

**Rapport d'activité Allocation SFD 2014 jeune chercheur francophone**  
**Projet AUTODIA attribué à Olivia Lenoir**

Le projet financé par la SFD avait pour objectif l'étude du rôle de l'autophagie dans le développement des complications microvasculaires rénales et rétinienne du diabète (projet AUTODIA). Le financement de 40 000 € accordé a été intégralement utilisé pour payer le salaire post-doctoral d'Olivia Lenoir.

Pour cela notre laboratoire avait préalablement généré des souris déficientes en autophagie endothéliale (souris *Cdh5-cre Atg5<sup>lox/lox</sup>* ou *Atg5<sup>Δve</sup>*)

6 objectifs avaient été décrits initialement dans le projet:

1) Etude de la réactivité vasculaire rénale à l'état basal et au cours du diabète.

La réactivité vasculaire rénale en réponse au flux et l'acétylcholine a été étudiée en collaboration avec l'équipe de D Henrion (Angers) sur des reins isolés-perfusés de souris sauvages ou déficientes pour l'autophagie endothéliale. Cette étude a permis de montrer que les souris déficientes en autophagie endothéliale présentent une réponse vasculaire rénale beaucoup plus importante en réponse à des niveaux croissants de flux que les souris WT. Ces résultats montrent que les souris *Atg5<sup>Δve</sup>* ont un défaut de dilatation au flux, suggérant une altération de la fonction endothéliale. Pour le moment ces expériences n'ont pas encore été réalisées dans un contexte diabétique.

2) Etude de la réactivité et de la perméabilité de la microcirculation au cours du diabète.

Sur des souris sauvages et *Atg5<sup>Δve</sup>*, nous avons testé en parallèle l'effet de la modulation de l'autophagie sur la relaxation de la microcirculation médiée par l'acétylcholine, et par le nitroprussiate de sodium. Cette étude a été réalisée par microscopie intravitale sur le muscle crémaster sur des souris anesthésiées, en collaboration avec Pierre Nivoit, ingénieur dans notre équipe. L'étude de la diffusion d'une solution de dextran fluorescent (dextran-FITC 70 kD) dans la microcirculation du crémaster a également été réalisée par microscopie intravitale. Nous n'avons pas observé de différence de réactivité et de perméabilité de la microcirculation entre les souris WT et *Atg5<sup>Δve</sup>* à l'état basal. Cette expérience devra maintenant être réalisée sur des souris diabétiques.

3) Etude de la raréfaction capillaire chez les souris diabétiques *Atg5<sup>Δve</sup>*.

La microangiopathie diabétique étant caractérisée par une raréfaction capillaire générale, nous avons étudié le rôle de l'autophagie endothéliale dans ce phénomène. Pour cela, nous avons analysé la densité capillaire sur coupes de cœur, et de rein des souris diabétiques WT et *Atg5<sup>Δve</sup>* par quantification des capillaires après marquage à la lectin B4 fluorescente ou par un marquage anti PECAM1. Nous avons observé que les souris diabétiques déficientes en autophagie endothéliale présentent une raréfaction capillaire plus importante que les souris WT, suggérant que l'autophagie endothéliale protège de l'apoptose induite par l'hyperglycémie.

4) Effet de la déficience en autophagie endothéliale sur le développement de la néphropathie diabétique.

Le développement de la néphropathie diabétique a été quantifiée grâce aux paramètres physiologiques (urée plasmatique, microalbuminurie, poids des reins) et histologiques (trichrome de Masson, coloration hématoxyline/éosine). Nous nous sommes attachés à décrire précisément les lésions glomérulaires chez ces souris en focalisant sur la perte podocytaire appréciée par la densité de marquage pour le facteur de transcription WT-1 et la glomérulosclérose qui ont été analysées par des marquages immunohistochimiques et en microscopie électronique. Les analyses des anomalies de l'ultrastructure glomérulaire et en particulier endothéliale par la microscopie électronique à transmission a été réalisée à la

plateforme de microscopie de l'institut Cochin (Paris). Nous avons montré que les souris diabétiques déficientes pour l'autophagie endothéliale sont plus sensibles au développement de la néphropathie diabétique. En effet, elles présentent des taux de microalbumine urinaire plus importants, et développent des lésions endothéliales, mais aussi de sclérose mésangiale, beaucoup plus sévères que les souris WT. Ces résultats montrent que l'autophagie endothéliale est protectrice pour la barrière de filtration glomérulaire dans un contexte diabétique.

5) Effet de la déficience en autophagie endothéliale sur le développement de la rétinopathie diabétique.

Nous avons analysé les rétines des souris diabétiques contrôles et déficientes en autophagie endothéliales en collaboration avec l'Institut de la Vision (X Guillonnet). La souris est un mauvais modèle de lésions de rétinopathie diabétique, en particulier le fond génétique C57BL6/J. En effet, chez la souris diabétique il est difficile d'observer dans les rétines une perte péricytaire, une apoptose endothéliale ou une rétinopathie proliférative. Nous n'avons pas observé de phénotype typique de la rétinopathie diabétique chez les souris analysées, qu'elles soient contrôle ou Atg5<sup>Δve</sup>, probablement car le modèle de diabète utilisé n'était pas adapté pour l'étude de la rétinopathie diabétique.

6) Expériences in vitro sur des cultures de cellules endothéliales afin de disséquer :

- les mécanismes impliqués dans la régulation de l'autophagie endothéliale,
- l'effet de la déficience en autophagie sur la fonction, la prolifération et la survie des cellules endothéliales sous traitement avec des fortes concentrations de glucose ou de mannitol.

Nous avons utilisé des HUVEC et analysé leur flux autophagique à l'état basal et en présence de fortes concentrations de glucose. Nous avons montré que 48H d'exposition à 30mM de glucose inhibe le flux autophagique. La conséquence sur la survie et la fonction des cellules endothéliales est en cours d'exploration.

Le projet financé par la SFD a fait l'objet de 2 publications et a été présenté dans 2 congrès européens. La SFD a été remerciée dans les 2 publications et dans les congrès.

#### Publications:

- [Autophagy in kidney disease and aging: lessons from rodent models](#). Lenoir O, Tharaux PL, Huber TB. *Kidney Int.* 2016 Jun 18. pii: S0085-2538(16)30173-9. PMID: 27325184

- [Endothelial cell and podocyte autophagy synergistically protect from diabetes-induced glomerulosclerosis](#). Lenoir O, Jasiak M, Hénique C, Guyonnet L, Hartleben B, Bork T, Chipont A, Flosseau K, Bensaada I, Schmitt A, Massé JM, Souyri M, Huber TB, Tharaux PL. *Autophagy*. 2015;11(7):1130-45. PMID: 26039325

#### Congrès:

- Gordon Research Seminar (GRS): Endothelial cell phenotypes in health and disease. Girone, Espagne (Juillet 2014).

Communication orale et poster: Endothelial autophagy during microvascular complications of diabetes.

- Gordon Research Conference (GRC): Autophagy in stress, development and disease. Barga, Italie (Mars 2014).

Poster: Autophagy is beneficial for podocytes and glomerular endothelial cells during diabetes-induced nephropathy.