

Contexte scientifique et but de l'étude:

Le laboratoire du Professeur Seung Kim a identifié une hormone peptidique appelée Limostatin (Lst) qui est produite et sécrétée par les cellules entéro-endocrines. Cette hormone supprime la sécrétion d'insuline dans le modèle invertébré de la *Drosophila melanogaster* [1].

La sécrétion de Lst est induite en condition de jeûne et inhibe la sécrétion d'insuline en activant son récepteur (LstR) couplé à une protéine G qui a une forte homologie de séquence avec le récepteur mammifère de la Neuromédine U (Nmur1). Le peptide Nmu est exclusivement produit par le système nerveux central et par les cellules entéro-endocrines du système gastro-intestinal mais n'est aucunement exprimé dans le pancréas [2-4]. Cependant les modalités de régulation de la sécrétion de Nmu en conditions prandiale, post-prandiale et de jeûne ainsi que sa fonction inhibitrice sur la sécrétion d'insuline *in vivo* restent indéterminées. De plus, de par le manque d'essais biochimiques fiables pour détecter les niveaux de Nmu, son rôle dans la régulation métabolique en tant que peptide plasmatique reste controversé [5]. Au sein du pancréas, le récepteur Nmur1 est spécifiquement exprimé dans les cellules endocrines Bêta. Une exposition des îlots humains et de rongeurs avec la Nmu inhibe de moitié la sécrétion régulée d'insuline *in vitro* [1, 6]. Cependant, il reste à confirmer si cet effet de la Nmu est médié par l'activation de Nmur1 et si la Nmu peut réguler d'autres hormones clés du métabolisme. Des études précédentes ont démontré que les souris transgéniques invalidées pour Nmur1 ont un poids corporel et des niveaux basaux d'insuline inchangés. Cependant, les souris déficientes en Nmu ont une hyperinsulinémie, une masse adipeuse et un poids corporel augmentés [7] qui sont des caractéristiques phénotypiques observées chez les individus haplo-insufficients en Nmu [1, 8].

Résultats:

Afin de mettre en évidence que le peptide Nmu est une hormone circulante, le laboratoire du Professeur Kim a généré des anticorps monoclonaux spécifiques pour la Nmu et a développé une méthode immuno-enzymatique en sandwich ELISA (enzyme linked immunosorption assays) pour mesurer les niveaux circulants de Nmu à partir de sang murin ou humain. Les niveaux sériques dans la souris sont d'environ 1nM après un jeûne de 16h et augmentent significativement après un jeûne prolongé. Dans les 30 minutes suivant une prise alimentaire, les niveaux plasmatiques de Nmu augmentent jusqu'à atteindre un pic maximal puis chutent progressivement pour retrouver des niveaux basaux dans les 2 heures post-prandiales. **Ainsi, l'essai développé dans le laboratoire du Professeur Kim démontre la régulation dynamique des niveaux circulants de Nmu en cas de jeûne prolongé suivi d'une prise alimentaire.** Les niveaux de Nmu fluctuent si les souris sont à jeûn depuis 16h et que le glucose est administré par gavage oral à 2g/kg de poids corporel mais pas lorsque le glucose est injecté en intra-péritonéal et ainsi court-circuite le tube digestif. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'une alimentation entérique et l'absorption intestinale de nutriments sont des régulateurs essentiels dans la production et sécrétion de Nmu dans la circulation.

