

Automnales du GRRC 2015
4/6 novembre 2015

Influence de l'hyperglycémie sur la méthylation de l'ADN

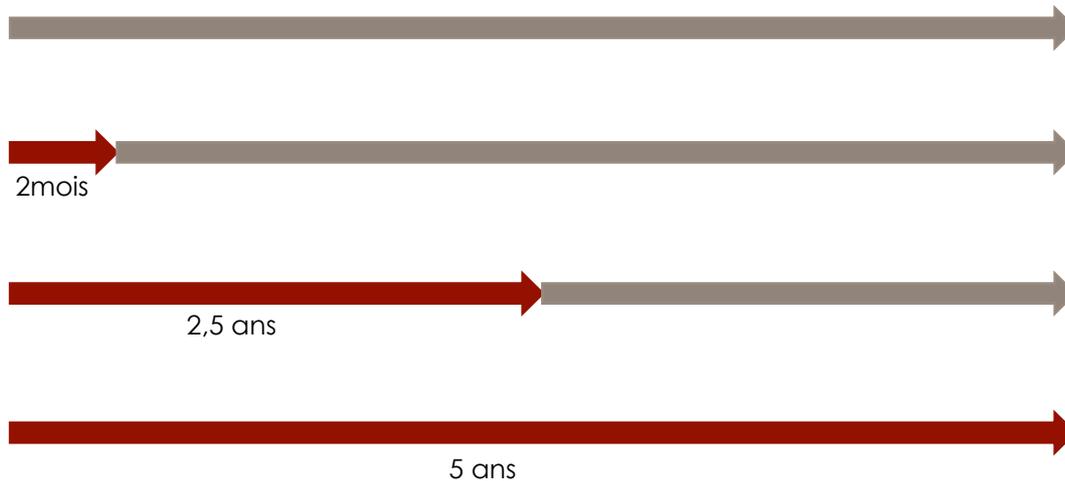
Delphine Fradin – Inserm U892

Conséquences de l'hyperglycémie

- Hyperglycémie a des conséquences physiologiques:
 - Hyperinsulinémie
 - Stimule/réprime la transcription
- Hyperglycémie a des conséquences physiopathologiques:
 - Insuffisance rénale
 - Rétinopathie
 - Artériopathie
 - Gangrènes des extrémités...
- Hyperglycémie a des effets
 - À long terme
 - Durables : mémoire métabolique

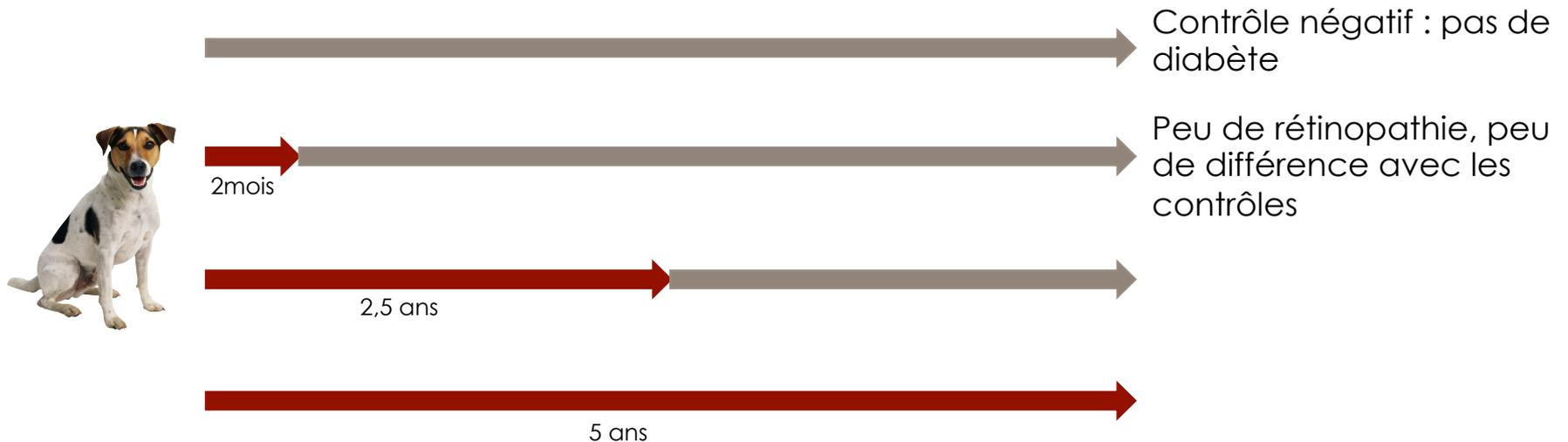
Mémoire métabolique

- ▣ = perturbation précoce et transitoire de la glycémie ayant des conséquences durables même après retour à l'état «normal».
- ▣ Engerman and Kern (1987)



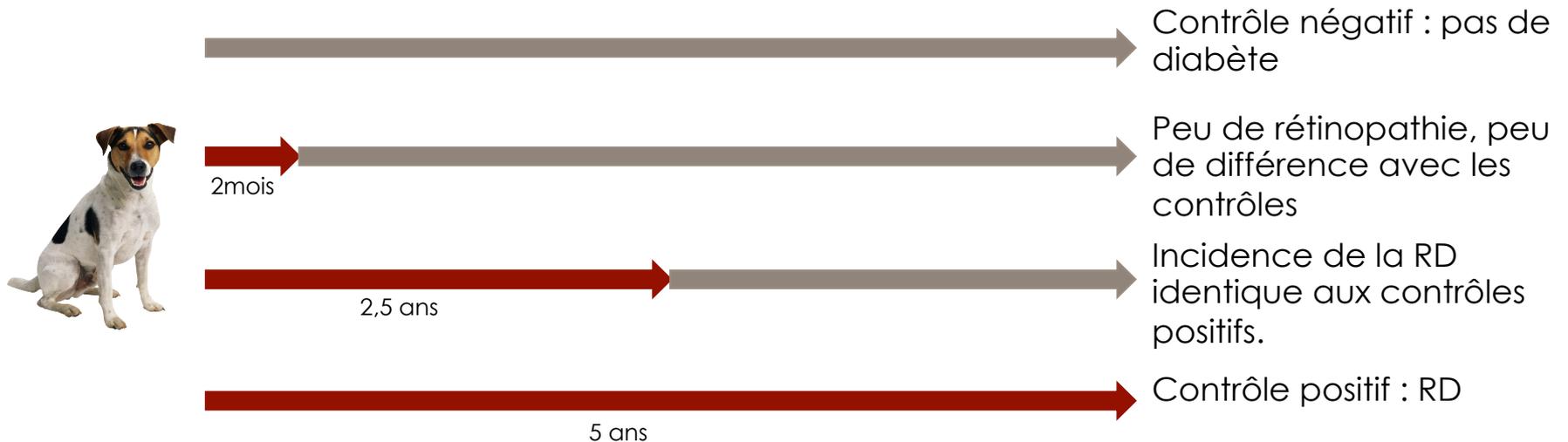
Mémoire métabolique

- ▣ = perturbation précoce et transitoire de la glycémie ayant des conséquences durables même après retour à l'état «normal».
- ▣ Engerman and Kern (1987)



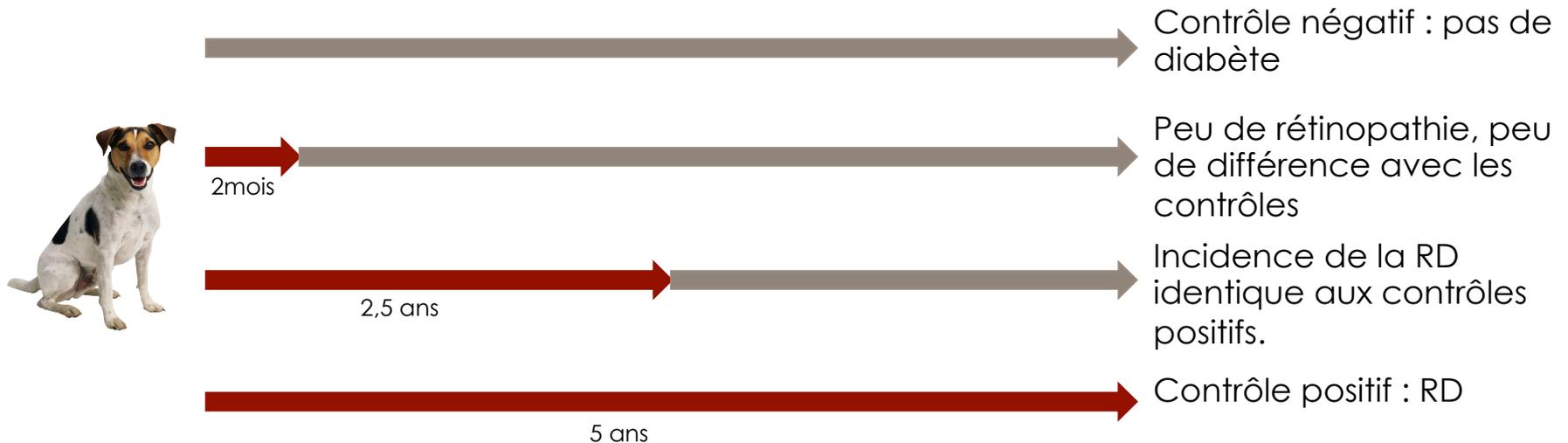
Mémoire métabolique

- = perturbation précoce et transitoire de la glycémie ayant des conséquences durables même après retour à l'état «normal».
- Engerman and Kern (1987)



