

Rapport « fin de projet »

Contrat de collaboration Inserm transfert/Inserm u 855/Bristol Myers Squibb

Etude du bénéfice du contrôle de la production hépatique de glucose dans le développement du diabète

Aya Abdul-wahed, Elodie Mutel, Anne Stefanutti, Gilles Mithieux et Fabienne Rajas

Introduction et objectif :

L'augmentation de la production endogène de glucose est une cause majeure de l'hyperglycémie à jeun chez les diabétiques. Cette fonction est restreinte à trois tissus : le foie, les reins et l'intestin qui sont les seuls à exprimer une enzyme clé : la glucose-6-phosphatase (G6Pase). Une augmentation de l'activité G6Pase hépatique a été soulignée chez les patients diabétiques de type 2. Des études *in vivo* ont montré que la seule surexpression, au niveau hépatique, de la sous unité catalytique de la G6Pase (G6PC) par une technique adénovirale, semble capable d'induire les principales caractéristiques métaboliques de l'insulinorésistance (IR) chez des rats normaux. Au contraire, l'inactivation du complexe G6Pase au niveau du foie, chez des souris diabétiques *ob/ob*, a permis de normaliser la glycémie et l'insulinémie de ces souris. Parallèlement à ces effets plutôt délétères de l'induction de la production hépatique de glucose, il a été montré que l'induction de la production intestinale de glucose par un régime riche en protéines pourrait expliquer l'effet satiétogène connu des protéines, un effet favorable et recherché chez les obèses et les patients diabétiques. Ces études ont été à l'origine d'une hypothèse d'un rôle différentiel de la production de glucose, hépatique (hypothétiquement délétère) et intestinale (hypothétiquement bénéfique) au cours de l'installation de l'IR.

L'objectif de ce projet est de démontrer le rôle central de l'induction de la production hépatique de glucose dans le développement de l'IR et du diabète.

Rappels de résultats précédents :

Nous disposons d'un modèle de souris transgéniques invalidées pour le gène de la sous unité catalytique du G6Pase (G6PC) spécifiquement dans le foie, et inductible par le tamoxifène (B6.g6pc^{ex3del}.SA^{+CreERT2}). Dans une première étude, trois groupes de souris mâles (SA^{+cre-ERT2}/g6pc^{ex3lox/ex3lox} : n=3, SA^{+cre-ERT2}/g6pc^{+ex3lox} : n=4, C57Bl/6J : n=5) ont été traités au tamoxifène à l'âge de 7 semaines. Suite à la dernière injection de tamoxifène, les souris invalidées pour la G6Pase hépatique : g6pc^{-/-}, hétérozygotes : g6pc^{+/-}, et témoins : g6pc^{+/+} ont été soumises à un déséquilibre alimentaire, un régime DIO (Diet induced obesity) [36,1% lipides, 35% glucides (maltodextrine+saccharose), 19,8% protéines] pendant 21 semaines. Au cours du protocole, la prise alimentaire et la masse corporelle des souris ont été suivies régulièrement. Le développement de l'IR et du diabète a été suivi par des tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline. L'invalidation du gène de la G6PC uniquement dans le foie a empêché l'installation de l'intolérance au glucose et de l'IR chez les souris g6pc^{-/-} hépatiques, sachant qu'elles ont conservé, voire augmenté, leur capacité de production extrahépatique de glucose. De plus, un nouveau rôle de la G6Pase hépatique dans le

métabolisme énergétique a été mis en évidence à travers le développement d'une résistance à l'obésité chez les souris invalidées. Ces premiers résultats ont été confirmés dans un deuxième groupe de souris plus important (n=10 souris/groupe)

Impact de l'absence de la production hépatique de glucose sur la dépense énergétique :

Les mécanismes potentiels impliqués dans la résistance à l'obésité observée chez les souris g6pc^{-/-} hépatique pourraient provenir soit d'une augmentation du métabolisme basal, soit d'une augmentation de l'activité physique, soit d'un défaut de l'absorption intestinale de la nourriture. Des études métaboliques ont été réalisées au centre d'explorations physiologiques aiguës et chroniques du petit animal vivant (plate-forme ANIPHY) à la semaine 17 d'alimentation DIO pour mesurer la dépense énergétique basale, le quotient respiratoire et l'activité locomotrice des souris. Sur un grand nombre de souris (SA^{+cre-ERT2}/g6pc^{ex3lox/ex3lox} : n=9, C57Bl/6J : n=10) les résultats des tests métaboliques montrent une augmentation significative de la dépense énergétique journalière de 15 % chez les souris g6pc^{-/-} par rapport aux souris témoins (186.3 ± 9.6 vs 162.8 ± 5.6 Kcal/ jour/ Kg^{0.75} chez les souris g6pc^{-/-} et g6pc^{+/+} respectivement), une différence qui est plus prononcée pendant le cycle de nuit (195.9 ± 9.4 vs 168.1 ± 4.8 Kcal/ jour/ Kg^{0.75} chez les souris g6pc^{-/-} et g6pc^{+/+} respectivement). Cela était corrélé avec une augmentation significative du quotient respiratoire des souris invalidées (0.82 ± 0.01 vs 0.78 ± 0.01 chez les souris g6pc^{-/-} et g6pc^{+/+} respectivement), également plus marquée pendant le cycle de nuit. A l'échelle moléculaire, l'induction de l'expression de la protéine découplante UCP3, observée précédemment dans le muscle glycolytique long extenseur des doigts des souris déficientes, a été confirmée au niveau de l'ARNm et de la protéine, suggérant un rôle important de la thermogenèse musculaire dans la résistance à l'obésité chez les souris invalidées. Cela est en accord avec l'augmentation de la température corporelle mesurée au niveau rectale chez les souris invalidées par rapport aux souris témoins (37.4 ± 0.1 vs 36.7 ± 0.1°C chez les souris g6pc^{-/-} et g6pc^{+/+} respectivement).

