



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

ECOLE DOCTORALE BIOSE (BIOLOGIE-SANTE-ENVIRONNEMENT)

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Hélène PELLANDA

**Expression des enzymes de la reméthylation de
l'homocystéine et effets épigénétiques de la mycotoxine
FB1 (fumonisine) dans l'hépatocarcinome**

Le 2 Juillet 2012

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Claude FOREST DR, UMR S747 INSERM, Paris

M. Jean-Noël FREUND DR, UMR U682 INSERM, Strasbourg

Examineurs :

Mme. Catherine-Laure TOMASETTO DR, IGBMC, Illkirch

M. Jean-Louis GUEANT PU-PH, UMR 954 INSERM, Nancy

M. Fares NAMOUR PU-PH, UMR 954 INSERM, Nancy
Directeur de thèse

M. Thierry FORGES DR, Maternité Grande-Duchesse Charlotte,
Luxembourg
Co-directeur de thèse

Membres invités :

M. Jean-Pierre BRONOWICKI PU-PH, CHU Nancy-Brabois, Nancy

M. Abalo CHANGO PU, Institut Polytechnique Lasalle, Beauvais

Remerciements

A Monsieur le Pr. Jean-Louis Guéant, directeur de l'unité INSERM U954,
Toute ma gratitude pour son accueil et pour avoir dirigé ces recherches...

A Monsieur le Dr. Claude Forest et Monsieur le Dr. Jean-Noël Freund, rapporteurs de
ma thèse,
Mes remerciements pour leur participation et pour avoir accepté d'évaluer mon travail
de thèse...

A Madame Catherine-Laure Tomasetto, examinatrice de ma thèse,
Mes remerciements pour sa participation au jury de ma soutenance de thèse et pour
son évaluation...

A Monsieur le Pr. Fares Namour, mon directeur de thèse et examinateur,
Mes remerciements les plus sincères pour m'avoir encadrée et soutenue au cours de
ma thèse...

A Monsieur le Dr. Thierry Forges, mon co-directeur de thèse et examinateur,
Mes remerciements les plus sincères pour m'avoir soutenue dans mon projet
professionnel et pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire pour mon stage de
Master...

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre Bronowicki et Monsieur Le Professeur Abalo
Chango, membres invités de mon jury,
Mes remerciements pour votre participation à mon jury de thèse...

A Céline Chéry et Jean-Marc Alberto, ingénieurs et premiers collègues de bureau,
Je ne vous remercierai jamais assez pour votre accueil, votre patience, vous m'avez
tellement appris...

A Philippe Gérard, ingénieur et collègue de bureau,
Merci pour tout, les dosages, les bons conseils, les bonnes blagues et tous ces repas
partagés...

A Déborah Helle et Pierre Rouyer, Justine Flayac, techniciens
Merci pour tous ces bons moments partagés ensemble et votre soutien...

A Sandra Audonnet et Romain Rivet, techniciens
Merci pour votre bonne humeur et votre aide...

A Dominique Guillaume, secrétaire
Un grand merci pour sa disponibilité, sa patience très remarquable...

A Catherine Tavera, secrétaire,
Un grand merci pour avoir pris soin de moi et pour son soutien...

A Ma'atem Fofou-Caillierez, Sonia Gkikopoulou, Nassila Akchiche et Nicolas Martin,
mes compagnons de galère et mes points de repères,
Sans vous ça n'aurait jamais été pareil, merci pour votre soutien, pour tous ces
excellents moments partagés au laboratoire et en dehors... Je vous souhaite le
meilleur pour la suite...

A Sarah El Chakour, Rania El Akoum, Racha Kerek, Rose Ghemrawi et Shabnam
Pooya,
Merci pour votre énergie positive, votre bonne humeur, votre soutien et tous ces
bons moments passés ensemble au laboratoire et en dehors... Bonne continuation à
vous toutes...

A tout le personnel du laboratoire,
Merci pour votre aide, votre gentillesse et votre soutien...

A ma famille, mes parents, mon petit frère, mes grands-parents, ma tante, son mari
et ses enfants...
Mille mercis, vous êtes mon bonheur, sans vous, rien de tout cela n'aurait été
possible...Je vous aime...

A mes amis, Charlène, Amandine, Céline, Anaïs, Nicolas, Noël, Jérôme...
Merci pour votre écoute, vos conseils... Je sais que je peux compter sur vous et je
vous en remercie...

A mes parents,

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	6
ABREVIATIONS.....	10
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	12
I. Les déterminants nutritionnels du métabolisme des monocarbones.....	13
A. Les folates.....	13
1. <u>Définition</u>	13
2. <u>Apports nutritionnels</u>	13
3. <u>Structure chimique</u>	13
4. <u>Absorption des folates</u>	16
5. <u>Transport cellulaire des folates</u>	18
5.1 Le « reduced folate carrier ».....	18
5.2 Les « folate receptors».....	21
5.3 Le « Proton-Coupled Folate Transporter » (PCFT).....	24
6. <u>Le stockage des folates</u>	25
7. <u>Le rôle des folates</u>	25
7.1 La synthèse des acides aminés.....	25
7.2 La synthèse des acides nucléiques.....	25
7.3 La conversion sérine-glycine.....	26
7.4 Le transport d'unités monocarbonées.....	26
7.5 La synthèse de la méthionine.....	26
8. Carence en vitamine B9.....	27
B. Les cobalamines.....	27

1. <u>Définition</u>	27
2. <u>Apports nutritionnels</u>	28
3. <u>Structure chimique</u>	28
4. <u>Absorption des cobalamines</u>	29
5. <u>Transport dans le sang</u>	30
6. <u>Transport cellulaire des cobalamines</u>	31
7. <u>Stockage des cobalamines</u>	33
8. <u>Le rôle des cobalamines</u>	33
8.1 La conversion de l'acide méthylmalonique en acide succinique.....	33
8.2 La conversion combinée de l'homocystéine en méthionine et du méthyltétrahydrofolate en tétrahydrofolate.....	33
9. Carence en vitamine B12.....	34
C. La choline et la bétaine	34
1. <u>Définition</u>	34
2. <u>Structure chimique</u>	35
3. <u>Apports alimentaires</u>	35
4. <u>Absorption et transport</u>	35
5. <u>Apports cellulaires</u>	36
6. <u>Rôle de la choline et de la bétaine</u>	37
7. <u>Carence en choline et bétaine</u>	38
II. Métabolisme des monocarbones et mécanismes épigénétiques	39
A. Le cycle des monocarbones	39

1. <u>L'homocystéine</u>	39
2. <u>La méthionine</u>	40
3. <u>Le cycle des monocarbones</u>	41
4. <u>Les enzymes du cycle des monocarbones</u>	43
4.1 La méthionine synthase (MS).....	43
4.2 La bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT).....	44
a. Le gène.....	46
b. La protéine.....	47
c. BHMT et BHMT2.....	48
4.3 La méthionine adényltransférase (MAT).....	49
5. <u>La SAM et la SAH et les réactions de transméthylation</u>	50
6. <u>Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine</u>	51
6.1 Balance entre voie de reméthylation et voie de transsulfuration.....	51
6.2 Balance entre réactions de transméthylation et réactions faisant intervenir la glycine N-méthyltransférase.....	52
B. Les modifications épigénétiques	52
1. <u>La méthylation de l'ADN</u>	53
1.1 Définition.....	53
1.2 Méthylation de l'ADN et cancer.....	55
2. <u>Modifications des histones</u>	56
2.1 Définition.....	56
2.2 L'acétylation des histones.....	57
2.3 La méthylation des histones.....	58
2.4 Modifications des histones et cancer.....	59
3. <u>Interactions entre méthylation de l'ADN et modifications des histones</u>	60

III. Les facteurs génétiques et environnementaux qui influencent le métabolisme des monocabones.....	61
A. Les facteurs génétiques.....	61
B. Les facteurs environnementaux.....	63
1. <u>Les fumonisines, mycotoxines alimentaires</u>	63
1.1 Découverte, origine.....	63
1.2 Source.....	64
1.3 Propriétés physico-chimiques.....	64
1.4 Absorption, distribution et élimination.....	65
1.5 Mode d'action.....	66
a. Interaction avec le métabolisme des sphingolipides.....	66
b. Interaction avec le métabolisme des folates....	70
1.6 Conséquences de l'action de la fumonisine B1.....	71
a. Conséquences embryotoxiques et tératogènes.....	71
b. Conséquences cancérigènes.....	72
1.7 Maladies associées.....	75
2. <u>Les autres facteurs environnementaux</u>	79
IV. Les Pathologies en lien avec le métabolisme des monocabones.....	79
A. Les maladies hématologiques.....	79
B. Les maladies neurologiques.....	80
C. Les maladies cardiovasculaires.....	80
D. Les complications obstétriques.....	80
E. Les cancers.....	81

1. <u>Le cholangiocarcinome</u>	83
1.1 Définition, fréquence.....	83
1.2 Facteurs de risque.....	83
1.3 Prévention et traitements.....	83
2. <u>L'hépatocarcinome</u>	84
2.1 Définition, fréquence.....	84
2.2 Facteurs de risque.....	85
2.3 Prévention et traitements.....	87
2.4 Le métabolisme des monocarbones dans le CHC.....	87
3. <u>Les différentes hypothèses étiologiques dans le cancer du foie</u>	88
3.1 Aspects nutritionnels.....	88
3.2 Aspects environnementaux.....	90
3.3 Aspects génétiques et épigénétiques.....	91
OBJECTIFS	96
ETUDE EXPERIMENTALE	98
PARTIE I : Caractérisation de l'expression des enzymes de la voie de reméthylation dans le cancer hépatique	99
PARTIE II : Etude des effets synergiques de la fumonisine B1 et de la carence en donneurs de méthyle sur les modifications épigénétiques au cours du développement chez le rat	108
CONCLUSION/DISCUSSION/PERSPECTIVES	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133
FICHES TECHNIQUES	155
LISTE DES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS	223

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Contexte bibliographique

<u>Figure 1</u> : Les folates.....	14
<u>Figure 2</u> : Interconversion des folates.....	15
<u>Figure 3</u> : Absorption intestinale des folates alimentaires.....	17
<u>Figure 4</u> : Processus de transport des folates à travers la membrane.....	18
<u>Figure 5</u> : Structure génomique et topologie membranaire de RFC.....	20
<u>Figure 6</u> : Cavéole et potocytose.....	23
<u>Figure 7</u> : Structure chimique de la vitamine B12.....	29
<u>Figure 8</u> : Mécanisme d'absorption de la vitamine B12.....	32
<u>Figure 9</u> : Réactions de synthèse de la choline puis de la bétaïne.....	37
<u>Figure 10</u> : Cycle du métabolisme de la méthionine et de l'homocystéine.....	42
<u>Figure 11</u> : Conversion combinée de l'homocystéine en méthionine et du méthylTHF en THF par la méthionine synthase	44
<u>Figure 12</u> : Réaction catalysée par la bétaïne homocystéine méthyltransférase (BHMT).....	45
<u>Figure 13</u> : Structure de la S-adénosylméthionine (SAM).....	50
<u>Figure 14</u> : Mécanisme de méthylation de l'ADN.....	54
<u>Figure 15</u> : Le nucléosome.....	57
<u>Figure 16</u> : Influences des stimuli intrinsèques et extrinsèques sur les différentes modifications des histones.....	60
<u>Figure 17</u> : Structure de la fumonisine B1.....	65
<u>Figure 18</u> : Voie de biosynthèse <i>de novo</i> des sphinganine, céramides et sphingosines nécessaires à la formation des sphingolipides complexes.....	67
<u>Figure 19</u> : Inhibition de la céramide synthase par la fumonisine B1 et les conséquences sur la synthèse des lipides complexes.....	68
<u>Figure 20</u> : Modèle d'action de la fumonisine B1 sur le site actif de la céramide synthase.....	69
<u>Figure 21</u> : Conséquences de l'action de la fumonisine B1.....	70
<u>Figure 22</u> : Voie de biosynthèse des sphingolipides, mode d'action de la fumonisine, survie et mort cellulaire.....	74
<u>Figure 23</u> : Processus de cancérogenèse en plusieurs étapes.....	82

<u>Figure 24</u> : Spectre des maladies associées à la consommation d'alcool (ALD) et non associées à la consommation d'alcool mais causant une accumulation d'acides gras dans le foie (NAFLD).....	86
<u>Figure 25</u> : Relation étroite entre les aspects nutritionnels et les aspects génétiques et épigénétiques amenant à l'apparition de CHC.....	94
<u>Tableau 1</u> : Sévérité de l'hyperhomocystéinémie selon les facteurs étiologiques.....	40
<u>Tableau 2</u> : Comparaison de la distribution de la bêtaïne homocystéine méthyltransférase (BHMT) dans différents organes chez l'homme, le singe rhésus, le porc, le mouton, la souris, le rat et le cochon d'inde.....	46
<u>Tableau 3</u> : Structure des fumonisines.....	65
<u>Etude expérimentale</u>	
<u>Figure 26</u> : Résultats de RT-PCR (A) et RT-qPCR (B) pour l'étude de l'expression des transcrits <i>MTR</i> , <i>BHMT</i> , et <i>BHMT2</i> dans les cellules HepG2, les tissus hépatiques humains sains et tumoraux et les tissus hépatiques sains fœtaux.....	100
<u>Figure 27</u> (A) : Représentation schématique des gènes <i>BHMT</i> , <i>BHMT2</i> et de la position des paires d'amorces utilisées en RT-PCR. (B) : Résultats de RT-PCR après amplification de <i>BHMT</i> et <i>BHMT2</i> exons par exons en utilisant les paires d'amorces P1 à P7 et P1' à P7'.....	102
<u>Figure 28</u> (A) : Séquence génomique de <i>BHMT</i> mettant en évidence les exons 3, 4 et 5 entrecoupés par les séquences introniques 4 et 5. (B) : Séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique correspondant au transcrit alternatif de 167 pb amplifié avec la paire d'amorces P3 en RT-PCR. (C) : Schéma représentant le mécanisme d'épissage alternatif générant le transcrit court de BHMT dans les tissus tumoraux et les cellules HepG2.....	104
<u>Figure 29</u> (A) : Résultats d'immunohistochimie pour l'étude de l'expression de la protéine BHMT dans les tissus sains et tumoraux. (B) : Résultats de Western blot pour l'étude de l'expression de la protéine BHMT.....	106

<u>Figure 30</u> : Mesure de l'activité enzymatique de BHMT par dosage radioisotopique.....	107
<u>Figure 31 (A)</u> : Résultats de dosages radioisotopiques (vitamine B9 et B12) et de spectrométrie de masse (homocystéine) – Effets de la carence en donneurs de méthyle et/ou de la fumonisine B1 (FB1) sur les concentrations plasmatiques des vitamines B9, B12 et homocystéine chez les mères. (B) : Résultats d'immunohistochimie – Etude histologique des foies des mères gestantes nourries avec un régime déficient en donneurs de méthyle associé ou non à une exposition à la fumonisine B1.....	110
<u>Figure 32</u> : Résultats des dosages radioisotopiques (vitamine B9 et B12) et d'HPLC (SAM/SAH) – Effets d'une carence en donneurs de méthyle et de la fumonisine sur les concentrations hépatiques en vitamine B9, B12 et SAM/SAH.....	111
<u>Figure 33</u> : Résultats de RT-qPCR – Effets de la carence en donneurs de méthyle associée ou non à une exposition à la fumonisine B1 (FB1) sur la transcription des gènes codant pour les récepteurs des folates FR et Slc19a1	113
<u>Figure 34</u> : Résultats de Western blot – Effets de la carence en donneurs de méthyle et de l'exposition à la fumonisine B1 (FB1) sur 4 marques de l'assemblage de l'hétérochromatine.....	115
<u>Tableau 4</u> : Caractéristiques cliniques des patients et fœtus analysés.....	99
<u>Tableau 5</u> : Effets d'une carence en donneurs de méthyle et d'un traitement par la fumonisine B1 (FB1) sur différents paramètres gestationnels.....	108
<u>Tableau 6</u> : Effets d'une carence en donneurs de méthyle et d'un traitement par la fumonisine sur le poids corporel et la taille des fœtus (E20).....	109
<u>Conclusion/Discussion</u>	
<u>Figure 35</u> : Schéma bilan représentant le mécanisme d'épissage provoquant l'apparition d'un transcrit de taille inférieure dans les cellules tumorales hépatiques.....	119
<u>Figure 36</u> : Cycle des monocarbones remplaçant les différents résultats obtenus dans les cellules tumorales hépatiques et les conséquences de l'abolition de la voie de reméthylation dépendante de la BHMT.....	120

Figure 37 : Schéma bilan remplaçant les effets synergiques de la carence en
donneurs de méthyle et de la fumonisine B1 pendant la période
gestationnelle chez le rat..... 125

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ALD : alcoholic liver disease
AP1 : aminopentol
ARN : acide ribonucléique
BADH : bétaïne aldéhyde déshydrogénase
BHMT : bétaïne homocystéine méthyltransférase
Cbl : cobalamine
CBS : cystathionine β synthase
CC : cholangiocarcinome
CHC : carcinome hépatocellulaire
CoA : coenzyme A
DHF : acide dihydrofolique ou dihydrofolate
DMG : diméthylglycine
DNMT : ADN méthyltransférase
DJT : dose journalière tolérable
DSE : dose sans effets observés
ELEM : leucoencéphalomalacie équine
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FB1 : fumonisine B1
FBP : folate binding protein
FGCP : folylpolyglutamate carboxypeptidase
FI (ou IF) : facteur intrinsèque
FR : folate receptor
GH : γ -glutamyl hydrolase
GNMT : glycine N-méthyltransférase
GPI : glycosyl-phosphatidylinositol
HAT : Histone acétyltransférase
HBV : virus de l'hépatite B
HCV : virus de l'hépatite C
HCY : homocystéine
HGF : hepatocyte growth factor

HDAC : histone déacétylase
HPLC : high-performance liquid chromatography
KO : knock out
MAT : méthionine adénosyltransférase
MRP : multidrug-resistance-associated protein
MS : méthionine synthase
MSR : méthionine synthase reductase
MTHFR : N5, N10-méthylènetétrahydrofolate réductase
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NAFLD : nonalcoholic fatty liver disease
NASH : nonalcoholic steatohepatitis
NTD : défaut de fermeture du tube neural (« neural tube defect »)
PAP1 : palmitoyl-aminopentol
PC : phosphatidylcholine
PCFT : proton-coupled folate transporter
PE : phosphatidyléthanolamine
PEMT : phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase
PLD: phospholipase D
RFC : reduced folate carrier
RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
SAH : S-adénosylhomocystéine
SAM : S-adénosylméthionine
SLC : solute carrier
SMM : S-méthylméthionine
TC : transcobalamine
THF : acide tétrahydrofolique ou tétrahydrofolate

CONTEXTE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les déterminants nutritionnels du métabolisme des monocarbones

A. Les folates

1. Définition

Les folates correspondent à un terme générique pour décrire un groupe de vitamines B solubles dans l'eau. En effet, le terme folate ou vitamine B9 désigne un ensemble de plusieurs formes vitaminiques dérivées de l'acide folique. Les synonymes correspondants sont la folacine, la vitamine BC, la vitamine B9, et *Lactobacillus casei* factor.

L'origine de leur nom provient du latin *folium* qui signifie feuille car ces substances ont été isolées à partir de feuilles d'épinard en 1941 par Mitchell et ses collaborateurs (*H.K. Mitchell, 1941; H.K. Mitchell, 1944*)

2. Apports nutritionnels

L'organisme n'est pas capable de synthétiser les folates, l'apport est donc exclusivement alimentaire. Les sources de folates sont le foie, les légumes verts, les haricots, les germes de blé, les levures, le jaune d'œuf, le lait et produits laitiers, les betteraves, le jus d'orange et le pain complet (*R. Iyer et S.K. Tomar, 2009*).

En Europe, les apports nutritionnels recommandés sont : 100-300 µg/jour de la naissance à la puberté, 200-400 µg/jour chez l'adulte et 400 µg/jour chez la femme enceinte. Aux USA, les apports recommandés chez l'adulte sont de 400 µg Dietary Folate Equivalents, 600 µg/jour pendant la grossesse puis 500 µg/jour pendant la lactation (Food and Nutrition Board, 1998 ; FAO/WHO 2002, IOM, 2004). Les taux plasmatiques des folates sont de 5 à 15 µg/L.

3. Structure chimique

L'acide folique dont le nom chimique est l'acide ptéroylmonoglutamique est composé d'un noyau ptérine, d'un acide p-aminobenzoïque, et d'une molécule

d'acide glutamique. Il ne correspond ni à la forme alimentaire naturelle ni à la forme physiologiquement active. Les formes actives dans l'organisme sont l'acide dihydrofolique (DHF), l'acide tétrahydrofolique (THF) et ses dérivés méthylés (CH₃) ou formylés (CHO) portant des radicaux monocarbonés en position 5 et/ou 10 (Figure 1 et 2): N5-formylTHF, N10-formylTHF, N5-méthylTHF, N5-formiminoTHF, N5, N10-méthylèneTHF et N5, N10-méthénylTHF.

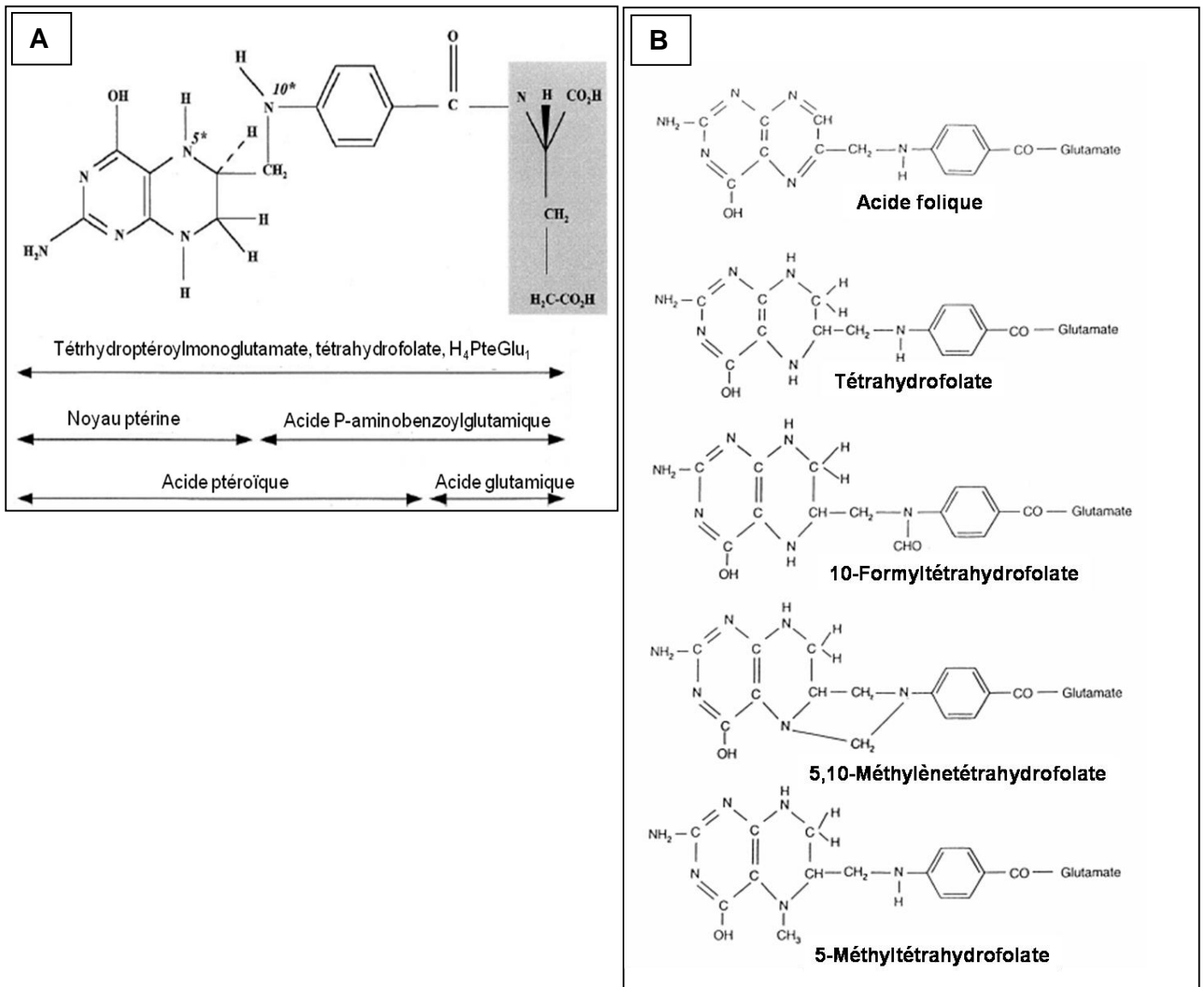


Figure 1 : Les folates **A**. La structure chimique du tétrahydrofolate. (modifié d'après M. Lucock, 2000). **B**. La structure chimique de l'acide folique et de quelques formes réduites des folates. (modifié d'après J.M. Scott, 1999)

Dans les cellules animales, l'acide folique est actif sous forme réduite en THF aux positions 5, 6, 7 et 8 du noyau ptérine (Figure 1B). Les dérivés actifs des folates sont aussi modifiés par addition d'une chaîne de résidus glutamyle. Les folates ont un rôle de coenzymes dans des réactions métaboliques essentielles en agissant comme accepteur ou donneur d'unités monocarbonées, notamment lors du métabolisme des acides aminés (constituants des protéines) et des acides nucléiques (ADN et ARN). Ils sont donc essentiels à la division cellulaire, la croissance, la formation des cellules sanguines et au fonctionnement optimal de la moelle osseuse. (M. Lucock, 2000).

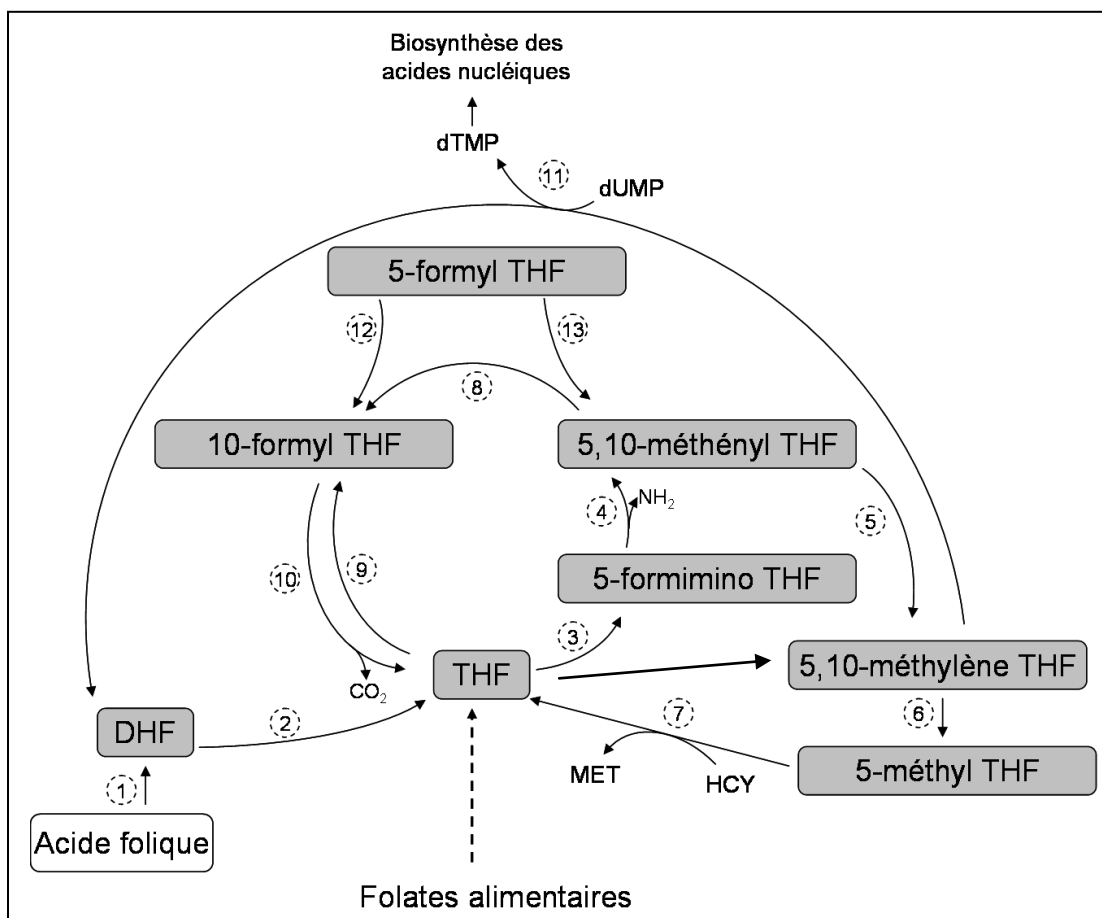


Figure 2 : Interconversion des folates. (1) Et (2): dihydrofolate réductase (3): tétrahydrofolate formiminotransférase, (4): formiminotétrahydrofolate cyclodéaminase, (5): 5,10-méthylène-tétrahydrofolate déshydrogénase, (6): 5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductase, (7): méthionine synthase, (8): 5,10-méthényltétrahydrofolate cyclohydrolase, (9): 10-formyl-tétrahydrofolate synthétase, (10): 10-formyl-tétrahydrofolate déshydrogénase, (11): thymidilate synthase, (12): formyltétrahydrofolate isomérase, (13): formyltétrahydrofolate cyclohydrolase. Met:

méthionine; HCY: homocystéine. (*Jean-Claude Guillard et Bruno Lequeu. Encyclopédie des vitamines - Du nutriment au médicament. Vol.1).*

4. Absorption des folates

Les folates sous forme de polyglutamates sont catabolisés en monoglutamates, par une enzyme spécifique intestinale appelée folylpolyglutamate carboxypeptidase (FGCP) ou γ -glutamyl hydrolase (GH) (*R. Yao et al, 1996*). Les monoglutamates sont ensuite absorbés dans l'intestin grêle (jéjunum proximal) par l'intermédiaire d'un récepteur principal : le « proton-coupled folate transporter » (PCFT) (Figure 3) (*R. Zhao et al, 2009*). Le rôle critique du récepteur PCFT dans l'absorption intestinale a été démontré chez des patients ayant une malabsorption héréditaire des folates chez qui le gène était muté induisant la perte de fonction de la protéine (*A. Qiu et al, 2007*).

Après absorption, la principale forme retrouvée dans la veine porte, est le 5-méthyltétrahydrofolate, chez les Mammifères. Les monoglutamates sont les principales formes transportées dans le sang soit sous forme libre soit liés. Les protéines de liaison plasmatique sont d'une part l'albumine et l'alpha2 macroglobuline, ligands de faible affinité et d'autre part, les « Folate Binding Proteins Solubles » (S-FBP), de haute affinité qui sont identiques à la protéine de liaison cellulaire ancrée à la membrane par un résidu glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). La concentration en folates est plus importante dans les érythrocytes que dans le plasma ($> 150 \mu\text{g/L}$ vs $> 5 \mu\text{g/L}$). Le taux érythrocytaire est un bon indicateur à long terme du statut en folates. (*Jean-Claude Guillard et Bruno Lequeu. Encyclopédie des vitamines-Du nutriment au médicament. Vol.1).*

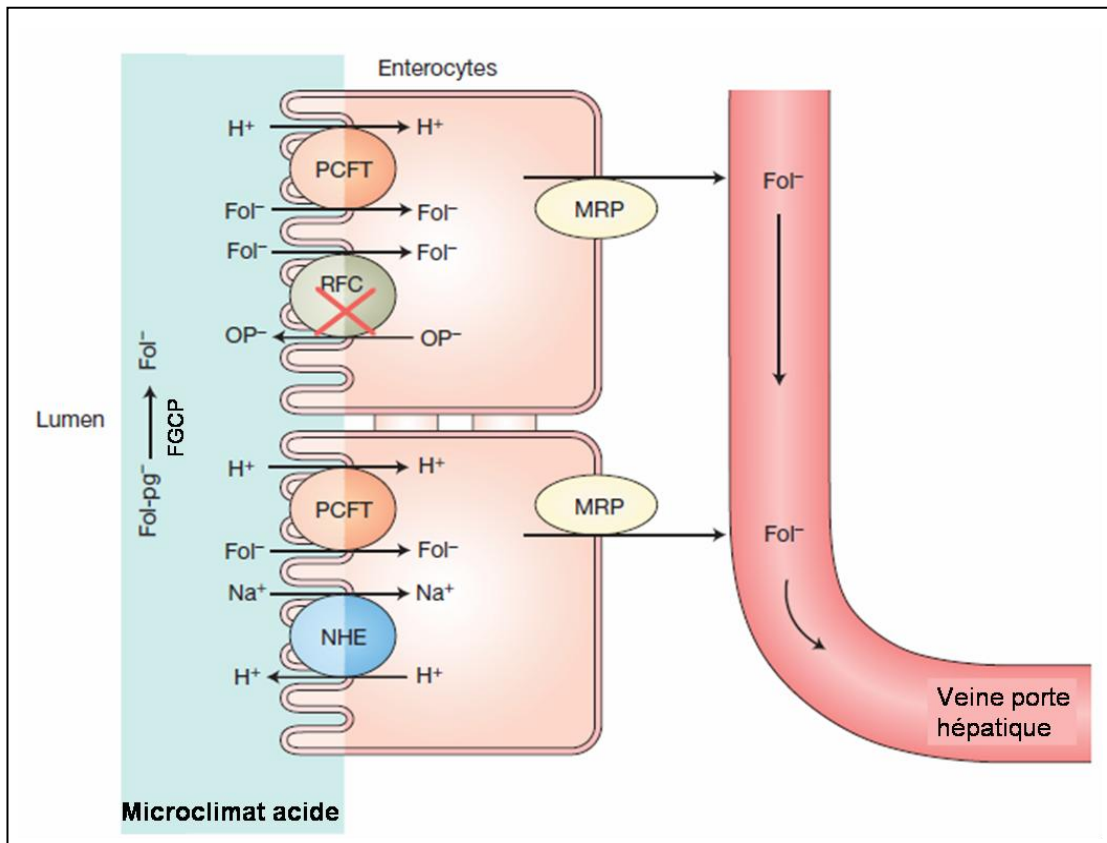


Figure 3 : Absorption intestinale des folates alimentaires. Les N5-méthylTHF polyglutamates (Fol-pg⁻) sont hydrolysés en monoglutamates par l'action de la foylpolylpolyglutamate carboxypeptidase (FGCP) et sont ensuite absorbés dans la cellule intestinale du jéjunum proximal *via* le « proton-coupled folate transporter » (PCFT). L'hydrolyse des polyglutamates ainsi que le transport *via* PCFT sont favorisés par un microclimat acide indiqué en bleu généré par des échangeurs d'ions Na⁺/H⁺ (NHE). Un autre récepteur, Reduced Folate Carrier RFC est également exprimé au niveau de la bordure en brosse mais il n'est pas fonctionnel dans cette région car son activité optimale nécessite un pH neutre. Les folates cellulaires empruntent la membrane basolatérale pour sortir de la cellule par un mécanisme impliquant probablement un des membres de la famille des « multidrug-resistance-associated protein » (MRP). Ils sont conduits vers les tissus périphériques et en particulier vers le foie *via* la veine porte hépatique (modifié d'après *R. Zhao et al, 2009*).

5. Transport cellulaire des folates

Trois récepteurs interviennent dans le transport cellulaire des folates (Figure 4).

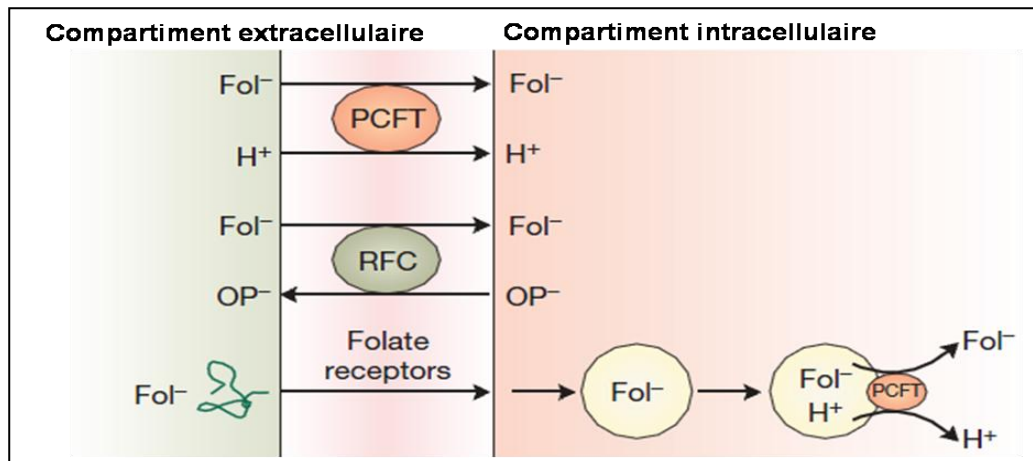


Figure 4 : Processus de transport des folates à travers la membrane. Le transporteur « proton-coupled folate transporter » (PCFT) permet l'entrée de folates et d'ions H^+ (symport) dans un environnement extracellulaire acide. Le récepteur « reduced folate carrier » (RFC) est un échangeur d'anions qui utilise le gradient transmembranaire d'ions phosphates (OP^-) pour réaliser le transport des folates dans la cellule. Les récepteurs « folate receptors » ($FR\alpha$ et $FR\beta$) lient les folates avec une forte affinité et effectuent le transport des folates dans la cellule *via* un mécanisme d'endocytose. Une fois dans le cytoplasme, la vésicule d'endocytose est acidifiée, les folates sont libérés de leurs récepteurs et exportés grâce à PCFT (modifié d'après *R. Zhao et al, 2009*).

5.1 Le «Reduced Folate Carrier » (RFC)

Le « Reduced folate carrier » (*RFC*) est un membre de la superfamille des «solute carrier» (*SLC*) (*V. Ganapathy et al, 2004*). C'est un échangeur d'anions qui distribue les folates aux tissus à pH physiologique (*R. Zhao et al, 2009*). La spécificité de ce transporteur pour les différents folates varie en fonction du tissu et du pôle de la cellule (apical ou basal).

Le transport *via* *RFC* est hautement sensible au gradient d'ions phosphates. Il possède une plus haute affinité pour les folates réduits comme le THF, le N5-

méthylTHF, le N5-formylTHF que pour les folates non réduits, son substrat prédominant étant le N5-méthylTHF.

Son expression est ubiquitaire mais plus élevée dans les tissus ayant une fonction d'absorption et un rôle dans l'homéostasie des folates (intestin, colon, tubules rénaux, membrane plasmique des hépatocytes, axones, dendrites, rate, plexus choroïde) (*Y. Wang et al, 2001; T.M. Trippett et al, 2001*). RFC est exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus sains et tumoraux. Les ARNm ont été détectés dans 8 lignées cellulaires tumorales et 68 tissus humains, et plus particulièrement, à un taux élevé, dans l'intestin, le rein, le placenta et le foie (*J.R. Whetstine, et al, 2002*).

Chez l'homme, le gène SLC19A1 codant hRFC (NM_003056) se situe sur le locus 21q22.2 à 21q22.3 et mesure 22,5 kb. (*J.A. Moscow et al, 1995 ; T.L. Yang-Feng et al, 1995*). Chez la souris, il se trouve sur le chromosome 10 (*K. Roy et al, 1998*). Au total 18 transcrits ont été décrits, comportant des régions 5' différentes mais codant vraisemblablement la même protéine (*J.R. Whetstine et al, 2002 ; R. Zhao et al, 2009*) (Figure 5).

La protéine hRFC comporte 12 domaines transmembranaires, un site de N-glycosylation (Asn-58) (conservé chez le rat mais pas chez la souris), elle possède 591 acides aminés et une masse moléculaire de 65 kDa (*J.A. Moscow et al, 1995; P.D. Prasad et al, 1995*). Chez la souris (mRFC) et le rat, sa masse moléculaire est de 58 kDa (*K.H. Dixon, et al, 1994*). Le domaine C-terminal (queue cytoplasmique) est important pour la stabilité et le trafic membranaire de la protéine mais pas pour sa fonction. Quant à ses domaines transmembranaires 4, 5, 7, 8 et 10, ils sont importants pour la structure et la fonction de la protéine. Le domaine 11 est essentiel à la liaison avec les folates. (*H. Sadlish et al, 2002; I.G. Sharina et al, 2002*). Le pourcentage d'homologie en acides aminés entre le rat et l'homme est égal à 65,2 %, entre la souris et l'homme à 66% et entre le rat et la souris à 89,7% (*B. Tolner et al, 1998*) (Figure 5).

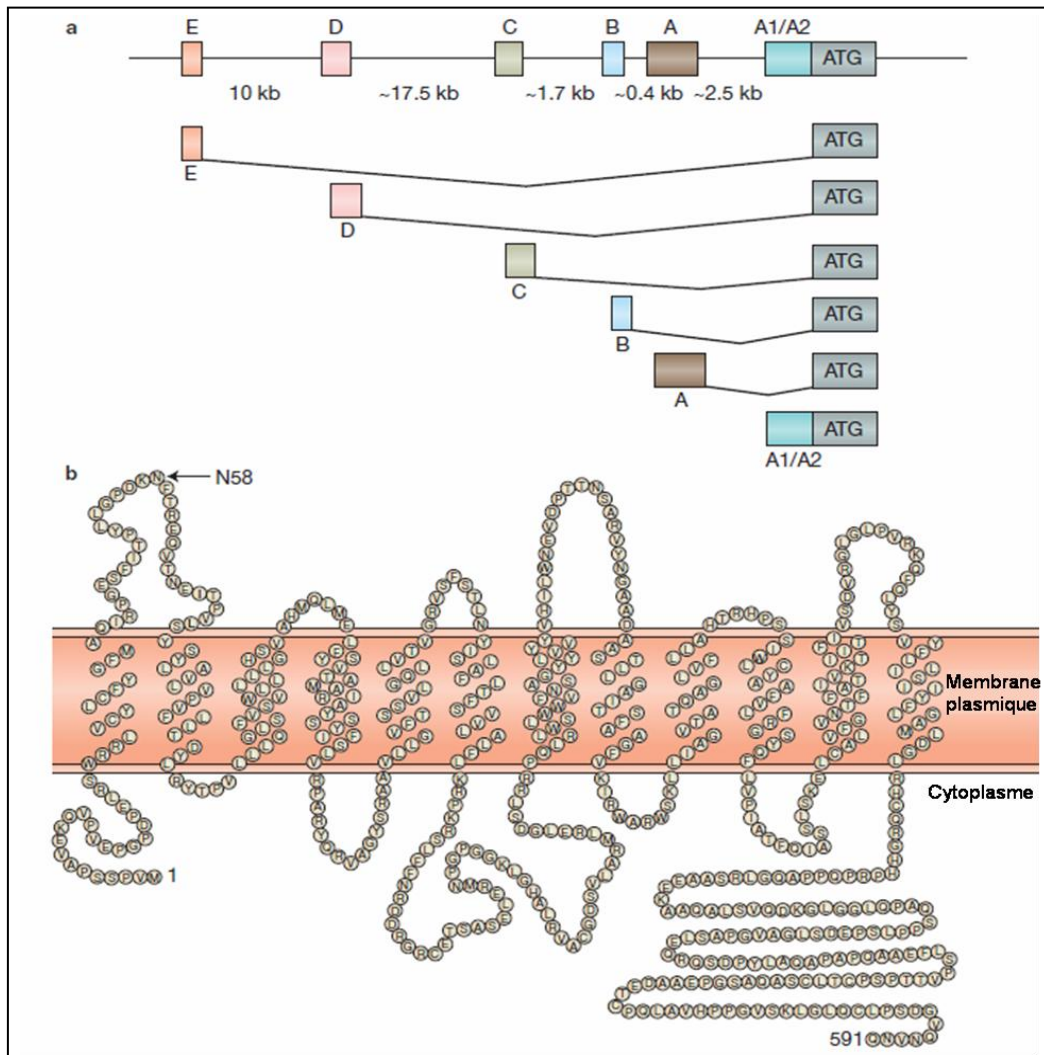


Figure 5 : Structure génomique et topologie membranaire du récepteur « reduced folate carrier » (RFC). (a) Schéma de la région 5' du gène *SLC19A1* codant la protéine humaine RFC. Sur une distance d'environ 35 kb en amont du principal site initial de la traduction, il existe 6 régions chacune précédée d'un promoteur alternatif générant des transcrits uniques avec des régions 5' non codantes distinctes qui codent pour une même protéine. (b) Topologie membranaire du récepteur RFC formé de 12 domaines transmembranaires, d'une boucle cytoplasmique entre les domaines 6 et 7 et de deux régions internes C et N-terminales. Le site de N-glycosylation est indiqué à la position N58 (modifié d'après *R. Zhao et al, 2009*).

Les modèles cellulaires et animaux montrent que la déplétion en folates exerce une régulation positive sur l'absorption intestinale des folates comportant une augmentation des ARNm et des protéines RFC (*G. Jansen et al, 1997 ; H.M. Said et*

al, 2000). La multiplicité des promoteurs de *hRFC* pourrait fournir un moyen potentiellement puissant de garantir des niveaux adéquats de transcrits et de protéines hRFC en réponse aux besoins métaboliques en folates et/ou en réponse aux signaux cellules/tissus spécifiques. Des mécanismes épigénétiques régulent l'expression de *RFC*. Dans les cellules cancéreuses du sein (MDA-MB-231) qui n'expriment pas *RFC*, une transfection avec l'ADNc de *RFC* provoque une expression du récepteur corrélée à une hypométhylation des îlots CpG associée à une augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 (*J. Worm et al, 2001*).

Des études, chez la souris *rfc*^{-/-} montrent que l'inactivation du gène induit une létalité embryonnaire à E9,5 due au mauvais développement des organes hématopoïétiques tandis que le KO hétérozygote est viable. Une amélioration de la survie jusqu'à la naissance a été observée quand les mères *rfc*^{+/-} étaient supplémentées avec de l'acide folique. Cependant, les jeunes souris meurent après 12 jours (*R. Zhao et al, 2001*). Plus récemment, des études menées sur des souris *Slc19A1*^{-/-} issus de mères supplémentées avec une faible concentration en folates montrent de nombreuses malformations congénitales (tube neural, membres, poumons, cœur et peau) avec un défaut de l'érythropoïèse (*J. Gelineau-van Waes et al, 2008*).

5.2 Les « folates receptors » (FR)

Les « Folate receptors » (FR), protéines de liaison membranaire spécifique, permettent l'internalisation par endocytose des folates à pH neutre ou acide. Les FR ont une forte homologie avec la protéine de liaison plasmatique S-FBP et ont été mis en évidence dans le placenta (*A.C. Antony et al, 1981*), dans le cortex, les tubules rénaux (*J. Selhub et W.A. Franklin, 1984*), les glandes salivaires submandibulaires, les tubules proximaux du rein, l'épithélium des trompes de Fallope, l'utérus, l'épididyme, les cellules des acini du sein, les glandes bronchiques, les alvéoles pulmonaires (pneumocytes type I et II), le trophoblaste, et un peu plus faiblement dans l'ovaire (cellules de la granulosa), le pancréas, le vas déferent, et la thyroïde chez l'homme. Son expression a également été retrouvée dans différentes lignées cellulaires tumorales, les cellules KB (epidermoid carcinoma) (*A.C. Antony et al, 1985; M.A. Kane et al, 1986*), Caco-2 (colon carcinoma), et IGROV1 (ovarian carcinoma) (*S.D. Weitman et al, 1992*).

Ce récepteur possède une plus grande affinité pour l'acide folique et le 5-méthylTHF, mais une plus faible affinité pour les autres folates réduits.

Trois gènes distincts *FOLR1*, *FOLR2* et *FOLR3* localisés sur le chromosome 11q13.3-q13.5 codent pour trois isoformes du récepteur, FR α , FR β , et FR γ (*J. Ragoussis et al, 1992*). Les FRs sont homologues à 68-79% au niveau de la séquence en acides aminés. Il existe 2 sites de N-glycosylation pour FR β et FR γ et 3 sites pour FR α (*L.H. Matherly et D.I. Goldman, 2003*).

FR α et β sont des protéines liées à la membrane par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) alors que FR γ est un récepteur sécrété (*F. Shen et al, 1995*). La protéine FR γ est homologue à 71% avec FR α et à 79% avec FR β , elle est surtout présente et étudiée dans les tissus hématopoïétiques.

Les FRs sont regroupés à la surface des cellules et sont plutôt associés à des invaginations de la membrane (= caveolae riche en cavéoline-1). Les récepteurs semblent se déplacer à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule et le processus de mise à disposition des folates par les FRs dépend d'une voie différente de l'endocytose. Le modèle proposé est le suivant : les folates (5-méthylTHF) se lient aux récepteurs orientés vers l'extérieur de la cellule puis survient une internalisation du récepteur *via* les cavéoles dans lesquelles un environnement acide est établi sous l'action d'une pompe à protons. Les folates se dissocient de leurs récepteurs et une fois dans le cytoplasme, le 5-méthylTHF est modifié de manière covalente par ajout de plusieurs résidus d'acide glutamique (polyglutamates). Les récepteurs sont ensuite recyclés dans la membrane dans les cavéoles pour un nouveau cycle (*K.G. Rothberg et al, 1990b; B.A. Kamen et al, 1988*). Plus récemment, il a été suggéré que PCFT pouvait être à l'origine du transport des folates de l'intérieur de la vésicule d'endocytose acidifiée vers le cytoplasme (*N.C. Andrews, 2007 ; A. Qiu et al, 2006*). La cavéoline-1 se lie au cholestérol et peut s'oligomériser sous la forme de complexes protéiques fonctionnant comme un organisateur de microdomaines (« rafts »). Ces microdomaines sont impliqués dans le trafic des membranes, l'adhésion cellulaire, l'assemblage de molécules cytoplasmiques de signalisation et sont essentiels à l'internalisation et au recyclage des FRs. Le cholestérol et les sphingolipides jouent un rôle essentiel dans le maintien de ces domaines membranaires au niveau des cavéoles et modulent l'interaction des protéines à ancre GPI *via* leurs ancres phospholipidiques avec la membrane cellulaire (*K.G. Rothberg et al, 1990a*). Les FRs régulent leur séquestration au niveau des cavéoles, mais en l'absence d'agents

qui favorisent leur regroupement ils sont répartis de manière diffuse dans la membrane plasmique (S. Mayor et al, 1994). Ce processus d'endocytose par l'intermédiaire de cavéoles est appelé potocytose (R.G. Anderson et al, 1992) (Figure 6).

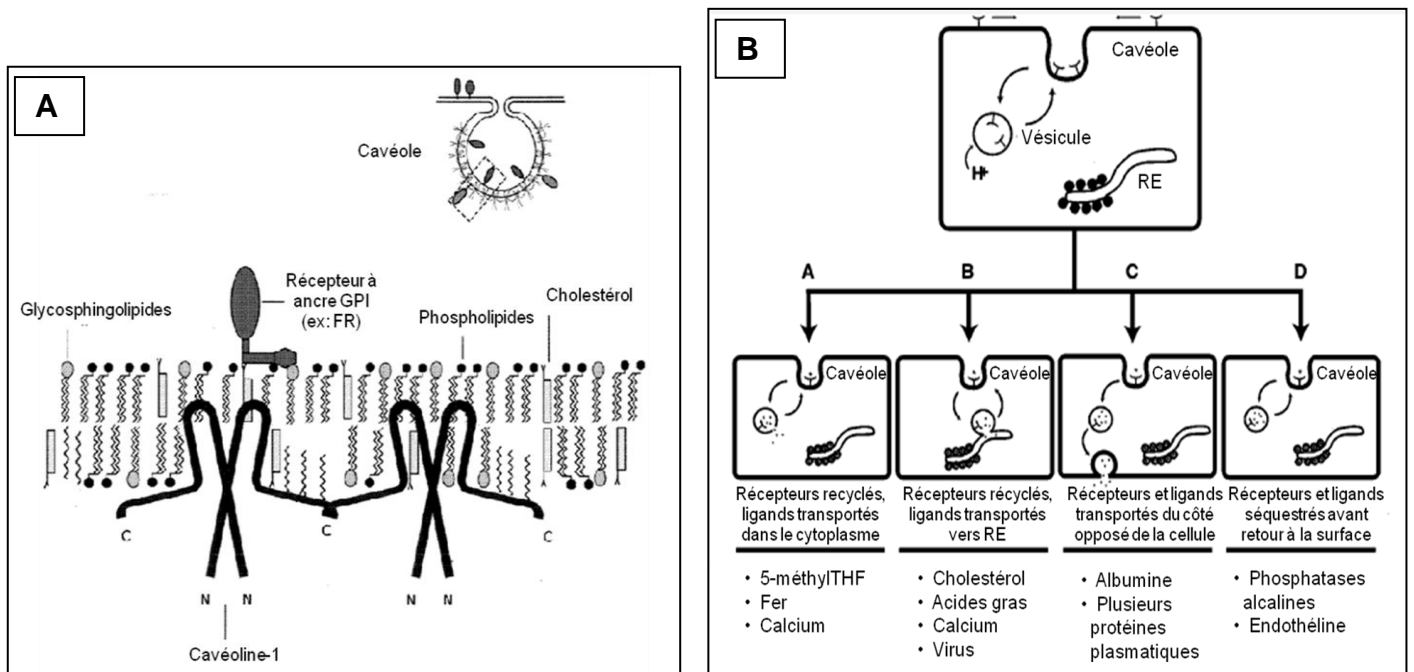


Figure 6 : Cavéole et potocytose **A** : Organisation d'une cavéole et des microdomaines associés. (modifié d'après F. Bender et al, 2002). **B** : Diverses voies impliquant le mécanisme de potocytose. Les récepteurs et les molécules internalisés par les cavéoles suivent une des quatre voies : A- le ligand est libéré dans le cytoplasme et le récepteur est recyclé à la surface de la cellule, B- le ligand est dirigé vers le réticulum endoplasmique (RE) et le récepteur est recyclé à la surface de la cellule, C- le ligand est transporté à travers la cellule et le récepteur est recyclé à la surface de la cellule, D- le ligand et le récepteur sont séquestrés à l'intérieur de la vésicule (modifié d'après R.G. Anderson, 1998).

Des cellules cultivées dans un milieu pauvre en folates, captent les folates jusqu'à ce que leur teneur intracellulaire atteigne un niveau physiologique puis le captage des folates est inhibé bien que le récepteur reste fonctionnel (B.A. Kamen et al, 1989). Les cellules KB (carcinome oral humain) cultivées dans un milieu pauvre en folates présentent une diminution des folates intracellulaires et une augmentation de l'expression de FR α . Une augmentation du taux de transcription initial et une

prolongation de la demi-vie de l'ARNm ont également été observées (*E. Sadasivan et al, 2002*). Les modèles de souris ayant des tumeurs implantées (myélome, mélanome, ovaire, poumon, colon, glande mammaire, pancréas) nourries avec un régime déficient en folates pendant 2 semaines présentent une augmentation de la densité des FRs permettant d'améliorer la captation des folates mais une diminution de l'affinité des FRs pour l'acide folique. Le tissu tumoral murin et humain est capable de réagir à la faible biodisponibilité en folates en augmentant l'expression des FRs mais ils ont une plus faible affinité pour l'acide folique ce qui suggère que l'isoforme exprimée change ou bien que les cellules tumorales sont pluripotentes et capables d'exprimer plusieurs isoformes lors d'une carence en folates. Une telle stratégie permettrait d'optimiser la capacité de la tumeur à extraire les folates circulants pour soutenir sa croissance (*L.G. Mendelsohn et al, 1996*).

La transcription de FR α peut être régulée par méthylation au niveau du promoteur, il y a alors une induction de la transcription lorsque le promoteur est hypométhylé (*C.T. Hsueh et B.J. Dolnick, 1994*). Dans un milieu pauvre en folates, une induction de la transcription de FR α , ainsi qu'une hypométhylation du gène est détectée mais si on expose les cellules à un milieu normal et qu'on ajoute des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN, il n'y a pas d'induction du gène. Cette augmentation d'ARNm dans un milieu pauvre en folates peut être liée à une augmentation de la stabilité des ARNm (*C.T. Hsueh et B.J. Dolnick, 1993*).

L'inactivation du gène *Folbp1* chez la souris (correspondant à *FOLR1* chez l'homme) est létale pour l'embryon à E10 qui présente des malformations (non fermeture du tube neural). Si une supplémentation des mères *Folbp1 +/-* est administrée avec de l'acide folique, ceci inverse le phénotype des embryons *Folbp1-/-*. Le KO du gène *Folbp2* (correspondant à *FOLR2* chez l'homme) n'est pas létal, le développement embryonnaire se déroule normalement. Ce récepteur lie les folates de manière plus faible (*J.A. Piedrahita et al, 1999*).

5.3 Le « Proton-Coupled Folate Transporter » (PCFT)

Le « Proton-Coupled Folate Transporter » (PCFT) a été mis en évidence pour la première fois par Shayeghi et al en 2005 sous le nom HCP1 (Heme Carrier Protein 1) (*M. Shayeghi et al, 2005*). Il appartient également à la superfamille des « solute

carrier » et fonctionne à pH acide (*R. Zhao et al, 2009*). Il transporte les folates avec une forte affinité pour l'acide folique. C'est une protéine membranaire et chez l'homme et la souris, elle est localisée majoritairement dans la membrane apicale des cellules intestinales de la bordure en brosse, le rein, le foie, le placenta, la rétine et le cerveau (*A. Qiu et al, 200 ; R. Zhao et al, 2009*).