Mémoire métabolique

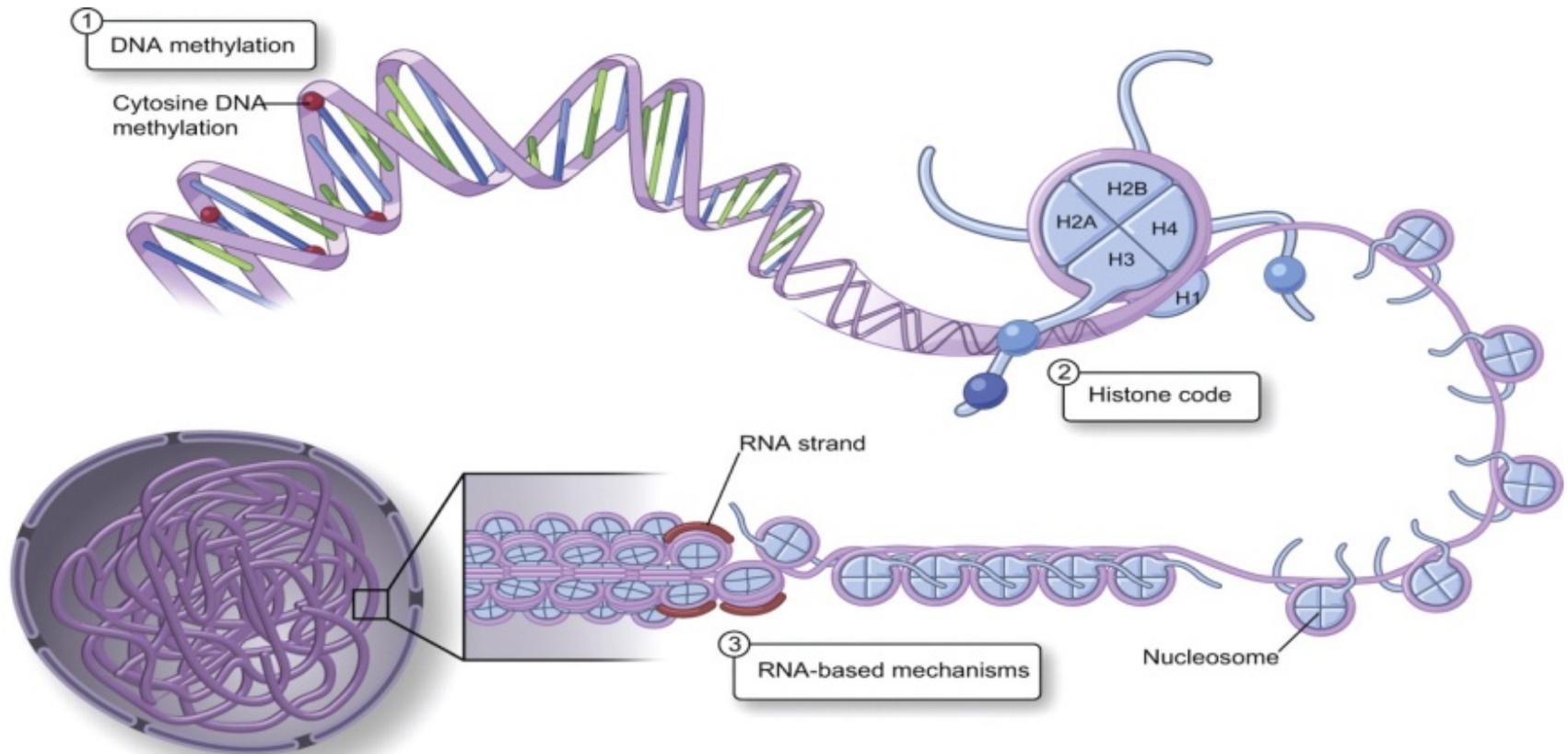
- ▣ = perturbation précoce et transitoire de la glycémie ayant des conséquences durables même après retour à l'état «normal».
- ▣ Engerman and Kern (1987)



- **Hypothèse : Rôle des marques épigénétiques dans le maintien de cette mémoire métabolique.**

Epigénétique

- = tout changement d'activité du génome, sans changement de la séquence d'ADN et héritable au cours des divisions cellulaires.

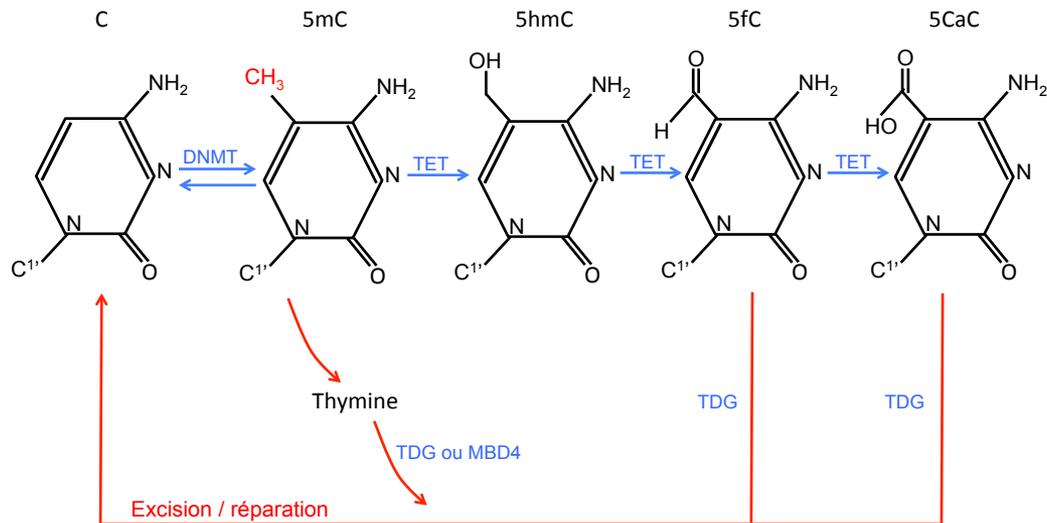


La méthylation de l'ADN

- Addition covalente d'un groupement méthyle sur le carbone 5 d'une cytosine
- Réaction catalysée par les DNA methyltransferases (DNMTs):
 - DNMT1
 - DNMT3...

La méthylation de l'ADN

- Addition covalente d'un groupement méthyle sur le carbone 5 d'une cytosine
- Réaction catalysée par les DNA methyltransferases (DNMTs):
 - DNMT1
 - DNMT3...
- Déméthylation active catalysée par les protéines TETs



Modèle de mémoire métabolique

▣ Zebrafish



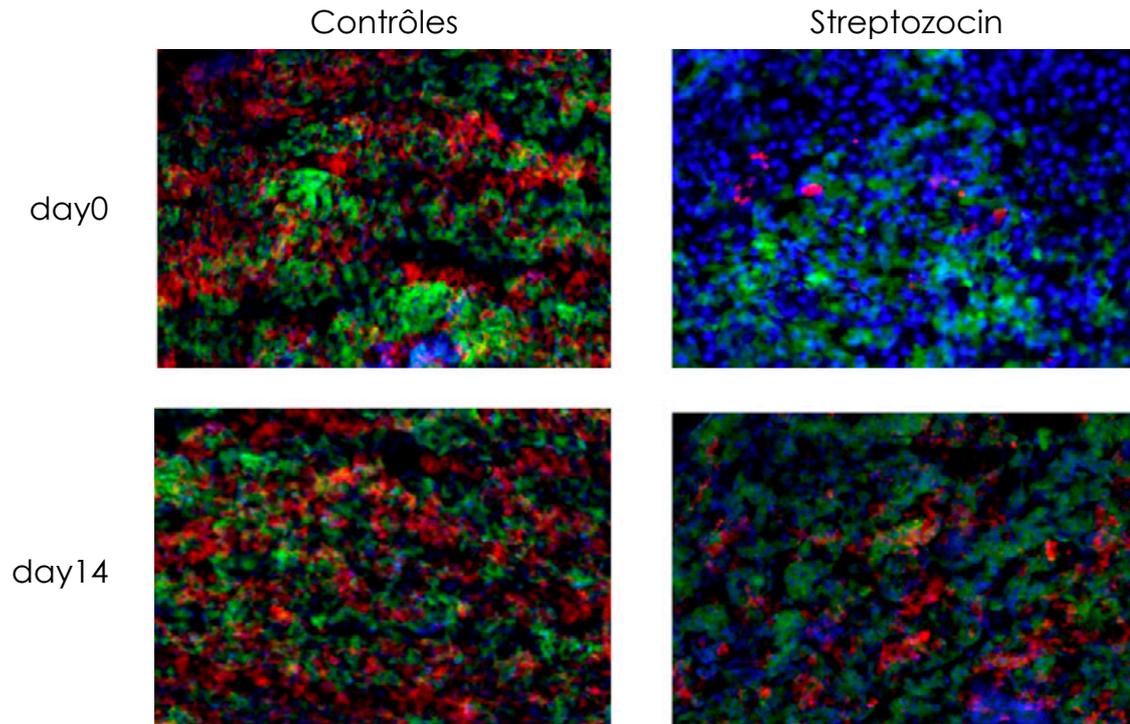
Modèle de mémoire métabolique

- ▣ Zebrafish
- ▣ Hyperglycémie induite par la streptozocin



Modèle de mémoire métabolique

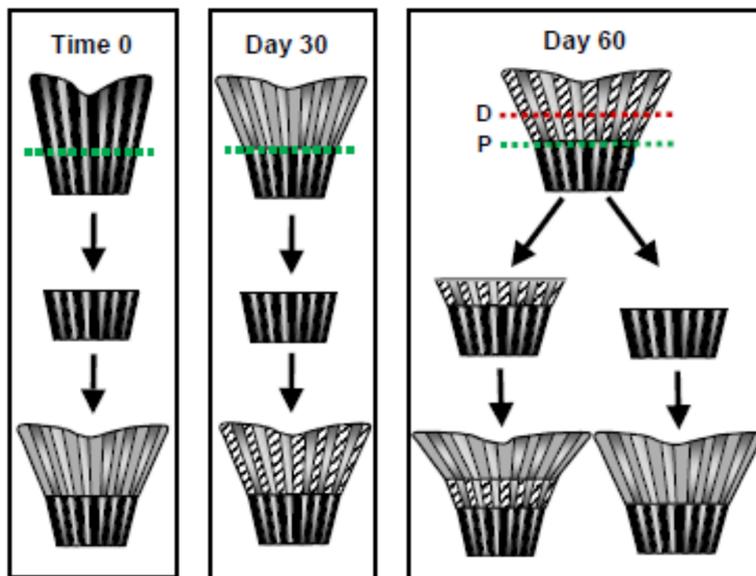
- ▣ Zebrafish
- ▣ Hyperglycémie induite par la streptozocin
- ▣ Zebrafish capable de régénérer des cellules β pancréatiques après l'arrêt de la streptozocin



