

**Faculté de pharmacie
et des sciences biomédicales**

Étude différentielle de l'effet de deux modèles obésogènes sur l'apparition systémique de modifications post-traductionnelles impliquées dans la cardiomyopathie diabétique

Auteure : Juliette Assenmacher
Promoteur : Luc Bertrand
Lecteur·rices : Laure Bindels et Jean-Christophe Jonas
Année académique 2022-2023
Master en sciences biomédicales, finalité approfondie

Remerciements

Tout d'abord je voudrais remercier de tout cœur le professeur Luc Bertrand qui m'a permis de passer un an dans son laboratoire à apprendre et découvrir la passion de la recherche fondamentale. Merci d'avoir pris le temps de répondre à mes questions et de m'avoir épaulée tout au long de ce mémoire.

Je tiens ensuite à remercier les professeurs Sandrine Horman et Christophe Beauoye pour votre gentillesse et votre accueil chaleureux au sein du laboratoire.

Je tenais également à remercier tout particulièrement mes deux encadrants, Natacha et Laurent. Sans vous, je n'aurais pas pu réaliser ce mémoire. Merci Laurent (Bubul) pour ta bonne humeur, ta patience et ton soutien sans faille. Tu m'a transmis ton savoir-faire et donné gout à la recherche. Merci Natacha pour tes conseils, ta bienveillance et tous les moments partagés ensemble. Merci aussi de m'avoir accordée autant de temps en étant toujours positive et attentionnée.

Merci à la team AcePhoGlc : Marine et Laura, pour vos encouragements et votre soutien tout au long de ce mémoire.

Merci aussi à toute la team CARD : Audrey, Julien C., Julien DP, Valentine, Laurence, Alice, Claire, Julie, Cécile, Dora, Anaïs et Mélanie. Merci pour votre bonne humeur et super ambiance, cela a été un véritable plaisir de travailler à vos côtés.

Ensuite, un tout grand merci à Martine de Clippele d'avoir pris le temps de relire mon mémoire. Merci également pour votre soutien et encouragements.

Finalement, un tout grand merci à ma famille, mes amis et Philippe, pour votre soutien tout au long de mon parcours étudiant.

Résumé

Le diabète de type 2 (DT2), l'une des problématiques de santé majeures dans le monde, est associé à de nombreuses complications cardiovasculaires. Notamment, le DT2 peut induire des altérations spécifiques de la fonction et de la structure cardiaque, appelée cardiomyopathie diabétique. Au niveau moléculaire, un nombre croissant d'études démontre un rôle significatif des modifications post-traductionnelles (MPTs) et plus particulièrement de l'acétylation et de l'O-GlcNAcylation des protéines dans le développement des maladies liées au DT2. Afin de mieux comprendre le rôle joué par ces MPTs dans l'installation du diabète et le développement de la cardiomyopathie diabétique, le laboratoire d'accueil s'intéresse à deux modèles de DT2 induits par régimes hypercaloriques, l'un riche en graisses (high fat diet, HFD), et l'autre riche en sucres et graisses (western diet, WD). Des résultats préliminaires semblent indiquer des effets différentiels de ces régimes sur l'apparition de ces MPTs, le développement du DT2 et l'installation de la cardiomyopathie diabétique. Le but de mon travail de mémoire était d'approfondir la caractérisation de ces deux modèles afin de mieux comprendre l'effet de ces deux régimes sur le développement du DT2 et sur les modifications différentielles d'acétylation et/ou d'O-GlcNAcylation. Le développement du diabète dans ces deux modèles a été suivi sur une période allant de 1 à 4 mois de régime via la mesure de différents paramètres physiopathologiques (y compris poids, insulino-résistance, tolérance au glucose, indice d'insulino-résistance). En parallèle, les modifications potentielles d'acétylation et/ou d'O-GlcNAcylation ainsi que les enzymes régulant ces MPTs ont été étudiés par immunoblotting dans le cœur et les muscles squelettiques soléaire et gastrocnémien. Les résultats obtenus montrent que les 2 régimes induisent effectivement l'installation d'un DT2 dès 2 mois avec une perturbation plus rapide de la glycémie à jeun chez les souris HFD que WD. On observe une tendance générale à l'augmentation des MPTs dans les trois tissus sous les 2 régimes étudiés. Néanmoins, l'amplitude et la temporalité de ces modifications sont particulières aux régimes et tissus étudiés et pourraient expliquer un effet différentiel de ceux-ci sur l'apparition des pathologies liées au diabète tel que la cardiomyopathie diabétique.

Mots clés : Diabète de type 2, Cardiomyopathie diabétique, O-GlcNAcylation, acétylation, muscle squelettique, cœur

Liste des abréviations

Acétyl-CoA	Acétyl-coenzyme A
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATP	Adénosine triphosphate
ANOVA	Analyse multifactorielle de variance
BCA	Acide bicinchoninique
BCAAs	Branched Amino Acids (Acides Aminés Branchés)
BSA	Bovin serum albumin (albumine bovine sérique)
CMD	Cardiomyopathie diabétique
DACs	Déacétylases
DT2	Diabète de type 2
ECL	Enhanced chemiluminescence
eEF2	Eukaryotic elongation factor 2 (facteur d'élongation eucaryotique 2)
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FID	Fédération Internationale du Diabète
F6P	Fructose-6-phosphate
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFAT	Glutamine -ructose-6-phosphate-transaminase
GlcNAc	β -N-acetyl glucosamine
GlcN-6-P	Glucosamine-6-phosphate
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLUT4	Transporteur de glucose 4
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HBP	Hexosamine biosynthetic pathway (voie de biosynthèse des hexosamines)
HDAC	Histone déacétylase
HFD	High fat diet (régime riche en graisse)
HOMA-IR	Homeostatic model assessment of insulin resistance
HRP	Horse Radish Peroxydase
KATs	Lysine acétyltransférase

LCAD	AcylCoA déshydrogénase à longue chaîne
MPT	Modification post-traductionnelle
mTOR	mammalian target of rapamycine
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAM ⁺	Nicotinamide adénine mononucléotide
OGA	O-GlcNAcase
O-GlcNac	O- linked- β -N-acetyl glucosamine
OGT	O-GlcNAc transférase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PBS	Phosphate buffer saline (tampon phosphate salin)
pH	Potentiel hydrogène
PKB	Protéine Kinase B
PM	Poids Moléculaire
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
P70S6K	70-kDa ribosomal protein S6 kinase
RIPA	Radio-immunoprecipitation assay
SDS	Sodium dodecyl Sulfate (dodecylsulfate de sodium)
SERCA2	Sarco/reticulum endoplasmique Ca ²⁺ -ATPase 2
SIRT	Sirtuines
STZ	Streptozocine
TMB	Tétraméthylbenzidine
VG	Ventricule gauche
WB	Western Blot
WD	Western diet (régime riche graisse et en sucre)
Zn ²⁺	Ion Zinc
β -HAD	β -hydroxy-acylCoA déshydrogénase

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
RÉSUMÉ	2
LISTE DES ABRÉVIATIONS	3
TABLE DES MATIÈRES	5
INTRODUCTION	7
I. QUESTION DE RECHERCHE	7
II. LE DIABÈTE DE TYPE 2	8
1. <i>Définition</i>	8
2. <i>Trouble systémique et importance du muscle squelettique</i>	8
III. LES COMPLICATIONS CARDIOVASCULAIRES DU DT2 ET LA CARDIOMYOPATHIE DIABÉTIQUE.....	10
.....	12
IV. L'O-GLCNAcylation DES PROTÉINES	12
V. L'ACÉTYLATION DES PROTÉINES	14
RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES ET OBJECTIFS DU MÉMOIRE	16
MATÉRIELS ET MÉTHODES	19
I. MODÈLES ANIMAUX.....	19
II. MESURE DE LA GLYCÉMIE À JEUN	20
1. <i>Principe</i>	20
2. <i>Protocole</i>	21
III. DOSAGE DE L'INSULINÉMIE PAR ELISA.....	21
1. <i>Principe</i>	21
2. <i>Protocole</i>	22
IV. EUTHANASIE ET PRÉLÈVEMENT D'ORGANES.....	22
V. WESTERN BLOT	23
1. <i>Principe</i>	23
2. <i>Protocole</i>	24
RÉSULTATS	28
I. CARACTÉRISATION DES EFFETS DES 2 RÉGIMES AU NIVEAU SYSTÉMIQUE	28
1. <i>Effets des régimes HFD et WD sur le développement de l'obésité et du DT2</i>	28
a) Obésité	28
b) Hyperglycémie à jeun, hyper-insulinémie à jeun et insulino-résistance systémique.....	28
2. <i>Effets des régimes HFD et WD sur le phénotype cardio-pulmonaire</i>	29
II. CARACTÉRISATION DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE ET CARDIAQUE.....	30
1. <i>Évaluation des niveaux d'O-GlcNAcylation et de ses enzymes régulatrices</i>	31
a) L'O-GlcNAcylation dans le muscle cardiaque, gastrocnémien et soléaire	31
b) Enzymes de la voie des HBP dans le muscle cardiaque, gastrocnémien et soléaire	33
2. <i>Évaluation des niveaux d'acétylation et de ses enzymes régulatrices</i>	35
a) L'Acétylation dans le muscle cardiaque, gastrocnémien et soléaire.....	35
b) Analyse de l'expression d'enzymes régulatrices de la voie d'acétylation dans le muscle cardiaque, gastrocnémien et soléaire	37
III. ÉVALUATION DE L'INSULINO-RÉSISTANCE LOCALE DANS LE MUSCLE GASTROCNÉMIEN ET SOLÉAIRE	39
DISCUSSION	42
I. DÉVELOPPEMENT DU DIABÈTE CHEZ LES SOURIS HFD ET WD	42
II. L'O-GLCNAcylation	44
1. <i>L'O-GlcNAcylation des protéines corrèle avec un régime riche en graisses/sucres et des dysfonctions cardiaques précoces</i>	44
2. <i>Régulation de l'O-GlcNAcylation des protéines</i>	44
III. L'ACÉTYLATION DES PROTÉINES DANS LES MODÈLES HFD ET WD	45
1. <i>Un régime riche en graisses induit une augmentation de l'acétylation des protéines</i>	45

2.	<i>L'acétylation des protéines impliquées dans le shift métabolique au niveau du cœur et des muscles squelettiques</i>	46
3.	<i>Régulation de l'acétylation des protéines</i>	47
IV.	INTERACTIONS ENTRE L'O-GLCNACYLATION ET L'ACÉTYLATION	49
V.	L'INSULINO-RÉSISTANCE MUSCULAIRE.....	49
	CONCLUSION GÉNÉRALE	51
	RÉFÉRENCES	52
	ANNEXES	57

Introduction

I. Question de recherche

Actuellement, le diabète de type 2 (DT2) est une problématique sanitaire majeure. Le dernier rapport de la Fédération Internationale du Diabète (FID) estime à près d'un demi-milliard les personnes atteintes de cette pathologie dans le monde (FID, 2021). De plus, l'Organisation Mondiale de la santé a imputé, en 2019, 1,5 millions de décès au diabète faisant de celui-ci la 9^{ième} cause de décès dans le monde (OMS, 2019). Le DT2 est associé à de nombreuses complications, dont les maladies cardiovasculaires, qui représentent la principale cause de mortalité chez les patients diabétiques (Fukushima et al., 2019; Bugger et al., 2014; Borghetti et al., 2018). La prévalence de l'insuffisance cardiaque parmi les personnes diabétiques se situe entre 19 à 26 % avec une issue clinique significativement plus grave chez les personnes diabétiques par rapport aux insuffisants cardiaques non diabétiques (Jia et al., 2018). Une personne diabétique a 2 à 5 fois plus de risques de développer une insuffisance cardiaque qu'une personne non diabétique du même âge (Borgetti et al., 2018). Parmi les maladies cardiovasculaires associées au DT2, le laboratoire d'accueil s'intéresse particulièrement à la cardiomyopathie diabétique (CMD). Cette pathologie se définit comme une altération des propriétés structurelles et fonctionnelles du cœur indépendantes d'autres facteurs de risques comme l'hypertension, les maladies valvulaires, ou encore les maladies coronariennes (Jia et al., 2018). Bien que cruciaux dans la compréhension de cette pathologie, les mécanismes moléculaires menant à ces dysfonctions cardiaques ne sont pas encore complètement élucidés. Afin de caractériser ceux-ci et de mieux comprendre les observations parfois contradictoires présentes dans la littérature, le laboratoire d'accueil étudie actuellement le développement de la CMD dans deux modèles de DT2 induit par un régime hypercalorique. Le premier est un régime riche en graisses ou « High Fat Diet » (HFD) et le second est un régime riche en graisses et en sucre ou « Western Diet » (WD). Les résultats préliminaires du laboratoire montrent que ces deux régimes, classiquement utilisés dans la littérature, induisent des effets différentiels tant dans l'installation du DT2 que dans l'apparition de la CMD. En parallèle, le laboratoire d'accueil étudie l'effet de ces régimes sur les niveaux de deux modifications post-traductionnelles (MPTs), l'O-GlcNAcylation et l'acétylation des protéines. En effet, différentes études ont démontré un rôle de ces MPTs dans le développement de maladies cardiovasculaires dont la CMD (Fukushima et al., 2016; Ducheix et al., 2018). Le laboratoire d'accueil cherche donc à déterminer si les effets différentiels observés entre les deux régimes

pourraient s'expliquer au moins partiellement par des effets particuliers sur les MPTs pouvant, de fait, nous éclairer sur le rôle de celles-ci dans le développement du DT2 dans un premier temps puis de la CMD. L'objectif de mon travail s'inscrit précisément dans la caractérisation de ces deux modèles et vise à déterminer si l'effet de ces deux régimes sur la modulation de l'O-GlcNAcylation et de l'acétylation est propre au cœur et son métabolisme particulier, ou, au contraire, affecte également d'autres tissus tels que le muscle squelettique.

II. Le diabète de type 2

1. Définition

Le diabète est une maladie multifactorielle chronique caractérisée par une incapacité de l'organisme à réguler sa glycémie dû à une production d'insuline insuffisante, une absence de production d'insuline ou encore une incapacité à répondre correctement à l'insuline sécrétée (FID, 2021). Il existe plusieurs types de diabète: le diabète de type 1, caractérisé par une destruction auto-immune des cellules β du pancréas ; le diabète gestationnel, caractérisé par une insulino-résistance réversible survenant chez la femme enceinte et finalement le diabète de type 2 (DT2), objet de ce travail. Le DT2 est la forme de diabète la plus fréquente puisqu'elle représente 90% des cas de diabète diagnostiqués (FID, 2021). Cette pathologie est caractérisée par une insulino-résistance périphérique et une insulinopénie relative entraînant une hyperglycémie chronique. Elle résulte d'une combinaison entre des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux. Le facteur de risque le plus important est l'obésité, entraînant 87,5% des cas de diabètes adultes, et résulte notamment d'un manque d'activité physique et d'une alimentation riche en graisse et/ou en sucre (OMS, 2019; Malone and Hansen., 2019).

2. Trouble systémique et importance du muscle squelettique

Le DT2 est un trouble multi-systémique qui affecte de nombreux tissus comme le pancréas, les tissus musculaires, le foie, le tissu adipeux, les reins et le cerveau (Brunton, 2016). La pathologie débute par une insulino-résistance périphérique prenant place dans plusieurs tissus qui vont participer à l'installation de l'hyperglycémie chacun à leur manière (Figure 1). Dans un premier temps, celle-ci sera compensée par les cellules β du pancréas qui augmentent la production d'insuline menant à une hyperinsulinémie. Au fur et à mesure de la progression de la pathologie, on observe

une décompensation des cellules β entraînant une insulinopénie suivie d'une hyperglycémie, l'on parle alors de DT2.

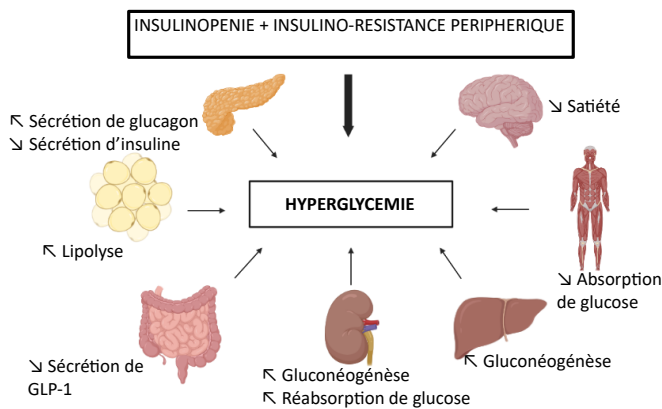


Figure 1. Le DT2 est une pathologie multi-systémique : l'insulino-résistance dans les organes périphériques participe à l'hyperglycémie chronique. L'effet satiétogène lors d'un repas est diminué au niveau du cerveau. L'absorption et le stockage de glucose est diminué dans les cellules musculaires. La production de glucose est augmentée au niveau du foie et du rein. L'excrétion de glucose dans les urines est diminuée due à une hausse de la réabsorption de celui-ci au niveau des reins. Une sécrétion moindre de GLP-1 (hormone hypoglycémiante) au niveau des intestins diminue l'effet incrétine. La lipolyse augmente dans les tissus adipeux libérant des acides gras dans le sang. Ces acides gras participent à l'hyperglycémie en renforçant l'insulino-résistance. Enfin le pancréas sécrète d'avantage de glucagon (hormone hyperglycémiante) et moins d'insuline (Brunton, 2016).

Le tissu musculaire, qui représente entre 40 à 60 % de la masse corporelle, est une des cibles majeures de l'insuline dans le contrôle de la glycémie car environ 85 % du glucose en postprandial y sera absorbé (Stuart et al., 2013; Bouzakri et al., 2005). L'apparition d'une insulino-résistance musculaire est l'un des facteurs clés dans le développement du DT2 (Bouzakri et al., 2005). Le tissu musculaire squelettique est un tissu hétérogène qui peut être subdivisé, selon son métabolisme, en 2 grands groupes différents. Les muscles squelettiques de type I sont composés majoritairement de fibres musculaires caractérisées par un métabolisme dit « oxydatif », c'est-à-dire dont la principale source d'énergie provient de l'oxydation des substrats au niveau de la mitochondrie. La production d'énergie au niveau de ces muscles nécessite une large quantité d'oxygène. Ce type de muscle est généralement requis pour des mouvements de longue durée tels que la posture. D'autre part, les muscles squelettiques de type II contiennent majoritairement des fibres dites « glycolytiques » produisant de l'ATP principalement via la glycolyse anaérobie. Plusieurs études ont observé une proportion plus faible de fibres de type I dans les muscles squelettiques de patients atteints de DT2 ou de syndrome métabolique ainsi qu'une corrélation positive entre le nombre de fibres de type I et la sensibilité globale à l'insuline (Oberbach et al., 2006; Stuart et al., 2013; Albers et al., 2015). Ces études proposent donc que les fibres de type I seraient plus importantes pour le maintien de l'homéostasie du glucose en réponse à l'insuline. Albers et ses collaborateurs proposaient en 2015 que le métabolisme du glucose médié par l'insuline diffère entre ces différents muscles en fonction de leur composition en fibres de type I ou II dû notamment à une expression et/ou régulation différentielle d'enzymes métaboliques et/ou d'éléments de signalisation à l'insuline (Albers et al.,

2015). En effet, en comparant des fibres de type I et II du vastus latéralis avant et après un clamp hyper-insulinémique/euglycémique, une surexpression de protéines impliquées dans la réponse à l'insuline tels que GLUT4, le récepteur à l'insuline, l'hexokinase II, la glycogène synthase et la pyruvate dehydrogenase-E1a a été retrouvée dans les fibres de type I. Ceci suggère qu'en fonction du type de fibres présent dans un muscle, son implication dans le développement du DT2 pourrait différer. Par conséquent, il est important d'étudier les muscles squelettiques et de prendre en compte les 2 types de muscles dans notre étude afin de mieux caractériser l'implication de ces tissus dans le DT2 et la CMD induits par des régimes obésogènes/diabétogènes.

III. Les complications cardiovasculaires du DT2 et la cardiomyopathie diabétique

Le DT2, l'insulino-résistance et l'hyperglycémie chronique qui en résulte entraînent avec le temps de nombreuses complications cardiovasculaires au niveau macro- et micro-vasculaire. Au niveau micro-vasculaire, on observe notamment des lésions rénales, nerveuses et oculaires entraînant des augmentations accrues des risques d'infections, d'apparitions d'ulcères, d'amputation des membres, de cécité et enfin d'insuffisance rénale. Les lésions macro-vasculaires peuvent, quant à elles, être la cause d'hypertension, de maladies coronariennes, d'accidents vasculaires cérébraux et d'infarctus du myocarde (Wu et al., 2014). Par ailleurs, en 1972, Rubler et al. ont identifié pour la première fois, via une analyse post-mortem de patients diabétiques décédés d'insuffisance cardiaque ne présentant aucun signe de maladie valvulaire, coronaire ou encore d'hypertension, une altération spécifique du myocarde qu'ils ont appelée cardiomyopathie diabétique (CMD) (Rubler et al., 1972; Nakamura et al., 2019).

