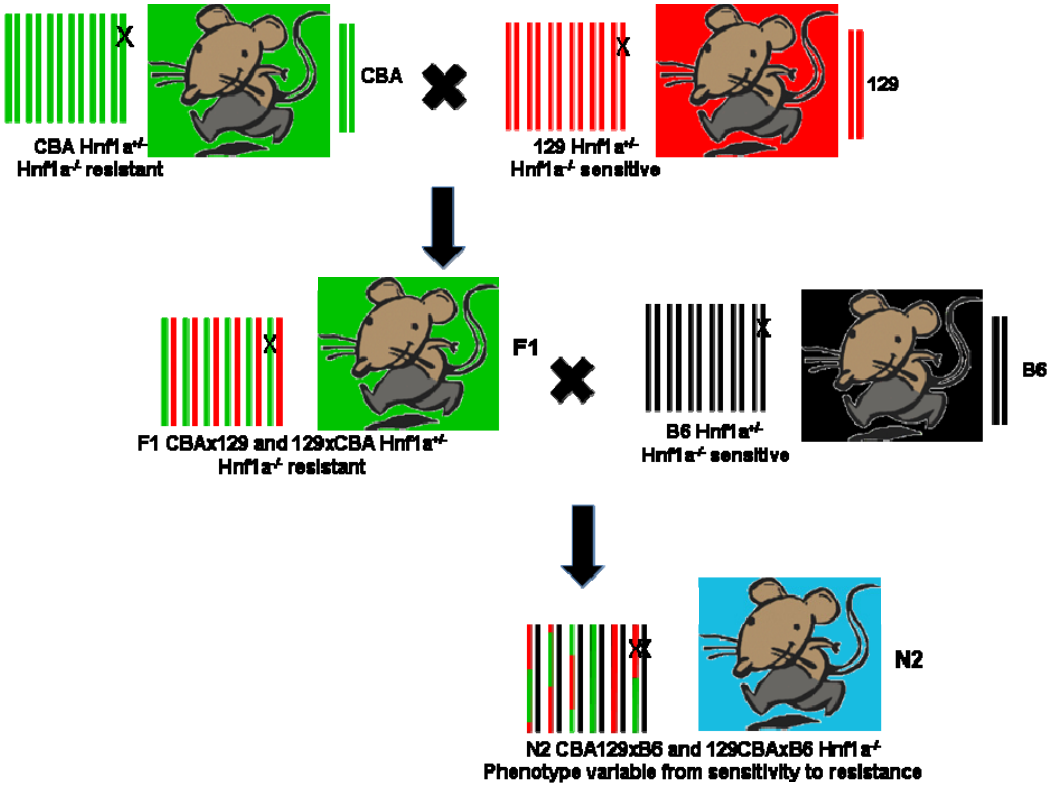


Figure 8: The mouse breeding strategy adopted to introduce heterogeneity in genetic background of N2 mutant mice. In order to identify genetic variations responsible for the resistance to diabetes in the CBA genetic background, we have intercrossed congenic CBA *Hnf1a*$^{+/-}$ mice with 129 *Hnf1a*$^{+/-}$ and obtained the corresponding F1 animal set. In a second step, we have backcrossed the F1 129CBA *Hnf1a*$^{+/-}$ mice with B6 *Hnf1a*$^{+/-}$ mice and produced a N2 generation of 2,100 129CBAxB6 and B6x129CBA mice in a total of 24 months long breeding program. As expected, we observed 530 animals *Hnf1a*$^{-/-}$ among all N2 (25%).