Dans le but d'identifier les effets d'une élévation de Nmu sur le métabolisme, nous avons étudié la régulation glucidique et insulinique des souris à jeûn présentant des niveaux de Nmu élevés. Lors d'un test de tolérance au glucose réalisé après un jeûne de 72h, ces souris ont des niveaux d'insuline bas et une hyperglycémie prolongée versus des souris mises à jeûn pendant 16h. **Ainsi les souris démontrent un même état caractéristique du syndrome appelé "starvation diabetes" tel qu'observé chez l'humain et qui consiste en une intolérance au glucose transitoire suite à une prise alimentaire riche en carbohydrates à la suite d'un jeûne prolongé [9-12].** Afin d'évaluer le rôle de la voie de signalisation de Nmu dans la manifestation de l'hyperglycémie post-prandiale transitoire suite à un jeûne prolongé ("starvation diabetes"), nous avons mesuré les niveaux glycémiques et d'insuline dans des souris invalidées pour Nmur1. Ce récepteur couplé à une protéine G lie le ligand Nmu et est exprimé dans les tissus périphériques dont les îlots pancréatiques humains [1]. Tel que des études antérieures l'ont montré [13], nous avons observé que la glycémie et l'insulinémie des souris contrôles et

homozygotes pour la mutation *Nmur1* nourries ad libitum sont identiques. Cependant, nous avons démontré que les souris invalidées pour *Nmur1* ont des niveaux d'insuline supérieurs aux souris contrôles suite à un test de tolérance au glucose après un jeûne prolongé, suivi d'un meilleur contrôle glycémique. **Ainsi, puisque l'expression de *Nmur1* a été identifiée pour être limitée aux cellules Bêta au sein de l'îlot pancréatique [1], ces données suggèrent que l'élévation de *Nmu* régule négativement la sécrétion d'insuline via l'activation du récepteur *Nmur1*.** Pour tester cette hypothèse, nous avons exposé les îlots pancréatiques extraits de souris déficientes en *Nmur1* avec l'hormone *Nmu* et avons mesuré la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Le traitement de *Nmu* supprime la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les îlots de souris contrôles alors que cet effet est perdu dans les îlots de souris manquant le récepteur *Nmur1*. Nous avons ainsi validé que *Nmu* est une hormone dite "décrétine" (de l'anglissisme "decrease insulin") de son par son action inhibitrice sur la sécrétion d'insuline via l'activation de *Nmur1*.

Afin de valider l'effet hypoinsulinémique de *Nmu in vivo*, nous avons injecté des souris après 12h de jeûne avec une seule dose de cette hormone en intra-péritonéal. Les niveaux sériques de *Nmu* s'élèvent 5 minutes post-injection et restent 2 fois supérieurs au niveau basal (après 12h de jeûne) pendant 60 minutes. Cette concentration est représentative de l'élévation physiologique des niveaux de *Nmu* observés suite à un jeûne prolongé de 72h dans les souris. Les niveaux d'insulinémie restent faibles et stables, ce qui se reflète dans la survenue d'une faible hyperglycémie. Les souris déficientes en *Nmur1* injectées avec la *Nmu* ne présentent aucune suppression de la sécrétion d'insuline et ont ainsi une régulation glycémique comparable aux souris contrôles. Des observations similaires ont été faites dans des souris contrôles injectées avec la *Nmu* et soumises à une administration orale de glucose par gavage, qui résulte en l'absence de pic insulinémique et une faible hyperglycémie. **Ces résultats démontrent qu'une injection unique de *Nmu* en amont d'un test de tolérance au glucose suite à un jeûne court, récapitule les caractéristiques de "starvation diabetes" survenant suite à un jeûne prolongé.**

La perturbation du contrôle glucidique induite par la *Nmu* suggère que l'élévation sérique des niveaux de *Nmu* peut influencer le profil sécrétoire de plusieurs facteurs, eux aussi régulateurs de l'insuline et du métabolisme glucidique, tels l'hormone incrétiline Glucagon-like peptide-1 (GLP1) ou le glucagon. Des souris contrôles injectées avec de la *Nmu* ont des niveaux circulants de GLP-1 réduits et une hyperglucagonémie, à l'inverse des souris invalides pour *Nmur1* injectées avec de la *Nmu* qui ne présentent pas ces changements hormonaux. Des mesures par PCR quantitative ont permis de mettre en évidence l'expression de *Nmur1* sur les cellules principales productrices de l'hormone GLP-1, les cellules L intestinales et la lignée cellulaire de cellules entéro-endocrines intestinales STC-1. De plus, l'administration exogène de *Nmu* sur les cellules STC-1, inhibe la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose. De même, la culture et le traitement avec la *Nmu* de morceaux d'iléum humains et de souris contrôles riches en cellules L [14] a également mis en évidence une suppression de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose. Le traitement par *Nmu* n'a aucun effet sur la sécrétion de GLP-1 par l'iléum des souris invalidées pour *Nmur1* en culture. À ce jour nous n'avons pas été en mesure d'induire une sécrétion de glucagon à partir d'îlots pancréatiques en culture exposés avec la *Nmu* en vue de reproduire l'élévation de la glucagonémie tel qu'observé *in vivo*.

