

## La protéine mitochondriale UCP2, impliquée dans l'hyperinsulinisme congénital, agit aussi sur le développement du pancréas endocrine pendant la vie fœtale

*Mitochondrial protein UCP2, which is involved in congenital hyperinsulinism, also plays a role in endocrine pancreas development during the fetal period*

Bertrand Duvillé\*

POINTS FORTS

» La protéine mitochondriale UCP2 est un transporteur de métabolites à 4 carbones. Des mutations du gène *Ucp2* chez l'homme entraînent un hyperinsulinisme congénital. Chez la souris, l'inactivation du gène *Ucp2* conduit à une augmentation du nombre de cellules endocrines dans le pancréas adulte. Nos données récentes indiquent que l'absence du gène *Ucp2* est également responsable de l'élévation du nombre de cellules endocrines pendant la vie fœtale et périnatale.

**Mots-clés :** Mitochondries – UCP2 – Hyperinsulinisme – Développement – Pancréas.

HIGHLIGHTS

*Mitochondrial protein UCP2 is a C4 metabolite transporter. Mutations in the *Ucp2* gene lead to congenital hyperinsulinism. In mice, the knock-out of *Ucp2* leads to an increased number of endocrine cells in the adult pancreas. Our recent data indicate that the absence of *Ucp2* is also responsible for an amplification of the pool of endocrine cells during the foetal and perinatal periods.*

**Keywords:** Mitochondria – UCP2 – Hyperinsulinism – Development – Pancreas.

L'hyperinsulinisme congénital (CHI) est une maladie rare. Il se traduit généralement par une hypoglycémie déclenchée par une sécrétion excessive d'insuline. Les formes sont variables, allant de modérées à sévères. Dans les cas les plus graves, il est nécessaire de recourir à la chirurgie pour retirer le pancréas. En effet, il faut éviter les dommages qui pourraient être causés au cerveau par une hypoglycémie prolongée.

Durant ces dernières années, plusieurs facteurs génétiques à l'origine du CHI ont pu être identifiés. Il s'agit notamment des mutations des gènes *ABCC8* et *KCNJ11*, qui codent pour des sous-unités *SUR1* et *Kir6.2* des canaux potassium dépendants de l'adénosine triphosphate (ATP) [1, 2], mais aussi des mutations de la glucokinase (3), de la glutamate déshydrogénase (4), de la L3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (5), du récepteur de l'insuline (6) et du gène *HNF4A* (7). L'implication du transporteur 1 du monocarboxylate a aussi été montrée (8).

Depuis plusieurs décennies, on a recherché l'éventuelle implication de la fonction mitochondriale dans le développement des îlots de Langerhans et dans l'apparition du diabète (9). Néanmoins, malgré ces efforts, les mécanismes moléculaires qui gouvernent ces processus mitochondriaux restent assez mal connus. La protéine mitochondriale *Uncoupling Protein 2* (UCP2) appartient à la famille des protéines UCP. La plupart de ces protéines, comme, par exemple, UCP1, sont des transporteurs de protons qui découplent l'activité de la chaîne mitochondriale de la production d'ATP. La protéine UCP2 avait été découverte à l'origine par homologie avec UCP1. Néanmoins, malgré son appellation, il est généralement accepté qu'UCP2 n'a pas de fonction découplante, ou peu. En effet, cette protéine serait plutôt un transporteur de métabolites à 4 carbones dans la mitochondrie (10). La protéine UCP2 est exprimée dans la rate, les poumons, l'estomac, le tissu adipeux et le pancréas (11, 12). Durant ces dernières années, il a été montré que la protéine UCP2 était impliquée dans le contrôle de la

\* Institut Curie, Inserm U1021, Orsay.

sécrétion d'insuline. Nos travaux récents, effectués en étroite collaboration avec l'équipe de C. Alves-Guerra (département endocrinologie, métabolisme et diabète, institut Cochin, Paris), montrent qu'UCP2 est également impliquée dans le contrôle de la masse de cellules endocrines, dès la vie foetale.

### **Rôle de la protéine UCP2 dans la sécrétion d'insuline**

Le rôle d'UCP2 dans la fonction des cellules  $\beta$  du pancréas a été étudié chez les rongeurs dans une série d'expériences sur le gain ou la perte de fonction. Notamment, la surexpression d'UCP2 dans des cellules  $\beta$  de rat entraîne une baisse de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (13). Une expérience en miroir a également été réalisée. En effet, en traitant des cellules  $\beta$  avec des RNAi (ARN interférents), l'expression de la protéine UCP2 a pu être diminuée. Cette expérience conduit alors à une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (14).

