

Glucose et facteurs de transcription redox sensibles : conséquences sur le récepteur de l'insuline

par Patrice Faure¹, Olivier Ramon¹ & Alain Favier²

¹Laboratoire du stress cardiovasculaire et pathologies associées ; ²Groupe de Recherche et d'Étude des Pathologies Oxydatives, Université J.-Fourier, Grenoble I

Reçu le 17 octobre 2001

RÉSUMÉ

Au cours du diabète on assiste à un stress oxydant dont les origines sont multiples. Ce stress peut être considéré comme un messenger particulier, modifiant certainement la transduction du signal insulinique mais aussi l'activité de certains facteurs de transcription. On oppose NF- κ B dont l'activité est augmentée à Sp1 dont l'activité baisse dans ce contexte. L'activation de NF- κ B participe certainement au remodelage vasculaire et joue un rôle dans le genèse même du stress oxydant. NF- κ B voit d'ailleurs son

activité augmenter tôt dans les états de résistance à l'insuline avant même qu'existe une hyperglycémie. Sp1 subit une baisse importante de son activité en présence de glucose. Celle-ci peut être restaurée en présence d'antioxydants. Sp1 étant nécessaire à l'expression du récepteur à l'insuline, ainsi que d'enzymes antioxydantes. La question qui n'est pas résolue est donc de savoir si cette baisse d'activité modifie sensiblement l'expression du récepteur à l'insuline.

SUMMARY Glucose and oxidative sensitive transcription factors: consequences on insulin receptor

During diabetes an oxidizing stress can be observed, whose origins are multiple. This stress can be regarded as a particular messenger, certainly modifying the transduction of the insulinic signal but also the activity of certain transcription factors. Indeed NF- κ B activity is increased, while Sp1 activity drops in this context. NF- κ B activation takes certainly part in vascular remodeling and plays a role in the gene-

sis of the oxidative stress. Hence, NF- κ B activity precociously increases in the states of insulin resistance before hyperglycemia sets in. Sp1 undergoes a significant fall in activity in the presence of glucose. This activity can be restored by antioxydants in the cell culture medium, Sp1 being necessary to insulin receptor expression, the question arises whether this drop in activity modifies significantly the insulin expression.

INTRODUCTION

Les patients présentant une résistance à l'insuline et/ou un diabète de type 2 sont victimes d'une mortalité par maladie cardiovasculaire 5 fois plus importante que le reste de la population. Par conséquent, l'hypothèse est souvent avancée que l'hypertension artérielle, les désordres du métabolisme des lipoprotéines ainsi que l'obésité viscérale, qui sont autant de risques coronariens, pourraient appartenir à un syndrome provoqué par la résistance à l'insuline. Les changements de la structure, de la fonction et de la régulation des facteurs de transcription semblent être des étapes importantes de la signalisation qui pourraient jouer un rôle essentiel dans la pathogénie et la thérapie des facteurs de risque cardiovasculaire liés à la résistance à l'insuline.

Au fur et à mesure de l'évolution de la résistance à l'insuline, on assiste à un remodelage vasculaire impor-

tant. Les mécanismes de ce remodelage sont multiples. Le stress oxydant y joue un rôle certainement important. En effet, l'hyperglycémie chronique au cours du diabète induit un stress oxydant qui se manifeste non seulement par une augmentation des espèces réactives de l'oxygène, mais également par une baisse des défenses cellulaires antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques. Par exemple la formation des produits avancés de la glycation s'accompagne d'un stress oxydant. Le phénomène est amplifié par l'activation des récepteurs des AGE (les RAGE) qui active elle-même la production intracellulaire de radicaux libres. On peut alors opposer deux conséquences sur les facteurs de transcription redox sensibles : une induction de leur synthèse ou plus souvent de leur activité ou, au contraire, une baisse de leur activité. Deux exemples viennent alors : NF- κ B dont l'activité est induite au cours du diabète et Sp1 qui au contraire voit son activité abaissée.