Olsen et al. 2012

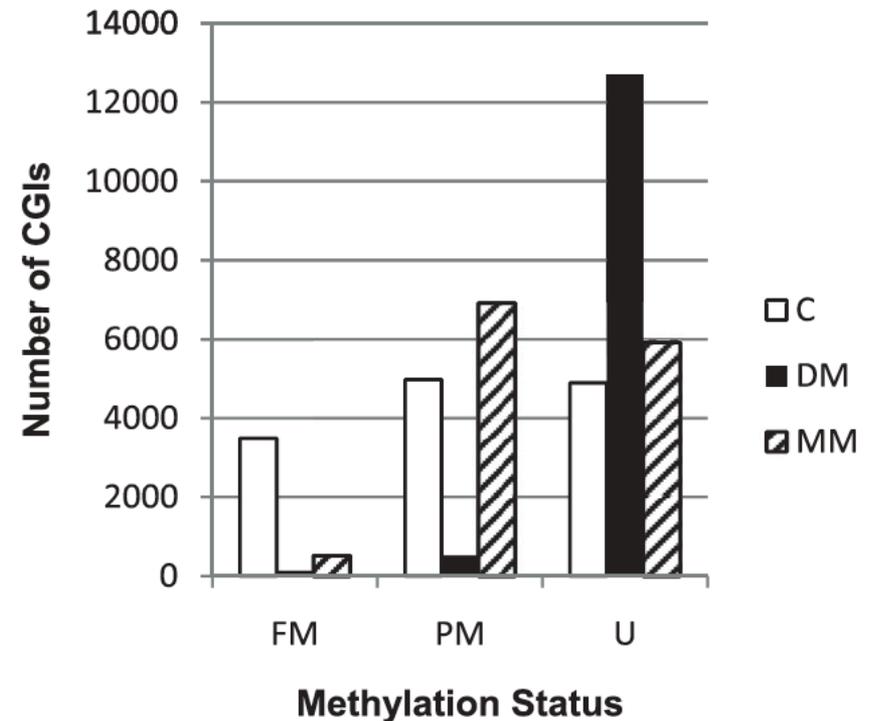
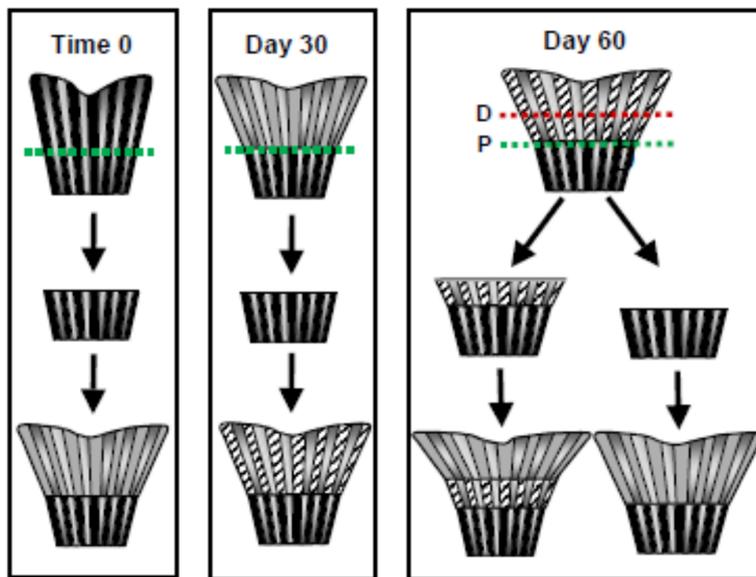
Modèle de mémoire métabolique

- Complications : rétinopathie, néphropathie, mauvaise régénération de la nageoire caudale
- Mesure de la méthylation et mémoire métabolique :



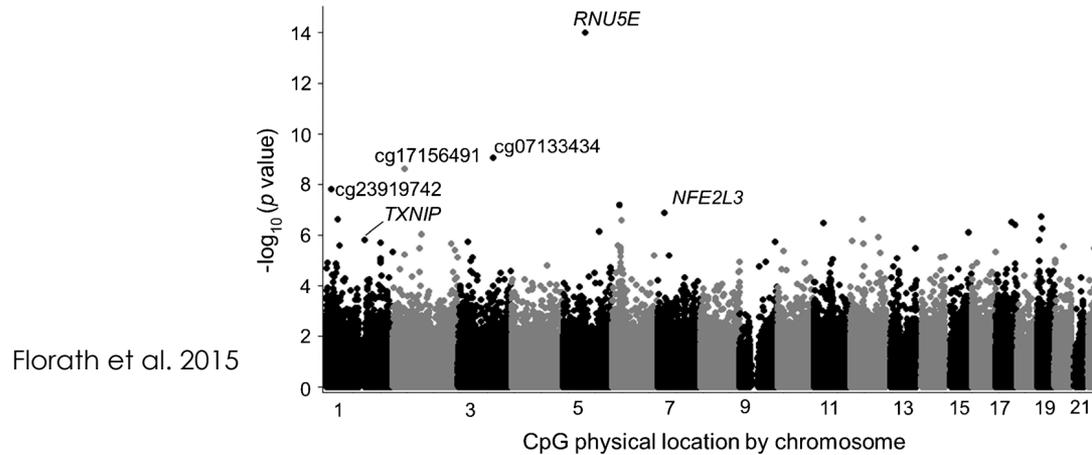
Modèle de mémoire métabolique

- Complications : rétinopathie, néphropathie, mauvaise régénération de la nageoire caudale
- Mesure de la méthylation et mémoire métabolique :



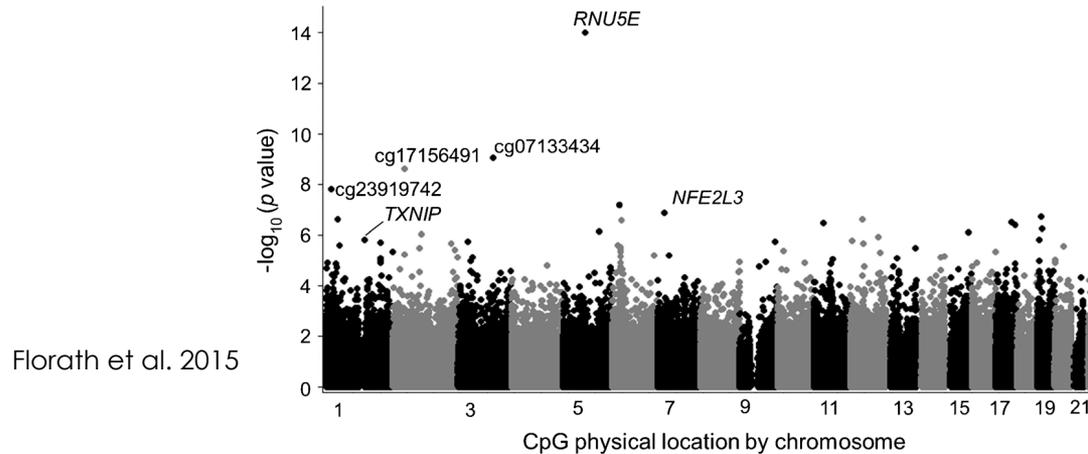
Association glycémie/méthylation

- Chez les diabétiques de type 2
 - Dans le sang des patients

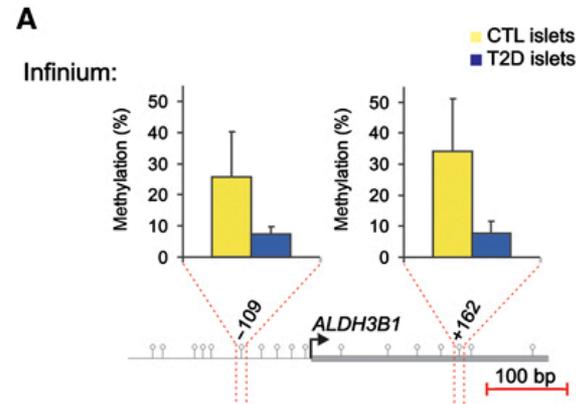
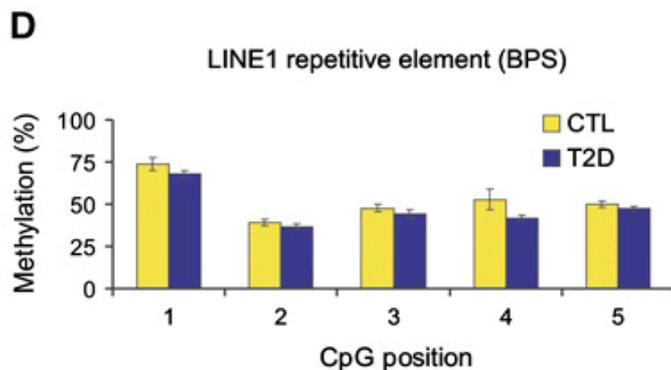


Association glycémie/méthylation

- Chez les diabétiques de type 2
 - Dans le sang des patients



- Dans les tissus cibles



Volkmar et al. 2012

Complexité ?

- ▣ Le diabète de type 2...
 - ▣ Hyperglycémie
 - ▣ Élévation des triglycérides plasmatiques
 - ▣ Diminution du taux HDL-cholesterol
 - ▣ Élévation des protéines de l'inflammation
 - ▣ Élévation de l'uricémie
 - ▣ Élévation de l'homocystéinémie
 - ▣ Modification du profil hormonal (SHBG)
 - ▣ Obésité...

Complexité ?

- ▣ Le diabète de type 2...
 - ▣ Hyperglycémie
 - ▣ Élévation des triglycérides plasmatiques
 - ▣ Diminution du taux HDL-cholesterol
 - ▣ Élévation des protéines de l'inflammation
 - ▣ Élévation de l'uricémie
 - ▣ Élévation de l'homocystéinémie
 - ▣ Modification du profil hormonal (SHBG)
 - ▣ Obésité...

Qui fait quoi ?

Quel est l'impact de l'hyperglycémie ?

Cause ou conséquence ?