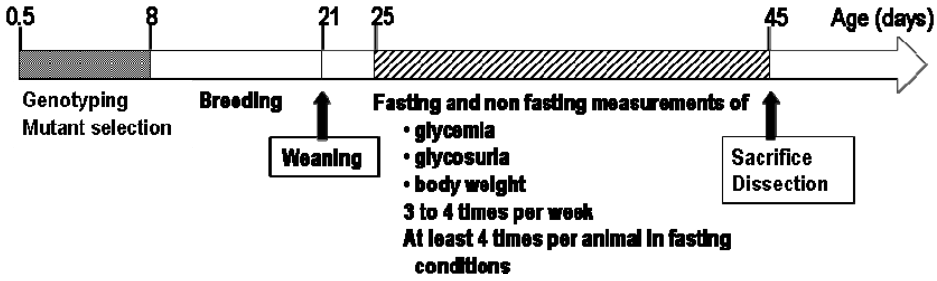


Figure 9: Intensive phenotyping protocol of N2 mutant mice. Resistant F1 129xCBA mice were outcrossed with B6 mice in order to obtain a N2 generation. Neonates were genotyped at birth and only mutants were raised. Both male and female mutant animals were bred and weaned at P21 with ad libitum access to water and rodent chow. Chow was pulled out 12h before measurement for fasting conditions. Finally, we phenotyped 530 N2 mutant mice following this protocol.



Figure 10: N2 mutant animals presented a variable phenotype ranging from sensitivity to resistance to diabetes. Results obtained from backcross experiments have revealed that the glycemias of the 530 N2 *Hnf1a*$^{-/-}$ mice (unfilled squares) were quite heterogeneous. Some animals were strictly normoglycemic (less than 200 mg/dL) whereas others developed hyperglycemia (>250 mg/dL). Ninety-one extremely sensitive (filled red triangles) and 50 extremely resistant (filled green squares) N2 *Hnf1a*$^{-/-}$ mice were selected for genetic analysis.

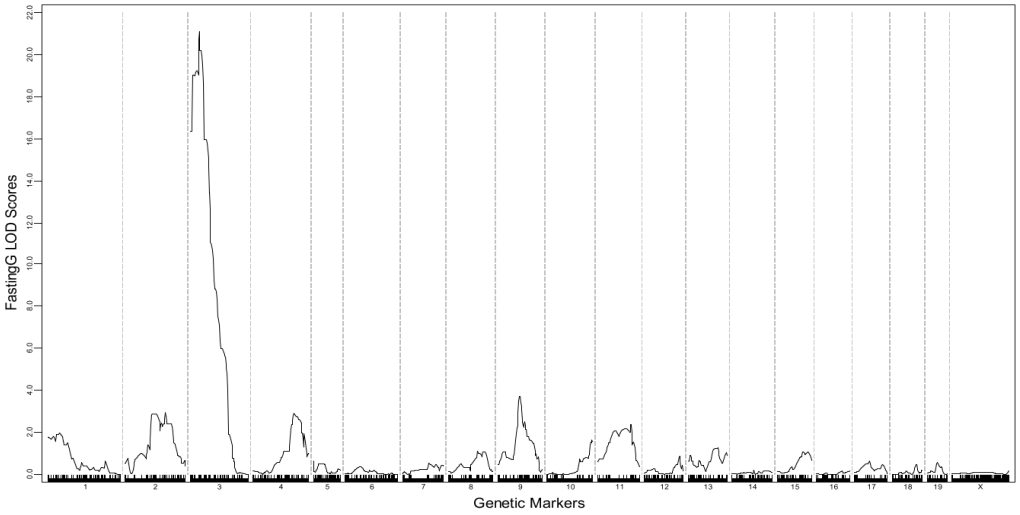


Figure 11: A major QTL for fasting glycemia was identified on chromosome 3. This QTL called ModA (Modifier locus A) was identified by genome scan. It is strongly associated with fasting glycemia in N2 *Hnf1a*$^{-/-}$ mice with a LOD score greater than 20. Statistical analysis found QTL peak at 29.79Mb with a confidence interval between 21.79 and 37.79Mb (confidence interval 95%) Statistical analyses were performed with J/QTL for R software.