Impact de l'inhibition de la production hépatique sur le diabète et l'obésité préalablement installés:

Nos résultats précédents ont démontré que l'invalidation du gène de la G6PC uniquement dans le foie avait empêché l'installation de l'intolérance au glucose et de l'IR chez les souris g6pc^{-/-} hépatiques, sachant qu'elles ont conservé, voire augmenté, leur capacité de production extrahépatique de glucose. Nos données présentaient ainsi une nouvelle preuve du rôle délétère de la production hépatique de glucose dans l'installation du diabète. Cela a donné naissance à une deuxième question, concernant l'efficacité de la maîtrise spécifique de la production hépatique de glucose dans l'instauration de l'équilibre glycémique chez des individus obèses et diabétiques. Grâce au système Cre/Lox inductible dans le temps un deuxième protocole a été réalisé. Deux groupes de souris mâles âgées de 8 semaines (SA^{+cre-ERT2}/g6pc^{ex3lox/ex3lox} : n=6, C57Bl/6J : n=6) ont été maintenus sur régime DIO pendant 16 semaines. A la fin de cette durée de régime, ces souris sont devenues sévèrement obèses et diabétiques. Au cours de la semaine 17 du régime DIO les souris ont subi un traitement au tamoxifène pendant 5 jours pour induire l'invalidation du gène de la G6PC et obtenir les souris g6pc^{-/-} et g6pc^{+/+}. Toujours sous alimentation DIO, les paramètres glycémiques et la masse corporelle ont été suivis chez les deux groupes de souris après le traitement au

tamoxifène afin d'étudier le potentiel de réversibilité de l'obésité et du diabète par l'invalidation de la g6pc hépatique. Seulement 10 jours après l'invalidation, une amélioration spectaculaire a été notée au niveau de la tolérance au glucose des souris invalidées, avec une diminution significative de l'aire sous la courbe (AUC) de tolérance au glucose par rapport aux tests la semaine avant l'invalidation ($AUC = 358,2 \pm 13,9$ mg/dL/h après l'invalidation vs $470,8 \pm 31,4$ mg/dL/h avant l'invalidation). Cela était accompagné d'une normalisation de la glycémie à jeun des souris invalidées ($92,67 \pm 14,64$ mg/dL après l'invalidation vs $141,61 \pm 0,34$ mg/dL avant l'invalidation) et de l'insulinémie ($0,57 \pm 0,11$ ng/mL après l'invalidation vs $1,44 \pm 0,34$ mg/dL avant l'invalidation) suggérant une amélioration de la sensibilité à l'insuline des souris invalidées. En accord avec ces résultats, une hypersensibilité à l'insuline était notée chez les souris g6pc^{-/-} avec une diminution de plus que 30 % de l'AUC pendant le test de sensibilité à l'insuline trois semaines après l'invalidation par rapport au test avant l'invalidation. Malgré une prise alimentaire identique entre les souris invalidées et les souris témoins, la masse corporelle des souris g6pc^{-/-} n'a plus augmenté à partir de l'invalidation alors que les souris témoins ont, quant à elles, continué à gagner du poids avec le régime DIO (112,2 % à semaine 10 et 125,2% à semaine 14 après le traitement tamoxifène).

En conclusion, la suppression spécifique uniquement de la production hépatique de glucose a permis une normalisation très précoce des paramètres glycémiques des souris diabétiques et l'instauration de la sensibilité périphérique à l'insuline. Ces résultats apportent la preuve moléculaire du rôle crucial de la production hépatique de glucose dans l'installation de l'IR et du diabète, et la cible thérapeutique intéressante que représente spécifiquement la production hépatique de glucose dans la prévention et le traitement de ces pathologies, y compris dans leurs aspects périphériques au niveau de l'utilisation moléculaire de glucose.