La CMD est caractérisée par un remodelage de la structure cardiaque dû notamment à une hypertrophie ventriculaire gauche, ainsi qu'une fibrose périvasculaire et interstitielle altérant la capacité de relaxation du myocarde. En premier lieu, une dysfonction diastolique va se développer, caractérisée par une augmentation du temps de relaxation iso-volumétrique et une altération de la compliance du ventricule gauche. Ensuite, celle-ci peut évoluer vers une dysfonction systolique caractérisée par une fraction d'éjection diminuée (Ho et al., 2022). Ces dysfonctions progressent avec le temps entraînant un risque accru de développer une insuffisance cardiaque (Bugger et al., 2014; Borghetti et al., 2018). De multiples recherches ont décrit de nombreuses altérations impliquées dans son établissement tel que l'augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation, l'altération de l'homéostasie calcique, l'apparition de fibrose myocardique, l'accumulation de métabolites

toxiques, ainsi qu'une dérégulation métabolique. Néanmoins leur importance relative et les mécanismes moléculaires soutenant leur apparition restent encore partiellement incompris (Borghetti et al., 2018; Ho et al., 2022; Bugger et al., 2014; Jia et al., 2018). Parmi ces altérations, le laboratoire d'accueil s'intéresse particulièrement au rôle de l'inflexibilité métabolique. Son apparition chez un patient diabétique est l'un des facteurs clés du remodelage cardiaque impliqué dans le développement de la CMD (Nakamura et al., 2019). Actuellement, il est admis que le maintien du métabolisme cellulaire cardiaque, et particulièrement de sa flexibilité omnivore, sont extrêmement importants pour le maintien de la fonction cardiaque (Renguet et al., 2018). Le cœur est un organe très énergivore, qui pour maintenir sa fonction contractile utilise une grande variété de substrats pour produire l'ATP nécessaire (autour de 5 kg par jour chez l'Homme). En situation physiologique, les cardiomyocytes oscillent principalement entre l'utilisation de glucose et d'acides gras suivant l'état nutritionnel (Fukushima et al., 2019). A jeun, l'oxydation des acides gras est majoritaire (70%) alors qu'à l'état nourri la source principale d'ATP devient le glucose et ses dérivés (50 à 70%). Cette flexibilité métabolique est notamment régulée par le cycle de Randle, ou cycle glucose-acide gras, décrivant les effets compétitifs qu'exercent entre eux le métabolisme du glucose et des acides gras (Randle et al., 1963 ; Hue et al., 2009). Randle et son équipe avaient plus particulièrement identifié, en 1963, trois points de contrôle au niveau desquels l'oxydation des acides gras inhibe l'oxydation du glucose, entraînant une utilisation accrue des acides gras au détriment du glucose. Le modèle actuel propose que cette régulation implique premièrement l'acétyl-CoA, produit final de la β -oxydation des acides gras, qui inhibe la pyruvate déshydrogénase (PDH) empêchant l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs. Ensuite, le citrate, dérivé de cet acétyl-CoA, inhibe au niveau cytoplasmique le couple phosphofructokinase-1/-2 entraînant une inhibition de la glycolyse. Enfin, l'entrée de glucose dans la cellule est inhibée via un mécanisme moléculaire encore non identifié. Cet effet inhibiteur des acides gras envers le glucose est renversé par l'insuline qui stimule le transport de glucose, la glycolyse et l'oxydation du glucose tout en inhibant l'utilisation des acides gras. L'insulino-résistance ainsi que l'excès d'acides gras, tous les deux caractéristiques du DT2, participent à l'installation de l'inflexibilité métabolique via un renforcement du cycle de Randle entraînant une large utilisation des acides gras au détriment du glucose. Cette réorganisation métabolique a des conséquences néfastes sur le fonctionnement des cellules du myocarde via un stress oxydatif et une dysfonction mitochondriale (Fukushima et al., 2019).

L'O-GlcNAcylation et l'acétylation des protéines ont été plus récemment identifiées comme étant de nouveaux intervenants moléculaires entrant en jeu dans la physiopathologie de la CMD (Ho et al., 2021).

IV. L'O-GlcNAcylation des protéines

L'O-GlcNAcylation est caractérisée par l'ajout d'un monosaccharide β- N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) provenant de l'uridine-diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) sur les résidus sérine et thréonine de protéines (Figure 2). Cette réaction est catalysée par l'O-GlcNAc transférase (OGT) que l'on retrouve dans le cytoplasme, le noyau et les mitochondries (Mailleux et al., 2016). Après son entrée dans les cellules, le glucose est transformé successivement en glucose-6-P et fructose-6-phosphate (F6P). Entre 0.003 et 0.006% de ce F6P, entre dans une voie métabolique alternative, la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP) (Olson et al., 2020). Ce F6P y est métabolisé en glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P) par la glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (GFAT), enzyme limitante de la voie HBP existant en 2 isoformes codés par 2 gènes distincts et exprimés différemment selon le type cellulaire. Ensuite, plusieurs réactions seront nécessaires pour transformer le GlcN-6-P en UDP-GlcNAc, substrat d'OGT (Collins and Chatham, 2020). L'O-GlcNAcase (OGA) catalyse la réaction enlevant le groupement GlcNAc des protéines. L'O-GlcNAcylation est indispensable pour le développement et la vie de tous les mammifères et son dérèglement est décrit dans de nombreuses pathologies comme le cancer, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et le DT2 (Nie et al., 2019). L'O-GlcNAcylation est un phénomène dynamique, répondant à de nombreux stimuli comme un stress cellulaire ainsi qu'un changement de disponibilité des nutriments (Jia et al., 2018). L'augmentation de l'O-GlcNAcylation peut avoir des effets positifs ou négatifs, en fonction de la durée et de la nature du stress. En effet, plusieurs études ont montré que lors de stress aigus tels que l'ischémie/reperfusion, le stress oxydatif ou encore l'hypoxie, l' O-GlcNAcylation augmente de manière transitoire et présente un effet cardioprotecteur (Dassanayaka et al., 2014). L'augmentation de l'O-GlcNAcylation serait favorable pendant l'ischémie/reperfusion en limitant le taux de calcium cytosolique et diminuant ainsi la surcharge de calcium délétère après une ischémie (Ducheix et al., 2018 ; Wright et al, 2017). En revanche, lors d'un stress dit « chronique », comme lors du développement du DT2 ou de

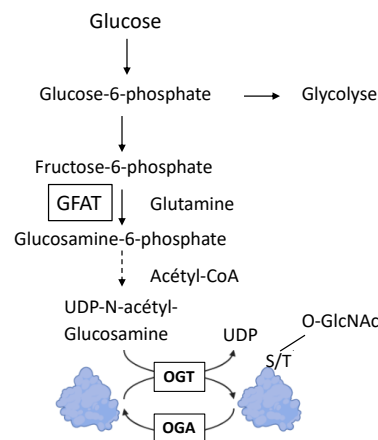


Figure 2. Voie de biosynthèse des hexosamines menant à l'O-GlcNAcylation. Voir texte principal.

l'hypertension, on observe une augmentation de l'O-GlcNAcylation ayant des effets délétères sur les fonctions du myocarde (Wright et al., 2017). En effet, l'augmentation chronique des niveaux d'O-GlcNAcylation des protéines affecte la contraction cardiaque, la fonction mitochondriale, l'insulino-sensibilité ainsi que la masse ventriculaire gauche (Ducheix et al., 2018). Le laboratoire d'accueil a notamment démontré l'implication de l'O-GlcNAcylation dans le développement de l'hypertrophie cardiaque pathologique (Gélinas et al., 2018). Plus proche de ce qui nous concerne, l'O-GlcNAcylation dans le myocarde humain de personnes diabétiques est significativement plus élevée par rapport à des personnes non diabétique et corrèle avec une dysfonction ventriculaire gauche (Prakoso et al., 2021). En outre, l'inhibition pharmacologique ou génétique de la voie de l'HBP améliore la fonction cardiaque et l'homéostasie calcique dans le cœur diabétique. Par exemple, la surexpression adénovirale d'OGA dans des cardiomyocytes isolés de souris diabétiques permet une amélioration de la contractilité cellulaire ainsi que de la gestion du calcium en diminuant les niveaux d'O-GlcNAcylation (Hu et al., 2005). Par ailleurs, il a été démontré que la surexpression d'OGT dans des cardiomyocytes néonataux de souris ou l'incubation de ceux-ci en présence d'un agent O-GlcNAcyloyant (glucosamine) perturbe de manière significative l'homéostasie calcique via l'O-GlcNAcylation de protéines nucléaires (Clark et al., 2003). Plus récemment, un phénotype cardiaque similaire à la CMD a été retrouvé chez des souris non diabétiques surexprimant OGT de manière cardio-spécifique (Prakoso et al., 2021). Plusieurs mécanismes par lesquels l'O-GlcNAcylation participerait aux altérations liées à la CMD sont actuellement proposés. L'O-GlcNAcylation altèrerait l'homéostasie calcique, les propriétés contractiles et la fonction mitochondriale cardiaque (Ducheix et al., 2018). Ils suggèrent également une activation des voies de signalisation de stress en réponse à l'O-GlcNAcylation comme celles impliquées dans l'hypertrophie et le stress du réticulum endoplasmique. Quelques protéines ont été identifiées comme étant des médiateurs potentiels de ces dysfonctions induites par l'O-GlcNAcylation. Le phospholamban est connu pour réguler le transporteur de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (sarco/réticulum endoplasmique Ca^{2+} -ATPase 2, SERCA2), dont la fonction principale est de transporter le calcium du cytosol vers le réticulum sarcoplasmique et ainsi de participer activement au maintien de l'homéostasie calcique nécessaire à la relaxation des fibres musculaires. L'O-GlcNAcylation du phospholamban bloque sa fonction activatrice de SERCA2 et réduit ainsi le potentiel de contraction/relaxation cardiaque (Hu et al., 2005; Ducheix et al., 2018; Dassanayaka et al., 2014).

Quelques études se sont également intéressées à l'O-GlcNAcylation dans le tissu musculaire squelettique dans le contexte du DT2, décrivant un rôle important de cette MPT dans les régulations

physiopathologiques du métabolisme musculaire (Lambert et al., 2018). L'étude de Shi et al. (2018) a observé une O-GlcNAcylation des protéines plus élevée dans le muscle squelettique (vastus lateralis) de patients obèses souffrant de DT2. Cette étude a également montré que l'inactivation d'OGT au niveau musculaire induit chez la souris un remaniement important du métabolisme général et plus particulièrement du métabolisme des muscles squelettiques. Ils ont mis en évidence une diminution de la masse grasseuse, de la glycémie, du captage de glucose au niveau musculaire ainsi qu'une résistance à l'induction du diabète par un régime riche en graisses. D'un autre côté, Arias et collaborateurs (2004) ont montré qu'une augmentation de l'O-GlcNAcylation diminuait l'insulino-sensibilité musculaire.

V. L'acétylation des protéines

L'acétylation consiste en l'ajout d'un groupement acétyle provenant de l'acétyl-CoA sur le groupe ϵ -amino de la chaîne latérale des résidus lysines. Cette modification a été décrite à l'origine comme étant un facteur clé dans la régulation de la transcription des gènes via la modification des histones. Mais depuis plusieurs décennies, d'autres protéines, situées en dehors du compartiment nucléaire, ont été décrites comme acétylées. Le niveau

d'acétylation est régulé par 2 familles d'enzymes : les lysine acétyltransférases (KATs) et les lysine déacétylases (KDACs) (Figure 3). Les KATs, dont le substrat est l'acétyl-CoA, catalysent la formation de la lysine acétylée. L'acétylation peut cependant également se produire de manière non enzymatique et semble être favorisée par une augmentation du niveau d'acétyl-CoA disponible (Fukushima et al., 2019). A l'inverse, les KDACs déacétylent les lysines acétylées. Ces dernières sont divisées en deux sous-groupes, les sirtuines (SIRT1-7) et les histones déacétylases (HDAC1-11), qui nécessitent respectivement du NAD^+ et du Zn^{2+} comme cofacteur (Renguet et al., 2018). Il est aisé de comprendre que les niveaux d'acétyl-CoA et de NAD^+ jouent un rôle important dans le contrôle des niveaux d'acétylation des protéines. Dans des périodes de jeûne prolongé, la réduction de l'apport en nutriments va réduire la production d'acétyl-CoA et augmenter la concentration en NAD^+ réduisant le niveau d'acétylation des protéines. Au contraire, dans des conditions de surcharge métabolique, comme observé durant le DT2, l'activité métabolique des cellules tend à favoriser une production excessive d'acétyl-CoA et une déplétion des stocks de NAD^+ favorisant ainsi l'acétylation des protéines (Renguet et al., 2018). L'acétylation des protéines pourrait donc jouer un rôle de

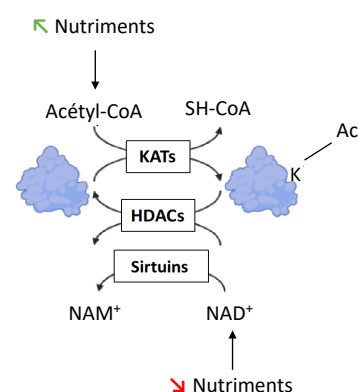


Figure 3. L'acétylation des protéines et son lien avec le métabolisme. Voir texte principal.

senseur énergétique important qui augmente en réponse à une surcharge de nutriments, présents dans le DT2. Parmi les études analysant ce paradigme, nous pouvons citer celles de Alrob et collaborateurs (2014) et de Kendrick et al. (2011) qui montrent une hyperacétylation des protéines mitochondriales ainsi qu'une activité réduite de SIRT 3 dans le foie et le cœur de souris soumises à un régime HFD. De nombreuses protéines qui ont été identifiées comme étant acétylées sont des protéines impliquées dans le métabolisme régulant notamment l'activité de certaines enzymes de la glycolyse, du cycle de l'acide tricarboxylique, de la chaîne de transport des électrons, de l'oxydation du glucose et de la β -oxydation des acides gras (Fukushima et al., 2018; Zhao et al., 2010). De manière similaire à l'O-GlcNAcylation, une augmentation de l'acétylation globale des protéines est observée dans le cœur de patients diabétiques et est associée à la CMD (Thiagarajan et al, 2016). Il a été démontré que l'augmentation de l'acétylation des protéines dans les cardiomyocytes pouvait induire la stimulation de la β -oxydation des acides gras (Fukushima et al., 2018) et une inhibition du métabolisme du glucose (Renguet et al., 2018) en activant des enzymes clés de la β -oxydation comme l'acylCoA déshydrogénase à longue chaîne (LCAD) et de la β -hydroxy-acylCoA déshydrogénase (β -HAD) (Alrob et al., 2014) et en inhibant des enzymes de l'oxydation du glucose dont la PDH (Mori et al., 2013). L'acétylation et l'inhibition de PKB, protéine clé de la signalisation insulinaire, participent également à l'installation de l'insulino-résistance présente chez les souris diabétiques/obèses (Alrob et al., 2014). Ces différentes études démontrent l'implication de l'acétylation dans l'installation d'une inflexibilité métabolique cardiaque en faveur des acides gras au détriment du glucose. Dans le même ordre d'idées, le laboratoire d'accueil, a démontré que des taux élevés de leucine et de corps cétoniques, tous les deux des marqueurs précoces du DT2, diminuent l'absorption de glucose en réponse à l'insuline via une inhibition de la translocation de GLUT4, transporteur de glucose insulino-sensible, à la membrane des cardiomyocytes (Renguet et al., 2017). Plus récemment le laboratoire d'accueil a démontré que les acides gras procédaient de la même manière à l'inhibition de la translocation de GLUT4 (De Loof et al., 2023) et que l'acétylation de l'alpha-tubuline, une protéine de structure du microtubule, pouvait participer en partie à ces phénomènes (Renguet et al., 2022).

L'acétylation dans le muscle squelettique dans un contexte physiologique et de DT2 est encore peu exploré. Néanmoins, Lundby et al. ont publié en 2012 une étude par approche acétylomique non biaisée révélant des profils d'acétylation spécifiques à chaque organe y compris musculaire où de nombreuses protéines impliquées dans la contraction musculaire ont été identifiées. Deux revues proposent l'implication de l'acétylation des protéines au niveau des muscles squelettiques dans la régulation de la réponse à l'insuline et le métabolisme du glucose (LaBarge et al., 2015;

Emamgholipour et al., 2019). LaBarge et al. (2015) présentent l'acétylation comme facteur liant la disponibilité des nutriments et la régulation de l'action de l'insuline dans le muscle squelettique en citant de nombreuses protéines de la voie insulinaire, tels que PKB et du métabolisme du glucose contenant des sites d'acétylation. L'acétylation serait un moyen de communication mis en place dans la cellule musculaire pour réguler sa réponse à l'insuline et diminuer l'entrée de glucose lorsque celle-ci possède assez d'énergie. En lien, on retrouve dans le muscle de souris à jeun une moindre acétylation de PKB avec une activation de cette protéine plus importante par rapport aux souris nourries (LaBarge et al., 2015). Dans un contexte de surcharge métabolique et de DT2, un excès d'acétylation pourrait être responsable de l'altération de la signalisation à l'insuline et d'une réduction du métabolisme glucidique. L'étude de Lantier et ses collaborateurs (2015) a mis en évidence une augmentation de l'acétylation des protéines corrélée à une insulino-résistance dans le muscle squelettique de souris HFD. Cette étude a également montré que l'insulino-résistance et les effets délétères du HFD étaient d'autant plus élevés chez les souris délétées pour le gène codant la déacétylase SIRT3. D'autre part, une dysfonction des muscles squelettiques avec une capacité réduite à l'exercice est une caractéristique clinique couramment présente chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque. On retrouve chez ces patients une acétylation accrue des protéines mitochondriales associée à une altération du métabolisme du muscle squelettique (Tsuda et al., 2018). De façon étonnante, à l'inverse de ce qui a été retrouvé dans le cœur (Alrob et al., 2014), l'acétylation de LCAD et β -HAD, protéines clés de la β -oxydation, induits dans ce modèle corrèle avec une diminution de l'oxydation des acides gras induisant une dysfonction mitochondriale.

Résultats préliminaires et objectifs du mémoire

Le travail de mon mémoire fait suite aux résultats préliminaires de Natacha Fourny qui montrent des effets différentiels de 2 régimes obésogènes, l'un riche en graisses (HFD) et l'autre riche en graisses et en sucres (WD) sur l'apparition du DT2, de la CMD et des niveaux d'O-GlcNAcylation et d'acétylation au niveau cardiaque (Figure 4). En effet, on observe que ces régimes induisent une obésité ainsi qu'un DT2 (Figure 4 A-B). Le poids de ces souris est significativement plus élevé que celui des souris contrôles. L'HOMA-IR, un index d'insulino-résistance calculé à l'aide des mesures des niveaux plasmatiques d'insuline et de glycémie à jeun, est également plus élevé chez les souris sous régime HFD et WD dès le premier mois de régime, soutenant une insulino-résistance périphérique de ces souris. De manière intéressante, on observe que ces paramètres « diabétiques » sont

généralement plus prononcés et/ou plus précoces chez les souris sous régime HFD en comparaison des souris WD. A l'inverse, les dysfonctions cardiaques apparaissent quant à elles plus tôt et sont plus accentuées chez les souris sous régime WD par rapport aux souris HFD (Figure 4C-D). En effet, la dysfonction systolique, caractérisée par une chute de la fraction d'éjection (c'est à dire le pourcentage de volume de sang contenu dans le ventricule gauche qui sera éjecté vers la circulation sanguine) apparait dès 1 mois de régime chez les souris WD, alors qu'elle ne s'installe légèrement qu'à 2 mois de régime chez les souris HFD. De la même manière, l'hypertrophie cardiaque, un second marqueur caractéristique du cœur diabétique, semble être légèrement plus importante chez les souris WD.