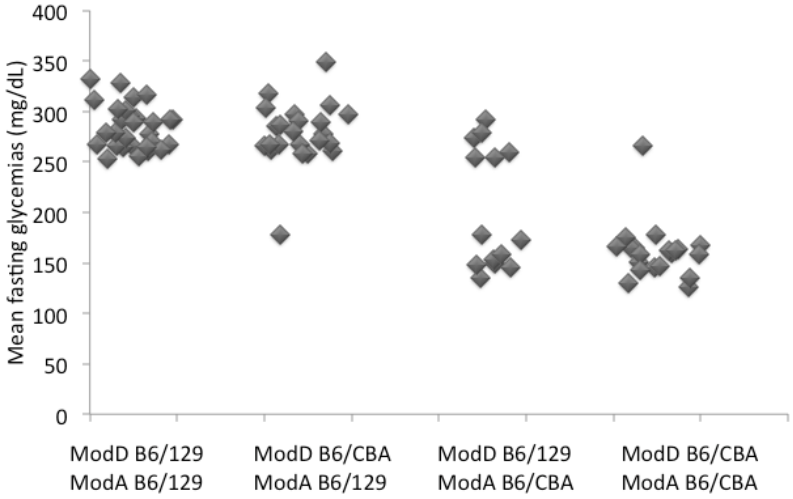


Figure 12: Effect of interaction between modifier locus A (ModA) and modifier locus D (ModD) on the mean fasting glycemias in resistant and sensitive N2. If both loci carried sensitive alleles B6/129, all N2 mice are hyperglycemic (sensitive). In the same context of ModA homozygous sensitive alleles, the presence of a resistant allele CBA on ModD did not affect hyperglycemia in most mice. On the contrary if ModA carried the CBA allele with ModD homozygous for sensitive alleles, half of the mice (but not all) are normoglycemic. Most of the mice are resistant only if they carried CBA allele on both ModA and ModD. The difference between the last four groups of resistant and sensitive mice carrying either a CBA allele on ModA or on both loci ModD and ModA is significant by Fisher's exact test ($p<0.05$). Each filled losange is a resistant or sensitive N2 mouse (141 mice in total). B6 and 129 are considered sensitive alleles and CBA resistant one.

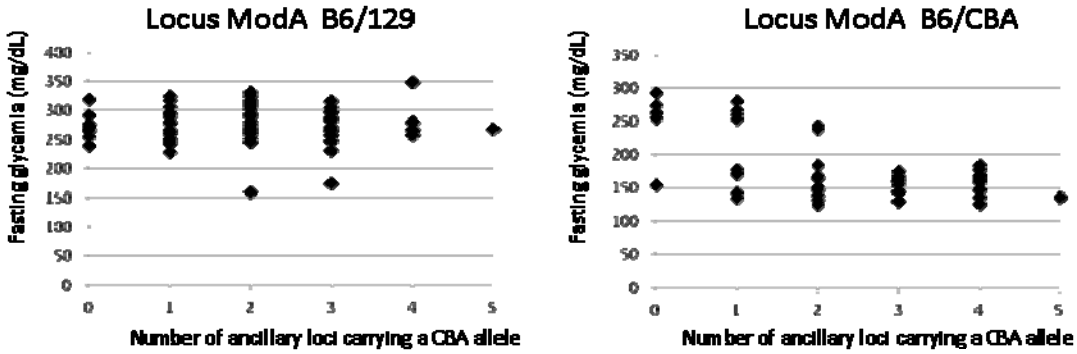


Figure 13: Genetic interactions between the major locus ModA and the minor ancillary loci affected fasting glycemia. Left panel: N2 mice carrying homozygous sensitive alleles (B6/129) at the ModA locus are hyperglycemic whatever the allelic status of the minor ancillary loci (B6/CBA or B6/129). **Right panel:** In N2 mice carrying heterozygous alleles on ModA (B6/CBA) glycemia is dependent on the presence of resistant heterozygous alleles (B6/CBA) on other additional minor ancillary loci. Each diamond is one mouse.

Annexe 3 – Articles publiés sur le sujet en amont du travail de thèse

1-Bellanné-Chantelot C, **Carette C**, Riveline J-P, Valéro R, Gautier J-F, Larger E, et al. The type and the position of *HNF1A* mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3. Diabetes. févr 2008;57(2):503-8.