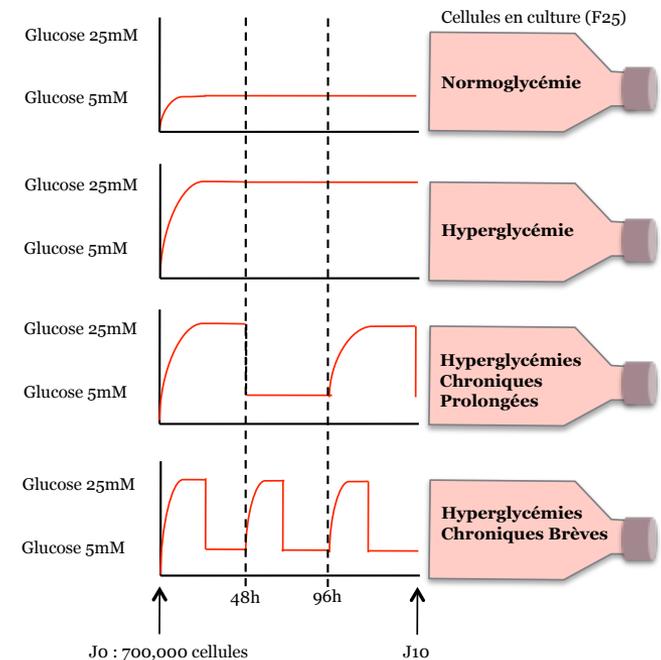
Modèle cellulaire : BTC3

▣ Conditions :

- ▣ Hyperglycémie pendant 10j (25mM)
- ▣ Normoglycémie pendant 10j (5mM)
- ▣ 5-aza-2-deoxycytidine pendant 10j

▣ Analyses :

- ▣ Méthylome = puce Nimbelgen
- ▣ Transcriptome = puce Affymetrix



Modèle cellulaire : BTC3

173 gènes différentiellement méthylés en réponse au glucose ($p < 0.05$)

- Enrichissement de la voie « cell death and survival » $p = 1.10^{-4}$

1612 gènes différentiellement exprimés en réponse au glucose ($p < 0.05$)

- Régulation par le facteur PDX-1

Modèle cellulaire : BTC3

173 gènes différentiellement méthylés en réponse au glucose ($p < 0.05$)

1612 gènes différentiellement exprimés en réponse au glucose ($p < 0.05$)

14 gènes dont l'expression et la méthylation sont modifiées en réponse au glucose

Table 3. List of the 14 genes showing both a DNA methylation and gene expression changes in response to hyperglycemia.

Gene	Methylation		Expression	
	LG mean methylation	HG mean methylation	Fold change HG/LG	Fold change 5-aza-dC/LG
<i>Pp2ac</i>	0.20	0.16	1.1	1.4
<i>Cish</i>	0.16	0.13	-1.2	-
<i>Gpr12</i>	0.10	0.12	-1.2	-
<i>Htr2a</i>	0.21	0.18	-1.3	-
<i>Sntg2</i>	0.24	0.20	-1.1	1.2
<i>Slc25a25</i>	0.20	0.31	1.2	-
<i>Bspry</i>	0.17	0.20	1.1	-
<i>Tle2</i>	0.18	0.16	-1.1	-
<i>Btbd10</i>	0.24	0.31	1.2	-
<i>Crygs</i>	0.38	0.29	-1.2	-
<i>Olfcr810</i>	0.61	0.54	-1.3	-
<i>Tm6sf2</i>	0.15	0.18	-1.1	-
<i>Naalad2</i>	0.29	0.23	1.2	-
<i>Rbm3</i>	0.11	0.12	-1.1	-1.4

Modèle cellulaire : BTC3

173 gènes différentiellement méthylés en réponse au glucose ($p < 0.05$)

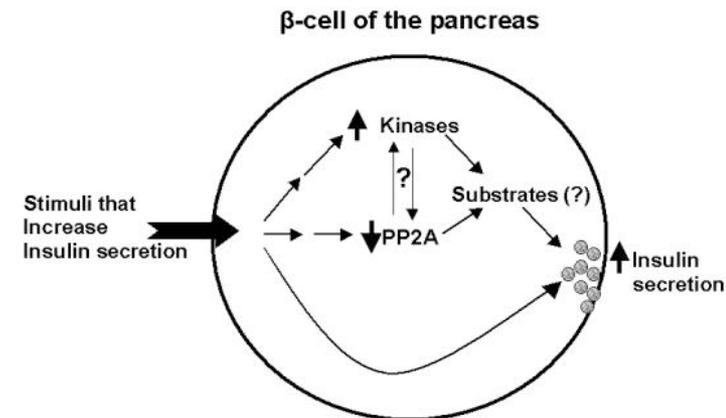
1612 gènes différentiellement exprimés en réponse au glucose ($p < 0.05$)

14 gènes dont l'expression et la méthylation sont modifiées en réponse au glucose

Traitement des cellules à la 5-aza-dC

3 gènes dont la méthylation régule l'expression du gène

Pp2ac
Rbm3
Sntg2



Parameswara et al. 2005

Modèle cellulaire : BTC3

173 gènes différentiellement méthylés en réponse au glucose ($p < 0.05$)

1612 gènes différentiellement exprimés en réponse au glucose ($p < 0.05$)

14 gènes dont l'expression et la méthylation sont modifiées en réponse au glucose

Traitement des cellules à la 5-aza-dC

3 gènes dont la méthylation régule l'expression du gène

1 gène dont la méthylation régule l'expression du gène et dont la méthylation et l'expression sont modifiées en réponse au glucose = **PP2AC** (méthylation ↓ , expression ↑)

Validation des résultats de méthylation au pyroséquenceur et de l'expression en RT-qPCR

Modèle cellulaire : BTC3

173 gènes différentiellement méthylés en réponse au glucose ($p < 0.05$)

1612 gènes différentiellement exprimés en réponse au glucose ($p < 0.05$)

14 gènes dont l'expression et la méthylation sont modifiées en réponse au glucose

Traitement des cellules à la 5-aza-dC

3 gènes dont la méthylation régule l'expression du gène

1 gène dont la méthylation régule l'expression du gène et dont la méthylation et l'expression sont modifiées en réponse au glucose = **PP2AC** (méthylation ↓ , expression ↑)

Validation des résultats de méthylation au pyroséquenceur et de l'expression en RT-qPCR

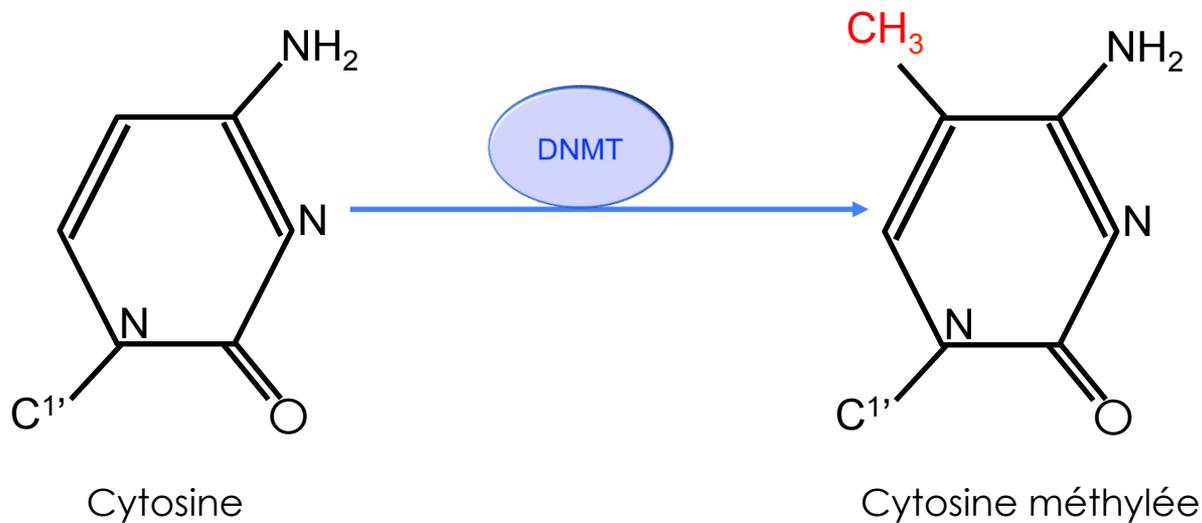
Etude de la méthylation du gène *PP2AC* chez des patients diabétiques comparés au contrôles et mises en évidence d'une hypométhylation du gène chez les diabétiques