Conclusion:

Nous avons démontré que les **niveaux circulants de l'hormone *Nmu* changent au cours d'un jeûne prolongé et d'une prise alimentaire.** La *Nmu* joue un rôle inhibiteur sur la sécrétion d'insuline en agissant directement sur les cellules Bêta pancréatiques. De plus, la *Nmu* semble également réguler négativement la sécrétion intestinale de l'incrétine GLP-1. La régulation du contrôle glucidique via la régulation des sécrétions d'insuline et de GLP-1 semble être dépendante de l'activation du récepteur *Nmur1*. Cette étude place l'hormone *NMU* comme régulateur clé du métabolisme et peut potentiellement permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de restaurer la sécrétion d'insuline des sujets diabétiques.

Références:

- [1] Alfa RW, Park S, Skelly KR, et al. (2015) Suppression of insulin production and secretion by a decretin hormone. *Cell metabolism* 21: 323-333
- [2] Brighton PJ, Szekeres PG, Willars GB (2004) Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles. *Pharmacological reviews* 56: 231-248
- [3] Brighton PJ, Szekeres PG, Wise A, Willars GB (2004) Signaling and ligand binding by recombinant neuromedin U receptors: evidence for dual coupling to Galphaq/11 and Galphai and an irreversible ligand-receptor interaction. *Molecular pharmacology* 66: 1544-1556
- [4] Martinez VG, O'Driscoll L (2015) Neuromedin U: a multifunctional neuropeptide with pleiotropic roles. *Clinical chemistry* 61: 471-482
- [5] Mitchell JD, Maguire JJ, Davenport AP (2009) Emerging pharmacology and physiology of neuromedin U and the structurally related peptide neuromedin S. *Br J Pharmacol* 158: 87-103
- [6] Kaczmarek P, Malendowicz LK, Pruszynska-Oszmalek E, et al. (2006) Neuromedin U receptor 1 expression in the rat endocrine pancreas and evidence suggesting neuromedin U suppressive effect on insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. *International journal of molecular medicine* 18: 951-955
- [7] Hanada R, Teranishi H, Pearson JT, et al. (2004) Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nature medicine* 10: 1067-1073
- [8] Hainerova I, Torekov SS, Ek J, et al. (2006) Association between neuromedin U gene variants and overweight and obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91: 5057-5063
- [9] Cahill GF, Jr., Herrera MG, Morgan AP, et al. (1966) Hormone-fuel interrelationships during fasting. *The Journal of clinical investigation* 45: 1751-1769
- [10] Fink G, Gutman RA, Cresto JC, Selawry H, Lavine R, Recant L (1974) Glucose-induced insulin release patterns: effect of starvation. *Diabetologia* 10: 421-425
- [11] Lundbaek K (1948) Metabolic abnormalities in starvation diabetes. *The Yale journal of biology and medicine* 20: 533-544
- [12] Unger RH, Eisentraut AM, Madison LL (1963) The effects of total starvation upon the levels of circulating glucagon and insulin in man. *The Journal of clinical investigation* 42: 1031-1039
- [13] Torres R, Croll SD, Vercollone J, et al. (2007) Mice genetically deficient in neuromedin U receptor 2, but not neuromedin U receptor 1, have impaired nociceptive responses. *Pain* 130: 267-278
- [14] Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, et al. (2007) Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 15069-15074