Afin de mieux comprendre ces effets *in vivo*, C.A. Robson-Doucette et al. ont généré et analysé des souris appelées UCP2 $\beta$ KO, qui portent une mutation nulle du gène *Ucp2* dans les cellules  $\beta$ . Les souris UCP2 $\beta$ KO présentaient une légère hyperpolarisation de la membrane mitochondriale en présence de glucose, mais aucun changement du niveau d'ATP n'était détecté. Les îlots de Langerhans de ces souris avaient une quantité d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* [ROS]) plus élevée que les témoins sauvages et une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De façon inattendue, ces souris présentaient aussi une augmentation de la sécrétion de glucagon et étaient intolérantes au glucose (11). Ces données confirment que la protéine UCP2 joue un rôle important dans la sécrétion d'insuline, mais elles indiquent également un rôle important dans les cellules  $\alpha$ .

### **Implication de la protéine UCP2 dans l'hyperinsulinisme congénital**

En 2008, le laboratoire du Pr D. Ricquier a cherché à déterminer si le gène *Ucp2* pouvait être impliqué dans le CHI. En effet, de nombreux patients atteints de CHI n'avaient pas de mutation connue dans les gènes qui avaient été jusque-là associés à cette maladie. De plus, on avait déjà démontré qu'UCP2 jouait un rôle important dans la sécrétion d'insuline.

L'équipe a étudié 10 enfants atteints d'hyperinsulinisme congénital n'ayant pas de mutation déjà connue (2). Des variants du gène *Ucp2* induisant un changement d'acides aminés ont été trouvés chez 2 des 10 enfants. Des analyses fonctionnelles chez la levure et dans les cellules sécrétrices d'insuline ont permis de démontrer que ces mutations induisent des anomalies de l'activité d'UCP2. Ces découvertes ont mis en évidence une association directe entre les altérations de la séquence de la protéine UCP2 et le CHI chez l'homme.

### **La protéine UCP2 régule la masse endocrine dans le pancréas**

Plusieurs études ont montré un lien entre l'expression d'UCP2 et la quantité de cellules  $\alpha$  et  $\beta$ . En effet, S.C. Lee et al. ont trouvé une augmentation significative de la fraction de cellules  $\beta$  chez des souris mutantes pour UCP2 par rapport aux témoins (15). De plus, J.W. Joseph et al. ont aussi détecté une augmentation de la masse de cellules  $\beta$  lorsque les souris UCP2 KO sont soumises à un régime riche en graisse (16). Enfin, C.A. Robson-Doucette et al. ont également identifié une augmentation de la surface des cellules  $\alpha$  dans le pancréas ayant une mutation du gène *Ucp2* dans les cellules  $\beta$  (11). L'ensemble de ces données indique que la protéine UCP2 joue un rôle important dans la régulation du nombre de cellules  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces effets dépendent également de l'alimentation.

### **Importance de la protéine UCP2 pendant la période embryonnaire et foetale**

Récemment, nous avons recherché, avec l'équipe de C. Alves-Guerra, si les observations qui avaient été faites chez les souris adultes pouvaient avoir une origine embryonnaire. Pour cela, nous avons d'abord examiné l'expression du gène *Ucp2* dans différents types cellulaires au cours du développement embryonnaire en utilisant la méthode de *Fluorescent Activated Cell Sorting* (FACS). Au stade E12,5 (qui représente un stade précoce), le pancréas est composé d'un épithélium qui contient les cellules progénitrices. Cet épithélium est entouré de mésenchyme qui fournit des signaux de croissance. Nous avons séparé ces 2 compartiments cellulaires, et nous avons ainsi montré que l'expression d'*Ucp2* était enrichie dans les cellules épithéliales (17). À E16,5, un stade plus différencié, l'expression d'*Ucp2* était plus importante dans les cellules endocrines que dans les autres types de cellules. Afin d'examiner le rôle d'*Ucp2*, nous avons généré des embryons mutants

Ucp2<sup>-/-</sup>. Ces animaux avaient une morphologie normale pendant leur développement. À E16,5, E19,5 et 2 jours après la naissance, la taille du pancréas était doublée chez les mutants. De plus, les surfaces de marquage avec des anticorps anti-insuline, anti-glucagon et anti-amylase étaient également augmentées chez les mutants Ucp2<sup>-/-</sup> par rapport aux témoins. À E16,5, le nombre de cellules précurseurs exprimant la neurogénine 3 (NGN3), un facteur proendocrine, était lui aussi augmenté, de façon proportionnelle à la taille du pancréas.