Mécanismes

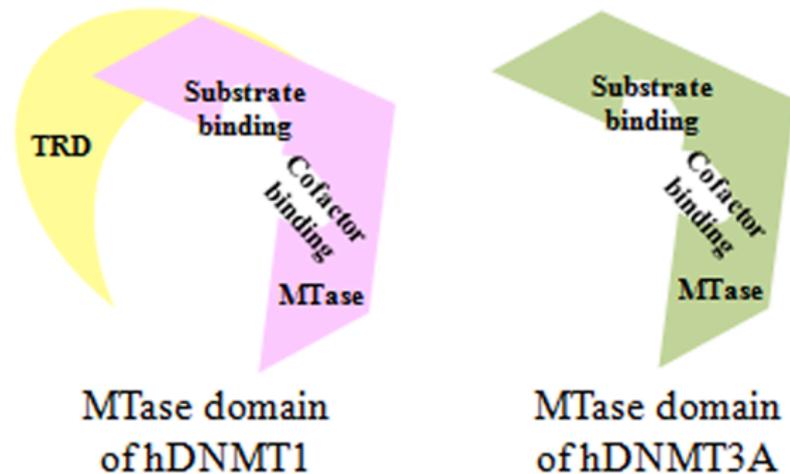
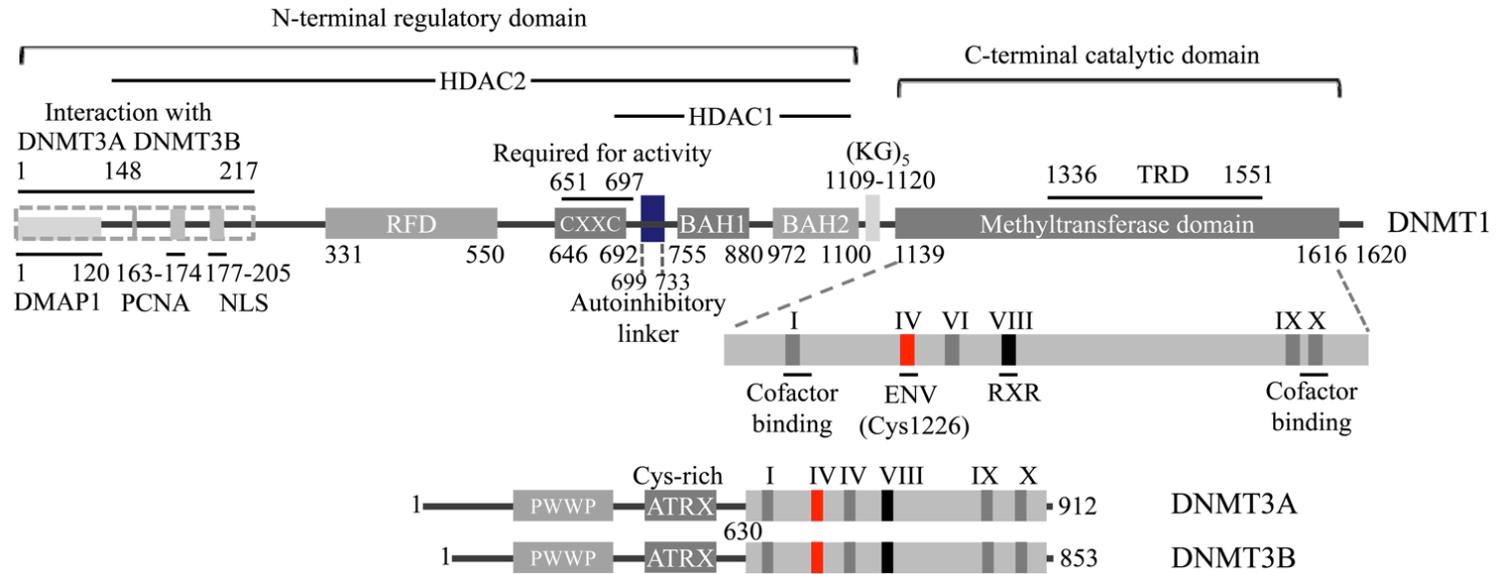
Comment l'hyperglycémie peut-elle modifier la méthylation de l'ADN ?

