

RAPPORT

Détermination du rôle de la NOX5 dans la survie des îlots pancréatiques et la sécrétion d'insuline grâce à un nouveau modèle de souris sur-exprimant NOX5 spécifiquement dans les cellules Béta.

Ce subside nous a permis de mettre à jour une nouvelle voie de régulation de la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans qui devrait se montrer très prometteuse dans le cadre du traitement des patients diabétiques. Elle concerne le rôle des « reactive oxygen species » dans la régulation physiopathologique des îlots. Ce thème est l'objet de recherches intensives et le rôle des enzymes NADPH oxydase (NOX-es) est particulièrement devenu récemment d'actualité dans ce cadre (<https://covalentdata.com/research-grant/JDRF%3A2-SRA-2014-259-Q-R>).

Notre projet se distingue d'autres études analogues en cherchant à identifier le rôle de l'enzyme NADPH oxydase 5 (NOX5) qui est la seule isoforme de NOX présente uniquement chez l'homme mais qui par contre est absente chez la souris et le rat. Cette expression spécifique à l'homme explique le fait que le rôle potentiel de NOX5 a engendré un nombre très limité d'études *in vivo*. En particulier, aucune étude relative à l'implication potentielle de NOX 5 sur la physiopathologie des îlots n'est pas disponible alors que des bases de données d'expression de gènes contiennent des informations suggérant une élévation de NOX5 mRNA dans des îlots de patients diabétiques de type 2.

Notre projet visait à développer un nouveau modèle animal ayant pour but d'analyser le rôle de NOX5 sur la sécrétion d'insuline par les cellules Béta son implication potentielle sur le développement d'un diabète lié à un défaut de fonctionnement des îlots. Dans ce contexte, nous avons généré des souris transgéniques exprimant NOX5 dans les cellules Béta des îlots de Langerhans sous induction par doxycycline (*RIP-rtTA-TetO-NOX5*) et avons analysé la fonction de ces îlots dans des conditions physiologiques ainsi que lors d'une situation diabétogène.

1. RESULTATES

Nous avons généré avec succès des souris sur-exprimant NOX5 dans les cellules β des îlots pancréatiques par le croisement de souris TetO-Nox5, comportant NOX5 humaine sous l'élément TetO sensible au transactivateur inverse rtTA avec des souris RIP-rtTA, exprimant le rtTA inducible par la tetracycline sous le contrôle du promoteur de l'insuline RIP. De telles souris sont viables et ne présentaient aucun phénotype particulier à la naissance. L'induction de NOX5 dans les îlots a été confirmée par RT-PCR et immunohistologie. L'induction spécifique de NOX5 dans les cellules Béta a également été confirmée par immuno-fluorescence.

Dans le cadre de la première série d'expériences nous avons effectué un phénotypage métabolique des souris RIP-rtTA/TetO-Nox5 en présence (traités/DOX+) ou non (contrôles/DOX-) de doxycycline dans la nourriture, afin d'induire spécifiquement NOX5 dans les cellules β . Dans des conditions de nourriture contrôle (chow-diet-fed) nous n'avons observé aucune différence entre les paramètres métaboliques (poids, composition corporelle, glycémie et insulinémie à jeun et nourri) entre les animaux contrôles et ceux exprimant NOX5. A la recherche de changements moins évidents de la fonction des îlots, nous avons comparé *in vitro* la sécrétion insulinaire induite par le glucose entre des îlots isolés obtenus d'animaux contrôles et de ceux exprimant NOX5. Ces expériences n'indiquaient aucune différence entre les capacités sécrétoires des deux types d'îlots.

La deuxième série d'expériences nous a permis d'analyser la capacité d'adaptation des îlots à l'hyperglycémie induite par une diète diabétogène chez des souris RIP-rtTA/TetO-Nox5. Dans le cadre de cette série d'expérience, nous avons caractérisé l'homéostasie métabolique et la fonction des îlots des souris RIP-rtTA/TetO-Nox5 (+/- DOX) nourries avec un régime diabétogène (Kliba NAFAG 2127, lipides: 60 % de kcal) sur 12 semaines. Les souris des deux groupes ont pris du poids de la même façon en réponse à ce régime riche en graisses. La composition corporelle en graisses a été régulièrement suivie par résonance magnétique (EchoMRI-700™) et le métabolisme énergétique a été étudié après 12 semaines de régime grâce à des mesures de calorimétrie indirecte (LabMaster, TSE Systems GmbH). Ce système de calorimétrie permet la détermination de la dépense énergétique (consommation d'O₂, chaleur produite) et des substrats utilisés (calcul du quotient respiratoire VCO₂/VO₂). La prise alimentaire et la consommation d'eau ont été enregistrées en continu et l'activité motrice a également été mesurée grâce à des capteurs infrarouges disposés en paires.

autour de la cage. Ces expériences ne démontrent aucune différence majeure entre les souris contrôles et celles exprimant NOX5.