Afin de mieux comprendre le mécanisme cellulaire responsable de l'augmentation de la taille du pancréas, nous avons alors mesuré la prolifération des cellules précurseurs exprimant PDX1 (*Pancreatic and Duodenal Homeobox 1*) à E13,5. Nous avons ainsi trouvé une augmentation significative de la prolifération des cellules progénitrices. Au niveau moléculaire, 2 mécanismes principaux peuvent expliquer les effets biologiques d'UCP2. Tout d'abord, UCP2 peut moduler le métabolisme énergétique en modifiant la balance entre la glycolyse et la phosphorylation oxydative. En vue d'évaluer le statut énergétique des pancréas Ucp2<sup>-/-</sup>, nous avons quantifié le niveau d'ATP. Aucune différence n'a été trouvée entre les pancréas mutants et les témoins. Afin d'étudier les effets de la mutation d'Ucp2 sur le stress oxydant, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre le facteur de transcription *Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2* (NRF2). En effet, en l'absence de stress oxydant, NRF2 est associé avec la protéine *Kelch-like ECH-Associated Protein 1* (Keap1) dans le cytoplasme de la cellule. Cela favorise la dégradation de NRF2 par le protéasome. Lorsque le niveau d'oxydation augmente, les oxydants peuvent modifier les résidus cystéines de Keap1, conduisant à une stabilisation de NRF2 et à sa translocation vers le noyau de la cellule. De façon intéressante, nous avons observé que, à E13,5, NRF2 n'était présent qu'à la périphérie des noyaux dans les pancréas des souris sauvages (WT), tandis qu'une translocation nucléaire de NRF2 était observée chez les mutants Ucp2<sup>-/-</sup>. À E16,5, la translocation de NRF2 était trouvée à la fois chez les mutants et chez les témoins, dans des régions riches en cellules  $\beta$ . Toutefois, la quantité de cellules exprimant NRF2 était plus importante chez les mutants. Ces résultats suggèrent que la mutation du gène Ucp2 entraîne une augmentation du niveau de ROS. La quantification de l'oxydation des protéines nous a permis de confirmer cette hypothèse.

La question suivante était de savoir quelle voie de signalisation était modulée par l'absence d'UCP2. Nous avons donc étudié la voie AKT, qui est sensible aux niveaux de

ROS. En l'absence d'UCP2, nous avons découvert que l'activation de la voie AKT était augmentée par rapport aux témoins. L'activation de la voie ROS-AKT contrôlerait donc la croissance du pancréas des souris Ucp2<sup>-/-</sup>.

Afin d'approfondir le rôle du stress oxydatif, nous avons traité des souris femelles gestantes avec un antioxydant, la N-acétylcystéine (NAC), entre E12,5 et E19,5. Comme nous l'avons vu précédemment, la masse de cellules  $\alpha$  et  $\beta$  était augmentée chez les mutants Ucp2<sup>-/-</sup>. Cet effet était aboli lorsque les souris Ucp2<sup>-/-</sup> avaient reçu un traitement par la NAC.

De plus, nous avons mesuré une augmentation de la prolifération des cellules  $\alpha$  et  $\beta$  à E19,5 chez les mutants. Cet effet était également supprimé lorsque la NAC était administrée. Cela démontre que l'inactivation du gène Ucp2 contrôle le développement endocrine de façon dépendante des ROS.

Enfin, nous avons également étudié les effets de la NAC aux stades précoces du développement pancréatique. Lorsque la NAC était injectée entre E9,5 et E13,5, ce traitement réduisait la prolifération des cellules progénitrices qui était induite par la mutation d'Ucp2. L'ensemble de ces données démontre que l'absence de la protéine UCP2 conduit à une augmentation du stress oxydant qui est responsable d'une augmentation de la croissance du pancréas fœtal.

### Considérations générales sur les effets des ROS au niveau pancréatique

Durant ces 20 dernières années, les ROS ont été largement étudiées pour leurs effets cytotoxiques. Notamment, on a montré leur implication dans diverses pathologies, comme le diabète, le cancer et la maladie de Parkinson (18). Néanmoins, certains effets physiologiques des ROS ont aussi été constatés lorsqu'elles sont présentes à de faibles niveaux. On peut donc les considérer comme des molécules de signalisation (19). On sait en effet que, selon le contexte cellulaire, les ROS peuvent moduler la survie (20), la prolifération (21) et la différenciation cellulaires (22).

Récemment, nous avons analysé le rôle des ROS au cours du développement pancréatique. Nous avons montré que, lorsque des pancréas embryonnaires sont cultivés en présence de peroxyde d'hydrogène, le nombre de cellules  $\beta$  générées est augmenté. En effet, les ROS induisent, dans ce modèle, la différenciation des cellules  $\beta$  en activant la voie ERK1/2 (23). De la même façon que l'inactivation d'UCP2, ces données soutiennent l'idée que les ROS joueraient un rôle physiologique important dans le contrôle du développement du pancréas.