Méthylation de l'ADN

- Addition covalente d'un groupement méthyle sur le carbone 5 d'une cytosine

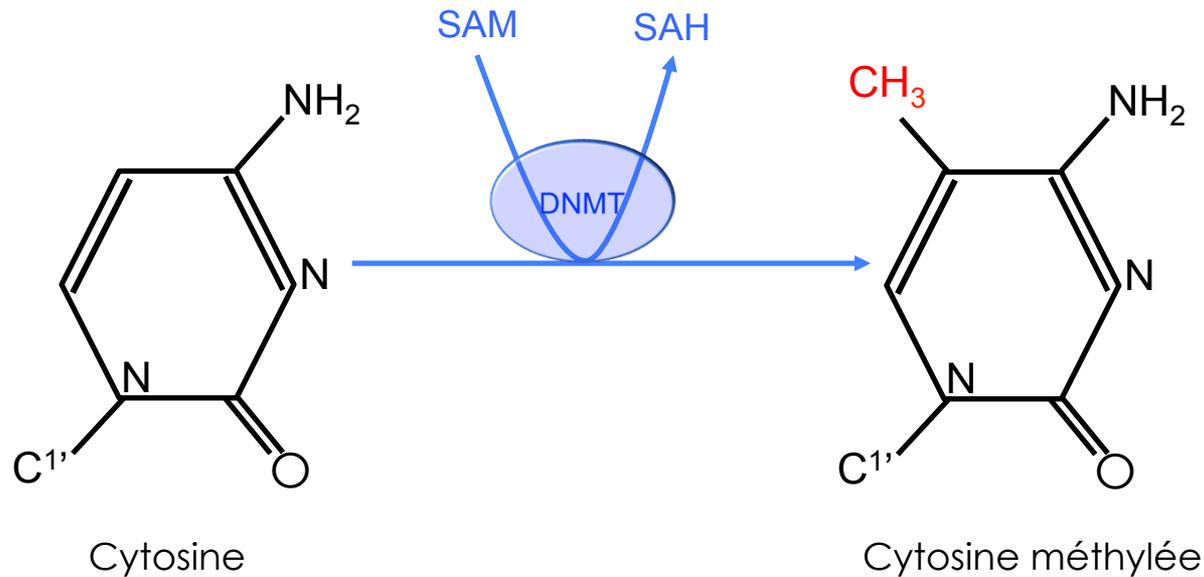


DNMTs

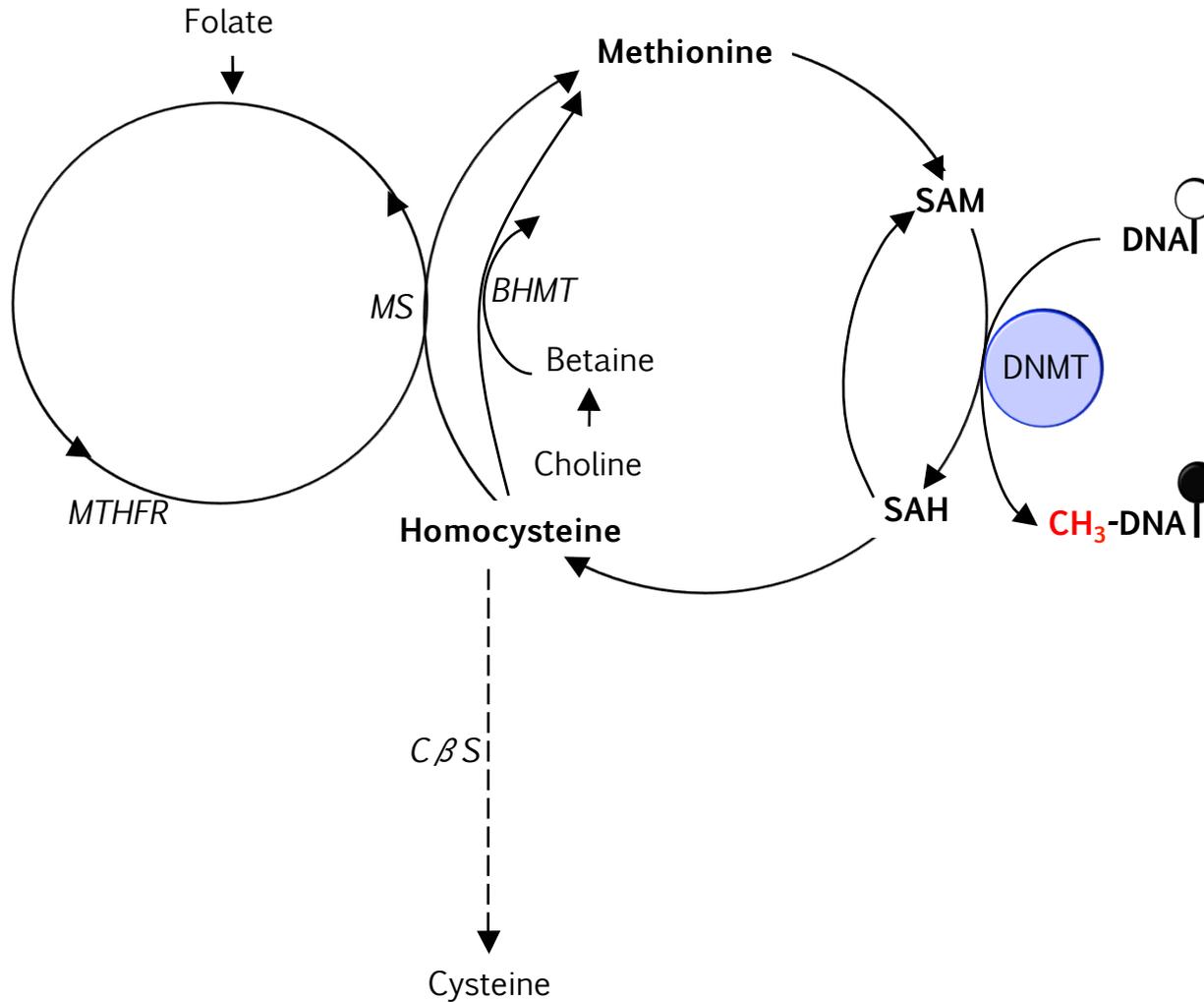


Méthylation de l'ADN

- Addition covalente d'un groupement méthyle sur le carbone 5 d'une cytosine

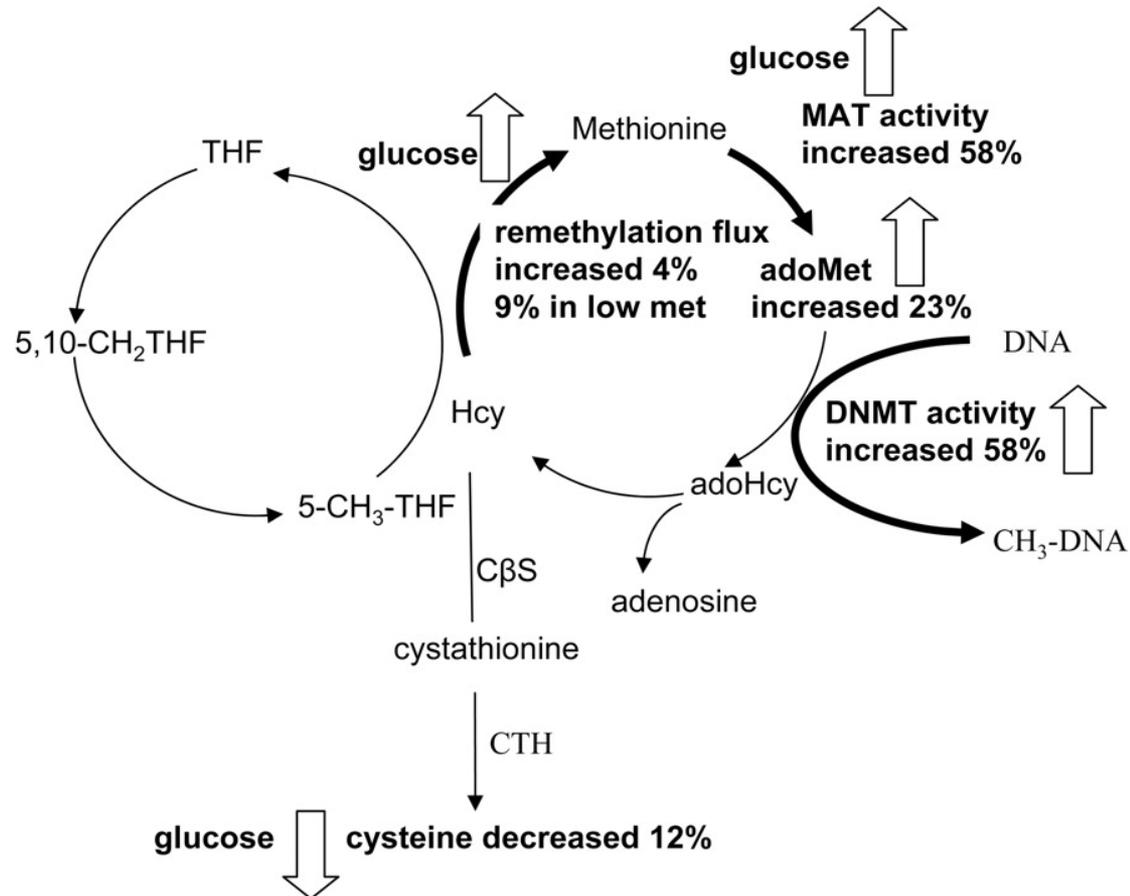


Les groupements méthyles

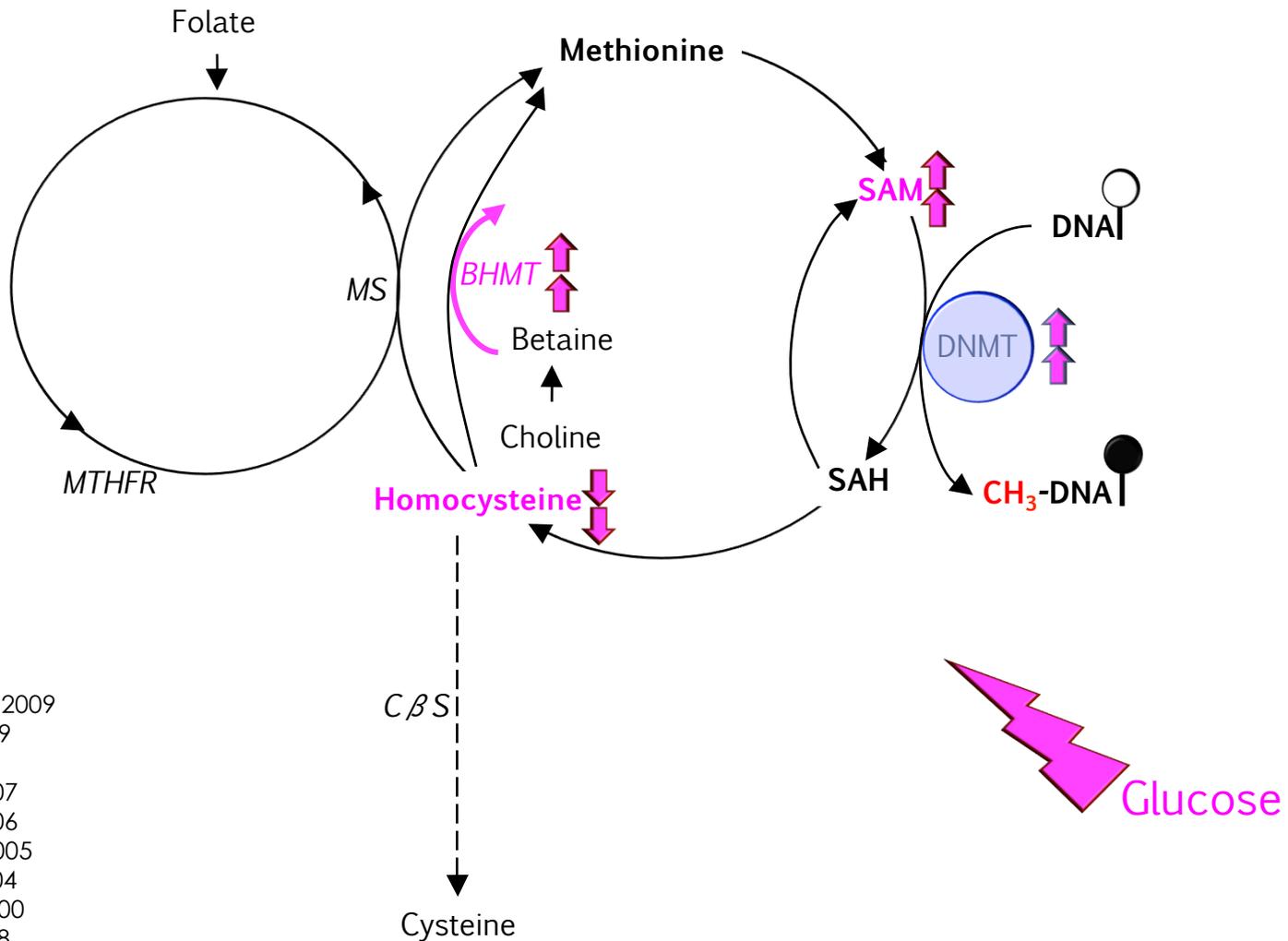


Groupements méthyles et Glucose

- Cellules HepG2 +/- 300mg/dl de glucose pendant 3 jours



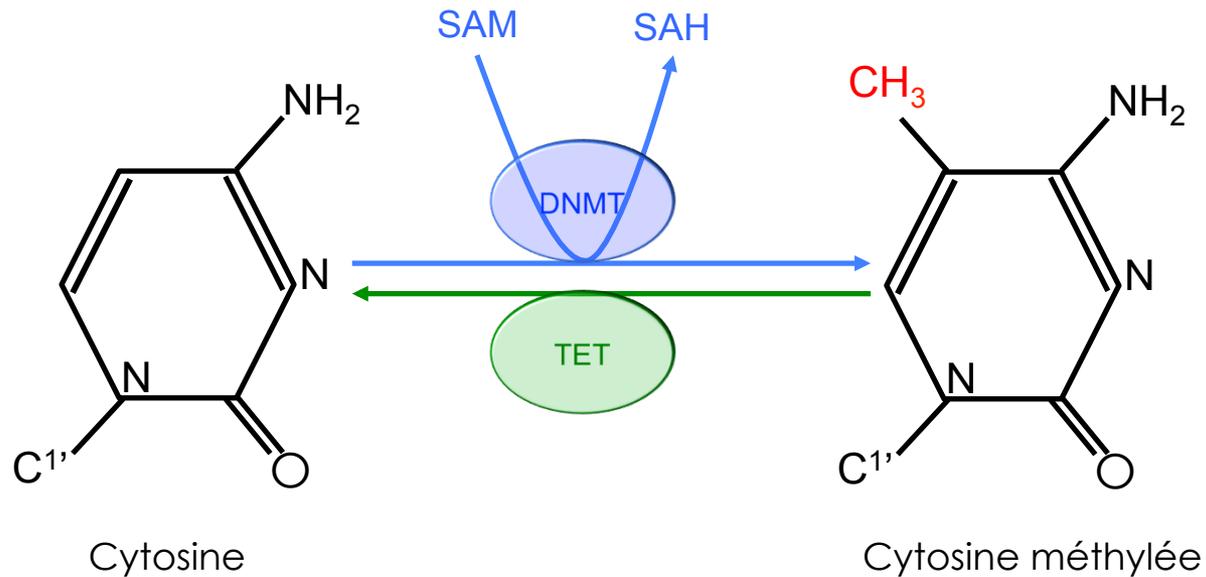
Groupements méthyles et Glucose



Brasacchio et al. 2009
Chiang et al. 2009
Liu et al. 2007
Ratnam et al. 2007
Ratnam et al. 2006
Wijekoon et al. 2005
Nieman et al. 2004
Fonseca et al. 2000
Jacobs et al. 1998