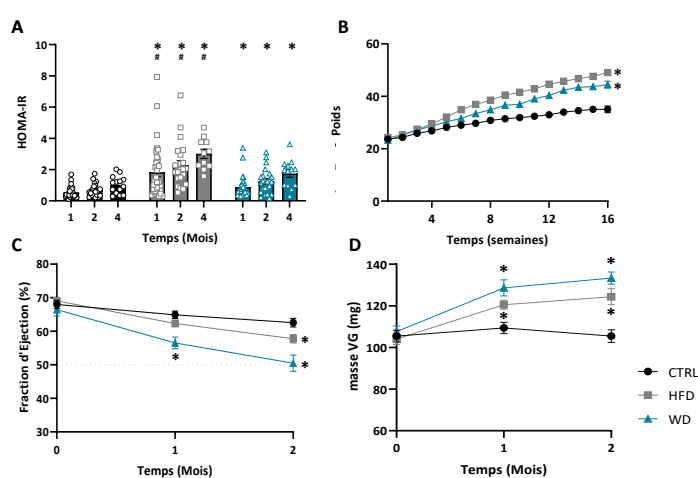


Figure 4. Évaluation de l'insulino-résistance, de l'obésité et de la fonction cardiaque chez les souris contrôles (CTRL), HFD et WD. HOMA-IR des souris à 1, 2 et 4 mois (A). Évaluation du poids des souris au cours du temps (B). Évaluation de la fraction d'éjection au cours du temps mesuré par échocardiographie (C). Évaluation de la masse du ventricule gauche au cours du temps mesuré par échocardiographie (D). Abréviations : VG = ventricule gauche. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. * = $p < 0,05$ vs. CTRL. # = $p < 0,05$ WD vs. HFD. (one-way ANOVA ou two-way ANOVA, test post-hoc de Tukey.)

Les niveaux d'O-GlcNAcylation et d'acétylation ont été quantifiés dans les tissus cardiaques de ces différents groupes de souris afin d'y étudier leur lien potentiel avec les dysfonctions cardiaques détectées (Figure 5). Une augmentation de l'O-GlcNAcylation globale est observée dans les modèles de souris WD par rapport aux autres régimes à 2 mois alors qu'à l'inverse, une augmentation de l'acétylation est surtout observée chez les HFD. Cela suggère une participation potentielle de l'O-GlcNAcylation dans les dysfonctions systoliques cardiaques liées au diabète, alors qu'une participation de l'acétylation dans les dysfonctions plus périphériques comme l'insulino-résistance globale peut-être envisagée.

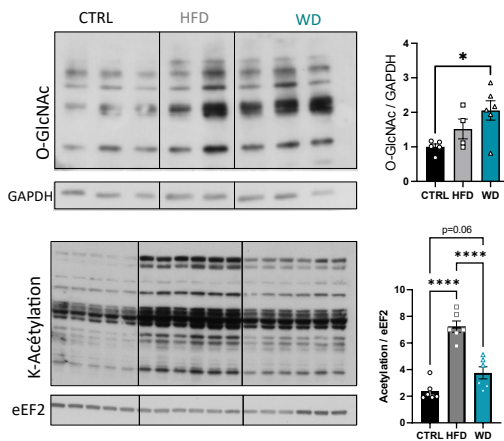


Figure 5. Évaluation des niveaux d'O-GlcNAcylation et d'acétylation des protéines dans les extraits de cœur des souris CTRL, HFD et WD. Western blots représentatifs des niveaux d'O-GlcNAcylation et d'acétylation des protéines à 2 mois de régime et quantifications de l'intensité des bandes, normalisées sur eEF2 ou GAPDH, avec le software ImageJ. Abréviations : K= lysine. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. * = $p < 0,05$ vs. CTRL (one-way ANOVA, test post-hoc de Tukey).

Au vu de ces résultats préliminaires, le laboratoire d'accueil cherche à caractériser plus en détails les deux modèles diabétogènes, et particulièrement le niveau de MPTs dans le muscle squelettique et de comparer ces niveaux avec les changements cardiaques et systémiques observés au cours du temps. En effet, s'il est fortement suggéré que l'acétylation est impliquée dans la dérégulation métabolique qui a lieu au niveau cardiaque, et que l'O-GlcNAcylation est impliquée dans les altérations structurelles du myocarde, ces MPTs au niveau du muscle squelettique n'ont pas encore été cartographiées dans le contexte d'un DT2 induit par un régime obésogène. L'objectif de mon travail de mémoire sera de caractériser les niveaux de ces MPTs dans les 2 modèles de DT2 (en suivant leur évolution à 1,2 et 4 mois) au niveau de 2 muscles squelettiques métaboliquement différents et ensuite de corrélérer l'apparition de ceux-ci à l'apparition des différentes dysfonctions systémiques et cardiaques. Je me suis concentrée sur le muscle soleus, qui tout comme le tissu cardiaque, possède un métabolisme majoritairement oxydatif (70% de fibres I) et le gastrocnémien qui contient des fibres contenant un métabolisme majoritairement glycolytique (Albers et al., 2015). Une cartographie d'expression des protéines régulant ces MPTs sera également réalisée afin de déterminer les facteurs impliqués dans les modifications de MPTs qui seront éventuellement observées. En parallèle, l'insulino-résistance locale au niveau des muscles gastrocnémien et soléaire a également été étudié. Comme cité plus haut, l'insulino-résistance au niveau musculaire est l'une des principales dysfonctions dans le DT2 responsable de l'hyperglycémie. Il est donc important de mieux comprendre celle-ci pour pouvoir contrôler et prévenir les complications, dont la CMD, suite à une hyperglycémie chronique. Pour ce faire, certains éléments de la voie de signalisation insulinique en réponse à l'insuline, seront également analysés au niveau de ces muscles.

Matériels et méthodes

I. Modèles animaux

Les modèles animaux de DT2 caractérisés et comparés dans ce travail sont des souris mâles C57BL/6N âgées de 2 mois, soumises soit à un régime contrôle (CHOW, SAFE® A03), un régime riche en graisses (HFD, D12492 Research Diets®) ou un régime riche en graisses et en sucre (WD, D12079B Research Diets®) (tableau 1). Les animaux ont été répartis aléatoirement dans chaque groupe et hébergés dans des cages ventilées à une température constante (23°) avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. L'ensemble des protocoles expérimentaux a été approuvé par le comité d'éthique de la faculté pour l'expérimentation animale (sous la référence 2021/UCL/MD/016). Les animaux sont euthanasiés après 1, 2 ou 4 mois de régime (nourriture et eau *ad libitum*).

Composants	Régimes (% Kcal)					
	CTRL - SAFE® A03 (CHOW)		HFD - D12492 Research Diets®		WD - D12079B Research Diets®	
Protéines	Protéines végétales (majoritaires) et animales	25,2%	Caséine, L-cystéine	20%	Caséine, méthionine	17%
Matières grasses	Ac. oléique, palmitique, stéarique et palmitoléique	13,5%	Lard et huile de soja	60%	Beurre anhydre et huile de maïs	40%
Hydrates de carbones	«Nitrogen Free Extract » : fibres, protéines et sucres	61,3%	Sucrose et maltodextrine	20%	Sucrose, maltodextrine, amidon, maïs	43%

Tableau 1. Compositions en protéines, matière grasses et hydrates de carbones des régimes CHOW, HFD et WD exprimés en pourcentages des calories totales du régime.

Dans ce travail (Figure 6), une première cohorte (A) a été générée au début de ce mémoire afin d'évaluer l'effet des régimes sur l'installation de l'obésité et du DT2. Les animaux ont été séparés en 3 groupes de régimes différents (n = 12/groupe) et ont été euthanasiés à 2 et 4 mois de régime. Ces résultats ont été complétés avec les données des paramètres de la cohorte B précédemment étudiée au laboratoire.

Une deuxième cohorte (B), précédemment générée au sein du laboratoire, a été utilisée afin d'évaluer l'effet des régimes sur les MPTs et leurs enzymes régulatrices dans différents tissus. Pour cela, les animaux ont été séparés en 3 groupes (n = 15/groupe) de régimes différents, 5 animaux de chaque groupe ont été euthanasiés aux différents temps.

Enfin, une 3ème cohorte (C) a été conçue en fin de mémoire afin d'étudier l'installation de l'insulino-résistance locale au niveau des muscles. Pour cela, 3 groupes de 9 animaux ont été sacrifiés à 2 et 4 mois de régime. Avant sacrifice, 5 animaux par groupe ont été stimulés à l'insuline (10 mU/kg, 10 min) par injection dans la veine cave inférieure. Les 4 autres individus, servant de contrôle, ont reçu de manière similaire du sérum physiologique (NaCl 0,9%).

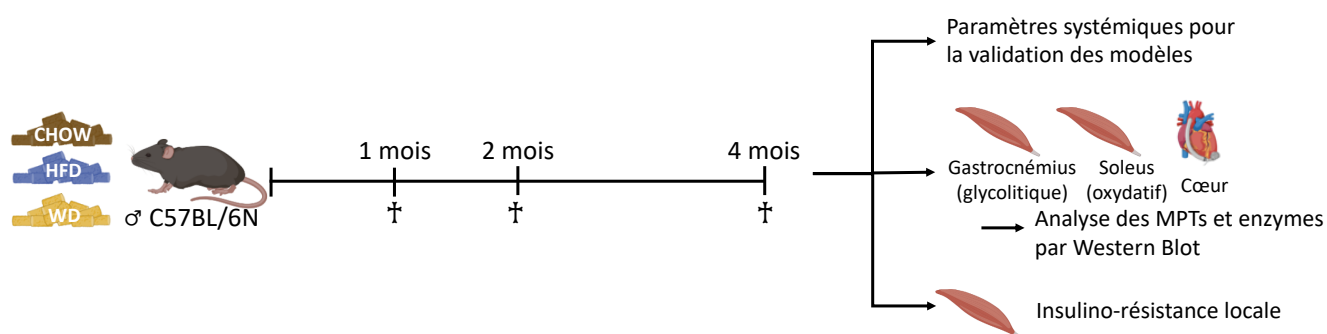


Figure 6: Schéma du plan expérimental du projet. 3 cohortes différentes seront étudiées dans ce mémoire à 1, 2 et 4 mois de régimes CHOW, HFD et WD. La première cohorte servira pour l'évaluation de l'effet des régimes sur l'installation de l'obésité et du DT2. La deuxième permettra l'étude des MPTs et de leurs enzymes régulatrices dans le gastrocnémien, le soleus et le cœur. Enfin, la troisième cohorte sera générée pour étudier l'installation de l'insulino-résistance locale dans les muscles gastrocnémiens et soléaires.

II. Mesure de la glycémie à jeun

1. Principe

La glycémie à jeun est définie comme la concentration de glucose (mg/dl) présente dans le sang après une période de 6 h de jeun. Celle-ci nous informe sur la capacité de l'animal à réguler son homéostasie glucidique. Chez l'homme, si la valeur est supérieure à 6,1 mmol/l ou 110 mg/dl on considère que la personne est en hyperglycémie. Cependant, chez la souris il n'existe pas de valeur universelle pour diagnostiquer une hyperglycémie. Certaines études considèrent cependant les souris avec une glycémie à jeun supérieure à ≥ 11.1 mmol/l ou 200 mg/dl comme diabétiques (Arulmozhi et al., 2008; Zhang et al., 2016).

2. Protocole

Les souris sont mises à jeun pendant 6 h et la glycémie est ensuite mesurée à l'aide d'un glucomètre et d'une goutte de sang prélevée par suite d'une incision caudale. Du sang, 50 μ L, est également prélevé à l'aide d'une Minivette® POCT 50 μ l K3 EDTA (Sarstedt; 17.2113.050) pour le dosage de l'insulinémie par ELISA. Ce sang est ensuite collecté dans un tube.

III. Dosage de l'insulinémie par ELISA

1. Principe

L'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est un test immuno-enzymatique permettant de détecter un antigène ou un anticorps cible dans un échantillon et de quantifier sa concentration. Dans le test ELISA « Sandwich » le principe vise à capturer l'antigène entre deux anticorps, l'un de capture et l'autre de détection qui ciblent 2 épitopes différents de cet antigène. Le premier anticorps est fixé dans le fond des puits d'une microplaque et permet de capter les antigènes d'intérêts pour pouvoir les maintenir dans les puits de la plaque contenant les échantillons. Le deuxième anticorps permet la détection des antigènes. En effet, celui-ci est la plupart du temps couplé à une enzyme, la peroxydase de raifort (HRP), qui catalyse la réaction de son substrat chromogène, le tétraméthylbenzidine (TMB) qui prend une coloration bleue. Pour arrêter la réaction, une solution acide est ajoutée et le produit de la réaction devient jaune dont l'absorbance peut être mesurée à 450 nm. Les concentrations en antigènes seront ainsi évaluées en comparant l'intensité d'absorbance obtenue à une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de concentrations connues en antigènes.

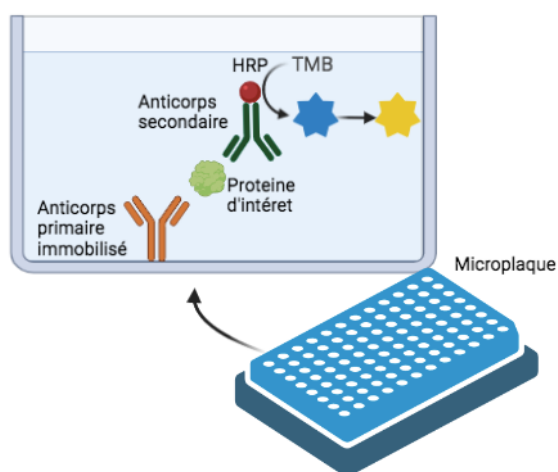


Figure 7: L'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sandwich. La microplaque possède 96 puits recouverts d'immunoglobulines anti-protéine d'intérêt immobilisées dans le fond. Les solutions standards de calibration, d'échantillons et les contrôles sont ajoutés dans les puits. Plusieurs lavages sont effectués pour retirer les protéines non reconnues. Les anticorps secondaires couplés à l'HRP sont ajoutés et se lient aux complexes anticorps-antigène. Le substrat chromogène de l'HRP, le TMB, est ajouté et forme un produit bleu. La réaction est stoppée avec l'ajout d'une solution acide. L'intensité du signal jaune est mesurée et celle-ci est proportionnelle à la concentration de la protéine d'intérêt dans les échantillons.

2. Protocole

Les concentrations en insuline dans le sang EDTA des souris CHOW, HFD et WD, préalablement récolté lors de la mesure de la glycémie à jeun, ont été dosées avec le kit Ultra Sensitive Mouse Insuline ELISA kit (Crystal Chem ; #90080). Pour cela, les sang EDTA sont centrifugés à 4 °C pendant 20 min à 200 g et le surnageant est récupéré. Les échantillons sont ensuite dilués 20x dans la solution de dilution du kit et incubés pendant 2 h à 4 °C dans les puits contenant les anticorps de capture au fond. Une gamme étalon est également réalisée avec des concentrations décroissantes connues d'insuline recombinante (12,8 ng/ml ; 6,4 ng/ml ; 3,2 ng/ml ; 1,6 ng/ml ; 0,8 ng/ml ; 0,4 ng/ml ; 0,2 ng/ml ; 0,1ng/ml et 0) diluée 20x avec la solution de dilution du kit et incubée dans les puits. Les puits sont ensuite lavés 5 fois avec le tampon de lavage du kit. Après, 100 µl de solution de conjugaison du kit contenant les anticorps de détections couplés à l'HRP sont ajoutés aux puits pendant 30 min à température ambiante. Par la suite, les puits sont à nouveau lavés 7 fois avec le tampon de lavage. Afin de détecter le signal, les puits sont incubés avec 100 µl d'une solution contenant le substrat de l'HRP (le 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine = TMB) 40 min à température ambiante. Enfin, 100 µl d'une solution d'H₂SO₄ sont ajoutés dans les puits afin de stopper la réaction. Enfin, la densité optique de chaque puits est mesurée à 450 nm à l'aide du spectrophotomètre Perkin Elmer Victor 4X et la concentration relative en insuline plasmatique est calculée à partir de la droite d'étalonnage.

IV. Euthanasie et prélèvement d'organes

L'anesthésie des souris se fait par injection intrapéritonéale d'une solution de xylazine (10 mg/kg) et de kétamine (150 mg/kg). Les souris subissent ensuite une thoracotomie afin d'y prélever le cœur qui est rincé successivement dans des solutions de « phosphate buffer saline » (PBS) (composition en annexe) et de KCl 250 mM froid. Celui-ci est ensuite pesé, pour mesurer une éventuelle hypertrophie cardiaque, puis « freeze-clampé » et conservé à -80 °C pour les futures analyses par western blot. Les poumons sont également retirés et pesés afin de mesurer un éventuel œdème pulmonaire. Le poids des cœurs et des poumons sont normalisés sur la longueur du tibia mesuré chez chaque souris. En outre, les muscles gastrocnémiens et soléaires sont également prélevés chez les souris, rincés dans le PBS puis freeze-clampés et également conservés à -80 °C pour les analyses par western blot.

Pour les souris de la cohorte C, dont le but est de mesurer l'insulino-résistance locale dans leur muscles par western-blot, les souris sont mises à jeun 6 h avant le sacrifice. Les muscles gastrocnémiens et soléaires sont prélevés 10 minutes après l'injection d'insuline (10 mU/kg) ou de sérum physiologique (NaCl 0,9%) dans la veine cave inférieure.

V. Western Blot

1. Principe

Le western blot (WB) est une technique semi-quantitative qui permet d'analyser l'expression et/ou l'abondances des MPTs des protéines d'intérêts. Cette méthode est réalisée en 3 grandes étapes : La séparation des protéines de chaque échantillon selon leur poids moléculaire (PM) dans un gel de polyacrylamide ; le transfert de ces protéines sur une membrane et la détection des protéines cibles.

Les organes préalablement prélevés sont lysés et homogénéisés afin d'extraire les protéines solubles. Pour pouvoir comparer les différents échantillons, la concentration protéique est évaluée dans chaque échantillons à l'aide d'un dosage d'acide bicinchoninique. L'acide bicinchoninique est un réactif chromogène qui forme un complexe pourpre avec le cuivre (Cu(I)), réduit par les protéines à partir de l'ion cuivrique (Cu(II)) en milieu alcalin. Ce complexe possède alors une absorbance proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'extrait. Une courbe d'étalonnage est générée en mesurant l'absorbance, au spectrophotomètre, d'échantillons contenant des concentrations croissantes et connues de protéines (Bovine Albumine Serum), permettant ainsi de calculer la quantité de protéines dans chaque échantillon dont l'absorbance a été mesurée en parallèle.

Pour chaque échantillon, une quantité donnée et égale d'extrait protéique sera engagée dans le western blot. Ces extraits protéiques sont préalablement réduits et dénaturés. Le SDS (dodecylsulfate de sodium) présent dans le tampon de dénaturation permet le maintien de cet état dénaturé et le chargement négatif des protéines avant leur dépôt au sommet d'un gel de polyacrylamide dans les puits prévus à cet effet. Le gel est soumis à un champ électrique et plongé dans un tampon de migration permettant la migration des protéines de l'anode vers la cathode. Les protéines sont séparées en fonction de leur PM : plus ces protéines ont un PM élevé, plus elles sont retenues par les mailles du gel réticulé. La vitesse de migration des protéines dépend de leur taille mais peut également être adaptée en modifiant le pourcentage d'acrylamide du gel. Le gel de

polyacrylamide est composé de 2 parties : la partie supérieure forme le gel de concentration et la partie inférieure le gel de séparation. Le gel de concentration permet de regrouper les protéines en une fine bande de manière à ce que les protéines dans chaque puits entrent de façon homogène dans le gel de séparation. La rétention des protéines dans ce gel est réalisée grâce à une différence de charge, conférée par le pH du gel, entre les ions glycine et chlorures du tampon de migration qui migrent à des vitesses différentes. Le gel de concentration possède un pH faiblement acide, attribuant une faible charge négative et une faible vitesse de migration à la glycine retenant les protéines. Le chlorure possède une charge un peu plus élevée qui pousse les protéines vers la glycine. Le pH basique du gel de séparation permet l'accélération de la migration de la glycine en lui conférant une charge négative plus élevée. Les protéines sont alors libérées et peuvent migrer librement en se faufilant entre les mailles du gels.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) sous l'effet d'un courant électrique perpendiculaire au sens de la migration. Il est important de bloquer ultérieurement les sites de liaisons aspécifiques potentiels, en incubant la membrane dans une solution riche en protéines neutres (BSA ou lait), pour éviter des interactions entre la membrane et les anticorps. En effet, afin de pouvoir visualiser et détecter les protéines, ces membranes sont incubées en présence d'anticorps primaires reconnaissant une protéine ou une MPT d'intérêt. Après lavage, afin d'éliminer les anticorps primaires en excès, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort et spécifique de la partie Fc de l'anticorps primaire utilisé. La peroxydase de raifort (HRP) est une enzyme qui catalyse la réaction entre ses substrats, le luminol et peroxyde d'oxygène et mène à l'émission d'un signal de lumière (chemiluminescence). Ce signal est ensuite capté grâce à un film photographique. L'intensité de chaque bande/signal est proportionnelle à la quantité de protéines ou de MPT détectée.