NF- κ B : UN MÉDIATEUR DE L'ATHÉROGENÈSE ACTIVÉ AU COURS DU DIABÈTE

NF- κ B joue un rôle particulièrement important dans les états de diabète et les complications vasculaires qui lui sont associées. En effet NF- κ B active la transcription de plusieurs gènes dont les protéines sont impliquées dans les processus d'inflammation (TNF- α) ou de prolifération et d'adhésion cellulaire (VCAM-1, ICAM-1, VEGF). Une corrélation positive existe *in vivo*, dans les tissus de rats diabétiques, entre l'activation de NF- κ B, le taux d'expression des gènes contrôlés par ces protéines, et l'élévation des risques de complications liées à la maladie diabétique (Brand *et al.*, 1996; Nishio *et al.*, 1998). Des études menées sur le facteur de transcription NF- κ B ont montré que son activation lors d'une hyperglycémie *in vitro* ou *in vivo* pouvait être inhibée par l'addition de molécules antioxydantes comme l'acide alpha-lipoïque ou la N-acétyl-cystéine (NAC) (Bierhaus *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1999). Dans un travail récent, nous avons montré, chez des patients diabétiques de type 2, que ce facteur de transcription avait une activité augmentée de 50 % dans les leucocytes de patients diabétiques, cette activité revenant à un niveau normal comparable aux témoins en cas de prise d'antioxydant (résultat en cours de publication). Hormis le stress oxydant rencontré au cours du diabète, plusieurs modifications induites par l'hyperglycémie peuvent induire NF- κ B. La formation d'AGE, l'activation des RAGE qui en résulte (Morifi *et al.*, 1998), les modifications osmotiques induites par l'hyperglycémie (parck) sont autant de modifications capables d'activer NF- κ B. Les modèles expérimentaux d'animaux diabétiques (rats streptozotocines, rats fructose) ont permis de montrer que NF- κ B était le plus fortement activé dans les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules endothéliales, et que son inhibition diminuait l'hyperprolifération des premières et l'apoptose des deuxièmes (Tucker *et al.*). L'activation de NF- κ B induit une cascade importante d'événements biochimiques, en particulier l'activation de cytokines et de TNF- α . Ce dernier diminue l'activité du récepteur à l'insuline, aggravant ainsi l'hyperinsulinémie du diabète de type 2, ce qui représente en soi un risque cardiovasculaire supplémentaire (Chu *et al.*). Par contre, contrairement à Sp1, il ne semble pas que NF- κ B interfère sur l'expression du récepteur à l'insuline.

SP1 : UN RÔLE UBIQUITAIRE MAIS POTENTIELLEMENT IMPORTANT POUR LE MÉTABOLISME GLUCIDIQUE

Le facteur de transcription Sp1, contrairement à NF- κ B subit une baisse de son activité lors d'un stress oxydant, ce qui peut entraîner une baisse de l'expression de certaines protéines dont le gène est régulé par Sp1. Dans le cas du diabète, celui-ci n'a été que peu étudié, et les seules observations décrites dans la littérature semblent démontrer qu'il jouerait un rôle moins important que

NF- κ B dans le développement de l'athérosclérose. Néanmoins, le rôle du facteur de transcription Sp1 ne doit pas être négligé dans ce processus car il est reconnu que celui-ci entre souvent en compétition avec NF- κ B pour la fixation sur un promoteur. De plus, des sites de fixation de Sp1 sont retrouvés sur de nombreux promoteurs de gènes codant pour des protéines fortement impliquées dans la maladie diabétique; parmi celles-ci, le récepteur à lui-même.

La région 5'-flanquante du gène du récepteur de l'insuline humain a été clonée et séquencée jusqu'à 1,8 kb en amont du site de départ de la traduction (Araki *et al.*, 1991). Cette région possède des caractéristiques typiques des gènes exprimés de manière constitutive: elle est particulièrement riche en nucléotides G et C, site de fixation de Sp1, est dépourvue de boîtes TATA et CAAT, et possède plusieurs sites de départ de la transcription (Tewari *et al.*, 1989). L'organisation fonctionnelle du promoteur humain du récepteur à l'insuline a été étudiée en exprimant dans plusieurs types cellulaires des mutants délétés en 5' et/ou en 3', fusionnés au gène rapporteur CAT (Seino *et al.*, 1989). Ces expériences ont permis de localiser la plus grande partie de l'activité du promoteur entre -646 et -290 pb chez l'Homme. Cependant, cette partie semble évoluer suivant le type cellulaire étudié (McKeon & Pham, 1991).

Parallèlement à l'analyse délétionnelle, les techniques de retard sur gel et d'empreinte à la DNase I, ont permis de mettre en évidence des interactions spécifiques entre des séquences définies du promoteur et des facteurs de transcription; les uns connus (Sp1, HNF4) et d'autres encore non identifiés comme IRNF I et II (Insulin receptor nuclear factor I et II). Plusieurs de ces facteurs, et en particulier Sp1, sont capables de transactiver le gène du récepteur à l'insuline lors d'expériences de cotransfections *in vitro* (Cameron & Pham, 1992).

