

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **11 juillet 2025**

Nom de famille et prénom de l'auteur. e : **Madame Eva DREVET MULARD**

Titre de la thèse : Exploration des fonctions métaboliques de la phosphatase alcaline non spécifique d'un tissu (TNAP) et de ses substrats par métabolomique et caractérisation enzymatique par RMN

Résumé



La phosphatase alcaline non spécifique d'un tissu (TNAP), une enzyme ancrée aux membranes cellulaires et libérée dans la circulation sanguine, est principalement connue pour son rôle crucial dans la minéralisation du squelette par l'hydrolyse du pyrophosphate inorganique (PPi), le principal inhibiteur de la minéralisation. Cependant, la TNAP déphosphoryle potentiellement un large éventail de substrats extracellulaires, contribuant ainsi à diverses fonctions physiologiques. En utilisant la métabolomique par résonance magnétique nucléaire (RMN), le laboratoire a récemment identifié la phosphocholine comme un substrat possible *in vivo*, suggérant un lien hypothétique entre la TNAP, la production hépatique de phosphatidylcholine, et le métabolisme lipidique. Dans ce mécanisme, la TNAP serait nécessaire pour la synthèse hépatique de phosphatidylcholine, indispensable à l'assemblage des lipoprotéines et l'export des triglycérides. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avaient pour objectif d'explorer ce lien hypothétique *in vivo* chez la souris, dans des sérums de souris et humains, en culture de cellules et *in vitro*. Les résultats montrent tout d'abord que les souris déficientes en TNAP développent une stéatose hépatique et présentent une réduction du taux de triglycérides sériques, mimant les effets d'une carence en choline. Dans des souris sauvages, la métabolomique par RMN a montré que l'inhibition de la TNAP par l'inhibiteur SBI-425 entraîne une diminution significative des niveaux de choline dans le sang et dans le foie et nous a permis de confirmer deux substrats potentiels de la TNAP : la phosphocholine et la phosphoéthanolamine. Des expériences d'enzymologie par RMN montrent que l'inhibition de la TNAP bloque l'hydrolyse de la phosphocholine et de la phosphoéthanolamine dans le sérum de souris et d'humains. Dans les hépatocytes humains HuH6, l'inhibition de la TNAP bloque l'hydrolyse de la phosphocholine et altère la prolifération cellulaire lorsque la phosphocholine est la seule source de choline, suggérant un impact direct sur le métabolisme lipidique cellulaire. En outre, nous avons déterminé que l'enzyme recombinante hydrolyse la phosphocholine et la phosphoéthanolamine avec une efficacité similaire, voire supérieure, à celle du PPi. La détermination par nos collaborateurs de l'UMR CNRS 5086 de la structure 3D de la TNAP par diffraction des rayons X et cryo-EM nous a

permis de déterminer les résidus d'acides aminés du site actif interagissant avec les substrats et l'inhibiteur de la TNAP. Collectivement, ces résultats suggèrent fortement que la TNAP hydrolyse la phosphocholine et phosphoéthanolamine pour participer au métabolisme lipidique. En parallèle de cette première étude, une expérience de métabolomique par RMN sur des souris ApoE-KO (modèle d'athérosclérose) a suggéré que la TNAP est également impliquée dans la déphosphorylation du nicotinamide mononucléotide (NMN). Nous montrons ici que la TNAP et l'ectonucléotidase CD73 hydrolysent toutes deux le NMN dans le sérum, ainsi qu'en culture d'ostéoblastes humains. In vitro, nous montrons que la TNAP et la CD73 recombinantes de souris hydrolysent le NMN, et que l'hydrolyse du NMN par la TNAP a une efficacité catalytique comparable à l'hydrolyse de la phosphocholine, de la phosphoéthanolamine et du PPI. Enfin, l'implication d'ENPP1 dans le métabolisme du NAD⁺ étant proposée dans la littérature, nous montrons sa capacité à hydrolyser le NAD⁺ in vitro. ENPP1, puis la TNAP et CD73 semblent donc participer à l'hydrolyse extracellulaire du NAD⁺ en nicotinamide. En conclusion, cette étude a permis d'identifier de nouvelles fonctions enzymatiques de la TNAP. La TNAP semble donc importante pour la captation cellulaire de choline, son absence ou inhibition perturbant le métabolisme lipidique. La TNAP pourrait également être impliquée dans le métabolisme du NAD ; l'impact d'une déficience ou d'une inhibition de la TNAP sur ce métabolisme reste à approfondir.

Mots-clés : TNAP,Métabolomique,RMN,Hypophosphatasie,Choline,NAD,