2. Protocole

- Lyse et préparation des échantillons

Les muscles soléaires et gastrocnémiens et le cœur des souris ont été préalablement prélevés et conservés à -80 °C chez les souris sous régime CHOW, HFD ou WD après 1, 2 ou 4 mois comme mentionné précédemment. Ces organes sont réduits en poudre à l'aide d'un mortier et 50mg de chaque échantillon sont prélevés. Ces échantillons sont dilués 10x (P/V) dans le tampon de lyse RIPA (radio-immunoprecipitation assay, contenant des inhibiteurs de déacétylases et d'O-GlcNase (composition en annexe)) et sont ensuite homogénéisés à l'aide du disperseur IKA® ULTRA- TURRAX®

sur glace. Après 30 min de repos sur glace, les lysats obtenus sont soniqués 2 x à une fréquence de 20 kHz pendant 5 secondes et centrifugés 20 min à 16 100 g à 4 °C. Les surnageants sont récupérés et conservés à -80 °C.

- **Dosage protéique des échantillons**

La quantité de protéines a été mesurée dans chaque échantillon via un dosage d'acide bicinchoninique (BCA). Les échantillons sont dilués 500X dans de l'eau distillée et en parallèle la gamme étalon est réalisée à partir de concentrations décroissantes de BSA recombinante (200 ; 40 ; 20 ; 10 ; 5 ; 2,5 ; 1 ; 0,5 µg/ml). Les échantillons ainsi que les étalons sont incubés avec le réactif BCA (solution du kit Micro BCA™ Protein Assay kit ; #23235) pendant 2h à température ambiante dans une plaque 96 puits. Enfin, l'absorbance est lue à 562 nm au spectrophotomètre Perkin Elmer Victor 4X et la concentration protéique est obtenue par comparaison avec la droite d'étalonnage.

- **Électrophorèse : Séparation des protéines dans gel le gel de polyacrylamide**

Les échantillons sont préparés afin de charger 15 µg de protéines par puits. Pour cela, les échantillons sont dilués dans de l'eau distillée et du tampon de Laemmli 4X concentré (composition en annexe) contenant 0,1 mM de DTT, en fonction de leur concentration protéique. Ensuite, les échantillons sont portés à ébullition et centrifugés avant d'être chargés dans le gel de polyacrylamide. Les gels sont, soit préalablement préparés et coulés (composition en annexe), soit des gels précoulés Criterion TGX (Biorad ; 5671058) de 26 puits. La préparation des gels requiert 2 vitres en verre dans lesquels le gel de séparation est d'abord coulé puis, une fois polymérisé, est recouvert du gel de concentration dans lequel un peigne est inséré afin de mouler les puits de chargements. Dans le 1^{er} puits, un marqueur de PM (Page ruler ; 26616 Thermo Scientific) est chargé afin de vérifier le poids des protéines révélées. Les protéines migrent dans le gel baigné dans un tampon de migration (composition en annexe) et grâce à un champ électrique de 150V et cela jusqu'à la sortie du front de migration du gel de migration.

- **Transfert des protéines sur une membrane de PVDF**

Les protéines sont transférées du gel vers une membrane de PVDF (Millipore; IPVH00010) préalablement activée dans l'éthanol 100% et hydratée ensuite dans l'eau. Le transfert est réalisé dans un tampon de transfert (composition en annexe) et grâce à l'application d'un champ électrique de 100 V pendant 1 h.

- **Coloration des protéines**

Pour vérifier l'uniformité du transfert des protéines du gel vers la membrane, la totalité des protéines est colorée de manière aspécifique par le rouge Ponceau. Ce colorant se lie de manière réversible et non covalente aux groupes amines, chargés positivement, et aux régions non polaires des protéines. Pour ce faire, la membrane est rincée rapidement à l'eau distillée après le transfert et puis incubée pendant 5 min dans la solution de rouge Ponceau (Ponceau S solution; Sigma; P7170-1L) sous agitation à température ambiante. La membrane est ensuite à nouveau rapidement lavée à l'eau distillée et les protéines sont visibles en rouge sur la membrane. La coloration est éliminée en rinçant la membrane dans une solution de TBS-Tween 0,1 % (composition en annexe).

- **Blocage de la membrane**

Les membranes sont incubées pendant 1h, sous agitation, à température ambiante, dans une solution de TBS-Tween 0,1 % contenant 2,5 % de lait. Ceci permet de prévenir les liaisons aspécifiques des anticorps avec la membrane.

- **Immunomarquage : détection des protéines cibles**

Afin de révéler les protéines d'intérêts, les membranes sont incubées en présence de l'anticorps primaire d'intérêt (liste des anticorps 1^{aire} en annexe), dilué dans une solution de TBS-Tween 0,1% contenant 2,5% de lait, sous agitation pendant une nuit à 4 °C. Les membranes sont ensuite lavées 3x dans une solution de TBS-Tween 0,1% pendant 10 min et incubées pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (liste anticorps 2nd en annexe) dilué dans une solution de TBS-Tween 0,1% contenant 2,5% de lait. Enfin, les membranes sont à nouveau lavées 3x pendant 10 min avec la solution TBS-Tween 0,1%.

- **Révélation**

La membrane est incubée pendant 1 min avec la solution de révélation ECL (Enhanced chemiluminescence; solution du kit BM Chemiluminescence Blotting Substrate; Roche; #11500694001) qui contient les substrats de l'HRP. Le signal est capté sur un film photographique qui est révélé dans une solution de révélation. Le signal est ensuite fixé grâce à une solution de fixation.

- **Quantification**

L'intensité de chaque bande/signal est quantifiée grâce au software ImageJ et normalisée via la mesure du facteur d'élongation eucaryote 2 (eEF2) ou de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), utilisés comme contrôle de chargement. Pour les MPTs, l'entièreté des bandes révélant les protéines O-GlcNAcylées ou acétylées sont prises en compte. Une deuxième normalisation est réalisée en rapportant chaque signal des différents échantillons sur la moyenne des signaux des échantillons de souris CHOW. Ceci permet de comparer l'expression des protéines entre les différentes conditions et ainsi d'obtenir une semi-quantification. Pour les phosphoprotéines, le signal est également normalisé sur le signal de la protéine non phosphorylée.

- **Stripping**

Le stripping des membranes sert à déstabiliser les liaisons des anticorps primaires afin de pouvoir réutiliser la membrane pour révéler une deuxième cible. Pour ce faire, les membranes sont incubées dans une solution de glycine (0,1 M), après un bref lavage à l'eau, à pH 2 pendant 30 min à température ambiante. Après 6 rinçages de 5 min avec du TBS-Tween 0,1%, les étapes citées précédemment sont réitérées en commençant par le blocage des membranes.

Résultats

I. Caractérisation des effets des 2 régimes au niveau systémique

1. Effets des régimes HFD et WD sur le développement de l'obésité et du DT2

a) Obésité

Les souris de la cohorte A ont été pesées hebdomadairement afin d'évaluer la prise de poids au cours de l'étude. On observe que les 2 régimes HFD et WD induisent le développement d'une obésité chez les souris. En effet, les souris sous régime HFD et WD ont un poids significativement supérieur aux souris sous régime contrôle dès la deuxième semaine de régime (Figure 8). On observe également que le poids des souris HFD est plus élevé que celui des souris WD. Cette différence devient significative après 4 semaines de régime.

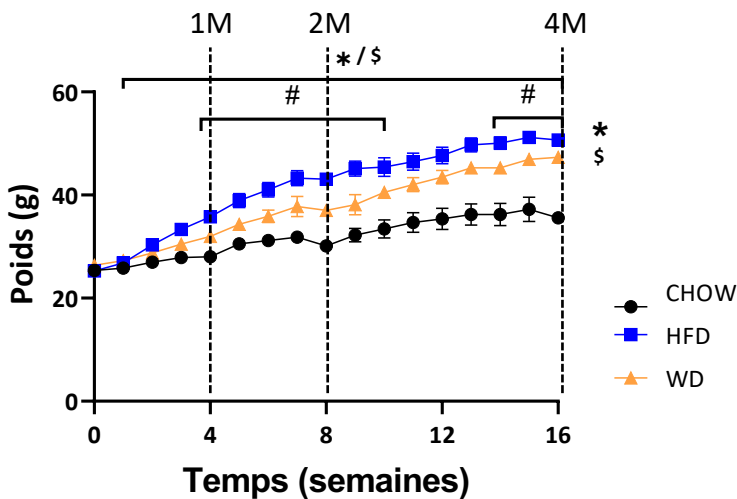


Figure 8. Développement d'une obésité avec les régimes HFD et WD. Évaluation du poids des animaux au cours du temps. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. * = $p < 0,05$ HFD vs. CHOW. \$ = $p < 0,05$ WD vs. CHOW. # = $p < 0,05$ WD vs. HFD. (one-way ANOVA ou two-way ANOVA, test post-hoc de Tukey).

b) Hyperglycémie à jeun, hyper-insulinémie à jeun et insulino-résistance systémique

L'hyperglycémie à jeun, l'hyper-insulinémie et l'HOMA-IR ont été évalués chez les souris de la cohorte A afin d'évaluer l'installation du diabète chez les souris des différents régimes. Ces données ont été complétées par les données précédemment obtenues (par la Dr. Natacha Fourny) sur la cohorte B, cohorte sur laquelle les muscles et cœurs ont été prélevés afin d'y étudier l'abondance de l'acétylation et de l'O-GlcNAcylation ainsi que l'expression de certaines enzymes régulatrices de ces MPTs par WB (voir chapitre II).

La glycémie à jeun a été mesurée chez les souris après 2 et 4 mois de régime. La glycémie à jeun est significativement plus élevée chez les souris HFD et WD par rapport aux souris CHOW à 2 et 4 mois de régime montrant une perte de l'homéostasie glucidique chez ces souris (Figure 9A). Néanmoins, à 2 mois de régime, la glycémie à jeun est significativement plus élevée chez les HFD par rapport aux WD soulignant l'apparition d'un diabète plus précoce chez les souris sous régime HFD. Par ailleurs, l'insulinémie à jeun est également significativement plus élevée chez les souris HFD et WD par rapport aux souris CHOW et cela dès 2 mois de régime (Figure 9B). Aucune différence n'est cependant observée entre les groupes WD et HFD.

L'HOMA-IR est un index d'insulino-résistance globale qui est calculé à l'aide de l'équation suivante : $HOMA-IR = [Insulinémie \text{ à jeun (ng/mL)} \times Glycémie \text{ à jeun (mg/dL)}] / 405$. Il permet de confirmer la présence d'une insulino-résistance chez les souris traitées par les régimes obésogènes (Figure 9C). On observe, en effet, un HOMA-IR significativement plus élevé chez les souris HFD et WD par rapport aux souris CHOW. A 4 mois, une différence significative apparaît entre les souris HFD et WD, indiquant une insulino-résistance exacerbée chez les HFD.

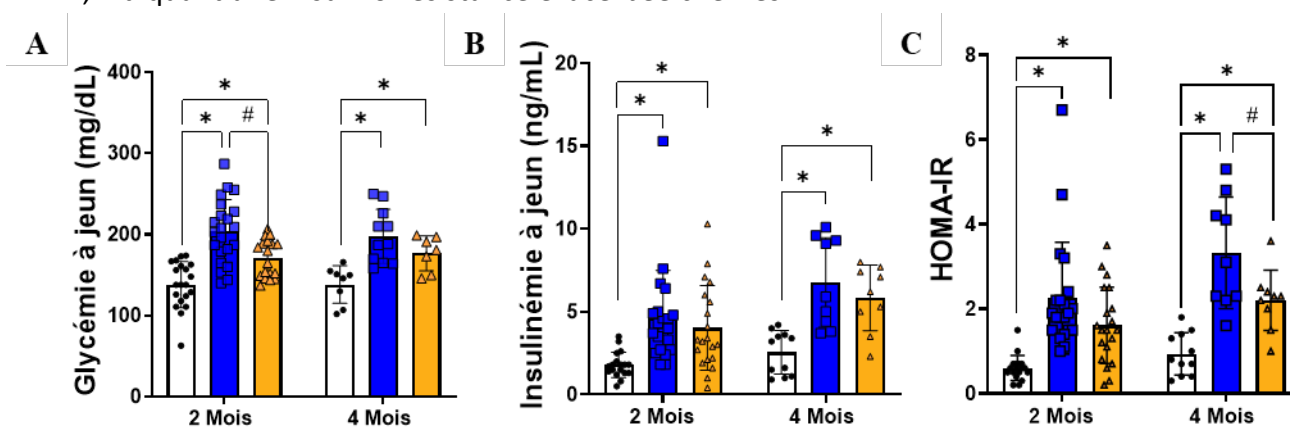


Figure 9. Développement d'un DT2 avec les régimes HFD et WD. La glycémie à jeun (A), l'insulinémie à jeun (B) et l'HOMA-IR (C) ont été mesurés sur des souris soumises à 2 et 4 mois de régime CHOW, HFD ou WD. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. * = $p < 0,05$ vs. CHOW. # = $p < 0,05$ WD vs. HFD. (one-way ANOVA, test post-hoc de Tukey).

2. Effets des régimes HFD et WD sur le phénotype cardio-pulmonaire

Afin de caractériser les changements morphologiques cardio-pulmonaires potentiels, la moitié des souris de la cohorte B a été euthanasiée après 2 mois de régime et l'autre moitié après 4 mois. Les cœurs ont été pesés afin de confirmer l'hypertrophie observée par échographie (résultats

préliminaires du Dr. Natacha Fourny). Je me suis également intéressée au poids des poumons pouvant indiquer la présence d'un œdème pulmonaire. Le poids des organes a été normalisé sur la longueur du tibia, pour éviter des biais dans les résultats dû à des variations de taille et de poids qu'il peut exister entre les différentes souris. Après 2 mois de régimes HFD et WD, on observe que le poids des cœurs est significativement plus élevé chez les souris HFD et WD par rapport aux souris contrôles, reflétant l'apparition d'une hypertrophie cardiaque (Figure 10A). D'autre part, le poids des poumons chez les HFD et WD augmente avec le temps et devient significativement supérieur à celui des souris CHOW après 4 mois de régime (figure 10B), observation caractéristique d'une dysfonction cardiaque diastolique (Deswal, 2005). En effet, une pression élevée dans le ventricule gauche provoque un reflux de sang dans les veines pulmonaires qui par la suite, par osmose, provoque une accumulation de liquide dans les poumons et une inondation alvéolaire. Cette hypertension dans le ventricule gauche peut être la conséquence de l'hypertrophie cardiaque apparaissant très tôt avec les régimes HFD et WD.

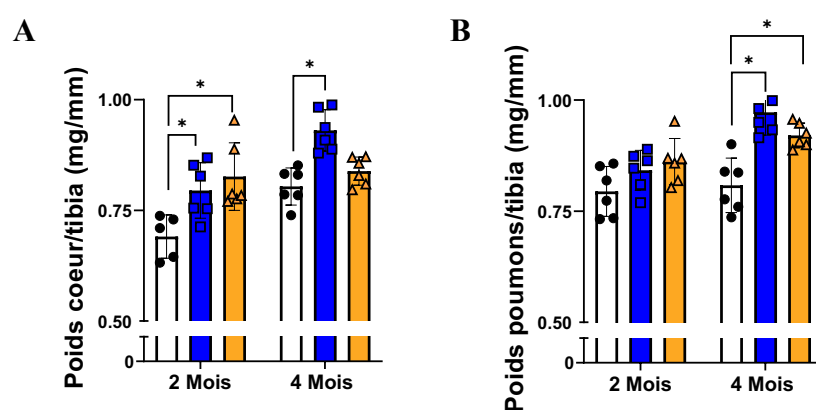


Figure 10. Poids des cœurs (A) et poumons (B), normalisés sur la longueur du tibia, après 2 et 4 mois de régime CHOW, HFD ou WD. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. * = $p < 0,05$ vs. CHOW (one-way ANOVA, test post-hoc de Tukey).

II. Caractérisation des modifications post-traductionnelles dans le muscle squelettique et cardiaque

L'effet des régimes sur les niveaux d'O-GlcNAcylation, d'acétylation et d'expression des enzymes participants à la régulation de ces MPTs a été étudié sur la cohorte B (les paramètres diabétiques de cette cohorte ont déjà été préalablement validés et correspondent aux données obtenues avec la

cohorte A, c'est-à-dire qu'une obésité et un HOMA-IR élevé chez les souris sous régime HFD ou WD ont été observés à 2 et 4 mois). Pour ce faire, des western blots ont été réalisés sur des extraits de muscle squelettique gastrocnémien, soléaire et de muscle cardiaque.

1. Évaluation des niveaux d'O-GlcNAcylation et de ses enzymes régulatrices

a) L'O-GlcNAcylation dans le muscle cardiaque, gastrocnémien et soléaire

Dans le tissu cardiaque, on observe une augmentation de l'O-GlcNAcylation des protéines avec le régime WD par rapport aux autres régimes et cela dès 1 mois (Figure 11A). Bien qu'à deux mois cette différence soit non significative dû à une grande variabilité des échantillons, une tendance à l'augmentation est néanmoins observée (pval= 0,07). Cette augmentation est confirmée à 4 mois de régime. Il faut attendre 4 mois de régime pour voir une augmentation similaire induite par le régime HFD.

Les niveaux d'O-GlcNAcylation dans le muscle gastrocnémien augmentent de manière similaire au muscle cardiaque. Une augmentation est détectée dès 1 mois chez les souris WD par rapport aux souris CHOW et HFD (Figure 11B). Après 4 mois de régime, on observe également une augmentation chez les souris HFD par rapport aux souris CHOW. Par contre, dans le soleus, on retrouve un profil d'O-GlcNAcylation plus éloigné des deux autres tissus (Figure 11C). En effet, pas ou peu d'effet n'est présent à 1 et 2 mois de régime. Il faut attendre 4 mois de régime pour voir une augmentation des niveaux d'O-GlcNAcylation chez les WD et les HFD par rapport aux CHOW. Afin d'affiner ces résultats, les niveaux d'O-GlcNAcylation dans le soleus ont été étudiés sur un seul et même gel (Figure 12). On retrouve une signature similaire avec une augmentation du niveau d'O-GlcNAcylation après 4 mois de régime, similaire entre HFD et WD.

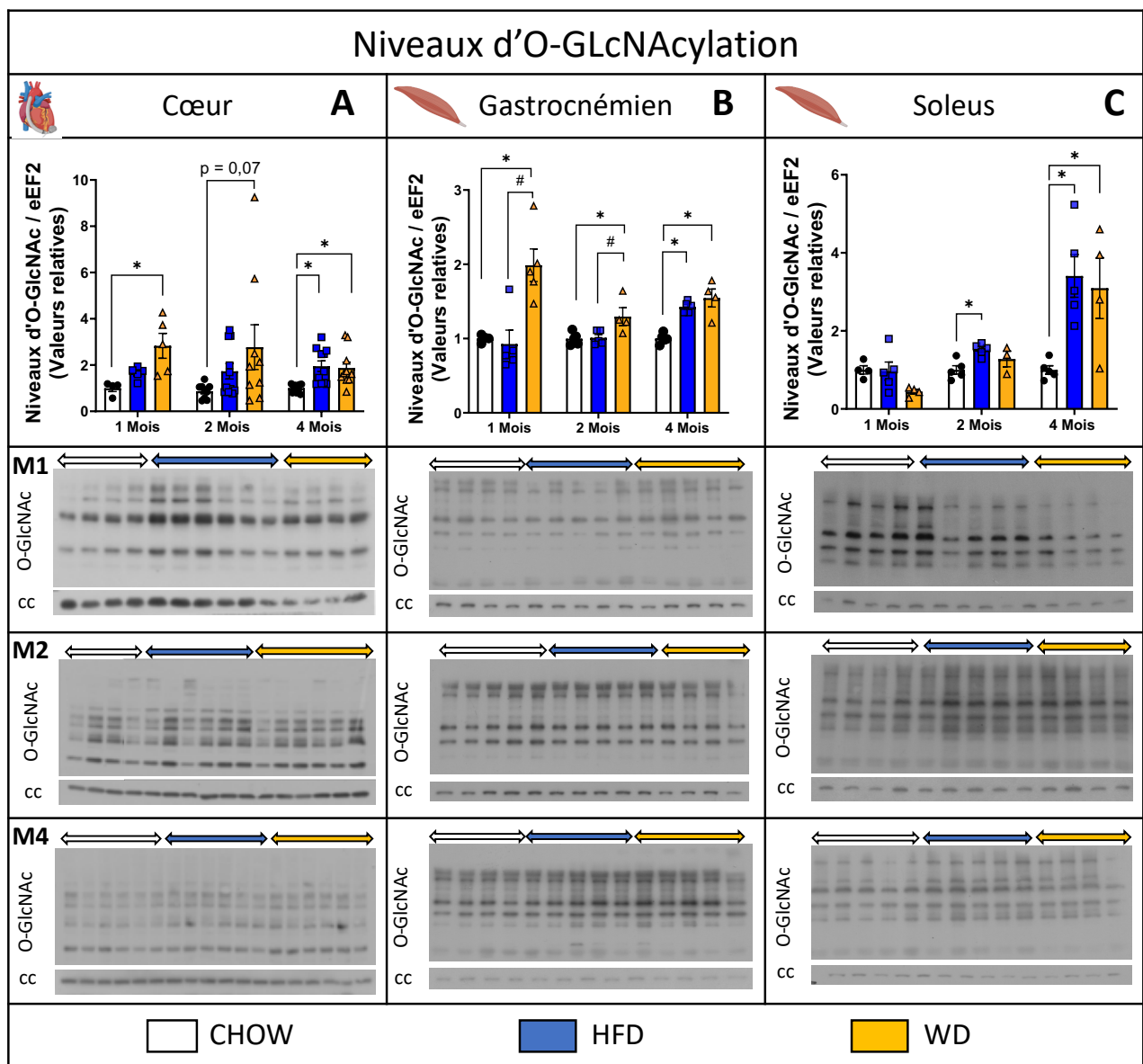


Figure 11. Niveaux d'O-GlcNAcylation des protéines dans le muscle cardiaque (A), soléaire (B) et gastrocnémien (C) à 1, 2 et 4 mois de régime. Quantifications et Western-Blots représentatifs des niveaux d'O-GlcNAcylation à 1, 2 et 4 mois de régime. L'intensité des bandes, normalisées sur le signal d'eEF2 (cc = contrôle de chargement), des westerns à 1,2 et 4 mois de régimes dans les muscles cardiaque, soléaire et gastrocnémien ont été quantifiées avec le software ImageJ. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. * = $p < 0,05$ vs. CHOW. # = $p < 0,05$ WD vs. HFD. (one-way ANOVA, test post-hoc de Tukey). M1 = 1 mois; M2 = 2 mois; M4 = 4 mois.