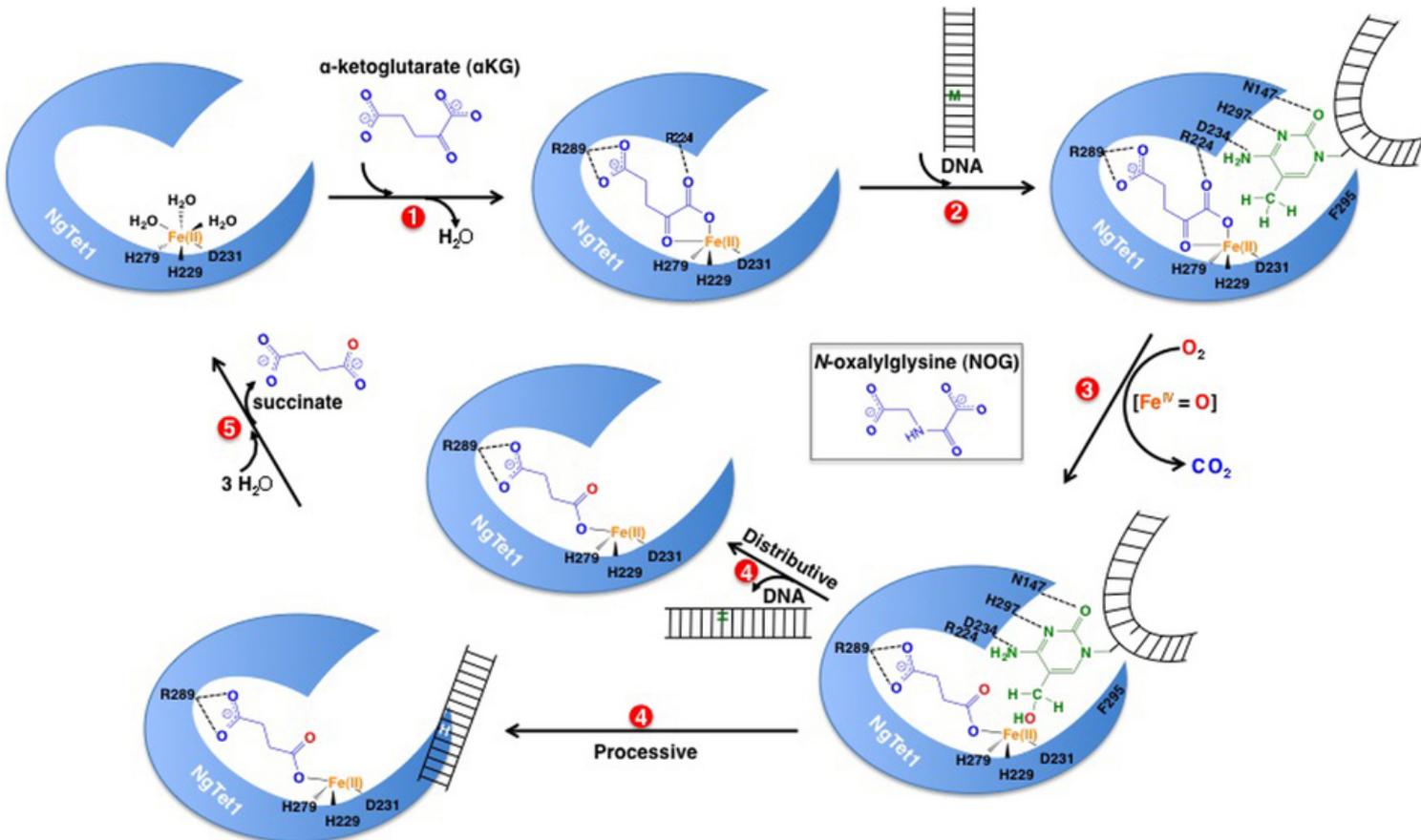
Méthylation de l'ADN

- Déméthylation de l'ADN via les protéines TET



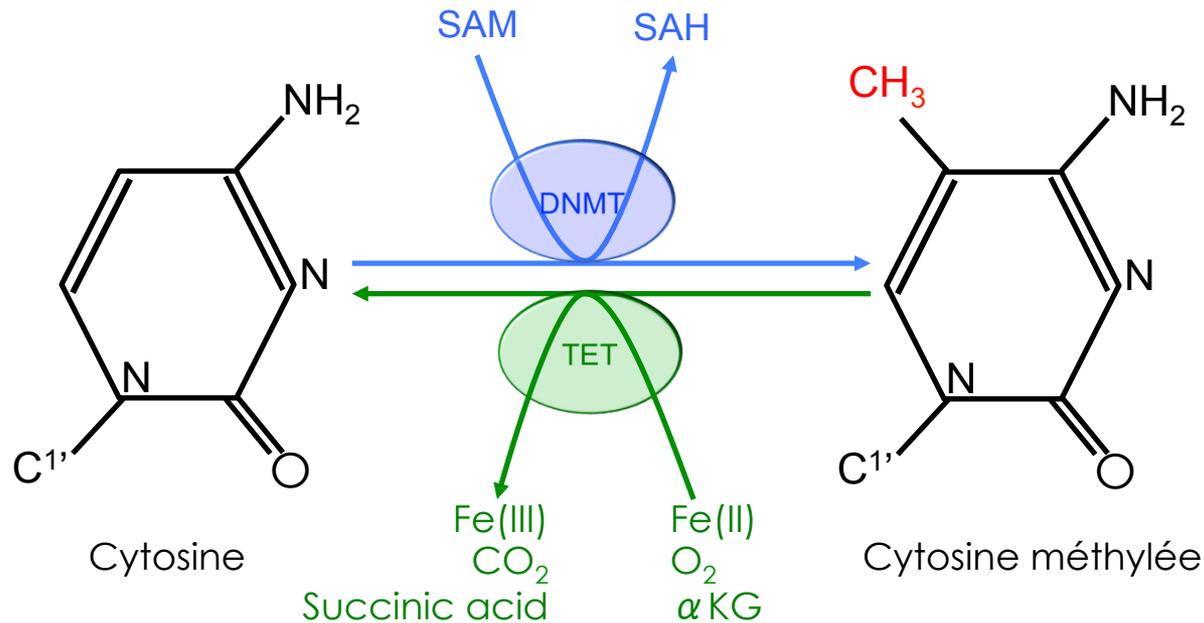
TETs

Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependant oxygenase family

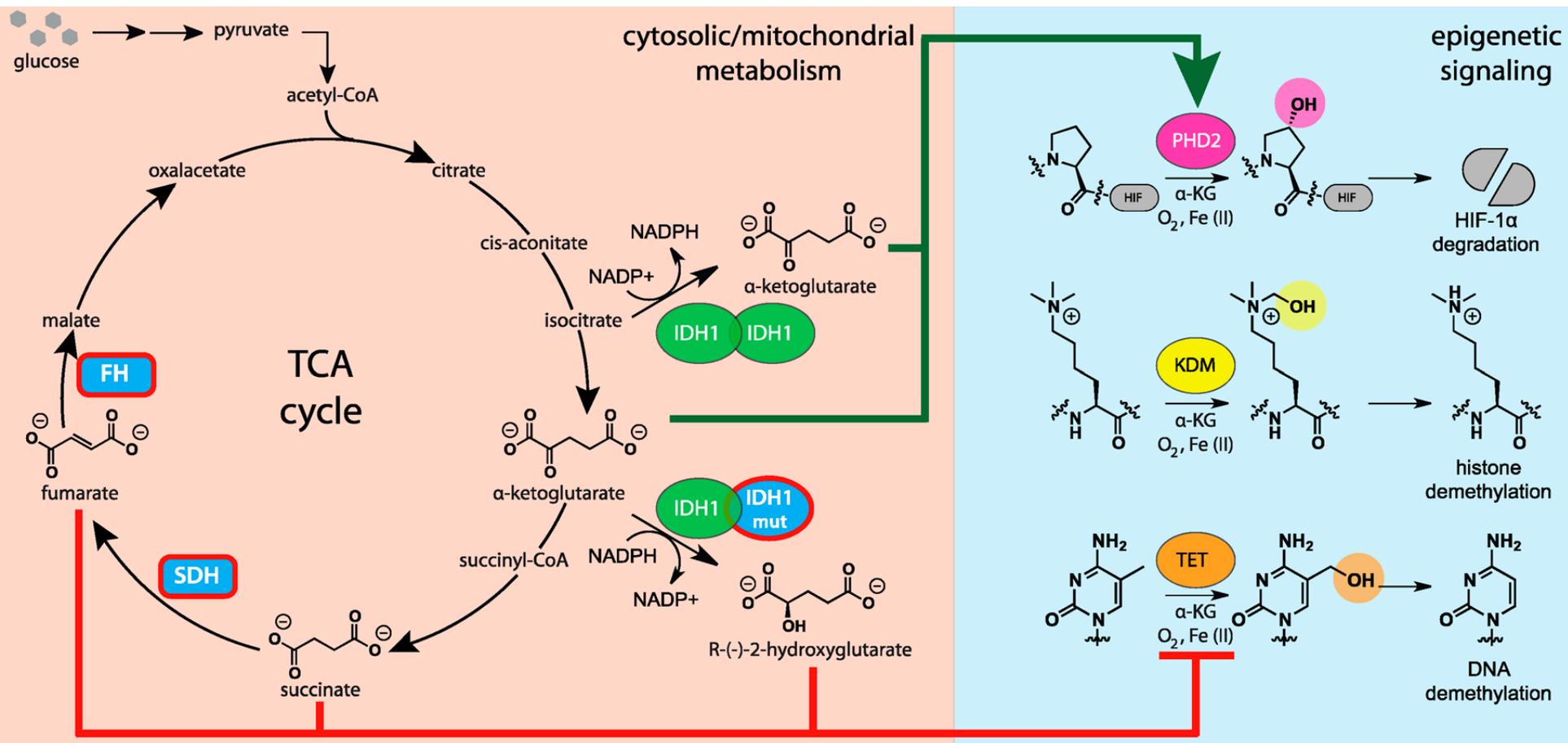


Méthylation de l'ADN

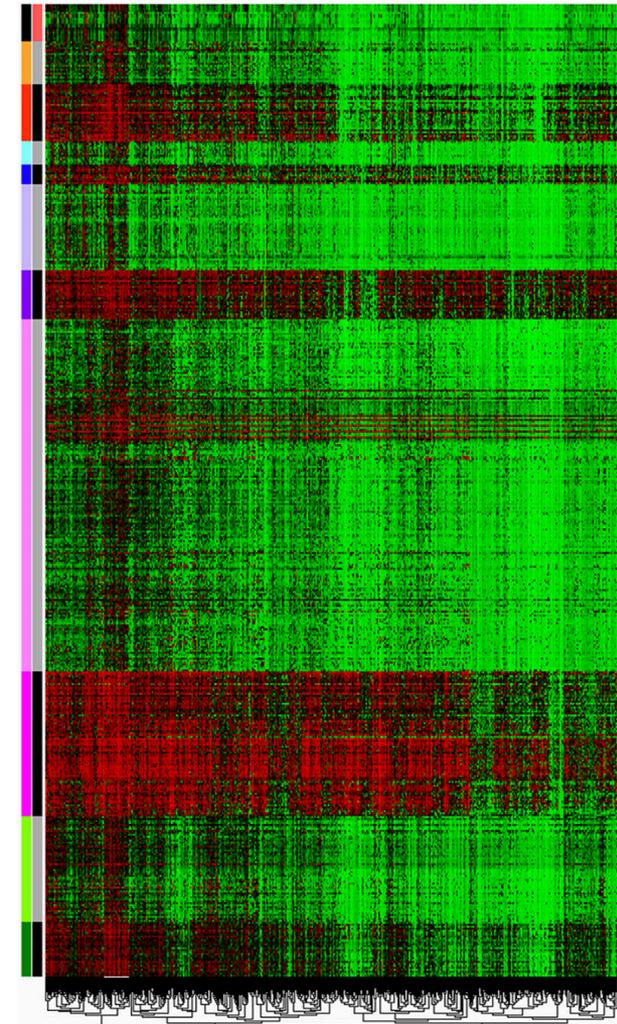
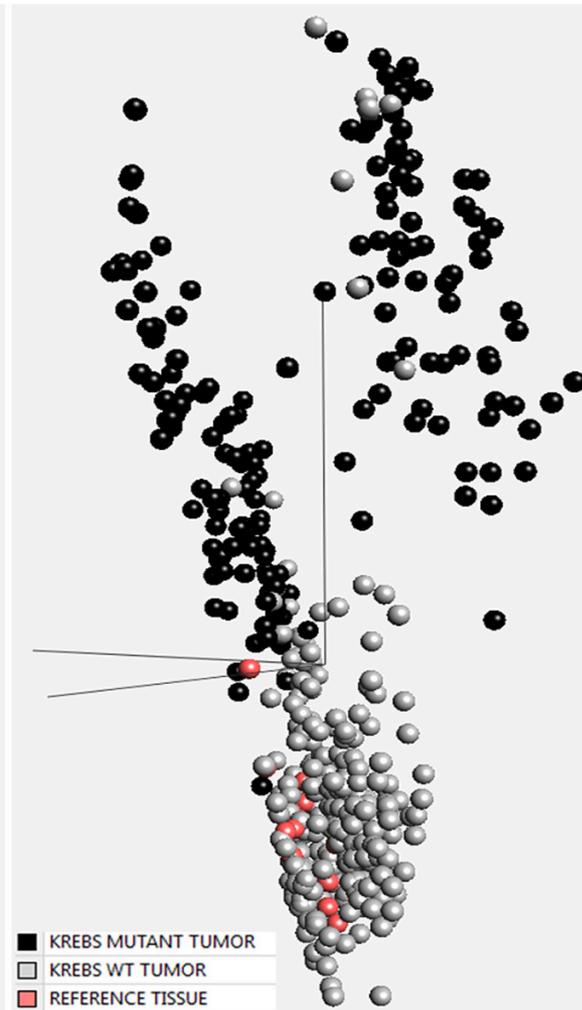
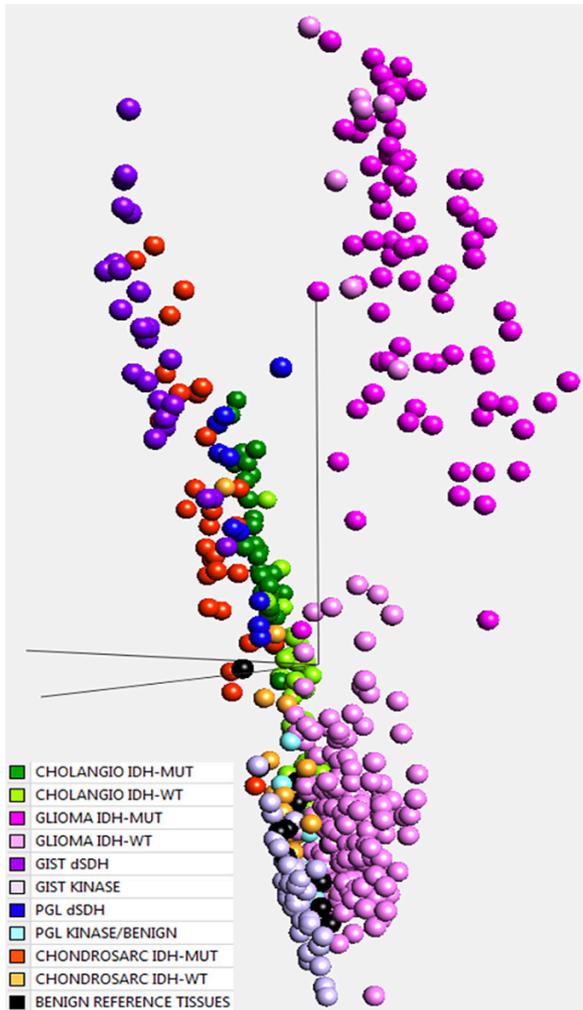
- Déméthylation de l'ADN via les protéines TET



TET et glucose

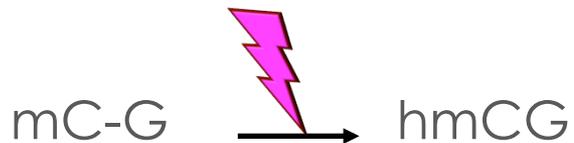
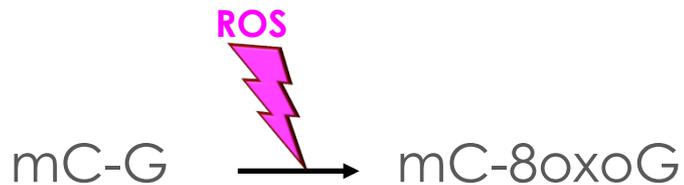


Mutants du cycle de Krebs et méthylation



Le stress oxydant et la méthylation

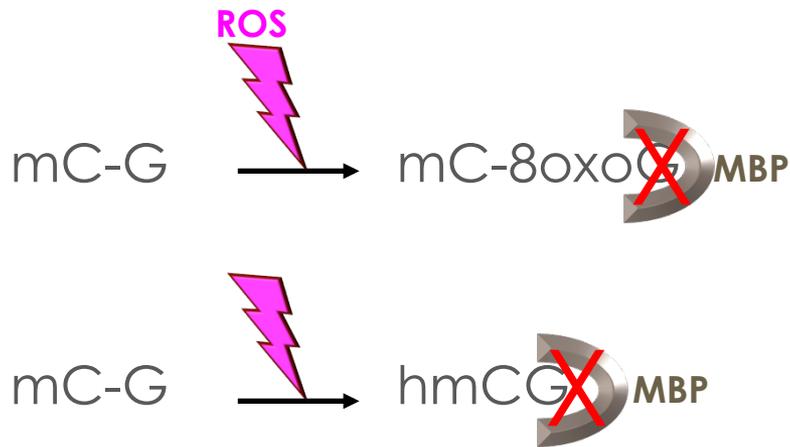
- ▣ L'hyperglycémie chronique créer un stress oxydant



- L'hyperglycémie peut modifier la méthylation de l'ADN *via* les ROS

Le stress oxydant et la méthylation

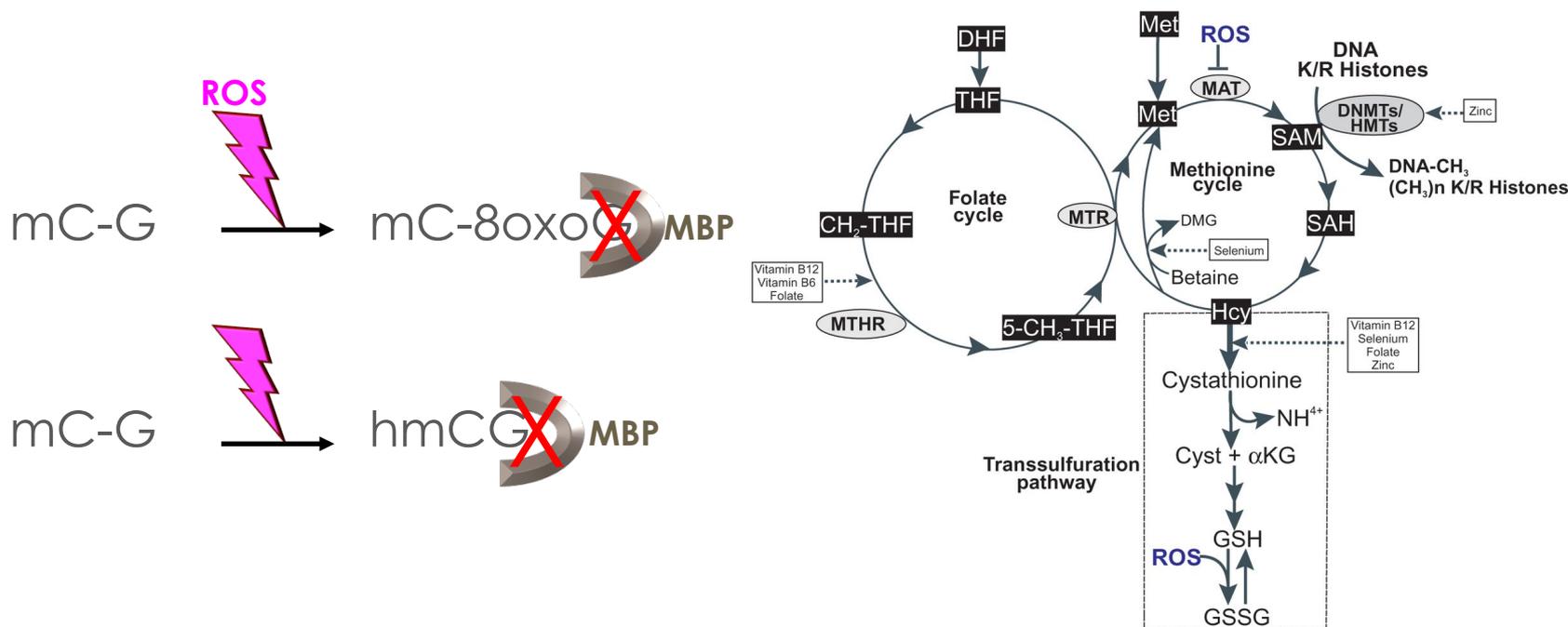
- ▣ L'hyperglycémie chronique créer un stress oxydant



- L'hyperglycémie peut modifier la méthylation de l'ADN *via* les ROS

Le stress oxydant et la méthylation

- ▣ L'hyperglycémie chronique créer un stress oxydant



Ortega Avila et al. 2014

- L'hyperglycémie peut modifier la méthylation de l'ADN via les ROS

Conclusion

- L'hyperglycémie modifie la méthylation de l'ADN *via*
 - Une augmentation de l'activité des DNMTs
 - Une modulation de l'activité des enzymes du métabolisme carboné
 - Une disponibilité des cofacteurs et cosubstrats des protéines TET
 - La production d'espèces réactives de l'oxygène
- Ses effets ne sont pas directionnels car l'hyperglycémie joue à la fois sur la méthylation et sur la déméthylation de l'ADN
- La relation inverse est vraie également

Remerciements

Membres de l'unité U1169

- Clémence Mille
- Marie-Pierre Belot
- Dalila Boudia
- **Fabiola Tros**
- Pierre Bougnères

Centre National de Génotypage

Plateforme Génomique Cochin

Financeurs :