6. Le stockage des folates

L'organe principal de stockage des folates est le foie qui contient environ la moitié des stocks de l'organisme (représente 10 à 15 mg) surtout sous forme de 5-méthylTHF. Environ 10 à 20% des folates absorbés (principalement N5-méthylTHF) sont captés par le foie au premier passage tandis que le reste est distribué aux autres tissus. Le foie stockerait les folates oxydés non méthylés, les réduirait et les méthylerait avant de les remettre en circulation sous forme disponible pour les tissus. Il existe un cycle entérohépatique des folates où le N5-méthylTHF libéré par le foie par voie biliaire est réabsorbé dans l'intestin grêle. Ce cycle entérohépatique permettrait de redistribuer les folates aux tissus. Les réserves en folates ne permettent de subvenir aux besoins de l'organisme que pendant quelques mois.

7. Le rôle des folates

7.1 La synthèse des acides aminés

La conversion de l'histidine en acide glutamique passe par un intermédiaire métabolique, l'acide formimino glutamique (FIGLU). Cette réaction s'effectue dans le cytoplasme et nécessite le THF qui sera lui-même transformé en N5,10-méthénylTHF.

7.2 La synthèse des acides nucléiques

- Synthèse des bases pyrimidiques

La synthèse de la thymine, base pyrimidique indispensable à la synthèse d'ADN passe par la méthylation du désoxyuridilate monophosphate (dUMP) en thymidylate

(dTMP) dans le cytoplasme. Cette réaction nécessite l'action de l'enzyme thymidylate synthase et du coenzyme N5,10-méthylèneTHF (C.W. Carreras et D.V. Santi, 1995).

- Synthèse des bases puriques

Le N5,10-méthylèneTHF et N10-formylTHF forment les 2^{ème} et 8^{ème} atomes de carbone du noyau purine dans le cytoplasme.

7.3 La conversion sérine-glycine

La conversion de la sérine en glycine s'effectue dans la mitochondrie en présence de THF et aboutit à la synthèse du N5,10-méthylèneTHF. L'enzyme clé de cette réaction est la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) (R.G. Matthews et al, 1982)

7.4 Le transport d'unités monocarbonées

Ces radicaux monocarbonés existent à un état d'oxydation variable, depuis le méthane (forme la moins oxydée) jusqu'au dioxyde de carbone (forme la plus oxydée). Les résidus monocarbonés sont transportés par les folates seulement lorsque le coenzyme est à l'état réduit de THF.

7.5 La synthèse de la méthionine

Le N5-méthylTHF est le donneur de groupement méthyle qui sera transféré sur l'homocystéine par transméthylation à l'aide de la vitamine B12, cofacteur de la méthionine synthase. La réaction aboutit à la régénération du THF et à la formation de méthionine. La méthionine pourra alors être transformée en S-adénosylméthionine (SAM), donneur universel de groupements méthyle pour les réactions de méthylation dans l'organisme (ADN, protéines, lipides...) et ceci aboutit à la formation de S-adénosylhomocystéine (SAH).

8. Carence en vitamine B9

La déficience en folates est une des carences en vitamines les plus communes et constitue un problème de malnutrition. Elle est très répandue dans de nombreuses régions du monde et dans les pays économiquement défavorisés. Avant 1998, 16 à 22% de la population générale aux Etats-Unis étaient concernés par cette carence. Une supplémentation systématique des farines alimentaires en acide folique a été mise en place. Une prise alimentaire insuffisante, une malabsorption, un métabolisme anormal ou des besoins augmentés peuvent être les causes de cette déficience.

La principale cause de déficience en folates est la carence d'apport (10 % de la population mondiale). Elle résulte de la malnutrition, des régimes amaigrissants, de la cuisson prolongée des aliments et de l'inadéquation entre les apports et les besoins (accrus au cours de la grossesse et des états d'hyperactivité médullaire : anémies hémolytiques et proliférations cellulaires malignes, taux élevé du turnover cellulaire dans le cas des cancers, certaines anémies et troubles de la peau). Dans les pays industrialisés, les sujets âgés dénutris, les alcooliques et les personnes économiquement défavorisées sont concernés. Les autres causes de carence sont liées à des problèmes de malabsorption dans le cas de plusieurs pathologies digestives (gastrectomies, résections intestinales étendues, maladie de Crohn, gastrite atrophique, maladies cœliaques, sprue). La carence en folates entraîne une accumulation de métabolites. En effet, la reméthylation de l'homocystéine est freinée, elle s'accumule et provoque ainsi une hyperhomocystéinémie et une homocystinurie.

B. Les cobalamines

1. Définition

La cobalamine (Cbl) ou vitamine B12, est une vitamine hydrosoluble. Elle a été isolée pour la 1^{ère} fois en 1948 par Riches et analysée en 1958 par Hodkin. Elle doit son nom à l'atome de cobalt qu'elle contient.

2. Apports nutritionnels

L'apport alimentaire est indispensable car elle n'est pas synthétisée par l'organisme. Les sources de vitamine B12 sont le foie, la viande, les laitages, les œufs, les poissons ; elles sont donc seulement d'origine animale. Les apports nutritionnels recommandés sont de 2 µg/jour chez l'adulte et de 2,8 µg/jour chez la femme enceinte (*J.L. Guéant et al, 2004*). Le taux plasmatique est compris entre 160-800 pg/mL. Les valeurs normales doivent être supérieures à 200 pg/mL (150 pmol/L) chez un sujet sain. L'utilisation de la vitamine B12 correspond à 0,05-0,2 % du pool corporel total par jour.

3. Structure chimique

Les Cbl appartiennent à la famille des corinoïdes. Il existe différentes Cbl en fonction du ligand fixé à l'atome de cobalt qui peut être tri, bi ou monovalent (3 niveaux d'oxydation) : [Cob(I)alamine], [Cob(II)alamine], [Cob(III)alamine]. Les Cbl sont composées d'un noyau corine et un ribonucléotide reliés par un pont amino-2 propanol. Le noyau corine est formé d'un atome de Cobalt avec 4 noyaux pyrroles et un ligand anionique (X) dont la nature permettra de définir (Figure 7): CN : cyanocobalamine, OH : hydroxocobalamine, CH₃ : méthylcobalamine et 5'd Ado : 5'-désoxyadénosylcobalamine.

Les deux dernières conformations sont les formes coenzymes actives et la méthylcobalamine est la principale forme circulante. Le ribonucléotide correspond à la liaison entre un ribose et le 5,6 diméthylbenzimidazole (base azotée).

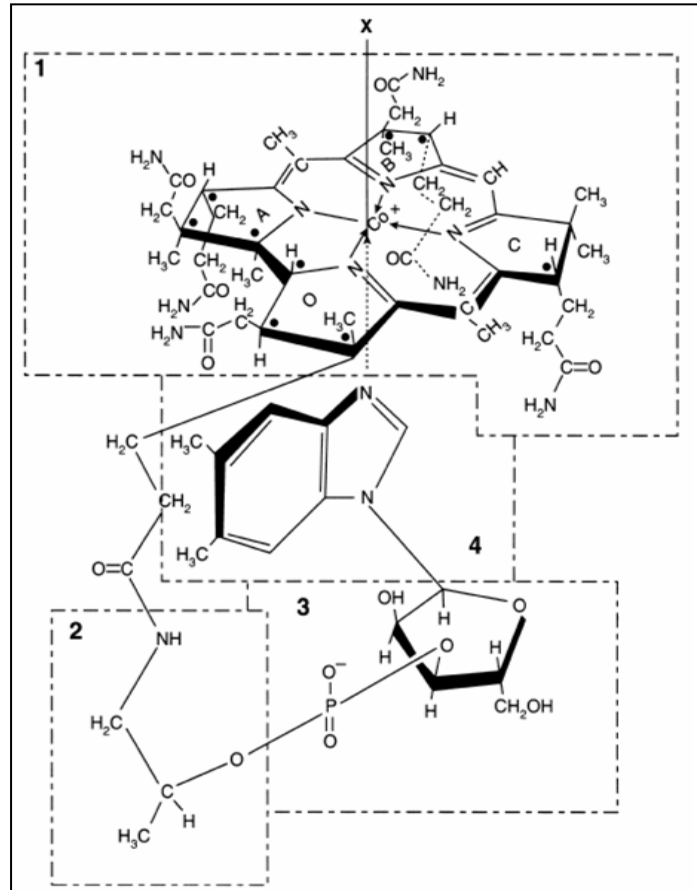


Figure 7 : Structure chimique de la vitamine B12. (X= CN pour cyanocobalamine, X= OH pour hydroxocobalamine, X= CH₃ pour méthylcobalamine, X= 5'd Ad pour 5'-désoxyadénosylcobalamine). (1) Groupe tétrapyrrole, (2) amino-1-propanol-2, (3) Groupe ribose-3'-phosphate, (4) Groupe 5,6-diméthylbenzimidazole. (modifié d'après J.L. Guéant et F. Namour, 2004).

4. Absorption des cobalamines

Au moment de l'ingestion des aliments, la majorité des Cbl sont liées à des protéines, principalement sous forme d'ado-Cbl et de méthyl-Cbl. Dans la salive, les haptocorrines (protéines R) prennent en charge les Cbl libres (10-30%) et les Cbl liées sont libérées de leur support protéique par les sécrétions chloro-hydropepsiques de l'estomac. Les Cbl se trouvent en présence de deux accepteurs digestifs: les haptocorrines et le facteur intrinsèque (FI). Elles se lient préférentiellement aux protéines R en raison du pH acide du suc gastrique et passe

de l'estomac au duodénum sous cette forme (*R.H. Allen et al, 1978*). A ce niveau, on retrouve les Cbl alimentaires mais aussi les Cbl endogènes excrétées par la bile et combinées aux protéines R biliaires. Ces protéines sont dégradées par les enzymes pancréatiques exocrines. Les Cbl sont libérées et se lient au FI, glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales de l'estomac et indispensable à l'absorption de la vitamine B12 au niveau de l'iléon (*J.S. Levine et al, 1980 ; J.S. Levine et al, 1981*). Ce transfert est conditionné par 3 facteurs : la dégradation partielle des protéines R, la résistance du FI aux protéases, et l'augmentation de l'affinité des Cbl pour le FI quand le pH passe de 2 à 8 (*R.H. Allen et al, 1978*). Le FI n'est pas dégradé par les protéases endogènes et aurait un rôle de protection des Cbl vis-à-vis de la flore intestinale au niveau du jéjunum.

Le complexe Cbl-FI est internalisé dans le compartiment lysosomal par endocytose au niveau des cellules intestinales de l'iléon distal par l'intermédiaire d'un ou de plusieurs récepteurs localisés sur la bordure en brosse des entérocytes. Le récepteur du FI est formé de la cubiline associée à la protéine amnionless formant un complexe appelé *cubam* (*R. Ahuja et al, 2008*). Le FI est dégradé et la vitamine B12 est soit métabolisée en coenzyme B12 soit majoritairement transférée sur la transcobalamine II (TCII) synthétisée par l'entérocyte. Les complexes Cbl-TCII sont transférés au pôle basal de la cellule intestinale et libérés dans la circulation sanguine (Figure 8).

5. Transport dans le sang

La TCII assure majoritairement le transport de la Cbl des entérocytes vers les cellules périphériques possédant un récepteur spécifique à leur surface. L'interaction de la TCII avec son récepteur est calcium-dépendante et l'internalisation du complexe Cbl-TCII s'effectue selon un mécanisme d'endocytose récepteur dépendant. Le récepteur de la TCII est une glycoprotéine membranaire détectable dans les tissus tels que le rein, le placenta, l'intestin et le foie chez l'homme. Elle est aussi exprimée dans le rein, l'intestin et plus faiblement dans le foie chez le rat (*S. Bose et al, 1995a ; S. Bose et al, 1995b*). La TCII peut également se lier à un autre récepteur : la mégaline ou protéine gp330 (*S.K. Moestrup et al, 1996*) (Figure 8).

6. Transport cellulaire des cobalamines

La TC II favorise la capture de la B12 par le foie et les tissus périphériques grâce à son activité perméasique, la partie protéique est dégradée dans les lysosomes et la Cbl est libérée (*P. Youngdhal-Turner et al, 1978*). Elle est ensuite transformée en coenzyme active après deux réductions successives: en méthyl-Cbl dans le cytoplasme et en Ado-Cbl dans la mitochondrie. La méthyl-Cbl est le coenzyme actif de la méthionine synthase tandis que l'Ado-Cbl est celui de la méthylmalonyl –CoA mutase, une enzyme mitochondriale (Figure 8).

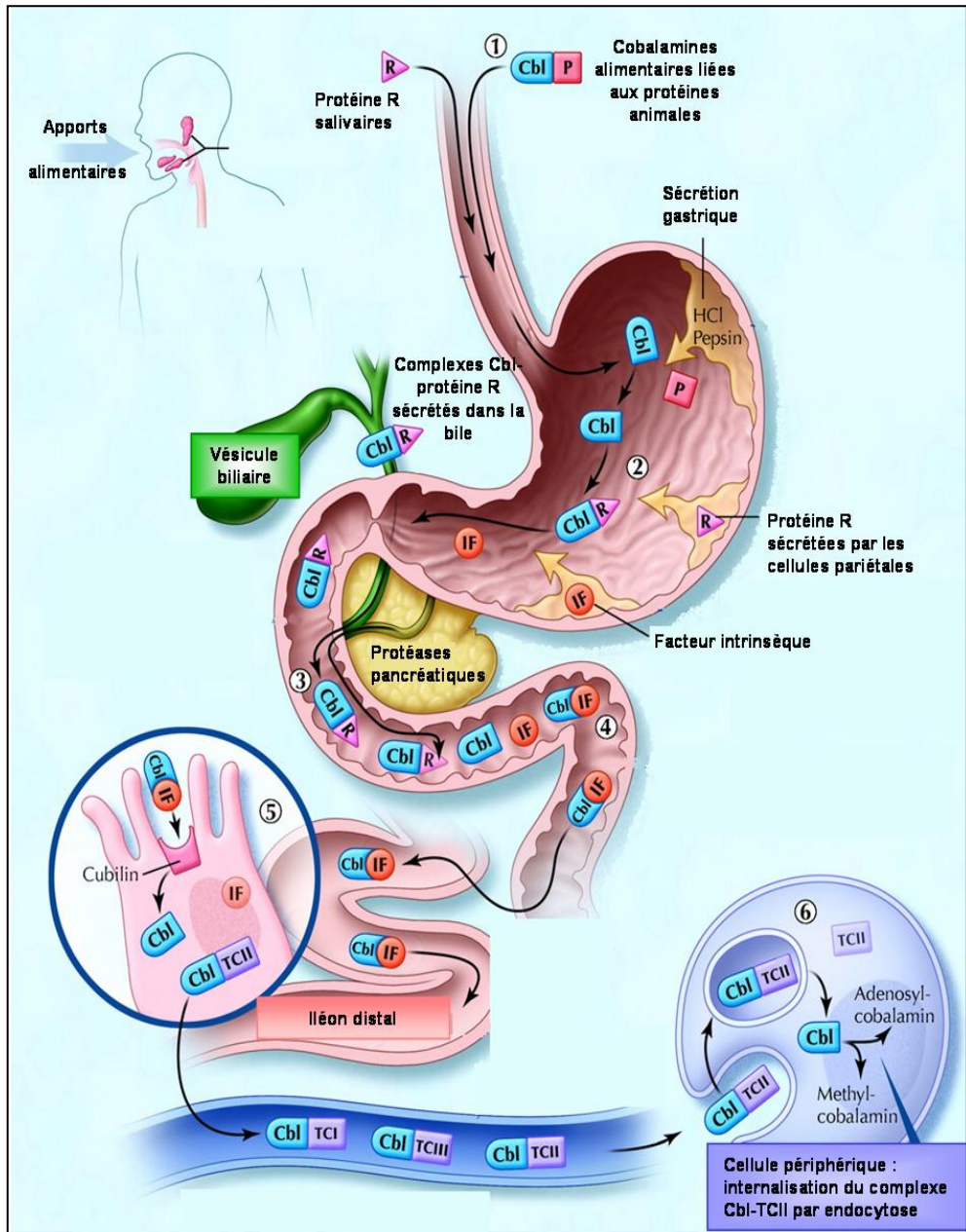


Figure 8 : Mécanisme d'absorption de la vitamine B12. (1) Les cobalamines (Cbl) alimentaires issus de l'alimentation d'origine animale se dirigent vers l'estomac sous forme liées aux protéines animales (P). (2) Sous l'action de la pepsine et de l'acide chlorhydrique (HCl) dans l'estomac, les Cbl sont libérées de leur support protéique et se lient aux protéines R (R). (3) Dans le duodénum, les Cbl alimentaires liées aux protéines R et les complexes Cbl-protéine R sécrétés dans la bile sont soumis à l'action des enzymes pancréatiques qui dégradent les protéines R et permettent la libération des Cbl. (4) Les Cbl se lient au facteur intrinsèque (IF). (5) Dans l'iléon distal, les complexes Cbl-IF se fixent à la cubiline et la cobalamine libérée se lie à la

transcobalamine II (TCII) nécessaire au transport *via* le système porte. (6) Dans les cellules périphériques, les complexes Cbl-TCII sont internalisés par endocytose et la Cbl libérée dans le compartiment lysosomal est transformée en méthylcobalamine (méthyl-Cbl) et adénosylcobalamine (Ado-Cbl), deux formes coenzymes actives (modifié d'après *E. Andrès et al, 2004*).

7. Stockage des cobalamines

Les réserves en Cbl représentent 3 à 4 mg et sont localisées essentiellement dans le foie, dans le cœur et la rate. Il existe un cycle entérohépatique qui concerne environ 1,3 µg par jour (*S. el Kholty et al, 1991*). Physiologiquement, les besoins en vitamines B12, environ 3 à 4 µg/jour, sont largement assurés car les apports quotidiens sont importants lors d'une alimentation normale. Les réserves étant de 3 à 4 mg, une carence en vitamine B12 ne se manifestera qu'après plusieurs années.

8. Le rôle des cobalamines

8.1 La conversion de l'acide méthylmalonique en acide succinique

Dans la mitochondrie, l'acide méthylmalonique, dérivé du malonate, est converti en acide succinique grâce au coenzyme Ado-Cbl et à la méthylmalonyl CoA mutase. Dans le cas d'une carence en vitamine B12, les concentrations sériques et urinaires en acide méthylmalonique sont augmentées ce qui entraîne des complications neurologiques.

8.2 La conversion combinée de l'homocystéine en méthionine et du méthylTHF en THF

Dans le cytoplasme, grâce à la méthionine synthase, le groupement méthyle du N5-méthylTHF est transféré sur la Cbl pour donner le THF. Ensuite, le groupement méthyle de la méthyl-Cbl est transféré sur l'homocystéine pour former la méthionine. Lors d'une carence en vitamine B12, le N5-méthylTHF s'accumule et le THF diminue,

ce qui provoque une réduction de la synthèse de thymidylate nécessaire à la fabrication de l'ADN.

9. Carence en vitamine B12

Dans les pays industrialisés, la prévalence est de 20% environ avec des cas extrêmes allant de 3 à 60% selon les critères utilisés. Chez les Américains, par exemple, elle est de 40% (*L.H. Allen, 2004*), chez les sujets âgés de 20 à 40% (*E. Andrès et al, 2004*) et dans les pays en voie de développement de 50% (*R. Masalha et al, 2002*). Ces valeurs sont cependant discutées par différents auteurs car les critères utilisés ne sont pas toujours les mêmes. Les carences d'apport sont plutôt rares chez l'adulte en bonne santé dans les pays industrialisés mais plus fréquentes chez les sujets végétaliens car la vitamine B12 est exclusivement apportée par l'alimentation d'origine animale. Les maladies digestives et la malabsorption peuvent être à l'origine d'une carence en vitamine B12. Les gastrectomies totales ou partielles, la pullulation bactérienne de l'intestin grêle ou syndrome de l'anse borgne, la bothriocéphalose provoquée par des parasites intestinaux, la pancréatite chronique, la maladie de Crohn, les lymphomes, la tuberculose intestinale et l'anémie de Biermer en sont des exemples. (*J.L. Guéant et F. Namour, 2004*).

L'anémie de Biermer est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction de la muqueuse gastrique par des auto-anticorps anti cellules pariétales gastriques (62% des patients) et auto-anticorps anti FI (87,5% des patients) empêchant la liaison de la vitamine B12 au FI. Au moins un des deux types d'anticorps sont présents chez 96% des patients.

Les déficits congénitaux du métabolisme de la vitamine B12 sont liés à un déficit en TCII ou en récepteurs du FI (*S.M. Tanner et al, 2004*).

C. La choline et la bétaine

1. Définition

La choline a été identifiée en 1998 comme étant un nutriment essentiel pour l'homme par l'académie nationale des Sciences aux Etats-Unis. C'est un composé hydrosoluble généralement classé dans le groupe des vitamines B (*P.M. Ueland,*

2011). Elle est également connue sous le nom de triméthylglycine mais son nom usuel de bétaine est dû à sa découverte dans la betterave à sucre (*Beta vulgaris*) par Sheibler dans les années 1860. D'autres produits naturels ont également été isolés et font parti des analogues de la bétaine. Ainsi plusieurs bétaines sont retrouvées dans l'alimentation, les plus importantes dans le métabolisme étant la glycine bétaine et la carnitine (M. Lever et S. Slow, 2010).

2. Structure chimique

La choline est un composé d'ammonium quaternaire de formule $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. La bétaine est synthétisée à partir de la choline et est également un composé d'ammonium quaternaire de formule $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$.

3. Apports alimentaires

La choline et la bétaine sont apportées par l'alimentation ou synthétisés *de novo* dans les tissus. Les sources alimentaires de choline sont les œufs, le bœuf, le porc, le foie, le soja, et les germes de blé. La bétaine est obtenue à partir de son de blé, germes de blé, épinards, betteraves à sucre, et crustacés. Les recommandations journalières sont de 425-550 mg/jour et de 100-300 mg/jour en moyenne pour la choline et la bétaine respectivement. La concentration plasmatique physiologique en choline se situe entre 10-50 μM (V. Michel et al, 2006) et la concentration intracellulaire des hépatocytes est de 50-100 nmol/g (poids humide) (S.H. Zeisel, 1981).

4. Absorption et transport

La choline est absorbée au niveau de l'intestin grêle proximal, principalement dans le jéjunum. Le transport dans l'intestin est unidirectionnel et médié par un système de transporteurs saturables. Si la concentration en choline augmente, elle passe dans l'intestin *via* un mécanisme de diffusion passive. Les transporteurs sont localisés sur la bordure en brosse des cellules de la muqueuse jéjunale, ils ne sont ni sodium, ni énergie dépendants. Une fois la choline absorbée, elle entre dans la circulation portale, de part sa solubilité. La bétaine et la triméthylamine sont les deux produits

majeurs de dégradation de la choline. Plusieurs organes sont capables d'oxyder, de phosphoryler ou d'acétyler la choline, la retirant ainsi du pool de choline libre disponible pour les tissus dans l'organisme, et formant respectivement la bétaine, la lécithine et l'acétylcholine (*S.H. Zeisel, 1981*).

Différentes familles de protéines semblent jouer un rôle dans le transport de la choline. Les plus importantes sont : la famille des transporteurs de haute affinité (CHTs) Na⁺ dépendants surtout présents dans le tissu neuronal, la famille des transporteurs de cations organiques polyspécifiques de faible affinité (OCTs) présents dans le foie, rein et intestin, et la famille des protéines de transport spécifique de la choline (CTLs) présentes dans de multiples tissus (*V. Michel et al, 2006*). Une fois dans la cellule, la choline pourra être transformée en bétaine dans la mitochondrie et en phosphatidylcholine (PC) dans le cytoplasme (*P.M. Ueland, 2011*).

5. Apports cellulaires

La synthèse de choline s'effectue grâce à la phospholipase D (PLD), à partir de la PC, un phospholipide représentant 95% du pool total de choline dans les tissus chez les mammifères. PC est elle-même synthétisée à partir de phosphatidyléthanolamine (PE) par une réaction catalysée par la phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase (PEMT) SAM dépendante. Dans le foie et le rein, la choline est oxydée en bétaine par une réaction enzymatique en deux étapes. Tout d'abord, dans la membrane interne de la mitochondrie, la choline est convertie en bétaine aldéhyde grâce à la choline oxydase mitochondriale FAD dépendante (EC 1.1.99.1) puis la bétaine aldéhyde est oxydée dans la matrice de la mitochondrie en bétaine par la bétaine aldéhyde déshydrogénase (BADH) NAD dépendante (EC 1.1.1.8) (Figure 9) (*R.K. Porter, 2000 ; P.M. Ueland, 2011*).

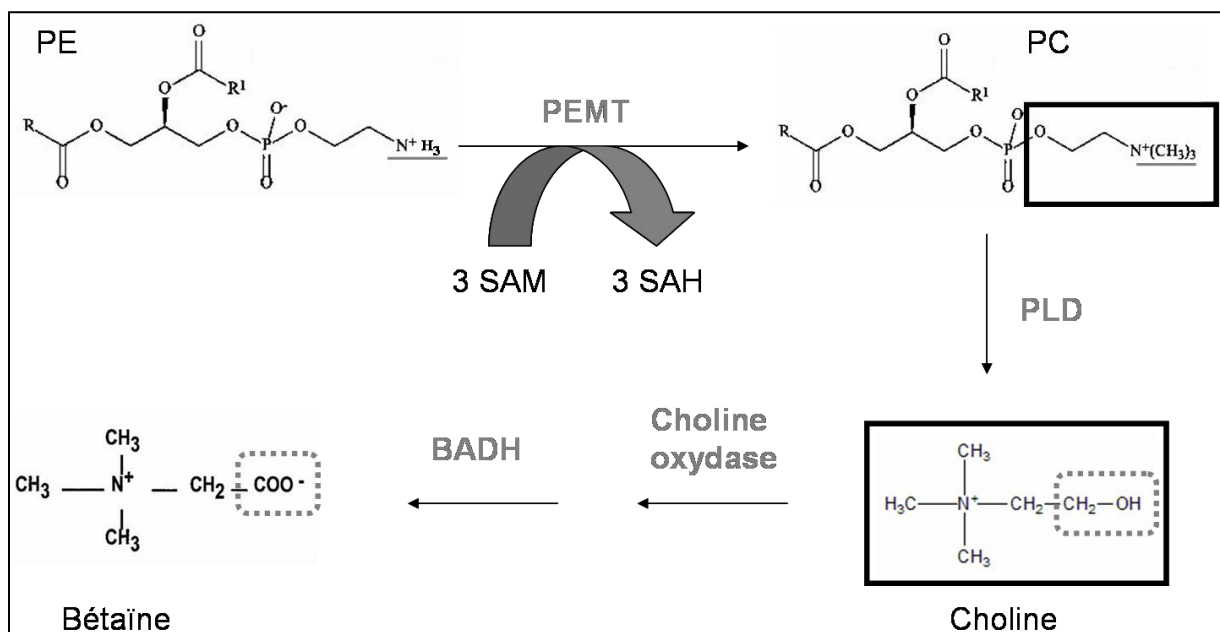


Figure 9 : Réactions de synthèse de la choline puis de la bétaine. PE : phosphatidyléthanolamine, PC: phosphatidylcholine, PEMT: Phosphatidylethanolamine N-méthyltransferase, PLD: phospholipase D, BADH : bétaine aldéhyde déshydrogénase.

6. Rôle de la choline et de la bétaine

La choline intervient dans plusieurs processus biologiques vitaux. Elle est le précurseur de la phosphatidylcholine (ou lécithine) et de la sphingomyéline, deux phospholipides qui entrent dans la composition des membranes biologiques et qui sont eux-mêmes des précurseurs de messagers intracellulaires comme le diacylglycérol et le céramide. La choline est également le précurseur de deux lipides de signalisation, le facteur d'activation plaquettaire, le sphingosylphosphorylcholine et l'acétylcholine qui est un neurotransmetteur (*J.K. Blusztain, 1998 ; M.D. Niculescu et S.H. Zeisel, 2002*). De plus, la choline peut être oxydée en bétaine dont le rôle est de servir comme osmolyte organique protégeant la cellule contre le stress osmotique, la sécheresse, la salinité et les températures élevées. Le rôle d'osmolyte signifie que la concentration cellulaire en bétaine est plus élevée que la concentration plasmatique. Un pourcentage non négligeable des groupements méthyle (jusqu'à 60%) utilisés dans la reméthylation de l'homocystéine en

méthionine pourrait provenir de la bétaine. Cette voie de méthylation alternative est catalysée par la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT) (*M. Lever et S. Slow, 2010*).

7. Carence en choline et bétaine

Lors d'une carence en choline, la concentration de bétaine est diminuée, ce qui augmente les besoins en folates pour la reméthylation de l'homocystéine. Au contraire, lors d'une déficience en folates, les groupements méthyle issus de la bétaine sont privilégiés pour la reméthylation de l'homocystéine, ce qui augmente les besoins en choline (*Y.I. Kim et al, 1994 ; G. Varela-Moreiras et al, 1992*). Une consommation élevée en choline et bétaine est corrélée à une faible concentration plasmatique en homocystéine. La relation inverse est d'autant plus prononcée chez les individus ayant une consommation en folates faible, ce qui prouve que la choline, la bétaine et les folates sont des sources interchangeable d'unités monocarbonnées (*P.I. Holm et al, 2007 ; P.M. Ueland, 2011*).

Une carence en choline provoque d'autre part, une accumulation d'acides gras dans le foie ainsi que des lésions du foie et des muscles (*A.L. Buchman et al, 1995 ; S.H. Zeisel et al, 1991 ; L.M. Fischer et al, 2007*). Chez le rat, un régime déficient en choline induit rapidement une stéatose hépatique, une réduction de la concentration en PC (*D.E. Vance et al, 2007*). Ces observations montrent l'importance de PEMT pour fournir un taux normal de PC dans des conditions de déficience alimentaire en choline. La consommation chronique d'alcool provoque une hyperhomocystéinémie et une stéatose hépatique. La bétaine, à la faveur de la voie alternative de reméthylation restaure le ratio SAM / SAH, qui à son tour, corrige les réactions de méthylation défectueuses cellulaires catalysée par PEMT résultant en une protection contre la génération de la stéatose alcoolique (*K.K. Kharbanda et al, 2007*). Une carence alimentaire en choline a également été associée à divers cancers, notamment du sein, de la prostate et du cerveau. Une déficience en choline augmente l'incidence de cancer du foie mais augmente aussi la sensibilité aux carcinogènes chez le rat (*D.H. Copeland et W.D. Salmon, 1946 ; W.D. Salmon et D.H. Copeland, 1954 ; A.K. Ghoshal et E. Farber, 1984 ; S. Yokoyama et al, 1985*). Le mécanisme suggéré inclut un ralentissement de la régénération hépatique, une

diminution de la méthylation de l'ADN, une atteinte des mécanismes de réparation de l'ADN et une augmentation du stress oxydatif (*P.M. Ueland, 2011*).

D'autre part, pendant la grossesse, les besoins en choline et bétaine sont augmentés. En effet, la choline est transportée selon un gradient de concentration de la mère au fœtus et la concentration circulante de choline chez le fœtus et le nouveau-né est 6 à 7 fois plus élevée que chez la mère, qui devient alors carencée en choline (*Y. Ozarda Ilcol et al, 2002*). La concentration plasmatique en choline ne montre aucune relation avec l'homocystéine et tend tout de même à augmenter tout le long de la grossesse de manière à entretenir des concentrations suffisantes pour le transport actif vers le fœtus. Ainsi, la choline/bétaine sert de source d'unités monocarbonées lorsque les apports en folates et méthionine deviennent limités (*P.M. Ueland, 2011*). De plus, un apport en choline durant la grossesse réduit le risque de défauts de fermeture du tube neural, et ceci est attribué au rôle de la choline en tant que donneur de groupements méthyle (*G.M. Shaw et al, 2004*).

II. Métabolisme des monocarbonés et mécanismes épigénétiques

A. Le cycle des monocarbonés

1. L'homocystéine (HCY)

L'homocystéine (HCY) est un acide aminé soufré découvert en 1933 par Du Vigneaud et qui n'intervient pas dans la synthèse protéique. L'HCY est formée dans le compartiment intracellulaire à partir de la méthionine apportée par l'alimentation. Elle sera synthétisée par toutes les cellules de l'organisme et elle existe soit sous forme libre (30%) soit sous forme liée aux protéines (albumine et hémoglobine) (70%) (*H. Jakubowski, 2006*). L'HCY, contrairement aux autres thiols intracellulaires (glutathion et cystéine) est considérée comme un thiol toxique pour la cellule.

Le premier cycle métabolique nécessaire à son élimination est la voie de reméthylation aboutissant à la synthèse de méthionine puis de SAM, le second est la voie de transsulfuration formant la cystathionine. A l'état physiologique, ces deux voies sont autorégulées, ce qui permet de garder un taux constant d'HCY (taux cellulaire de 1 $\mu\text{mol/L}$ et taux plasmatique de 10 à 15 $\mu\text{mol/L}$). Cependant, de

nombreux facteurs peuvent être responsables d'une hyperhomocystéinémie (X. Roblin et al, 2007). Celle-ci peut se présenter sous trois formes : modérée (de 15 à 30 $\mu\text{mol/L}$), intermédiaire (de 30 à 100 $\mu\text{mol/L}$) et sévère ou majeure (> 100 $\mu\text{mol/L}$) (Tableau 1) (T. Bottiglieri, 2005).

Etiologie	Sévérité
<u>Altération de la voie de reméthylation</u> Déficit d'absorption de la vitamine B12 Déficit de la MTHFR d'origine génétique Carence alimentaire en folates ou B12	
	Sévère
	Intermédiaire à sévère
	Intermédiaire
<u>Altération de la voie de transsulfuration</u> Carence en vitamine B6 Déficit fonctionnel de la CBS	
	Modérée
<u>Pathologies</u> Insuffisance rénale Diabète, hypothyroïdie, Cancers Atrophie gastrique	
	Intermédiaire
	Modérée
	Modérée à intermédiaire
<u>Médicaments</u> (NO, méthotrexate, anti épileptiques, contraceptifs...)	Modérée à intermédiaire
<u>Style de vie</u> (tabac, alcool, café...)	Modérée

Tableau 1 : Sévérité de l'hyperhomocystéinémie selon les facteurs étiologiques (d'après T. Bottiglieri, 2005).

2. La méthionine

La méthionine est acide- α -aminé essentiel possédant une fonction thioéther (-S-CH₃). Elle est capable de transférer le groupement méthyle qui est lié à l'atome de soufre et ce transfert nécessite l'utilisation d'une grande quantité d'énergie.

Les sources de méthionine sont les légumineuses, les œufs, les poissons, l'ail, les lentilles, les viandes, les oignons, le soja, le yaourt, le parmesan et le gruyère. Un

apport alimentaire élevé de méthionine risque d'entraîner une augmentation de l'HCY si la réaction de reméthylation de l'HCY en méthionine n'est pas fonctionnelle.

3. Le cycle des monocarbones

La reméthylation de l'HCY en méthionine nécessite la présence de N5-méthylTHF provenant de la réduction du N5, N10-méthylèneTHF par la N5, N10-méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR). Le N5-méthylTHF interagit avec un complexe enzymatique, la méthionine synthase (MS) dont le cofacteur, la méthyl-Cbl (vitamine B12) prend en charge transitoirement le groupement méthyle avant qu'il ne soit transféré sur l'HCY pour former de la méthionine. Une seconde enzyme, la méthionine synthase réductase (MSR) est nécessaire pour maintenir la MS dans un état fonctionnel. Alternativement, le groupement méthyle peut être fourni par la bétaine grâce à la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT), ce qui aboutit à la formation de diméthylglycine (DMG). Contrairement à la première réaction, qui a lieu de façon ubiquitaire, l'activité de la BHMT semble être limitée aux tissus hépatique et rénal (*C.V. Delgado-Reyes et al, 2001*). Une fois produite, la méthionine entre alors dans les synthèses protéiques ou est couplée à l'adénosine fournie par l'adénosine triphosphate (ATP) grâce à la méthionine adénosyltransférase (MAT) pour former la S-adénosylméthionine (SAM). Ce composé est le principal donneur de groupements méthyles pour les réactions de transméthylation concernant aussi bien les protéines et lipides que l'ADN. De ce fait, la SAM joue un rôle central dans les phénomènes de régulation épigénétiques de l'expression des gènes. Après la cession du groupement méthyle, la SAM est transformée en S-adénosylhomocystéine (SAH), elle-même en équilibre réactionnel avec l'HCY sous l'action de la SAH-hydrolase. L'ensemble de ces réactions constitue le cycle de l'homocystéine (*B. Fowler, 2005*).

Ainsi, ce cycle est intimement lié au cycle des folates dans lequel la MTHFR occupe une position stratégique puisque son activité dépendra de l'utilisation préférentielle des folates, soit pour la synthèse des acides nucléiques, soit pour la reméthylation de l'HCY.

Parallèlement à sa reméthylation, l'HCY peut également être éliminée par transsulfuration grâce à la cystathionine-bêta-synthétase (CBS) qui la transforme en cystathionine. Celle-ci est ensuite métabolisée en cystéine par la cystathionine-

gamma-lyase. Ces deux dernières enzymes ont pour cofacteur la vitamine B6. Par analogie avec la voie de la reméthylation, un déficit enzymatique sur cette voie, un polymorphisme du gène de la CBS altérant son activité ou un déficit en vitamine B6 peuvent entraîner une hyperhomocystéinémie et les pathologies qui en découlent (*T. Forges et al, 2008*) (Figure 10).

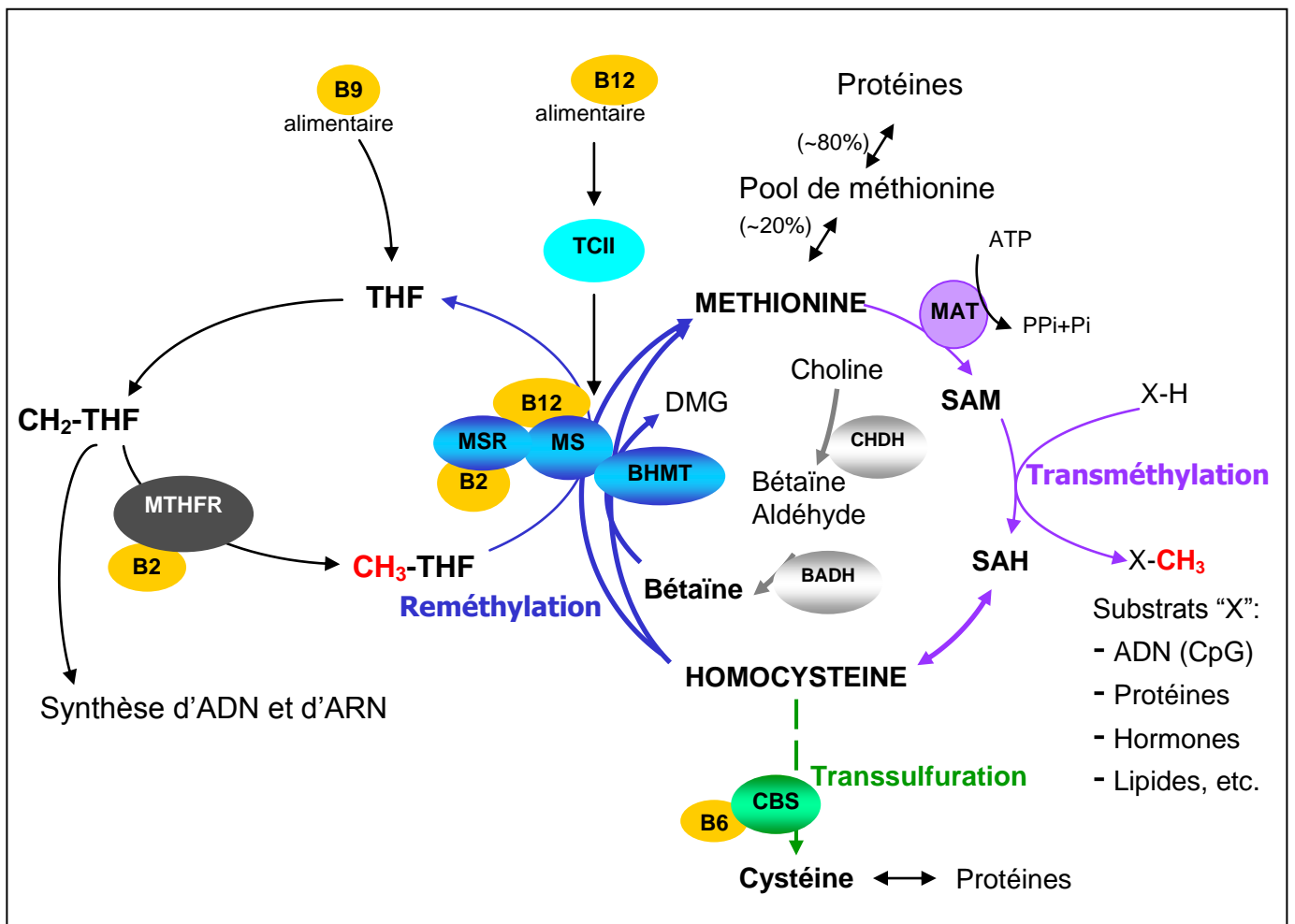


Figure 10 : Cycle du métabolisme de la méthionine et de l'homocystéine. THF : tétrahydrofolate, MTHFR : N⁵,N¹⁰-méthylèneTHF réductase, TCII : transcobalamine II, MSR : méthionine synthase réductase, MS : méthionine synthase, BHMT : bétaïne homocystéine méthyltransférase, DMG : diméthylglycine, CBS : cystathionine β synthase, CHDH : choline déshydrogénase, BADH : bétaïne aldéhyde déshydrogénase, SAM : S-adénosylméthionine, SAH : S-adénosylhomocystéine, MAT : méthionine adénosyltransférase.

4. Les enzymes du cycle des monocarbones

4.1 La méthionine synthase (MS)

La méthionine synthase (MS) est une méthyltransférase qui catalyse le transfert de groupements méthyles du N5-méthylTHF sur le groupement thiol de l'HCY pour former la méthionine. La MS humaine est une enzyme de 1265 acides aminés avec une masse moléculaire de 136 kDa exprimée de manière ubiquitaire. Les acides aminés 2 à 353 correspondent au domaine de liaison à l'HCY, 354 à 649 à la région liant le N5-méthylTHF, 650 à 896 à la région liant la Cbl et les acides aminés 897 à 1227 au domaine de liaison de la SAM (*C.W. Goulding et al, 1997*). Le zinc et la Cbl sont les deux cofacteurs de la MS. La réaction comporte deux étapes formant un mécanisme séquentiel ordonné (1) : le groupement méthyle est transféré du N5-méthylTHF à la Cob(I)alamine pour former la méthylcob(III)alamine, (2) : le groupement méthyle est transféré à l'HCY pour former la méthionine.

Cette réaction est complexe par le fait que la Cob(I)alamine peut facilement être oxydée en Cob(II)alamine qui est une forme inactive. Cependant la Cob(II)alamine peut être réduite et méthylée par la SAM en méthylcob(III)alamine grâce à la méthionine synthase réductase (MSR) (Figure 11).

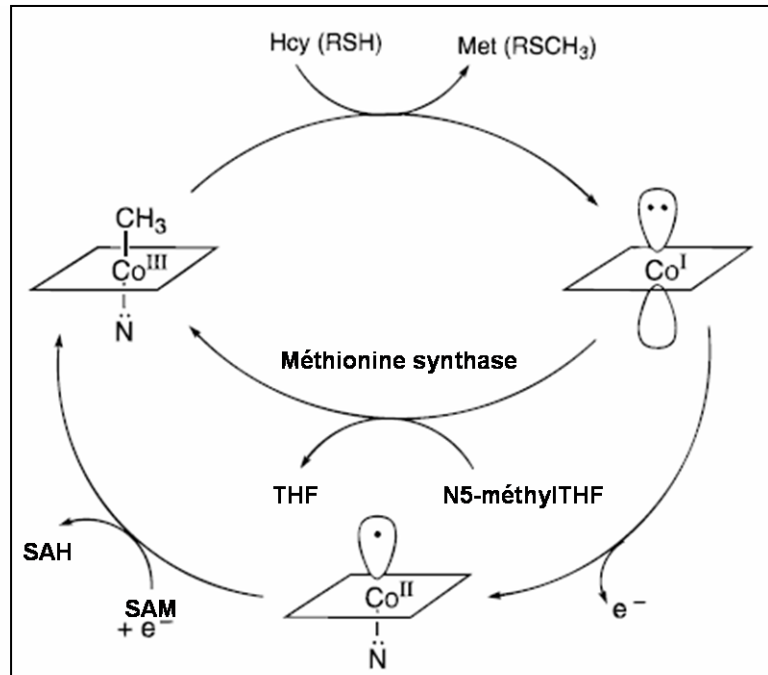


Figure 11 : Conversion combinée de l'homocystéine (HCY) en méthionine et du méthylTHF en THF par la méthionine synthase. Dans le cycle catalytique, la méthionine synthase (MS) dépendante de la cobalamine transfère le groupement méthyle de la méthyl-Cbl à l'HCY pour former la méthionine et la cob(I)alamine. La cob(I)alamine est reméthylée et le groupement méthyle provient du N5-méthylTHF pour produire le THF. Tous les 100 à 2000 cycles, la cob(I)alamine est oxydée en cob(II)alamine inactive, elle sera à nouveau activée par méthylation et la S-adénosylhomocystéine (SAM) sera le donneur du groupement méthyle. (modifié d'après *C.W. Goulding et al, 1997*).

4.2 La bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT)

La bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT) est également une méthyltransférase qui représente la voie alternative de la reméthylation de l'HCY, catalysant le transfert d'une unité méthyle de la bétaine vers l'HCY entraînant la formation de DMG et de méthionine respectivement (Figure 12).

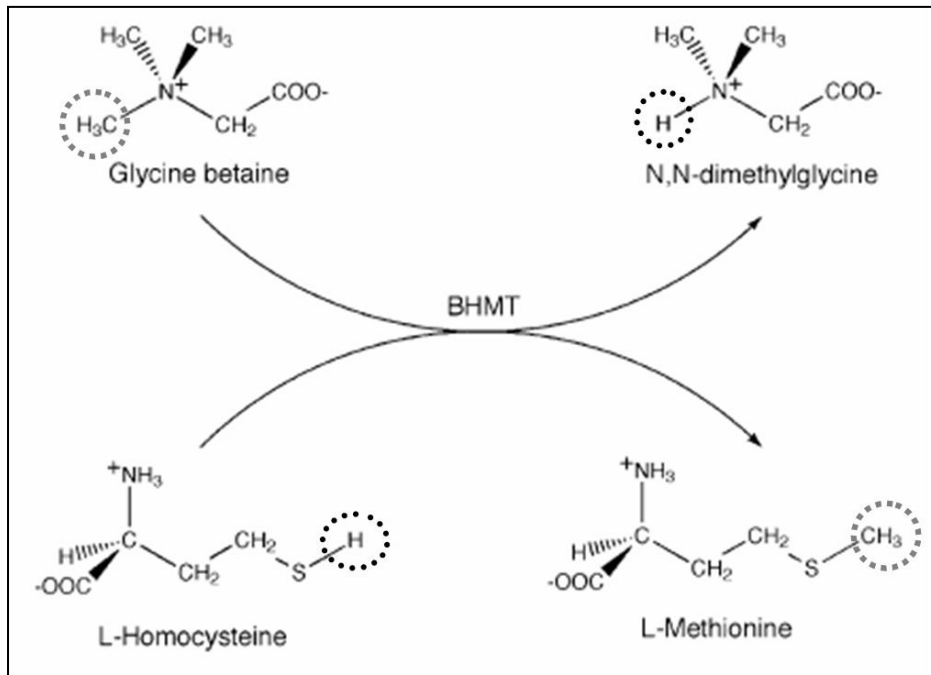


Figure 12 : Réaction catalysée par la bêtaïne homocystéine méthyltransférase (BHMT) (modifié d'après *J.C. Evans et al, 2002*).

Cette voie est limitée au foie et au rein et permet de maintenir la concentration tissulaire en méthionine à un niveau suffisant pour assurer la synthèse de SAM en cas de carence en folate. La BHMT est impliquée dans la régulation de la tonicité du foie et du rein, la bêtaïne exerçant un rôle important dans le maintien du volume cellulaire (*S.A. Craig, 2004*). La BHMT est exprimée dans foie et le rein mais elle est absente dans le cerveau, le pancréas, les muscles squelettiques, le poumon, le placenta et le cœur (*S.L. Sunden et al, 1997*) les lymphocytes et les fibroblastes (*J. Wang et al, 1991*). Elle est plus précisément localisée dans le cytosol des hépatocytes et dans le rein au niveau des 3 segments du tubule proximal et en moindre quantité dans le tubule distal et le tube collecteur chez l'homme (*C.V. Delgado-Reyes et al, 2001*) (Tableau 2).

		Homme	Singe rhésus	Porc	Mouton	Souris	Rat	Cochon d'inde
Foie		++++ (1), (2)		++++ (1), (2)	+++ (5)	++++ (3)	++++ (1), (3)	++++ (3)
Rein	Cortex	+++ (1)		+++ (1), (2)	+ (5)	+ (3)	++ (1)	+ (3)
	Médulla	++ (1)		++ (1) ; - (2)			+ (1), (3)	
Cœur		- (2)		- (2)				
Cerveau		- (2)		- (2)		- (3)	- (3)	- (3)
Poumon		- (2)		- (2)				
Cristallin		- (6)	+++ (6)					
Pancréas		- (2)		- (2)	++++ (5)			
Muscles squelettiques		- (2)				- (3)	- (3)	- (3)
Rate				- (2)		- (3)	- (3)	- (3)
Placenta		- (2)						
Lymphocytes		- (4)						
Fibroblastes		- (4)						

Tableau 2 : Comparaison de la distribution de la bêtaïne homocystéine méthyltransférase (BHMT) dans différents organes chez l'homme, le singe rhésus, le porc, le mouton, la souris, le rat et le cochon d'inde. (1): C.V. Delgado-Reyes et al, 2001. (2): S.L. Sunden et al, 1997. (3): G.A. Maw, 1959. (4): J. Wang et al, 1991. (5): G.P. Xue et A.M. Snoswell, 1986. (6): P.V. Rao et al, 1998.

a. Le gène

Chez l'homme, le gène *BHMT* possède 8 exons et 7 introns, mesure 20 kb (E.I. Park et T.A. Garrow, 1999), est situé sur le chromosome 5 en position q13.1-q15 (S.L. Sunden et al, 1997) et partage 61% d'identité avec celui de la souris en 5' (D.J. Neece et al, 2000).

L'analyse de la région génomique 5' montre la position d'une boîte TATA 26 pb avant le site d'initiation de la transcription, de quatre sites de liaison Sp-1 (stimulating

protein-1) juste avant la boîte TATA et de deux autres sites après, d'un site de liaison AP-2 (activator protéine-2), HNF-1 (Hepatic nuclear factor-1), HNF-3, C/EBP (CAAT enhancer-binding protein), des homeobox 4c, 4d et 4e, et des récepteurs aux hormones stéroïdes (Glucocorticoïdes, progestérone, œstrogène et androgène) (*E.I. Park et T.A. Garrow, 1999*). Des éléments de réponse à SAM sont localisés à -254/+1. La méthionine et l'éthionine (acide aminé n'entrant pas dans la synthèse protéique, analogue structurel de la méthionine avec un groupement éthyle à la place du groupement méthyle) n'affectent pas l'activité du promoteur de *BHMT* et n'ont aucune influence sur l'effet inhibiteur de la SAM suggérant un effet direct de la SAM sur le promoteur de *BHMT* (*C. Castro et al, 2004*). Dans les cellules HepG2, un traitement avec SAM et méthylthioadénosine (produit de dégradation de la SAM) inhibent l'expression des ARNm par activation de la voie NF-κB qui agit comme répresseur du gène *BHMT* chez l'homme. En effet, le gène *BHMT* contient plusieurs sites de liaison de NF-κB et la surexpression de NF-κB inhibe l'activité du promoteur de *BHMT* alors que le blocage de l'activation de NF-κB augmente l'expression de *BHMT* ainsi que l'activité de son promoteur. Ces traitements entraînent également un recrutement de plusieurs histones déacétylases (HDAC1 et HDAC2) qui ont un rôle de co-répresseurs au niveau du site de liaison de NF-κB. De plus, un traitement avec la cycloleucine (inhibiteur spécifique de MAT) entraîne une diminution de SAM dans la cellule et une augmentation de l'activité du promoteur de *BHMT* (*X. Ou et al, 2007*). Les transcrits de *BHMT* et de *MAT* sont diminués dans le foie des patients cirrhotiques et dans les hépatocarcinomes (*M.A. Avila et al, 2000*).

b. La protéine

La BHMT a été décrite comme étant une protéine hexamérique de 270 kDa, chaque sous-unité faisant 45 kDa (*W.E. Skiba et al, 1982*). Toutefois la forme acceptée est son agrégation en tétramère (*B. Gonzalez et al, 2002; J.C. Evans et al, 2002*). L'oligomérisation de la BHMT humaine est essentielle à sa fonction (*S.S. Szegedi et T.A. Garrow, 2004*). La protéine possède 406 acides aminés et représente 0,6-1,6% des protéines totales dans le foie dans la plupart des espèces (*T.A. Garrow, 1996*); mais dans le rein son activité est plus faible chez l'humain et le porc voire très basse chez le rat (*M.P. McKeever et al, 1991*). BHMT est une métallo enzyme Zn-dépendante (*N.S. Millian et T.A. Garrow, 1998*). L'atome de zinc est tétraédrique et

coordonne avec trois résidus cystéines et un résidu tyrosine de la BHMT (Cys 217, 299 et 300 et Tyr 160) (A.P. Breksa III et T.A. Garrow, 1999 ; B. Gonzalez et al, 2004). Les cystéines 299 et 300 donnent 2 thiolates pour la liaison du zinc qui en retour est requis pour la liaison de l'HCY à la BHMT. Le groupement thiol est converti en ion thiolate. Il s'en suit la libération d'un proton et l'activation de l'HCY par attaque nucléophile sur le groupement méthyle de la bétaine. (N.S. Millian, et T.A. Garrow, 1998).

L'activité de BHMT est influencée par la prise alimentaire de méthionine, choline et bétaine. Un régime alimentaire restreint en méthionine mais néanmoins contenant des donneurs de groupements méthyles induit l'expression de la BHMT. Chez le rat, une déficience en méthionine couplée à un excès de choline augmente de trois fois l'activité BHMT et de quatre fois le taux d'ARNm, de même, une déficience en méthionine associée à un excès de bétaine augmente de huit à dix fois l'activité BHMT et de deux fois le taux d'ARNm (E.I. Park et T.A. Garrow, 1999). Une supplémentation en méthionine entraîne une augmentation de l'expression de BHMT dans le foie et une diminution des taux de bétaine et de sérine hépatiques (J.D. Finkelstein et al, 1986). Le taux de BHMT augmente dans le foie des rats supplémentés avec de la bétaine ou choline même s'ils sont carencés en choline au préalable, montrant que la BHMT est indispensable pour le catabolisme de la bétaine et de la choline (J.D. Finkelstein et al, 1983). Chez le rat, comme décrit précédemment pour le gène, la protéine BHMT serait inhibée de manière irréversible par SAM (J.D. Finkelstein et J.J. Martin, 1984). Cependant, cette observation a été plus récemment contredite par d'autres auteurs qui ont montré que l'expression d'une protéine recombinante humaine de BHMT n'était pas inhibée par SAM (N. Bose et al, 2002) et qu'un excès de SAM n'avait aucun effet sur l'activité enzymatique de BHMT (S.S. Szegedi et al, 2008).

c. BHMT et BHMT2

Chez l'homme, le gène *BHMT2* est localisé sur le chromosome 5 en position q13.1-13.2 et résulte d'une duplication en tandem de *BHMT*. La protéine BHMT2 est formée de 363 acides aminés avec un poids moléculaire de 40,3 kDa. BHMT2 possède 82% d'homologie en acides aminés avec le gène BHMT2 chez la souris, ainsi que 87% de similarité au niveau génique (L.H. Chadwick et al, 2000). BHMT et

BHMT2 possèdent une homologie de 73%, 34 acides aminés en position C-terminale (372-406) sont manquants ce qui entraîne la perte du bras de dimérisation et transforme la BHMT2 en une protéine rapidement dégradée et/ou plus instable que la BHMT et donc difficilement détectable (*F. Li et al, 2008*).