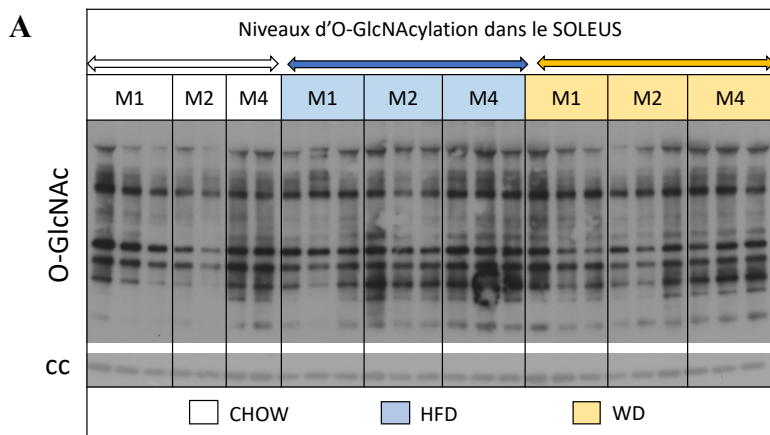
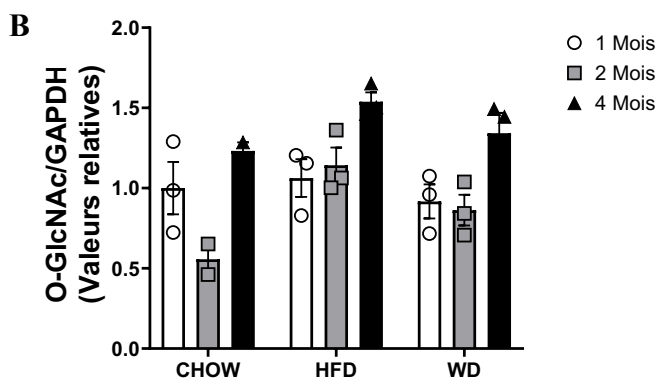


Figure 12. Niveaux d'O-GlcNAcylation des protéines dans le muscle soléaire à 1, 2 et 4 mois de régime. Western-Blot représentatif des niveaux d'O-GlcNAcylation à 1,2 et 4 mois de régime (A) et quantification de l'intensité des bandes, normalisées sur le signal de GAPDH (cc = contrôle de chargement), avec le software ImageJ (B). Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. M = mois



b) Enzymes de la voie des HBP dans le muscle cardiaque, gastrocnémien et soléaire

L'expression protéique des enzymes OGA, OGT, GFAT1 et GFAT2 a également été évaluée au niveau des muscles gastrocnémiens et soléaires par western blot. Le tableau 2 vous résume les changements relatifs induits par les régimes alors que la figure 13 décrit avec précision les changements d'expression d'OGA. En résumé, l'expression protéique d'OGT, de GFAT1 et de GFAT2 ne diffère pas entre les différents groupes dans les 2 muscles (voir tableau 2). En revanche, on observe une diminution significative de l'expression d'OGA avec le régime WD à 4 mois tant dans le muscle gastrocnémien que dans le muscle soléaire et ainsi qu'avec le régime HFD dans le soleus par rapport au régime CHOW (Figure 13). La diminution d'OGA intervient donc à un moment plus tardif que l'augmentation de l'O-GlcNAcylation, suggérant que la régulation de l'expression de cette enzyme n'est pas la seule responsable de l'augmentation de l'O-GlcNAcylation. Néanmoins, il n'est pas exclu qu'une MPT (phosphorylation ou autre) puisse influencer l'activité de ces enzymes.

	Gastrocnémien			Soleus		
Mois	1	2	4	1	2	4
O-GlcNAc	= ↑	= ↑	= ↑	= =	↑ =	↑ ↑
OGA	= =	= =	= ↓	= =	= =	↓ ↓
OGT	= =	= =	= =	= =	= =	= =
GFAT1	= =	= =	= =	= =	= =	= =
GFAT2	= =	= =	= =	= ↑	= =	= =

Tableau 2. Tableau résumant les différences d'expression protéique (obtenus via western blot) dans les soleus et gastrocnémiens à 1,2 et 4 mois de régime HFD (bleu) ou WD (jaune). =, pas de changement par rapport au régime CHOW; ↑, augmentation; ↓, diminution.

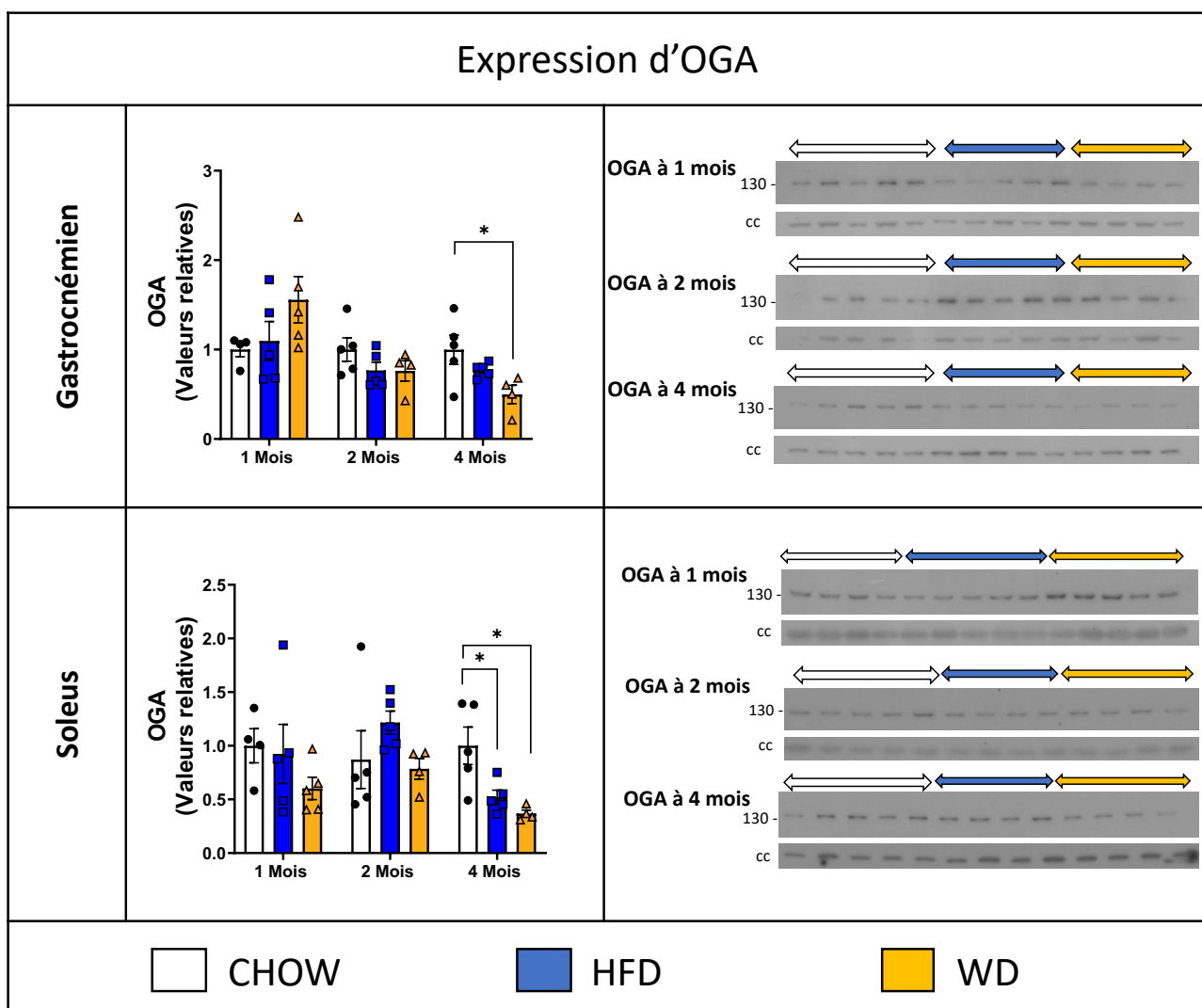


Figure 13. Niveaux d'OGA dans le muscle gastrocnémien et soléaire de souris sous régime CHOW, HFD et WD. Western blots représentatifs des niveaux d'O-GlcNAcylation et quantifications de l'intensité des bandes, normalisées sur le signal d'eEF2 ou de GAPDH (cc = contrôle de chargement), avec le software ImageJ. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. * = $p < 0,05$ vs. CHOW (one-way ANOVA, test post-hoc de Tukey).

2. Évaluation des niveaux d'acétylation et de ses enzymes régulatrices

a) L'Acétylation dans le muscle cardiaque, gastrocnémien et soléaire

Une augmentation importante et significative de l'acétylation des protéines cardiaques est détectée dès le 1^{er} mois sous régime HFD et se maintient durant toute la période étudiée (Figure 14A). Une augmentation plus légère et uniquement significative à 2 mois est présente chez les souris WD. Une réponse similaire est retrouvée au niveau du soleus. En effet, les niveaux d'acétylation des protéines sont augmentés sévèrement dès le 1^{er} mois de régime chez les HFD par rapport aux CHOW et WD (Figure 14B). Ce n'est qu'après 4 mois de régime WD qu'une augmentation de l'acétylation est régulière. Le profil d'acétylation des protéines dans le muscle gastrocnémien est différent. Les niveaux d'acétylation dans ce muscle glycolytique sont extrêmement faibles (quasiment indétectables) et ne sont pas modifiés à 1 et 2 mois de régime. A 6 mois (après 4 mois de régime), l'acétylation dans le muscle est visible et suffisante pour être quantifiée, suggérant peut-être un effet de l'âge sur l'acétylation des protéines dans le muscle glycolytique (Figure 14C). De plus, on observe qu'après 4 mois de régime HFD, il y a une augmentation significative de l'acétylation des protéines dans le muscle gastrocnémien par rapport aux régimes CHOW et WD (figure 15). Afin de vérifier l'hypothèse d'une moindre acétylation dans le muscle gastrocnémien par rapport au muscles soléaire et cardiaque, l'acétylation dans ces différents tissus a été évaluée sur un seul gel à 4 mois de régime (Figure 15). On confirme aussi une moindre acétylation dans le muscle gastrocnémien par rapport aux deux autres tissus.

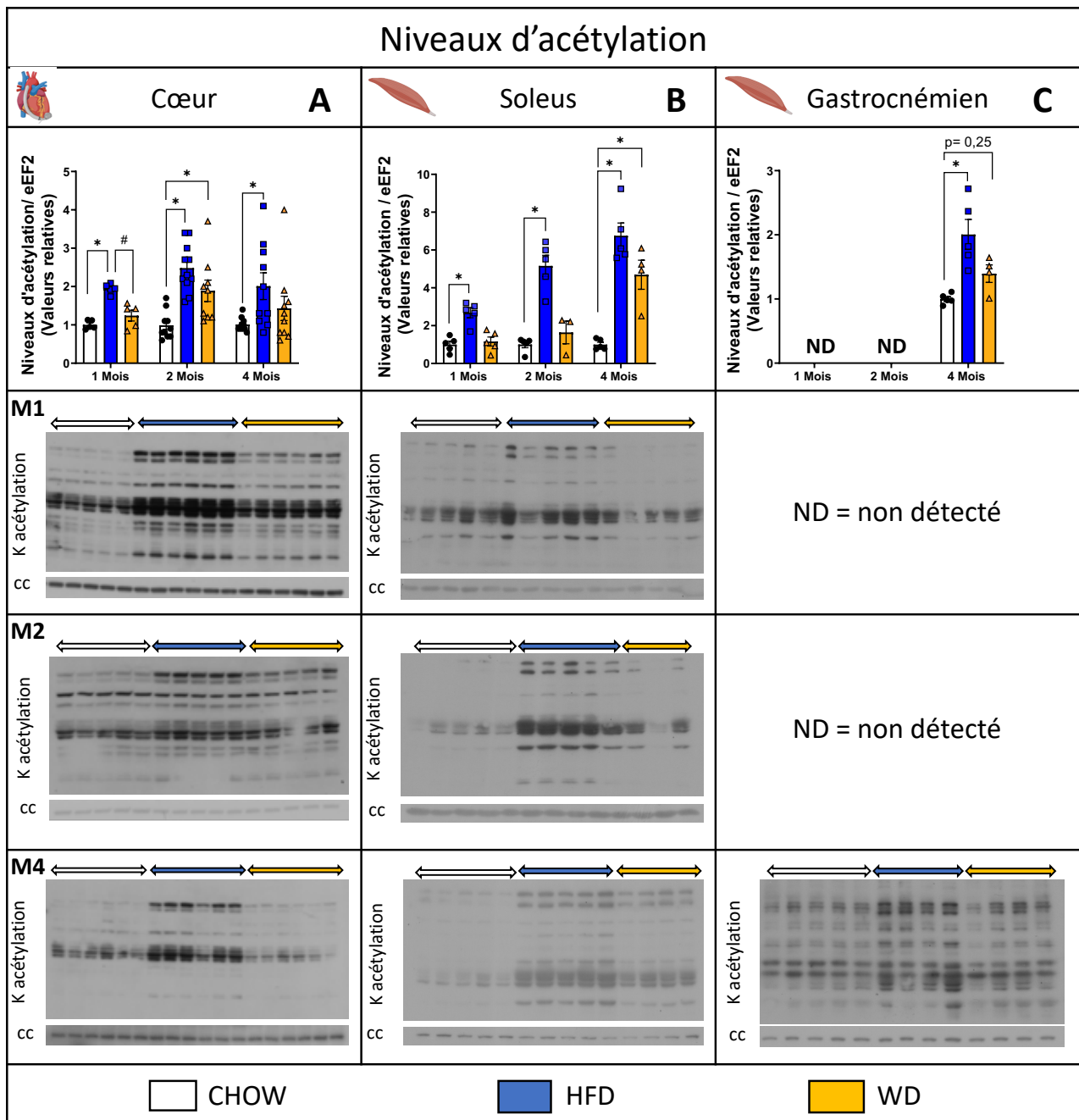


Figure 14. Niveaux d'acétylation des protéines dans le muscle cardiaque (A), soléaire (B) et gastrocnémien (C) à 1, 2 et 4 mois de régime. Quantifications et Western-Blots représentatifs des niveaux d'O-GlcNAcylation à 1, 2 et 4 mois de régime. L'intensité des bandes, normalisées sur le signal d'eEF2 (cc = contrôle de chargement), des westerns à 1,2 et 4 mois de régimes dans les muscles cardiaque, soléaire et gastrocnémien ont été quantifiées avec le software ImageJ. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. * = $p < 0,05$ vs. CHOW. # = $p < 0,05$ WD vs. HFD. (one-way ANOVA test post-hoc de Tukey). M1 = 1 mois; M2 = 2 mois; M4 = 4 mois.

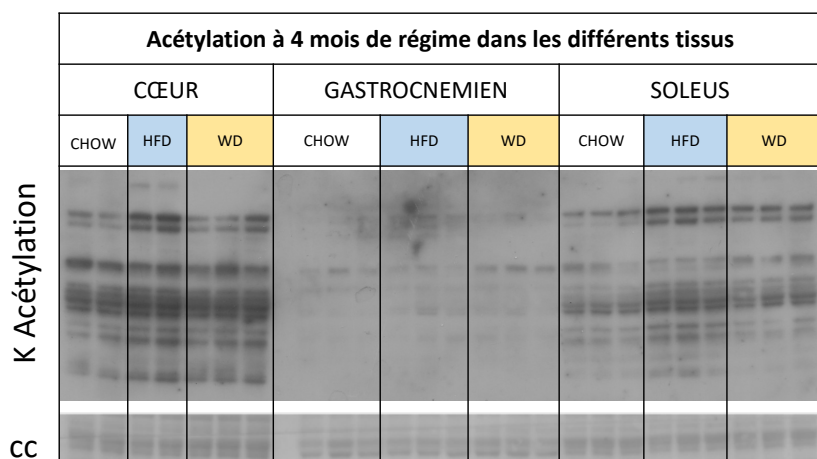


Figure 15. Niveaux d'acétylation des protéines dans le muscle cardiaque, gastrocnémien et soléaire à 4 mois de régime. Western blots représentatif du niveau d'acétylation à 4 mois. cc = contrôle de charge (ici les protéines totales ont été marquées au rouge Ponceau)

b) Analyse de l'expression d'enzymes régulatrices de la voie d'acétylation dans le muscle cardiaque, gastrocnémien et soléaire

Les enzymes HDAC6, SIRT1, SIRT2 et SIRT3 sont les principaux régulateurs de la déacétylation. Les expressions protéiques de ces enzymes ont également été évaluées à 1, 2 et 4 mois dans les 2 tissus musculaires squelettiques (Tableau 3 et Figure 16). Le niveau d'expression protéique d'HDAC6, de SIRT1 et de SIRT3 est inchangé entre les souris quel que soit le régime (Tableau 3). Par contre, l'expression de SIRT2 varie en fonction des régimes et du type musculaire. D'une part, on observe une diminution de l'expression de SIRT2 dans le gastrocnémien avec les régimes HFD et WD par rapport au CHOW après 4 mois. A l'inverse, on retrouve une augmentation de son expression dès le 1^{er} mois de régime HFD et WD dans le soleus.

	Gastrocnémien			Soleus		
Mois	1	2	4	1	2	4
Acetylation	nd	nd	↑ =	↑ =	↑ =	↑ ↑
SIRT1	nm	nm	= =	= =	= =	= =
SIRT2	nm	nm	= ↓	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↑
SIRT3	nm	nm	= =	= =	= =	= =
HDAC6	nm	nm	= =	= =	= =	= =

Tableau 3. Tableau résumant les différences d'expression protéique (obtenus via western blot) dans les soleus et gastrocnémiens à 1,2 et 4 mois de régime HFD (bleu) ou WD (jaune). =, pas de changement par rapport au régime CHOW; ↑, augmentation; ↓, diminution.