Les différences majeures entre les deux types de souris ont été observées dans le cadre de la fonction des îlots et ce aussi bien *in vivo* que *in vitro*. En effet, les souris exprimant NOX5 et nourries avec une diète riche en graisse sécrétaient moins d'insuline en réponse au glucose *in vivo* et de façon analogue, les îlots isolés des animaux exprimant NOX5 montraient une sécrétion d'insuline réduite *in vitro*. Ces données ont également été validées par une autre série d'expériences. En effet, une preincubation en présence d'acide gras d'îlots isolés d'animaux par ailleurs nourris par une diète standard montraient également une réduction de sécrétion d'insuline obtenue d'îlots isolés d'animaux exprimant NOX5 par rapport à celle d'îlots isolés d'animaux contrôles.

Nos résultats utilisant un modèle *in vivo* de souris transgéniques démontrent indubitablement des effets négatifs clairs de NOX5 sur la capacité d'adaptation des cellules Béta sous conditions de challenge diabétogène.

Les résultats de ces études sont actuellement soumis pour publication « Aggravated high fat diet-induced impairment of islet insulin secretion in mice with beta-cell specific NADPH oxidase 5 expression ».

2. DIFFICULTES RENCONTREES

Notre projet a dû faire face à deux problèmes dans le décours en cours de sa réalisation:

1. Le début des expériences a dû être postposé de 8 mois suite à une infection générale de gale de l'animalerie de notre institution. Les souris de l'ensemble de l'animalerie ont dû recevoir un traitement avec des effets secondaires connus sur leur métabolisme. Les expériences rapportées n'ont donc pu être réalisées que deux générations après un tel traitement pour s'assurer de la validité des résultats.

2. Les recherches dans le domaine NOX sont préteritées par le manque d'anticorps NOX isoformes spécifiques bien caractérisés. Dans le décours de nos expériences nous avons donc dû investir du temps et de l'argent en vue de caractériser différents anticorps et d'identifier les conditions optimales pour les expériences d'immunofluorescence aussi bien sur les tissus humains que murins. Nous sommes maintenant confiants et fiers de la qualité des résultats obtenus.

3. OBSERVATIONS INATTENDUES

Nos études ont par ailleurs amenés à des observations inattendues que nous souhaiterions poursuivre dans le futur.

1. Les souris exprimant NOX5 montrent une différence intéressante dans le rythme de la prise alimentaire qui était élevée pendant la journée (période de jeûne relative pour les souris) chez les souris exprimant NOX5 et nourries par une diète standard même si la prise alimentaire totale était la même pour les deux types de souris. Cette différence entraînait aussi une différence dans le type de source calorique utilisée pendant la journée (graisses *versus* hydrates de carbone). En effet, les souris NOX5 utilisent moins de graisses que les souris contrôles dans ces situations. Or, le promoteur *Ins2* utilisé pour l'induction spécifique de NOX5 dans les cellules Béta est aussi connu pour induire une expression génique dans certains neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'alimentation. Des études de l'expression de gènes par microarrays montrent l'expression de NOX5 dans l'hypothalamus humain (GeoProfile, Accession: GDS596). Des changements oxydatifs dans la région hypothalamique représentent un lien important entre le cycle circadien et les réseaux métaboliques. Notre modèle animal avec une induction de l'expression de NOX5 dans des neurones hypothalamiques spécifiques pourrait dès lors représenter un modèle unique permettant de collecter plus d'informations quant à la modulation du lien pouvant exister entre le status redox neuronal, notre horloge métabolique et la régulation métabolique.

2. Les analyses par immunofluorescence ont également démontré une présence importante de NOX5 dans les cellules Delta des îlots. Parallèlement à l'augmentation de NOX5 induite par le glucose dans les cellules Béta, nous avons également observé une expression importante de l'expression de NOX5 dans les cellules Delta à la fois dans les îlots humains isolés et sur des coupes de pancréas *in situ*. Les cellules Delta jouent un

rôle important dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules Béta et pourraient être à l'origine de transdifférentiation en cellules Béta dans le décours du diabète juvénile.

Dans ce cadre, nous avons développé un nouveau modèle animal présentant une expression spécifique de NOX5 dans les cellules Delta et planifions de les utiliser dans des expériences de modélisation des diabètes de Type 1 et 2.

En conclusion, les projets soutenus par le subside SFD_Abbot a été couronné de succès en permettant de développer un nouveau modèle expérimental et en identifiant un composant clé de de l'homéostasie de la cellule Beta et de la sécrétion d'insuline dans des conditions diabétiques.