Chez l'homme, elle est exprimée dans le foie et le rein mais aussi plus faiblement dans le cerveau, le cœur et le muscle squelettique (Northern Blot). Chez l'embryon de souris (E12.5 et E14.5) elle est retrouvée dans le cœur, le poumon, le foie, le rein, et l'œil (RT-PCR). (*L.H. Chadwick et al, 2000*). Le rôle de BHMT2 n'est pas encore clairement établi. Elle pourrait agir comme une métalloenzyme Zn-dépendante et avoir une activité homocystéine méthyltransférase. Dans ce cas, certains auteurs ont démontré que le substrat de la BHMT2 n'était pas la bêtaïne mais plutôt la S-méthylméthionine (SMM, dérivé de la méthionine) et beaucoup plus faiblement la SAM. (*S.S. Szegedi et al, 2008*). Elle pourrait, d'autre part, interagir avec BHMT et serait ainsi stabilisée en formant des hétéro-oligomères. De plus, la BHMT2 est stabilisée en présence d'HCY mais la bêtaïne n'a aucun effet (*F. Li et al, 2008*). En ce qui concerne la régulation de la protéine, la bêtaïne et la DMG, d'une part, n'ont aucun effet sur l'activité de BHMT2, ce qui confirme le fait qu'elle n'utilise pas la bêtaïne pour reméthyler l'HCY. D'autre part, contrairement à la BHMT, un excès de SAM peut réduire l'activité de reméthylation de la BHMT2 de 24%. De même, un excès de méthionine, produit des deux réactions catalysées par BHMT et BHMT2, réduit l'activité des deux enzymes de 11% et de 60 % respectivement. (*S.S. Szegedi et al, 2008*).

4.3 La méthionine adénosyltransférase (MAT)

La méthionine adénosyltransférase (MAT) catalyse la réaction transformant la méthionine en S-adénosylméthionine (SAM). Cette enzyme est produite sous trois isoformes qui ont des propriétés cinétiques différentes : MATI, MATIII codées par *MAT1A* et MATII codée par *MAT2A*. *MAT1A* est exprimée exclusivement dans le foie alors que *MAT2A* est présente de manière ubiquitaire (*E.R. Garcia-Tevijano et al, 2001*). L'expression combinée de MATI et MATIII (Km pour la méthionine jusqu'à 600 μM pour la MATI et égal à 120 μM pour la MATII) et est plus efficace que l'expression isolée de MATII (Km pour la méthionine égal à 80 μM) pour maintenir un

taux élevé de SAM. Un KO de *Mat1a* chez la souris, induit une augmentation de la méthionine, une diminution de SAM, une plus grande sensibilité à un régime déficient en choline à 3 mois, une stéatose hépatique et une augmentation de la prolifération à 8 mois. (J.M. Mato et al, 2002 ; S.C. Lu et al, 2001 ; J.M. Mato et S.C. Lu, 2007). Dans les hépatocarcinomes humains le ratio *MAT1A* : *MAT2A* et le ratio des activités MATI/III : MATII sont négativement corrélés à la prolifération cellulaire et à l'instabilité génétique, mais positivement corrélés à l'apoptose et à la méthylation de l'ADN (M. Frau et al, 2012). Des patients cirrhotiques montrent une diminution de la biosynthèse de SAM due à une diminution de l'expression de *MAT1A* et de l'activité de MAT (A.M. Duce et al, 1988) et un traitement avec la SAM augmente les chances de survie des patients quand la cirrhose est à un stade peu avancé (J.M. Mato et al, 2002). De plus l'expression de *MAT1A* est également diminuée chez les patients atteints d'hépatocarcinome (M.A. Avila et al, 2000).

5. La SAM et la SAH et les réactions de méthylation

La SAM et la SAH sont des intermédiaires métaboliques du cycle homocystéine/méthionine. SAM est le donneur universel de groupements méthyle pour les réactions de méthylation de protéines, acides nucléiques et lipides au sein de l'organisme (Figure 13).

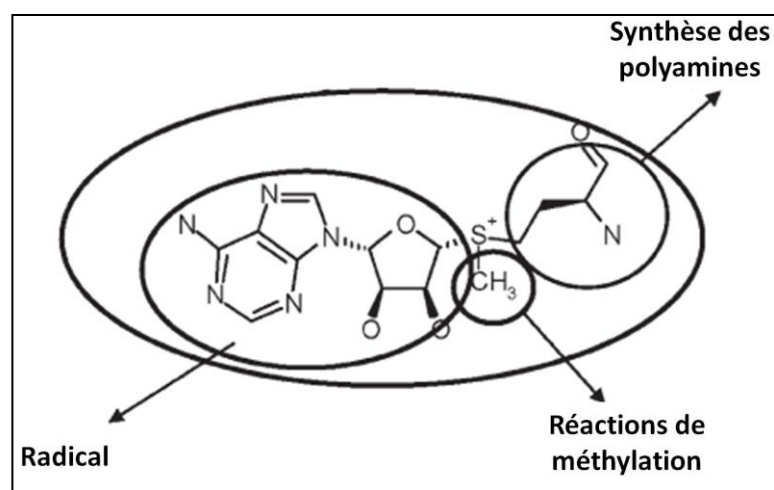


Figure 13 : Structure de la S-adénylméthionine (SAM) qui participe à de multiples réactions. Le groupement méthyle participe aux réactions de méthylation et le groupement propylamine participe aux réactions de synthèse des polyamines.

Les enzymes qui reconnaissent le « radical de la SAM », utilisent des clusters Fe_4S_4 et SAM pour générer des radicaux 5'-déoxyadénosyl (d'après *J.M. Mato et S.C. Lu, 2007*).

La synthèse et le catabolisme de la SAM s'effectuent principalement dans le foie via MATI/III et la glycine N-méthyltransférase (GNMT), principales enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation de la SAM respectivement (*J.M. Mato et S.C. Lu, 2007*).

Plusieurs études ont montré que la diminution de SAM et l'augmentation de SAH dans le foie des rats nourris avec un régime pauvre en méthionine, choline, folates, vitamine B12 induisent des méthylations anormales impliquées dans la formation de cancers (*L.A. Poirier et al, 1977 ; N. Shivapurkar et L.A. Poirier, 1983*). Le ratio SAM/SAH est un index des réactions de méthylation. Plus de 100 méthyltransférases ont été identifiées. La glycine N-méthyltransférase (GNMT) est une méthyltransférase abondante et correspond approximativement à 1% des protéines solubles hépatiques. Son rôle est de maintenir un ratio SAM/SAH constant (*J.M. Mato et S.C. Lu, 2007*) et de transférer un groupement méthyle de la SAM vers la glycine. La SAM est alors convertie en SAH et la glycine en N-méthylglycine (sarcosine, intermédiaire du métabolisme de la choline en glycine) (*C. Wagner et al, 1985*). Deux autres méthyltransférases, SAM dépendantes sont également importantes au niveau du foie. La guanidinoacétate (GAMT) méthyle le guanidinoacétate pour former la créatine et la PEMT transforme la PE en PC (*J.M. Mato et al, 2008*).

6. Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine

6.1 Balance entre voie de reméthylation et voie de transsulfuration

La disponibilité en méthionine et en SAM régule le métabolisme de l'Hcy en orientant celle-ci soit vers la voie de reméthylation soit vers la voie de transsulfuration. La synthèse *de novo* de la méthionine dépend de la ration en groupements méthyles labiles (méthionine, choline) (*S.H. Mudd et J.R. Poole, 1975 ; S.H. Mudd et al, 1980*). Si l'apport en méthionine est normal, l'Hcy est recyclée environ deux fois par la voie de reméthylation avant d'être catabolisée par la voie de

transsulfuration. Si l'apport en méthionine diminue de moitié, le nombre de cycle de reméthylation double par contre si l'apport en méthionine est plus important, la voie de transsulfuration sera plus utilisée.

Il existe deux mécanismes de régulation permettant à l'organisme d'adapter l'utilisation de l'Hcy en fonction de l'apport en méthionine: (1) : la SAM inhibe la MTHFR et active la CBS, favorisant ainsi la réaction de transsulfuration ; (2) : la concentration intracellulaire en méthionine peut réguler la concentration intracellulaire de SAM. En effet, si la concentration en méthionine augmente, la SAM augmente, la MTHFR est inhibée, la CBS est activée et la voie de transsulfuration est favorisée. Au contraire, si la teneur en méthionine est faible, la voie de reméthylation est favorisée. La voie de reméthylation est donc d'autant plus favorisée que la concentration en SAM est trop basse pour stimuler la CBS.

6.2 Balance entre réactions de transméthylation et réactions faisant intervenir la GNMT

L'inhibiteur spécifique de la GNMT est le N5-méthylTHF (*C. Wagner et al, 1985*). La synthèse du N5-méthylTHF est inhibée par la SAM et la GNMT est inhibée par le N5-méthylTHF. Ceci lie la synthèse *de novo* des dérivés méthylés *via* la formation de N5-méthylTHF à la régulation du rapport SAM/SAH et à la disponibilité alimentaire en méthionine. Si l'apport en méthionine est suffisant, la SAM est produite en quantité importante et la synthèse de N5-méthylTHF (*via* inhibition MTHFR) est inhibée. Dans ce cas, la GNMT transforme l'excès de SAM en SAH. Mais si l'apport en méthionine est faible, la SAM est produite en faible quantité et la synthèse de N5-méthylTHF n'est plus inhibée par la SAM (qui n'inhibe plus la MTHFR). Dans ce cas là, le N5-méthylTHF est utilisé pour remétyler l'Hcy en méthionine et compenser l'apport insuffisant de méthionine. La GNMT est inhibée et la SAM est déroutée vers les réactions de méthylation dans la cellule.

B. Les modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques peuvent être définies comme étant des changements héréditaires de l'expression des gènes sans changement de la séquence

nucléotidique. Elles comprennent notamment la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et l'interférence à l'ARN. D'autres mécanismes existent comme le système polycomb-trithorax et le remodelage de la chromatine (*R.A. Waterland et K.B. Michels, 2007*).

Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN génomique est compacté avec les histones sous forme de chromatine. Pour rendre la chromatine accessible et faciliter son ouverture, des modifications réversibles au niveau de l'ADN et/ou des histones sont nécessaires. Ainsi la chromatine se trouvera soit sous forme d'hétérochromatine associée à un haut degré de compaction et à une forte répression de la transcription, soit sous forme d'euchromatine correspondant à une configuration plus relâchée et accessible à la machinerie de la transcription (*C. Sawan et Z. Herceg, 2010*).

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une perturbation globale des profils épigénétiques (*I.P. Pogribny et al, 2007*).

1. La méthylation de l'ADN

1.1 Définition

La méthylation de l'ADN est le mécanisme épigénétique le mieux caractérisé et consiste en une modification post-réplivative. Elle s'effectue sur les cytosines des dinucléotides cytosine-guanine souvent présents dans les îlots CpG. Les groupements méthyles, provenant de la SAM, sont transférés sur la position N5 des cytosines par toute une famille d'ADN méthyltransférase (DNMTs) (Figure 14). Dans la plupart des espèces, 3 à 5% des cytosines sont méthylées. D'une manière générale, un taux faible de méthylation favorise l'expression des gènes tandis qu'un taux plus élevé de méthylation correspond à une mise sous silence des gènes (*R. Holliday et G.W. Grigg, 1993*).

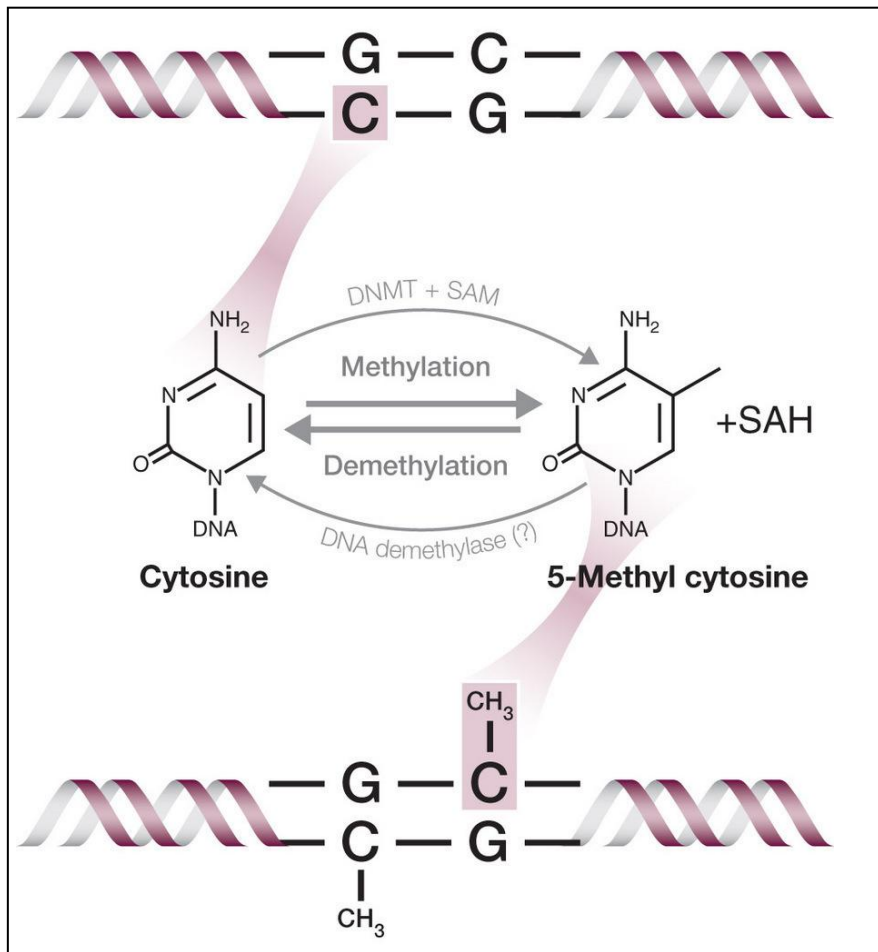


Figure 14 : Mécanisme de méthylation de l'ADN sur les résidus cytosines par les ADN méthyltransférases (DNMT) qui utilisent la S-adénosylméthionine (SAM) comme donneur de groupements méthyle. Il en résulte la formation de N5-méthylcytosine et de S-adénosylhomocystéine (SAH) (modifié d'après *O. May, DNA methylation : Fingerprints of the (epi)genome, www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2153*).

Les profils de méthylation de l'ADN varient selon les tissus et évoluent lors du développement. La régulation épigénétique opère très activement dans le fonctionnement cellulaire normal chez les mammifères, à partir de la conception jusqu'au vieillissement et la mort. La reprogrammation de la méthylation de l'ADN du zygote totipotent a lieu dans les cellules germinales et pendant la pré-implantation. Le génome des spermatozoïdes et des ovules sont hautement méthylés comparé à celui des cellules somatiques. Cependant, quelques heures après la fécondation, une déméthylation rapide du génome paternel a lieu par des mécanismes

dynamiques mais pourtant indéfinis jusqu'à aujourd'hui, en plus de l'acquisition de modifications des histones. Le génome maternel suit un procédé plus lent et plus passif. Jusqu'au stade morula, la méthylation de l'ADN reste réduite et les cellules sont pluripotentes avec tous leurs gènes potentiellement actifs. Simultanément, les cellules germinales primordiales subissent des changements des histones et une réorganisation de la chromatine. Après l'implantation, une réinitialisation se produit pour la plus grande partie du génome d'une manière spécifique et celle-ci continue à moindre mesure tout au long du reste du développement fœtal. La reméthylation à ce stade varie selon la partie concernée de l'embryon : alors que l'ectoderme et le mésoderme deviennent hyperméthylés, l'endoderme primaire et le trophoblaste restent hypométhylés. Il semble y avoir une séquence de reméthylation qui dicte la structure et la fonction de chaque tissu somatique en formation (*N.D. Greene et al, 2011*).

1.2 Méthylation de l'ADN et cancer

Les cellules néoplasiques sont caractérisées par une hypométhylation globale. La méthylation des îlots CpG régule l'expression des gènes en affectant la liaison de protéines régulatrices ou en recrutant des complexes répresseurs (*R.A. Waterland et K.B. Michels, 2007*). Les dinucléotides CG sont des « hot spots » susceptibles d'abriter des mutations. Les cytosines peuvent subir des déaminations en uraciles et les 5-méthylcytosines des déaminations en thymine, ce qui génère des mutations ponctuelles pouvant toucher des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs. Les enzymes qui méthylent l'ADN interagissent avec les enzymes qui modifient les histones : ces 2 mécanismes sont intriqués. Les modifications des histones jouent un rôle primordial dans la structure de la chromatine (*M.F. Fraga et al, 2005*). Des études de plus en plus nombreuses montrent qu'elles interviennent dans la régulation de l'expression des gènes avec (*J.A. Fahrner et al, 2002 ; C.T. Nguyen et al, 2002 ; E. Ballestar et al, 2003*) ou sans (*J.R. Dobosy et al, 2008*) variation de la méthylation des îlots CpG (*M.F. Fraga et al, 2005*).

2. Modifications des histones

2.1 Définition

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome formé d'environ 150 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones. Cet octamère est composé de deux dimères d'histones H2A-H2B et de deux dimères d'histones H3-H4. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 forment donc le « cœur » tandis que l'histone H1 ainsi que d'autres protéines « non histones » participent à un degré de condensation supplémentaire en faisant le lien entre chaque nucléosome.

Chaque histone est composée d'un domaine globulaire central et d'un domaine N-terminal de 20-30 acides aminés appelé « queue ». Seule l'histone H2A possède 37 acides aminés supplémentaires en N-terminal. Les queues des histones sont les sites des modifications post-traductionnelles réversibles pouvant relâcher ou au contraire compacter la chromatine. Ces modifications ou « marques » sont de plusieurs types : acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, ADP-ribosylation, déamination, isomérisation de proline, et propionylation (*T. Kouzarides, 2007; B. Liu et al, 2009*). Ces modifications des histones sont amplifiées par le fait que les résidus lysine peuvent être mono-, di- ou tri-méthylés et les résidus arginine mono- ou di-méthylés symétriquement ou asymétriquement. Les modifications des histones ne sont pas considérées isolément. Elles sont lues par les protéines régulatrices sous forme de combinaisons qui constituent la base du « langage ou code des histones ». Ainsi une modification donnée selon la combinaison dans laquelle elle se trouve peut donner des effets différents en aval. Une modification des histones peut être influencée par une autre modification de manière synergique ou antagoniste. Cette interaction entre histones ou « cross-talk » peut se dérouler entre résidus appartenant à la même histone ou à des histones différentes (*B.D. Strahl et C.D. Allis, 2000; C. Sawan et Z. Herceg, 2010*) (Figure 15).

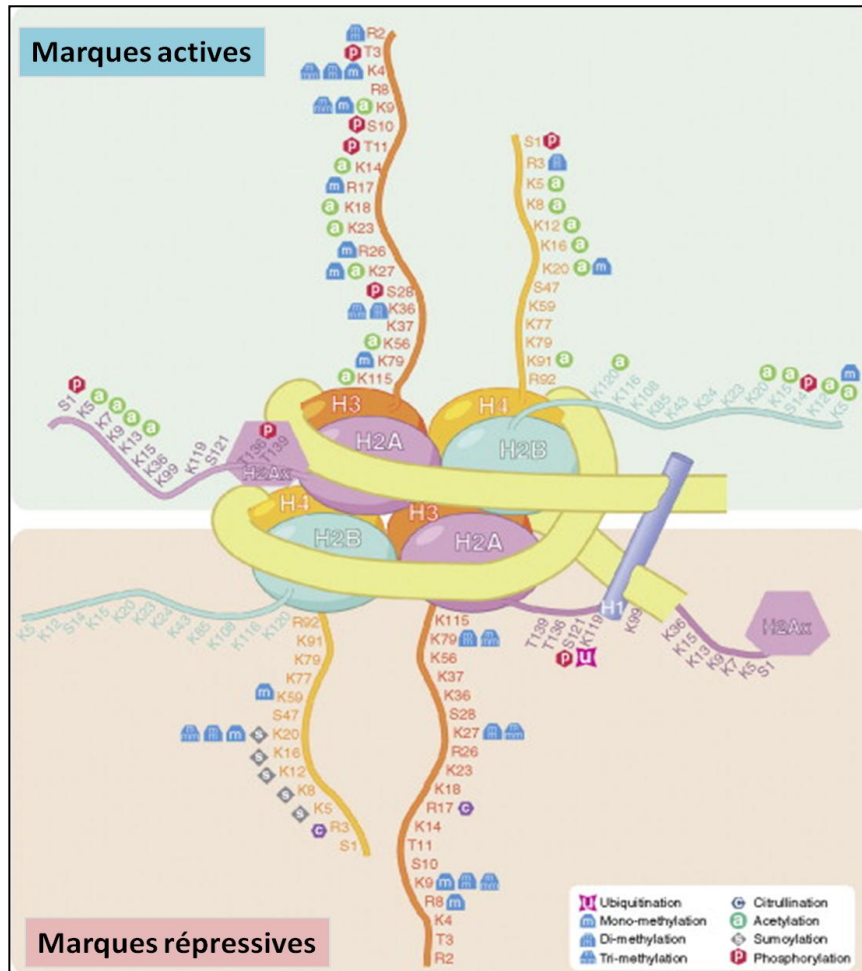


Figure 15 : Le nucléosome. L'ADN est enroulé autour d'un octamère à partir des 4 « cœurs » d'histones H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 effectue la liaison en se liant à l'ADN entre chaque nucléosome. Différents acides aminés constituant les « queues » des histones sont représentés avec leurs différentes modifications covalentes spécifiques. Les marques actives sont indiquées sur le panneau du haut et les marques répressives sur celui du bas. K : lysine, R : arginine, S : sérine, T : thréonine (modifié d'après C. Sawan et Z. Herceg, 2010).

2.2 L'acétylation des histones

Les histones sont acétylées sur les résidus lysines. La réaction est contrôlée par deux types d'enzymes : les « histones acétyltransférases » (HATs) (P. Loidl, 1994) et les « histones déacétylases » (HDACs) (S.E. Rundlett et al, 1996 ; D.R. Walkinshaw et al, 2008). Les HATs et les HDACs fonctionnent comme des complexes multiprotéiques (K.K. Lee et J.L. Workman, 2007 ; K. Ekwall, 2005) et l'équilibre

dynamique de l'acétylation des lysines *in vivo* est gouverné par leurs actions opposées. L'acétylation neutralise la charge positive portée par les résidus basiques des histones, relâchant ainsi les interactions entre histones et ADN (chargé globalement négativement) (*D.J. Steger et J.L. Workman, 1996 ; K. Luger et T.J. Richmond, 1998*). Ceci aboutit à un changement conformationnel facilitant l'accessibilité à l'ADN pour de nombreux facteurs nucléaires. Une hyperacétylation des histones est donc considérée comme une marque transcriptionnellement active de la chromatine qui se trouve alors sous forme d'euchromatine. Par contre, une déacétylation des histones résulte en une diminution de l'espace disponible entre les nucléosomes et l'ADN, ce qui conduit à une conformation fermée de la chromatine (hétérochromatine) et à une diminution de l'accessibilité pour les facteurs de transcription (*V.G. Norton et al, 1989 ; C. Sawan et Z. Herceg, 2010*).

La perte de la marque H4K16Ac serait une marque universelle de la tumorigenèse (*M.F. Fraga et al, 2005*). De plus, cette acétylation déstabilise le nucléosome et serait corrélée à une décondensation de certaines régions de la chromatine ce qui pourrait réguler l'accès des facteurs de transcription ainsi que le remodelage par les enzymes (*M. Shogren-Knaak et al, 2006*).

2.3 La méthylation des histones

Les queues des histones peuvent être méthylées sur les chaînes latérales des lysines et des arginines et les histones H3 et H4 sont les plus fréquemment méthylées.

Les « protéines arginine méthyltransférases » (PRMTs) sont les enzymes qui catalysent les réactions de méthylation des arginines en utilisant la SAM comme donneur de groupements méthyles. Elles sont de deux types : le type I catalyse les mono- et les di-méthylations asymétrique et le type II catalyse les mono- et les di-méthylations symétriques (*J.D. Gary et S. Clarke, 1998*). Plusieurs études suggèrent que la méthylation des arginines pourrait jouer un rôle important dans l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs (*S. Pal et al, 2004 ; V. Singh et al, 2004*).

Les résidus lysine peuvent être méthylés par les « histones méthyltransférases » (HMTs) lysine-spécifiques contenant un domaine SET (Su(var), enhancer of Zeste, and Thrithorax) ou par les HMTs ne contenant pas de domaine SET (*Q. Feng et al, 2002 ; H.H. Ng et al, 2002*). La méthylation des lysines provoque diverses

conséquences et selon le résidu méthylé, cette méthylation peut être soit une marque de l'euchromatine transcriptionnellement active soit une marque de l'hétérochromatine transcriptionnellement réprimée. La méthylation des histones H3K9, H4K20 et H3K27 est généralement associée à l'hétérochromatine alors que la méthylation des histones H3K4, H3K36 et H3K79 est plutôt corrélée à l'euchromatine (*R.J. Sims et al, 2003*). La méthylation des histones fut considérée comme un mécanisme irréversible jusqu'en 2004 où la première enzyme déméthylase fut découverte. La régulation de la méthylation des histones est donc maintenant considérée comme un mécanisme plus dynamique, ce qui ouvre la voie pour l'identification de nombreuses autres déméthylases (*Y. Shi et al, 2004 ; C. Sawan et Z. Herceg, 2010*).

2.4 Modifications des histones et cancer

Ces modifications épigénétiques jouent un rôle critique dans le recrutement de protéines qui régulent de nombreuses fonctions cellulaires comme la transcription, la réplication, la recombinaison ou la réparation de l'ADN. Elles sont effectuées par des enzymes qui utilisent des métabolites cellulaires (Acétyl-CoA pour l'acétylation, groupement CH₃ pour la méthylation, ATP pour la phosphorylation...). La chromatine est donc un reflet des fluctuations métaboliques cellulaires. Par conséquent, les facteurs environnementaux en particulier la nutrition, peuvent induire une dérégulation épigénétique reconnue comme un mécanisme impliqué dans la prolifération tumorale. Une altération dans une des modifications des histones peut faire pencher la balance de la régulation de l'expression des gènes conduisant à des défauts de la transcription, prolifération, apoptose, réparation de l'ADN puis en fin de compte à une transformation cellulaire et une croissance maligne. Au cours des dernières années, de nombreuses études montrent que des « patterns » épigénétiques aberrants peuvent conduire à une mise sous silence non programmée de gènes suppresseurs de tumeur ou d'autres gènes associés au cancer chez l'Homme (*A.P. Feinberg et B. Tycko, 2004 ; P.A. Jones et S.B. Baylin, 2002*). La dérégulation des modifications des histones peut également aboutir à des changements génétiques à travers une altération des processus cellulaires comme la réparation de l'ADN, la transcription des gènes et la réplication de l'ADN (*C. Sawan et al, 2008 ; C. Sawan et Z. Herceg, 2010*).

De plus, une activité aberrante de plusieurs enzymes modifiant les histones a été démontrée dans de nombreux cancers (M. Esteller, 2006) (Figure 16).

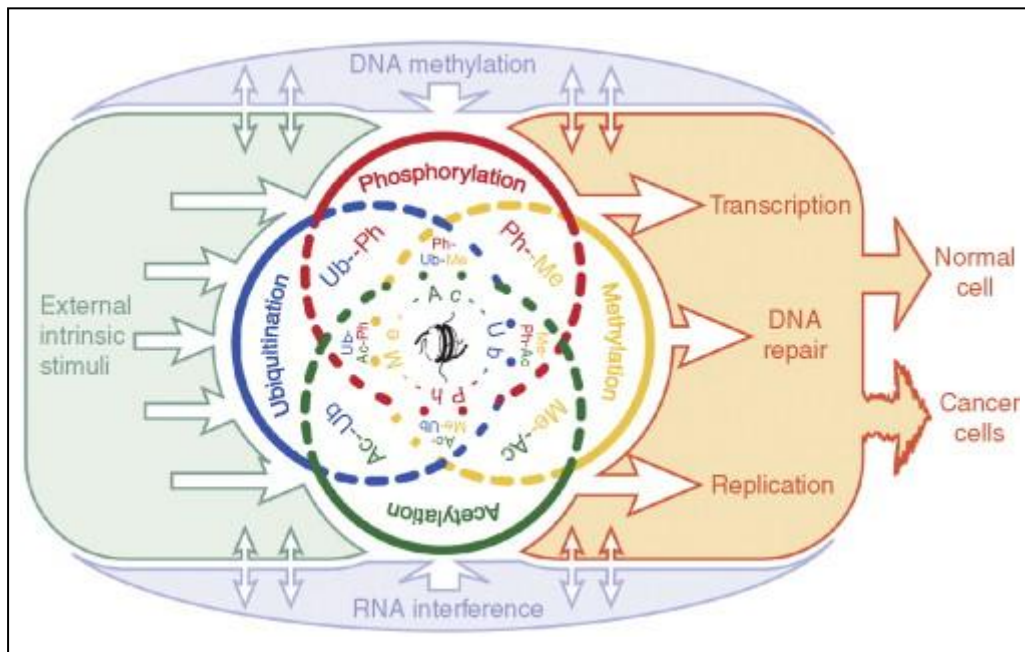


Figure 16: Influence des stimuli intrinsèques et extrinsèques sur les différentes modifications des histones : Ac (l'acétylation), Me (la méthylation), Ph (la phosphorylation), Ub (l'ubiquitination) et leur connexion entre elles ou avec d'autres mécanismes épigénétiques comme la méthylation de l'ADN et l'interférence à l'ARN. Ces modifications épigénétiques régulent étroitement les processus cellulaires basés sur l'organisation de la chromatine comme la transcription, la réparation de l'ADN, la réplication de l'ADN afin de protéger la cellule face à des stress externes et/ou internes. Une dérégulation quelconque de l'une de ces modifications ou de leur interconnexion peut conduire à une régulation anormale de ces processus cellulaires, à une transformation oncogénique puis au développement de cancer (modifié d'après C. Sawan et Z. Herceg, 2010).

3. Interactions entre modifications des histones et méthylation de l'ADN

Les modifications des histones peuvent affecter directement ou indirectement le profil de méthylation de l'ADN. Inversement, la méthylation de l'ADN influence les modifications des histones. Une hyperméthylation des îlots CpG au niveau des promoteurs de gènes déclenche la déacétylation des histones. Des protéines

possédant un domaine de liaisons aux CpGs méthylés (MBD pour « Methyl-CpG-sequence binding domain proteins ») comme MeCP2 se lient de manière sélective aux régions méthylées de l'ADN et recrutent des corépresseurs transcriptionnels et des HDACs. Au contraire, des inhibiteurs de HDAC contribuent au détachement de la protéine MeCP2 des cytosines méthylées, ce qui permet aux HATs d'acétyler à nouveau les histones favorisant ainsi la transcription des gènes. Quel est l'évènement qui se produit en premier et qui déclenche l'autre ? Cette question reste encore ouverte au débat. Le consensus actuel semble favoriser le fait que la méthylation de l'ADN soit plutôt secondaire à l'hypoacétylation des histones dans le processus d'inactivation des gènes (S.B. Baylin et al, 2001).

D'autres modifications de la chromatine comme la méthylation des histones peuvent diriger la méthylation de l'ADN et *vice versa*. La plupart des DNMTs et des protéines MBD interagissent avec des enzymes qui modifient les histones, incluant les HMTs. Les mécanismes moléculaires de la régulation de l'expression des gènes impliquent donc une coordination étroite entre DNMTs, HDACs, HMTs et d'autres protéines de remodelage de la chromatine (J.G. Moggs et al, 2004 ; S.B. Baylin et al, 2001 ; O. May, *DNA methylation : Fingerprints of the (epi)genome*, www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2153).

III. Les facteurs génétiques et environnementaux qui influencent le métabolisme des monocarbones

A. Les facteurs génétiques

Toutes lésions génétiques pouvant affecter l'expression des enzymes qui interviennent dans le métabolisme des monocarbones, peuvent induire une hyperhomocystéinémie. Le gène codant pour la *MTHFR* est le premier concerné et une soixantaine de polymorphismes ont été décrits, le plus commun étant le polymorphisme *MTHFR C677T* sur l'exon 4 dans le domaine catalytique de l'enzyme (J. Selhub., 1999 ; Y.N. Martin et al, 2006). Dans la séquence d'acides aminés, la conséquence est la modification d'une valine en alanine (P. Frosst et al, 1995). Une baisse de l'activité enzymatique de l'ordre de 30 à 40% pour les hétérozygotes et de 60-70% pour les homozygotes à été décrite (P. Frosst et al, 1995 ; I.S. Weisberg et

al, 2001 ; K.J. Sohn et al, 2004). Lorsque le taux de folates dans le sang est élevé, aucune corrélation entre ce polymorphisme et l'homocystéinémie n'est observée, par contre lorsque le taux de folates est faible, la mutation homozygote (T/T) est corrélée à une hyperhomocystéinémie (*P.F Jacques et al, 1996*). Ce polymorphisme a été décrit comme un facteur de risque des maladies cardiovasculaires, des néoplasies colorectales, des défauts de fermeture du tube neural et des complications de grossesse (*K. Meyer et al, 2004*). Un second polymorphisme important est celui qui concerne la substitution d'une adénine par une cytidine en position 1298 (*MTHFR A1298C*) sur l'exon 7 qui code pour une partie du domaine régulateur de l'enzyme. Ceci entraîne une modification d'une alanine en glutamate.

En ce qui concerne la MS, le polymorphisme *MTR A2756G* correspond à la substitution d'une adénosine par une guanosine sur l'exon 8 ce qui conduit à la modification d'un acide aspartique en glycine au niveau de la protéine. Ceci entraîne un changement dans une région de la protéine ayant un rôle dans la réduction de la vitamine B12 (*L.H. Chen et al, 1997*). L'association entre ce polymorphisme et l'hyperhomocystéinémie est encore discutée, certaines études ne montrant aucune corrélation (*X.L. Wang et al, 1999 ; P.F. Jacques et al, 2003*) contrairement à d'autres (*Z. Yates et M. Lucock, 2003 ; A. Laraqui et al, 2007*).

Dans le cas de la MSR, la substitution d'une adénosine en guanine en position 66 (*MTRR A66G*) sur l'exon 2 entraîne le changement d'une isoleucine en méthionine (*A. Wilson et al, 1999*). Cette modification touche le site de fixation de la flavine mononucléotide nécessaire à la réduction de la vitamine B12 (*A. Laraqui et al, 2007*). Ces trois derniers polymorphismes ont été associés à une hyperhomocystéinémie, à des défauts de fermeture du tube neural et des cancers colorectaux (*K. Meyer et al, 2004*). Plusieurs autres polymorphismes incluant *CBS C1080T*, *CBS C699T*, *TCII C776G*, *TCII A67G*, *RFC G80A*, et *BHMT G742A* ont également été associés au statut en folates et HCY et leur possible association avec le risque de maladies cardiovasculaires ou d'autres maladies est encore sous investigations (*K. Meyer et al, 2004*). Le polymorphisme *BHMT G742A* est associé à une augmentation du risque d'apparition de défauts de fermeture du tube neural chez l'enfant, une diminution du risque des maladies cardiovasculaires et une réduction du risque de mortalité suite à un cancer du sein (*Y.W. Teng et al, 2011*).

B. Les facteurs environnementaux

1. Les fumonisines, mycotoxines alimentaires

Les mycotoxines (du grec «mycos» : champignon et du latin «toxicum» : poison), sont des substances chimiques toxiques produites par certaines moisissures qui se développent sur certaines denrées alimentaires, en particulier sur les céréales. Il est possible d'en trouver en faible quantité dans les récoltes et en raison de leur stabilité, elles peuvent subsister dans les produits alimentaires après stockage. Elles ne représentent un risque pour la santé publique que lorsqu'elles sont consommées en grande quantité dans le cas d'infection massive des céréales suite à de mauvaises conditions de culture ou de stockage. Parmi les mycotoxines, certaines sont capables d'interférer avec le métabolisme des monocarbones : l'aflatoxine (*M.N. Viogt et al, 1981*), l'ochratoxine, le déoxinivalénol (*G. Hunder et al, 1991*), et les fumonisines.

1.1 Découverte, origine

Les fumonisines n'ont été identifiées qu'à partir des années 80, bien que leurs effets sur les chevaux aient été reconnus au moins 150 ans auparavant.

Elles sont des métabolites produits par plusieurs espèces de *Fusarium*, dont *F. verticillioides* (*F. moniliforme*). Le genre *Fusarium* appartient à l'ordre des Hyphomycètes et à la famille des Tuberculariacées (*N. Thibault et al, 1997*).

Environ 30 types de fumonisines ont été identifiés, la plus répandue et le plus toxique étant la fumonisine B1 (FB1). Ces fumonisines produites par *F. verticillioides* ont été définies comme carcinogènes du groupe B par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) (*J.P. Rheeder et al, 2002*). L'isolation des fumonisines B1 et B2 à partir de culture de *Fusarium moniliforme* a été réalisée pour la première fois en 1988 par Gelderblom et al. (*W.C. Gelderblom et al, 1988*). En 2001, les fumonisines ont été examinées par le Comité mixte FAO / OMS expert sur les additifs alimentaires, et ce corps a alloué, sur la base de la dose sans effet observé (DSE), un apport maximal tolérable provisoire (DJT) pour les fumonisines B1, B2 et B3 de 2 µg / kg de poids corporel par jour, individuellement ou combinées, et un facteur de sécurité de 100 (www.mycotoxins.org).

1.2 Source

Lorsque les fumonisines ont été identifiées, il a été considéré que leur production était confinée au maïs. Par la suite, leur présence a été notée dans une gamme de produits, qui comprennent le riz, le sorgho et les haricots blancs, mais jusqu'à présent à des concentrations beaucoup plus faibles par rapport au maïs. L'accumulation significative de FB1 dans le maïs se produit lorsque les conditions météorologiques favorisent la pourriture de la graine (www.mycotoxins.org). La contamination par FB1 dépend de plusieurs facteurs dont les conditions climatiques (température, humidité), les infestations d'insectes et les conditions de pré et post-récolte. Dans certains pays européens, les aliments à base de maïs sont contaminés par des fumonisines à une incidence globale de 62% et les fumonisines ont été détectées à des niveaux dépassant les limites légales dans 7% des échantillons analysés (S. Lo Magro et al, 2011).

Il a été montré que les fumonisines peuvent être présentes dans un certain nombre d'aliments finis, tels que la polenta, les céréales pour le petit déjeuner à base de maïs, la bière et les encas à base de céréales. Elles n'ont pas été détectées dans le lait, la viande ou les œufs. Les fumonisines sont souvent associées avec d'autres mycotoxines, pouvant inclure les aflatoxines, le déoxynivalénol et la zéaralénone. A poids égal, les fumonisines sont beaucoup moins toxiques que les aflatoxines. Toutefois, les fumonisines sont fréquemment retrouvées à de fortes concentrations (parties par million) dans le maïs; jusqu'à 300 mg / kg ont été signalés. Cela contraste avec les aflatoxines, qui sont habituellement mesurées à des concentrations en parties par milliard dans les aliments (www.mycotoxins.org).

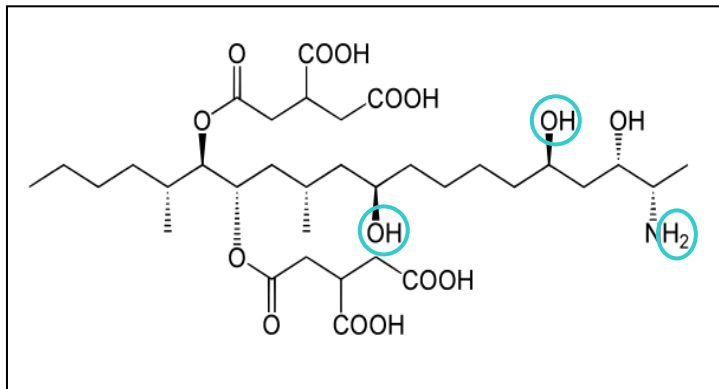
1.3 Propriétés physico-chimiques

Leur structure chimique comporte une longue chaîne hydrocarbonée hydroxylée contenant des groupes méthyle et amines. Bien que différentes mycotoxines soient produites par *F. moniliforme* (toxine T2, moniliformine, Fusarine C) seules les fumonisines seront développées ici et plus particulièrement la fumonisine B1 du fait de sa toxicité importante et de son abondance. (N. Thibault, et al, 1997).

La FB1 de formule C₃₄H₅₉NO₁₅ a une masse moléculaire relative d'environ 720 g/mol. Elle est un diester de l'acide 1,2,3 propane tricarboxylique et du 2-amino-

12,16-diméthyl-3,5,10,14,15-pentahydroxyeicosane (Figure 17 et Tableau 3) (N. Thibault, et al, 1997).

Tableau 3 : Structure des fumonisines
(d'après N. Thibault, et al, 1997)



Fumonisine	R1	R2	R3
FB1	OH	OH	H
FB2	H	OH	H
FB3	OH	H	H
FB4	H	H	H
FA1	OH	OH	CH3CO
FA2	H	OH	CH3CO

Figure 17 : Structure de la fumonisine B1 (modifié d'après N. Thibault, et al, 1997).

1.4 Absorption, distribution et élimination

Il n'y a pas de données chez l'homme concernant l'absorption et la distribution de la fumonisine mais plusieurs études ont été réalisées grâce à des modèles animaux. La fumonisine est ingérée *via* les aliments qu'ils soient d'origine végétale (céréales contaminées) ou animale (viandes contaminées). La totalité de la fumonisine est faiblement absorbée (moins de 6%) et sera rapidement éliminée principalement par excrétion biliaire chez la plupart des animaux (poule pondeuse, porc, vache, rat, souris, primates non humains). Il existe un cycle entérohépatique chez quelques espèces et l'excrétion par voie urinaire est faible (moins de 1%), la majorité étant éliminée dans les fèces dans la forme originale (*European commission (2000). "Fumonisin B1". Opinion of the scientific committee on food on Fusarium toxins.* Après administration orale chez le rat (10 mg/kg de poids corporel), l'absorption est également faible (3,5%) mais rapide (Tmax : 1,02h) (*M.R. Martinez-Larranaga et al, 1999*). La demi-vie d'élimination de la fumonisine chez le rat est de 3,15h dans le plasma ; 4,07h dans le foie et 7,07h dans le rein (*M.R. Martinez-Larranaga et al, 1999*).

Après absorption, la majorité est retenue dans le foie et le rein. Chez le rat nourri avec un régime contenant de la fumonisine pendant plusieurs semaines, la

concentration en fumonisine dans le rein est approximativement 10 fois supérieure à celle du foie (*R.T. Riley et K.A. Voss, 2006*).

1.5 Mode d'action

a. Interaction avec le métabolisme des sphingolipides

Du fait de leur grande similarité de structure, les fumonisines sont capables d'inhiber les sphingosine-sphinganine-transférases ainsi que les céramides synthases et sont de ce fait des inhibiteurs compétitifs du métabolisme et de la biosynthèse des sphingolipides (Figure 18).

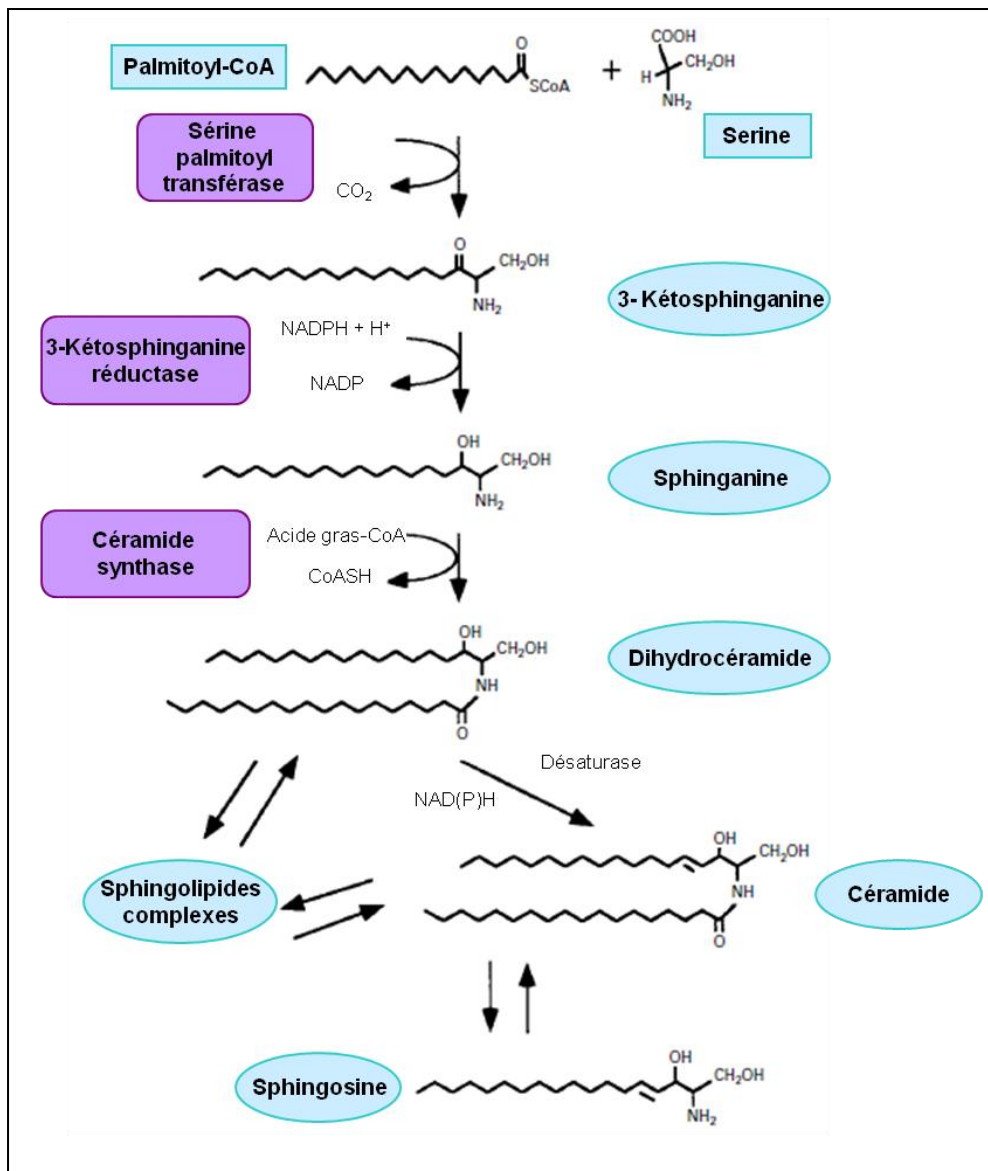


Figure 18 : Voie de biosynthèse *de novo* des sphinganine, céramides, et sphingosines nécessaires à la formation de sphingolipides complexes (modifié d'après A.H. Merrill Jr. et al, 2001).

Dans des conditions normales, la quantité de ces composés est faible, cependant un stress cellulaire peut induire la synthèse *de novo* de ces sphingolipides et ainsi perturber le comportement cellulaire.

Le stress le plus connu pouvant affecter ce métabolisme est causé par la fumonisine qui inhibe la céramide synthase responsable de l'acylation des bases sphingoïdes (sphinganine et sphingosine) (A.H. Merrill Jr. et al, 2001).

L'injection sous-cutanée d'une dose unique de FB1 (25 mg/kg) chez la souris provoque une augmentation de la concentration en bases sphingoides dans l'intestin et le foie après 4 à 8 h puis atteint à nouveau un taux normal après 24h, par contre dans le rein le niveau reste élevé jusqu'à 48h puis diminue après 96h. Ceci suggère que FB1 est plus rapidement éliminée du foie que du rein par excrétion dans l'intestin *via* la bile et que les hépatocytes et les cellules épithéliales intestinales métabolisent FB1 de manière plus efficace grâce à un turnover cellulaire plus important (E.N. Enongene et al, 2000). Chez le rat, la sphinganine est retrouvée dans les cellules mortes de l'urine collectée jusqu'à 10 jours après administration d'un régime alimentaire contenant FB1 (10 µg/g de nourriture) (E. Wang et al, 1999). L'inhibition de la céramide synthase provoque une accumulation de la sphinganine et quelquefois de la sphingosine ainsi que de leurs dérivés 1-phosphate et plus tardivement lorsque les dommages cellulaires sont suffisants, la dégradation de la membrane (Figure 19) (A.H. Merrill Jr. et al, 2001).

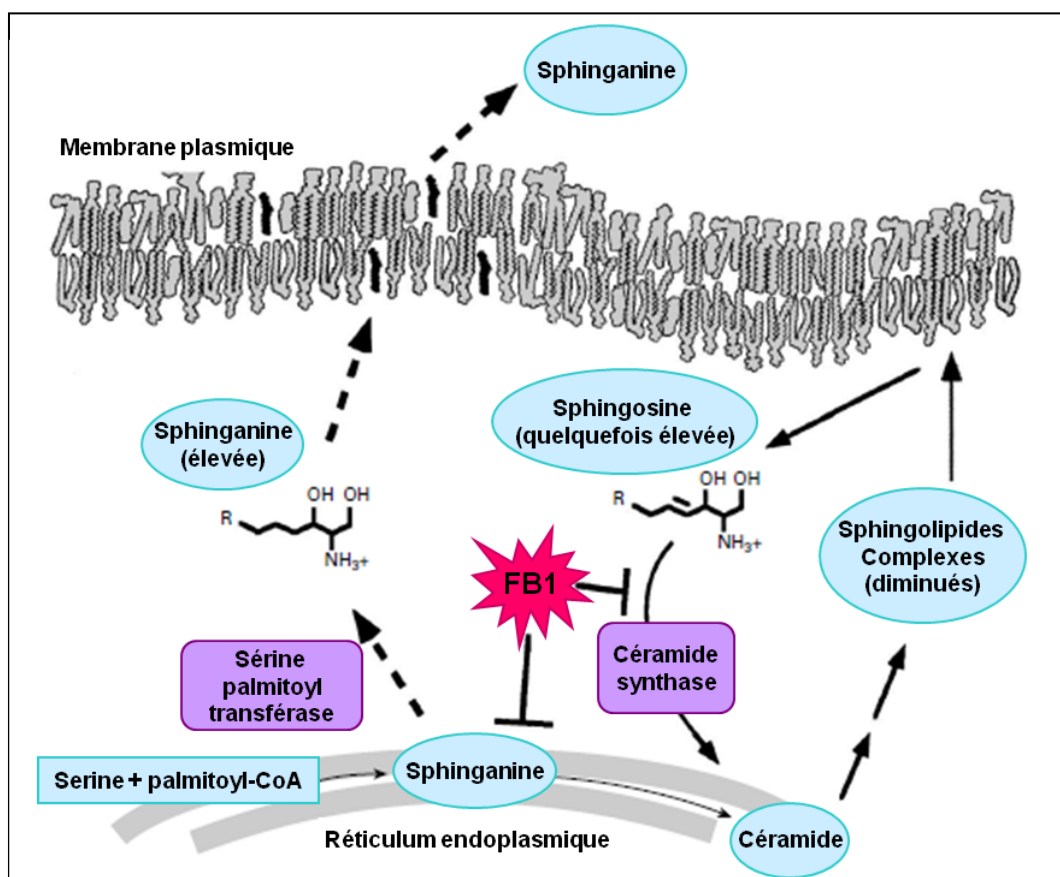


Figure 19 : Inhibition de la céramide synthase par la fumonisine B1 et les conséquences sur la synthèse des lipides complexes (modifié d'après A.H. Merrill Jr. et al, 2001).

La nature de l'inhibition de la céramide synthase par FB1 est présentée sur la figure 20 qui montre que FB1 semblerait interagir avec le site de liaison de la sphinganine et de l'acyl-CoA.

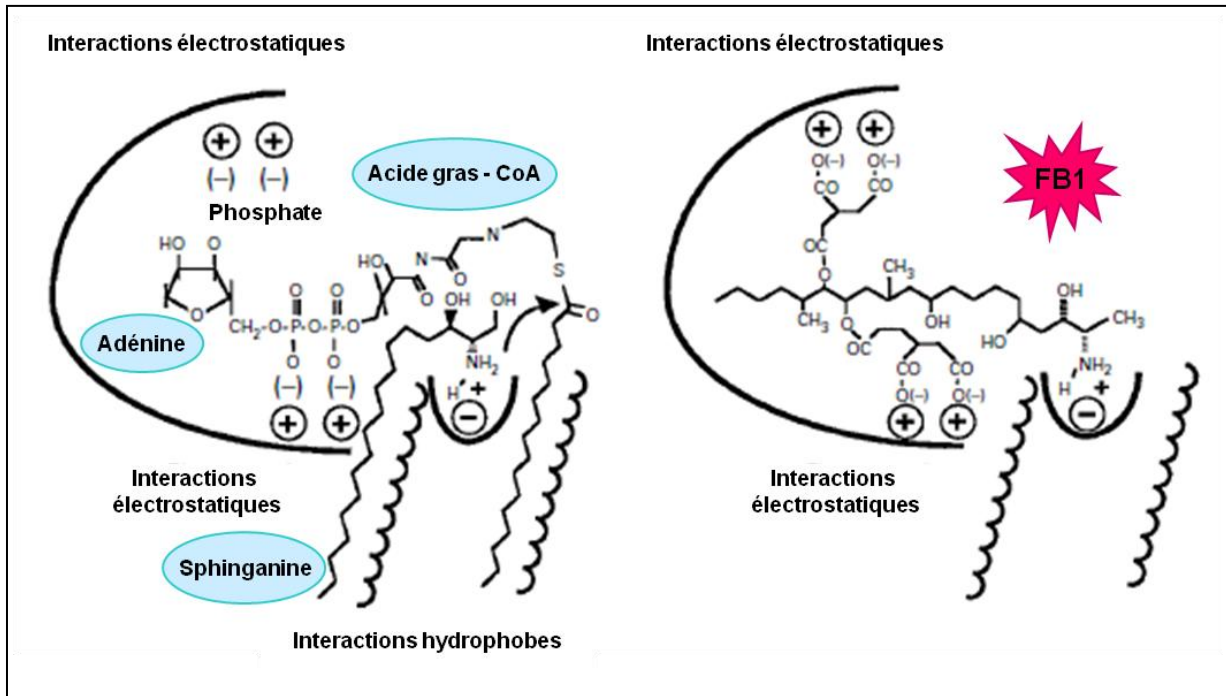


Figure 20 : Modèle d'action de la fumonisine B1 sur le site actif de la céramide synthase. FB1 mime les régions de la sphinganine et de l'acyl-CoA au niveau du site de liaison de l'enzyme (modifié d'après A.H. Merrill Jr. et al, 2001).

Ce modèle semble valider par le fait que si les chaînes d'acide tricarballylique qui interviennent en temps normal dans les interactions électrostatiques au niveau du site actif de l'enzyme sont supprimées, cela diminue la potentialité d'inhibition de la céramide synthase *in vitro* d'un facteur 10. De plus, FB1 n'est normalement pas acylée par la céramide synthase mais l'élimination des trois chaînes d'acide tricarballylique résulte en un composé, l'aminopentol AP1, qui lui, est converti en N-palmitoyl-AP1 noté PAP1. Ceci est uniquement possible si AP1 occupe le site de liaison de la base sphingoïde et laisse accessible le site de liaison de l'acyl-CoA (A.H. Merrill Jr. et al, 2001; H.U. Humpf et al, 1998).

L'inhibition de la céramide synthase par la fumonisine B1 est réversible si la toxine est diluée *in vitro* ou supprimée du régime alimentaire (A.H. Merrill Jr. et al, 2001; E. Wang et al, 1999).

b. Interaction avec le métabolisme des folates

FB1 provoque une diminution de l'incorporation cellulaire de 5-méthylTHF *via* le récepteur des folates (FR). FR étant un récepteur à ancre GPI situé dans des domaines de la membrane riches en sphingolipides et cholestérol (*W.J. Chang et al, 1992*), l'inhibition du métabolisme des sphingolipides par la FB1 altère et perturbe l'attachement du récepteur à la membrane ce qui conduit à une diminution de l'expression de la protéine (Figure 21).