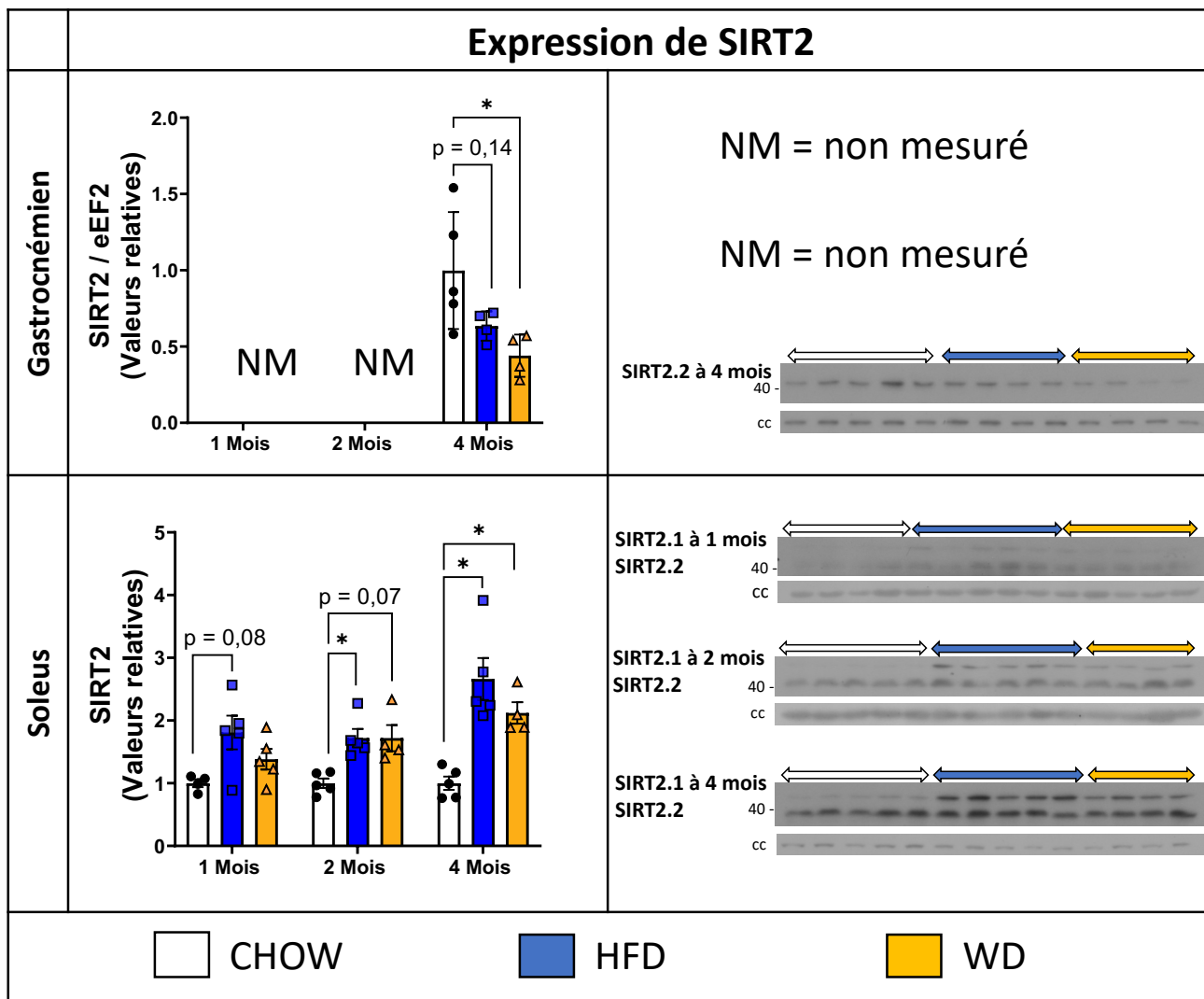


Figure 16. Expression de SIRT2 dans le muscle gastrocnémien et soléaire de souris sous régime CHOW, HFD et WD. Western blots représentatifs des niveaux d'O-GlcNAcylation et quantifications de l'intensité des bandes, normalisées sur le signal d'eEF2 ou de GAPDH (cc), avec le software ImageJ. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. * = $p < 0,05$ vs. CHOW (one-way ANOVA, test post-hoc de Tukey).

III. Évaluation de l'insulino-résistance locale dans le muscle gastrocnémien et soléaire

L'insulino-résistance au niveau des muscles gastrocnémiens et soléaires a été évaluée à 2 mois de régime en analysant le niveau de phosphorylation de plusieurs protéines de la voie insulinaire. Celles-ci ont été étudiées par western blot après une stimulation insulinaire (par injection d'insuline ou de véhicule dans la veine cave inférieure des souris in 10 minutes avant le prélèvement des muscles). Les protéines analysées ici étaient les formes phosphorylées et totales de PKB et de S6 (figure 17). Ces données, obtenues en fin de mémoire, ne concernent encore qu'un petit nombre d'individus par groupe. L'analyse statistique qui en résulte n'est donc pas robuste mais ces données permettent néanmoins d'entrevoir des réponses différentes suivant les tissus et les régimes.

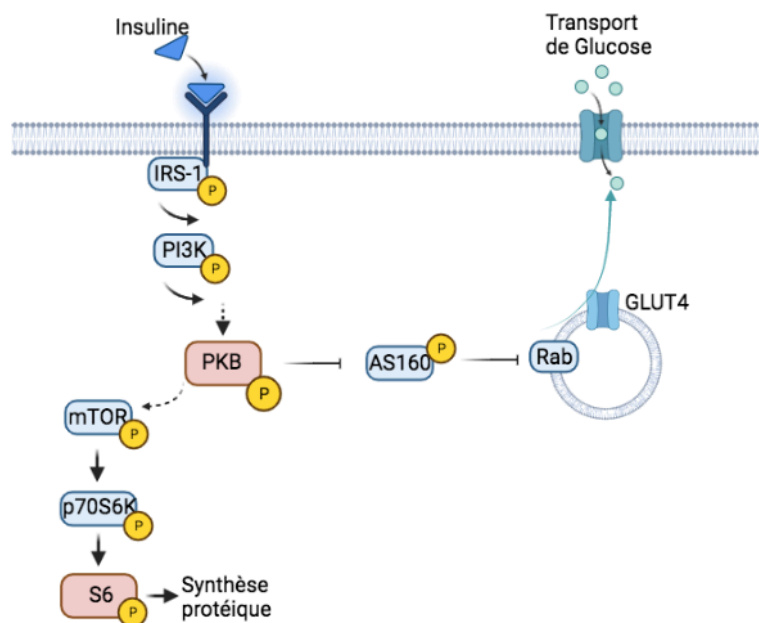


Figure 17. Éléments de la voie de signalisation à l'insuline. L'insuline active plusieurs voies de signalisation lorsqu'elle se lie à son récepteur. La voie insulinaire principale responsable des changements métaboliques est la voie menant à l'activation de la protéine kinase B (PKB). PKB, une fois phosphorylée, peut à son tour phosphoryler plusieurs protéines. Parmi ces protéines, on retrouve la protéine AS160 qui perd alors sa capacité inhibitrice sur la translocation de GLUT4 à la membrane et permet l'entrée de glucose dans la cellule. Une autre cible de PKB est mTOR qui à son tour phosphoryle le couple p70S6K/S6, responsable de la régulation de la synthèse protéique mais également d'une boucle de rétro contrôle négatif sur le récepteur à l'insuline. Abréviations: IRS-1 = Insulin Receptor Substrate 1; PI3K = phosphoinositide 3-kinase; PKB = Protéine Kinase B; mTOR = mammalian target of rapamycine; p70S6K = 70-kDa ribosomal protein S6 kinase; S6 = protéine ribosomale; AS160 = Akt Substrate of 160 kDa; GLUT4 = transporteur de glucose 4.

Concentrons-nous dans un premier temps sur PKB, considéré comme le carrefour majeur de la réponse insulinique (Abdul-Ghani et al., 2010). Une augmentation de la phosphorylation de PKB sur la Ser473 semble présente dans le muscle oxydatif soléaire dans le groupe CHOW et HFD (Figure 18.B1). Par contre, le niveau de phosphorylation est déjà élevé dans le groupe WD en absence d'insuline et l'insuline n'augmente pas ce taux de phosphorylation. Ce dernier profil de phosphorylation est caractéristique d'un tissu insulino-résistant (Abdul-Ghani et al., 2010). D'un autre côté, la réponse à l'insuline au niveau de PKB dans le gastrocnémien est assez diffuse et aucune différence ne semble pouvoir être observée entre les souris stimulées ou non à l'insuline quel que soit le régime (Figure 18.A1).

L'état de phosphorylation de la protéine ribosomiale S6, qui est un bon reflet de l'état d'activation de la voie PKB, a également été évalué (Figure 18.2). Comme pour PKB, on retrouve une tendance à l'augmentation de la phosphorylation de S6 après stimulation à l'insuline dans le groupe CHOW dans le muscle soleus. Cette réponse insulinique disparaît dans les groupes WD et HFD avec un niveau basal de phosphorylation élevé. Le niveau de phosphorylation de S6 dans le gastrocnémien est beaucoup plus hétérogène avec peu ou pas d'effet de l'insuline.

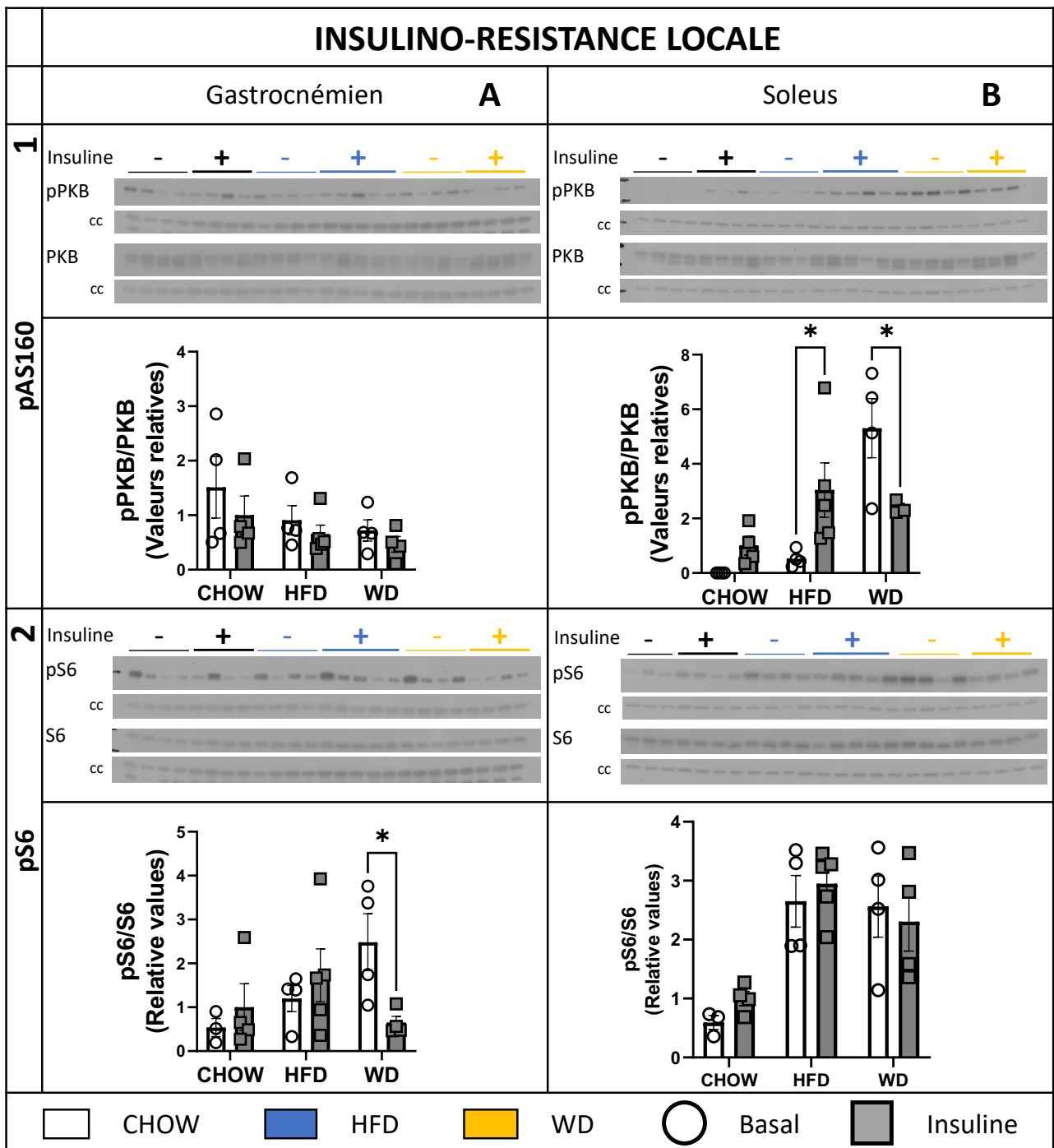


Figure 18. Analyse des protéines de la voie de signalisation de l'insuline dans le gastrocnémien et soleus après 2 mois de régime. Western blots et quantification des niveaux de phosphorylation et d'expression de PKB (1), S6 (2) dans le gastrocnémien (A) et dans le soleus (B). L'intensité des bandes a été normalisée sur le signal d'eEF2 ou GAPDH (cc= contrôle de charge), avec le software ImageJ. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. * = $p < 0,05$ vs. basal (one-way ANOVA, test post-hoc de Tukey). Phosphorylation de PKB sur la Ser473 et de S6 sur la Ser235 et Ser236.

Discussion

La littérature récente montre que l'O-GlcNAcylation et l'acétylation des protéines sont des facteurs importants du développement du DT2 et de la CMD qui en découle. Cependant, leur apparition ainsi que leur rôle dans la progression de la pathologie restent peu compris. Le laboratoire d'accueil a étudié 2 modèles de DT2 induisant chacun des modifications de ces MPTs particulières au niveau cardiaque et corrélant avec des dysfonctions cardiaques et systémiques différentes. Le but de ce mémoire est d'approfondir la caractérisation de ces 2 modèles afin de mieux comprendre l'apparition de ces MPTs et leur implication dans les effets différents de ces régimes obésogènes.

I. Développement du diabète chez les souris HFD et WD

Les 2 modèles murins utilisés dans ce mémoire sont induits par des régimes riches en graisses et/ou en sucres (HFD et WD). Ces modèles présentent de nombreux avantages puisqu'ils permettent l'étude du développement naturel de la pathologie du DT2 et sont peu invasifs. L'utilisation d'agents chimiques pour induire des altérations mimant le DT2 tels que la streptozocine (STZ), toxique ciblant cellules β et induisant une insulinopénie, peut interférer avec notre étude via OGA. En effet, la STZ a été reconnue pour être un faible inhibiteur d'OGA augmentant ainsi les niveaux d'O-GlcNAcylation des protéines de manière indépendante du développement du DT2 (Elbatrawy et al., 2020). Cependant, avec nos modèles, les facteurs génétiques de la pathologie qui peuvent jouer un rôle important (Nagao et al., 2015) ne sont pas pris en compte. A côté du choix du modèle, les polymorphismes génétiques jouent également un grand rôle dans la susceptibilité des individus face à la prise de poids et à l'intolérance au glucose (Nagao et al., 2015). On observe notamment des différences au niveau du développement de la pathologie en fonction des souches ou du sexe des souris (Nagao et al., 2015 ; Fourny et al., 2021). De plus, d'autres facteurs peuvent facilement influencer notre modèle tels que les conditions sanitaires et la prise alimentaire de chaque souris.

Par ce travail de mémoire, j'ai pu démontrer l'apparition d'une obésité (prise de poids) et d'un diabète (hyperglycémie, hyper-insulinémie, insulino-résistance globale), dès 2 mois de régime, chez ces souris WD ou HFD. Par ailleurs, le poids du cœur et des poumons de ces souris augmente également après 2 mois de régimes HFD et WD, soulignant le développement d'une hypertrophie cardiaque et d'un œdème pulmonaire. Ces résultats récapitulent les observations cliniques attribuant l'obésité et la suralimentation comme principaux facteurs de risque du DT2 et de

problèmes cardiovasculaires, tels que l'insuffisance cardiaque (OMS, 2019). Ils permettent également la validation de ces modèles pour la suite de mon travail.

Une des originalités de mon travail réside dans la comparaison de ces 2 modèles au cours du temps, indiquant un phénotype différent. En effet, une obésité plus accrue et une hyperglycémie plus prononcée ont été mises en évidence à 2 mois sous HFD en accord avec les résultats préliminaires du laboratoire suggérant une apparition plus rapide de dérèglements métaboliques systémiques avec le régime riche en graisses par rapport au régime riche en graisses et en sucres. En accord, une étude menée en 2018 comparant une diète riche en graisse et une diète riche en glucose (HGD) avait souligné une hyperglycémie à jeun élevée après 2 semaines de HFD par rapport aux souris CHOW et aux souris sous HGD montrant également des altérations précoces de l'homéostasie glucidique chez les souris sous HFD (Huang et al., 2018). Ceci suggère un effet néfaste plus important des graisses par rapport aux sucres au niveau de l'apparition de la pathologie du DT2. Pour la suite de ce projet, il serait intéressant de voir si ces mêmes effets sont observés chez les souris femelles ou s'il existe un développement différentiel entre les 2 sexes sur l'apparition du DT2 et des profils de MPTs. Il existe, en effet, un dimorphisme sexuel dans l'incidence et l'issue clinique de la CMD, avec une moindre prévalence du DT2 et des altérations systémiques moins prononcées mais engendrant cependant des complications cardiovasculaires plus graves et un plus grand risque de mortalité chez le sexe féminin (Fourny et al., 2021). De plus, certaines souches de souris sont connues pour être plus résistantes aux régimes obésogènes, tels que les souris C3H, ou les souris C57BL6/J qui développent un DT2 mais sans dysfonction cardiaque. Il serait dès lors intéressant aussi de comparer les phénotypes diabétiques et de MPTs chez différentes souches de souris (Nagao et al., 2015; Tadinada et al., 2021).

Ce mémoire s'inscrit plus généralement dans le travail du Dr. Natacha Fourny qui étudie les effets de ces 2 régimes sur les fonctions cardiaques et le développement de la CMD. Les résultats préliminaires mettent également en évidence des différences au niveau de l'apparition de ces dysfonctions avec une altération de la fraction d'éjection plus rapide et plus importante dans le groupe WD en comparaison au groupe HFD. En conclusion, ces modèles, classiquement utilisés dans la littérature, sont représentatifs de la pathologie mais présentent cependant des différences en termes d'intensité et de temporalité avec pour conséquence des pathologies cardiaques différentes. Pourtant, ces modèles de DT2 sont souvent étudiés de manière indifférenciées dans la littérature alors qu'il est important d'être vigilant et de bien spécifier les modèles utilisés pour comprendre et étudier une pathologie.

II. L'O-GlcNAcylation

1. L'O-GlcNAcylation des protéines corrèle avec un régime riche en graisses/sucres et des dysfonctions cardiaques précoces

Les variations des niveaux d'O-GlcNAcylation avec les différents régimes sont assez subtils et pour affiner ceux-ci, un nombre d'échantillons plus conséquent devrait être analysé. On peut toutefois observer de manière générale, une augmentation de l'O-GlcNAcylation des protéines avec le régime riche en graisses et sucres. L'O-GlcNAcylation induite par des graisses et des sucres n'est pas surprenante et a déjà été étudiée précédemment (Hawkins et al., 1997 ; Pang et al., 2021). Dans le muscle gastrocnémien et le cœur, celle-ci apparaît de manière précoce, allant de pair avec les résultats obtenus dans le cœur par le laboratoire d'accueil avant mon arrivée. Son élévation est concomitante à l'apparition de la dysfonction cardiaque systolique mesurée au sein du laboratoire. Ceci coïncide avec l'étude de Prakoso et ses collègues (2021) qui ont également retrouvé des niveaux élevés d'O-GlcNAcylation au niveau cardiaque et corrélant avec des dysfonctions du ventricule gauche. De plus, lorsque l'O-GlcNAcylation est diminuée par la surexpression d'OGA, ces dysfonctions cardiaques sont améliorées montrant à nouveau un lien étroit entre cette MPT et la CMD (Prakoso et al. 2021; Hu et al., 2005). Néanmoins, l'O-GlcNAcylation ne semble pas être l'élément unique impliqué dans le développement de celle-ci puisqu'on observe avec les résultats préliminaires également des dysfonctions cardiaques avec le régime HFD à 2 mois.

2. Régulation de l'O-GlcNAcylation des protéines

Malgré le fait que l'augmentation de l'O-GlcNAcylation soit induite par une alimentation riche en sucre, il est actuellement admis que le flux de glucose entrant dans la voie des HBP n'est pas simplement et directement affecté par des changements dans la disponibilité du glucose mais que celui-ci est régulé plutôt par des mécanismes transcriptionnels et/ou post-transcriptionnels affectant ses enzymes régulatrices (Collins et al., 2020). En effet, l'augmentation de l'O-GlcNAcylation retrouvée dans les cœurs âgés, hypertrophiques ou en privation de glucose ne peut pas s'expliquer par une réponse découlant directement de l'excès de nutriments dû à une diète calorigène. Pour expliquer les changements d'O-GlcNAcylation observés dans nos modèles, l'expression protéique des enzymes régulatrices de la voie des HBP a été étudiée. Alors que les niveaux d'OGT, GFAT1 et GFAT2 ne diffèrent pas entre les différents groupes, l'expression protéique d'OGA est réduite à 4 mois de WD dans les 2 muscles squelettiques. L'existence d'un décalage entre l'augmentation de l'O-

GlcNAcylation, observée dès un mois, et les changements d'expression d'OGA, à 4 mois, semble suggérer que cette dernière ne joue pas un rôle majeur dans la hausse du niveau d'O-GlcNAcylation observée chez les souris WD. Ceci est renforcé notamment par les résultats de l'étude du muscle vastus lateralis chez des patients obèses et diabétiques qui n'ont pas révélé de différence significative au niveau de l'expression d'OGT et d'OGA (Shi et al., 2014). Ceci suggère qu'il y aurait d'autres mécanismes/protéines entrant en jeu et expliquant les changements d'O-GlcNAcylation chez les diabétiques. De plus, ces enzymes pourraient être régulées indépendamment d'un changement dans leur expression, par des mécanismes tels que des MPTs et/ou un changement de localisation (Collins et al., 2020). Par exemple, la phosphorylation de GFAT1 par la protéine AMPK (AMP-activated protein kinase) est connue pour diminuer son activité. L'AMPK est un senseur énergétique et est par conséquent directement influencé par le métabolisme cellulaire (Collins et al., 2020).