## La protéine mitochondriale UCP2, impliquée dans l'hyperinsulinisme congénital, agit aussi sur le développement du pancréas endocrine pendant la vie foetale

Pour illustrer ce point, il faut aussi considérer que les ROS sont des signaux nécessaires à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (24). Enfin, selon J.D. Watson, le diabète de type 2 ne serait pas causé uniquement par un excès de ROS, mais, au contraire, pourrait dans certains cas être lié à un défaut de ROS (25). Ces différents aspects sont donc à prendre en considération pour un meilleur traitement du diabète.

Les travaux de ces dernières années indiquaient donc que la protéine mitochondriale UCP2 était importante

dans le déclenchement de l'hyperinsulinisme congénital. De plus, l'accumulation des données provenant d'études indépendantes montre que c'est un facteur crucial pour le contrôle de la masse endocrine. Nos investigations récentes indiquent quant à elles que ces effets commencent dès les premiers stades du développement embryonnaire du pancréas. Ces nouveaux mécanismes devraient permettre de mieux comprendre et, potentiellement, de mieux traiter l'hyperinsulinisme congénital.

L'auteur déclare ne pas avoir de liens d'intérêts.

## RÉFÉRENCES

1. Nestorowicz A, Inagaki N, Gonoï T et al. A nonsense mutation in the inward rectifier potassium channel gene, Kir6.2, is associated with familial hyperinsulinism. *Diabetes* 1997;46:1743-8.
2. González-Barroso MM, Giurgea I, Bouillaud F et al. Mutations in UCP2 in congenital hyperinsulinism reveal a role for regulation of insulin secretion. *PLoS One* 2008;3:e3850.
3. Glaser B, Kesavan P, Heyman M et al. Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* 1998;338:226-30.
4. Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY et al. Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med* 1998;338:1352-7.
5. Clayton PT, Eaton S, Aynsley-Green A et al. Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of  $\beta$ -oxidation in insulin secretion. *J Clin Invest* 2001;108:457-65.
6. Højlund K, Hansen T, Lajer M et al. A novel syndrome of autosomal-dominant hyperinsulinemic hypoglycemia linked to a mutation in the human insulin receptor gene. *Diabetes* 2004;53:1592-8.
7. Pearson ER, Boj SF, Steele AM et al. Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS Med* 2007;4:e118.
8. Otonkoski T, Jiao H, Kaminen-Ahola N et al. Physical exercise-induced hypoglycemia caused by failed silencing of monocarboxylate transporter 1 in pancreatic  $\beta$  cells. *Am J Hum Genet* 2007;81:467-74.
9. Simmons RA. Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2006;40:917-22.
10. Vozza A, Parisi G, De Leonardis F et al. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:960-5.
11. Robson-Doucette CA, Sultan S, Allister EM et al.  $\beta$ -cell uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species production, which influences both insulin and glucagon secretion. *Diabetes* 2011;60:2710-9.
12. Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C et al. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 2001;276:8705-12.
13. Chan CB, De Leo D, Joseph JW et al. Increased uncoupling protein-2 levels in  $\beta$ -cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 2001;50:1302-10.
14. Affourtit C, Brand MD. Uncoupling protein-2 contributes significantly to high mitochondrial proton leak in INS-1E insulinoma cells and attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Biochem J* 2008;409:199-204.
15. Lee SC, Robson-Doucette CA, Wheeler MB. Uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species formation in islets and influences susceptibility to diabetogenic action of streptozotocin. *J Endocrinol* 2009;203:33-43.
16. Joseph JW, Koshkin V, Zhang CY et al. Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet. *Diabetes* 2002;51:3211-9.
17. Broche B, Ben Fradj S, Aguilar E et al. Mitochondrial protein UCP2 controls pancreas development. *Diabetes* 2018;67:78-84.
18. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 2006;5:14.
19. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:813-24.
20. Panieri E, Gogvadze V, Norberg E et al. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Radic Biol Med* 2013;57:176-87.
21. Arana L, Gangoiti P, Ouro A et al. Generation of reactive oxygen species (ROS) is a key factor for stimulation of macrophage proliferation by ceramide 1-phosphate. *Exp Cell Res* 2012;318:350-60.
22. Lee H, Lee YJ, Choi H, Ko EH, Kim JW. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem* 2009;284:10601-9.
23. Hoarau E, Chandra V, Rustin P, Scharfmann R, Duvillie B. Pro-oxidant/antioxidant balance controls pancreatic  $\beta$ -cell differentiation through the ERK1/2 pathway. *Cell Death Dis* 2014;5:e1487.
24. Leloup C, Tourrel-Cuzin C, Magnan C et al. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2009;58:673-81.
25. Watson JD. Type 2 diabetes as a redox disease. *Lancet* 2014;383:841-3.