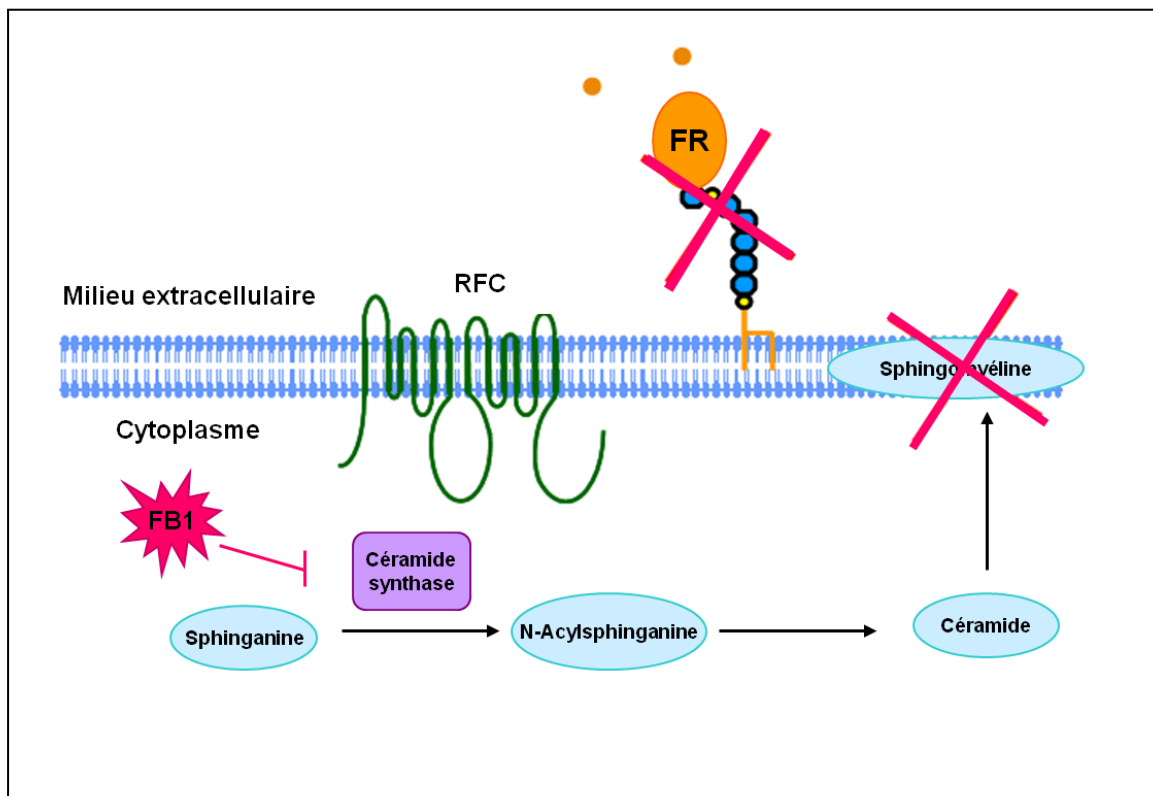


Figure 21: Conséquences de l'action de la fumonisine B1 sur l'intégrité membranaire *via* la sphingomyéline (sphingolipide complexe formé d'une céramide et d'une phosphocholine) et sur la structure de l'ancre glycoposphatidyl-inositol (GPI) du récepteur des folates (FR) (modifié d'après *W.F. Marasas et al, 2004*).

En effet, dans les cellules HepG2 en culture, l'expression de la protéine FR est diminuée en présence de FB1 dans un milieu complet tandis que l'expression du récepteur des folates réduits (hRFC) est augmentée, ce qui laisserait penser à un mécanisme de compensation. FB1 induit également l'apoptose des cellules HepG2 selon la dose et le temps d'exposition aussi bien dans un milieu complet que dans un

milieu dépourvu en folates. Le milieu pauvre en folates augmente la toxicité de la fumonisine si bien que l'apoptose est observée après 24h à 1 μ M de FB1 au lieu de 100 μ M de FB1 dans un milieu complet. En présence d'un milieu pauvre en folates seulement, l'expression de la protéine FR est également diminuée. De plus, l'expression des protéines et des transcrits des deux récepteurs est affectée en présence d'un milieu dépourvu en folates et supplémenté en FB1. Le N5-méthylTHF protège contre l'apoptose induite par FB1 et son effet est supérieur à celui de l'acide folique. Dans la cellule, le N5-méthylTHF ne nécessite aucune réduction avant d'être incorporé dans le pool actif de folates cellulaires, alors que l'acide folique doit être converti en méthyltétrahydrofolate pour devenir biologiquement actif (*A.M. Abdel Nour et al, 2007*). De même, l'effet délétère de FB1 sur FR a été mis en évidence dans les cellules Caco-2 (*V.L. Stevens and J. Tang, 1997*).

1.6 Conséquences de l'action de la fumonisine B1

Les conséquences d'une inhibition de la synthèse des sphingolipides sur la physiologie cellulaire sont multiples, variables et mettent surtout en jeu le rôle des bases sphingoïdes et des céramides. La sphingosine et les céramides interviennent comme seconds messagers dans différents processus: l'apoptose, la croissance et la différenciation cellulaire, l'inflammation, la sécrétion protéique, l'endocytose, la synthèse des autres classes de sphingolipides (*N. Thibault et al, 1997*)

a. Conséquences embryotoxiques et tératogènes

Les gangliosides (composés d'un glycosphingolipide –céramide et oligosaccharide- avec un ou plusieurs acide sialique lié à une chaîne de sucres) stabilisent l'association entre les protéines à ancre GPI et le feuillet externe de la membrane cellulaire et sont des composés importants des microdomaines membranaires, comme les «radeaux lipidiques ». Le ganglioside GM1 est fortement exprimé dans le cerveau en développement et dans la moelle épinière (*V. Silani et al, 1993*) et une diminution des gangliosides GM1a et GD1a a été reportée dans des cas d'anencéphalie chez l'homme (*M. Cacic, 1995*). Il semblerait donc que l'expression du glycosphingolipide GM1 dans des microdomaines membranaires du neuroépithélium en développement est nécessaire pour coordonner les interactions

protéines-lipides et les événements de transduction du signal impliqués dans la fermeture du tube neural et le développement de la face.

b. Conséquences cancérigènes

L'augmentation des bases sphingoïdes peut être cytotoxique, induire la mort cellulaire et inhiber la croissance cellulaire (*H.S Yoo et al, 1992; V.L. Stevens et al, 1990; E.A. Sweeney et al, 1996; S. Nakamura et al, 1996; L. Riboni et al, 1998; W.H. Tolleson et al, 1999; C. Isogai et al, 1998*) mais cela dépend du type cellulaire et de la capacité de métaboliser les bases sphingoïdes (*W.H. Tolleson et al, 1999*). En effet, ces bases sphingoïdes et leurs métabolites peuvent, au contraire, stimuler la croissance cellulaire (*S. Spiegel, 1999*).

L'induction du cancer par la fumonisine B1 dépendrait de la balance entre la concentration intracellulaire en sphingolipides effecteurs qui protègent la cellule de l'apoptose (lors de la diminution des céramides et de l'augmentation des bases sphingoïdes 1-phosphate) et la concentration en effecteurs qui induisent l'apoptose (lors de l'augmentation des céramides, des bases sphingoïdes, des acides gras, des glycosphingolipides) (*R.T. Riley et al, 2001 ; S. Spiegel, 1999 ; Y.A. Hannun et C. Luberto, 2000*).

Certaines lignées cellulaires répondent à l'inhibition de la céramide synthase en augmentant l'apoptose et en diminuant la prolifération cellulaire (*H.S Yoo et al, 1992; E.-M. Schmelz et al, 1998*), alors que d'autres lignées répondent en augmentant la prolifération (*J.J. Schroeder et al, 1994*) et d'autres encore ne montrent aucune réponse (*J.R. Ciacci-Zanella et al, 1998*). De plus, l'inhibition de la céramide synthase empêche les effets apoptotiques de certains traitements. L'altération du métabolisme des sphingolipides aura donc des effets différents selon le type cellulaire concerné et le traitement appliqué.

La balance entre les taux d'apoptose et de prolifération est un déterminant critique dans la tumorigenèse (*S.M. Cohen, 1995; T.L. Goldworthy et al, 1996*). Il existe un seuil de concentration des bases sphingoïdes au-delà duquel la croissance cellulaire est inhibée. Si les céramides sont diminués et les bases sphingoïdes 1-phosphate augmentées et si les conditions auxquelles les cellules exposées à la FB1 sont telles que l'augmentation des bases sphingoïdes (sphinganine, sphingosine) n'est pas suffisante pour inhiber la croissance cellulaire, les cellules devraient être

sélectionnées pour survivre et proliférer. Inversement, lorsque le taux important de bases sphingoïdes excède la capacité de la cellule à convertir la sphinganine/sphingosine en dihydrocéramide/céramide ou en leurs bases sphingoïdes 1-phosphate, elles s'accumulent. Dans ce cas, les cellules sensibles à l'arrêt de la croissance induit par les bases sphingoïdes, cesseront de proliférer (S. Spiegel, 1999 ; R.T. Riley et al, 2001) (Figure 22).

Si les cellules sélectionnées pour survivre ont un ADN endommagé, le risque de cancer sera alors augmenté. En suivant ce raisonnement, la fumonisine pourrait agir en augmentant la population de cellules ayant des lésions préexistantes d'ADN.

La fumonisine pourrait induire un cancer en (1) favorisant la survie des cellules ayant des lésions de l'ADN (2) stimulant directement la division cellulaire (*via* l'augmentation de bases sphingoïdes 1-phosphate), (3) augmentant la régénération en réponse aux signaux de mort cellulaire (*via* l'augmentation des bases sphingoïdes ou la diminution de sphingolipides plus complexes), ou (4) augmentant les chances de survie des cellules avec ADN lésé préexistant en les rendant insensibles aux effets apoptotiques induits par l'altération du métabolisme des sphingolipides (R.T. Riley et al, 2001).

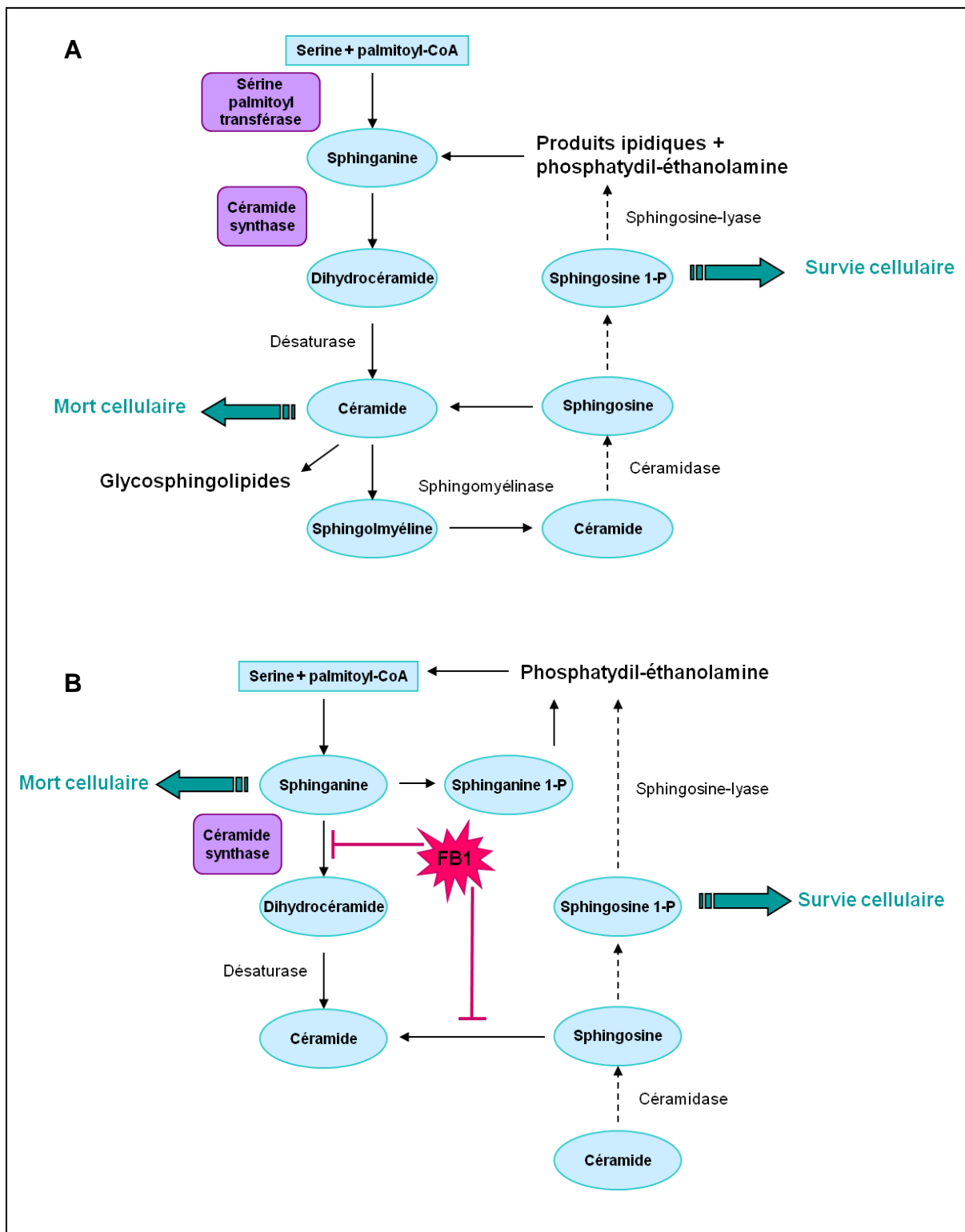


Figure 22: Voie de biosynthèse des sphingolipides, mode d'action de la fumonisine, survie et mort cellulaire **(A)** Voie de biosynthèse *de novo* des sphingolipides et le turnover dans les cellules de mammifères. Les flèches en trait plein indiquent les

étapes enzymatiques aboutissant à la biosynthèse des céramides, un effecteur de la mort cellulaire et les flèches en pointillés montrent les étapes enzymatiques conduisant à la production de sphingosine 1-phosphate, un effecteur de la survie cellulaire. **(B)** Schéma représentant le site d'action de la fumonisine B1, inhibiteur de la céramide synthase. La conséquence de cette inhibition est l'accumulation de sphinganine à un taux toxique (> 12-150 nmol/g de poids sec, normalement présente en quantité faible non toxique, < 0,5-3 nmol/g de poids sec) amenant ainsi à la mort cellulaire. Le blocage de la céramide synthase responsable de son acylation produit une augmentation de la sphinganine mais aussi quelquefois de la sphingosine et de la sphingosine 1-phosphate, effecteur de la survie cellulaire (modifié d'après *R.T. Riley et al, 2001*).

1.7 Maladies associées

Les effets des fumonisines ont en premier lieu été observés dans la leucoencéphalomalacie équine (ELEM). En 1970, cette maladie a été associée en Afrique du Sud à la contamination du maïs avec le champignon *Fusarium verticillioides* (*W.F. Marasas, 2001*). Dans la même région où sévissait l'ELEM en Afrique du Sud, *Fusarium verticillioides* a été identifié comme un facteur responsable de la forte incidence de cancer de l'œsophage chez les individus consommant régulièrement du maïs. *F.verticillioides* a ainsi été impliqué dans l'ELEM, l'hépatotoxicose, le syndrome duodénite/jéjunite proximale chez les chevaux, dans l'œdème pulmonaire et l'hépatotoxicose chez le porc, dans les retards de croissance et les atteintes hépatiques chez la volaille, dans la néphrotoxicité et l'hépatotoxicité chez les ovins ainsi que dans les arrêts cardiaques, les cirrhoses, les hépatites et les risques d'infarctus, de l'athérosclérose chez les primates (*W.F. Marasas, 2001 ; N. Thibault et al, 1997*).

Chez l'homme, la prévalence du cancer de l'œsophage peut atteindre de 50 à 200 pour 100 000 dans certaines régions du Transkei en Afrique du Sud au lieu de 5 pour 100 000 normalement (*W.F. Marasas et al, 1988*). *F. moniliforme* est également deux fois plus présent dans les régions de Chine où la prévalence de cancer de l'œsophage est importante par rapport aux autres régions (*T. Yoshizawa et al, 1994*). Le maïs constitue un aliment de base dans ces régions.

Chez le rat, une intoxication à court terme (15 mg/kg d'aliment pendant quelques jours à quelques semaines), induit une néphrotoxicité et une hépatotoxicité, ainsi qu'une baisse de la consommation, une polyurie, une perte de poids, une toxicité foétale (altération de la croissance et du développement à 60 mg/kg) (S. Lebepe-Mazur et al, 1995). Le foie est décoloré, et son poids est diminué (T. Javed, et al, 1993; K.A. Voss et al, 1990). En ce qui concerne le rein, le cortex est la région la plus atteinte avec des cellules vacuolisées, une autophagocytose et une dégénérescence cellulaire (G. Bondy et al, 1995). Au niveau cellulaire, on note une cirrhose avec hyperplasie hépatocellulaire, une prolifération des canaux biliaires (N.P. Kriek et al, 1981) ainsi que des mitochondries plus volumineuses au niveau rénal et hépatique, des agrégats membranaires dans les canalicules biliaires et dans le cytoplasme, une dilatation du réticulum endoplasmique, des lysosomes plus nombreux, des cellules épithéliales biliaires présentant des microvillosités moins nombreuses (R.T. Riley et al, 1994). Sur le plan métabolique, une augmentation significative de la concentration hépatique et rénale des bases sphingoïdes libres et une élévation du ratio sphinganine/sphingosine ont été mises en évidence (R.T. Riley et al, 1994).

Une intoxication intermédiaire à 250 mg de FB1/kg d'aliment pendant 5 semaines cause des lésions hépatiques avec nécrose et apoptose des hépatocytes, prolifération de cellules hépatiques étoilées, marques de fibrose, perturbation progressive de l'architecture et formation de nodules de régénération. Malgré le fait que l'activité mitotique continue son cours, une prolifération de cellules ovales a été notée après 2 semaines, ainsi qu'un développement de nodules puis un peu plus tard, ces cellules ovales ont été retrouvées à l'intérieur de certains de ces nodules «atypiques». Une analyse par Northern Blot montre une augmentation de l'expression de certains gènes codant l'alpha fetoprotéine, le facteur de croissance hépatique (HGF), les facteurs TGF- α et TGF- β 1, et le proto-oncogène c-myc. L'augmentation de TGF- β 1 semble être liée à l'apoptose et à la fibrose qui sont en corrélation avec les lésions hépatiques induites par la FB1. L'augmentation de c-myc quant à elle pourrait être impliquée dans l'activité promotrice cancéreuse de FB1 (E.R. Lemmer et al, 1999).

Une intoxication à plus long terme par l'administration d'aliments contaminés avec *F.moniliforme* pendant plusieurs mois provoque l'apparition d'hépatocarcinomes avec cirrhose et adénofibrose, carcinomes de l'épithélium stomacal et hyperplasie des cellules basales de l'œsophage (K. Jaskiewicz, et al, 1987; W.F. Marasas, et al,

1984; *T.M. Wilson, et al, 1985*). Après un traitement par la FB1 à 50 mg/kg d'aliments pendant 6, 12, 20 et 26 mois, 66% (10/15) des rats tués ou morts entre 18 et 26 mois présentent un hépatocarcinome avec pour certains (4/10) des métastases dans le cœur, les poumons et reins (*W.C. Gelderblom, et al, 1991*).

Les effets de la fumonisine ont aussi été testés sur des fœtus de rates gestantes à E20. Le traitement avec la fumonisine seule (150 mg/kg de nourriture) diminue significativement la prise de nourriture et le poids des mères, le poids de la portée, le nombre de fœtus vivants, le poids des fœtus, et augmente significativement le nombre de résorptions, le nombre de malformations squelettiques (30,4 % au niveau du crâne et 26.1% au niveau du sternum) et le ratio sphinganine/sphingosine hépatique chez les mères mais pas chez les fœtus. Ces effets sont réversibles par la supplémentation grâce à des extraits de semences de choux et d'ail, détoxifiants et antioxydants naturels limitant la peroxydation des lipides, qui ont donc un effet protecteur chez les rates gestantes (*M.A. Abdel-Wahhab et al, 2004*). Une administration de FB1 à 50 mg/kg de poids corporel /jour du 3^{ème} au 16^{ème} jour de gestation cause une toxicité maternelle chez la rate (perte d'appétit, amaigrissement, léthargie, mort, interruption de la gestation) et fœtale (mort tardive, diminution de poids et de taille, augmentation des hydrocéphalies et de l'apparition de malformations squelettiques). Des altérations dans les tissus rénal (néphrose tubulaire) et hépatique (altération cytoplasmique hépatocellulaire et nécrose cellulaire) ont été notées. Par contre, aucune modification du ratio sphinganine/sphingosine n'a été observée dans les tissus fœtaux (foie, reins, cerveau) contrairement aux tissus maternels, ces auteurs suggèrent alors que la FB1 ne passe pas la barrière placentaire et que la toxicité observée chez les fœtus est une simple répercussion de la toxicité observée chez les mères (*T.F. Collins et al, 1998*). Ceci est contredit dans l'étude de *J. Gelineau van Waes et al.*, qui montre que le taux de sphinganine est augmenté dans les tissus embryonnaires suggérant que la toxine peut passer la barrière placentaire (*J. Gelineau van Waes et al, 2005*). La méthode expérimentale, la dose de FB1 administrée, le mode d'administration, la durée et le moment de l'administration, l'espèce ou la souche de *Fusarium*, d'une part, les caractéristiques physiologiques, métaboliques et génétiques de l'espèce animale utilisée dans les expérimentations, d'autre part, peuvent être à l'origine de ces variations.

Chez la souris, la fumonisine B1 cause des lésions hépatiques et rénales (K.A. Vosset al, *Fund. Appl. Toxicol.* 1995). Pendant l'embryogenèse *in vivo* et *in vitro*, la fumonisine B1 diminue la formation de sphingolipides complexes dont les gangliosides, le transport des folates *via* le récepteur des folates à ancre GPI et altère le développement du tube neural et de la face (*W.F. Marasas et al, 2004 ; J. Gelineau van Waes et al, 2005*). L'administration orale chez la souris gestante, d'une dose quotidienne de 25 mg de FB1/kg d'aliment entre le 7ème et le 15ème jour de gestation provoque au 18ème jour une diminution du poids des mères, du nombre de foetus par portée, et du poids de la portée ainsi qu'une augmentation du nombre de résorptions et fait apparaître des lésions hépatiques. Les doses de 50 ou 100 mg de FB1/kg d'aliment induisent une augmentation de la mortalité maternelle. Chez la souris, un régime maternel comportant 50 mg FB1/kg provoque l'apparition de fentes palatines chez les foetus. Une dose de 20 mg FB1/kg induit des défauts de fermeture du tube neural (NTD) chez 79% des foetus à partir de 12,5 mg de FB1/kg, des déficits d'ossification sont observés chez les foetus (*S.M. Gross et al, 1994*). Une altération du métabolisme des sphingolipides, une diminution du taux de folates dans le placenta et dans le foie et rein des mères et des foetus ont été décrites ainsi qu'une diminution de l'expression du récepteur des folates (Folbp1, homologue de FR chez l'homme) dans le tube neural et le sac vitellin des embryons à E10,5. Une supplémentation maternelle en folates à 50 mg/kg de poids corporel en injection intrapéritonéale annule partiellement les effets de la FB1 sur l'apparition des NTD tandis qu'une supplémentation en ganglioside GM1 restaure la concentration en folates et accorde une protection complète contre les NTD induits par la FB1 (*J. Gelineau van Waes et al, 2005*). De plus, une exposition à long terme des embryons à E9 *in vitro* (26h) à la fumonisine B1 (1 à 100 µM) provoque des malformations (NTD: exencéphalie), un retard de croissance, une accumulation de la sphinganine au moment de la neurulation (effets visibles à raison de 10 à 25 % pour des doses comprises entre 2 et 50 µM et de 50% pour une dose de 100 µM). Une exposition à court terme (2h) à 50 µM induit également, chez les embryons, des NTD et des retards de croissance. Cependant, ces effets sont moins prononcés que lors d'une exposition de 26h à une concentration supérieure ou égale à 2 µM. Ces effets à long et à court terme sont réversibles après supplémentation en folates à 1mM. (*T.W. Sadler et al, 2002*).

2. Les autres facteurs environnementaux

La consommation chronique de nicotine, de café, et d'alcool favoriserait l'apparition d'hyperhomocystéinémie. Chez les sujets alcoolo-dépendants, une hyperhomocystéinémie a été décrite pour la première fois en 1993 (*B. Hultberg et al, 1993*). L'alcool provoque une altération du métabolisme des monocarbones *via* une réduction de l'activité de la MS et une modification de la voie de reméthylation (*A.J. Barak et H.C. Beckenhauer, 1988*). Le mécanisme d'inhibition de la MS par l'alcool n'est pas vraiment élucidé mais en 1996, Cravo et ses collaborateurs lie cette baisse d'activité à la baisse de vitamine B12 et folates qui modifierait le taux d'ARNm de la MS (*S.H. Kenyon et al, 1998*). La consommation chronique d'alcool chez le rat provoque également une baisse de l'hydroxocobalamine et de l'activité de la MS (*M.I. Waly et al, 2011*).

Certains médicaments peuvent interagir avec le métabolisme des monocarbones en provoquant des carences et une hyperhomocystéinémie. L'utilisation de phénobarbital, de contraceptifs oraux (*A.M. Shojanja et al, 1968*), d'antibiotique Bactrim®, d'anti-diabétiques (sulfamides) et de médicaments anti-folates comme le méthotrexate (inhibiteur de la dihydrofolate réductase) peut jouer un rôle (*J. Jolivet et al, 1987*).

IV. Les Pathologies en lien avec le métabolisme des monocarbones

A. Les maladies hématologiques

Les premiers symptômes d'une carence en folates ne sont pas spécifiques (fatigue, irritabilité, la perte d'appétit). Dans le cas d'une déficience sévère, une anémie mégaloblastique se développe. La biosynthèse de l'ADN et de l'ARN nécessaire à une division cellulaire et à une synthèse protéique normale est réduite et la moelle osseuse produit des globules rouges immatures et géants. De plus, les folates étant des transporteurs d'unités monocarbonees, ils sont nécessaires à la formation de l'hème de l'hémoglobine et lors d'une déficience en folates, l'organisme n'est plus capable de maintenir la formation de nouveaux globules rouges (*R. Iyer et S.K.*

Tomar, 2009). Des désordres hématologiques conduisant à des anomalies morphologiques (gigantisme) des cellules sanguines et de la moelle osseuse causées par des troubles de la synthèse de l'ADN et de la division cellulaire sont également associés à une carence en vitamine B12.

B. Les maladies neurologiques

La déficience en folates est également impliquée dans certains troubles neuropsychologiques (la dépression, schizophrénie, démence...), dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et les maladies cardiovasculaires (*R. Iyer and S.K. Tomar, 2009*). La cobalamine est nécessaire à la synthèse de la myéline (*R.M. Sesso et al 1999*), la carence affecte donc le cerveau, la moelle épinière, les nerfs optiques et les nerfs périphériques, les signes associés étant des neuropathies, des névrites, une perte de la vision et des symptômes psychiatriques (*C. Durand et al, 2003*).

C. Les maladies cardiovasculaires

Une hyperhomocystéinémie sera liée à des maladies cardiovasculaires chez l'homme et à l'athérosclérose. Ainsi, une carence en folates, en vitamine B12 ou vitamine B6 et/ou une élévation de la méthionine dans l'organisme causée par un régime alimentaire riche en protéines, induira une élévation de l'HCY et l'apparition de l'athérosclérose chez les modèles animaux (*T. Bottiglieri, 2005 ; S.R. Lentz, 2005*).

D. Complications obstétriques

La grossesse est une période où les besoins en folates sont considérablement augmentés par transfert préférentiel des folates vers l'unité foeto-placentaire et en raison d'une augmentation physiologique de l'érythropoïèse (*G.I. Henderson et al, 1995*). Si la carence en folates s'installe pendant la grossesse, elle peut induire un décollement du placenta, une prééclampsie, une naissance prématurée, un faible poids à la naissance, un retard de croissance et des anomalies du développement (non fermeture du tube neural, fentes palatines...) (*T.O. Scholl et W.G. Johnson,*

2000). Les folates en prévention avant la conception réduisent les risques d'anomalies du développement comme le *spina bifida* et l'anencéphalie (*MRC Vitamin Study Research Group, 1991*). Un taux faible en folates dans la nourriture non enrichie en acide folique en Suède augmente de 50 % le risque d'avortement spontané (*L. George et al, 2002*) et une supplémentation avec de l'acide folique avant la conception réduit la fréquence d'apparition du Syndrome de Down chez l'enfant (*G. Barkai et al, 2003*). Chez l'enfant, la carence entraîne également un retard de croissance et un retard de puberté. De plus, plusieurs études ont associé une concentration plasmatique en HCY élevée chez la mère à des fausses couches à répétition, des prééclampsies et des décollements placentaires. Dans la descendance, une hyperhomocystéinémie est positivement corrélée à l'apparition de morts *in utero*, de retards de croissance, des accouchements prématurés, des anomalies de fermeture du tube neural (*spina bifida*, anencéphalie), des anomalies de la face (fentes labiales et/ou palatines) et des stress hépatiques (*W.M. Hague, 2003*).

E. Les cancers

La cancérogenèse est un processus multiphasique et multifactoriel qui implique l'enchaînement de processus génétiques et épigénétiques. Elle se déroule en 3 étapes : initiation, promotion et progression (Figure 23) (*C.C. Harris, 1991*).

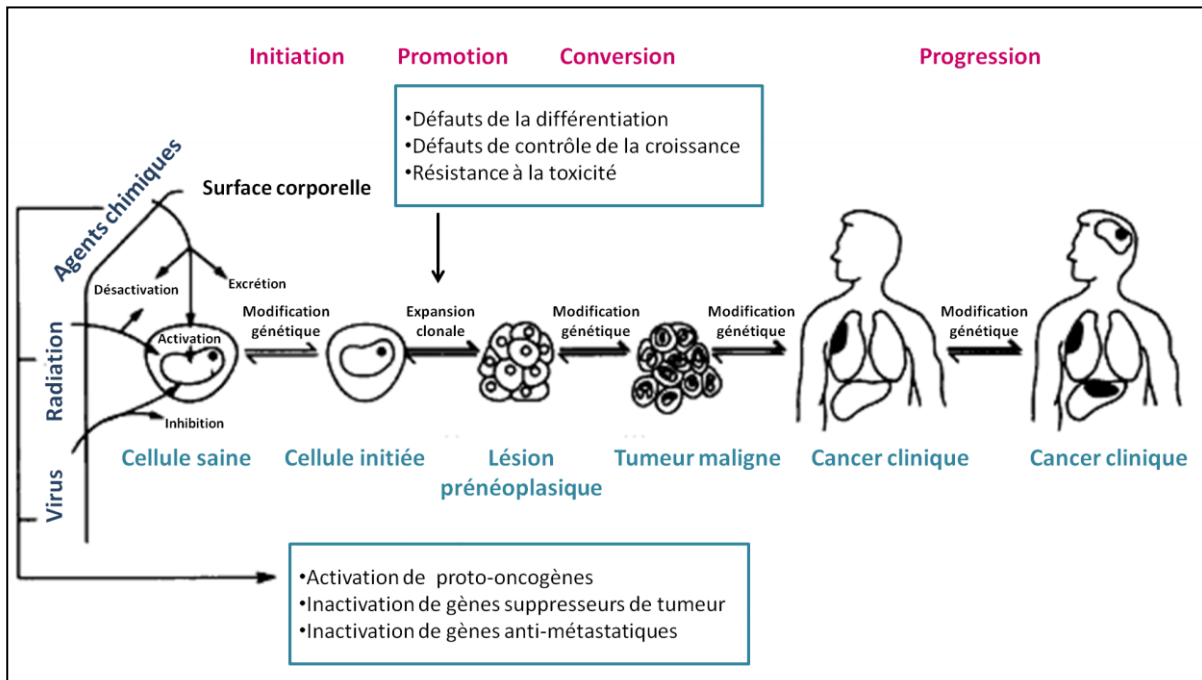


Figure 23 : Processus de cancérogenèse en plusieurs étapes. Il implique des évènements génétiques et épigénétiques au niveau de l'expression de proto-oncogènes, de gènes suppresseurs de tumeur et de gènes anti-métastatiques (modifié d'après C.C Harris, 1991).

Les cellules cancéreuses prolifèrent rapidement, leur synthèse d'ADN est accélérée, et leurs besoins en folates sont plus importants (Y.I. Kim, 1999). Le captage des folates dans les cellules cancéreuses est plus important que dans les cellules saines. Malgré des teneurs sériques ou érythrocytaires en folates normales, une déficience tissulaire localisée, limitée à la zone atteinte, a été observée dans le cas de l'adénome colorectal (Y.I. Kim et al, 1998) et la teneur en folates des cellules tumorales est inférieure à celle des cellules saines adjacentes (J. Meenan et al, 1997). La carence en folates est ainsi associée au développement de plusieurs cancers : le colon (B.A. Lashner et al 1989 ; B.A. Lashner, 1993 ; B.A. Lashner et al, 1997), le sein (S.C. Larsson et al, 2007; S.J. Lewis et al, 2006), le pancréas, l'estomac, l'œsophage (S.J. Larsson et al, 2006), le poumon (L.E. Voorrips et al, 2000) et le col de l'utérus (C.E. Butterworth et al, 1992; N. Potischman et al, 1991).

1. Le cholangiocarcinome

1.1 Définition, fréquence

Le cholangiocarcinome (CC) est une tumeur maligne se développant à partir de l'épithélium des voies biliaires et comptant pour 3% des tumeurs gastro-intestinales. Il est le deuxième cancer hépatique le plus fréquent après l'hépatocarcinome, ce qui représente 10 à 25% des cancers hépatiques primaires à travers le monde. Il apparaît rarement avant l'âge de 40 ans et les hommes sont généralement plus touchés que les femmes avec un ratio de 1 : 1,2-1,5. D'un point de vue anatomique, le CC peut avoir une localisation intra ou extra-hépatique. L'incidence du CC varie grandement en fonction de la zone géographique et des facteurs de risques. Le pronostic du CC est faible, et par conséquent, la mortalité et les taux d'incidence sont similaires (G.L. Tyson et H.B. El-Serag, 2011). Le CC se manifeste notamment par une jaunisse, des selles de couleur argile, une bilirubinurie, une perte de poids, des douleurs abdominales.

1.2 Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risques ont été mis en cause dans le CC : les infections parasitaires (par des vers plats : *Opisthorchis viverrini* et *Clonorchis sinensis*), la cholangite sclérosante primitive (atteinte inflammatoire idiopathique et fibrosante des voies biliaires), les kystes des canaux biliaires, les calculs intra-hépatiques (hépatolithiases) et les toxines dont la fumonisine B1 (E.R. Lemmer et al, 1999).

D'autres facteurs de risque possibles comprennent les maladies inflammatoires de l'intestin, les virus des hépatites B et C, la cirrhose, le diabète, l'obésité, la consommation d'alcool, le tabagisme et certains polymorphismes génétiques, dont le *MTHFR C677T* (K.H. Ko et al, 2006 ; G.L. Tyson et H.B. El-Serag, 2011).

1.3 Prévention et traitements

En prévention du CC, les selles des patients habitant les régions endémiques (Chine, Japon, Corée, Thaïlande, Laos), peuvent être analysées à la recherche des œufs de parasites pouvant coloniser les voies biliaires. L'infection parasitaire se fait par

ingestion de poissons contaminés et la réduction de la consommation de poisson cru pourrait améliorer la susceptibilité face à ce facteur de risque. L'analyse de marqueurs tumoraux (par exemple l'antigène CA 1.9, et l'antigène carcino-embryonnaire CEA, qui sont augmentés dans la majorité des cas), l'imagerie (IRM, échographie du foie et des voies biliaires, endoscopie) et les études cytologiques se complètent et sont nécessaires au diagnostic du CC. La survie des patients atteints de CC est extrêmement pauvre avec un taux de survie en moyenne de 5% dans les 5 ans. A un stade précoce (sans propagation à distance, sans invasion vasculaire, ou sans dissémination extra-hépatique), la résection chirurgicale ou la transplantation sont les seules possibilités de guérison ou de rémission, le CC étant très résistant à la chimiothérapie (C. Braconi et T. Patel, 2010).

2. L'hépatocarcinome

2.1 Définition, fréquence

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) ou hépatocarcinome, est un cancer du foie provenant, dans la plupart des cas, d'une complication de maladies hépatiques préexistantes. Plutôt asymptomatique au départ, le CHC peut être révélé par un ictère, une hypertension au niveau de la veine porte (un gradient de pression veineux hépatique supérieur à 10 mm Hg), une apparition ou majoration d'une ascite (accumulation de fluide dans la cavité péritonéale), des ecchymoses dues à des anomalies de la coagulation sanguine, une perte d'appétit, une perte de poids involontaire, des douleurs abdominales, en particulier dans la partie supérieure droite, des nausées, des vomissements ou une fatigue.

Des nouveaux cas de cancer du foie apparaissent à une fréquence de plus d'un million chaque année dans le monde. Il est le 5^{ème} cancer le plus commun chez l'homme et le 7^{ème} chez la femme avec un taux 3 à 5 fois plus élevé chez l'homme. Le cancer du foie se développe rarement avant l'âge de 40 ans et atteint un maximum de fréquence chez les personnes de plus de 70 ans (H.B. El-Serag, 2011).

2.2 Facteurs de risque

Les facteurs de risque du CHC sont caractérisés par une variabilité interindividuelle et dépendent de la région géographique, de la « race » ou du groupe ethnique. Les plus fréquents sont les infections par les virus de l'hépatite B (HBV) et de l'hépatite C (HCV) avec une contribution d'environ 80%, les maladies associées à la consommation d'alcool (ALD pour « alcoholic liver disease ») pouvant inclure une stéatose alcoolique associée ou non à une fibrose hépatique et les maladies non associées à la consommation d'alcool mais causant une accumulation d'acides gras dans le foie (NAFLD pour « nonalcoholic fatty liver disease ») (présente dans 90% des cas chez les personnes obèses et 70% chez les diabétiques de type 2). Chez certains patients les NAFLD peuvent évoluer vers une stéatose hépatique simple non alcoolique (NASH pour « nonalcoholic steatohepatitis »). La stéatose hépatique simple ou alcoolique est associée à une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes et à une inflammation préparant le terrain pour la fibrose (Figure 24) (*B. Gao et R. Bataller, 2011 ; M. Trauner et al, 2009 ; H.B. El-Serag, 2011 ; Z. Herceg et A. Paliwal, 2011*). L'exposition à des toxines comme l'aflatoxine ou les fumonisines ainsi que le tabagisme sont également des facteurs de risques non négligeables et d'une manière moins commune, l'hémochromatose héréditaire (surcharge de fer), l'hépatite auto-immune, la porphyrie et la maladie de Wilson sont également des facteurs pouvant déclencher l'apparition de CHC. Tous ces facteurs de risques aboutissent à la formation et à la progression de la cirrhose qui est présente chez 80 à 90% des cas d'hépatocarcinome. La cirrhose est associée à une désorganisation de l'architecture hépatique qui est bouleversée de manière diffuse par une destruction des hépatocytes suivies de lésions de fibrose alternant avec des plages de régénération cellulaire qui ne correspondent plus à l'organisation initiale lobulaire (*H.B. El-Serag, 2011 ; Z. Herceg et A. Paliwal, 2011*) (Figure 24).

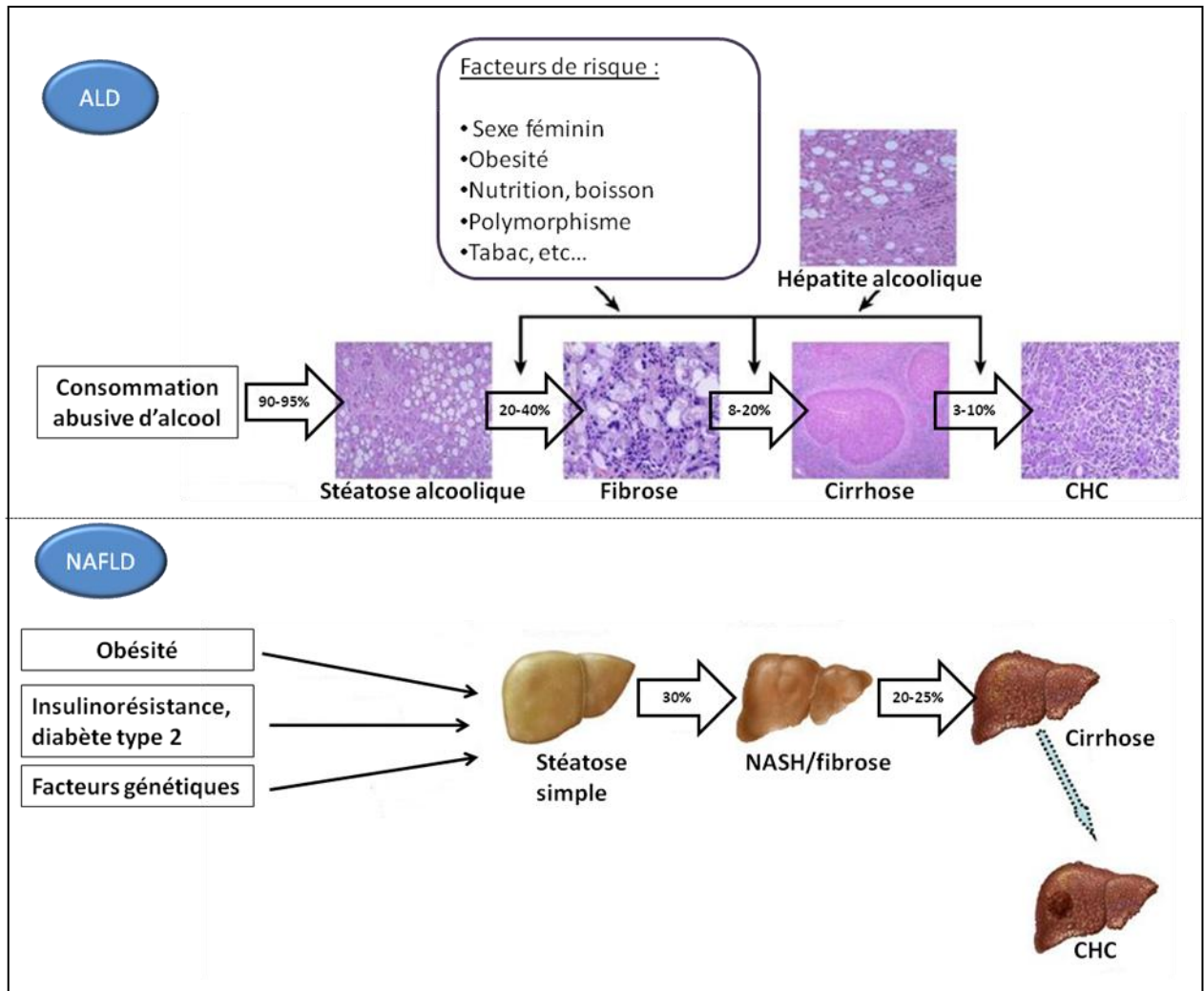


Figure 24 : Spectre des maladies associées à la consommation d'alcool (ALD pour « alcoholic liver disease ») et des maladies non associées à la consommation d'alcool mais causant une accumulation d'acides gras dans le foie (NAFLD pour « nonalcoholic fatty liver disease»). Dans le cas des ALD, 90 à 95% des gros consommateurs d'alcool développent une accumulation de graisses dans le foie et 35% de cette population développent des formes plus sévères comme la fibrose, l'hépatite alcoolique, la cirrhose et l'hépatocarcinome (CHC) (modifié d'après *B. Gao et R. Bataller, 2011*). Dans le cas des NAFLD, l'obésité, l'insulinorésistance et les facteurs génétiques contribue également au dépôt de graisses dans le foie. 30% des patients atteints de NAFLD ont une stéatose non alcoolique (NASH pour « nonalcoholic steatohepatitis ») provoquant différents degrés d'inflammation et de fibrose qui aboutissent par la suite à la cirrhose dans 20-25% des cas (modifié d'après *M. Trauner et al, 2009*).

2.3 Prévention et traitement

La vaccination contre le virus de l'hépatite B réduit la prévalence d'infection par le virus HBV. Des traitements antiviraux diminuent le risque de CHC sans l'éliminer complètement. La surveillance consiste à associer le dosage sérique de l'alpha-fœtoprotéine qui est augmentée dans les cas de CHC (> à 400 ng/mL), à l'imagerie échographique tous les 6 mois à 12 mois (J. Bruix et M. Sherman, *Hepatology*, 2005 ; H.B. El-Serag, *N. Engl. J. Med.*, 2011). Le traitement dépend du stade de l'hépatocarcinome et du terrain. Le traitement chirurgical consiste en une résection ou transplantation du foie. Les autres moyens thérapeutiques comprennent la chimioembolisation artérielle ou l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques qui améliorent le taux de survie. A un stade précoce, la résection chirurgicale est associée à un taux de survie de 90%. En phase terminale le taux de survie dans l'année suivante ne dépasse pas les 10% (H.B. El-Serag, *N. Engl. J. Med.*, 2011).

2.4 Le métabolisme des monocarbones dans le CHC

La prévalence de l'hyperhomocystéinémie est plus importante chez des patients atteints de cirrhose et contribue à l'apparition de fibrose hépatique et de complications vasculaires chez l'homme (*P. Ventura et al, 2005 ; E.R. Garcia-Tevijano et al, 2001*). Une étude a notamment montré une altération de l'expression des enzymes du métabolisme des monocarbones (*MAT1A, GNMT, BHMT, CBS et MS*) chez des patients atteints de cirrhose hépatique et d'hépatocarcinome (*M.A. Avila et al, 2000*). Cependant les mécanismes moléculaires de cette altération sont encore mal connus. D'après une étude très récente, chez des rats génétiquement susceptibles à l'hépatocarcinogénèse (F344), *Mat1a* est sous exprimé et *Mat2a* est surexprimé alors que SAM est diminuée. Ce switch *Mat1a :Mat2a* est associé à une hyperméthylation des îlots CpG et à une déacétylation de l'histone H4 sur le promoteur de *Mat1a* ainsi qu'à une hypométhylation et à une acétylation de H4 sur le promoteur de *Mat2a*. Chez des rats génétiquement résistants à l'hépatocarcinogénèse (BN), peu de changements sont observés concernant le ratio *Mat1a :Mat2a*, la méthylation des îlots CpG et l'acétylation des histones. Les taux les plus élevés d'hyperméthylation du promoteur de *MAT1A* et d'hypométhylation du

promoteur de *MAT2A* les plus élevés sont observés dans les hépatocarcinomes humains de mauvais pronostics (*M. Frau et al, 2012*).

Récemment, une équipe a développé le premier modèle *bhmt*^{-/-} chez la souris. Cette invalidation du gène entraîne une hyperhomocystéinémie, une diminution du ratio SAM/SAH dans le foie de l'ordre de 75%, une augmentation de la concentration en bêtaïne et une diminution des concentrations en choline, phosphocholine, glycérophosphocholine, phosphatidylcholine, sphingomyéline. A un an, 64% des souris présentent des tumeurs hépatiques visibles. Tout ceci montre que la BHMT a un rôle important dans le métabolisme des monocarbones et les polymorphismes qui induisent une altération de l'activité de l'enzyme chez l'homme pourraient avoir des effets délétères (*Y.W. Teng et al, 2011*).

3. Les différentes hypothèses étiologiques dans le cancer du foie

3.1 Aspects nutritionnels

De nombreuses études chez l'homme et les modèles animaux montrent un lien entre carence en folates et lésions hépatiques comme la stéatose, la nécrose, la fibrose et le cancer (*L. Brunaud et al, 2003 ; J.M. Mato et al, 2008 ; I.P. Pogribny et al, 2012 ; C.S. Kuo et al, 2008 ; T.M. Welzel et al, 2007*). Une carence en donneurs de méthyles (folates, bêtaïne, choline) et/ou méthionine entraîne une diminution de la SAM, principal donneur de méthyle, qui peut potentiellement conduire à une hypométhylation de l'ADN rencontrée dans le CHC. Ainsi, une déficience chronique en donneur de méthyles (méthionine, choline, folates, vitamine B12) peut agir comme un carcinogène (*N. Chandar et B. Lombardi, 1988 ; L.A. Poirier, 1994 ; Y.B. Mikol et al, 1983 ; A.K. Ghoshal et E. Farber, 1984 ; C.S. Kuo et al, 2008 ; T.M. Welzel et al, 2007*). Lors d'une carence en choline, la concentration en SAM hépatique est également diminuée de 50% (*N. Shivapurkar et L.A. Poirier, 1983 ; S.H. Zeisel et al, 1989*) et la concentration plasmatique en HCY est doublée (*G. Varela Moreiras et al, 1995*). Cela montre clairement qu'une carence en choline induit une diminution de la biodisponibilité en méthionine, précurseur de la S- adénosylméthionine impliquée dans les réactions de transméthylation dans l'organisme. En revanche, la supplémentation en choline semble réduire l'incidence de l'hépatocarcinome dans ces modèles, ce qui souligne l'importance de la voie

alternative de la reméthylation de l'HCY en méthionine dépendante de la BHMT dans la prévention de l'hépatocarcinogénèse (A.K. Ghoshal et E. Farber, 1984; E. Wainfan et M. Dizik, 1987).

De plus, les folates sont essentiels pour la synthèse *de novo* de pyrimidine, thymidylate et purines et lorsque l'approvisionnement en méthyles alimentaires est inadéquat, une compétition s'installe entre l'utilisation des folates pour les réactions de méthylation et la synthèse de nucléotides. Si la concentration en SAM diminue, des mécanismes compensatoires permettent d'augmenter la conversion de 5,10-méthylèneTHF en 5-méthylTHF, réaction irréversible qui compromet la biodisponibilité des folates pour la synthèse *de novo* des nucléotides et ainsi la synthèse d'ADN (S.W. Choi et J.B. Mason, 2000). Parallèlement, une carence en folates induit des cassures dans l'ADN qui peuvent être accompagnées par une augmentation de survenue de CHC chez l'homme. Plusieurs mécanismes paraissent créer ces cassures : une accumulation de résidus uraciles dans l'ADN et une déamination *in situ* des résidus cytosine. En effet, une carence en folates réduit la synthèse de thymidylate à partir de déoxyuridylate et ce déséquilibre de nucléotides provoque une mauvaise incorporation de bases uracile dans l'ADN, la plupart des ADN polymérases ne faisant pas la distinction entre déoxyuridylate et thymidylate (B.C. Blount et al, 1997).

Il a été montré chez le rat et la souris que la consommation chronique d'alcool provoque un déficit en folates et une hypovitaminose à l'origine d'une hyperhomocystéinémie. Celle-ci entraîne ensuite une carence en méthionine puis un déficit en SAM. Ce dernier pourrait alors contribuer à la carcinogénèse hépatique *via* une hypométhylation globale (A. Hamid et al, 2009). Chez 32 patients alcooliques chroniques comparés à 31 volontaires, la concentration en folates dans les globules rouges est diminuée et la concentration en HCY est doublée. La consommation de bière entraîne des concentrations en HCY plus faible que certains alcools forts comme le vin et les liqueurs. En interférant avec le métabolisme des folates et de la vitamine B6, la prise d'alcool chronique peut nuire à la reméthylation et à la transsulfuration de l'HCY (M.L. Cravo et al, 1996).

Une supplémentation en acide folique et/ou en SAM, associée si nécessaire, au sevrage alcoolique des patients pourrait ainsi être incluse dans une stratégie de

prévention du CHC à grande échelle. Il faut cependant être prudent car des études ont montré qu'une supplémentation en folates pouvait avoir des effets négatifs sur les maladies cardiovasculaires et les cancers selon les individus, suggérant que cela peut interférer avec l'homéostasie du métabolisme des monocarbones et que la réponse à la prise de folates n'est pas uniforme (*J. Sauer et al, 2009*). Des rats nourris avec une alimentation riche en méthyles après avoir été soumis une carence pendant 12 mois présentent une accélération de la croissance tumorale hépatique. Une supplémentation abusive pourrait même entraîner la synthèse d'ADN anormal dans des cellules hypométhylées et certaines tumeurs malignes sont connues pour surexprimer des récepteurs aux folates. Seule une supplémentation avec de faibles doses d'acide folique pour des patients alcooliques et/ou carencés de manière bien documentée pourrait améliorer les mécanismes de réparation de l'ADN sans stimuler la prolifération tumorale. Un apport de 200 µg d'acide folique par jour correspondant à l'apport moyen dans la population serait alors suffisant (*L. Peyrin-Biroulet et al, 2006*).

D'autres vitamines et molécules peuvent avoir des effets protecteurs vis-à-vis du CHC. Il s'agit principalement d'antioxydants contenus dans certains fruits et légumes, notamment les vitamines A (ou rétinol), C (acide ascorbique), et E (tocophérol), les caroténoïdes, les flavonoïdes et le sélénium. Leur rôle protecteur envers la carcinogenèse serait dû à leur capacité à lutter contre les dommages oxydatifs de l'ADN, des lipides et des protéines en neutralisant les radicaux libres (ROS) (*S.A. Stanner et al, 2004 ; C. Loguercio et A. Federico, 2003 ; W.A. Peres et al, 2011; E. Yurtcu et al, 2011*).

3.2 Aspects environnementaux

De nombreux facteurs environnementaux sont associés à l'incidence de CHC : les radiations ionisantes (particules alpha et bêta, rayons X et gamma), de nombreux agents chimiques (phénobarbital, diméthylnitrosamine, éthionine, alcaloïdes, biphényles polychlorés, trichloroéthylène...), les métaux lourds (arsenic), le tabac, les virus HBV et HCV, et les toxines alimentaires (aflatoxine B1 et fumonisine B1) (*C.C. Harris, 1991 ; R.W. Clapp et al, 2007*). L'aflatoxine B1 semble jouer un rôle dans 4,6 à 28,2% des cas d'hépatocarcinomes en général et la plupart des cas observés se situent en Afrique sub-saharienne, en Asie du sud-est et en Chine, où les

populations souffrent d'une prévalence élevée de virus HBV associée à une exposition alimentaire incontrôlée à cette toxine (Y. Liu et F. Wu, 2010). Une association significative entre une exposition à l'aflatoxine B1 et des lésions génétiques et épigénétiques a été démontrée (Y.J. Zhang et al, 2006 ; Z. Herceg et A. Paliwal, 2011). L'aflatoxine B1 et la fumonisine B1 sont souvent retrouvées comme co-contaminants dans les produits alimentaires et en particulier dans le maïs. Ces deux toxines sont ainsi capables d'interagir pour produire des altérations hépatiques chez le rat (C. McKean et al, 2006). La fumonisine B1 peut agir comme un facteur d'initiation et de promotion du cancer, elle peut donc être considérée comme un carcinogène. L'initiation du cancer est effectuée à travers une réponse toxique et proliférative tandis que l'effet inhibiteur sur la prolifération des hépatocytes semble être un aspect essentiel déterminant la promotion du cancer. Ainsi l'exposition à la fumonisine B1 est associée à l'apparition de lésions hépatiques chez les rongeurs incluant une cirrhose micro et macronodulaire, une fibrose, des cholangiocarcinomes et des hépatocarcinomes pouvant conduire à des métastases dans le rein, le cœur et les poumons. Ces effets sont cependant observés à partir d'une forte dose de FB1 administrée pendant plusieurs mois (25 mg/kg d'aliments) ce qui montre qu'un seuil existe et qu'un effet toxique chronique est requis pour l'induction de CHC. Une dose comprise entre 0,08 et 0,16 mg/100 g de poids corporel/jour pendant 2 ans provoque l'apparition de cancer du foie chez les rats, tandis qu'une dose inférieure à 0,08 mg/100 g de poids corporel/jour n'induit pas de CHC même si des lésions préneoplasiques sont observées. Le mécanisme proposé pour l'induction du cancer inclut des dommages oxydatifs pendant l'initiation, une perturbation du métabolisme des lipides et de l'intégrité des membranes cellulaires ainsi qu'une altération de la régulation de la croissance cellulaire pendant la promotion (W.C. Gelderblom et al, 2001).

3.3 Aspects génétiques et épigénétiques

Les facteurs génétiques et épigénétiques impliqués dans le CHC sont, en étroite relation avec les aspects nutritionnels et environnementaux cités précédemment (Figure 25). Un statut épigénétique aberrant peut prédisposer à des changements génétiques, mais des changements génétiques peuvent également initier des événements épigénétiques aberrants. Les mécanismes génétiques et épigénétiques

peuvent donc s'associer pour modifier l'expression de gènes clés et déstabiliser le génome conduisant ainsi à une transformation oncogénique.

L'altération de la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans les processus oncogénétiques. La méthylation de l'ADN diminue très précocement dans la cancérogenèse et semble précéder les événements de mutations et de délétions qui apparaissent plus tardivement dans l'évolution du cancer (*S.W. Choi et J.B. Mason, 2000*).

La carence en folates provoque une diminution du taux de méthylation de l'ADN. Si des rats sont carencés par administration d'un régime déficient en groupements méthyles le taux de méthylation de l'ADN est diminué, l'expression des gènes est altérée. Le mécanisme le plus probable par lequel l'hypométhylation de l'ADN peut induire une transformation tumorale comprend l'activation de certains oncogènes, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, l'induction d'instabilité génomique et l'augmentation de mutations résultant d'une structure chromosomique anormale (*P.W. Laird et R. Jeanisch, 1996 ; E. Wainfan et al 1989*). Une hypométhylation de l'ADN a notamment été observée dans des modèles animaux de cancérogenèse induite par une déficience en choline, méthionine, vitamine B12 et folates (*E. Wainfan et al, 1989*). Une hypométhylation gène spécifique peut même apparaître en absence d'hypométhylation globale de l'ADN et ceci semble être un processus plus important dans la cancérogenèse. Par exemple, une déficience en folates induit une hypométhylation dans la région codante du gène suppresseur de tumeur p53 sans hypométhylation globale de l'ADN (*Y.I. Kim et al, 1997*). Cette région particulièrement sensible à l'hypométhylation induite par la carence en folates ou par l'exposition à des agents chimiques cancérogènes est précisément la région la plus fréquemment mutée dans les cancers chez l'homme.