Il est important de prendre en compte dans ces résultats que les extraits protéiques proviennent de tissus entiers lysés, contenant donc essentiellement des cellules musculaires mais également d'autres cellules telles que des cellules endothéliales, présentes en plus faibles quantités. Par conséquent certaines protéines pourraient n'être exprimées que dans certaines populations cellulaires présentes en tellement faible quantité qu'une augmentation ou réduction de leur expression serait masquée.

III. L'acétylation des protéines dans les modèles HFD et WD

1. Un régime riche en graisses induit une augmentation de l'acétylation des protéines

L'analyse des MPTs dans le cœur, le soleus et le gastrocnémien révèle, de manière générale, une augmentation de l'acétylation des protéines avec le régime riche en graisses. Ceci concorde notamment avec les études de Lantier et al. (2015) et de Alrob et al. (2014) qui montrent respectivement une augmentation de l'acétylation des protéines dans le muscle squelettique et le cœur de souris soumises à un régime riche en graisses. Cette augmentation de l'acétylation apparaissant de manière précoce, dès le 1^{er} mois de régime, dans mes résultats, suit l'apparition de l'obésité et de l'hyperglycémie plus prononcée observée chez ces souris, présentant l'acétylation comme un potentiel marqueur et/ou effecteur de la progression du DT2.

Une augmentation de l'acétylation des protéines est également induite après 4 mois de WD. Cette élévation plus tardive est en adéquation avec l'élévation de la glycémie à jeun, qui à 2 mois est inférieure à celle des souris sous HFD et rattrape ensuite celle-ci après 4 mois de régime, suggérant

à nouveau que l'acétylation pourrait être un bon marqueur de la progression du DT2. L'hémoglobine glyquée (HbA1c) étant également un marqueur important du DT2, il serait intéressant de corrélérer ces 2 paramètres dans nos modèles.

Le laboratoire d'accueil a récemment montré que certains métabolites, présents en grandes quantités et de manière précoce dans le sang des patients atteints de DT2, tels que les acides aminés branchés (BCAAs), les corps cétoniques et les acides gras sont capable d'induire une augmentation de l'acétylation des protéines dans le cœur (De Loof et al., 2023). Pour aller plus loin, il faudrait suivre l'évolution, au sein des 2 régimes, de ces paramètres sanguins pour voir s'ils peuvent expliquer les différences d'apparition d'acétylation observées entre les 2 régimes.

2. L'acétylation des protéines impliquées dans le shift métabolique au niveau du cœur et des muscles squelettiques

En fonction des tissus étudiés, quelques différences sont observées au niveau des vitesses d'apparition de l'acétylation induite par les régimes. En effet, dans les tissus cardiaques et soléaires, on observe une augmentation précoce de l'acétylation générale des protéines, c'est-à-dire dès le 1^{er} mois de régime HFD, tandis que dans le muscle gastrocnémien l'acétylation des protéines n'apparaît à des niveaux quantifiables qu'à partir de 4 mois de régime. Lorsque l'on compare ces 3 tissus après 4 mois de régime (CHOW, HFD ou WD) sur un seul et même gel, l'acétylation dans le gastrocnémien est globalement plus faible par rapport aux tissus cardiaque et soléaire. Une explication potentielle est que, contrairement aux muscles cardiaque et soléaire, le gastrocnémien est plutôt caractérisé par un métabolisme glycolytique et un contenu moindre en mitochondries. Or, une large proportion des protéines acétylées est d'origine mitochondriale (Yang et al., 2020 ; Pougovkina et al., 2014). En accord, Lantier et ses collègues ont démontré que l'augmentation de l'acétylation au niveau musculaire de souris sous régime HFD se produit majoritairement au niveau mitochondrial (Lantier et al., 2015, Lantier et al. 2018). Cette propension à affecter les mitochondries pourrait s'expliquer par le fait que la production d'acétyl-CoA se déroule initialement au niveau mitochondrial, ce qui pourrait y stimuler l'acétylation médiée ou non par des acétyltransférases.

Comme cité précédemment dans l'introduction, on retrouve dans les muscles des patients atteints de DT2 une moindre proportion en fibres oxydatives (fibres de type I) par rapport aux fibres glycolytiques (fibres de type II). Oberbach et ses collègues (2006) expliquent ce phénomène par un changement métabolique prenant place dans ces fibres de type I résultant en une moindre activité oxydative en faveur de la glycolyse. Ce même phénomène est observé en comparant des patients

atteints de syndrome métabolique à des patients sains, sans retrouver de différence de contenu en mitochondries dans tous les muscles (Stuart et al., 2013). Une seconde étude, analysant les muscles de patients atteints d'insuffisance cardiaque, a retrouvé une augmentation de l'acétylation des protéines et plus particulièrement une acétylation inhibitrice des protéines LCAD et de β -HAD diminuant ainsi l'oxydation des acides gras dans les muscles squelettiques (Tsuda et al., 2018). De manière intéressante, on observe dans mes résultats des niveaux importants d'acétylation dans les muscles riches en fibres oxydatives (soleus et cœur) avec les régimes riches en graisses ou riches en graisses et sucres par rapport au muscle glycolytique (gastrocnémien). Ceci suggère une éventuelle implication de cette augmentation de l'acétylation dans le shift métabolique prenant place dans ces muscles squelettiques. Comme cité dans l'introduction, un nombre grandissant d'études considèrent l'acétylation comme un régulateur métabolique important et l'impliquent dans la dérégulation métabolique retrouvée au niveau du cœur (Renguet et al., 2022). Il est donc attrayant de relier les altérations métaboliques au niveau des fibres oxydatives dans les muscles squelettiques à leur niveaux importants d'acétylation retrouvés dans mes résultats.

3. Régulation de l'acétylation des protéines

Pour expliquer les changements des niveaux d'acétylation par les régimes, l'expression protéique de certaines enzymes régulant cette voie a également été étudiée dans les muscles squelettiques. Je me suis intéressée aux déacétylases SIRT1, SIRT2, SIRT3 et HDAC6 pour plusieurs raisons. Premièrement, des recherches bibliographiques ont permis d'identifier ces 4 enzymes comme cibles intéressantes puisqu'elles ont été impliquées dans plusieurs études dans le contexte du DT2 et de la surnutrition. Par exemple, SIRT3 a été impliquée dans la hausse de l'acétylation dans le cœur et le foie induite par un HFD (Alrob et al., 2014 ; Hirschey et al., 2011). On retrouve également une diminution de l'expression de SIRT2 dans cette même étude chez les souris sous HFD et dans le cœur hypertrophique de souris (Alrob et al., 2014 ; Tang et al., 2017). Par ailleurs, HDAC6, SIRT1 et SIRT2 sont toutes les 3 des enzymes ayant pour substrat l'alpha-tubuline impliquée dans la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique et étant fortement étudiée dans le laboratoire d'accueil (Renguet et al., 2022).

Les résultats obtenus montrent que l'expression protéique de ces déacétylases est peu affectée par les 2 régimes. Ceci va de pair avec l'étude de White et collaborateurs démontrant que la surexpression de SIRT1 ne préserve pas le métabolisme musculaire de souris sous HFD et n'améliore pas la sensibilité à l'insuline chez les souris (White et al., 2014 ; White et al., 2013). A côté de ce

changement d'expression potentielle, d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans le contrôle de l'acétylation des protéines. Le laboratoire d'accueil a notamment montré que les niveaux d'acétyl-CoA produits en condition de surnutrition ainsi que des concentrations croissantes d'acides gras, d'acides aminés branchés (BCAAs) ou de corps cétoniques, substrats augmentés dans le DT2, jouent un rôle important dans l'augmentation globale de l'acétylation des protéines (Renguet et al. 2017 ; De Loof et al., 2023). De plus, le niveau d'acétylation est également influencé par l'état redox de la cellule via le NAD⁺ qui sert de cofacteur aux sirtuines. En effet, des défauts de l'activité de la chaîne de transport des électrons sont observés chez les diabétiques, diminuant le taux NAD⁺/NADPH, ce qui pourrait également contribuer à l'augmentation de l'acétylation des protéines (Fukushima et al., 2016). Ceci suggère que l'augmentation de l'acétylation serait davantage induite par des modifications de concentrations de différents métabolites que par des changements d'expression des déacétylases. A l'avenir, il serait également intéressant d'étudier les éventuelles variations d'expression d'acétyltransférases tels que GCN5L1 et p300 pour renforcer notre hypothèse.

Toutefois, des changements d'expression de la protéine SIRT2 sont observés à 4 mois de HFD et WD et ceux-ci sont opposés en fonction du tissu. En effet, d'une part son expression augmente avec les 2 régimes dans le soleus, tandis qu'elle diminue avec le régime WD dans le gastrocnémien. Dans le gastrocnémien, l'augmentation de l'acétylation à 4 mois avec le régime WD peut donc s'expliquer en partie par une diminution de l'expression de SIRT2 comme c'est également le cas dans le cœur selon Alrob et al. (2014). D'autre part, l'augmentation de son expression dans le soleus pourrait être un mécanisme de compensation mis en place pour atténuer l'acétylation accrue dans ce tissu. En effet, notons que l'inactivation globale de SIRT2 induit une insulino-résistance exacerbée dans le muscle de souris soumises à un HFD et peut également induire une insulino-résistance de manière indépendante du régime et du poids (Lanthier et al., 2018). De plus, l'expression de SIRT2 est augmentée dans un modèle de cellules musculaires squelettiques insulino-résistantes in vitro (Arora et al., 2014). Ceci suggère un rôle important de SIRT2 dans la régulation de l'acétylation au niveau musculaire.

IV. Interactions entre l'O-GlcNAcylation et l'acétylation

On retrouve dans les 2 modèles, une augmentation de l'acétylation et de l'O-GlcNAcylation similaire à 4 mois de régime, suggérant des éventuelles interactions entre ces MPTs qui expliqueraient les augmentations tardives de l'acétylation avec le WD d'une part et de l'O-GlcNAcylation avec le HFD d'autre part. En effet, il est possible que l'augmentation précoce de l'O-GlcNAcylation induite par le WD impacte certaines enzymes de la voie de l'acétylation stimulant ou inhibant celles-ci. Par exemple, lors d'un stress oxydatif ou métabolique aigu, comme une privation de glucose, SIRT1 est O-GlcNAcylée transitoirement augmentant ainsi son activité déacétylase (Han et al., 2017). Il est reconnu qu'une augmentation de l'O-GlcNAcylation aiguë et transitoire peut avoir des effets bénéfiques sur la cellule et que celle-ci devient défavorable quand elle persiste (Ducheix et al., 2018). A l'inverse, l'acétylation peut également influencer les niveaux d'O-GlcNAcylation mais de manière plus indirecte. On retrouve par exemple, un rôle cardioprotecteur de SIRT2 dans l'hypertrophie cardiaque par son activité déacétylase. SIRT2 active indirectement l'AMPK et à son tour l'AMPK inhibe GFAT par phosphorylation (Tang et al., 2017).

V. L'insulino-résistance musculaire

Pour évaluer le développement d'une insulino-résistance locale, j'ai analysé par western blot l'activation de la voie de signalisation de l'insuline dans le gastrocnémien et dans le soleus après stimulation à l'insuline dans les différents groupes étudiés. La transduction du signal insulinique passe par une cascade complexe de phosphorylations impliquant plusieurs protéines dont les protéines PKB et S6. L'activation de celles-ci est donc reflétée par une augmentation de leurs formes phosphorylées. Le protocole utilisé ici est celui utilisé en routine dans le laboratoire pour mesurer la réponse à l'insuline au niveau cardiaque. La concentration en insuline utilisée, 10 mU/kg en intra-veineux, est considérée comme sub-optimale (afin d'éviter l'activation de rétro-contrôle négatif). Je l'ai utilisée pour la première fois pour la mesure de la réponse insulinique musculaire dans une étude pilote composée d'un nombre peu élevé d'individus par groupe. Dans la suite, je discuterai donc plutôt de tendances observées plutôt que d'analyses statistiques.

Dans le soleus, une réponse à l'insuline est perçue chez les souris contrôles au niveau des protéines PKB et S6. Avec le régime HFD, la réponse à l'insuline au niveau de PKB est maintenue alors

qu'elle est perdue au niveau de la protéine S6. L'existence d'une déconnexion entre ces 2 protéines peut paraître étonnante à première vue. Cependant, la protéine S6 est stimulée par la voie p70S6K/mTOR qui est régulée et stimulée par PKB mais également par de nombreux autres facteurs tels l'AMPK, un important senseur énergétique, les acides gras ou encore les BCAAs tous deux augmentés dans le DT2 (Renguet et al., 2016). Avec le régime WD, la réponse à l'insuline est perdue au niveau des 2 protéines étudiées suggérant des perturbations au niveau de la voie de signalisation à l'insuline plus importantes avec ce régime.

Dans le gastrocnémien, on ne retrouve pas de réponse à l'insuline au niveau de S6 et PKB chez les souris stimulées à l'insuline quel que soit le régime, suggérant une sensibilité à l'insuline basale moindre dans ce muscle par rapport au muscle soleus. En effet, il existe des différences de sensibilité à l'insuline entre différents muscles et il a été démontré que les fibres glycolytiques, majoritaires dans le gastrocnémien, répondent moins bien à l'insuline que les fibres de oxydatives (Stuart et al., 2013; Albers et al., 2014). L'utilisation d'une concentration insulinique sub-optimale pourrait donc expliquer une faible réponse à l'insuline observée dans les tissus des souris contrôles. A l'avenir, il faudrait tester plusieurs conditions différentes (concentrations en insuline et temps de stimulation) sur des souris sous régime CHOW afin d'optimiser le protocole. De plus, le faible nombre d'animaux par groupe et la grande variabilité observée n'a pas permis d'atteindre une puissance statistique suffisante. Il sera important d'ajouter d'autres cohortes à cette première étude pilote.

De manière plus générale, l'insulino-résistance peut être la conséquence de perturbations de la voie insulinique en aval de PKB et indépendante de la voie de mTOR/p70S6K. En effet, dans l'étude d'Arias et al. (2004), une insulino-résistance est observée avec l'augmentation de l'O-GlcNAcylation dans les muscles indépendamment d'une perturbation au niveau de PKB ou de sa forme phosphorylée. Dans la suite de ce projet, il sera intéressant d'évaluer l'insulino-résistance tissulaire dans les muscles au niveau d'autres points de contrôle. Nous pourrions ainsi mesurer le transport de glucose, la synthèse protéique et/ou la synthèse de glycogène.

Conclusion générale

Avec ce mémoire, j'ai pu mettre en lumière une augmentation de l'O-GlcNAcylation et de l'acétylation dans les muscles squelettiques dans un contexte de DT2 induit par des régimes obésogènes de la même manière que dans le cœur. De manière générale, un régime riche en graisses tend à augmenter l'acétylation des protéines dans les 3 tissus (gastrocnémien, soleus, cœur). Cette acétylation corrèle premièrement avec une obésité et une hyperglycémie prononcée mettant en avant l'acétylation comme marqueur précoce caractérisant la progression du DT2. Cependant, il serait intéressant de corrélér celui-ci à d'autres marqueurs du diabète comme l'HbA1c, les BCAAs et les corps cétoniques pour vérifier cette hypothèse. De plus, l'acétylation des protéines est plus abondante dans les tissus subissant des changements métaboliques avec le DT2, suggérant peut-être un lien entre ces 2 mécanismes. Alors que la participation de cette MPTs dans l'altération métabolique au niveau cardiaque est bien étudiée dans le laboratoire d'accueil, sa participation dans les changements métaboliques prenant place dans les fibres musculaires reste peu connue et est mise en évidence pour la première fois dans ce mémoire. L'augmentation de cette acétylation induite par le HFD est indépendante de changements d'expression protéique des principales déacétylases impliquées dans le développement du diabète ce qui suggère que celle-ci soit plutôt impactée par des changements de concentrations de métabolites (acétyl-CoA, NAD⁺). D'autre part, l'augmentation de l'O-GlcNAcylation est induite par le régime WD de manière générale et va de pair avec les dysfonctions cardiaques systoliques précoces observées par le Dr. Natacha Fourny. Ensuite, une perturbation de la voie de signalisation à l'insuline a été démontrée avec les 2 régimes à 2 mois dans le soleus reflétant une insulino-résistance locale dans nos deux modèles. De plus, cette insulino-résistance est plus prononcée avec le régime WD. Dans le gastrocnémien, mes résultats n'ont pas pu mettre en évidence de réponse à l'insuline chez les souris sous régime contrôle suggérant une insulino-sensibilité basale plus faible dans ce muscle par rapport au soleus. Néanmoins, le protocole étant adapté au tissu cardiaque, une optimisation de celui-ci sera requis pour appuyer mes résultats.

Références

1. Abdul-Ghani, M. A., & DeFronzo, R. A. (2010). Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 476279.
2. Albers, P. H., Pedersen, A. J., Birk, J. B., Kristensen, D. E., Vind, B. F., Baba, O., Nøhr, J., Højlund, K., & Wojtaszewski, J. F. (2015). Human muscle fiber type-specific insulin signaling: impact of obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, 64(2), 485–497.
3. Alrob, O. A., Sankaralingam, S., Ma, C., Wagg, C. S., Fillmore, N., Jaswal, J. S., Sack, M. N., Lehner, R., Gupta, M. P., Michelakis, E. D., Padwal, R. S., Johnstone, D. E., Sharma, A. M., & Lopaschuk, G. D. (2014). Obesity-induced lysine acetylation increases cardiac fatty acid oxidation and impairs insulin signalling. *Cardiovascular research*, 103(4), 485–497.
4. Arias, E. B., Kim, J., & Cartee, G. D. (2004). Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-Linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes*, 53(4), 921–930.
5. Arora, A., & Dey, C. S. (2014). SIRT2 negatively regulates insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(9), 1372–1378.
6. Arulmozhi, D. K., R. Kurian, S. L. Bodhankar, and A. Veeranjaneyulu, 2008. Metabolic effects of various antidiabetic and hypolipidaemic agents on a high-fat diet and multiple low-dose streptozocin (MLDS) mouse model of diabetes. *J. Pharm. Pharmacol.* 60. 1167-1173.
7. Zhang, X., Gao, S., Niu, J., Li, P., Deng, J., Xu, S., Wang, Z., Wang, W., Kong, D., & Li, C. (2016). Cannabinoid 2 Receptor Agonist Improves Systemic Sensitivity to Insulin in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 40(5), 1175–1185.
8. Brunton S. (2016). Pathophysiology of Type 2 Diabetes: The Evolution of Our Understanding. *The Journal of family practice*, 65(4 Suppl), supp_az_0416.
9. Bugger, H., & Abel, E. D. (2014). Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*, 57(4), 660–671.
10. Bouzakri, K., Koistinen, H. A., & Zierath, J. R. (2005). Molecular mechanisms of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Current diabetes reviews*, 1(2), 167–174.
11. Borghetti, G., von Lewinski, D., Eaton, D. M., Sourij, H., Houser, S. R., & Wallner, M. (2018). Diabetic Cardiomyopathy: Current and Future Therapies. *Beyond Glycemic Control. Frontiers in physiology*, 9, 1514.
12. Collins, H. E., & Chatham, J. C. (2020). Regulation of cardiac O-GlcNAcylation: More than just nutrient availability. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(5), 165712. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165712>.
13. Clark, R. J., McDonough, P. M., Swanson, E., Trost, S. U., Suzuki, M., Fukuda, M., & Dillmann, W. H. (2003). Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *The Journal of biological chemistry*, 278(45), 44230–44237.
14. De Loof, M., Renguet, E., Ginion, A., Bouzin, C., Horman, S., Beauloye, C., Bertrand, L., & Bultot, L. (2023). Enhanced protein acetylation initiates fatty acid-mediated inhibition of cardiac glucose