2-Carette C, Dubois-Laforgue D, Saint-Martin C, Clauin S, Beaufils S, Larger E, et al. Familial young-onset forms of diabetes related to *HNF4A* and rare *HNF1A* molecular aetiologies. Diabet Med. déc 2010;27(12):1454-8.

3-Bellanné-Chantelot C, Lévy DJ, **Carette C**, Saint-Martin C, Riveline J-P, Larger E, et al. Clinical characteristics and diagnostic criteria of maturity-onset diabetes of the young (MODY) due to molecular anomalies of the *HNF1A* gene. J Clin Endocrinol Metab. août 2011;96(8):E1346-51.

Résumé : Les souris invalidées pour *Hnf1a* présentent un diabète sévère avec défaut d'insulino-sécrétion proche du phénotype observé chez les patients MODY3 (Maturity Onset Diabetes of te Young). Les mécanismes moléculaires responsables du diabète lié à la déficience en *Hnf1a* ne sont pas clairement compris. Dans ce travail, nous avons montré que des souris congéniques présentant la même délétion de *Hnf1a* dans des fonds génétiques différents présentent des phénotypes radicalement opposés. En effet, la déficience en *Hnf1a* conduit à un diabète sévère dans la plupart des lignées telles que 129, B6, BALB/c ou AJ (lignées sensibles). Mais à l'inverse, aucun diabète n'est observé chez les souris congéniques des lignées CBA et C3H malgré le défaut d'expression de *Hnf1a* (lignées résistantes). Les souris sensibles présentent une altération de leurs îlots de Langerhans avec notamment une diminution de taille de ces îlots. A l'inverse les souris résistantes présentent des îlots beta de taille normale malgré la déficience en *Hnf1a.* Nous avons pu montrer que le ou les variants génétiques présents dans les deux lignées résistantes agissent de façon dominante et, par un balayage du génome, nous avons identifié un locus majeur suppresseur du phénotype diabétique au niveau du chromosome 3. Ce locus majeur contient 11 gènes présentant des variations de SNP non synonymes et il interagit avec cinq autres loci ancillaires au niveau des chromosomes 4, 11 et 18. Notre travail montre finalement que les variations génétiques naturellement présentes dans les lignées de souris de laboratoire peuvent supprimer le phénotype diabétique lié à la déficience en *Hnf1a*.

Mots clés : diabètes monogéniques, MODY3, *HNF1A* MODY, *Hnf1a*

Title: Diabetic phenotype linked to Hnf1a deficiency is suppressed by genetic background in mice.

Abstract: *Hnf1a*$^{-/-}$ mice exhibit a severe diabetes mellitus due to a drastic defect in insulin secretion that closely resembles to the phenotype presented by MODY3 (Maturity Onset Diabetes of the Young type 3) patients. The molecular mechanisms responsible for the diabetes are still poorly understood. Here we show that congenic mice of different genetic backgrounds carrying the same *Hnf1a* deletion presented with drastically different phenotypes. *Hnf1a*-deficiency led to severe diabetes when introgressed into 129, B6, BALB/C or A/J genetic backgrounds (sensitive strains). Conversely, when the same null mutation was introgressed into CBA or C3H genetic backgrounds (resistant strains), the diabetic phenotype was suppressed. In sensitive strains, pancreatic islets did not increase in size compared to control animals and on the other hand average islet-size growth was normal in resistant strains. The genetic variations naturally present in these two resistant strains acted in a dominant way and a genome scan analysis led to the identification of a major suppressor locus on chromosome 3 that accounted for more than 60% of the variance of glycemia. The major locus contained 11 genes with non-synonymous SNPs changes and it interacted with 5 additional ancillary loci on chromosomes 4, 11 and 18. Our study demonstrated that the naturally occurring genetic variation present in distinct mouse laboratory strains is able to suppress the phenotype of a monogenic disorder.

Keywords: monogenic diabetes, MODY3, *HNF1A* MODY, *Hnf1a*