Sept sites potentiels de liaison du facteur de transcription Sp1 sont présents dans la région s'étendant de -692 à -395 pb. Les études d'interaction ADN-protéine ont mis en évidence une liaison effective de Sp1 avec les quatre boîtes distales et avec deux hexamères (GGGAGG) localisés entre -637 et -594 pb. La mutation des boîtes GC ou GA localisées dans cette région conduit à une diminution de 60 à 70 % de l'activité du promoteur ce qui suggère que le facteur de transcription Sp1 est un régulateur important de l'activité du promoteur du récepteur à l'insuline. Fukuda *et al.* (2001) ont montré sur des hépatocytes en lignée, que 3 mutations des sites de fixation de Sp1 étaient nécessaires pour altérer la synthèse du récepteur de l'insuline en présence de glucose. De même des extraits nucléaires d'hépatocytes de rat se fixent sur la séquence du récepteur de l'insuline.

Dans un travail récent, nous avons montré dans des cellules en lignées (les cellules HeLa), que l'activité de Sp1 était diminuée quand le glucose augmente, et restaurée si les cellules sont cultivées en présence de N-acétyl-cystéine. Par ailleurs, cette baisse d'activité s'accompagne d'une baisse modérée d'expression du récepteur de l'insuline, ne pouvant pas à elle seule modifier la sensibilité à l'insuline. Plusieurs hypothèses peuvent expli-

quer cette modification de l'activité de Sp1 : une oxydation de la séquence consensus de Sp1, une oxydation de la protéine elle-même, celle-ci étant riche en cystéine, très sensible à l'oxydation, ou une modification de la conformation protéique. En fait, les interactions entre Sp1 et NF- κ B semblent plus devoir être prises en compte puisqu'il semble que la baisse d'activité de Sp1 favorise l'activation de NF- κ B par l'intermédiaire de IKK.

CONCLUSION

Jusqu'à présent, aucune mesure de prévention efficace des maladies cardiovasculaires chez le diabétique n'a pu être mise en place. En particulier, les traitements anti-oxydants n'ont pas fait leurs preuves. La meilleure compréhension de la spécificité du stress oxydant au cours du diabète pourrait amener un élément de réponse en permettant d'intervenir sur les facteurs responsables de la gravité du remodelage vasculaire observé au cours de cette pathologie, plus particulièrement les facteurs de transcription redox sensibles.

BIBLIOGRAPHIE

Araki E., Murakami T., Kanai F., Shirotani T., Shinohara Y., Shimada F., Mori M., Shichiri M. & Ebina Y., A cluster of four Sp1 binding sites required for efficient expression of the human insulin receptor gene. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 3944-3948.

Bierhaus A., Chevion S., Chevion M., Hofmann M., Quehenberger P., Illmer T., Luther T., Berentshtein E., Tritschler H., Müller M., Wahl P., Ziegler R. & Nawroth P. P., Advanced glycation end products-induced activation of NF- κ B is sup-

pressed by α -lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*, 1997, 46, 1481-1490.

Brand K., Page S., Rogler G., Bartsch A., Brandl R., Knuechel R., Page M., Kaltschmidt C., Bauerle P. A. & Neumeier D., Activated transcription factor Nuclear factor-Kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J. Clin. Invest.*, 1996, 97, 1715-1722.

Cameron K. E., Resnik J. & Webster N. J., Transcriptional regulation of the human insulin receptor promoter. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 17375-17383.

Chu N., Spiegelman D., Hotamisligil G. S., Rifai N., Stampfer M. & Rimm E. B., Plasma insulin, leptin and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombotic cardiovascular disease risk factors among men. *Atherosclerosis*, 2001, 157, 495-503.

Ho E., Chen G. & Bray T. M., Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NF- κ B activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *FASEB J.*, 1999, 13, 1845-1854.

Mc Keon C. & Pham T., Transactivation of the human insulin receptor gene by the CAAT/enhancer binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, 174, 721-728.

Morigi M. et al., Leukocyte-endothelial interactions is augmented by high glucose and hyperglycemia in a NF- κ B-dependent fashion. *J. Clin. Invest.*, 1998, 101, 1905-1915.

Nishio Y., Kashiwagi A., Taki H., Shinozaki K., Maeno Y., Kojima H., Maegawa H., Haneda M., Hidaka H., Yasuda H., Horiike K. & Kikkawa R., Altered activities of transcription factors and their related gene expression in cardiac tissues of diabetic rats. *Diabetes*, 1998, 47, 1318-1325.

Seino S., Seino M., Nishi S. & Bell G. I., Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 114-118.

Tewari D. S., Cook D. M. & Taub R., Characterization of the promoter region and 3' end of the human insulin receptor gene. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 16238-16245.

Tucker C. & Myron I. C., NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, 2001, 107, 255-263.