Le changement de méthylation site-spécifique génère des mutations. Les cytosines méthylées (5mC) au sein des îlots CpG, sont plus instables que les cytosines non méthylées. Une déamination hydrolytique des cytosines méthylées conduit à leur remplacement par des thymines et aboutit à un mésappariement G/T (*M.J. Yebra et A.S. Bhagwat, 1995*). Ces îlots CpG, localisés le plus souvent aux extrémités 5' des gènes (régions promotrices) sont normalement non méthylés dans les cellules non tumorales. Le niveau de méthylation spécifique des promoteurs régule l'expression de nombreux gènes d'une part à l'état physiologique et d'autre part dans certains cas particuliers comme le cancer. Au total, 675 gènes anormalement méthylés ont été

dénombrés dans le CHC (*L. Peyrin-Biroulet et al, 2006*). Les cytosines non méthylées peuvent également subir des réactions de déamination conduisant à la formation d'uracile, particulièrement lorsque la concentration en SAM est faible (voir aspects nutritionnels ci-dessus). L'uracile dans l'ADN est excisée par une enzyme de réparation, une glycosylase, et pendant le processus, une cassure simple brin transitoire se développe. La suppression et la réparation simultanée de deux résidus uracile adjacents sur des brins opposés résultent en une cassure double brin dans l'ADN. Dans le cas où ces cassures double brin ne sont pas réparées par défaut des systèmes de réparation de l'ADN, ce qui semble être le cas lors d'une déficience en folates (*S.W. Choi et al, 1998 ; S.J. Duthie et A. Hawdon, 1998*), la cellule subit une transformation maligne. Un contenu en uracile excessif et une augmentation du nombre de cassures double brin ont été notés dans le cas d'une carence en folates chez l'homme et ces deux effets sont réversibles si une supplémentation en folates est administrée (*B.C. Blount et al, 1997 ; S.W. Choi et J.B. Mason, 2000*).

D'autre part, une répression par hyperméthylation peut être un moyen alternatif conduisant à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. En effet, l'hyperméthylation induit des altérations dans la conformation des gènes, ce qui les rend inaccessibles et transcriptionnellement inactifs. De manière paradoxale, même si des régions spécifiques des gènes suppresseurs de tumeur (p53) sont hypométhylées, une hyperméthylation plus tardive peut survenir lorsque des foci néoplasiques sont histologiquement visibles dans le foie (*I.P. Pogribny et al, 1997*). Une hyperméthylation d'un autre gène suppresseur de tumeur, p16 a également été mise en évidence dans le CHC (*Y. Kanai et al, 1996*).

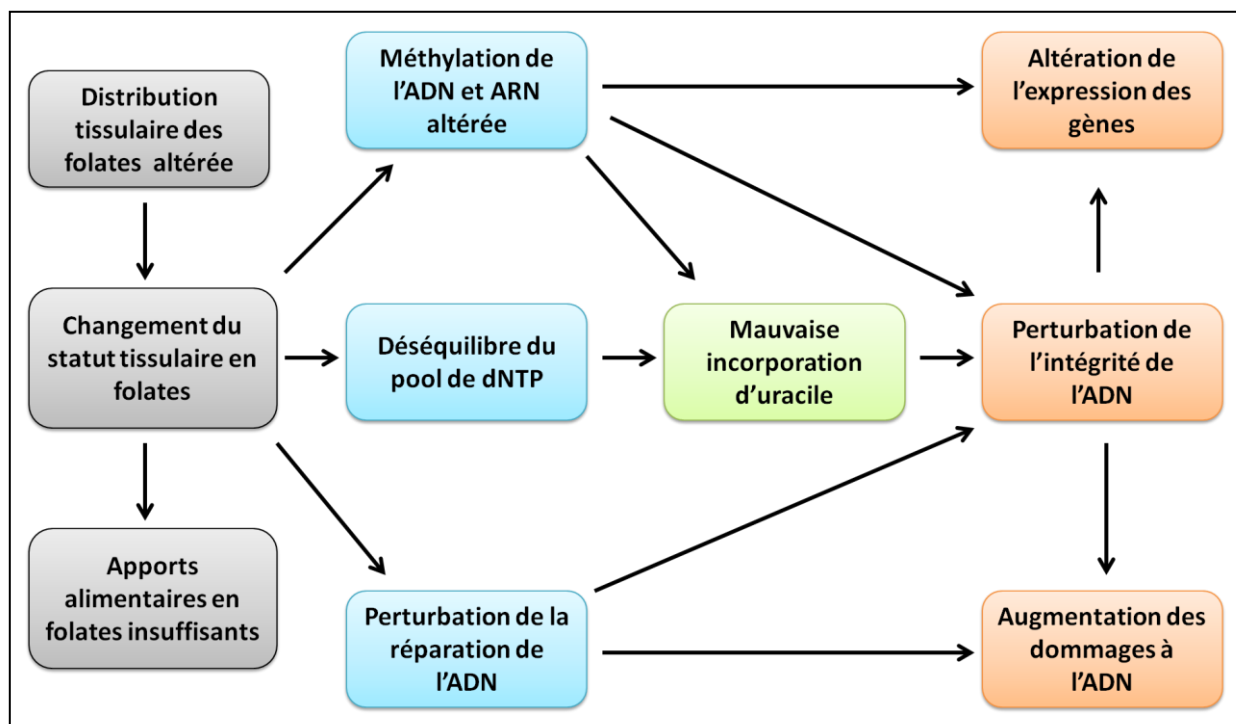


Figure 25 : Relation étroite entre les aspects nutritionnels et les aspects génétiques et épigénétiques amenant à l'apparition de CHC. Les encadrés à droite illustrent les processus par lesquels le concept d'apparition de CHC est renforcé (modifié d'après S.W. Choi et J.B. Mason, 2000).

Parallèlement au processus de méthylation de l'ADN, il existe dans le CHC une détérioration de la machinerie responsable de la modification des histones. La plupart des modifications aberrantes des histones connues comme étant associées aux CHC affectent l'expression de gènes critiques. De nombreuses marques épigénétiques sont altérées dans le CHC et agissent comme un facteur facilitant la cancérogenèse. Certaines HAT sont fortement exprimées dans le foie sain mais sont réprimées dans le foie cancéreux. Un faible taux d'expression des HAT conduit à une hypoacétylation, donc à l'inactivation de nombreux gènes notamment ceux impliqués dans l'apoptose (I.Y. Park et al, 2007 ; J.K. Shon et al, 2009 ; D.L. Zheng et al, 2009). La diméthylation de H3K4 (H3K4diMe) est quasiment indétectable dans le CHC chez l'homme et cette diminution serait causée par une altération de l'expression d'enzymes responsables de la méthylation (complexe Ash2) et de la déméthylation (LSD1) à ce niveau (C. Magerl et al, 2010) alors qu'une surexpression de la triméthylation de l'histone H3K4 (H3K4triMe) ainsi que de son « histone

méthyltransférase » (SMYD3) a été corrélée avec un mauvais pronostic dans le carcinome hépatocellulaire (C. He et al, 2012). Dans le foie de rats nourris avec un régime déficient en donneurs de méthyle, une diminution de la triméthylation de H4K20 (H4K20triMe) et de l'expression de l'histone méthyltransférase associée (Suv4-20h2) a été observée alors qu'une augmentation de la triméthylation de H3K9 (H3K9triMe) et de l'expression de l'histone méthyltransférase associée (Suv39h1) a été mise en évidence dans des nodules prénéoplasiques et dans le tissu cancéreux hépatique. Ceci suggère un rôle important de ces marques épigénétiques dans la promotion des CHC et l'apparition d'altérations épigénétiques spécifiques de tumeur à des stades précoces montrent qu'une reprogrammation épigénétique induite par un stress serait une condition préalable importante à l'apparition de mutations (I.P. Pogribny et al, 2006).

Objectifs

La cancérogenèse est un processus multiphasique et multifactoriel. Elle inclut des facteurs génétiques, épigénétiques, nutritionnels et environnementaux qui sont étroitement interconnectés. L'hépatocarcinome (CHC) chez l'homme est l'un des cancers les plus communs et les plus mortels à travers le monde.

Une altération du taux de SAM, principal donneur de groupement méthyle influence fortement le développement d'hépatocarcinomes. En effet, une faible concentration en SAM favorise le développement de CHC chez les rongeurs et chez l'homme alors que la prolifération cellulaire est inhibée après administration de SAM. Le ratio SAM/SAH et l'activité des enzymes MAT I/III diminuent progressivement dans les lésions hépatiques. Ces altérations du métabolisme des monocarbones jouent un rôle dans l'instabilité génétique et les modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications des histones) dans le CHC. Mais les mécanismes moléculaires sous jacents à cette perturbation sont encore mal connus.

Le premier objectif de cette étude est donc de caractériser les enzymes intervenant dans les voies de reméthylation de l'HCY en méthionine an amont de la formation de SAM. Pour cela, une lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain (HepG2) ainsi que des biopsies humaines d'hépatocarcinome et cholangiocarcinome versus tissus sains ou cirrhotiques adjacents ont été utilisés.

De plus, plusieurs études montrent, chez des modèles animaux, qu'un régime déficient en donneurs de méthyle est associé à une hyperhomocystéinémie, une diminution du ratio SAM/SAH, une hypométhylation de l'ADN et des modifications de la chromatine pouvant être liées à l'apparition de CHC et de défauts de fermeture du tube neural. De plus, la fumonisine B1, toxine alimentaire tératogène des céréales également incriminer dans les lésions hépatiques, pourrait potentialiser ces effets néfastes, de part son interférence avec le métabolisme des monocarbones.

Le deuxième objectif de notre étude est donc d'utiliser notre modèle de rates gestantes carencées en donneurs de méthyle supplémentées ou non avec une dose de fumonisine B1 deux fois supérieure à la dose journalière admissible (4 µg/kg de poids corporel/jour) afin d'étudier plusieurs marques d'assemblage de l'hétérochromatine (H3R2me2, H4K20me3, H3K9me3, H4K16ac) dans le foie des

foetus à 20 jours de gestation (E20). 4 groupes seront donc formés : (1) Groupe témoin, (2) groupe carencé, (3) groupe traité avec la fumonisine B1, (4) groupe carencé supplémenté avec la fumonisine B1. Plusieurs paramètres gestationnels et métaboliques seront également analysés.

Ainsi ce travail permettra, d'une part, d'éclaircir les bases moléculaires de l'altération de la voie de reméthylation à l'origine de modifications génétiques/épigénétiques dans les CHC et d'autre part de caractériser l'effet potentialisateur d'un facteur environnemental sur une carence nutritionnelle pouvant aboutir à des modifications épigénétiques associées au développement de CHC. Cette étude se situe donc au carrefour entre les enjeux nutritionnels et environnementaux influençant les modifications génétiques/épigénétiques liées à l'apparition de l'hépatocarcinome et constitue de ce fait un véritable intérêt d'un point de vue santé publique.

**ETUDE
EXPERIMENTALE**

PARTIE I : Caractérisation de l'expression des enzymes de la voie de reméthylation dans le cancer hépatique.

Pour cette étude, des échantillons humains de foie adultes et fœtaux ont été utilisés, le tableau 4 ci-dessous en présente les caractéristiques.

Patients	Age	Sexe	Diagnostic	Etiologie
C1 vs T1	77 ans	Homme	Cholangiocarcinome	Foie non cirrhotique
C2 vs T2	60 ans	Homme	Cholangiocarcinome	Fibrose
C3 vs T3	61 ans	Homme	Hépatocarcinome (grade III)	Fibrose
C4 vs T4	61 ans	Homme	Hépatocarcinome (grade III)	Foie non cirrhotique
C5 vs T5	67 ans	Femme	Hépatocarcinome (grade III)	Foie non cirrhotique
C6 vs T6	53 ans	Homme	Hépatocarcinome (grade III)	Foie cirrhotique
Foetus	Age gestationnel	Sexe	Diagnostic	Etiologie
F1	27 semaines		Avortement spontané	
F2	38 semaines		Avortement spontané	

Tableau 4 : Caractéristiques cliniques des patients et fœtus analysés. C : contrôle, T : tumoral, F : fœtal.

1. L'expression de *MTR* (codant pour la MS), *BHMT* et *BHMT2* dans les cellules HepG2, les tissus hépatiques humains adultes tumoraux et sains, et les tissus hépatiques humains sains fœtaux

Les transcrits de *MTR* ont été mis en évidence dans les cellules HepG2 par RT-PCR alors que les transcrits *BHMT* et *BHMT2* n'ont pas été détectés. De la même manière, *MTR* est normalement exprimé dans les tissus tumoraux (T1, T2 et T3) tandis que l'expression de *BHMT* est quasiment absente. En effet, l'expression de *BHMT* est soit très faible (T1 et T3) soit absente (T2) d'après le gel d'électrophorèse. En ce qui concerne *BHMT2*, son expression est réduite dans les tissus tumoraux (T1, T2 et T3) par rapport aux tissus sains (C1, C2 et C3). Les transcrits de *MTR*, *BHMT* et *BHMT2* ont été détectés dans tous les tissus sains (C1, C2 et C3) comme le montrent les produits d'amplification à la taille attendue (Figure 26 A). Le

séquençage de ces produits ont confirmé qu'il s'agissait bien des transcrits *MTR*, *BHMT* et *BHMT2*. Afin de quantifier la quantité relative de ces transcrits entre les tissus sains et tumoraux, une RT-PCR quantitative (RT-qPCR) a été effectuée et les résultats ont confirmé une expression constante de *MTR*, une expression très réduite de *BHMT2* et une expression indétectable pour *BHMT* dans les cellules HepG2 et dans les tissus tumoraux comparés aux tissus sains (Figure 26 B).

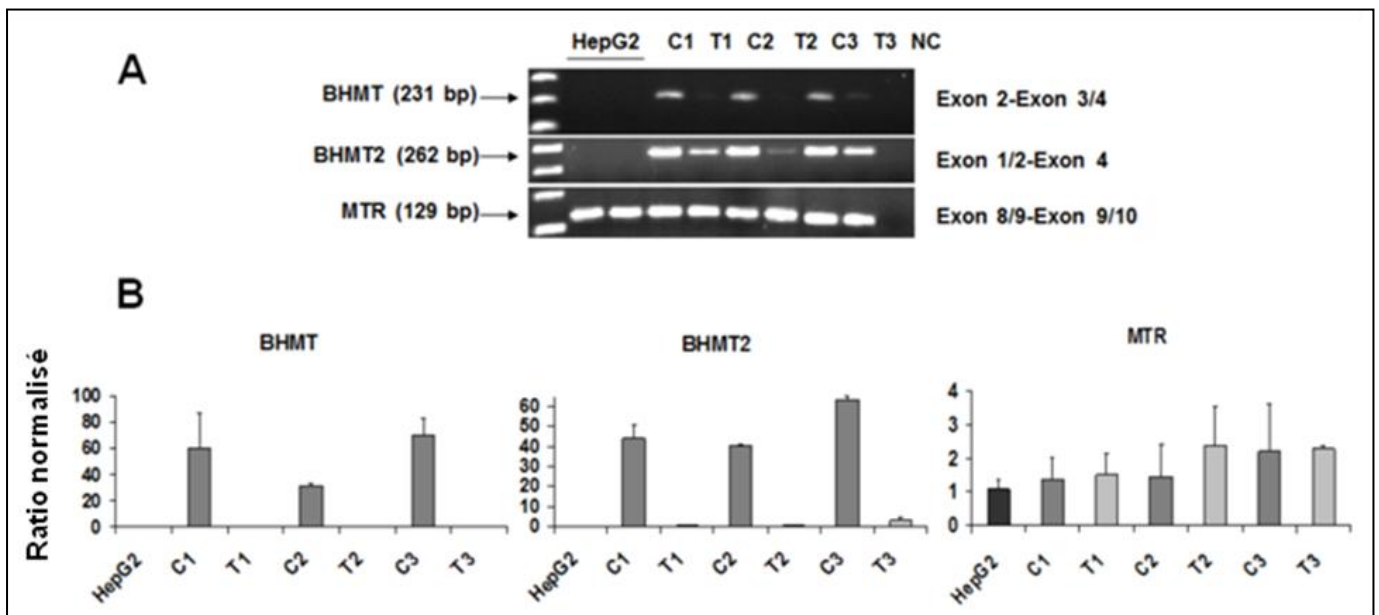


Figure 26: Résultats de RT-PCR (A) et RT-qPCR (B) pour l'étude de l'expression des transcrits *MTR*, *BHMT* et *BHMT2* dans les cellules HepG2, les tissus hépatiques humains sains et tumoraux et les tissus hépatiques sains fœtaux. Dans les échantillons tumoraux et dans les cellules HepG2, les transcrits BHMT sont indétectables, les transcrits BHMT2 sont très peu exprimés, et les transcrits MTR sont normalement détectés. Les taux de transcrits ont été quantifiés en normalisant les valeurs par l'utilisation d'un gène de référence, l'ARN polymérase II (POLR2A). Les histogrammes représentent les moyennes issues de deux RT pour chaque échantillon passé en duplicate \pm l'erreur standard à la moyenne. T1, T2, T3: foies tumoraux issus des patients 1, 2 et 3; C1, C2, C3 : foies sains issus des mêmes patients respectivement. NC: contrôle négatif.

En raison de l'absence d'expression de *BHMT* et *BHMT2* dans les cellules HepG2 et dans les tissus tumoraux, des RT-PCR ont été effectuées en utilisant des paires d'amorces chevauchantes (P1 à P7 pour *BHMT* et P1' à P7' pour *BHMT2*) dans le but d'amplifier chaque transcrite exon par exon (Figure 27 A). Chaque RT-PCR a abouti à l'amplification d'un produit unique à la taille attendue pour *BHMT* et *BHMT2* dans les tissus sains (C1, C2 et C3). Dans les cellules HepG2, *BHMT2* n'a pas été détecté mais son expression est tout de même faiblement présente dans les tissus tumoraux (T1, T2 et T3). Les produits d'amplification pour *BHMT* n'ont quasiment pas été détectés dans les tissus tumoraux (T1, T2 et T3). Dans les cellules HepG2, seule la paire d'amorces P3 forme un produit d'amplification de faible intensité à la taille attendue (240 pb) et toutes les autres paires d'amorces ne donnent aucun produit d'amplification. De manière surprenante, la paire d'amorces P3 forme un second produit d'amplification à une taille inférieure par rapport à la taille attendue (167 pb au lieu de 240 pb). Ce transcrite plus court de 75 pb a été détecté dans les cellules HepG2 et dans les tissus tumoraux (T1, T2 et T3) et il coexiste avec le transcrite de taille normale. Ce transcrite additionnel est complètement absent dans les tissus sains (C1, C2 et C3) (Figure 27 B).

Dans le but de tester l'hypothèse que ce transcrite plus court soit un marqueur onco-fœtal, des RT-PCR ont été réalisées avec les mêmes paires d'amorces spécifiques de *BHMT* dans deux échantillons de foie fœtal (F1 and F2). Les foies fœtaux ont le même profil d'expression que les foies sains et aucun transcrite supplémentaire n'a été observé (Figure 27 B).

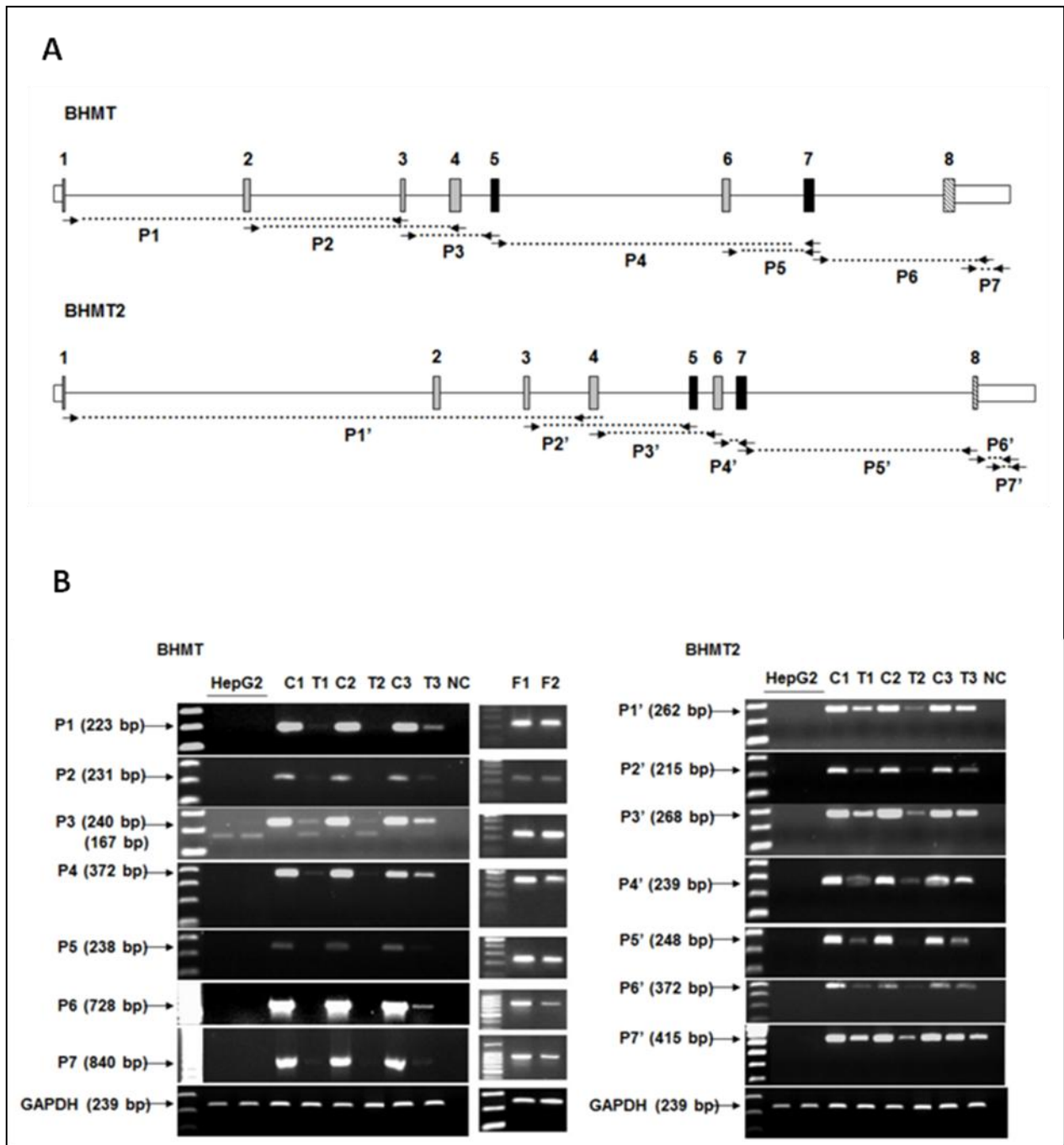


Figure 27 : (A) Représentation schématique des gènes *BHMT* et *BHMT2* et de la position des paires d'amorces utilisées en RT-PCR. Les exons de *BHMT* et *BHMT2* sont indiqués par des rectangles numérotés et les introns par des lignes pleines. Les exons partageant 80-100% ou 60-80% d'homologie entre *BHMT* et *BHMT2* sont représentés en noir et en gris respectivement. L'exon 8 partageant 30% d'homologie est hachuré. Les rectangles blancs indiquent les régions non codantes 3'UTR et 5'UTR. Les flèches montrent la position des paires d'amorces utilisées en

RT-PCR et sont numérotées de P1 à P7 pour *BHMT* et de P1' à P7' pour *BHMT2*. **(B) Résultats de RT-PCR après amplification de *BHMT* and *BHMT2* exons par exons en utilisant les paires d'amorces P1 à P7 et P1' à P7'** comme décrit dans le figure 27 A. La paire d'amorces P3 (l'amorce sens chevauche les exons 3/4 et l'amorce antisens se trouve dans l'exon 5), conduit à l'amplification de deux produits dans les tissus tumoraux (T1, T2 et T3) et dans les cellules HepG2. Le premier correspond à la taille attendue de 240 pb et le second est plus petit d'environ 75 pb. Le transcrit de taille normale (240 pb) est très faiblement visible dans les cellules HepG2. T1, T2, T3: foies tumoraux issus des patients 1, 2 et 3; C1, C2, C3 : foies sains issus des mêmes patients respectivement. F1 et F2 : foies fœtaux. NC: contrôle négatif.

2. Analyse de la séquence du transcrit alternatif de *BHMT*

Le séquençage du produit d'amplification correspondant au transcrit court supplémentaire de *BHMT* présent dans les tissus tumoraux et dans les cellules HepG2, montre une lésion génétique complexe. Il s'agit d'une délétion de 86 pb correspondant à la région 3' de l'exon 4 suivie d'une insertion de 13 pb correspondant à la région 3' de l'intron 4 (Figure 28 A et C). Ceci explique la différence de 75 pb entre les deux transcrits observés après RT-PCR en utilisant la paire d'amorces P3. Le séquençage des produits d'amplification correspondant aux tissus hépatiques sains, ne montre aucune lésion génétique. Le séquençage de l'ADN génomique n'a montré aucune variation aussi bien dans les tissus sains que dans les tissus cancéreux et les cellules.

Les résultats de séquençage permettent de prédire que le transcrit alternatif de *BHMT* possède un décalage du cadre de lecture dans l'exon 4, ce qui provoque l'apparition d'un codon stop prématuré au début de l'exon 5 en position 150 (Figure 28 B et C). Si le transcrit était traduit, la protéine attendue serait tronquée et les régions codées par les exons 6 à 8 seraient manquantes.

A

```

... TAAACAGAAATTATACCTTTCTCATTCACTCTCCAGTTCCGCCAGCTTCATCGAGAGT
TCCTCAGAGCTGGCTCAAAAGTCAATGCAAGACCTTCACCTTCTATGCGAGTGAAGAAGAGCTGG
AGAACAGGGGCAACTATGTCTTAGAGAAAGATATCTGTGAGTAAAACAGCCGTGGGACTTTTA
GAAGGATATTGTGACCTATTGCATCAACAAAGCTCCCATAGAGAAAAGGGTTCAACCTCTTC
AGAGTTTTGTTTTATTCTAATAATACAAAAATGAGAGGCGTGAATAACAAC. . . . .
TGTTATGGCAAAGTGTCAACTTGGTAAAGCTTTGAACTATCCATAACAGTCATTTTCTGG
AATAAGATACATTGTAATATACAACAAAGATGTGAATGTTTGAATAATAATTTTATTTCAA
TTTCACATGAAAATTTAGATGTCTCATATACTACCCATTTTAGGGCAGGAGTCAATGAAG
CTGCTTGGCAATCGCCGCAAGTGGCTGATGAAGGAGATGCTTTGGTAGCAGGAGGAGTGA
GTGAGACACCTTCATACCTTAGCT [ GCAAGAGTGAACGAAAGTCAAAAAAGTATTTC
TGCAACAGTTAGAGGCTTTTATGAAAGAACGTTGGACTTCTTGATTGCAAG ] GTAAAGA
AAGATGTGGTGAAGATAAGACAATAACCTAGTACATTTTCTCTACCTTTTGGCTTTCAAG
AGTACTGTGGGGTTAGGTGACAACTAAGTACCAATA . . . . AACTGGGAGGCCAA
ATGTTGCAAGTGGCCGAAATGCGACCAACAGCACCAGCCGCTGGTGAAGAGCAAACTCCG
TCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATGTTTTGGGAGAAAAGGATTAAGTACTCTAACTTAACT
TGATTCCAGTATTTTGAACAGTTGAAGAAAGCTGTGGGGCAGTTTGAACCTTGTATAGCATC
CGGTAAACCTGTGGCAGCAACCATGTGCATTGGCCGAGAGGAGATTGCATGGCGTGCCCC
CCGGCAGTGTGAGTGGCCTGGTGAAGCAGGTGATGATAGATTTCATCAGTTTGTGAT
TAGTAAGTCTTAAAAAACAACACTAGTGACATCTGTCTACAAATC. . .

```

EXON 3
ATCI-P3 sens

INTRON 3/4

EXON 4
GGG...ATG-P3 sens
[GCA...GAG]-deletion

INTRON 4/5

EXON 5
TAA...CAG=insertion
GIG...CTT-P3 antisens

B

```

T F T F Y A S E D K L E N R G N Y V 90
ACC TTC ACC TTC TAT GCG AGT GAA GAC AAG CTG GAG AAC AGG GGC AAC TAT GTC 270

L E K I S Q E V N E A A C D I A R 108
TTA GAG AAG ATA TCT GGG CAG GAA GTC AAT GAA GCT GCT TGC GAC ATC OCC CGA 324

Q V A D E G D A L V A G G V S Q T P 126
CAA GTG GCT GAT GAA OGA GAT GCT TTG GTA OCA OGA OGA GTG AGT CAG ACA CCT 378

S Y L S L T D S S I L N T L K K L C 144
TCA TAC CTT AGC TTA ACT GAT TCC AGT ATT TTG AAC ACG TTG AAG AAG CTG TGT 432

G Q L K P * * H P V N L W Q Q P C A 162
GGG CAG TTG AAA CCT TGA TAG CAT CCG GTA AAC CTG TGG CAG CAA CCA TGT GCA 486

L A Q K E I C M A C P P A S V Q C A 180
TTG GCC CAG AAG GAG ATT TOC ATG GCG TGC CCC CCG GCG AGT GTG CAG TGC GCC 540

```

C

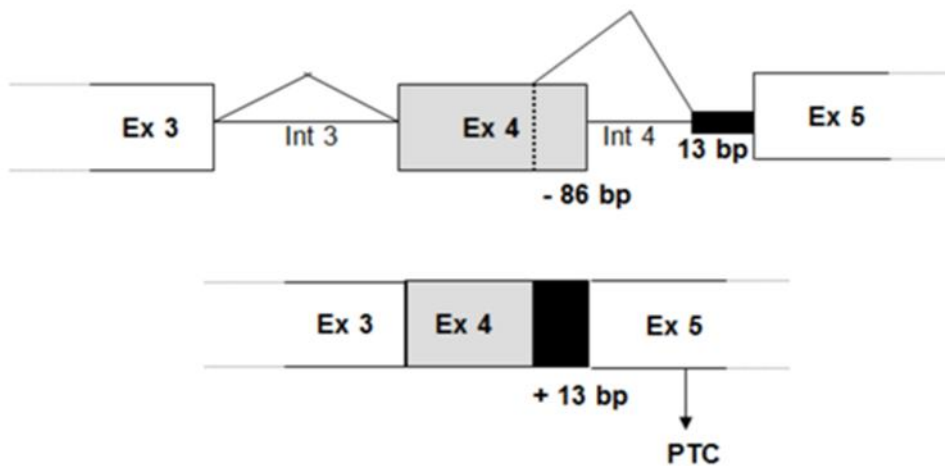


Figure 28 : (A): Séquence génomique de *BHMT* mettant en évidence les exons 3, 4 et 5 entrecoupés par les séquences introniques 4 et 5. La paire d'amorces P3 utilisée en RT-PCR est soulignée. La délétion de 86 pb à l'extrémité 3' de l'exon 4 est représentée entre crochets. L'insertion de 13 pb à l'extrémité 3' de l'intron 4 est indiquée dans l'encadré. **(B): Séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique correspondant au transcrit alternatif de 167 pb amplifié avec la paire d'amorces P3 en RT-PCR.** Les localisations de la délétion et de l'insertion sont indiquées. La délétion/insertion cause l'apparition d'un codon stop prématuré (PTC) dans l'exon 5 à la position 150. **(C): Schéma représentant le mécanisme d'épissage alternatif générant le transcrit court de *BHMT* dans les tissus tumoraux et les cellules HepG2.** PTC : codon stop prématuré.

3. Immunodétection de la protéine BHMT dans les tissus hépatiques sains et tumoraux adultes

Les résultats d'immunohistochimie montrent la présence de la protéine BHMT dans les tissus de foie sain mais non dans les tissus de foie cancéreux que ce soit un hépatocarcinome ou un cholangiocarcinome (Figure 29 A).

Les résultats de Western blot nous montrent que la protéine BHMT est exprimée à la taille attendue (45 kDa) dans les tissus sains adultes (C1, C2, C3, C4, C5 et C6) et fœtaux (F1 et F2). Par contre, l'expression de la protéine BHMT n'a pas été mise en évidence dans les cellules HepG2 que ce soit à 50%, 80% ou 100% de confluence et dans 5 échantillons tumoraux (T1, T2, T3, T5 and T6) parmi 6 étudiés. La protéine BHMT a cependant été retrouvée dans l'échantillon tumoral T4 de la même manière que dans le tissu sain C4 et ceci indique que l'absence d'expression de la protéine est fréquente mais non systématique dans les tumeurs hépatiques.

La protéine MS a été mise en évidence dans tous les échantillons à la taille attendue (150 kDa) mais à des taux variables. L'expression de MS est diminuée dans 4 des 6 échantillons tumoraux (T1, T2, T3 et T5) en comparaison avec les tissus sains correspondant (C1, C2, C3 et C5) et n'est pas altérée dans les cellules HepG2, ceci témoignant d'une régulation à la baisse non constante (Figure 29 B).

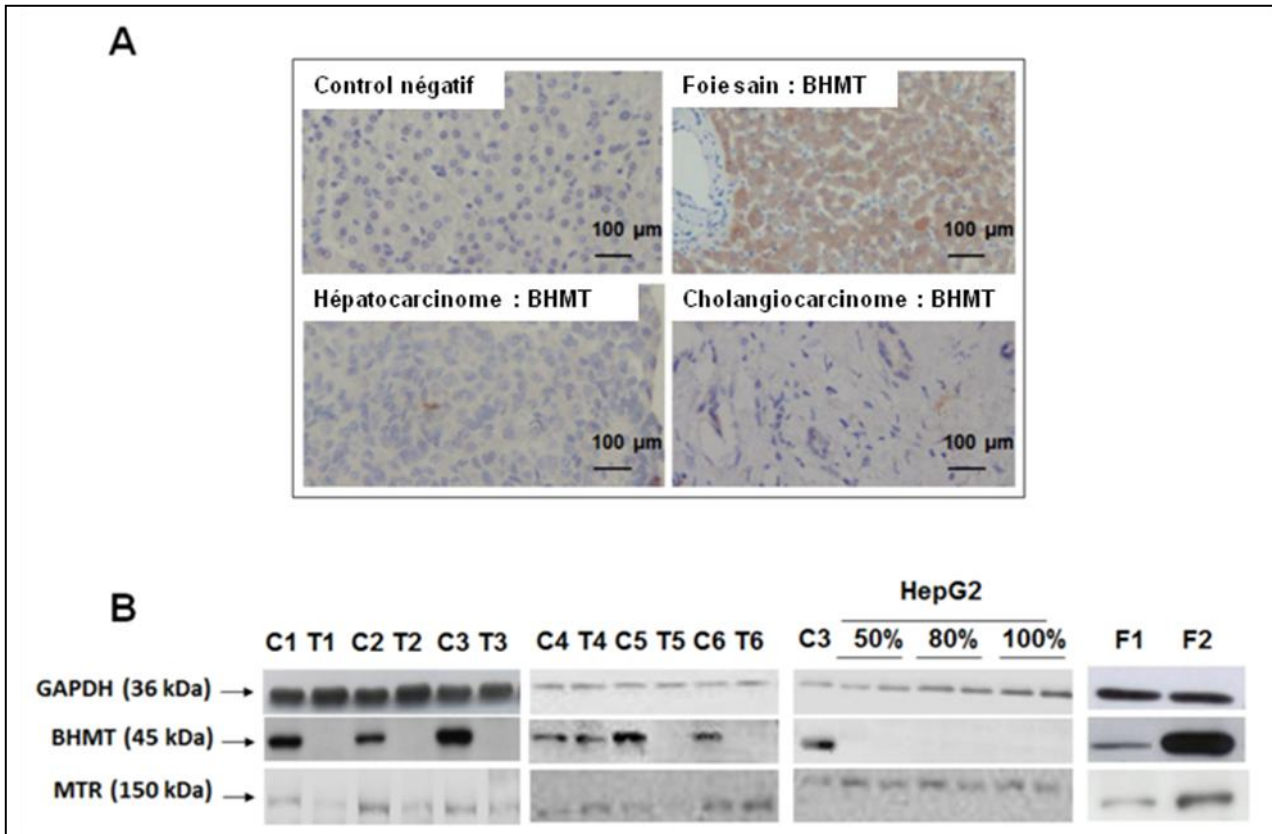


Figure 29 : (A): Résultats d'immunohistochimie pour l'étude de l'expression de la protéine BHMT dans les tissus sains et tumoraux. BHMT a été détectée dans le cytoplasme des hépatocytes dans le foie sain mais non dans le foie cancéreux qu'il s'agisse d'un hépatocarcinome ou d'un cholangiocarcinome. **(B): Résultats de Western blot pour l'étude de l'expression de la protéine BHMT.** BHMT a été détectée à la taille attendue (45 kDa) dans les échantillons de foie sain adulte (C1, C2, C3, C4, C5 et C6) et foetal (F1 et F2) ainsi que dans l'échantillon de foie tumoral T4 alors qu'aucune protéine n'a été mise en évidence dans les autres échantillons de foie tumoraux (T1, T2, T3, T5 et T6). La protéine n'a pas été observée dans les cellules HepG2 (confluentes à 50%, 80% et 100%). La protéine GAPDH a été utilisée comme standard interne pour confirmer l'égalité des dépôts de protéines.

4. Etude de l'activité enzymatique de BHMT

Dans le tissu tumoral T1 et les cellules HepG2, aucune activité enzymatique de BHMT n'a été observée alors qu'une activité enzymatique moyenne de 4,08 nmol/h/mg de protéines totales et de 2,25 nmol/h/mg de protéines totales a été

mesurée dans le tissu sain C1 et dans les tissus fœtaux F1 et F2 respectivement (Figure 30).

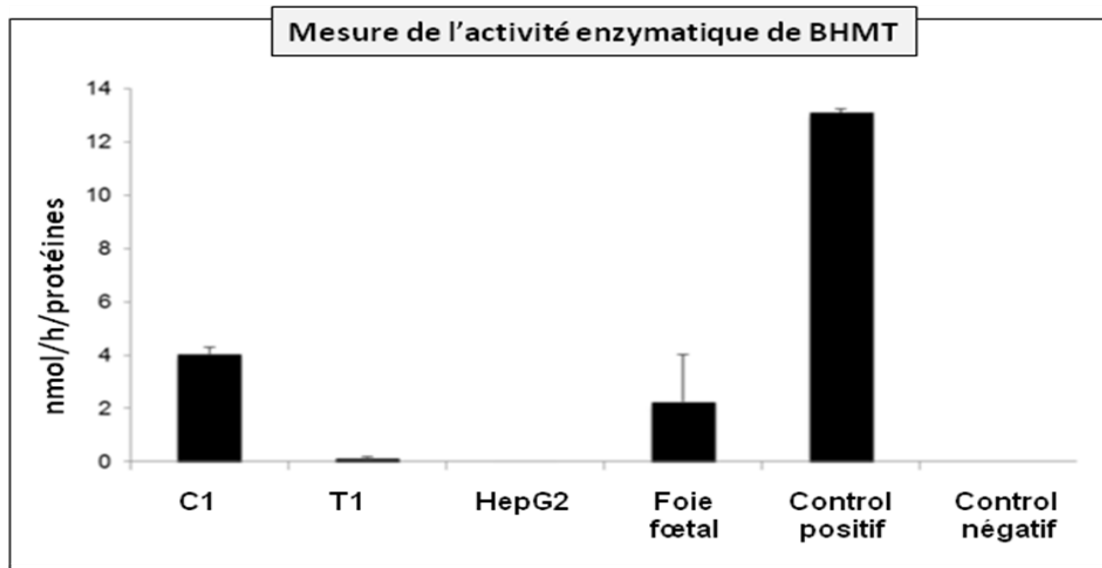


Figure 30 : Mesure de l'activité enzymatique de BHMT par dosage radioisotopique. Aucune activité enzymatique n'a été détectée dans l'échantillon de foie tumoral T1 et dans les cellules HepG2. Chaque échantillon a été mesuré en duplicate et l'histogramme représente la moyenne de deux expériences indépendantes \pm l'erreur standard à la moyenne.

PARTIE II : Etude des effets synergiques de la fumonisine B1 et de la carence en donneurs de méthyle sur les modifications épigénétiques au cours du développement chez le rat

1. La déficience en donneurs de méthyle et non le traitement par la fumonisine B1 provoque une diminution du poids et de la taille des fœtus

Aucun des groupes de mères ne montre une différence concernant le nombre de fœtus/portée, le gain de poids des mères, la prise de nourriture pendant l'acclimatation et la gestation, et le poids de l'utérus gravide (Tableau 5).

Traitements	No of fœtus/rates	Gain de poids des mères (g)	Prise alimentaire (g) (acclimatation)	Prise alimentaire (g) (gestation)	Poids utérus gravide (g)
Témoin (mères=2)	11,5 ± 0,5	121,5 ± 17,5	501,7 ± 16,4	284,9 ± 7,5	66,8 ± 3,6
Carencé (mères=3)	14,7 ± 1,8	137,7 ± 9,8	424,6 ± 36,5	264,0 ± 8,8	81,5 ± 12,8
FB1 (mères=2)	13,0 ± 0	141,5 ± 0,5	448,5 ± 10,2	289,1 ± 0,3	71,6 ± 0,8
Carencé/FB1 (mères=3)	13,3 ± 1,5	139,7 ± 1,2	445,0 ± 20,9	254,8 ± 2,4	67,8 ± 6,7

Tableau 5 : Effets d'une carence en donneurs de méthyle et d'un traitement par la fumonisine B1 (FB1) sur différents paramètres gestationnels. L'administration de FB1 et/ou l'exposition à un régime carencé en donneurs de méthyle n'affecte pas le nombre de fœtus par portée, le gain de poids des mères, la prise alimentaire pendant l'acclimatation et la gestation, et le poids de l'utérus gravide. ± représente l'erreur standard à la moyenne.

Aucune malformation macroscopique, mort *in utero* ou avortons ont été observés lors de la dissection (E20). Le régime déficient en donneur de méthyle seul diminue de manière significative le poids ($p=0,0020$) et la taille ($p=0,0089$) des fœtus par rapport au groupe témoin. Les mêmes observations sont faites pour le groupe carencé et traité avec la fumonisine B1 alors que le traitement par la fumonisine seul ne donne aucune différence significative (Tableau 6).

Traitements	Moyenne du poids corporel des fœtus (g)	Moyenne de la taille des fœtus (cm)
Témoin (n=23)	3,64 ± 0,05 ^a	3,60 ± 0,03 ^a
Carencé (n=39)	3,34 ± 0,07 ^b	3,50 ± 0,03 ^b
FB1 (n=25)	3,60 ± 0,08 ^a	3,58 ± 0,03 ^a
Carencé/FB1 (n=38)	3,22 ± 0,05 ^b	3,47 ± 0,02 ^b

Tableau 6 : Effets d'une carence en donneurs de méthyle et d'un traitement par la fumonisine B1 (FB1) sur le poids corporel et la taille des fœtus (E20). Les fœtus exposés à un régime carencé en donneurs de méthyle seul ou en association avec un traitement par la FB1 montrent une diminution significative de leur poids corporel et de leur taille par rapport au groupe témoin, tandis que le traitement FB1 seul ne montre aucune différence significative. n représente le nombre total de fœtus issus de toutes les portées à l'intérieur d'un même groupe. ± représente l'erreur standard à la moyenne et les moyennes dans chaque colonne ne partageant pas la même lettre en exposant sont significativement différentes.

2. La déficience en donneurs de méthyle seule ou associée à un traitement à la fumonisine B1 induit une hyperhomocystéinémie et une stéatose hépatique dans le foie des mères gestantes

La carence en donneurs de méthyle diminue de manière très significative la concentration plasmatique en folates (vitamine B9) ($p < 0,0001$) et en vitamine B12 ($p < 0,0001$) et augmente la concentration en HCY ($p = 0,002$) par rapport au groupe témoin. La fumonisine seule provoque également une diminution de la concentration plasmatique en folates ($p = 0,0011$) et en vitamine B12 ($p = 0,0096$) sans augmentation significative de l'HCY. Cependant, dans le groupe Carencé/FB1 l'augmentation de l'HCY ($p < 0,0001$) et la diminution des vitamines B9 ($p = 0,0002$) et B12 ($p < 0,0001$) est encore plus significative que dans le groupe carencé seulement (Figure 31 A). Le régime carencé induit une stéatose péricentrolobulaire de grade 1 dans le foie des mères gestantes, atteignant un grade 2 lors d'une association avec la fumonisine B1 (Figure 31 B).

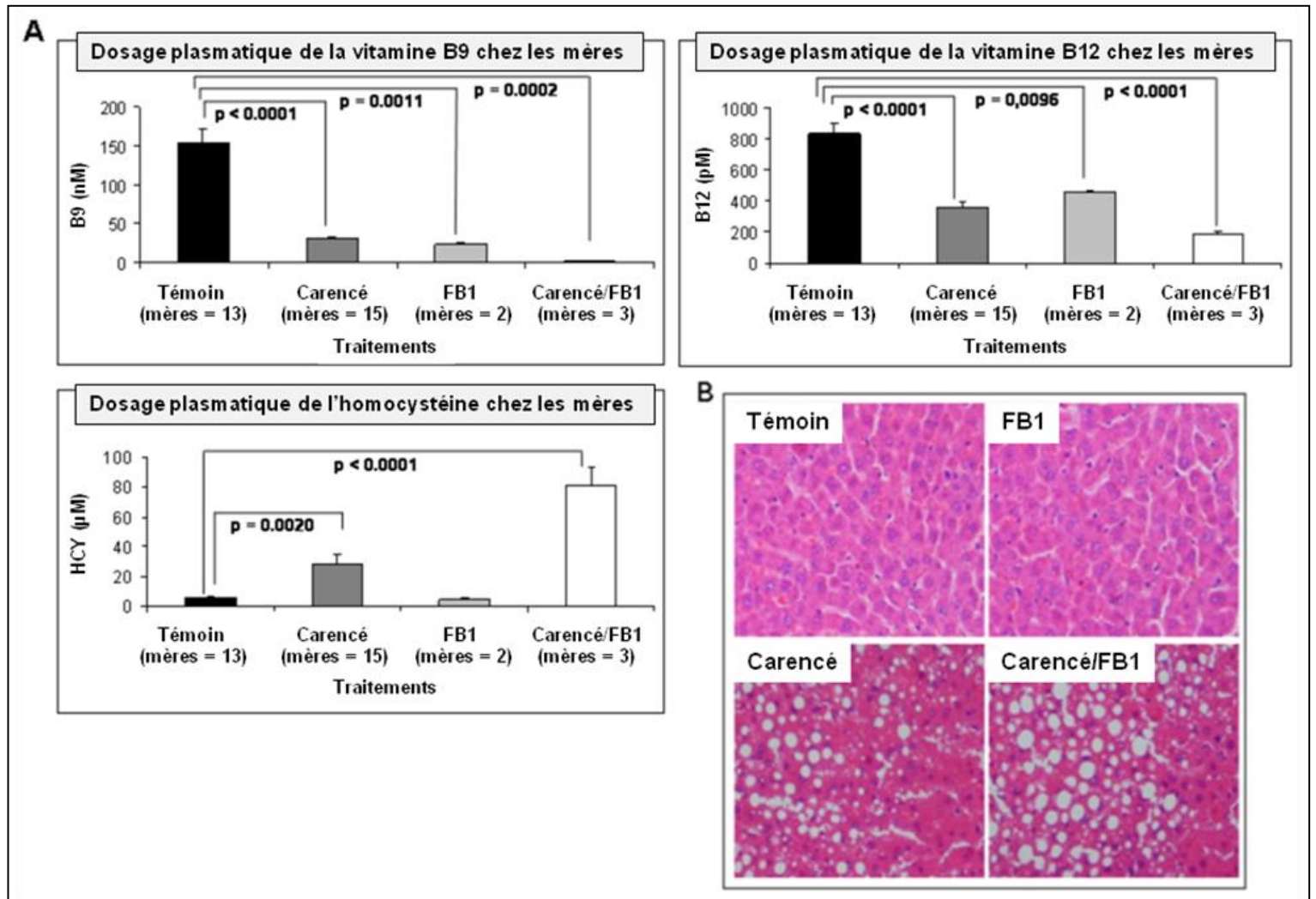


Figure 31 : (A): Résultats de dosages radioisotopiques (vitamine B9 et B12) et de spectrométrie de masse (homocystéine) - Effets de la carence en donneurs de méthyle et/ou de l'exposition à la fumonisine B1 (FB1) sur les concentrations plasmatiques des vitamines B9, B12 et homocystéine (HCY) chez les mères. Les concentrations en vitamines B9 et B12 sont diminuées et la concentration en HCY est significativement augmentée chez les mères exposées à un régime carencé en donneurs de méthyle seul ou avec l'administration de FB1 par rapport au groupe témoin. Chaque échantillon a été analysé en duplicate dans 3 expériences indépendantes et les moyennes ont été comparées par ANOVA. Les histogrammes représentent les moyennes et les erreurs standards à la moyenne. **(B): Résultats d'immunohistochimie - Etude histologique des foies des mères gestantes nourries avec un régime déficient en donneurs de méthyle associé ou non à une exposition à la fumonisine B1.** L'étude morphologique révèle que la

stéatose péricentrolobulaire induite par la carence en donneurs de méthyle est aggravée par l'administration de FB1.

3. Contrairement à la déficience en donneurs de méthyle seule, le traitement par la fumonisine seule n'est pas corrélé avec une faible concentration en folates dans le foie des fœtus mais l'association des deux conditions induit une diminution du ratio SAM/SAH

Dans les foies fœtaux, la carence en donneurs de méthyle induit une diminution significative de la concentration tissulaire en folates ($p < 0,0001$) et en vitamine B12 ($p = 0,0029$) par rapport au groupe témoin (Figure 32). Dans le groupe Carencé/FB1, les concentrations en folates ($p < 0,0001$) et en vitamine B12 ($p = 0,0021$) sont également significativement diminuées. La fumonisine B1 seule n'affecte pas les concentrations tissulaires en folates et en vitamine B12 mais diminue le ratio SAM/SAH ($p = 0.0046$) de la même manière que la carence en donneurs de méthyle ($p = 0.0031$) et la carence associée à la fumonisine B1 ($p = 0.009$).

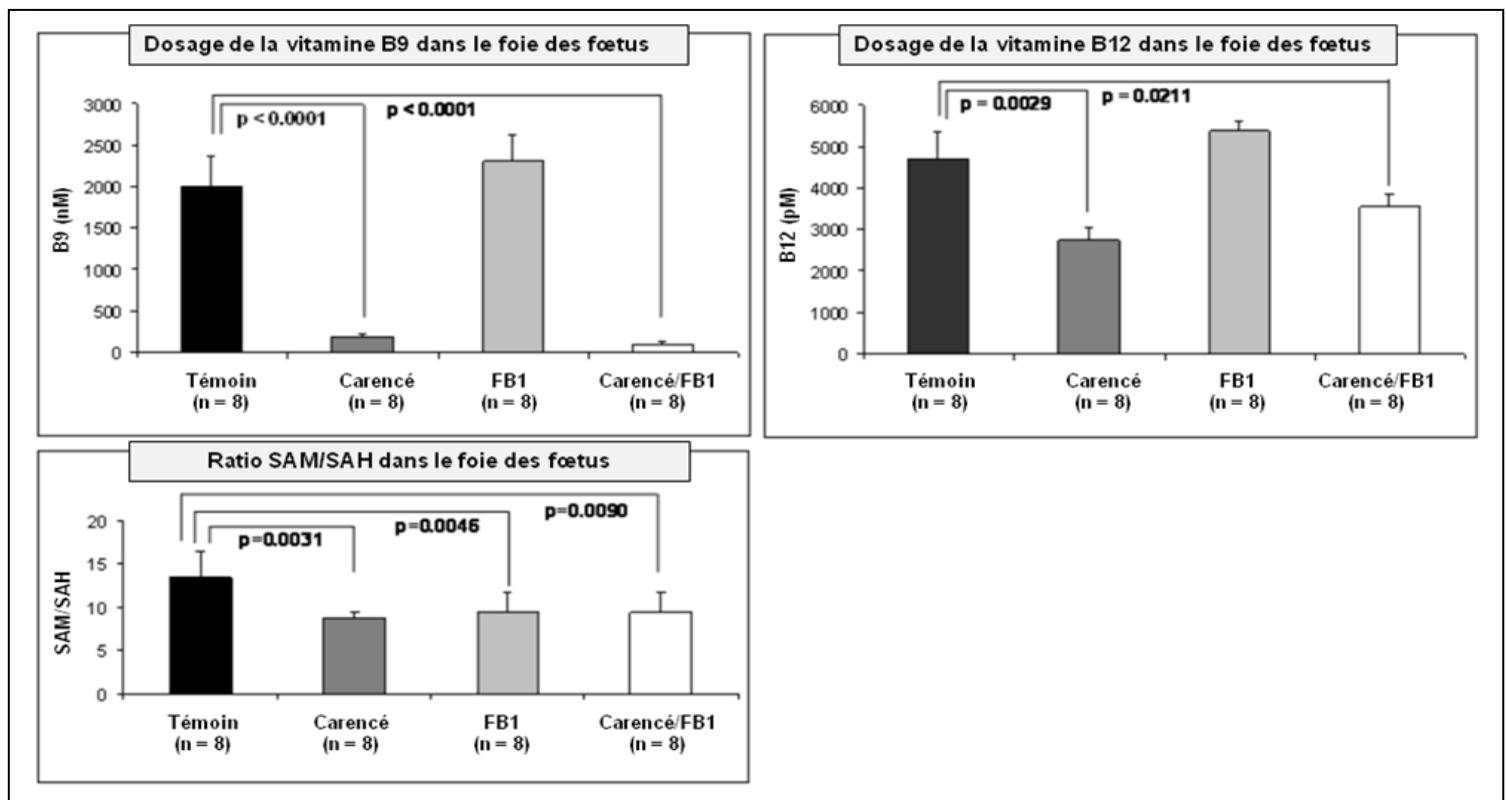


Figure 32: Résultats des dosages radioisotopiques (vitamine B9 et B12) et d'HPLC (SAM/SAH) - Effets d'une carence en donneurs de méthyle et de la

fumonisine sur les concentrations hépatiques en vitamines B9, B12 et SAM/SAH. Les concentrations hépatiques en folates et vitamine B12 sont réduites dans les groupes carencé et Carencé/FB1 par rapport au groupe Témoin. Le ratio SAM/SAH est significativement diminué dans le foie des fœtus issus de mères exposées au régime carencé seul, à la fumonisine seule, ou aux deux traitements associés par rapport au groupe Témoin. *n* représente le nombre de fœtus choisis au hasard et analyses dans chaque groupe. Les histogrammes représentent les moyennes et les erreurs standards à la moyenne. Chaque échantillon a été testé en duplicate dans 3 expériences indépendantes et les moyennes ont été comparées par ANOVA.

4. Le traitement par la fumonisine B1 diminue l'expression des transcrits des récepteurs des folates (*FR* et *Slc19a1*)

La carence en donneurs de méthyle entraîne une surexpression des transcrits *FR* et *Slc19a1*. *FR* est significativement augmenté dans le groupe Carencé comparé au groupe Témoin ($p= 0,0133$) et dans le groupe Carencé/FB1 comparé au groupe FB1 ($p= 0,0272$). *Slc19a1* est significativement augmenté dans le groupe Carencé comparé au groupe Témoin ($p= 0,0018$) et de manière non significative dans le groupe Carencé/FB1 comparé au groupe FB1 ($p=0,6044$) (Figure 33).

Toutefois, il ne peut être exclu que l'exposition combinée à une carence en donneurs de méthyle et à la fumonisine B1 inverse la surexpression de *FR* et *Slc19a1* observée dans le groupe Carencé. Ce mécanisme montre un impact plus prononcé pour les transcrits *FR* que pour les transcrits *Slc19a1*. Les résultats montrent que les taux de transcrits *FR* sont similaires dans les groupes Témoin et Carencé/FB1. De plus, le taux de transcrits est plus faible dans le groupe Carencé/FB1 comparé au groupe Carencé ($p= 0,0078$). Le taux de transcrits *Slc19a1* suit le même profil mais de manière non significative ($p=0,0607$).

Une exposition à la fumonisine B1 résulte en une diminution des transcrits *FR* par rapport au groupe Témoin ($p= 0,0157$), alors que les transcrits *Slc19a1* sont augmentés de manière non significative ($p=0,2795$). Ce résultat renforce l'hypothèse que l'un des mécanismes par lequel la fumonisine altère le transport des folates se ferait par interférence avec le métabolisme des sphingolipides.