- transport. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 10.1152/ajpheart.00449.2022. Advance online publication.
15. Deswal A. (2005). Diastolic dysfunction and diastolic heart failure: mechanisms and epidemiology. *Current cardiology reports*, 7(3), 178–183.
 16. Dassanayaka, S., & Jones, S. P. (2014). O-GlcNAc and the cardiovascular system. *Pharmacology & therapeutics*, 142(1), 62–71.
 17. Ducheix, S., Magré, J., Cariou, B., & Prieur, X. (2018). Chronic O-GlcNAcylation and Diabetic Cardiomyopathy: The Bitterness of Glucose. *Frontiers in endocrinology*, 9, 642.
 18. Elbatrawy, A. A., Kim, E. J., & Nam, G. (2020). O-GlcNAcase: Emerging Mechanism, Substrate Recognition and Small-Molecule Inhibitors. *ChemMedChem*, 15(14), 1244–1257.
 19. Emamgholipour, S., Ebrahimi, R., Bahiraei, A., Niazpour, F., & Meshkani, R. (2020). Acetylation and insulin resistance: a focus on metabolic and mitogenic cascades of insulin signaling. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 1–19. Advance online publication.
 20. Fourny, N., Beauloye, C., Bernard, M., Horman, S., Desrois, M., & Bertrand, L. (2021). Sex Differences of the Diabetic Heart. *Frontiers in physiology*, 12, 661297.
 21. Fukushima, A., & Lopaschuk, G. D. (2016). Acetylation control of cardiac fatty acid β -oxidation and energy metabolism in obesity, diabetes, and heart failure. *Biochimica et biophysica acta*, 1862(12), 2211–2220.
 22. Gélinas, R., Mailleux, F., Dontaine, J., Bultot, L., Demeulder, B., Ginion, A., Daskalopoulos, E. P., Esfahani, H., Dubois-Deruy, E., Lauzier, B., Gauthier, C., Olson, A. K., Bouchard, B., Des Rosiers, C., Viollet, B., Sakamoto, K., Balligand, J. L., Vanoverschelde, J. L., Beauloye, C., Horman, S., ... Bertrand, L. (2018). AMPK activation counteracts cardiac hypertrophy by reducing O-GlcNAcylation. *Nature communications*, 9(1), 374.
 23. Han, C., Gu, Y., Shan, H., Mi, W., Sun, J., Shi, M., Zhang, X., Lu, X., Han, F., Gong, Q., & Yu, W. (2017). O-GlcNAcylation of SIRT1 enhances its deacetylase activity and promotes cytoprotection under stress. *Nature communications*, 8(1), 1491.
 24. Hawkins, M., Barzilai, N., Liu, R., Hu, M., Chen, W., & Rossetti, L. (1997). Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 99(9), 2173–2182.
 25. Hirschey, M. D., Shimazu, T., Jing, E., Grueter, C. A., Collins, A. M., Auouizerat, B., Stančáková, A., Goetzman, E., Lam, M. M., Schwer, B., Stevens, R. D., Muehlbauer, M. J., Kakar, S., Bass, N. M., Kuusisto, J., Laakso, M., Alt, F. W., Newgard, C. B., Farese, R. V., Jr, Kahn, C. R., ... Verdin, E. (2011). SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Molecular cell*, 44(2), 177–190.
 26. Ho, K. L., Karwi, Q. G., Connolly, D., Pherwani, S., Ketema, E. B., Ussher, J. R., & Lopaschuk, G. D. (2022). Metabolic, structural and biochemical changes in diabetes and the development of heart failure. *Diabetologia*, 65(3), 411–423.
 27. Huang, W., Su, L., Zhang, X., Xu, X., & Li, R. (2019). Endocrinological characterization of pancreatic ducts in HFD and HGD fed mice. *Journal of cellular biochemistry*, 120(9), 16153–16159.
 28. Hue, L., & Taegtmeyer, H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 297(3), E578–E591.

29. Hu Y, Belke D, Suarez J, Swanson E, Clark R, Hoshijima M, Dillmann WH (2005) Adenovirus-mediated overexpression of O-GlcNAcase improves contractile function in the diabetic heart. *Circulation Research* 96(9):1006-13.
30. IDF (2021) International Diabetes federation. Atlas du diabète de la FID, 10^e édition 2021. Inis communication (Editeur). <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
31. Jia, G., Hill, M. A., & Sowers, J. R. (2018). Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circulation research*, 122(4), 624–638.
32. Kendrick, A. A., Choudhury, M., Rahman, S. M., McCurdy, C. E., Friederich, M., Van Hove, J. L., Watson, P. A., Birdsey, N., Bao, J., Gius, D., Sack, M. N., Jing, E., Kahn, C. R., Friedman, J. E., & Jonscher, K. R. (2011). Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation. *The Biochemical journal*, 433(3), 505–514.
33. LaBarge, S., Migdal, C., & Schenk, S. (2015). Is acetylation a metabolic rheostat that regulates skeletal muscle insulin action?. *Molecules and cells*, 38(4), 297–303.
34. Lambert, M., Bastide, B., & Cieniewski-Bernard, C. (2018). Involvement of O-GlcNAcylation in the Skeletal Muscle Physiology and Physiopathology: Focus on Muscle Metabolism. *Frontiers in endocrinology*, 9, 578.
35. Lantier, L., Williams, A. S., Williams, I. M., Yang, K. K., Bracy, D. P., Goelzer, M., James, F. D., Gius, D., & Wasserman, D. H. (2015). SIRT3 Is Crucial for Maintaining Skeletal Muscle Insulin Action and Protects Against Severe Insulin Resistance in High-Fat-Fed Mice. *Diabetes*, 64(9), 3081–3092.
36. Lantier, L., Williams, A. S., Hughey, C. C., Bracy, D. P., James, F. D., Ansari, M. A., Gius, D., & Wasserman, D. H. (2018). SIRT2 knockout exacerbates insulin resistance in high fat-fed mice. *PLoS one*, 13(12), e0208634.
37. Liu, Y., Hu, Y. J., Fan, W. X., Quan, X., Xu, B., & Li, S. Z. (2022). O-GlcNAcylation: The Underestimated Emerging Regulators of Skeletal Muscle Physiology. *Cells*, 11(11), 1789.
38. Lundby, A., Lage, K., Weinert, B. T., Bekker-Jensen, D. B., Secher, A., Skovgaard, T., Kelstrup, C. D., Dmytriiev, A., Choudhary, C., Lundby, C., & Olsen, J. V. (2012). Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell reports*, 2(2), 419–431.
39. Mailleux, F., Gélinas, R., Beauloye, C., Horman, S., & Bertrand, L. (2016). O-GlcNAcylation, enemy or ally during cardiac hypertrophy development?. *Biochimica et biophysica acta*, 1862(12), 2232–2243.
40. Malone, J. I., & Hansen, B. C. (2019). Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite?. *Pediatric diabetes*, 20(1), 5–9.
41. Mori, J., Alrob, O. A., Wagg, C. S., Harris, R. A., Lopaschuk, G. D., & Oudit, G. Y. (2013). ANG II causes insulin resistance and induces cardiac metabolic switch and inefficiency: a critical role of PDK4. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 304(8), H1103–H1113.
42. Morino, K., & Maegawa, H. (2021). Role of O-linked N-acetylglucosamine in the homeostasis of metabolic organs, and its potential links with diabetes and its complications. *Journal of diabetes investigation*, 12(2), 130–136.
43. Nagao, M., Asai, A., Sugihara, H., & Oikawa, S. (2015). Fat intake and the development of type 2 diabetes. *Endocrine journal*, 62(7), 561–572.

44. Nakamura, M., & Sadoshima, J. (2020). Cardiomyopathy in obesity, insulin resistance and diabetes. *The Journal of physiology*, 598(14), 2977–2993.
45. Nie, H., & Yi, W. (2019). O-GlcNAcylation, a sweet link to the pathology of diseases. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 20(5), 437–448.
46. Oberbach, A., Bossenz, Y., Lehmann, S., Niebauer, J., Adams, V., Paschke, R., Schön, M. R., Blüher, M., & Punkt, K. (2006). Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 29(4), 895–900.
47. Olson, A. K., Bouchard, B., Zhu, W. Z., Chatham, J. C., & Des Rosiers, C. (2020). First characterization of glucose flux through the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) in *ex vivo* mouse heart. *The Journal of biological chemistry*, 295(7), 2018–2033.
48. OMS (2020) Organisation mondiale de la santé. Diabète, principaux faits. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
49. Pang, Y., Xu, X., Xiang, X., Li, Y., Zhao, Z., Li, J., Gao, S., Liu, Q., Mai, K., & Ai, Q. (2021). High Fat Activates O-GlcNAcylation and Affects AMPK/ACC Pathway to Regulate Lipid Metabolism. *Nutrients*, 13(6), 1740.
50. Pougovkina, O., te Brinke, H., Ofman, R., van Cruchten, A. G., Kulik, W., Wanders, R. J., Houten, S. M., & de Boer, V. C. (2014). Mitochondrial protein acetylation is driven by acetyl-CoA from fatty acid oxidation. *Human molecular genetics*, 23(13), 3513–3522.
51. Prakoso, D., Lim, S. Y., Erickson, J. R., Wallace, R. S., Lees, J. G., Tate, M., Kiriazis, H., Donner, D. G., Henstridge, D. C., Davey, J. R., Qian, H., Deo, M., Parry, L. J., Davidoff, A. J., Gregorevic, P., Chatham, J. C., De Blasio, M. J., & Ritchie, R. H. (2022). Fine-tuning the cardiac O-GlcNAcylation regulatory enzymes governs the functional and structural phenotype of the diabetic heart.
52. Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., & Newsholme, E. A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet (London, England)*, 1(7285), 785–789.
53. Renguet, E., Bultot, L., Beauloye, C., Horman, S., & Bertrand, L. (2018). The Regulation of Insulin-Stimulated Cardiac Glucose Transport via Protein Acetylation. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 5, 70.
54. Renguet, E., De Loof, M., Fourny, N., Ginion, A., Bouzin, C., Poüs, C., Horman, S., Beauloye, C., Bultot, L., & Bertrand, L. (2022). α -Tubulin acetylation on Lysine 40 controls cardiac glucose uptake. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 10.1152/ajpheart.00664.2021. Advance online publication.
55. Renguet, E., Ginion, A., Gélinas, R., Bultot, L., Auquier, J., Robillard Frayne, I., Daneault, C., Vanoverschelde, J. L., Des Rosiers, C., Hue, L., Horman, S., Beauloye, C., & Bertrand, L. (2017). Metabolism and acetylation contribute to leucine-mediated inhibition of cardiac glucose uptake. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 313(2), H432–H445.
56. Rubler, S., Dlugash, J., Yuceoglu, Y. Z., Kumral, T., Branwood, A. W., & Grishman, A. (1972). New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *The American journal of cardiology*, 30(6), 595–602.
57. Shi, H., Munk, A., Nielsen, T. S., Daughtry, M. R., Larsson, L., Li, S., Høyer, K. F., Geisler, H. W., Sulek, K., Kjøbsted, R., Fisher, T., Andersen, M. M., Shen, Z., Hansen, U. K., England, E. M., Cheng,

- Z., Højlund, K., Wojtaszewski, J., Yang, X., Hulver, M. W., ... Gerrard, D. E. (2018). Skeletal muscle O-GlcNAc transferase is important for muscle energy homeostasis and whole-body insulin sensitivity. *Molecular metabolism*, 11, 160–177.
58. Stuart, C. A., McCurry, M. P., Marino, A., South, M. A., Howell, M. E., Layne, A. S., Ramsey, M. W., & Stone, M. H. (2013). Slow-twitch fiber proportion in skeletal muscle correlates with insulin responsiveness. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(5), 2027–2036.
59. Tadinada, S. M., Weatherford, E. T., Collins, G. V., Bhardwaj, G., Cochran, J., Kutschke, W., Zimmerman, K., Bosko, A., O'Neill, B. T., Weiss, R. M., & Abel, E. D. (2021). Functional resilience of C57BL/6J mouse heart to dietary fat overload. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 321(5), H850–H864.
60. Tang, X., Chen, X. F., Wang, N. Y., Wang, X. M., Liang, S. T., Zheng, W., Lu, Y. B., Zhao, X., Hao, D. L., Zhang, Z. Q., Zou, M. H., Liu, D. P., & Chen, H. Z. (2017). SIRT2 Acts as a Cardioprotective Deacetylase in Pathological Cardiac Hypertrophy. *Circulation*, 136(21), 2051–2067.
61. Thapa, D., Bugga, P., Mushala, B. A. S., Manning, J. R., Stoner, M. W., McMahon, B., Zeng, X., Cantrell, P. S., Yates, N., Xie, B., Edmunds, L. R., Jurczak, M. J., & Scott, I. (2022). GCN5L1 impairs diastolic function in mice exposed to a high fat diet by restricting cardiac pyruvate oxidation. *Physiological reports*, 10(15), e15415.
62. Thiagarajan, D., Vedantham, S., Ananthakrishnan, R., Schmidt, A. M., & Ramasamy, R. (2016). Mechanisms of transcription factor acetylation and consequences in hearts. *Biochimica et biophysica acta*, 1862(12), 2221–2231.
63. Tsuda, M., Fukushima, A., Matsumoto, J., Takada, S., Kakutani, N., Nambu, H., Yamanashi, K., Furihata, T., Yokota, T., Okita, K., Kinugawa, S., & Anzai, T. (2018). Protein acetylation in skeletal muscle mitochondria is involved in impaired fatty acid oxidation and exercise intolerance in heart failure. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 9(5), 844–859.
64. White, A. T., Philp, A., Fridolfsson, H. N., Schilling, J. M., Murphy, A. N., Hamilton, D. L., McCurdy, C. E., Patel, H. H., & Schenk, S. (2014). High-fat diet-induced impairment of skeletal muscle insulin sensitivity is not prevented by SIRT1 overexpression. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 307(9), E764–E772.
65. Wright, J. N., Collins, H. E., Wende, A. R., & Chatham, J. C. (2017). O-GlcNAcylation and cardiovascular disease. *Biochemical Society transactions*, 45(2), 545–553.
66. Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2014). Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *International journal of medical sciences*, 11(11), 1185–1200.
67. Yang, M., Zhang, Y., & Ren, J. (2020). Acetylation in cardiovascular diseases: Molecular mechanisms and clinical implications. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(10), 165836.
68. Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S. M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., ... Guan, K. L. (2010). Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5968), 1000–1004.

Annexes

Solutions et tampons	Composition
Tampon phosphate salin (PBS) (1x)	NaCl 137 mM; KCl 2,70 mM; Na ₂ HPO ₄ 10 mM; KH ₂ PO ₄ 1,76 mM
Tampon de lyse RIPA	TRIS-HCl 25 mM; NP40/IGEPAL 1% (v/w); Sodium Deoxycholate 1% (v/w); SDS 0,1% (v/w); NaCl 150 mM; Glycérol-2-phosphate disodium 20 mM; NaF 50 mM; Na ₄ P ₂ O ₇ .10H ₂ O 5mM
+ Inhibiteurs (rajoutés juste avant la lyse)	PMSF 0,5 mM ; Benzamidine HCl 1mM ; Leupeptine 1 µg/mL ; Pepstatine A 1 µg/mL ; DTT 1 mM ; Ex 527 0,01 mM ; TSA 0,001 mM ; Alloxan 1 µM ; PUGNAC 1 µM, Vanadate 1 mM
Tampon Laemmli 4X	Tris (pH 6,8) 200 mM; EDTA 2 mM; Glycérol 40% (w/v); bleu de Bromophénol 0,04% (v/w); SDS 8% (w/v)
Tampon de migration (1x)	Tris 2,5 mM ; Glycine 19,2 mM ; SDS 0,01 %
Tampon de transfert (1x)	Tris 2,5 mM, Glycine 19,2 mM ; Ethanol 10 %
Tampon Tris salin (TBS) (1x)	Tris 50 mM ; NaCl 150 mM ; pH 8

Gels pour Western Blot		
Pour 4 gels 1 mm	Gel de separation	Gel de concentration
	9%	4%
	Volume (mL)	Volume (mL)
H ₂ O	5,38	3,35
TRIS 1M pH 8.8	7,50	
TRIS 0,25M pH 6.8		5,00
SDS 5%	1,00	0,20
30% Acrilamide	6,00	1,333
10% APS	0,100	0,100
Temed	0,20	0,015
Volume Total	20	10

Réactifs	Fournisseur	Référence
30% Acrylamide (Rotiphorèse®Gel 30)	Roth	3029.1
Albumine de sérum bovin (BSA)	Roth	8076.3 / 3854.4
Alloxan monohydrate	Sigma	A7413-10g
APS (Ammonium persulfate electrophoresis grade)	Serva	13376.01
Benzamidine HCl	Roth	CN38.1
Bleu de Bromophénol	MP Biomedicals	193990
DTT (Dithiothreitol)	Serva	20710.03
EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate)	MP Biomedicals	194822
Ex 527	Tocris	2780
Fixateur et régénérateur	Carestream	5285937
Glycerol	Roth	3783.1
Glycine	Serva	23391.03
IGEPAL/NP40 (IGEPAL®CA-630)	Sigma-aldrich	I3021
Insuline (Actrapid®)	Novo nordisk	1VV7R04C
KCl (Potassium chloride)	Roth	P017.1
Kétamine (Nimatek)	Eurovet	804132
Leupeptine	Roth	CN33.3
NaCl (Sodium chloride)	Roth	9265.2
Pepstatine A	Roth	2936.1
PMSF	Sigma	P7626
PUGNAc	Sigma	A7229
Révélateur et entretien	Carestream	5023866
SDS (Sodium dodecylsulfate)	Merck	K51481334 946
Sodium Deochycolate	Sigma-aldrich	D6750-25G
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma	T9281
Tris	Serva	37181.03
TSA	Sigma	T8552
Tween ® 20, Molecular Biology Reagent	MP Biomedicals	9005-64-5
Vanadate	Sigma-aldrich	S6508
Xylazine (Rompun)	Bayer	81963959
Materiel	Fournisseur	Référence
Films d'autoradiographie	Fujifilm Medical Systems	47410 19289

Liste des anticorps					
Anticorps primaires	Dilution	Isotype (animal)	Taille	Référence	Fournisseur
AS160	1000	Lapin	160	07-741	Millipore
eEF2	2000	Lapin	100	PA5-17794	Invitrogen
GAPDH	200000	Lapin	37	2118S	Cell signaling
GFAT1	2000	Lapin	100	5322	Cell signaling
GFAT2	3000	Lapin	79	6917	Cell signaling
HDAC6	1000	Lapin	160	7612	Cell signaling
K-Acétylation	2000	Lapin		9441	Cell signaling
OGA	1000	Lapin	130	HPA036141	Sigma
O-GlcNAcylation-HRP	2000	Lapin		ab201995	Abcam
OGT	1000	Lapin	100	24083	Cell signaling
PKB	2000	Souris	60	05-591	Millipore
pPKB	2000	Lapin	60	4060S	Cell signaling
pS6 (S235/236)	1000	Lapin	32	4838S	Cell signaling
SIRT1	1000	Souris	120	ab110304	Abcam
SIRT2	1000	Lapin	43/39	12650	Cell signaling
SIRT3	1000	Lapin	25-35	12650	Cell signaling
S6	4000	Lapin	34	2217	Cell signaling
Anticorps secondaires	Dilution	Isotype (animal)		Référence	Fournisseur
IgG anti-lapin + HRP	1/5000	Chèvre		7074	Cell Signaling
IgG anti-souris + HRP	1/20 000	Chèvre		A0545	Sigma

Type 2 diabetes (T2D) is one of the major health problems in the world and is associated with numerous cardiovascular complications. In particular, T2D can induce specific alterations in cardiac function and structure, called diabetic cardiomyopathy (DCM). At the molecular level, a growing number of studies has demonstrated an important role of post-translational modifications (PTMs), and more particularly acetylation and O-GlcNAcylation of proteins, in the development of T2D-related diseases. In order to further understand the role played by these PMTs in the establishment of diabetes and the development of DCM, the host laboratory is currently studying two models of T2D induced by hypercaloric diets, one high fat diet (HFD), and the other high sugar and fat diet (WD). Preliminary results suggest differential effects of these diets on the onset of these PTMs, the development of T2D and the development of DCM. The aim of this work is to further characterize these two models in order to better understand the effect of these two diets on the development of T2D and on differential changes in acetylation and/or O-GlcNAcylation. The development of diabetes in these two models was followed over a period from 1 to 4 months of dieting through the measurement of different pathophysiological parameters (including weight, insulin levels, glucose tolerance, insulin resistance index). In parallel, potential changes in acetylation and/or O-GlcNAcylation and in the expression of the enzymes regulating these PTMs were studied by immunoblotting in the heart, soleus and gastrocnemius. The results showed that both diets induced the development of T2D with a more rapid disturbance of fasting blood glucose levels in HFD than in WD mice. A general tendency to increase PTMs in the three tissues was observed under the two diets studied. Nevertheless, the amplitude and temporality of these changes are specific to the diets and tissues and could explain a differential effect of these on the development of diabetes-related pathologies such as diabetic cardiomyopathy.

Key words: Type 2 diabetes, diabetic cardiomyopathy, O-GlcNAcylation, acetylation, skeletal muscle, heart, HFD, WD.