

Rapport d'activité final Allocation SFD-Antadir 2013

Tarik Issad

Projet : O-GlcNAc glycosylation dans le macrophage : rôle potentiel dans les processus inflammatoires associés à l'hyperglycémie chronique

Au cours des dernières décennies, les modifications comportementales ont conduit à une forte augmentation de la prévalence des maladies métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2. L'hyperglycémie chronique associée à ces maladies a des effets délétères sur de nombreux tissus, entraînant de graves complications (glucotoxicité). Parmi les différents mécanismes impliqués dans les effets toxiques du glucose, la O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAc) des protéines joue un rôle très important. La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle réversible qui régule l'activité des protéines cytosoliques et nucléaires en fonction de la disponibilité en glucose. Deux enzymes seulement, l'O-GlcNAc transférase (OGT) et l'O-GlcNAcase (OGA), ajoutent ou retirent le groupement GlcNAc sur les protéines, respectivement. Cette modification dépend étroitement de la disponibilité en glucose et de son flux à travers la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP).

Les maladies métaboliques comme le diabète et l'obésité se caractérisent par ailleurs par une inflammation chronique à bas bruit, qui participe également aux complications observées dans ces pathologies. Les perturbations métaboliques associées à ces maladies (augmentation des acides gras libres et du glucose) favorisent les processus pro-inflammatoires dans le macrophage. Cependant, les relations entre processus inflammatoires et O-GlcNAcylation des protéines restent peu explorées. Le but de ce travail était d'évaluer l'implication de la voie de O-GlcNAcylation dans le macrophage.

Les études ont été réalisées en utilisant la lignée de macrophages murins RAW264.7 ou des macrophages, différenciés à partir de moelle osseuse de souris, des macrophages péritonéaux de souris ou des macrophages différenciés à partir de monocytes humains. La O-GlcNAcylation des protéines a été mesurée dans les macrophages RAW264.7 à l'aide d'un biosenseur BRET adressé dans différents compartiments cellulaires. Nous avons observé que l'activation du Toll-like receptor (TLR) 4 par le LPS (lipopolysaccharide) augmente le signal de BRET à la membrane plasmique, dans le cytosol et le noyau des cellules RAW264.7. Une augmentation de la O-GlcNAcylation induite par le LPS était également observée par western

blotting dans les cellules RAW264.7 et dans les macrophages primaires de souris et humains. Cette augmentation de O-GlcNAcylation était en particulier détectée sur la sous-unité p65 du facteur de transcription NFκB, suggérant un rôle de cette modification dans les effets pro-inflammatoires du LPS. En accord avec cette notion, l'inhibition de l'OGA, (responsable de la dé-GlcNAcylation des protéines) à l'aide d'un inhibiteur spécifique (Thiamet G), potentialise les effets du LPS sur l'expression des ARNm de deux pro-inflammatoires : la cytokine IL1β ainsi que NOS2.

Nous avons en outre généré un modèle de souris OGT-KO inducible au tamoxifène. L'inactivation de l'OGT dans les macrophages primaires de ces souris réduit l'effet du LPS sur l'expression des ARNm de l'IL1β d'un facteur 2, suggérant que l'induction de la O-GlcNAcylation est au moins en partie impliquée dans la transmission des effets pro-inflammatoires du LPS.

Afin d'évaluer le rôle de NOS2 sur la O-GlcNAcylation des protéines dans les macrophages, nous avons utilisé des macrophages primaires de souris délétées pour NOS2. Nous avons observé que bien que la délétion de NOS2 ait tendance à induire une augmentation du niveau basal de O-GlcNAcylation dans certaines expériences, elle ne modifie pas significativement la O-GlcNAcylation induite par le LPS. Ceci suggère que les effets du LPS sur la O-GlcNAcylation sont médiés par un mécanisme indépendant du NO

Afin d'élucider les mécanismes responsables de l'augmentation de O-GlcNAcylation induite par le LPS, nous avons étudié, dans les cellules RAW264.7, l'effet du LPS sur les enzymes impliquées dans la voie O-GlcNAc. Nous avons observé que le traitement au LPS n'a pas d'effet sur l'expression (ARNm et protéine) et sur les activités enzymatiques de l'OGT et de l'OGA. En revanche, le LPS induit une forte augmentation de l'expression (ARNm et protéine) de la glutamine : fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT), enzyme limitante de la voie HBP. L'inhibition de la GFAT à l'aide de 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) inhibe la O-GlcNAcylation induite par le LPS et l'augmentation d'expression des ARNm de l'IL1β, mais pas celle de NOS2, confirmant une dépendance partielle des effets pro-inflammatoires du LPS vis-à-vis de la voie O-GlcNAc.

En conclusion, nos résultats indiquent que l'activation de la voie de O-GlcNAcylation pourrait faire partie intégrante du signal induit par le TLR4, et suggèrent que cette voie est impliquée dans une partie des effets pro-inflammatoires du LPS dans le macrophage.

Ce travail a donné lieu à :

- Une thèse de Doctorat soutenue par Léa Baudoin le 07-04-2017

- Un article actuellement en cours de finition, qui sera soumis dans les semaines à venir :
The pro-inflammatory effects of LPS involve increased glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) expression and protein O-GlcNAcylation in macrophages.
Léa Baudoin, Hasanain Al-Mukh, Mostafa Khair, Laura Francese, Florence Niedergang and Tarik Issad.

- Une revue publiée :

O-GlcNAcylation and Inflammation: A vast territory to explore.

Baudoin, L and Issad, T. (2015) Frontiers in Endocrinology
doi: 10.3389/fendo.2014.00235

- Une communication orale :

TLR4 activation induces O-GlcNAcylation in macrophages via a NOS2-dependent mechanism.

Léa Baudoin, Hasanain Al-Mukh, Mostafa Khair, Florence Niedergang and Tarik Issad.
Protein O-GlcNAcylation in Health and Disease, 8 juillet 2016, Darwin House, Londres

- Deux communications par affiche :

O-GlcNAcylation in Macrophage: A role in high glucose mediated inflammation?

Léa Baudoin, Mostafa Khair, Florence Niedergang and Tarik Issad.

Colloque annuel du CORDDIM, 16 septembre 2015, Université Paris Diderot, Paris

L'activation de la voie du TLR4 dans les macrophages induit la O-GlcNAcylation des protéines par un mécanisme dépendant de la nitric-oxyde synthase NOS2

Hasanain Al-Mukh, Léa Baudoin, Mostafa Khair, Florence Niedergang et Tarik Issad.
Congrès 2017 de la Société Francophone du Diabète, Grand Palais de Lille

Fait à PARIS le 21/04/2017



Tarik ISSAD