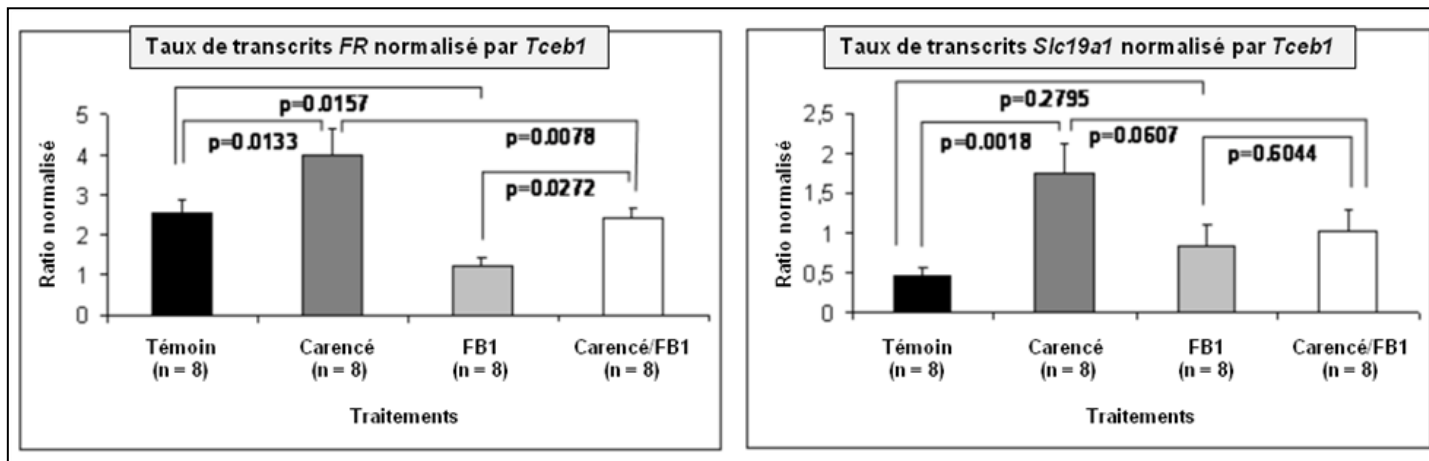


Figure 33: Résultats de RT-qPCR - Effets de la carence en donneurs de méthyle associée ou non à une exposition à la fumonisine B1 (FB1) sur la transcription des gènes codant pour les récepteurs des folates FR et Slc19a1. En comparant les groupes Carencé avec Témoin, et les groupes Carencé/FB1 avec FB1, les taux de transcrits indiquent que la transcription des récepteurs des folates est régulée à la hausse indifféremment du traitement avec la fumonisine B1. Cependant, une exposition combinée au régime carencé et à la fumonisine B1 pourrait neutraliser cette surexpression puisque les transcrits FR et Slc19a1 sont diminués dans le groupe Carencé/FB1 comparé au groupe Carencé. Une exposition à la fumonisine B1 seule réduit le taux d'expression de *FR* mais pas de *Slc19a1*. n représente le nombre de fœtus choisis au hasard et analysés dans chaque groupe. Les histogrammes représentent les moyennes et les erreurs standards à la moyenne. Chaque échantillon a été testé en duplicate dans 3 expériences indépendantes et les moyennes ont été comparées par ANOVA.

5. Un stress généré par l'association entre carence en donneurs de méthyle et traitement par la fumonisine B1 conduit à une diminution de la méthylation de H4K20me3 et à une augmentation de H3K9me3

Les modifications des histones ont été comparées entre les 3 groupes traités et le groupe Témoin. La carence en donneurs de méthyle induit une diminution significative de H4K20me3 ($p=0.0297$) sans altération significative de H3K9me3. L'association de la carence avec l'exposition à la fumonisine B1 génère une

diminution significative de H4K20me3 ($p=0.0083$) avec une augmentation de H3K9me3 ($p=0.0005$). En amplifiant le stress métabolique par l'ajout de la fumonisine B1 à la carence, cela pourrait déclencher un mécanisme de défense dans la cellule pour tenter de résister à la désorganisation de l'hétérochromatine. H3R2me2 est également diminué dans le groupe Carencé par rapport au groupe Témoin, mais la différence n'est pas significative ($p=0.1572$). Cependant, dans le groupe Carencé/FB1, H3R2me2 est significativement augmenté par rapport au groupe Carencé ($p=0.0062$). Le profil de H4K16Ac est similaire à celui de H3R2me2 mais les variations observées ne sont pas significatives. La carence en donneurs de méthyle seule provoque une diminution de H4K16ac comparé au groupe Témoin. Dans le groupe Carencé/FB1, H4K16ac est légèrement augmenté par rapport au groupe Carencé (Figure 34).

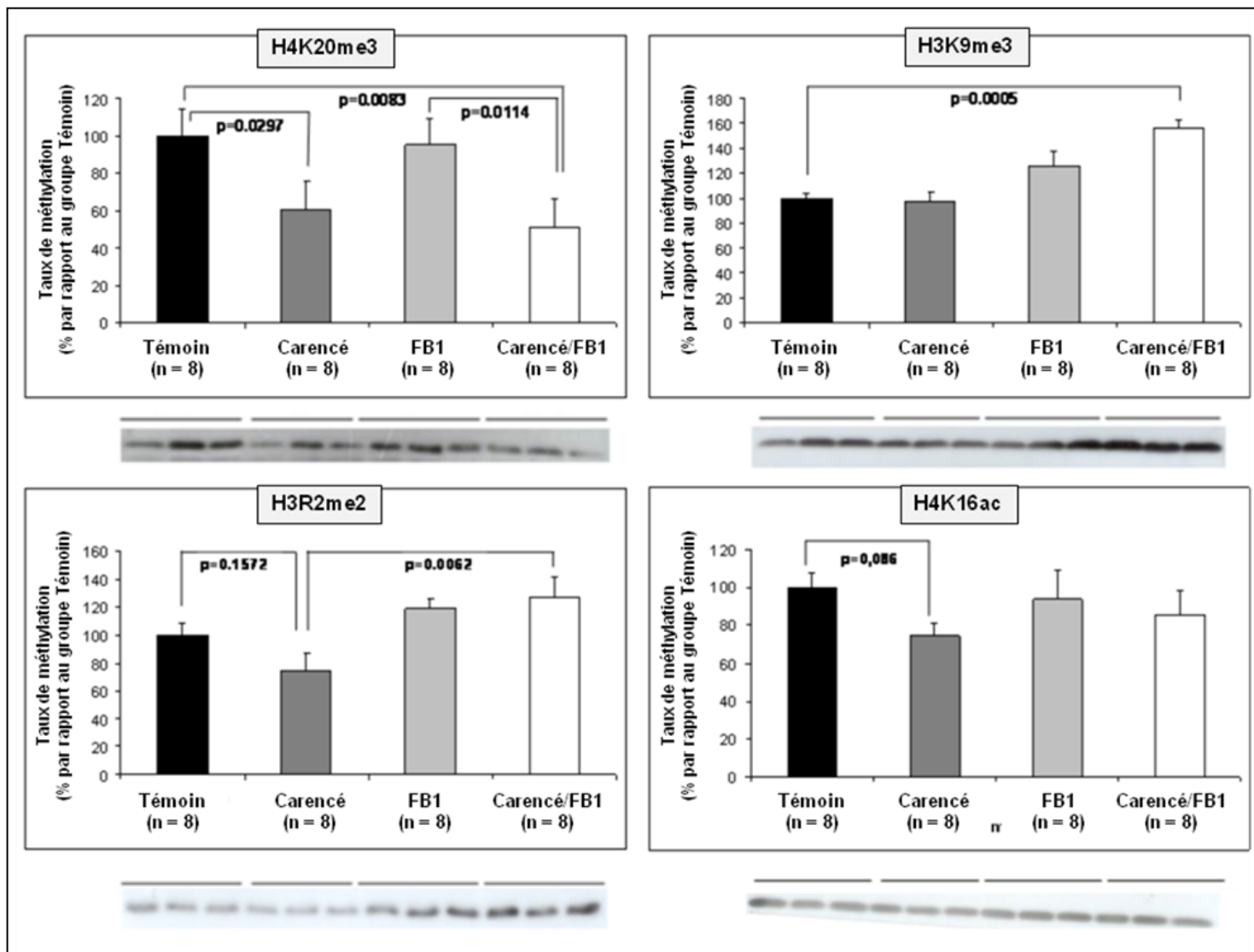


Figure 34 : Résultats de Western blot - Effets de la carence en donneurs de méthyle et de l'exposition à la fumonisine B1 (FB1) sur 4 marques de l'assemblage de l'hétérochromatine. La carence en donneurs de méthyle induit une diminution de H4K20me3 et de H4K16ac en comparaison avec le groupe Témoin. Une exposition combinée à la carence et à la fumonisine B1 provoque une diminution de H4K20me3 et une augmentation de H3K9me3. Cette variation inverse témoignerait d'un mécanisme de défense de la cellule pour résister à la désorganisation de l'hétérochromatine. Dans le groupe Carencé/FB1, H3R2me2 et H4K16ac sont également augmentés en accord avec le mécanisme de défense mis en place par les cellules. n représente le nombre de fœtus choisis au hasard et analyses dans chaque groupe. Les histogrammes représentent les moyennes et les erreurs standards à la moyenne. Chaque échantillon a été testé en duplicate dans 3 expériences indépendantes et les moyennes ont été comparées par ANOVA.

**CONCLUSION
DISCUSSION
PERSPECTIVES**

CONCLUSION/DISCUSSION

PARTIE 1 : Caractérisation de l'expression des enzymes de la voie de reméthylation dans le cancer hépatique.

Notre étude a démontré une forte réduction d'expression des gènes *BHMT* et *BHMT2* dans les cellules HepG2 et dans les tissus de foie cancéreux. Un variant alternatif de *BHMT* a été identifié alors que le transcrite *BHMT2* a été détecté à la taille attendue. Le transcrite alternatif de *BHMT* résulte d'un mécanisme d'épissage aberrant. S'il avait été recherché auparavant, il aurait peut-être pu expliquer la diminution des taux d'ARNm de *BHMT* précédemment démontrée dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains (*M.A. Avila et al, 2000*) et à la diminution de la protéine BHMT dans les hépatocarcinomes (*C.R. Liang et al, 2005; W. Sun et al, 2007*). La voie de reméthylation de l'HCY dépendante de la bétaine est donc complètement abolie dans les cellules HepG2 et ceci est confirmé par l'absence totale d'activité enzymatique de BHMT. Contrairement à une précédente étude dans laquelle *MTR* est également diminuée dans l'hépatocarcinome (*C.R. Liang et al, 2005*), nos résultats ne montrent aucune différence des ARNm de *MTR* entre les tissus sains et tumoraux. Cette contradiction peut être due aux différences histologiques entre les tumeurs ou aux modalités techniques de séparation entre tissu sain et tissu cancéreux.

Au niveau moléculaire, notre étude a révélé la présence d'un transcrite alternatif ayant une taille inférieure dans les cellules HepG2 et dans les tissus tumoraux mais non dans les tissus sains. L'analyse par séquençage de ce transcrite a confirmé un profil d'épissage complexe associant une délétion partielle de 86 pb correspondant à la région 3' l'exon 4 et une insertion de 13 pb correspondant à la région 3' de l'intron 4. Cette variation génétique est effectivement apparue au niveau transcriptionnel, alors qu'au niveau de l'ADN génomique, dans les mêmes échantillons tumoraux, aucune variation n'a été démontrée. Jusqu'à présent, des variants de BHMT ont été signalés à la suite, soit de modifications post-transcriptionnelles (*A. Ichikawa et al, 2004*), soit de modifications génomiques, principalement avec des polymorphismes dont certains d'entre eux ont été associés avec l'activité enzymatique et le taux d'expression protéique (*Q. Feng et al, 2011*). Aucun phénomène d'épissage alternatif concernant *BHMT* n'a encore été publié jusqu'à aujourd'hui. Le variant d'épissage

que nous décrivons dans cette étude ne correspond donc à aucun mécanisme d'épissage connu.

Le décalage du cadre de lecture résultant de cette variation génétique induit l'apparition d'un codon stop prématuré qui pourrait aboutir à la synthèse d'une protéine tronquée et non fonctionnelle. Puisque le codon stop prématuré est localisé à plus de 50 nucléotides en amont de la jonction exon-exon suivante, il pourrait être également la cible du système « nonsense-mediated mRNA decay » (NMD) qui dégrade les ARNm anormaux par les extrémités 3' et 5' à la fois (*R.E. Green et al, 2003; K.E. Baker et R. Parker, 2004*).

La dégradation rapide du transcrit serait en accord avec le très faible taux de transcrits BHMT et l'absence de protéine immune-réactive dans les cellules HepG2 et les tissus tumoraux. Cette constatation est également en accord avec les résultats de Ji. et al. qui trouvent que la protéine BHMT n'est pas détectée par Western blot dans les cellules HepG2 (*C. Ji et al., 2007*). Ils ont associé l'absence de protéine à un faible taux de transcrits normaux de BHMT mais ils n'ont pas amplifié le transcrit avec des amorces chevauchant les exons 3/4-exon 5. Dans notre étude, l'amplification de *BHMT* avec une paire d'amorces chevauchant les exons 3/4-exon 5 (P3) a permis de détecter le variant d'épissage et de proposer qu'il est responsable de l'absence de production de la protéine. Cependant, il convient de noter que la non expression de la protéine BHMT est fréquente mais non constante dans les tissus tumoraux. En effet, BHMT n'a pas été détectée dans les cellules HepG2 et dans 5 des 6 échantillons de tissu tumoral analysés (Figure 35).

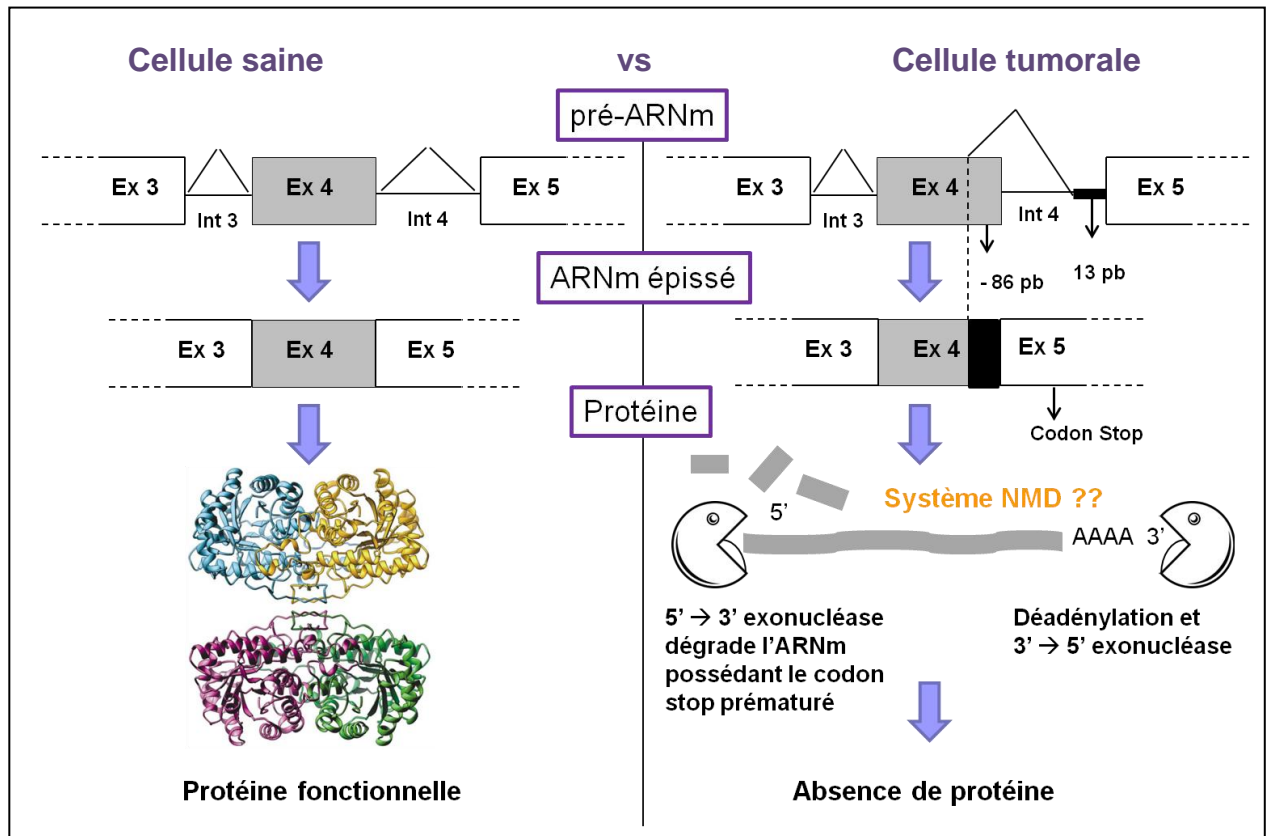


Figure 35 : Schéma bilan représentant le mécanisme d'épissage provoquant l'apparition d'un transcrit de taille inférieure dans les cellules tumorales hépatiques. La délétion/insertion provoque l'apparition d'un codon stop prématuré susceptible d'être reconnu par le système « nonsense mediated decay » (NMD) responsable de la dégradation des transcrits anormaux. Ceci permet d'éviter la production de protéines tronquées non fonctionnelles. C'est un contrôle qualité des ARNm chez les eucaryotes (R.E. Green et al, 2003; K.E. Baker et R. Parker, 2004).

Contrairement aux cellules normales, beaucoup de cellules cancéreuses ne peuvent proliférer dans un milieu où la méthionine a été remplacée par l'HCY (B.C. Halpern et al, 1974; J.O. Mecham et al, 1983).

Cette caractéristique phénotypique est connue sous le nom de « méthionine dépendance ». La méthionine dépendance dans les cellules HepG2 a été liée à une diminution de l'activité de reméthylation de l'HCY associée à une faible activité de MS (H. Ashe et al, 1974; A. Chango et al, 2009) et cette activité pourrait être augmentée par la cobalamine (V. Marguerite et al, 2007). La BHMT est impliquée à raison de 50% dans la régénération de la méthionine à partir de l'HCY dans les hépatocytes normaux (J.D. Finkelstein et J.J. Martin, 1984). Nos résultats suggèrent que la perte de fonction de la BHMT peut contribuer à la « méthionine dépendance »

des cellules cancéreuses. La diminution dramatique de la BHMT dans les cellules HepG2 et les tissus cancéreux produit une réduction dramatique du taux de reméthylation de l'HCY et par voie de conséquence une diminution de production de SAM. La baisse de concentration de SAM est aggravée par le fait que dans l'hépatocarcinome l'isoforme MAT1A est sous exprimé or c'est l'isoforme le plus actif pour le maintien de taux élevés de SAM et sa concentration est positivement corrélée à la méthylation de l'ADN. Ces résultats soulignent que des défauts de méthylation pourraient participer à la cancérogenèse hépatique (J.M. Mato et al, 2008) (Figure 36).

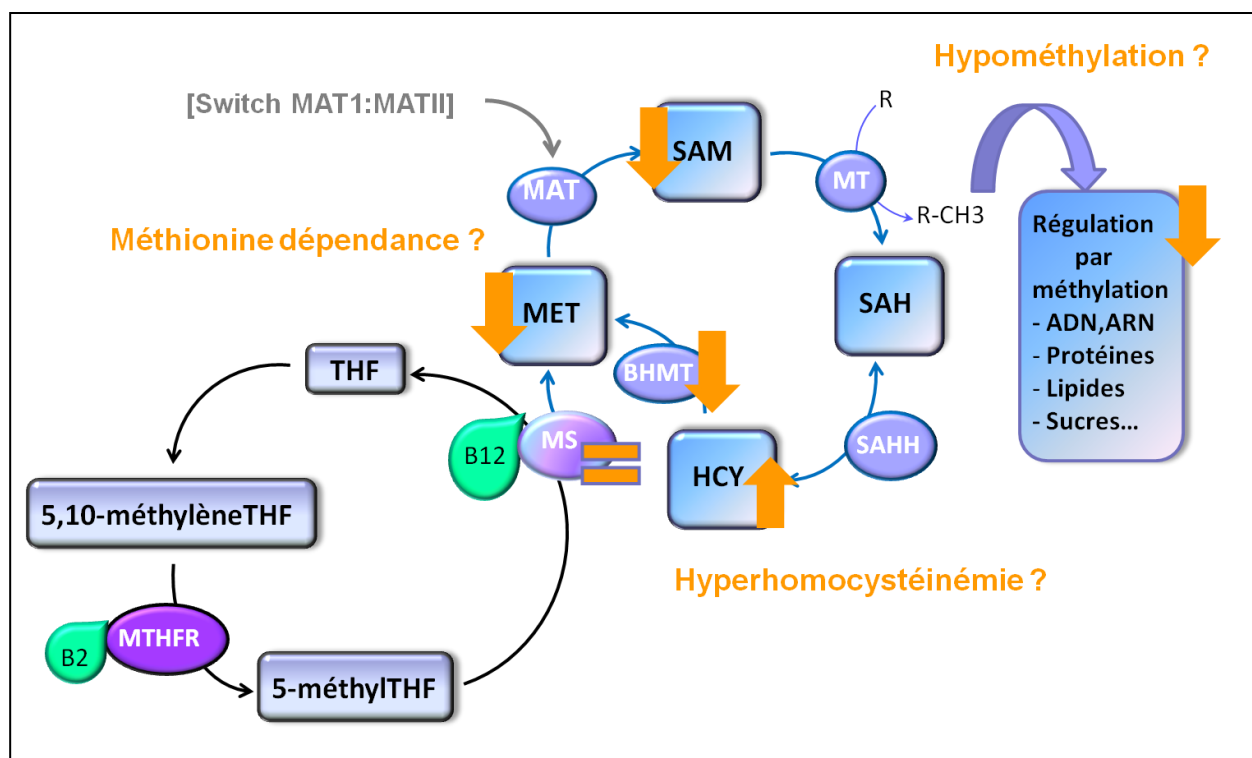


Figure 36 : Cycle des monocarbone remplaçant les différents résultats obtenus dans les cellules tumorales hépatiques et les conséquences de l'abolition de la voie de reméthylation dépendante de la BHMT qui participe pour 50% à la reméthylation de l'HCY dans le foie. L'expression de BHMT étant diminuée et l'expression de la MS étant inchangée, les résultats de notre étude suggèrent une diminution de la reméthylation de l'HCY, donc une augmentation de l'HCY ainsi qu'une diminution de la méthionine pouvant participer au phénomène de méthionine dépendance des cellules tumorales. Ceci peut aboutir à une diminution de la SAM, principal donneur de méthyle dans l'organisme et à une hypométhylation de certains oncogènes

pouvant intervenir dans la cancérogenèse hépatique. Cela est renforcé par le fait que l'isoforme MAT1 est diminué par rapport à l'isoforme MAT2.

Pour résumer, nous avons observé une diminution drastique de l'expression et de l'activité de BHMT dans les cellules HepG2 et dans les tissus hépatiques cancéreux, ce qui résulte d'un épissage alternatif de BHMT dans l'exon 4. Le variant de transcription produit un décalage du cadre de lecture avec un codon stop prématuré dans l'exon 5 qui mène à une perte de fonction du gène. Ce mécanisme moléculaire de l'expression altérée de BHMT peut expliquer une partie de la méthionine dépendance des carcinomes hépatocellulaires. Le fait que cette transcription anormale de BHMT soit la cause ou la conséquence de la carcinogenèse hépatique mérite des investigations complémentaires.

PARTIE 2 : Etude des effets synergiques de la fumonisine B1 et de la carence en donneurs de méthyle sur les modifications épigénétiques au cours du développement chez le rat

Comme prévu, le régime alimentaire déficient en donneurs de méthyle utilisé dans cette étude induit, chez les mères gestantes, une réduction de la concentration plasmatique en folates et en vitamine B12 ainsi qu'une augmentation de l'HCY. Il produit un épuisement du stock de donneurs de méthyle dans les cellules et un ralentissement des enzymes impliquées dans le cycle de la méthionine (*S. Blaise et al, 2005; S. Blaise et al, 2007*).

L'exposition à la fumonisine B1 (FB1) seule n'a pas suffi à augmenter la concentration plasmatique en HCY chez les mères gestantes ; toutefois lorsque FB1 est combinée à un régime carencé en donneurs de méthyle, une augmentation de l'HCY est observée et ce, de manière plus accrue que lors de l'utilisation du régime carencé seul. En outre, FB1 aggrave la stéatose hépatique péricentrolobulaire induite par le régime carencé dans le foie des mères gestantes, ce qui indique que l'association de ces deux facteurs est plus nocive que chaque facteur indépendamment.

Le régime carencé en donneurs de méthyle seul est corrélé à une diminution du poids corporel et de la taille des fœtus et provoque une diminution de la vitamine B12, des folates et du ratio SAM / SAH dans le foie des fœtus. Il est à noter que le traitement par FB1 seul produit une diminution du ratio SAM / SAH dans le foie des fœtus mais ne modifie pas la concentration tissulaire en folates et en vitamine B12, ceci pouvant être attribué à la faible dose de FB1 administrée (4 µg / kg / j). Cette faible dose a été utilisée intentionnellement car FB1 est présente à de faibles taux dans le maïs à travers le monde. Les humains sont exposés de manière chronique à des concentrations de FB1 ne dépassant pas largement la dose journalière tolérable (DJT à 2 pg / kg / j). Utiliser une dose élevée de FB1 ne permettrait pas de reproduire l'exposition réelle chez l'homme et l'utilisation de doses faibles de FB1 offre la possibilité de caractériser un niveau de seuil au-delà duquel les effets cellulaires sont observables.

Un mécanisme moléculaire d'adaptation à la carence en folates (*I. Ifergan et Y.G. Assaraf, 2008*) a été déclenché par l'activation de la transcription des gènes codant les récepteurs des folates FR et Slc19a1 dans le foie des fœtus. Globalement, nos résultats montrent que la transcription de *FR* et *Slc19a1* est augmentée par l'administration d'un régime carencé en donneurs de méthyle indépendamment du traitement avec FB1. Toutefois, l'exposition à FB1 peut provoquer des changements subtils dans la transcription des récepteurs des folates puisque l'association Carence/FB1 semble antagoniser l'adaptation à la carence en folate. Le régime carencé seul augmente de façon significative *FR* et *Slc19a1* en comparaison avec le régime témoin, mais ces 2 récepteurs ne varient pas de manière significative entre les groupes Témoin et Carencé/FB1. De plus, les transcrits *FR* et *Slc19a1* sont significativement diminués dans le groupe Carencé/FB1 par rapport au groupe Carencé. Cet effet neutralisant est plus prononcé pour les transcrits *FR* ce qui est compatible avec une interaction préférentielle entre FB1 et FR. La superposition de l'administration de FB1 à la carence en donneurs de méthyle pourrait aggraver l'environnement maternel défavorable et rendre encore plus difficile l'adaptation du fœtus à la déplétion en folates.

Plus important encore, FB1 a réduit la transcription de *FR* chez les fœtus nourris avec le régime normal mais n'a pas réduit la transcription de *Slc19a1*. FR est une protéine à ancre GPI associée à des domaines membranaires enrichis en sphingolipides (*V.L. Stevens et J. Tang, 1997*). Ce résultat est conforme aux travaux

antérieurs montrant que FB1 est impliqué dans la perturbation du métabolisme des sphingolipides (*K.A. Voss et al, 2009; J. Gelineau-van Waes et al, 2005*). Deux contraintes doivent cependant être soulignées. Tout d'abord, seuls les transcrits des récepteurs des folates ont été mesurés et il n'est pas connu si les protéines ont été conservées ou non. Deuxièmement, FR est associé à des domaines membranaires enrichis en sphingolipides, mais aussi en cholestérol et plasminogène. Des interactions possibles entre FB1 et ces structures complexes devraient donc également être considérées.

De toutes les modifications des histones analysées, le régime carencé en donneurs de méthyle induit seulement une diminution significative de H4K20me3. H4K20me3 (en association avec H3K9me3, les « heterochromatin protein 1 » (HP1) et la méthylation de l'ADN) est une marque conservée de l'hétérochromatine constitutive qui contribue au maintien de la stabilité du génome (*S.I. Grewal et S. Jia, 2007; H. Yang et C.A. Mizzen, 2009*). Une perte de H4K20me3 induite par le régime carencé peut donc contribuer à affaiblir l'organisation de l'hétérochromatine et peut interférer avec l'expression appropriée des gènes, conduisant ainsi à une altération des fonctions cellulaires. L'un des mécanismes moléculaires expliquant l'instabilité de l'ADN observé chez les rongeurs exposés à un régime carencé en groupements méthyles (*J.J. Liu et R.L. Ward, 2010*) peut être le faible taux de H4K20me3.

La famille des protéines HP1 est un constituant majeur de l'hétérochromatine. HP1 α et HP1 β se lie à H3K9me3 afin d'établir une chromatine condensée transcriptionnellement inactive (*W. Zeng et al, 2010, J.C. Black et J.R. Whetstine, 2011*). Il a été montré que la triméthylation de H4K20 ne survient qu'après la liaison de HP1 à H3K9me3 (*G. Schotta, et al, 2004; N. Kourmouli et al, 2004*).

Nous montrons dans ce travail que lorsque les mères gestantes sont exposées à la combinaison [régime carencé en donneurs de méthyle et FB1], une diminution significative de H4K20me3 et une augmentation significative de H3K9me3 sont observées dans le foie des fœtus. Tout cela se produit comme si l'augmentation de H3K9me3 était une tentative de sauvetage pour restaurer H4K20me3 à un niveau normal. FB1, même à des concentrations modérément élevées, ajoute un stress métabolique supplémentaire à la cellule qui tente alors d'échapper à ce contexte difficile et de préserver ses fonctions par l'élaboration d'un mécanisme de défense, qui lui permet de résister à la désorganisation de l'hétérochromatine. Cette interaction réciproque entre H4K20me3 et H3K9me3 a été décrite précédemment

chez des rats adultes exposés à un régime carencé, mais pendant une période prolongée de 54 semaines à la fin de laquelle des tumeurs du foie se sont développées (*J.P. Pogribny et al, 2006*). Dans notre étude, les mères gestantes ont été exposées à la carence en donneurs de méthyle pour une période relativement courte, un mois avant l'accouplement, puis durant la gestation et jusqu'au 20^{ème} jour de gestation. Le stress métabolique induit par le régime carencé seul, au cours de cette période, peut ne pas être suffisant pour provoquer ce mécanisme de défense chez les fœtus, par contre l'addition de FB1 renforce la menace et entraîne plus rapidement la cellule vers le seuil de défense.

L'assemblage de l'hétérochromatine dépend d'un grand nombre de protéines qui mettent en œuvre plusieurs marques distinctes autres que H4K20me3 et H3K9me3. La marque H3R2me2 a été retrouvée dans des loci hétérochromatiques et au niveau de gènes inactifs dans l'euchromatine (*A. Kirmizis et al, 2007*). Le régime carencé en donneurs de méthyle seul provoque une diminution de H3R2me2 alors que l'exposition combinée au régime carencé et à l'administration de FB1 entraîne une augmentation de H3R2me2. La différence entre ces 2 expositions est statistiquement significative. Ce résultat est en accord avec le mécanisme de seuil de défense. Le stress métabolique supplémentaire représenté par l'exposition à la fois au régime carencé et à FB1 constitue un "second hit" guidant la cellule pour augmenter H3R2me2 afin de résister à la désorganisation de l'hétérochromatine.

Un résidu de l'histone H4 supplémentaire, H4K16, peut être considéré comme un site d'ancrage qui recrute le complexe Sir2-Sir3-Sir4 nécessaire à l'établissement de l'hétérochromatine (Sir: « silent information regulator ») (*A. Johnson et al, 2009*). En effet, la chromatine acétylée permet la liaison de Sir2/Sir4. Sir2 est une histone déacétylase NAD-dépendante qui déacétyle spécifiquement H4K16. Sir3 se lie à H4K16 déacétylée et réprime la chromatine.

Dans notre étude, le profil d'expression de H4K16Ac est similaire à H3R2me2 mais les variations ne sont pas statistiquement significatives. Les niveaux de H4K16Ac sont inférieurs dans le groupe Carencé par rapport au groupe Témoin, mais sont plus élevés dans le groupe Carencé/FB1 comparé au groupe Carencé.

Le fait que les facteurs environnementaux ne touchent pas de la même manière les modifications des histones et les marques de l'hétérochromatine n'est pas surprenant. L'analyse de puces à ADN de l'expression génique globale dans les cellules KB (carcinome nasopharyngien humain) cultivées en absence de folates

puis avec restauration de l'acide folique a révélé que seulement huit gènes ont répondu à la variation des niveaux de folates (M.S. Jhaveri et al, 2001). Parmi ces gènes certains étaient surexprimés et d'autres sous exprimés, certains étaient hyperméthylés et d'autres hypométhylés. Ainsi, la carence en donneurs de méthyle est gène spécifique et n'altère pas de manière uniforme les modifications épigénétiques. Il est probable que ce soit également le cas pour d'autres facteurs environnementaux tels que la FB1 (Figure 37).

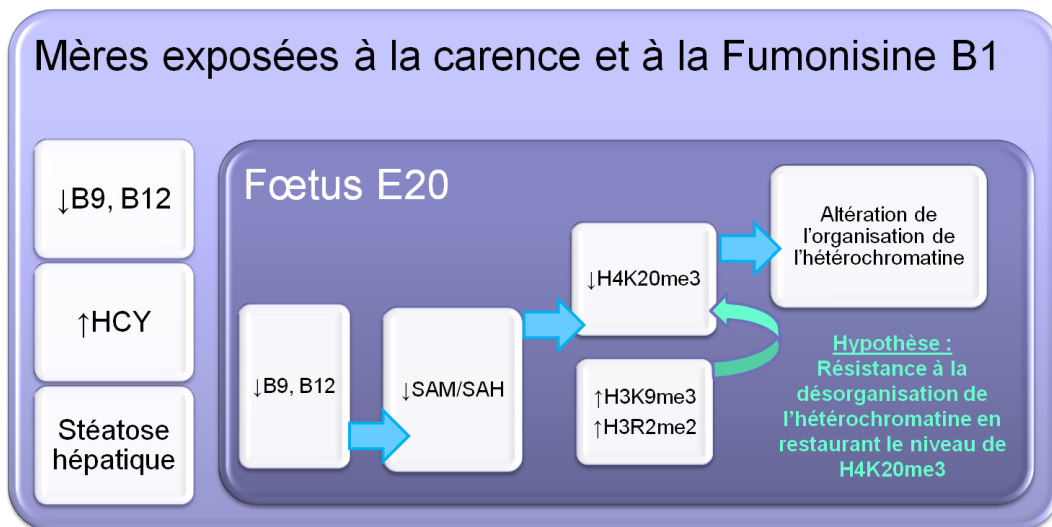


Figure 37 : Schéma bilan replaçant les effets synergiques de la carence en donneurs de méthyle et de la fumonisine B1 pendant la période gestationnelle chez le rat. Chez les mères, les concentrations plasmatiques en vitamines B9 et B12 sont diminuées et la concentration en HCY est augmentée ce qui favorise l'apparition d'une stéatose hépatique. Chez les fœtus E20 issus de ces mères, les concentrations en vitamines B9 et B12 le ratio SAM/SAH représentant l'index de méthylation sont également diminuées. H4K20me3 qui est une des marques de l'assemblage de l'hétérochromatine est aussi diminuée mais l'augmentation de H3K9me3 et de H3R2me2 pourrait être un mécanisme de résistance à la désorganisation de l'hétérochromatine pour tenter de restaurer un taux normal de H4K20me3.

Des études sur des modèles animaux et des études épidémiologiques montrent que l'exposition maternelle à la FB1 augmente le risque d'apparition de défauts de fermeture du tube neural (NTD) qui pourraient être évités en maintenant des niveaux

adéquats de folales (S.A. Missmer et al, 2006; J. Gelineau-van Waes et al, 2005). Les interactions entre FB1 et acide folique sont complexes, pas totalement élucidées et le rôle de FB1 et de l'acide folique dans l'étiologie des NTD a encore besoin de clarifications. Les NTD ont une origine multifactorielle et impliquent des interactions complexes gènes-environnement. L'effet bénéfique de l'acide folique dans les NTD peut être attribué à l'amélioration de la méthylation de l'ADN (N.D. Greene et al, 2011). Un autre mécanisme épigénétique peut aussi entrer en jeu puisque des études récentes montrent que les modifications des histones peuvent participer à l'étiologie des NTD (N.D. Greene et al, 2011). Dans les embryons mutants Splotch (Pax3) qui développent des NTD, H3K27me est augmenté (S. Ichi et al, 2010). Des NTD au niveau crânien ont été observés chez des embryons knock-out pour p300 (T.P. Yao et al, Cell, 1998) et CITED (Z. Yin et al, 2002) et knock-in pour GCN5 (P. Bu et al, 2007; W. Lin et al, 2008). Ces 3 enzymes ont des activités acétyltransférase. A l'inverse, plusieurs histones déacétylases (HDAC) contrôlent la progression de précurseurs neuronaux vers les neurones (R.L. Montgomery et al, 2009). En particulier, des NTD ont été retrouvés dans des mutants pour Sirt1 et pour un sous-ensemble de HDAC4 (R.B. Vega et al, 2004; H.L. Cheng et al, 2003). Sirt1 est l'homologue, chez les mammifères, de Sir2 qui déacétyle H4K16. En outre, des inhibiteurs de HDAC, tels que l'acide valproïque et la trichostatine A, présentent un effet tératogène et peuvent induire des NTD ainsi que des malformations squelettiques axiales (R.H. Finnell et al, 2002; E.F. Menegola et al, 2005). Plusieurs preuves sous-tendent également des changements globaux des profils de modification des histones dans de nombreux cancers (M. Hirst et M.A. Marra, 2009). Des altérations épigénétiques aberrantes induites par des facteurs nutritionnels semblent notamment être un mécanisme essentiel conduisant à l'hépatocarcinogénèse chez les rongeurs (L. Daxinger et E. Whitelaw, 2010).

L'intérêt principal de cette étude est de montrer que la FB1, à de faibles doses susceptibles de réellement contaminer les aliments consommés quotidiennement, peut altérer les modifications des histones. Une voie commune à travers laquelle l'acide folique et FB1 sont impliqués dans les NTD pourrait être la régulation épigénétique. Les résultats exposés ici doivent être considérés comme préliminaires car une limite de cette étude est le petit nombre d'animaux analysés. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour confirmer sur une plus grande

échelle que la carence en donneurs de méthyle et la FB1 interagissent, pour provoquer une perturbation du profil épigénétique susceptible de contribuer à l'apparition de maladies du développement ou à la prolifération tumorale.

CONCLUSION GENERALE

Notre premier objectif était d'identifier les mécanismes qui contrôlent l'expression des enzymes de reméthylation de l'Hcy dans les proliférations tumorales humaines. Dans les cellules d'hépatocarcinome humain (HepG2) et les tissus cancéreux hépatiques humains, deux transcrits *BHMT* ont été identifiés. Le premier transcrit correspond à l'amplicon de taille attendue également retrouvé, plus fortement dans les tissus hépatiques sains et le deuxième est un transcrit plus court (167 pb), uniquement présent dans les tumeurs et qui résulte d'une délétion/insertion déterminant l'apparition d'un codon stop prématuré. Ainsi, la BHMT n'est pas exprimée dans les cellules et tissus cancéreux et son activité enzymatique est nulle. Par contre, l'expression de la MS reste inchangée par rapport aux tissus sains. A l'inverse des cellules normales, les cellules HepG2 sont méthionine dépendantes et la défaillance de la reméthylation induite par la BHMT pourrait au moins partiellement être responsable de cette méthionine dépendance des cellules hépatiques tumorales. Nos résultats suggèrent donc que la diminution voire l'absence d'expression de cette enzyme dans les cellules HepG2 et les tissus tumoraux, induit une réduction dramatique du taux de reméthylation de l'Hcy, puis par la suite une diminution de l'index de méthylation déterminé par le ratio SAM/SAH et enfin une diminution des réactions de transméthylation ayant pour substrat la SAM. De nombreuses enzymes telles que les DNMTs et les HMTs qui interviennent dans les modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN et des histones), dépendent de ce taux de SAM. Dans le cas d'une carence en donneurs de méthyles, pouvant avoir un effet carcinogène et aboutir à long terme à l'hépatocarcinome, une diminution de la SAM induit une hypométhylation de l'ADN et des modifications des histones. La fumonisine, toxine alimentaire tératogène des céréales, de part son effet sur le métabolisme des monocarbones, potentialise les effets néfastes de la carence en donneurs de méthyle. Notre deuxième objectif était donc d'analyser cette synergie dans un modèle de rates gestantes carencées en donneurs de méthyles soumis ou non à une exposition à la fumonisine à une dose deux fois supérieure à la dose journalière admissible dans l'alimentation humaine. Le phénotypage métabolique (vitamine B9, B12 et Hcy) a confirmé l'effet de la carence et de l'association Carence/FB1. Il est à noter que la FB1 seule entraîne une diminution du ratio SAM/SAH. La stéatose hépatique, éventuellement préalable à l'apparition

d'hépatocarcinome à plus long terme, provoquée par la carence a été aggravée par la FB1 chez les mères. Les traitements administrés ont provoqué chez les fœtus une diminution du poids et de la taille. L'index de méthylation SAM/SAH a également été diminué dans le foie des fœtus quelque soit le traitement utilisé seul ou en combinaison ce qui a abouti à des modifications épigénétiques spécifiques de l'assemblage de l'hétérochromatine. La carence en donneur de méthyle et la fumonisine agissent donc en synergie et altèrent les marques sélectives de l'assemblage de l'hétérochromatine, fournissant ainsi un mécanisme qui peut contribuer à l'instabilité génétique.

PERSPECTIVES

L'absence d'activité de BHMT résultant de la transcription du variant d'épissage pourrait être un des principaux contributeurs de la méthionine dépendance. Cela pourrait également influencer la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses hépatiques qui dépendent fortement de la disponibilité en méthionine (*E. Cellarier et al, 2003; X. Durando et al., 2008*).

De plus, une altération du métabolisme cellulaire de la vitamine B12 et de l'activité de la MS (codée par MTR), provoque une diminution du taux de prolifération de plusieurs cellules cancéreuses (*S.F. Battaglia-Hsu et al, 2009; S.C. Lai et al, 2011*). Par conséquent, nos résultats suggèrent qu'une altération de MTR pourrait être une stratégie dans la chimiothérapie du cancer du foie car cela abolirait de manière sélective la voie de reméthylation dans des cellules cancéreuses où la BHMT est déjà absente contrairement aux cellules normales. Cela ouvre donc de nouvelles perspectives pour le ciblage de la MS dans la chimiothérapie de l'hépatocarcinome mais des investigations complémentaires doivent être établies pour pouvoir identifier la transcription anormale de BHMT comme cause ou conséquence de la carcinogenèse hépatique. La BHMT étant surtout présente dans le foie et le rein, il serait également intéressant d'étudier son expression dans les cancers du rein et de corrélérer le niveau d'expression avec le stade de la tumeur.

Le mécanisme d'épissage amenant à ce variant transcriptionnel reste encore à élucider. Afin de savoir si le système NMD (« non-sense mediated decay ») entre en jeu dans la dégradation du transcrit anormal, il faudrait cultiver des cellules HepG2 en présence d'un inhibiteur de ce système, le cycloheximide. Si NMD est inhibé, l'expression du transcrit anormal de plus petite taille pourrait se trouver être augmentée. Une autre expérience, en utilisant des inhibiteurs de prolifération, pourrait nous permettre de comprendre si ce transcrit est lié à la prolifération tumorale.

Une intoxication à long terme avec la fumonisine B1 ainsi que la carence en donneurs de méthyles provoquent des hépatocarcinomes chez les rongeurs. Notre étude a montré que la fumonisine et la carence en donneurs de méthyles agissent en synergie et altèrent les marques sélectives de l'assemblage de l'hétérochromatine de manière générale dans le foie. La suite des recherches consisterait à étudier l'effet

de ces deux facteurs sur les marques de l'assemblage de l'hétérochromatine mais de manière plus sélective en ciblant par exemple, des gènes impliqués dans la cancérogenèse hépatique. Plus de 675 gènes sont anormalement méthylés dans le CHC (*L. Peyrin-Biroulet et al, 2006*). Parmi ces gènes régulés par méthylation, certains d'entre eux, représentant des marqueurs pronostics du CHC, pourraient être sélectionnés pour étudier l'effet d'une carence associée à la fumonisine sur les marques de l'assemblage de l'hétérochromatine au niveau de ces gènes. Le facteur "Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor 2/Placental Bikunin (HAI-2/PB)" par exemple est hyperméthylé et son expression se retrouve diminuée dans les hépatocarcinomes, le cancer du rein et de l'estomac. HAI-2/PB est un inhibiteur (de l'activateur) du facteur de croissance des hépatocytes (HGF, « hepatocyte growth factor »), qui est un mitogène, morphogène et motogène dans plusieurs cellules via c-met, son récepteur exprimé à la surface des cellules. La voie de signalisation HGF/c-met peut être impliquée dans la cancérogenèse hépatique puisqu'une surexpression de c-met et des taux élevés de HGF ont été retrouvés dans le sérum de patients ayant de faibles pronostics. HAI-2/PB peut donc avoir un rôle dans la suppression de l'invasion tumorale via la régulation de HGF (*K. Fukai et al, 2003 ; M.R. Morris et al, 2005 ; W. Dong et al, 2010*).

La fumonisine est également un facteur de risque des NTD et les folates sont utilisés comme traitement préventif des NTD. Les souris Splotch comportent un gène Pax3 inactivé et développent spontanément des NTD. Les NTD des homozygotes Splotch $^{-/-}$ peuvent être évités par administration d'acide folique. Les gènes Hes1 et Neurog2 présentent des actions réciproques et participent au développement des cellules nerveuses en maintenant une balance entre la prolifération des cellules souches et la mise en route de la neurogenèse. Hes1 favorise le maintien et la prolifération des cellules souches alors que Neuro2 s'il est activé trop tôt induit une neurogenèse prématurée. Chez les souris homozygotes Splotch $^{-/-}$, il existe une sous expression de KDM6B (histone déméthylase) et par voie de conséquence une augmentation de H3K27me2. La sous expression de KDM6B est guidée par des mi-RNA. La marque H3K27me2 est préférentiellement retrouvée sur le promoteur de Hes1. Hes1 est alors inactivé induisant ainsi une perte du renouvellement des cellules souches. Au même âge embryonnaire, les marques retrouvées sur le promoteur de Neurog2 sont H3K9Ac et H3K18Ac. Neurog2 est ainsi activé et induit une neurogenèse prématurée. Cette rupture de la balance entre prolifération des cellules souches et

neurogenèse semble être une cause essentielle d'apparition des anomalies neurologiques. Le traitement avec l'acide folique restaure cette balance et empêche la survenue des NTD.

Notre étude a montré que la fumonisine altère des modifications globales des histones. Il faut maintenant déterminer si la fumonisine altère des modifications spécifiques en analysant les marques chromatiniennes associées aux gènes *Hes1* et *Neurog2* dans des explants embryonnaires de tube neural caudal (ou des cellules de crête neurale en culture). Il faut déterminer ensuite si ces altérations sont réversibles et peuvent être effacées par l'acide folique. Le résultat attendu est la mise en évidence du mécanisme moléculaire qui explique 1) pourquoi la fumonisine est un facteur de risque des NTD ; 2) pourquoi l'acide folique est un traitement préventif contre les NTD.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdel-Wahhab, M. A., A. M. Hassan, et al. (2004). "Prevention of fumonisin-induced maternal and developmental toxicity in rats by certain plant extracts." J Appl Toxicol **24**(6): 469-74.
- Abdel Nour, A. M., D. Ringot, et al. (2007). "Folate receptor and human reduced folate carrier expression in HepG2 cell line exposed to fumonisin B1 and folate deficiency." Carcinogenesis **28**(11): 2291-7.
- Ahuja, R., R. Yammani, et al. (2008). "Interactions of cubilin with megalin and the product of the amnionless gene (AMN): effect on its stability." Biochem J **410**(2): 301-8.
- Allen, L. H. (2004). "Folate and vitamin B12 status in the Americas." Nutr Rev **62**(6 Pt 2): S29-33; discussion S34.
- Allen, R. H., B. Seetharam, et al. (1978). "Effect of proteolytic enzymes on the binding of cobalamin to R protein and intrinsic factor. In vitro evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency." J Clin Invest **61**(1): 47-54.
- Anderson, R. G., B. A. Kamen, et al. (1992). "Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae." Science **255**(5043): 410-1.
- Anderson, R. G. (1998). "The caveolae membrane system." Annu Rev Biochem **67**: 199-225.
- Andres, E., N. H. Loukili, et al. (2004). "Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients." Cmaj **171**(3): 251-9.
- Andrews, N. C. (2007). "When is a heme transporter not a heme transporter? When it's a folate transporter." Cell Metab **5**(1): 5-6.
- Antony, A. C., M. A. Kane, et al. (1985). "Studies of the role of a particulate folate-binding protein in the uptake of 5-methyltetrahydrofolate by cultured human KB cells." J Biol Chem **260**(28): 14911-7.
- Antony, A. C., C. Utley, et al. (1981). "Isolation and characterization of a folate receptor from human placenta." J Biol Chem **256**(18): 9684-92.
- Ashe, H., B. R. Clark, et al. (1974). "N5-methyltetrahydrofolate: homocysteine methyltransferase activity in extracts from normal, malignant and embryonic tissue culture cells." Biochem Biophys Res Commun **57**(2): 417-25.
- Avila, M. A., C. Berasain, et al. (2000). "Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma." J Hepatol **33**(6): 907-14.
- Baker, K. E. and R. Parker (2004). "Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression." Curr Opin Cell Biol **16**(3): 293-9.
- Ballestar, E., M. F. Paz, et al. (2003). "Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer." Embo J **22**(23): 6335-45.
- Barak, A. J. and H. C. Beckenhauer (1988). "The influence of ethanol on hepatic transmethylatation." Alcohol Alcohol **23**(1): 73-7.
- Barkai, G., S. Arbusova, et al. (2003). "Frequency of Down's syndrome and neural-tube defects in the same family." Lancet **361**(9366): 1331-5.
- Battaglia-Hsu, S. F., N. Akchiche, et al. (2009). "Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(51): 21930-5.
- Baylin, S. B., M. Esteller, et al. (2001). "Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer." Hum Mol Genet **10**(7): 687-92.

- Bender, F., M. Montoya, et al. (2002). "Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1." *Biol Res* **35**(2): 151-67.
- Black, J. C. and J. R. Whetstine. (2011). "Chromatin landscape: methylation beyond transcription." *Epigenetics* **6**(1): 9-15.
- Blaise, S., J. M. Alberto, et al. (2005). "Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats." *Pediatr Res* **57**(6): 777-82.
- Blaise, S. A., E. Nedelec, et al. (2007). "Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats." *Am J Pathol* **170**(2): 667-79.
- Blount, B. C., M. M. Mack, et al. (1997). "Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3290-5.
- Blusztajn, J. K. (1998). "Choline, a vital amine." *Science* **281**(5378): 794-5.
- Bondy, G., C. Suzuki, et al. (1995). "Toxicity of fumonisin B1 administered intraperitoneally to male Sprague-Dawley rats." *Food Chem Toxicol* **33**(8): 653-65.
- Bose, N., P. Greenspan, et al. (2002). "Expression of recombinant human betaine: homocysteine S-methyltransferase for x-ray crystallographic studies and further characterization of interaction with S-adenosylmethionine." *Protein Expr Purif* **25**(1): 73-80.
- Bose, S., S. Seetharam, et al. (1995a). "Membrane expression and interactions of human transcobalamin II receptor." *J Biol Chem* **270**(14): 8152-7.
- Bose, S., S. Seetharam, et al. (1995b). "Regulation of expression of transcobalamin II receptor in the rat." *Biochem J* **310** (Pt 3): 923-9.
- Bottiglieri, T. (2005). "Homocysteine and folate metabolism in depression." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **29**(7): 1103-12.
- Braconi, C. and T. Patel "Cholangiocarcinoma: new insights into disease pathogenesis and biology." *Infect Dis Clin North Am* **24**(4): 871-84, vii.
- Breksa, A. P., 3rd and T. A. Garrow (1999). "Recombinant human liver betaine-homocysteine S-methyltransferase: identification of three cysteine residues critical for zinc binding." *Biochemistry* **38**(42): 13991-8.
- Bruix, J. and M. Sherman (2005). "Management of hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **42**(5): 1208-36.
- Brunaud, L., J. M. Alberto, et al. (2003). "Effects of vitamin B12 and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver." *Clin Chem Lab Med* **41**(8): 1012-9.
- Bu, P., Y. A. Evrard, et al. (2007). "Loss of Gcn5 acetyltransferase activity leads to neural tube closure defects and exencephaly in mouse embryos." *Mol Cell Biol* **27**(9): 3405-16.
- Buchman, A. L., M. D. Dubin, et al. (1995). "Choline deficiency: a cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be reversed with intravenous choline supplementation." *Hepatology* **22**(5): 1399-403.
- Butterworth, C. E., Jr. (1992). "Effect of folate on cervical cancer. Synergism among risk factors." *Ann N Y Acad Sci* **669**: 293-9.
- Cabrera, R. and D. R. Nelson. (2009). "Review article: the management of hepatocellular carcinoma." *Aliment Pharmacol Ther* **31**(4): 461-76.
- Cacic, M. (1995). "Gangliosides of anencephalic and fetal brain--immunostaining on thin-layer chromatograms." *Neuroreport* **6**(2): 389-93.

- Carreras, C. W. and D. V. Santi (1995). "The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase." Annu Rev Biochem **64**: 721-62.
- Castro, C., A. A. Gratson, et al. (2004). "Dissecting the catalytic mechanism of betaine-homocysteine S-methyltransferase by use of intrinsic tryptophan fluorescence and site-directed mutagenesis." Biochemistry **43**(18): 5341-51.
- Cellarier, E., X. Durando, et al. (2003). "Methionine dependency and cancer treatment." Cancer Treat Rev **29**(6): 489-99.
- Chadwick, L. H., S. E. McCandless, et al. (2000). "Betaine-homocysteine methyltransferase-2: cDNA cloning, gene sequence, physical mapping, and expression of the human and mouse genes." Genomics **70**(1): 66-73.
- Chandar, N. and B. Lombardi (1988). "Liver cell proliferation and incidence of hepatocellular carcinomas in rats fed consecutively a choline-devoid and a choline-supplemented diet." Carcinogenesis **9**(2): 259-63.
- Chang, W. J., K. G. Rothberg, et al. (1992). "Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate." J Cell Biol **118**(1): 63-9.
- Chango, A., A. A. Nour, et al. (2009). "Time course gene expression in the one-carbon metabolism network using HepG2 cell line grown in folate-deficient medium." J Nutr Biochem **20**(4): 312-20.
- Chen, L. H., M. L. Liu, et al. (1997). "Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression." J Biol Chem **272**(6): 3628-34.
- Cheng, H. L., R. Mostoslavsky, et al. (2003). "Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10794-9.
- Choi, S. W., Y. I. Kim, et al. (1998). "Folate depletion impairs DNA excision repair in the colon of the rat." Gut **43**(1): 93-9.
- Choi, S. W. and J. B. Mason (2000). "Folate and carcinogenesis: an integrated scheme." J Nutr **130**(2): 129-32.
- Ciacci-Zanella, J. R., A. H. Merrill, Jr., et al. (1998). "Characterization of cell-cycle arrest by fumonisin B1 in CV-1 cells." Food Chem Toxicol **36**(9-10): 791-804.
- Clapp, R. W., G. K. Howe, et al. (2007). "Environmental and occupational causes of cancer: a call to act on what we know." Biomed Pharmacother **61**(10): 631-9.
- Cohen, S. M. (1995). "Role of cell proliferation in regenerative and neoplastic disease." Toxicol Lett **82-83**: 15-21.
- Collins, T. F., M. E. Shackelford, et al. (1998). "Effects of fumonisin B1 in pregnant rats." Food Chem Toxicol **36**(5): 397-408.
- Coney, L. R., A. Tomassetti, et al. (1991). "Cloning of a tumor-associated antigen: MOv18 and MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein." Cancer Res **51**(22): 6125-32.
- Copeland, D. H. and W. D. Salmon (1946). "The occurrence of neoplasms in the liver, lungs, and other tissues of rats as a result of prolonged choline deficiency." Am J Pathol **22**: 1059-79.
- Craig, S. A. (2004). "Betaine in human nutrition." Am J Clin Nutr **80**(3): 539-49.
- Cravo, M. L., L. M. Gloria, et al. (1996). "Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status." Am J Clin Nutr **63**(2): 220-4.
- Daxinger, L. and E. Whitelaw. (2010). "Transgenerational epigenetic inheritance: more questions than answers." Genome Res **20**(12): 1623-8.

- Delgado-Reyes, C. V., M. A. Wallig, et al. (2001). "Immunohistochemical detection of betaine-homocysteine S-methyltransferase in human, pig, and rat liver and kidney." Arch Biochem Biophys **393**(1): 184-6.
- Dixon, K. H., B. C. Lanpher, et al. (1994). "A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells." J Biol Chem **269**(1): 17-20.
- Dobosy, J. R., V. X. Fu, et al. (2008). "A methyl-deficient diet modifies histone methylation and alters Igf2 and H19 repression in the prostate." Prostate **68**(11): 1187-95.
- Dong, W., X. Chen, et al. "Epigenetic inactivation and tumor suppressor activity of HAI-2/SPINT2 in gastric cancer." Int J Cancer **127**(7): 1526-34.
- Duce, A. M., P. Ortiz, et al. (1988). "S-adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis." Hepatology **8**(1): 65-8.
- Durand, C., S. Mary, et al. (2003). "[Psychiatric manifestations of vitamin B12 deficiency: a case report]." Encephale **29**(6): 560-5.
- Durando, X., E. Thivat, et al. (2008). "[Methionine dependency of cancer cells: a new therapeutic approach?]." Bull Cancer **95**(1): 69-76.
- Duthie, S. J. and A. Hawdon (1998). "DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro." Faseb J **12**(14): 1491-7.
- Ekwall, K. (2005). "Genome-wide analysis of HDAC function." Trends Genet **21**(11): 608-15.
- el Kholty, S., J. L. Gueant, et al. (1991). "Portal and biliary phases of enterohepatic circulation of corrinoids in humans." Gastroenterology **101**(5): 1399-408.
- El-Serag, H. B. (2011). "Hepatocellular carcinoma." N Engl J Med **365**(12): 1118-27.
- Elwood, P. C., K. Nachmanoff, et al. (1997). "The divergent 5' termini of the alpha human folate receptor (hFR) mRNAs originate from two tissue-specific promoters and alternative splicing: characterization of the alpha hFR gene structure." Biochemistry **36**(6): 1467-78.
- Enongene, E. N., R. P. Sharma, et al. (2000). "Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B(1)." Food Chem Toxicol **38**(9): 793-9.
- Esteller, M. (2006). "Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes." Br J Cancer **94**(2): 179-83.
- European commission Health and Consumer Protection Directorate-General (2000). "Fumonisin B1. Opinion of the scientific committee on food on Fusarium toxins."
- Evans, J. C., D. P. Huddler, et al. (2002). "Betaine-homocysteine methyltransferase: zinc in a distorted barrel." Structure **10**(9): 1159-71.
- Fahrner, J. A., S. Eguchi, et al. (2002). "Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer." Cancer Res **62**(24): 7213-8.
- Feinberg, A. P. and B. Tycko (2004). "The history of cancer epigenetics." Nat Rev Cancer **4**(2): 143-53.
- Feng, Q., K. Kalari, et al. (2011). "Betaine-homocysteine methyltransferase: human liver genotype-phenotype correlation." Mol Genet Metab **102**(2): 126-33.
- Feng, Q., H. Wang, et al. (2002). "Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain." Curr Biol **12**(12): 1052-8.
- Finkelstein, J. D., B. J. Harris, et al. (1982). "Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary methionine." Biochem Biophys Res Commun **108**(1): 344-8.

- Finkelstein, J. D., J. J. Martin, et al. (1983). "Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary betaine." J Nutr **113**(3): 519-21.
- Finkelstein, J. D. and J. J. Martin (1984). "Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways." J Biol Chem **259**(15): 9508-13.
- Finkelstein, J. D., J. J. Martin, et al. (1986). "Effect of dietary cystine on methionine metabolism in rat liver." J Nutr **116**(6): 985-90.
- Finnell, R. H., J. G. Waes, et al. (2002). "Molecular basis of environmentally induced birth defects." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 181-208.
- Fischer, L. M., K. A. daCosta, et al. (2007). "Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline." Am J Clin Nutr **85**(5): 1275-85.
- Forges, T., P. Monnier-Barbarino, et al. (2007). "Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health." Hum Reprod Update **13**(3): 225-38.
- Fowler, B. (2005). "Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes." Semin Vasc Med **5**(2): 77-86.
- Fraga, M. F., E. Ballestar, et al. (2005). "Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer." Nat Genet **37**(4): 391-400.
- Frau, M., M. L. Tomasi, et al. (2012). "Role of transcriptional and post-transcriptional regulation of methionine adenosyltransferases in liver cancer progression." Hepatology.
- Frost, P., H. J. Blom, et al. (1995). "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase." Nat Genet **10**(1): 111-3.
- Fukai, K., O. Yokosuka, et al. (2003). "Hepatocyte growth factor activator inhibitor 2/placental bikunin (HAI-2/PB) gene is frequently hypermethylated in human hepatocellular carcinoma." Cancer Res **63**(24): 8674-9.
- Ganapathy, V., S. B. Smith, et al. (2004). "SLC19: the folate/thiamine transporter family." Pflugers Arch **447**(5): 641-6.
- Gao, B. and R. Bataller. (2011). "Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets." Gastroenterology **141**(5): 1572-85.
- Garcia-Tevijano, E. R., C. Berasain, et al. (2001). "Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis." Hypertension **38**(5): 1217-21.
- Garrow, T. A. (1996). "Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase." J Biol Chem **271**(37): 22831-8.
- Gary, J. D. and S. Clarke (1998). "RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **61**: 65-131.
- Gelderblom, W. C., S. Abel, et al. (2001). "Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: mechanisms related to cancer initiation and promotion." Environ Health Perspect **109** Suppl 2: 291-300.
- Gelderblom, W. C., K. Jaskiewicz, et al. (1988). "Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*." Appl Environ Microbiol **54**(7): 1806-11.
- Gelderblom, W. C., N. P. Kriek, et al. (1991). "Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats." Carcinogenesis **12**(7): 1247-51.
- Gelineau-van Waes, J., L. Starr, et al. (2005). "Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: mechanisms in an in vivo mouse model." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol **73**(7): 487-97.

- Gelineau-van Waes, J., S. Heller, et al. (2008). "Embryonic development in the reduced folate carrier knockout mouse is modulated by maternal folate supplementation." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **82**(7): 494-507.
- George, L., J. L. Mills, et al. (2002). "Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion." *Jama* **288**(15): 1867-73.
- Ghoshal, A. K. and E. Farber (1984). "The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens." *Carcinogenesis* **5**(10): 1367-70.
- Goldsworthy, T. L., R. B. Conolly, et al. (1996). "Apoptosis and cancer risk assessment." *Mutat Res* **365**(1-3): 71-90.
- Gonzalez, B., M. A. Pajares, et al. (2002). "Crystallization and preliminary X-ray study of recombinant betaine-homocysteine S-methyltransferase from rat liver." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**(Pt 9): 1507-10.
- Gonzalez, B., M. A. Pajares, et al. (2004). "Crystal structure of rat liver betaine homocysteine s-methyltransferase reveals new oligomerization features and conformational changes upon substrate binding." *J Mol Biol* **338**(4): 771-82.
- Goulding, C. W., D. Postigo, et al. (1997). "Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine." *Biochemistry* **36**(26): 8082-91.
- Green, R. E., B. P. Lewis, et al. (2003). "Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes." *Bioinformatics* **19 Suppl 1**: i118-21.
- Greene, N. D., P. Stanier, et al. (2011). "The emerging role of epigenetic mechanisms in the etiology of neural tube defects." *Epigenetics* **6**(7): 875-83.
- Grewal, S. I. and S. Jia (2007). "Heterochromatin revisited." *Nat Rev Genet* **8**(1): 35-46.
- Gross, S. M., R. V. Reddy, et al. (1994). "Developmental effects of fumonisin B1-containing *Fusarium moniliforme* culture extract in CD1 mice." *Mycopathologia* **128**(2): 111-8.
- Guéant, J.L. and F. Namour. (2004). "Vitamin B12: Absorption, Metabolism and Deficiency." *Encyclopedia of Gastroenterology Elsevier (USA)*.
- Hague, W. M. (2003). "Homocysteine and pregnancy." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **17**(3): 459-69.
- Halpern, B. C., B. R. Clark, et al. (1974). "The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(4): 1133-6.
- Hamid, A., N. A. Wani, et al. (2009). "New perspectives on folate transport in relation to alcoholism-induced folate malabsorption--association with epigenome stability and cancer development." *Febs J* **276**(8): 2175-91.
- Hannun, Y. A. and C. Luberto (2000). "Ceramide in the eukaryotic stress response." *Trends Cell Biol* **10**(2): 73-80.
- Harris, C. C. (1991). "Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s." *Cancer Res* **51**(18 Suppl): 5023s-5044s.
- He, C., J. Xu, et al. (2012). "High expression of trimethylated histone H3 lysine 4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma." *Hum Pathol*.
- Henderson, G. I., T. Perez, et al. (1995). "Maternal-to-fetal transfer of 5-methyltetrahydrofolate by the perfused human placental cotyledon: evidence for a concentrative role by placental folate receptors in fetal folate delivery." *J Lab Clin Med* **126**(2): 184-203.

- Herceg, Z. and A. Paliwal. (2011). "Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome." Mutat Res **727**(3): 55-61.
- Hirst, M. and M. A. Marra (2009). "Epigenetics and human disease." Int J Biochem Cell Biol **41**(1): 136-46.
- Holliday, R. and G. W. Grigg (1993). "DNA methylation and mutation." Mutat Res **285**(1): 61-7.
- Holm, P. I., S. Hustad, et al. (2007). "Modulation of the homocysteine-betaine relationship by methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->t genotypes and B-vitamin status in a large-scale epidemiological study." J Clin Endocrinol Metab **92**(4): 1535-41.
- Hsueh, C. T. and B. J. Dolnick (1993). "Altered folate-binding protein mRNA stability in KB cells grown in folate-deficient medium." Biochem Pharmacol **45**(12): 2537-45.
- Hsueh, C. T. and B. J. Dolnick (1994). "Regulation of folate-binding protein gene expression by DNA methylation in methotrexate-resistant KB cells." Biochem Pharmacol **47**(6): 1019-27.
- Hultberg, B., M. Berglund, et al. (1993). "Elevated plasma homocysteine in alcoholics." Alcohol Clin Exp Res **17**(3): 687-9.
- Humpf, H. U., E. M. Schmelz, et al. (1998). "Acylation of naturally occurring and synthetic 1-deoxysphinganine by ceramide synthase. Formation of N-palmitoyl-aminopentol produces a toxic metabolite of hydrolyzed fumonisin, AP1, and a new category of ceramide synthase inhibitor." J Biol Chem **273**(30): 19060-4.
- Hunder, G., K. Schumann, et al. (1991). "Influence of subchronic exposure to low dietary deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, on intestinal absorption of nutrients in mice." Food Chem Toxicol **29**(12): 809-14.
- Ichi, S., F. F. Costa, et al. (2010). "Folic acid remodels chromatin on Hes1 and Neurog2 promoters during caudal neural tube development." J Biol Chem **285**(47): 36922-32.
- Ichikawa, A., Y. Ohashi, et al. (2004). "In vitro modification of betaine-homocysteine S-methyltransferase by tissue-type transglutaminase." Int J Biochem Cell Biol **36**(10): 1981-92.
- Ifergan, I. and Y. G. Assaraf (2008). "Molecular mechanisms of adaptation to folate deficiency." Vitam Horm **79**: 99-143.
- Isogai, C., T. Murate, et al. (1998). "Analysis of bax protein in sphingosine-induced apoptosis in the human leukemic cell line TF1 and its bcl-2 transfectants." Exp Hematol **26**(12): 1118-25.
- Iyer, R. and S. K. Tomar (2009). "Folate: a functional food constituent." J Food Sci **74**(9): R114-22.
- Jacques, P. F., A. G. Bostom, et al. (2003). "Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study." Atherosclerosis **166**(1): 49-55.
- Jacques, P. F., A. G. Bostom, et al. (1996). "Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations." Circulation **93**(1): 7-9.
- Jakubowski, H. (2006). "Pathophysiological consequences of homocysteine excess." J Nutr **136**(6 Suppl): 1741S-1749S.
- Jansen, G., R. M. Mauritz, et al. (1997). "Regulation of carrier-mediated transport of folates and antifolates in methotrexate-sensitive and-resistant leukemia cells." Adv Enzyme Regul **37**: 59-76.

- Jaskiewicz, K., S. J. van Rensburg, et al. (1987). "Carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* culture material in rats." J Natl Cancer Inst **78**(2): 321-5.
- Javed, T., J. L. Richard, et al. (1993). "Embryopathic and embryocidal effects of purified fumonisin B1 or *Fusarium proliferatum* culture material extract on chicken embryos." Mycopathologia **123**(3): 185-93.
- Jean-Claude Guillard et Bruno Lequeu. Encyclopédie des vitamines - Du nutriment au médicament. Vol.1
- Jean-Claude Guillard et Bruno Lequeu. Encyclopédie des vitamines-Aspects médicaux. Vol. 3
- Jhaveri, M. S., C. Wagner, et al. (2001). "Impact of extracellular folate levels on global gene expression." Mol Pharmacol **60**(6): 1288-95.
- Ji, C., M. Shinohara, et al. (2007). "Mechanisms of protection by the betaine-homocysteine methyltransferase/betaine system in HepG2 cells and primary mouse hepatocytes." Hepatology **46**(5): 1586-96.
- Johnson, A., G. Li, et al. (2009). "Reconstitution of heterochromatin-dependent transcriptional gene silencing." Mol Cell **35**(6): 769-81.
- Jolivet, J., F. Faucher, et al. (1987). "Influence of intracellular folates on methotrexate metabolism and cytotoxicity." Biochem Pharmacol **36**(19): 3310-2.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-28.
- Kamen, B. A. and A. Capdevila (1986). "Receptor-mediated folate accumulation is regulated by the cellular folate content." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(16): 5983-7.
- Kamen, B. A., C. A. Johnson, et al. (1989). "Regulation of the cytoplasmic accumulation of 5-methyltetrahydrofolate in MA104 cells is independent of folate receptor regulation." J Clin Invest **84**(5): 1379-86.
- Kamen, B. A., M. T. Wang, et al. (1988). "Delivery of folates to the cytoplasm of MA104 cells is mediated by a surface membrane receptor that recycles." J Biol Chem **263**(27): 13602-9.
- Kanai, Y., S. Ushijima, et al. (1996). "Aberrant DNA methylation on chromosome 16 is an early event in hepatocarcinogenesis." Jpn J Cancer Res **87**(12): 1210-7.
- Kane, M. A., P. C. Elwood, et al. (1986). "The interrelationship of the soluble and membrane-associated folate-binding proteins in human KB cells." J Biol Chem **261**(33): 15625-31.
- Kenyon, S. H., A. Nicolaou, et al. (1998). "The effect of ethanol and its metabolites upon methionine synthase activity in vitro." Alcohol **15**(4): 305-9.
- Kharbanda, K. K., M. E. Mailliard, et al. (2007). "Betaine attenuates alcoholic steatosis by restoring phosphatidylcholine generation *via* the phosphatidylethanolamine methyltransferase pathway." J Hepatol **46**(2): 314-21.
- Kim, Y. I., K. Fawaz, et al. (1998). "Colonic mucosal concentrations of folate correlate well with blood measurements of folate status in persons with colorectal polyps." Am J Clin Nutr **68**(4): 866-72.
- Kim, Y. I. (1999). "Folate and cancer prevention: a new medical application of folate beyond hyperhomocysteinemia and neural tube defects." Nutr Rev **57**(10): 314-21.
- Kim, Y. I., J. W. Miller, et al. (1994). "Severe folate deficiency causes secondary depletion of choline and phosphocholine in rat liver." J Nutr **124**(11): 2197-203.
- Kim, Y. I., I. P. Pogribny, et al. (1997). "Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene." Am J Clin Nutr **65**(1): 46-52.

- Kirmizis, A., H. Santos-Rosa, et al. (2007). "Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation." Nature **449**(7164): 928-32.
- Ko, K. H., N. K. Kim, et al. (2006). "Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) and thymidylate synthase enhancer region (TSER) as a risk factor of cholangiocarcinoma in a Korean population." Anticancer Res **26**(6B): 4229-33.
- Kourmouli, N., P. Jeppesen, et al. (2004). "Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals." J Cell Sci **117**(Pt 12): 2491-501.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Kriek, N. P., T. S. Kellerman, et al. (1981). "A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats." Onderstepoort J Vet Res **48**(2): 129-31.
- Kuo, C. S., C. Y. Lin, et al. (2008). "Relationship between folate status and tumour progression in patients with hepatocellular carcinoma." Br J Nutr **100**(3): 596-602.
- Lai, S. C., Y. Nakayama, et al. (2011). "Down-regulation of transcobalamin receptor TCbIR/CD320 by siRNA inhibits cobalamin uptake and proliferation of cells in culture." Exp Cell Res **317**(11): 1603-7.
- Laird, P. W. and R. Jaenisch (1996). "The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics." Annu Rev Genet **30**: 441-64.
- Laraqui, A., A. Allami, et al. (2007). "Relation between plasma homocysteine, gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes, and angiographically proven coronary artery disease." Eur J Intern Med **18**(6): 474-483.
- Larsson, S. C., E. Giovannucci, et al. (2006). "Folate intake, MTHFR polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis." Gastroenterology **131**(4): 1271-83.
- Larsson, S. C., E. Giovannucci, et al. (2007). "Folate and risk of breast cancer: a meta-analysis." J Natl Cancer Inst **99**(1): 64-76.
- Lashner, B. A. (1993). "Red blood cell folate is associated with the development of dysplasia and cancer in ulcerative colitis." J Cancer Res Clin Oncol **119**(9): 549-54.
- Lashner, B. A., P. A. Heidenreich, et al. (1989). "Effect of folate supplementation on the incidence of dysplasia and cancer in chronic ulcerative colitis. A case-control study." Gastroenterology **97**(2): 255-9.
- Lashner, B. A., K. S. Provencher, et al. (1997). "The effect of folic acid supplementation on the risk for cancer or dysplasia in ulcerative colitis." Gastroenterology **112**(1): 29-32.
- Lebepe-Mazur, S., H. Bal, et al. (1995). "Fumonisin B1 is fetotoxic in rats." Vet Hum Toxicol **37**(2): 126-30.
- Lee, K. K. and J. L. Workman (2007). "Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(4): 284-95.
- Lemmer, E. R., P. de la Motte Hall, et al. (1999). "Histopathology and gene expression changes in rat liver during feeding of fumonisin B1, a carcinogenic mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*." Carcinogenesis **20**(5): 817-24.
- Lentz, S. R. (2005). "Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis." J Thromb Haemost **3**(8): 1646-54.
- Lever, M. and S. Slow (2010). "The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism." Clin Biochem **43**(9): 732-44.
- Levine, J. S., P. K. Nakane, et al. (1980). "Immunocytochemical localization of human intrinsic factor: the nonstimulated stomach." Gastroenterology **79**(3): 493-502.

- Levine, J. S., P. K. Nakane, et al. (1981). "Human intrinsic factor secretion: immunocytochemical demonstration of membrane-associated vesicular transport in parietal cells." J Cell Biol **90**(3): 644-55.
- Lewis, S. J., R. M. Harbord, et al. (2006). "Meta-analyses of observational and genetic association studies of folate intakes or levels and breast cancer risk." J Natl Cancer Inst **98**(22): 1607-22.
- Li, F., Q. Feng, et al. (2008). "Human betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and BHMT2: common gene sequence variation and functional characterization." Mol Genet Metab **94**(3): 326-35.
- Liang, C. R., C. K. Leow, et al. (2005). "Proteome analysis of human hepatocellular carcinoma tissues by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry." Proteomics **5**(8): 2258-71.
- Lin, W., Z. Zhang, et al. (2008). "Proper expression of the Gcn5 histone acetyltransferase is required for neural tube closure in mouse embryos." Dev Dyn **237**(4): 928-40.
- Liu, B., Y. Lin, et al. (2009). "Identification and characterization of propionylation at histone H3 lysine 23 in mammalian cells." J Biol Chem **284**(47): 32288-95.
- Liu, J. J. and R. L. Ward. (2010). "Folate and one-carbon metabolism and its impact on aberrant DNA methylation in cancer." Adv Genet **71**: 79-121.
- Liu, Y. and F. Wu. (2010). "Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment." Environ Health Perspect **118**(6): 818-24.
- Lo Magro, S., M. Campaniello, et al. (2011) "Assessment of fumonisins B1 and B2 levels in commercial maize-based food products by liquid chromatography with fluorimetric detection and postcolumn chemical derivatization." J Food Sci **76**(1): T1-4.
- Loguercio, C. and A. Federico (2003). "Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis." Free Radic Biol Med **34**(1): 1-10.
- Loidl, P. (1994). "Histone acetylation: facts and questions." Chromosoma **103**(7): 441-9.
- Lu, S. C., L. Alvarez, et al. (2001). "Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5560-5.
- Lucock, M. (2000). "Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes." Mol Genet Metab **71**(1-2): 121-38.
- Luger, K. and T. J. Richmond (1998). "The histone tails of the nucleosome." Curr Opin Genet Dev **8**(2): 140-6.
- Magerl, C., J. Ellinger, et al. (2010). "H3K4 dimethylation in hepatocellular carcinoma is rare compared with other hepatobiliary and gastrointestinal carcinomas and correlates with expression of the methylase Ash2 and the demethylase LSD1." Hum Pathol **41**(2): 181-9.
- Marasas, W. F. (2001). "Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective." Environ Health Perspect **109 Suppl 2**: 239-43.
- Marasas, W. F., K. Jaskiewicz, et al. (1988). "Fusarium moniliforme contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei." S Afr Med J **74**(3): 110-4.
- Marasas, W. F., N. P. Kriek, et al. (1984). "Primary liver cancer and oesophageal basal cell hyperplasia in rats caused by Fusarium moniliforme." Int J Cancer **34**(3): 383-7.
- Marasas, W. F., R. T. Riley, et al. (2004). "Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize." J Nutr **134**(4): 711-6.

- Marguerite, V., M. Beri-Dexheimer, et al. (2007). "Cobalamin potentiates vinblastine cytotoxicity through downregulation of mdr-1 gene expression in HepG2 cells." Cell Physiol Biochem **20**(6): 967-76.
- Martin, Y. N., O. E. Salavaggione, et al. (2006). "Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics." Pharmacogenet Genomics **16**(4): 265-77.
- Martinez-Larranaga, M. R., A. Anadon, et al. (1999). "Toxicokinetics and oral bioavailability of fumonisin B1." Vet Hum Toxicol **41**(6): 357-62.
- Masalha, R., I. Rudoy, et al. (2002). "Symptomatic dietary vitamin B(12) deficiency in a nonvegetarian population." Am J Med **112**(5): 413-6.
- Matherly, L. H. and D. I. Goldman (2003). "Membrane transport of folates." Vitam Horm **66**: 403-56.
- Mato, J. M., F. J. Corrales, et al. (2002). "S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function." Faseb J **16**(1): 15-26.
- Mato, J. M. and S. C. Lu (2007). "Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury." Hepatology **45**(5): 1306-12.
- Mato, J. M., M. L. Martinez-Chantar, et al. (2008). "Methionine metabolism and liver disease." Annu Rev Nutr **28**: 273-93.
- Matthews, R. G., J. Ross, et al. (1982). "Interactions of pig liver serine hydroxymethyltransferase with methyltetrahydropteroylpolyglutamate inhibitors and with tetrahydropteroylpolyglutamate substrates." Biochemistry **21**(6): 1230-8.
- Maw, G. A. (1959). "Thetin-homocysteine transmethylase. The distribution of the enzyme, studied with the aid of trimethylsulphonium chloride as substrate." Biochem J **72**(4): 602-8.
- May, O. "DNA méthylation: Fingerprints of the (epi)genome", www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2153
- Mayor, S., K. G. Rothberg, et al. (1994). "Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking." Science **264**(5167): 1948-51.
- McKean, C., L. Tang, et al. (2006). "Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells." Food Chem Toxicol **44**(6): 868-76.
- McKeever, M. P., D. G. Weir, et al. (1991). "Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat." Clin Sci (Lond) **81**(4): 551-6.
- Mecham, J. O., D. Rowitch, et al. (1983). "The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently in human tumor cell lines." Biochem Biophys Res Commun **117**(2): 429-34.
- Meenan, J., E. O'Hallinan, et al. (1997). "Epithelial cell folate depletion occurs in neoplastic but not adjacent normal colon mucosa." Gastroenterology **112**(4): 1163-8.
- Mendelsohn, L. G., S. B. Gates, et al. (1996). "The role of dietary folate in modulation of folate receptor expression, folylpolyglutamate synthetase activity and the efficacy and toxicity of lometrexol." Adv Enzyme Regul **36**: 365-81.
- Menegola, E., F. Di Renzo, et al. (2005). "Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity." Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol **74**(5): 392-8.
- Merrill, A. H., Jr., M. C. Sullards, et al. (2001). "Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins." Environ Health Perspect **109** Suppl 2: 283-9.

- Meyer, K., A. Fredriksen, et al. (2004). "High-level multiplex genotyping of polymorphisms involved in folate or homocysteine metabolism by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." Clin Chem **50**(2): 391-402.
- Michel, V., Z. Yuan, et al. (2006). "Choline transport for phospholipid synthesis." Exp Biol Med (Maywood) **231**(5): 490-504.
- Mikol, Y. B., K. L. Hoover, et al. (1983). "Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets." Carcinogenesis **4**(12): 1619-29.
- Millian, N. S. and T. A. Garrow (1998). "Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme." Arch Biochem Biophys **356**(1): 93-8.
- Missmer, S. A., L. Suarez, et al. (2006). "Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border." Environ Health Perspect **114**(2): 237-41.
- Mitchell, H., E.E. Snell, et al. (1941). "The concentration of folic acid."
- Mitchell, H., E.E. Snell, et al. (1944). "Folic Acid. Concentration from Spinach."
- Moestrup, S. K., H. Birn, et al. (1996). "Megalin-mediated endocytosis of transcobalamin-vitamin-B12 complexes suggests a role of the receptor in vitamin-B12 homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8612-7.
- Moggs, J. G., J. I. Goodman, et al. (2004). "Epigenetics and cancer: implications for drug discovery and safety assessment." Toxicol Appl Pharmacol **196**(3): 422-30.
- Montgomery, R. L., J. Hsieh, et al. (2009). "Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(19): 7876-81.
- Morris, M. R., D. Gentle, et al. (2005). "Tumor suppressor activity and epigenetic inactivation of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2/SPINT2 in papillary and clear cell renal cell carcinoma." Cancer Res **65**(11): 4598-606.
- Moscow, J. A., M. Gong, et al. (1995). "Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells." Cancer Res **55**(17): 3790-4.
- MRC Vitamin Study Research Group (1991). "Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study." Lancet **338**(8760): 131-7.
- Mudd, S. H., M. H. Ebert, et al. (1980). "Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine." Metabolism **29**(8): 707-20.
- Mudd, S. H. and J. R. Poole (1975). "Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens." Metabolism **24**(6): 721-35.
- Nakamura, S., Y. Kozutsumi, et al. (1996). "Dual roles of sphingolipids in signaling of the escape from and onset of apoptosis in a mouse cytotoxic T-cell line, CTLL-2." J Biol Chem **271**(3): 1255-7.
- Neece, D. J., M. A. Griffiths, et al. (2000). "Isolation and characterization of a mouse betaine-homocysteine S-methyltransferase gene and pseudogene." Gene **250**(1-2): 31-40.
- Ng, H. H., Q. Feng, et al. (2002). "Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association." Genes Dev **16**(12): 1518-27.
- Nguyen, C. T., D. J. Weisenberger, et al. (2002). "Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine." Cancer Res **62**(22): 6456-61.

- Niculescu, M. D. and S. H. Zeisel (2002). "Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline." J Nutr **132**(8 Suppl): 2333S-2335S.
- Norton, V. G., B. S. Imai, et al. (1989). "Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change." Cell **57**(3): 449-57.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**(4260): 23-8.
- Ou, X., H. Yang, et al. (2007). "Inhibition of human betaine-homocysteine methyltransferase expression by S-adenosylmethionine and methylthioadenosine." Biochem J **401**(1): 87-96.
- Ozarda Ilcol, Y., G. Uncu, et al. (2002). "Free and phospholipid-bound choline concentrations in serum during pregnancy, after delivery and in newborns." Arch Physiol Biochem **110**(5): 393-9.
- Pal, S., S. N. Vishwanath, et al. (2004). "Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes." Mol Cell Biol **24**(21): 9630-45.
- Park, E. I. and T. A. Garrow (1999). "Interaction between dietary methionine and methyl donor intake on rat liver betaine-homocysteine methyltransferase gene expression and organization of the human gene." J Biol Chem **274**(12): 7816-24.
- Park, I. Y., B. H. Sohn, et al. (2007). "Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein." Gastroenterology **132**(4): 1476-94.
- Parker, N., M. J. Turk, et al. (2005). "Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay." Anal Biochem **338**(2): 284-93.
- Peres, W. A., G. V. Chaves, et al. (2011). "Vitamin A deficiency in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease." Br J Nutr **106**(11): 1724-31.
- Peyrin-Biroulet, L., H. Barraud, et al. (2006). "[Epigenetic changes and liver carcinogenesis]." Gastroenterol Clin Biol **30**(12): 1354-9.
- Piedrahita, J. A., B. Oetama, et al. (1999). "Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development." Nat Genet **23**(2): 228-32.
- Pogribny, I. P., S. J. James, et al. (2012). "Molecular alterations in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency." Mol Nutr Food Res **56**(1): 116-25.
- Pogribny, I. P., B. J. Miller, et al. (1997). "Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat." Cancer Lett **115**(1): 31-8.
- Pogribny, I. P., S. A. Ross, et al. (2006). "Histone H3 lysine 9 and H4 lysine 20 trimethylation and the expression of Suv4-20h2 and Suv-39h1 histone methyltransferases in hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats." Carcinogenesis **27**(6): 1180-6.
- Pogribny, I. P., V. P. Tryndyak, et al. (2007). "Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis." J Nutr **137**(1 Suppl): 216S-222S.
- Poirier, L. A. (1994). "Methyl group deficiency in hepatocarcinogenesis." Drug Metab Rev **26**(1-2): 185-99.
- Poirier, L. A., P. H. Grantham, et al. (1977). "The effects of a marginally lipotrope-deficient diet on the hepatic levels of S-adenosylmethionine and on the urinary metabolites of 2-acetylaminofluorene in rats." Cancer Res **37**(3): 744-8.

- Porter, R. K. (2000). "Mammalian mitochondrial inner membrane cationic and neutral amino acid carriers." Biochim Biophys Acta **1459**(2-3): 356-62.
- Potischman, N., L. A. Brinton, et al. (1991). "A case-control study of serum folate levels and invasive cervical cancer." Cancer Res **51**(18): 4785-9.
- Prasad, P. D., S. Ramamoorthy, et al. (1995). "Molecular cloning of the human placental folate transporter." Biochem Biophys Res Commun **206**(2): 681-7.
- Qiu, A., M. Jansen, et al. (2006). "Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption." Cell **127**(5): 917-28.
- Qiu, A., S. H. Min, et al. (2007). "Rodent intestinal folate transporters (SLC46A1): secondary structure, functional properties, and response to dietary folate restriction." Am J Physiol Cell Physiol **293**(5): C1669-78.
- Ragoussis, J., G. Senger, et al. (1992). "Genomic organization of the human folate receptor genes on chromosome 11q13." Genomics **14**(2): 423-30.
- Rao, P. V., T. A. Garrow, et al. (1998). "Betaine-homocysteine methyltransferase is a developmentally regulated enzyme crystallin in rhesus monkey lens." J Biol Chem **273**(46): 30669-74.
- Rheeder, J. P., W. F. Marasas, et al. (2002). "Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species." Appl Environ Microbiol **68**(5): 2101-5.
- Riboni, L., A. Prinetti, et al. (1998). "The effects of exogenous sphingosine on Neuro2a cells are strictly related to the overall capacity of cells to metabolize sphingosine." J Biochem **124**(5): 900-4.
- Riley, R. T., E. Enongene, et al. (2001). "Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis." Environ Health Perspect **109 Suppl 2**: 301-8.
- Riley, R. T., D. M. Hinton, et al. (1994). "Dietary fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity." J Nutr **124**(4): 594-603.
- Riley, R. T. and K. A. Voss (2006). "Differential sensitivity of rat kidney and liver to fumonisin toxicity: organ-specific differences in toxin accumulation and sphingoid base metabolism." Toxicol Sci **92**(1): 335-45.
- Roblin, X., J. Pofelski, et al. (2007). "[Steatosis, chronic hepatitis virus C infection and homocysteine]." Gastroenterol Clin Biol **31**(4): 415-20.
- Ross, J. F., H. Wang, et al. (1999). "Folate receptor type beta is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia." Cancer **85**(2): 348-57.
- Rothberg, K. G., Y. S. Ying, et al. (1990a). "Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate." J Cell Biol **111**(6 Pt 2): 2931-8.
- Rothberg, K. G., Y. S. Ying, et al. (1990b). "The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway." J Cell Biol **110**(3): 637-49.
- Roy, K., J. H. Chiao, et al. (1998). "Chromosomal localization of the murine RFC-1 gene encoding a folate transporter and its amplification in an antifolate resistant variant overproducing the transporter." Cancer Genet Cytogenet **105**(1): 29-38.
- Rundlett, S. E., A. A. Carmen, et al. (1996). "HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14503-8.
- Sadasivan, E., M. M. Cedeno, et al. (1994). "Characterization of the gene encoding a folate-binding protein expressed in human placenta. Identification of promoter activity in a

- G-rich SP1 site linked with the tandemly repeated GGAAG motif for the ets encoded GA-binding protein." J Biol Chem **269**(7): 4725-35.
- Sadasivan, E., A. Regec, et al. (2002). "The half-life of the transcript encoding the folate receptor alpha in KB cells is reduced by cytosolic proteins expressed in folate-replete and not in folate-depleted cells." Gene **291**(1-2): 149-58.
- Sadler, T. W., A. H. Merrill, et al. (2002). "Prevention of fumonisin B1-induced neural tube defects by folic acid." Teratology **66**(4): 169-76.
- Sadlish, H., F. M. Williams, et al. (2002). "Cytoplasmic domains of the reduced folate carrier are essential for trafficking, but not function." Biochem J **364**(Pt 3): 777-86.
- Said, H. M., N. Chatterjee, et al. (2000). "Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency." Am J Physiol Cell Physiol **279**(6): C1889-95.
- Salmon, W. D. and D. H. Copeland (1954). "Liver carcinoma and related lesions in chronic choline deficiency." Ann N Y Acad Sci **57**(6): 665-77.
- Sauer, J., J. B. Mason, et al. (2009). "Too much folate: a risk factor for cancer and cardiovascular disease?" Curr Opin Clin Nutr Metab Care **12**(1): 30-6.
- Sawan, C. and Z. Herceg. (2010). "Histone modifications and cancer." Adv Genet **70**: 57-85.
- Sawan, C., T. Vaissiere, et al. (2008). "Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer." Mutat Res **642**(1-2): 1-13.
- Schmelz, E. M., M. A. Dombink-Kurtzman, et al. (1998). "Induction of apoptosis by fumonisin B1 in HT29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases." Toxicol Appl Pharmacol **148**(2): 252-60.
- Scholl, T. O. and W. G. Johnson (2000). "Folic acid: influence on the outcome of pregnancy." Am J Clin Nutr **71**(5 Suppl): 1295S-303S.
- Schotta, G., M. Lachner, et al. (2004). "A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin." Genes Dev **18**(11): 1251-62.
- Schroeder, J. J., H. M. Crane, et al. (1994). "Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1. A molecular mechanism for carcinogenesis associated with *Fusarium moniliforme*." J Biol Chem **269**(5): 3475-81.
- Scott, J. M. (1999). "Folate and vitamin B12." Proc Nutr Soc **58**(2): 441-8.
- Selhub, J. (1999). "Homocysteine metabolism." Annu Rev Nutr **19**: 217-46.
- Selhub, J. and W. A. Franklin (1984). "The folate-binding protein of rat kidney. Purification, properties, and cellular distribution." J Biol Chem **259**(10): 6601-6.
- Sesso, R. M., Y. Iunes, et al. (1999). "Myeloneuropathy following nitrous oxide anaesthesia in a patient with macrocytic anaemia." Neuroradiology **41**(8): 588-90.
- Sharina, I. G., R. Zhao, et al. (2002). "Role of the C-terminus and the long cytoplasmic loop in reduced folate carrier expression and function." Biochem Pharmacol **63**(9): 1717-24.
- Shaw, G. M., S. L. Carmichael, et al. (2004). "Periconceptional dietary intake of choline and betaine and neural tube defects in offspring." Am J Epidemiol **160**(2): 102-9.
- Shayeghi, M., G. O. Latunde-Dada, et al. (2005). "Identification of an intestinal heme transporter." Cell **122**(5): 789-801.
- Shen, F., J. F. Ross, et al. (1994). "Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type beta in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity." Biochemistry **33**(5): 1209-15.
- Shen, F., M. Wu, et al. (1995). "Folate receptor type gamma is primarily a secretory protein due to lack of an efficient signal for glycosylphosphatidylinositol modification: protein characterization and cell type specificity." Biochemistry **34**(16): 5660-5.

- Shi, Y., F. Lan, et al. (2004). "Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1." Cell **119**(7): 941-53.
- Shivapurkar, N. and L. A. Poirier (1983). "Tissue levels of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets for one to five weeks." Carcinogenesis **4**(8): 1051-7.
- Shogren-Knaak, M., H. Ishii, et al. (2006). "Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions." Science **311**(5762): 844-7.
- Shojania, A. M., G. Hornady, et al. (1968). "Oral contraceptives and serum-folate level." Lancet **1**(7556): 1376-7.
- Shon, J. K., B. H. Shon, et al. (2009). "Hepatitis B virus-X protein recruits histone deacetylase 1 to repress insulin-like growth factor binding protein 3 transcription." Virus Res **139**(1): 14-21.
- Silani, V., C. Bonifati, et al. (1993). "GangliosideGM1 expression during human spinal cord and neural crest development." Neuroreport **4**(6): 767-70.
- Sims, R. J., 3rd, K. Nishioka, et al. (2003). "Histone lysine methylation: a signature for chromatin function." Trends Genet **19**(11): 629-39.
- Singh, V., T. B. Miranda, et al. (2004). "DAL-1/4.1B tumor suppressor interacts with protein arginine N-methyltransferase 3 (PRMT3) and inhibits its ability to methylate substrates in vitro and in vivo." Oncogene **23**(47): 7761-71.
- Skiba, W. E., M. P. Taylor, et al. (1982). "Human hepatic methionine biosynthesis. Purification and characterization of betaine:homocysteine S-methyltransferase." J Biol Chem **257**(24): 14944-8.
- Slaga, T. J. (1983). "Overview of tumor promotion in animals." Environ Health Perspect **50**: 3-14.
- Smith, S. B., R. Kekuda, et al. (1999). "Expression of folate receptor alpha in the mammalian retinol pigmented epithelium and retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(5): 840-8.
- Smolin, L. A. and N. J. Benevenga (1982). "Accumulation of homocyst(e)ine in vitamin B-6 deficiency: a model for the study of cystathionine beta-synthase deficiency." J Nutr **112**(7): 1264-72.
- Smolin, L. A., T. D. Crenshaw, et al. (1983). "Homocyst(e)ine accumulation in pigs fed diets deficient in vitamin B-6: relationship to atherosclerosis." J Nutr **113**(10): 2022-33.
- Sohn, K. J., R. Croxford, et al. (2004). "Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate." J Natl Cancer Inst **96**(2): 134-44.
- Spiegel, S. (1999). "Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers." J Leukoc Biol **65**(3): 341-4.
- Stanner, S. A., J. Hughes, et al. (2004). "A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'." Public Health Nutr **7**(3): 407-22.
- Steger, D. J. and J. L. Workman (1996). "Remodeling chromatin structures for transcription: what happens to the histones?" Bioessays **18**(11): 875-84.
- Stevens, V. L., S. Nimkar, et al. (1990). "Characteristics of the growth inhibition and cytotoxicity of long-chain (sphingoid) bases for Chinese hamster ovary cells: evidence for an involvement of protein kinase C." Biochim Biophys Acta **1051**(1): 37-45.
- Stevens, V. L. and J. Tang (1997). "Fumonisin B1-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake *via* the glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor." J Biol Chem **272**(29): 18020-5.

- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-5.
- Sun, W., B. Xing, et al. (2007). "Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues." Mol Cell Proteomics **6**(10): 1798-808.
- Sunden, S. L., M. S. Renduchintala, et al. (1997). "Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene." Arch Biochem Biophys **345**(1): 171-4.
- Sweeney, E. A., C. Sakakura, et al. (1996). "Sphingosine and its methylated derivative N,N-dimethylsphingosine (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines." Int J Cancer **66**(3): 358-66.
- Szegedi, S. S., C. C. Castro, et al. (2008). "Betaine-homocysteine S-methyltransferase-2 is an S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase." J Biol Chem **283**(14): 8939-45.
- Szegedi, S. S. and T. A. Garrow (2004). "Oligomerization is required for betaine-homocysteine S-methyltransferase function." Arch Biochem Biophys **426**(1): 32-42.
- Tanner, S. M., Z. Li, et al. (2004). "Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B12: founder effects, consanguinity, and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East." Hum Mutat **23**(4): 327-33.
- Teng, Y. W., M. G. Mehedint, et al. (2011). "Deletion of betaine-homocysteine S-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon metabolism, resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas." J Biol Chem **286**(42): 36258-67.
- Thibault, N., V. Burgat, et al. (1997). "Les fumonisines: nature, origine et toxicité." Revue Méd Vét **148**(5): 369-388.
- Tolleson, W. H., L. H. Couch, et al. (1999). "Fumonisin B1 induces apoptosis in cultured human keratinocytes through sphinganine accumulation and ceramide depletion." Int J Oncol **14**(5): 833-43.
- Tolner, B., K. Roy, et al. (1998). "Structural analysis of the human RFC-1 gene encoding a folate transporter reveals multiple promoters and alternatively spliced transcripts with 5' end heterogeneity." Gene **211**(2): 331-41.
- Trauner, M., M. Arrese, et al. (2009). "Fatty liver and lipotoxicity." Biochim Biophys Acta **1801**(3): 299-310.
- Trippett, T. M., S. Garcia, et al. (2001). "Localization of a human reduced folate carrier protein in the mitochondrial as well as the cell membrane of leukemia cells." Cancer Res **61**(5): 1941-7.
- Tyson, G. L. and H. B. El-Serag. 2011 "Risk factors for cholangiocarcinoma." Hepatology **54**(1): 173-84.
- Ueland, P. M. (2011). "Choline and betaine in health and disease." J Inherit Metab Dis **34**(1): 3-15.
- Vance, D. E., Z. Li, et al. (2007). "Hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, unexpected roles in animal biochemistry and physiology." J Biol Chem **282**(46): 33237-41.
- Varela-Moreiras, G., C. Ragel, et al. (1995). "Choline deficiency and methotrexate treatment induces marked but reversible changes in hepatic folate concentrations, serum homocysteine and DNA methylation rates in rats." J Am Coll Nutr **14**(5): 480-5.

- Varela-Moreiras, G., J. Selhub, et al. (1992). "Effect of choline deficiency in rats on folate content and distribution." J Nutr Biochem **3**(10): 519-522.
- Vega, R. B., K. Matsuda, et al. (2004). "Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis." Cell **119**(4): 555-66.
- Ventura, P., M. C. Rosa, et al. (2005). "Hyperhomocysteinaemia in chronic liver diseases: role of disease stage, vitamin status and methylenetetrahydrofolate reductase genetics." Liver Int **25**(1): 49-56.
- Viogt, M. N., J. D. Clarke, et al. (1981). "Abnormal concentrations of B vitamins and amino acids in plasma and B vitamins in bile of rabbits with aflatoxicosis." Appl Environ Microbiol **41**(4): 919-23.
- Voorrips, L. E., R. A. Goldbohm, et al. (2000). "A prospective cohort study on antioxidant and folate intake and male lung cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **9**(4): 357-65.
- Voss, K. A., R. D. Plattner, et al. (1990). "Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B1 and B2 content of water and chloroform/methanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain MRC 826 culture material." Mycopathologia **112**(2): 81-92.
- Voss, K. A., R. T. Riley, et al. (2009). "Reproductive and sphingolipid metabolic effects of fumonisin B(1) and its alkaline hydrolysis product in LM/Bc mice: hydrolyzed fumonisin B(1) did not cause neural tube defects." Toxicol Sci **112**(2): 459-67.
- Wagner, C., W. T. Briggs, et al. (1985). "Inhibition of glycine N-methyltransferase activity by folate derivatives: implications for regulation of methyl group metabolism." Biochem Biophys Res Commun **127**(3): 746-52.
- Wainfan, E. and M. Dizik (1987). "Suppression by methionine and choline of onco-fetal patterns of liver tRNA methyltransferase activities in carcinogen-treated rats." Carcinogenesis **8**(4): 615-7.
- Wainfan, E., M. Dizik, et al. (1989). "Rapid appearance of hypomethylated DNA in livers of rats fed cancer-promoting, methyl-deficient diets." Cancer Res **49**(15): 4094-7.
- Walkinshaw, D. R., S. Tahmasebi, et al. (2008). "Histone deacetylases as transducers and targets of nuclear signaling." J Cell Biochem **104**(5): 1541-52.
- Waly, M. I., K. K. Kharbanda, et al. (2011). "Ethanol lowers glutathione in rat liver and brain and inhibits methionine synthase in a cobalamin-dependent manner." Alcohol Clin Exp Res **35**(2): 277-83.
- Wang, E., R. T. Riley, et al. (1999). "Fumonisin B1 consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine." J Nutr **129**(1): 214-20.
- Wang, H., J. F. Ross, et al. (1998). "Structure and regulation of a polymorphic gene encoding folate receptor type gamma/gamma'." Nucleic Acids Res **26**(9): 2132-42.
- Wang, J. A., N. P. Dudman, et al. (1991). "Betaine:homocysteine methyltransferase--a new assay for the liver enzyme and its absence from human skin fibroblasts and peripheral blood lymphocytes." Clin Chim Acta **204**(1-3): 239-49.
- Wang, Y., R. Zhao, et al. (2001). "Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis." Biochim Biophys Acta **1513**(1): 49-54.
- Wang, X. L., N. Duarte, et al. (1999). "Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population." Atherosclerosis **146**(1): 133-40.

- Waterland, R. A. and K. B. Michels (2007). "Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis." Annu Rev Nutr **27**: 363-88.
- Weisberg, I. S., P. F. Jacques, et al. (2001). "The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine." Atherosclerosis **156**(2): 409-15.
- Weitman, S. D., A. G. Weinberg, et al. (1992). "Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis." Cancer Res **52**(23): 6708-11.
- Welzel, T. M., H. A. Katki, et al. (2007). "Blood folate levels and risk of liver damage and hepatocellular carcinoma in a prospective high-risk cohort." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(6): 1279-82.
- Whetstine, J. R., T. L. Witt, et al. (2002). "The human reduced folate carrier gene is regulated by the AP2 and sp1 transcription factor families and a functional 61-base pair polymorphism." J Biol Chem **277**(46): 43873-80.
- Wilson, T. M., P. E. Nelson, et al. (1985). "Hepatic neoplastic nodules, adenofibrosis, and cholangiocarcinomas in male Fisher 344 rats fed corn naturally contaminated with *Fusarium moniliforme*." Carcinogenesis **6**(8): 1155-60.
- Wilson, A., R. Platt, et al. (1999). "A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida." Mol Genet Metab **67**(4): 317-23.
- Worm, J., A. F. Kirkin, et al. (2001). "Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells." J Biol Chem **276**(43): 39990-40000.
- Xue, G. P. and A. M. Snoswell (1986). "Developmental changes in the activities of enzymes related to methyl group metabolism in sheep tissues." Comp Biochem Physiol B **83**(1): 115-20.
- Yao, R., Z. Nimec, et al. (1996). "Identification, cloning, and sequencing of a cDNA coding for rat gamma-glutamyl hydrolase." J Biol Chem **271**(15): 8525-8.
- Yao, T. P., S. P. Oh, et al. (1998). "Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300." Cell **93**(3): 361-72.
- Yang, H. and C. A. Mizzen (2009). "The multiple facets of histone H4-lysine 20 methylation." Biochem Cell Biol **87**(1): 151-61.
- Yang-Feng, T. L., Y. Y. Ma, et al. (1995). "Assignment of the human folate transporter gene to chromosome 21q22.3 by somatic cell hybrid analysis and in situ hybridization." Biochem Biophys Res Commun **210**(3): 874-9.
- Yates, Z. and M. Lucock (2003). "Interaction between common folate polymorphisms and B-vitamin nutritional status modulates homocysteine and risk for a thrombotic event." Mol Genet Metab **79**(3): 201-13.
- Yebra, M. J. and A. S. Bhagwat (1995). "A cytosine methyltransferase converts 5-methylcytosine in DNA to thymine." Biochemistry **34**(45): 14752-7.
- Yin, Z., J. Haynie, et al. (2002). "The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1alpha, in heart development and neurulation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10488-93.
- Yokoyama, S., M. A. Sells, et al. (1985). "Hepatocarcinogenic and promoting action of a choline-devoid diet in the rat." Cancer Res **45**(6): 2834-42.

- Yoo, H. S., W. P. Norred, et al. (1992). "Fumonisin inhibition of de novo sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK1 cells." Toxicol Appl Pharmacol **114**(1): 9-15.
- Yoshizawa, T., A. Yamashita, et al. (1994). "Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China." Appl Environ Microbiol **60**(5): 1626-9.
- Youngdahl-Turner, P., L. E. Rosenberg, et al. (1978). "Binding and uptake of transcobalamin II by human fibroblasts." J Clin Invest **61**(1): 133-41.
- Yurtcu, E., O. D. Iseri, et al. "Effects of ascorbic acid and beta-carotene on HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line." Mol Biol Rep **38**(7): 4265-72.
- Zeisel, S. H. (1981). "Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology." Annu Rev Nutr **1**: 95-121.
- Zeisel, S. H., K. A. Da Costa, et al. (1991). "Choline, an essential nutrient for humans." Faseb J **5**(7): 2093-8.
- Zeisel, S. H., T. Zola, et al. (1989). "Effect of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentrations in rat liver." Biochem J **259**(3): 725-9.
- Zeng, W., A. R. Ball, Jr., et al. (2010). "HP1: heterochromatin binding proteins working the genome." Epigenetics **5**(4): 287-92.
- Zhang, Y. J., P. Rossner, Jr., et al. (2006). "Aflatoxin B1 and polycyclic aromatic hydrocarbon adducts, p53 mutations and p16 methylation in liver tissue and plasma of hepatocellular carcinoma patients." Int J Cancer **119**(5): 985-91.
- Zhao, R., R. G. Russell, et al. (2001). "Rescue of embryonic lethality in reduced folate carrier-deficient mice by maternal folic acid supplementation reveals early neonatal failure of hematopoietic organs." J Biol Chem **276**(13): 10224-8.
- Zhao, R., L. H. Matherly, et al. (2009). "Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues." Expert Rev Mol Med **11**: e4.
- Zheng, D. L., L. Zhang, et al. (2009). "Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein *via* interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A." J Hepatol **50**(2): 377-87.

FICHES
TECHNIQUES

Fiche 1
Foies humains adultes et fœtaux analysés

Les foies humains adultes ont été prélevés au CHU de Nancy-Brabois et les foies humains fœtaux ont été prélevés à la Maternité Régionale de Nancy après consentements écrits des patients et des parents respectivement.

Une fois les prélèvements effectués, les échantillons ont directement été congelés dans l'azote liquide puis placés à -80° ou directement fixés dans du formol 4%.

Les principales caractéristiques des tissus analysés dans cette étude sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Patients	Age	Sexe	Diagnostic	Etiologie
C1 vs T1	77 ans	Homme	Cholangiocarcinome	Foie non cirrhotique
C2 vs T2	60 ans	Homme	Cholangiocarcinome	Fibrose
C3 vs T3	61 ans	Homme	Hépatocarcinome (grade III)	Fibrose
C4 vs T4	61 ans	Homme	Hépatocarcinome (grade III)	Foie non cirrhotique
C5 vs T5	67 ans	Femme	Hépatocarcinome (grade III)	Foie non cirrhotique
C6 vs T6	53 ans	Homme	Hépatocarcinome (grade III)	Foie cirrhotique
Foetus	Age gestationnel	Sexe	Diagnostic	Etiologie
F1	27 semaines		Avortement spontané	
F2	38 semaines		Avortement spontané	

Fiche 2 Lignées cellulaires – Conditions de culture

Toutes les cultures cellulaires sont réalisées de manière stérile sous une hotte à flux vertical, poste de sécurité microbiologique de type II.

- Décongeler une ampoule de cellules (Fiche 2)
- Mettre en suspension les cellules dans une flasque de culture de 75 cm² ① puis incuber à 37°C (5% CO₂/ 95% air) en changeant le milieu de culture tous les deux ou trois jours :

Lignées cellulaires	Milieu	Compléments	Sérum	Antibiotiques
HepG2 : hepatocarcinoma cell line (ATCC HB-8065)	DMEM ②	L-Glutamine ② 2 mM	Sérum de veau foetal ③ 10%	Penicilline Streptomycine ② 1%
REC : Primary Renal Proximal Tubule Epithelial Cells (ATCC PCS-400-010)	Renal epithelial cell basal medium (ATCC PCS- 400-030)	Renal epithelial cell growth kit (ATCC PCS- 400-040)	Sérum de veau foetal ③ 10%	Penicilline Streptomycine② 1%
G401 : kidney rhabdoid tumor cell line (ATCC CRL-1441)	Mc Coy's Medium modified ②	L-Glutamine ② 2 mM	Sérum de veau foetal ③ 10%	Penicilline Streptomycine ② 1%
HKC8 ④ : immortalized human renal proximal cell line	DMEM-F12 ②	Insuline, Transferine, Sélénium② 1X	Sérum de veau foetal ③ 2,5% (PAA)	Penicilline Streptomycine ② 1%

① Plastiques stériles à usage unique : BD Falcon, Dutscher, Brumath, France

② Tous les produits sont fournis par : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

③ Sérum de Veau Foetal fourni par PAA Laboratories, France

④ Lignée HKC8 obtenue généreusement de la part du Dr. Racusen Lorraine C.

Département of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine, 624 Ross Building,
720 Rutlang Ave., MD 21205, USA.

Fiche 3

Décongélation des lignées cellulaires

- Sortir le cryotube ① de l'azote liquide et le réchauffer rapidement dans un bain-marie à 37°C
- Nettoyer l'extérieur du cryotube à l'alcool.
- Transvaser le contenu du cryotube dans un tube de 15 mL contenant 10 mL de milieu de culture complet
- Centrifuger 5 min à 200 g pour l'élimination du glycérol ou du DMSO
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 5 mL de milieu de culture complet
- Ensemencer une boîte de culture de 25 ou 75 cm² ②
- Après 48h, récupérer 1 mL de milieu de culture pour effectuer le test de détection des mycoplasmes (Fiche 5)
- Changer le milieu après 48h

① Cryotube, Nalgène : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

② Plastiques stériles à usage unique : BD Falcon, Dutscher, Brumath, France.

Fiche 4 Repiquage des lignées cellulaires

Tous les produits doivent être à température ambiante

- Aspirer le milieu de culture
- Rincer le tapis cellulaire avec du PBS stérile ①
- Ajouter de la trypsine-EDTA ② 0,05% à raison de 40 μL par cm^2 à trypsiner
- Incuber 5 à 10 min à 37°C, selon le type de lignée
- Préparer pendant ce temps un tube de 15 mL avec du milieu de culture correspondant à la lignée (2 fois le volume de trypsine)
- Décrocher les cellules à l'aide d'une pipette par aspiration/refoulement
- Resuspendre les cellules trypsinées dans le tube de 15 mL pour stopper la réaction
- Centrifuger à 200 g pendant 5 min
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 2 à 5 mL de milieu de culture correspondant au milieu dans lequel les cellules serontensemencées.
- Compter les cellules sur 2 grilles d'une cellule de Thoma ③
- Faire la moyenne des 2 grilles, le nombre trouvé correspond à $N \cdot 10^4$ cellules/mL
- Pour l'entretien des cellules, ensemenecer à $2 \cdot 10^4$ cellules par cm^2

① PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} : Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France

② Trypsine-EDTA trypsine 0.05% : Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France

③ Cellule de Thoma : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

Fiche 5 Congélation des lignées cellulaires

Dans du DMSO (9% DMSO3, 36% SVF, 55% milieu de culture)

Pour une ampoule contenant 1.10^6 à 2.10^6 selon le type cellulaire :

- Préparer le milieu de congélation dans de la glace : 70 μ L de DMSO, 300 μ L de SVF, 450 μ L de milieu de culture correspondant aux cellules
- Récupérer 1 mL de milieu de culture pour effectuer un test de détection des mycoplasmes (Fiche 5)
- Après avoir éliminé le milieu, trypsiné, et compté les cellules, centrifuger de nouveau et retirer le surnageant.
- Déposer délicatement les 800 μ L de milieu de congélation en agitant légèrement le tube à 4°C
- Transférer les cellules ainsi suspendues dans un cryotube ①
- Placer les tubes dans la boîte de congélation ②
- Placer cette boîte 24h à -80°C. Puis transférer les tubes dans un container à azote liquide
- Référencer les tubes congelés et décongelés dans les registres de cultures cellulaires

① Cryotube, Nalgène : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

② Boîte de congélation : Nalgène Cryo (VWR international, Fontenay-sous-Bois, France) dans laquelle l'alcool isopropylique permet une congélation progressive

Fiche 6

Test de détection des mycoplasmes à partir du milieu de culture ①

➤ Avant de commencer

Les échantillons doivent être issus de culture cellulaire à 90-100% confluentes car des inhibiteurs de PCR peuvent s'accumuler dans le milieu des cultures plus avancées. L'utilisation de pénicilline/streptomycine n'affecte pas la sensibilité du test. Seuls les surnageants peuvent être testés pour les mycoplasmes. Dans le cas d'une utilisation des culots cellulaires, l'ADN doit préalablement être extrait car les débris peuvent interférer avec la réaction de PCR (2µL de l'extrait suffisent pour réaliser la PCR). La préparation de l'échantillon peut être effectuée de deux manières :

→ Inactivation par la chaleur de l'échantillon

La matrice pour l'analyse par PCR est préparée en exposant le surnageant de l'échantillon à la chaleur. 100µL de surnageant sont transférés dans un tube stérile puis incubés 10 min à 95°. Le surnageant est ensuite centrifugé pendant 5 sec à 1000g pour éliminer les débris. Une fois récupéré, il sera utilisé pour la PCR. Alternativement, l'ADN peut être purifié.

→ Enrichissement en mycoplasmes par centrifugation

1 mL de surnageant de l'échantillon est transféré dans un tube stérile. Il est ensuite centrifugé 15 min à 10000g (alternativement 6 min à 13000g) pour sédimenter les particules de mycoplasmes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot suspendu dans 50 µL de tampon (10 mM de Tris à pH 8.4). L'échantillon est ensuite vortexé puis chauffé pendant 10 min à 95°. L'extrait peut être conservé à -18° pendant 1 an.

➤ Procédure

→ Préparer un mélange réactionnel correspondant au nombre total de tube pour un volume final de 25 µL par tube :

	Tube « test »	Témoin négatif	Témoin positif
Tampon de réhydratation	22.8 µL	22.8 µL	24.8 µL
Taq Polymerase © (5 U/µL)	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL

→ Agiter le mélange réactionnel doucement sans utiliser le vortex

→ Couper le nombre de tubes nécessaires et les annoter

→ Centrifuger ou taper les tubes sur la table pour collecter le lyophilisat dans le fond du tube. Enlever le film de protection des tubes.

→ Déposer 23 µL de mix dans les tubes « test » et dans le tube « témoin négatif »

→ Déposer 25 µL de mix dans les tubes « témoin positif »

NB : attention aux contaminations, il faut toujours préparer les témoins positifs après les témoins négatifs et les tubes « test » !

→ Ajouter 2 µL d'échantillon dans les tubes « test » et 2 µL d'eau dans le témoin négatif.

→ Fermer les tubes grâce au couvercles fournis dans le kit. Ne pas vortexer !

→ Centrifuger brièvement les tubes

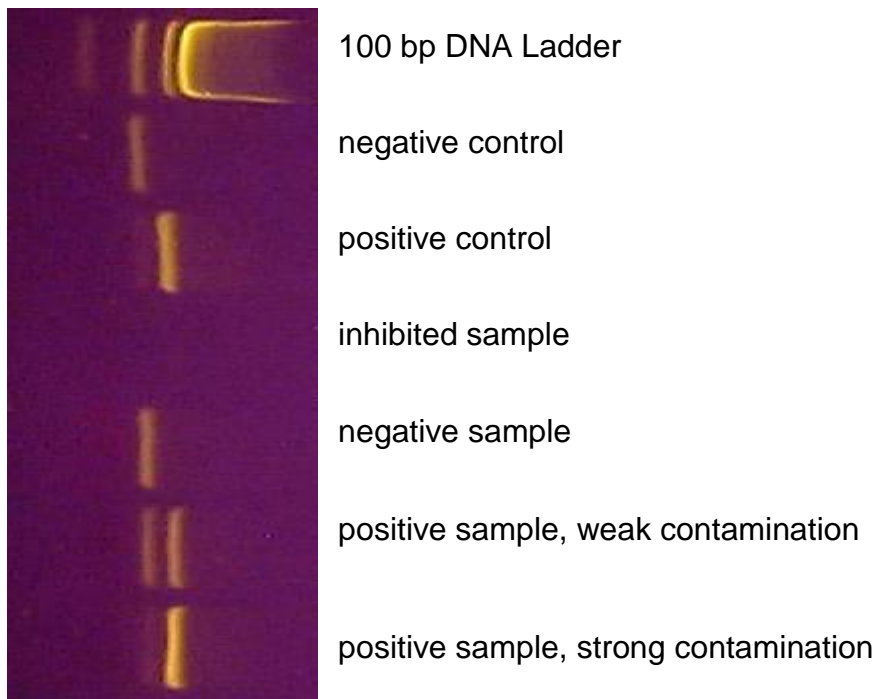
→ Incuber pendant 5 min à température ambiante

→ Réaliser immédiatement la PCR selon le programme suivant :

Nombre de cycles	Température	Temps
1 cycle	94°	2 min
39 cycles	94°	30 sec
	55°	30 sec
	72°	30 sec
1 cycle	4°	∞

- Préparer un gel d'agarose ③ à 1.5%
- Une fois la réaction de PCR terminée, déposer directement 5 µL de chaque produit de PCR (il n'y a pas besoin de rajouter du tampon de dépôt)
- Faire migrer pendant 20 min à environ 100 V
- Une bande distincte à 191 pb doit apparaître dans tous les échantillons témoignant d'une réaction réussie. Cette bande a tendance à diminuer lorsque l'ADN de mycoplasme est amplifié. Dans ce cas, une bande à 265-278 pb est également visible sur le gel.

Exemple de résultats



-
- ① VenorGeM Advance Mycoplasma Detection Kit, 11_7096, BIOVALLEY S.A., France
 - ② MB Taq DNA Polymerase, 53_0050, BIOVALLEY S.A., France
 - ③ Agarose standard, Euromedex

Fiche 7 Protocole animal

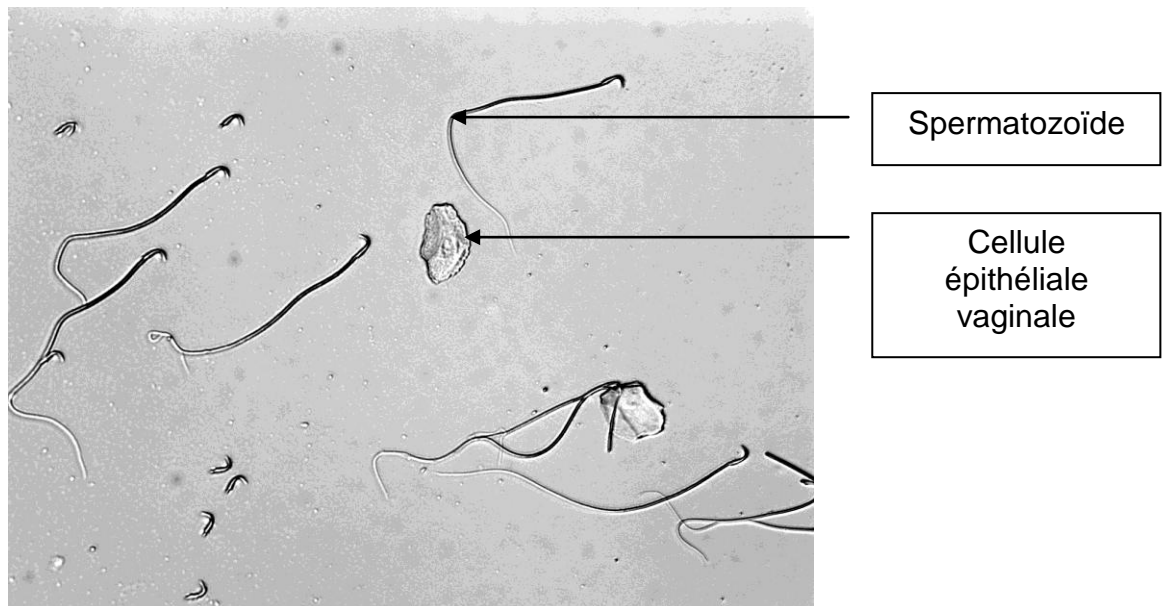
- Les animaux ont été traités en accord avec le N.I.H. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.
- Provenance des animaux : Charles River, l'Arbresle, France
- Espèce utilisée : rats Wistar
- Poids à l'arrivée : 180-210 g
- Age à l'arrivée : 2 mois
- Acclimatation : 2 semaines
- Environnement: conditions standard du laboratoire avec accès à volonté à la nourriture et à l'eau
- Rats mâles reproducteurs : alimentés avec de la nourriture standard avant l'accouplement.
- Adaptation : un mois avant la mise en accouplement, 4 groupes de rates ont été créés selon le régime alimentaire fourni et l'administration de la toxine alimentaire fumonisine FB1 par gavage :

Groupes	Nombre de rates	Régime	Gavage
Témoin	2	Standard ①	Eau
Carencé	3	Carencé ②	Eau
FB1	2	Standard ①	FB1 ③: 4 µg/kg p.c./jour
Carencé/FB1	3	Carencé ②	FB1 ③: 4 µg/kg p.c./jour

- Accouplement : Après un mois d'adaptation les rates sont mises en présence des mâles. Après 24h, réaliser un frottis vaginal qui témoignera du jour exact de l'accouplement :

- Utiliser un coton tige imbibé de sérum physiologique
- Etaler le prélèvement sur une lame
- Observer la lame au microscope
- Si le test est positif, considérer le jour J0 de gestation et enlever le mâle de la cage

→ Si le test est négatif, laisser la rate en présence du mâle et recommencer la manipulation après 24h



Exemple de photo montrant un test positif

- Gestation : compter 20 jours à partir de J0 et sacrifier les mères afin de prélever les organes ainsi que les embryons (fiche 8)

-
- ① Régime alimentaire normal : SAFE, Augy, France
vitamine B12 (0,04 mg/kg), folates (0,9 mg/kg), choline (2100 mg/kg)
 - ② Régime carencé, Special Diet Service, Saint- Gratien, France
vitamine B12 (0 µg/kg), folates (0,01 mg/kg), choline (0,06 mg/kg)
 - ③ Fumonisine FB1, F1147-1mg, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
Diluée dans l'eau à 4µg/kg de poids corporel (p.c.)/jour

Fiche 8 Prélèvement des échantillons

- Après 20 jours de gestation, anesthésier les rates gestantes avec un excès d'isoflurane ①
- Effectuer un prélèvement sanguin intracardiaque à l'aide d'une seringue héparinée ② pour l'analyse des concentrations plasmatiques en folates, vitamine B12 et homocystéine
- Recueillir le sang dans des tubes ③ contenant 50 µL d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) et centrifuger à 3000 g pendant 20 min à 4°C pour récupérer le plasma.
- Récupérer les embryons dans l'utérus des rates, chaque embryon étant isolé dans des sacs amniotiques indépendants et possédant un placenta individuel (qui sera prélevé)
- Examiner les embryons et l'utérus afin de déceler les éventuelles anomalies embryonnaires (avortons, malformations fœtales, mort *in utero*...)
- Après anesthésie par excès d'isoflurane, placer les embryons sur la glace et disséquer chaque embryon afin de récupérer les organes (foie, rein, cerveau...)
- Les organes sont directement congelés dans l'azote liquide puis placés à -80°C (pour les analyses de biologie moléculaire, western blot, dosages tissulaires) ou fixés dans le paraformaldéhyde 5% ④ (pour les analyses d'immunohistochimie)

① Isoflurane, Baxter

② Seringues traitées avec de l'héparine, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

③ Tubes héparinés, Dutscher

④ Paraformaldéhyde, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Fiche 9

Extraction d'ARN avec le kit Rneasy Mini Kit^① à partir des cellules

Ce kit est utilisé pour extraire les ARN servant à la RT-PCR semi-quantitative. Avec cette procédure, tous les ARNs de plus de 200 nucléotides sont purifiés, les ARNm sont conservés et tous les ARNs de taille inférieure à 200 nucléotides (15 à 20% des ARN totaux) sont exclus (ARNr 5.8S, ARNr 5S et ARNt).

Le tampon RLT contient du guanidine thiocyanate (nocif), et le tampon RW1 contient de l'éthanol (inflammable)

Le tampon RLT dénature et inactive les RNases, l'éthanol est nécessaire pour avoir une condition appropriée pour la liaison à la colonne de silice.

Toutes les étapes se font à température ambiante. Toutes les centrifugations doivent être effectuées entre 20 et 25°.

➤ Avant de commencer :

→ Préparer éthanol 70% (ou 50% pour le foie)

→ Ajouter 10 µl de β-mercaptoéthanol^② pour 1 mL de tampon RLT.

→ Ajouter 4 volumes d'éthanol 96-100% au tampon RPE comme indiqué sur la bouteille.

➤ Procédure :

→ Cellules en monocouche : les cellules peuvent être lysées directement dans le récipient de culture cellulaire ou peuvent être décollées avec la trypsine et collectées sous forme de culot cellulaire avant la lyse.

- Pour lyser les cellules directement : déterminer le nombre de cellules puis aspirer le milieu de culture et passer directement à l'étape suivante.
- Pour décoller les cellules avec la trypsine et collecter un culot cellulaire : aspirer le milieu de culture, faire deux lavages au PBS 1X stérile^③, aspirer le PBS, ajouter la trypsine 0.05% - EDTA^④ pendant 5 minutes à 37°C. Lorsque les cellules sont détachées, ajouter 2 volumes de milieu contenant du SVF

pour désactiver la trypsine puis récupérer la suspension cellulaire dans un tube^⑤ pour le centrifuger à 200 g pendant 5 min. Après aspiration du milieu, suspendre le culot cellulaire dans du PBS^③ et centrifuger à nouveau. Eliminer le PBS^③ et procéder à l'étape suivante.

NB : le culot cellulaire peut également être congelé à -80°C pour réaliser l'étape suivante ultérieurement.

→ Reprendre les cellules dans du tampon RLT

- Pour les cellules lysées directement : ajouter le tampon RLT dans le puit à raison de 350 µL pour un puit de diamètre inférieur à 6 cm ou 600 µL pour un puit de diamètre compris entre 6 et 10 cm. Puis récupérer le lysat cellulaire dans un tube^⑤ en s'assurant qu'il n'y a pas d'amas cellulaire.
- Pour les culots cellulaires : décoller le culot en tapotant sur les parois du tube^⑤, ajouter le tampon RLT à raison de 350 µL pour un nombre de cellules inférieur à 5×10^6 ou 600 µL pour un nombre compris entre 5×10^6 et 1×10^7 puis vortexer ou mélanger à la pipette.

→ Passer le lysat cellulaire 5 fois dans une seringue munie d'une aiguille de 0.9 mm de diamètre

→ Ajouter un volume d'éthanol 70°C au lysat cellulaire et mélanger en pipetant. Attention il ne faut pas centrifuger.

NB : un précipité peut se former après ajout d'éthanol mais cela n'affecte pas la procédure.

→ Transférer 700 µL de l'échantillon dans une colonne placée sur un tube de 2 mL

→ Centrifuger pendant 15 s à 8000 g (10 000 rpm) et éliminer l'éluat

NB : si l'échantillon est supérieur à 700 µL, centrifuger le reste successivement en gardant la même colonne et évacuer l'écoulement après chaque centrifugation.

→ Ajouter 700 µL de tampon RW1 dans la colonne

→ Centrifuger 15 s à 8000 g (10 000 rpm) pour laver la membrane et évacuer l'écoulement

NB : enlever délicatement la colonne du tube pour éviter tout contact entre la membrane et le produit d'écoulement. S'assurer que le tube est bien vide.

→ Ajouter 500 µL de tampon RPE dans la colonne

→ Centrifuger 15 s à 8000 g (10 000 rpm) pour laver la membrane et évacuer l'écoulement

→ Ajouter 500 µL de tampon RPE dans la colonne

→ Centrifuger 2 min à 8000 g (10 000 rpm) pour éliminer toute trace d'éthanol

NB : enlever délicatement la colonne du tube pour éviter tout contact entre la membrane et le produit d'écoulement.

→ Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 mL

→ Centrifuger 1 min à vitesse maximale pour éliminer toute trace de tampon RPE

→ Placer la colonne sur un nouveau tube de 1.5 mL

→ Ajouter 30 à 50 µL d'eau RNase free directement sur la membrane

→ Centrifuger 1 min à 8000 g (10 000 rpm) pour éluer l'ARN

→ Dans le cas où la quantité d'ARN prévisible est supérieure à 30 µg, répéter cette étape en ajoutant à nouveau 30 à 50 µL d'eau Rnase free puis en centrifugeant 1 min à 8000 g (10 000 rpm)

① Rneasy Mini Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France

② Préparer le volume à utiliser, à savoir 10 ml de β-Mercaptoéthanol par ml de tampon RLT.

③ PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

④ Trypsine-EDTA trypsine 0.05% : Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France

⑤ Plastiques stériles à usage unique : BD Falcon, Dutscher, Brumath, France

Fiche 10

Extraction d'ARN avec le kit Rneasy® Mini Kit① à partir des tissus

Avec cette procédure, tous les ARNs de plus de 200 nucléotides sont purifiés, les ARNm sont conservés et tous les ARNs de taille inférieure à 200 nucléotides (15 à 20% des ARN totaux) sont exclus (ARNr 5.8S, ARNr 5S et ARNt)

Toutes les étapes se font à température ambiante. Toutes les centrifugations doivent être effectuées entre 20 et 25°.

➤ Avant de commencer :

- Préparer éthanol 70% (ou 50% pour le foie)
- Ajouter 10 µl de β-mercaptoéthanol ② pour 1 mL de tampon RLT.
- Ajouter 4 volumes d'éthanol 96-100% au tampon RPE comme indiqué sur la bouteille.

➤ Procédure :

- Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote et la carboglace et garder entre 20 et 30 mg de tissu puis conserver le reste à -80°C
 - Ajouter 600 µL de tampon RLT et homogénéiser à l'aide d'une seringue et d'une aiguille (0.9mm) en faisant passer le lysat minimum 5 fois dans la seringue
 - Centrifuger le lysat à vitesse maximale (12 à 14000 g) pendant 3 min
 - Récupérer le surnageant à l'aide d'une pipette et transférer le tout dans un nouveau tube
 - Ajouter 1 volume d'éthanol 70% (préférentiellement 50% pour le foie) et mélanger en pipetant (ne pas centrifuger)
- NB : un précipité peut se former après ajout d'éthanol mais cela n'affecte pas la procédure.
- Transférer 700 µL de l'échantillon dans une colonne placée sur un tube de 2 mL
 - Centrifuger pendant 15 s à 8000 g (10 000 rpm) et évacuer l'écoulement
- NB : si l'échantillon est supérieur à 700 µL, centrifuger le reste successivement en gardant la même colonne et évacuer l'écoulement après chaque centrifugation.

→ Ajouter 700 µL de tampon RW1 dans la colonne

→ Centrifuger 15 s à 8000 g (10 000 rpm) pour laver la membrane et évacuer l'écoulement

NB : enlever délicatement la colonne du tube pour éviter tout contact entre la membrane et le produit d'écoulement. S'assurer que le tube est bien vide.

→ Ajouter 500 µL de tampon RPE dans la colonne

→ Centrifuger 15 s à 8000 g (10 000 rpm) pour laver la membrane et évacuer l'écoulement

→ Ajouter 500 µL de tampon RPE dans la colonne

→ Centrifuger 2 min à 8000 g (10 000 rpm) pour éliminer toute trace d'éthanol

NB : enlever délicatement la colonne du tube pour éviter tout contact entre la membrane et le produit d'écoulement.

→ Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 mL

→ Centrifuger 1 min à vitesse maximale pour éliminer toute trace de tampon RPE

→ Placer la colonne sur un nouveau tube de 1.5 mL

→ Ajouter 30 à 50 µL d'eau Rnase free directement sur la membrane

→ Centrifuger 1min à 8000 g (10 000 rpm) pour éluer l'ARN

→ Dans le cas ou la quantité d'ARN prévisible est supérieure à 30 µg, répéter cette étape en ajoutant à nouveau 30 à 50 µL d'eau Rnase free puis en centrifugeant 1 min à 8000 g (10 000 rpm)

→ Doser les ARN afin d'obtenir la concentration de chaque échantillons (fiche 9)

→ Aliquoter les ARN par 1 µg (et 500 ng pour le dépôt sur gel d'agarose – fiche 10) et conserver à -80°C.

① Rneasy® Mini Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France

② Préparer le volume à utiliser, à savoir 10 ml de b-Mercaptoéthanol par ml de tampon RLT.

Fiche 11 Quantification des ARN

- Diluer l'ADN ou l'ARN dans de l'eau à un 1/60^{ème} dans une cuve en quartz.
- Lire l'absorbance à 260 (absorbance des acides nucléiques) et 280 nm (absorbance des protéines) avec un spectrophotomètre^①.

La concentration en ARN est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{ARN}] = 44 \mu\text{g/mL} \times A_{260\text{nm}} \times \text{facteur de dilution}$$

Le rapport A260/A280 témoigne de la pureté des ARN, celui-ci doit être idéalement compris entre 1,8 et 2 lorsque le dosage est effectué dans l'eau Rnase free.

L'absorbance à 260 nm doit être comprise entre 0,1 et 1, dans le cas contraire, ajuster la dilution.

^① Spectrophotomètre Biophotometer, Eppendorf

Fiche 12

Vérification de l'intégrité des ARN sur gel d'agarose^①

➤ Préparation du gel d'agarose^①

- Dissoudre l'agarose à raison de 1% (p/v) dans du tampon TBE 1X^② (Tris, Borate, EDTA) (80-100 mL)
- Chauffer le mélange à l'aide d'un four micro-ondes jusqu'à complète dissolution de l'agarose
- Attendre quelques minutes que le mélange refroidisse
- Ajouter le bromure d'éthidium (BET)^③ à 0,5 µg/mL et homogénéiser
- Couler le mélange dans le support de la cuve d'électrophorèse^④
- Ajouter un peigne de 15 ou 20 puits selon le nombre d'échantillons à déposer
- Laisser polymériser pendant environ 20 min
- Placer le support dans la cuve remplie de tampon TBE 1X^②

➤ Préparation et dépôt des échantillons d'ARN

- Décongeler les aliquots de 500 ng préparés au préalable (fiche 8)
- Ajouter de l'eau MilliQ qsp 10 µL et 2 µL de tampon de dépôt^⑤
- Déposer les 12 µL finaux dans les puits du gel
- Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu puis faire migrer pendant 40 min à 110 V

➤ Observation des ARN sur gel d'agarose

→ Une fois la migration achevée, arrêter le générateur et sortir le support de la cuve puis visualiser l'ARN contenu dans le gel sur une plaque UV (312 nm) par Image Master™ VDS®

→ Deux bandes correspondant aux ARNr 28S et 18S sont alors visibles sur le gel, par contre, si les ARN sont dégradés, un smear est alors observé

① Agarose standard, Euromedex

② Tampon TBE 10X: Tris 890 mM acide borique 890 mM, EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid) 20 mM (pH 8,0), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

③ Bromure d'éthidium (BET) : Eurobio

④ Cuve d'électrophorèse, BioRad

⑤ Solution de dépôt 6X : Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v), EDTA 0,1 mM (pH 8,0), SDS 0,5% (p/v), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑥ Image Master™ VDS, Pharmacia Biotech

Fiche 13
**Retrotranscription des ARN avec le kit Quantitect® Reverse
Transcription①**

Description des composants

- 1- Tampon gDNA Wipeout, 7x : Pour l'élimination de l'ADN génomique.
- 2- Quantiscript Reverse Transcriptase : Pour l'utilisation de la RT-PCR en deux étapes. Contient un mélange des produits Qiagen Omniscript Reverse Transcriptase et Sensiscript Reverse Transcriptase, deux enzymes hétérodimériques exprimées chez E.coli. Contient des inhibiteurs des RNases.
- 3- Quantiscript RT Buffer, 5x : Pour l'optimisation de la reverse transcription, contient Mg^{2+} et dNTPs.
- 4- RT Primer Mix : Mélange d'oligo-dT et de random primers dissouts dans l'eau.
- 5- RNase-Free Water : Eau ultrapure.

Le protocole est optimisé pour 10 pg à 1 µg d'ARN. Toutes les étapes doivent être réalisées dans la glace pour éviter la dégradation des ARN.

Avant de commencer, dissoudre éventuellement les précipités qui peuvent se former dans le tampon gDNA Wipeout en vortexant ou en chauffant rapidement à 37°C jusqu'à disparition des précipités.

➤ Procédure :

→ Décongeler les échantillons d'ARN dans la glace, ainsi que le tampon gDNA Wipeout, le tampon Quantiscript RT, le mix RT Primer et l'eau.

→ Sortir l'enzyme RT au dernier moment

→ Etape d'élimination de l'ADN génomique : volume final = 14µL

- Préparer un volume d'ARN = 1 µg qsp 12 µL avec de l'eau
- Ajouter ensuite 2 µL de tampon gDNA Wipeout par tube d'ARN
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger rapidement
- Mettre 9 min à 42°C au thermocycler②
- Mettre les tubes rapidement dans la glace

→ Etape de reverse transcription : volume final = 20 μ L

Réactifs	Pour 1 tube	RT- sans ARN	RT- sans enzyme
Tampon Quantiscript RT 5x	4 μ L	4 μ L	4 μ L
RT Primer Mix	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Quantiscript RT	1 μ L	1 μ L	-
ARN	14 μ L	- + 14 μ L H2O	14 μ L + 1 μ L H2O

- Préparer un mélange réactionnel en utilisant le tableau selon le nombre de tube d'ARN
- Ajouter 6 μ L de mix / tube d'ARN traités contre ADNg
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger
- Mettre 15 min à 42°C puis 3 min à 95°C au thermocycler^②
- Mettre les tubes dans la glace
- Aliquoter les échantillons 2x10 μ L et conserver les ADNc à -20°C

① Quantitect® Reverse Transcription Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France

② Thermocycler GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer Biosystems, 91945 - Courtaboeuf cedex)

Fiche 14 PCR semi quantitative

Description des composants :

- 1- Platinum® Taq DNA polymerase ①
- 2- Tampon de PCR, sans MgCl₂ 10X ①
- 3- Magnésium Chloride 50 mM ①
- 4- dNTP ①

- Décongeler les échantillons d'ADNc, ainsi que les réactifs de PCR : le tampon de PCR, le MgCl₂
- Préparer un mix de PCR contenant pour un tube 0,2 µM d'amorces sens, 0,2 µM d'amorce antisens, 1 unité de Platinum® Taq DNA polymerase, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP et le tampon de PCR 1X concentré pour un volume final de 50 µL qsp eau ultrapure.
- Distribuer 48 µL de mix dans les tubes de PCR et ajouter 2 µL de produits de RT pour chacun des échantillons
- Programmer le bloc thermostaté② pour 30 cycles avec 3 étapes par cycle : la dénaturation à 94°C pendant 30 s, l'hybridation à 55°C pendant 30 s, l'élongation à 72°C pendant 30 s. Au début de chaque cycle, ajouter une étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 15 min et à la fin une élongation finale à 72°C pendant 7 min.
- Conserver les produits de PCR à -20°C pour la visualisation des ADN sur gel d'agarose.

① Tous les produits sont fournis par Invitrogen ,Cergy-Pontoise, France

② Thermocycler, Perkin Elmer

③ Les oligonucléotides ont été synthétisés par Eurogentec (Les Ulis, France). Les amorces pour la PCR quantitative ont été purifiées par HPLC. Les oligonucléotides utilisés ont été choisis à l'aide du programme Primer 3 (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA) accessible par l'adresse Internet, <http://www.genome.wi.mit.edu>

➤ Oligonucléotides utilisés③:

Gene	Location	Size	Primer sequence
BHMT (NM_001713.2)	Exon 1	223	P1 sens (c.87-c.106) : 5'-CTGTCTGGACACCACGAAGA-3'
	Exon 3	bp	P1 antisens (c.290-c.309) : 5'-TGAGCCAGCTCTGAGGAACT-3'
	Exon 2	231	P2 sens (c.176- c.195) : 5'-TTGGAGATGGAGGGTTTGTGTC-3'
	Exon 3/4	bp	P2 antisens (c.387- c.406) : 5'-CATTGACTTCCTGCCCAGAT-3'
	Exon 3/4	240	P3 sens (c.387- c.406) : 5'-ATCTGGGCAGGAAGTCAATG-3'
	Exon 5	bp	P3 antisens (607-626) : 5'-AAGGTTTCAACTGCCACAC-3'
	Exon 5	372	P4 sens (c.607- c.626) : 5'-GTGTGGGCAGTTGAAACCTT-3'
	Exon 7	bp	P4 antisens (c.959- c.978) : 5'-CAGGTTGTAGGCCTCTCTGG-3'
	Exon 6	238	P5 sens (c.883- c.902) : 5'-GGATTCATCGATCTCCAGA-3'
	Exon 7	bp	P5 antisense (c.1101- c.1120) : 5'-TGTGCATGTCCAAACCACTT-3'
BHMT2 (NM_017614.4)	Exon 1/2	262	P1' sens : 5'-CCAAGAAGGGGATTTTGGGA-3'
	Exon 3/4	bp	P1' antisens : 5'- TCACAGGCAGCAGCATTAC-3'
	Exon 3/4	215	P2' sens : 5'-ATGGAAAGCAAGTGGGAAGA-3'
	Exon 4/5	bp	P2' antisens : 5'-TGCTCAAATACTCTGCAATCAA-3'
	Exon 4	268	P3' sens : 5'- TGCCTGGAAAAATGTGGACT-3'
	Exon 6	bp	P3' antisens : 5'- CCACTCAAGACCCTCCTTCA-3'
	Exon 6	239	P4' sens : 5'-TGAAGGAGGGTCTTGAGTGG-3'
	Exon 7	bp	P4' antisens : 5'-AATTGCCCTGATGTGGTAGG-3'
	Exon 7	248	P5' sens : 5'-GCTGTGGATTTGAGCCCTAC-3'
	Exon 8	bp	P5' antisens : 5'-TTCAGGGTTTTCTTTCACTACTCC-3'
MTR (NM_000254.2)	Exon 8/9	129	Sens : 5'-TGGAGAACCACTCTGCATTG-3'
	Exon 9/10	bp	Antisens : 5'-GTGTTGGGAAGACCTGCATT-3'
GAPDH (NM_002046.3)	Exon 5	239	Sens : 5'-TGTTTCGTCATGGGTGTGA-3'
	Exon 7	bp	Antisens : 5'-AGGGATGATGTTCTGGAGA-3'

Fiche 15
PCR quantitative en temps réel avec le kit Quantitect® SYBR®
Green PCR ①

Description des composants :

1- HotStarTaq DNA Polymerase: forme modifiée de l'ADN polymerase recombinante (94kDa) isolée de *Thermus aquaticus* clonée chez *E.coli*. N'a pas d'activité enzymatique à température ambiante.

2- QuantiTect SYBR Green PCR Buffer: Contient Tris·HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, pH 8.7 (20°C)

3- dNTP mix* : Contient dATP, dCTP, dGTP, et dTTP/dUTP

4- Fluorescent dyes* : **SYBR Green I** émet de la fluorescence lorsqu'il se lie à l'ADN double brin, l'excitation du fluorophore s'effectue à 494 nm et l'émission à 521 nm et **ROX** émet la même fluorescence tout au long de la PCR, il sert de niveau de référence sur lequel tous les signaux fluorescents seront normalisés, il compense les différences de détection de fluorescence entre les puits dues aux faibles variations de volume réactionnel ou encore à la position des puits.

5- RNase-free water : Eau ultrapure

➤ Avant de commencer :

→ La longueur de l'ADN à amplifier doit être idéalement comprise entre 100 et 150 pb

→ Une étape initiale d'incubation de 15 min à 95°C est nécessaire pour activer l'ADN polymérase HotStar Taq

→ Toujours commencer la réaction avec une concentration finale de MgCl₂ de 2,5 mM comme cela est fourni dans le tampon quantitect SYBR Green PCR Master Mix.

➤ Procédure :

→ Décongeler les échantillons dans la glace, le master mix, les amorces et l'eau

→ Préparer un mix selon le tableau suivant :

Réactifs	Pour 1 puit (µL)	PCR -
Eau RNase free	7.8	7.8
Master Mix 10x	10	10
Amorce sens à 10 µM	0.6	0.6
Amorce antisens à 10 µM	0.6	0.6
ADNc	1	- + 1 µL d'eau
Volume final	20	20

→ Dans les puits d'une plaque 96 puits^②, mettre 19 µL de mix

→ Ajouter 1 µL d'ADNc de la dilution souhaitée soit pour la gamme étalon soit pour l'échantillon à quantifier relativement à la gamme

→ Coller un film adhésif transparent sur la plaque^② en insistant bien sur les contours

→ Programmer le bloc thermostaté^③ pour un nombre de cycle compris entre 35 et 45 avec 3 étapes par cycle : la dénaturation à 94°C pendant 30 s, l'hybridation à 55-56°C (selon les amorces utilisées) pendant 30 s, l'élongation à 72°C pendant 30 s. Avant les 35-45 cycles, ajouter une étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 15 min et à la fin une élongation finale à 72°C pendant 7 min suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 5 s. Programmer ensuite la courbe de fusion en 50 cycles en augmentant la température de 65°C à 95°C à raison de 0,5°C par seconde.

→ La plaque peut ensuite être conservée à -20°C pour la visualisation des ADN sur gel d'agarose

① Quantitect® SYBR® Green PCR Qiagen (Courtaboeuf, France)

② ABgene® PCR Plates, Thermo-Fast® 96, Semi-Skirted, AB-0990, Thermo Scientific

③ iCycler™, Biorad

④ Les oligonucléotides ont été synthétisés par Eurogentec (Les Ulis, France). Les amorces pour la PCR quantitative ont été purifiées par HPLC. Les oligonucléotides utilisés ont été choisis à l'aide du logiciel Primer 3 (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA) accessible par l'adresse Internet, <http://www.genome.wi.mit.edu>

➤ Oligonucléotides utilisés④:

Gène	Localisation	Taille	Primer sequence
BHMT (NM_001713.2)	Exon 2 Exon 2/3	106 bp	Sens : 5'- TGGAGATGGAGGGTTTGTCTT-3' Antisens : 5'- AAGCTGGCGAACTGCTTCT-3'
BHMT2 (NM_017614.4)	Exon 1/2 Exon 2/3	144 bp	Sens : 5'-CCAAGAAGGGGATTTTGGGA-3' Antisens : 5'-GAACTGCGTCTGGGTGTTCT-3'
MTR (NM_000254.2)	Exon 8/9 Exon 9/10	129 bp	Sens : 5'-TGGAGAACCACTCTGCATTG-3' Antisens : 5'-GTGTTGGGAAGACCTGCATT-3'
Fr (NM_133527.1)	Exon 3/4 Exon 4	133 bp	Sens : 5'- ACTGGACCTCGGGGCATAA -3' Antisens : 5'- CCTCGGCTGTAGTTGCTGA -3'
SLC19A1 (NM_017299.2)	Exon 1 Exon 2	114 pb	Sens : 5'- CCTCTGCTTCTTTGGCTTCA -3' Antisens : 5'- ATCGGAATGATCTCGTTGGT -3'
POLR2A (NM_000937.4)	Exon 8/9 Exon 9	123 bp	Sens : 5'-CAGACCGGCTATAAGGTGGA-3' Antisens : 5'-GGTAGACCATGGGAGAATGC-3'
TCEB1 (NM_022593.3)	Exon 2 Exon 3	90 pb	Sens : 5'-GCATTAACATCAGGAACAATAAAGGC-3' Antisens : 5'-GATCTCTCTAAAGTTGACCTCATTGG-3'

Fiche 16
Analyse qualitative de l'ADN sur gel d'agarose^①

➤ **Préparation du gel d'agarose^①**

- Dissoudre l'agarose à raison de 1 à 1,5% (p/v) dans du tampon TBE 1X^② (Tris, Borate, EDTA) (80-100 mL)
- Chauffer le mélange à l'aide d'un four micro-ondes jusqu'à complète dissolution de l'agarose
- Attendre quelques minutes que le mélange refroidisse
- Ajouter le bromure d'éthidium (BET)^③ à 0,5 µg/mL et homogénéiser
- Couler le mélange dans le support de la cuve d'électrophorèse^④
- Ajouter un peigne de 15 ou 20 puits selon le nombre d'échantillons à déposer
- Laisser polymériser pendant environ 20 min
- Placer le support dans la cuve remplie de tampon TBE 1X^②

➤ **Préparation et dépôt des échantillons d'ADN issus de la réaction de PCR**

- Décongeler les tubes contenant l'ADN amplifié
- Prélever 10 µL de chaque échantillon et ajouter 2 µL de tampon de dépôt^⑤
- Déposer les 12 µL finaux dans les puits du gel ainsi qu'un marqueur de taille^⑥
- Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu puis faire migrer pendant 40 min à 110 V

➤ Observation des ARN sur gel d'agarose

→ Une fois la migration achevée, arrêter le générateur et sortir le support de la cuve puis visualiser l'ADN contenu dans le gel sur une plaque UV (312 nm) par Image Master™ VDS⑦

→ Vérifier alors que tous les amplicons se trouvent à la taille attendue en mesurant le rapport $\log PM/R_f$ (distance de migration) en comparant aux tailles connues du marqueur de taille.

① Agarose standard, Euromedex

② Tampon TBE 10X: Tris 890 mM acide borique 890 mM, EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid) 20 mM (pH 8,0), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

③ Bromure d'éthidium (BET) : Eurobio

④ Cuve d'électrophorèse, BioRad

⑤ Solution de dépôt 6X : Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v), EDTA 0,1 mM (pH 8,0), SDS 0,5% (p/v), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑥ Marqueur de taille (DNA ladder) 100 pb, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France

⑦ Image Master™ VDS, Pharmacia Biotech

Fiche 17

Purification des produits de PCR à partir du gel d'agarose avec le kit QIAquick® Gel Extraction Kit①

Toutes les étapes se font à température ambiante. Toutes les centrifugations doivent être effectuées entre 20 et 25°C à 13 000 rpm.

➤ Avant de commencer :

- La couleur jaune du tampon QG indique un pH ≤ 7.5
- Ajouter de l'éthanol 96-100% au tampon PE comme indiqué sur la bouteille
- Préparer de l'isopropanol 100%
- Faire chauffer un bain marie à 50°C

➤ Procédure :

- Découper le fragment de gel contenant la bande à l'aide d'un scalpel et éliminer l'excès de gel à l'aide d'une lampe UV
- Peser le fragment et ajouter 3 volumes de tampon QG pour 1 volume de gel (pour un gel à 2% ajouter 6 volumes de tampon QG)
- Incuber à 50°C pendant 10 min jusqu'à complète dissolution du gel. Vortexer éventuellement toutes les 2-3 min pendant l'incubation (vérifier que le gel soit complètement dissous, pour un gel à 2%, prolonger le temps d'incubation)
- Vérifier que la couleur est jaune comme le tampon QG ce qui témoigne d'un pH optimal pour l'extraction (si la couleur est orange ou violette, ajouter 10 μL d'acétate de sodium 3 M à pH 5 et mélanger)
- Ajouter un volume d'isopropanol pour 1 volume de gel et mélanger
Cette étape permet d'augmenter la récolte de fragments d'ADN < 500 pb et > 4 kb
NB : Ne pas centrifuger à cette étape
- Placer la colonne sur un tube de 2 mL et ajouter l'échantillon dans la colonne
- Centrifuger 1 min (le volume maximal pouvant être ajouté est de 800 μL , pour les échantillons supérieurs à 800 μL , recommencer cette étape)

- Eliminer l'éluat et replacer la colonne sur le tube
 - Ajouter 0,5 mL de tampon QG dans la colonne et centrifuger 1 min
- Cette étape permet d'éliminer toute trace d'agarose, elle est importante pour les étapes de séquençage, de transcription in vitro et de microinjection
- Ajouter 0,75 mL de tampon PE dans la colonne et centrifuger 1 min
- Laisser agir pendant 2-5 min avant la centrifugation pour les étapes de séquençage
- Eliminer l'écoulement et centrifuger 1 min supplémentaire pour éliminer toute trace d'éthanol contenu dans le tampon PE
 - Placer la colonne sur un nouveau tube de 1,5 mL
 - Pour l'élution, ajouter 50 µL de tampon EB ou d'eau directement sur la membrane et centrifuger 1 min. Alternativement, pour augmenter la concentration en ADN, ajouter 30 µL de tampon ou eau sur la membrane et laisser agir 1 min avant la centrifugation
 - Conserver l'ADN à -20°C
 - La qualité de l'ADN peut éventuellement être vérifiée sur gel d'agarose

Fiche 18

Réaction de séquençage des produits de PCR avec le kit Big Dye®

Terminator Cycle Sequencing Kit^①

Description des composants:

1- Ready Reaction Mix 2,5X

2- BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X)

→ Décongeler les échantillons d'ADNc à séquencer après purification (fiche 16)

→ Préparer le mélange réactionnel suivant dans des microtubes:

Réactifs	Pour 1 tube	Concentration finale
Ready Reaction Mix 2,5 X	2 µL	0,5 X
Big Dye Sequencing Buffer 5X	1 µL	2 X
Amorce Sens ou Antisens 3,2 µM	1 µL	0,32 µM
Template	1 à 6 µL	
Water	qsp 10µL	
Volume final	10µL	

→ Vortexer doucement les microtubes et centrifuger brièvement

→ Programmer le bloc thermostaté^② pour 25 cycles avec 3 étapes par cycle : la dénaturation à 96°C pendant 10 s, l'hybridation à 50°C pendant 5 s, l'élongation à 60°C pendant 4 min. Avant les 25 cycles, ajouter une étape de dénaturation initiale à 96°C pendant 1 min.

→ Mettre les tubes à +4°C, et démarrer immédiatement la purification sur plaque des produits de séquençage (fiche 18)

① Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems

② Thermocycler T3000, Biometra

Fiche 19 Purification des produits de séquençage sur plaque

Cette étape a pour but de purifier par gel-filtration les produits de la réaction de séquençage. La résine Sephadex® G50 ① utilisée permet de dessaler les échantillons, d'éliminer les nucléotides non incorporés (les ddNTP marqués par un fluorochrome) et l'amorce utilisée pour la PCR de séquence présente en excès. La limite d'exclusion de la résine G50 correspond à un oligonucléotide d'environ 20 bases.

➤ Préparation de la plaque de G50 :

→ Retourner la plaque MultiScreen HV ②. Coller un film alu autocollant ③ en dessous de la plaque Multiscreen HV ② de façon à bien protéger la membrane de chaque puits.

→ Déposer de la résine Sephadex® G50 ① dans chaque puits du chargeur de colonne ④,

→ Retirer l'excès de résine sur le chargeur de colonne avec la raclette et récupérer l'excès de résine dans le pot stock

→ Placer la plaque MultiScreen HV ② à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble,

→ Taper légèrement sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque.

→ Ajouter 300 µl d'eau MilliQ dans chaque puits contenant de la résine, fermer la plaque MultiScreen HV ② avec son couvercle et laisser incuber 3 heures à 4°C.

Les plaques MultiScreen HV ② contenant de la résine Sephadex® G50 ① imbibée d'eau peuvent être stockées à 4 °C pendant 2 semaines.

➤ Tassement de la colonne avant la première utilisation de la plaque de G50 :

→ Masquer avec un film aluminium les puits qui ne vont pas être utilisés.

→ Sans retourner la plaque Multiscreen HV ②, enlever le film aluminium sous les puits qui vont être utilisés.

→ Placer la plaque de filtration Multiscreen HV ② sur la plaque de récupération de 350 µL.

→ Equilibrer avec une plaque usagée et une plaque de récupération

→ Centrifuger le montage à 910 g pendant 5 min.

→ Vider la plaque de récupération et la conserver pour les prochaines plaques.

➤ Tassement de la colonne : utilisations suivantes de la plaque de G50 :

→ Enlever le film aluminium au dessus des puits qui vont être utilisés.

→ Sans retourner la plaque Multiscreen HV ②, enlever le film aluminium sous les puits qui vont être utilisés.

→ Réhydrater les puits en ajoutant de l'eau MilliQ jusqu'à la surface du puits.

→ Placer la plaque de filtration Multiscreen HV ② sur la plaque de récupération de 350 µL.

→ Equilibrer avec une plaque usagée et une plaque de récupération

→ Centrifuger le montage à 910 g pendant 5 min.

→ Vider la plaque de récupération et la conserver pour les prochaines plaques.

➤ Purification :

→ Ajuster le volume de la réaction de séquençage à 20 µl à l'aide d'eau MilliQ.

→ Déposer la plaque de filtration Multiscreen HV ② sur une plaque neuve 96 puits transparente à fond conique ⑤ de 250 µL.

→ Déposer les 20 µl de produits de séquençage au centre de chaque puits de la plaque de filtration, sans toucher les bords et la résine.

→ Equilibrer avec une plaque usagée et une plaque de récupération.

→ Centrifuger à 910 g pendant 4 min.

→ Couvrir la plaque neuve 96 puits transparente à fond conique de 250 µL par un film adhésif transparent, l'emballer dans du papier aluminium et la conserver à 4°C.

① Sephadex™ G-50 Superfine, GE HEALTHCARE

② Plaque de filtration MultiScreen-HV, Millipore

③ Film adhésif pré-découpé pour microplaques

④ Chargeur de colonnes Multiscreen en Sephadex™, Millipore

⑤ Plaque 96 puits fond cône stérile Greiner Bio-one, Dutscher

Fiche 20 Séquençage des produits purifiés

➤ Préparation des échantillons :

- Prélever 10 µL de chaque produit purifié à partir de la plaque (fiche 19)
- Ajouter 10 µL de formamide Hi-Di ①
- Déposer chaque échantillon dans un puit sur une autre plaque 96 puits ②
- Recouvrir la plaque à l'aide de son bouchon souple ② et placer la plaque sur son support ②
- Recouvrir le « sandwich » ainsi formé par le couvercle en plastique ② en faisant coïncider les trous du couvercle avec ceux du bouchon
- Déposer le tout dans le séquenceur ③ contenant des capillaires ④ de 36 cm remplis du polymère POP4 ⑤
- Faire migrer à l'aide du tampon EDTA 1X ⑥ en ouvrant le logiciel de run « 3100-avant data collection software v 2.0 »

➤ Analyse des séquences :

Cette analyse est réalisée grâce au logiciel Sequencing Analysis v 5.1.1

- Ouvrir le logiciel et importer les séquences en cliquant sur l'icône correspondant
- Ouvrir le disque E ; « Applied Biosystems ; UDC ; Data collection ; Data » ; puis le « result group » désiré et sélectionner les fichiers de séquences à importer
- Cliquer sur « Add selected sample » puis sur « OK »

Chaque pic correspond à 1 base :

- pic vert ➤ base A
- pic rouge ➤ base T
- pic bleu ➤ base C
- pic noir ➤ base G

Ces pics sont utilisés pour déterminer la séquence en bases de l'échantillon de départ.

Un "pic" correspond donc à la détection d'un nucléotide donné dans la séquence

2 pics de différentes couleurs se superposent lorsque 2 nucléotides sont situés à la même position

Le séquençage est effectué à la plateforme de Biologie Moléculaire au CHU de Brabois, Nancy.

① Formamide Hi-Di, référence 4311320, Applied Biosystems

② Montage support + plaque 96 puits + bouchon + couvercle, Applied Biosystems

③ 3100-Avant Genetic Analyser, Applied Biosystems

④ Capillaires, référence 4333464, Applied Biosystems

⑤ Polymère POP4, référence 4316355, Applied Biosystems

⑥ Tampon EDTA 10X, référence 402824, Applied Biosystems

Fiche 21

Extraction de protéines totales à partir des cellules et des tissus

➤ Avant de commencer :

→ Préparer une solution de phenylmethanesulfonylfluoride ou phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ① dissous à 10 mg/mL dans l'éthanol absolu

→ Préparer une solution d'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) ① à 18,39 mg/mL dans de l'eau MilliQ

→ Préparer le tampon RIPA selon le tableau suivant :

Tampon RIPA	Concentration
NaCl (sodium chloride)①	8 g/L
Na_2HPO_4 (sodium phosphate anhydrous dibasic) ①	1,44 g/L
KH_2PO_4 (potassium dihydrogen phosphate)①	0,24 g/L
NP40 (Nonidet P40) ①	1%
DOC (Deoxycholate de sodium) ①	0,5%
SDS (Lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate) ①	0,1%
PMSF ①	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$
Na_3VO_4 ①	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$
Cocktail d'inhibiteurs de protéases ①	1,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$

➤ Procédure :

→ Pour les cellules : décoller les cellules avec la trypsine et les collecter sous forme de culot cellulaire avant la lyse :

NB : le culot cellulaire peut également être congelé à -80°C avant utilisation à l'étape suivante.

→ Pour les tissus : broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote liquide et la carboglace et garder environ 50 mg de tissu puis conserver le reste à -80°C

- Reprendre les cellules ou le broyat tissulaire dans du tampon RIPA à raison de 200 μ L de tampon pour 5 millions de cellules et 500 μ L de tampon pour 100 mg de tissu
- Passer le lysat/broyat 5 fois dans une seringue munie d'une aiguille de 0.9 mm de diamètre
- Faire 2 cycles congélation-décongélation – azote liquide-bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 min à 4°C, 12000 rpm
- Récupérer le surnageant et stocker au congélateur à -80°C.

① Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich, (St Louis, USA)

Fiche 22
Extraction des histones à partir des tissus

➤ Préparation des solutions :

→ Tris-HCl ① 0,1 M pH 8,0 : 1,2114 g dans 100 mL d'eau. Ajuster le pH avec HCl. Conserver à 4°C.

→ KCl ① 100 mM : 0,7455 g dans 100 ml d'eau. Conserver à 4°C.

→ MgCl₂ ① 15 mM : 0,3049 g (MgCl₂, 6H₂O) dans 100 mL d'eau. Conserver à 4°C.

→ Dithiothréitol (DTT) ① 200 mM (préparer extemporanément) : 0,0308 g dans 1 mL d'eau.

→ Phenylmethanesulfonylfluoride ou phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ① 200 mM (préparer extemporanément) : 0,0348 g dans 1 mL d'éthanol 100%.

→ Orthovanadate de sodium (Na₃VO₄) ① 100 mM : Conserver à -20°C.

→ Fluorure de sodium (NaF) ① 1 M : Conserver à -20°C.

→ Butyrate de sodium ① 200 mM : 0,11 g dans 5 mL d'eau. Aliquoter et conserver à -20°C.

→ Phosphate Buffer Saline (PBS) + inhibiteurs (10 mL): à préparer extemporanément :

- DTT 1 mM	50 µL de DTT 200 mM
- PMSF 1 mM	50 µL de PMSF 200 mM
- Protease Inhibitor Cocktail ① 2%	200 µL
- Na ₃ VO ₄ 1 mM	100 µL de Na ₃ VO ₄ 100 mM
- NaF 2 mM	20 µL de NaF 1 M
- Butyrate de sodium 5 mM	250 µL de butyrate de sodium 200 mM
- PBS ① 10x	1 mL
- Eau	8,33 mL

→ Tampon de lyse hypotonique (10 ml) : Tris-KCl-MgCl₂ conservé à 4°C

- Tris-HCl 10 mM pH 8,0	1 mL Tris-HCl 0,1 M pH 8,0
- KCl 1mM	100 µL de KCl 100 mM
- MgCl ₂ 1,5 mM	1 mL de MgCl ₂ 15 mM
- DTT 1mM	50 µL de DTT 200 mM
- PMSF 1mM	50 µL de PMSF 200 mM
- Proteinase Inhibitor Cocktail ① 2%	200 µL

- Na ₃ VO ₄ 1 mM	100 µL de Na ₃ VO ₄ 100 mM
- NaF 2 mM	20 µL de NaF 1 M
- Butyrate de sodium 5 mM	250 µL de butyrate de sodium 200 mM
- Eau	7,23 mL

→ H₂SO₄ ① 0,2 M (0,4 N) : 1,13 mL Acide sulfurique 95% + 98,87 mL d'eau 10mL

→ Acide acétique ① 2,5% : 50 mL + 1950 mL d'eau

➤ Extraction des histones à partir de tissus :

→ Broyer le tissu dans l'azote à l'aide d'un mortier et d'un pilon. L'échantillon ne doit pas être décongelé. Conserver le broyat à -80°C.

→ Resuspendre le broyat (environ 50 mg) dans 1 mL de tampon de lyse hypotonique

→ Transférer dans un microtube à centrifuger

→ Lyser les cellules à l'aide d'une seringue

→ Incuber 30 min à 4°C sur un agitateur rotatif

→ Centrifuger 10 000 g / 10 min / 4°C. et éliminer le surnageant.

→ Resuspendre le culot dans 400 µL d'H₂SO₄ 0,2 M

→ Incuber 2 h à 4°C sur un agitateur rotatif

→ Centrifuger 14000 g / 10 min / 4°C. et récupérer le surnageant.

→ Dialyser 1 nuit contre 200 mL d'acide acétique 2,5% dans des cassettes de dialyse②

→ Récupérer la solution de la cassette et transférer dans un microtube à centrifuger

→ Congeler les échantillons à -80°C pendant au moins 1 heure.

→ Lyophiliser les histones au Speed Vac® ③ (au moins 4 heures).

→ Resuspendre les histones dans 100 µL d'eau, aliquoter par 5 µg (quantité pour 1 dépôt en Western Blot) et conserver à -80°C.

Méthode du "Laboratory of Chromatin Biology" (NY, USA), Shechter *et al.*, 2007

① Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich, (St Louis, USA)

② Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, 3500 MWCO, 0,1-0,5 ml capacity, Pierce

③ Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA

Fiche 23

Dosage des protéines/histones par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

- Préparer une gamme étalon (0, 50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 et 2000 µg/mL, en duplicate) à partir d'une solution stock de BSA^① (bovine serum albumin) diluée dans le même tampon que les échantillons à doser
- Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes de réactif A (BCA)^② avec 1 volume de réactif B (CuSO₄)^③
- Distribuer 25 µL de chaque dilution de BSA ou d'échantillon à doser sur une plaque de 96 puits à fonds plats
- Deux blancs sont réalisés avec 25 µL de diluant seul
- Ajouter 200 µL de réactif de travail et agiter la plaque
- Couvrir la plaque et la placer 30 min à 37°C
- Laisser refroidir la plaque à température ambiante
- Mesurer l'absorbance sur un spectrophotomètre lecteur de plaques^④ à 570 nm
- La droite de régression étalon est tracée et la concentration protéique des échantillons déduite

Smith *et al.* (1985) *Anal. Biochem.*, 150 : 76-85

① Ampoule contenant de la BSA à 2,0 mg/mL dans une solution de NaCl à 0,9% (p/v) et NaN₃ à 0,05% (p/v)

② Réactif A : solution aqueuse contenant BCA-Na₂ 1% (p/v), Na₂CO₃ 2% (p/v), tartrate-Na₂ 0,16%, NaOH 0,4% (p/v) et NaHCO₃ 0,95% (p/v) (pH 11,25)

③ Réactif B : solution de CuSO₄.5H₂O à 4% (p/v) dans de l'eau déionisée
Pierce, Rockford, IL, USA kit BCA Protein Assay® Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)

④ Lecteur de plaques Victor3 Wallac Multilabel, Perkin Elmer

Fiche 24

Electrophorèse analytique des protéines/histones sur gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE) – Western Blotting

➤ Préparation du tampon de migration pour 1 litre 10X concentré :

- Tris ① 250 mM 30g
- Glycine ① 1,92 M 144g
- SDS ① 1 % 10g
- qsp eau MilliQ

→ A utiliser 1X concentré : diluer 100ml de la solution 10X et compléter avec 1litre d'eau ultrapure.

→ pH \approx 8,3 - ne pas ajuster le pH

→ Conserver à +4°C

→ Utiliser à température ambiante

➤ Préparation des gels d'électrophorèse

→ Laver les plaques de verre à l'alcool

→ Monter l'appareil d'électrophorèse Mini-Protean III : plaques de verre et espaceurs (en général 1,5mm)

→ Préparer les gels de séparation et de concentration selon le tableau ci-dessous en adaptant la concentration en acrylamide ② selon la taille de la protéine : (pour 2 gels prévoir 20 mL de solution)

→ Couler les gels et s'arrêter au niveau bas du plastique vert en dessous de l'emplacement du peigne

→ Déposer un film (\sim 500 μ l) d'isopropanol ③ (ou isobutanol)

→ Attendre la polymérisation à température ambiante (pour gel 12%, si T° \sim 20-22°C compter 20min)

→ Rincer abondamment à l'eau distillée et éliminer toutes traces d'eau

→ Couler le gel de concentration à 5% (voir tableau). Pour 2 gels prévoir 8 mL

→ Positionner le peigne en Téflon en évitant la formation de bulles : polymérisation

→ Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration

→ Monter l'appareil en assemblant les deux supports de gel sur le système central

→ Remplir le réservoir central (cathode) jusqu'en haut ainsi que la cuve (à moitié) avec le tampon de migration

➤ Préparation des échantillons

→ Les échantillons récupérés dans un tampon de lyse doivent être préalablement dosés. Pour un premier essai, prévoir un dépôt de 20 à 30 µg par puit pour les protéines et de 4µg par puit pour les histones. Pour une plus belle migration, déposer à quantité et volume constants (pour une même quantité de protéines par échantillon, compléter avec le tampon de lyse pour obtenir le même volume)

→ Dans des tubes Eppendorf, ajouter 1 volume de tampon Laemmli 2X ④ à 1 volume d'échantillon

→ Chauffer 5 mn à 100°C les échantillons et les marqueurs de taille ⑤ (si nécessaire)

→ Charger les puits avec les échantillons et les marqueurs

➤ Migration ⑥ :

→ A voltage constant

→ Gel de concentration : 80V, environ 15 min

→ Gel de séparation : 110V, ~1h30

→ Arrêter la migration quand le front de migration arrive en bas des plaques

➤ Tableau indiquant la composition des gels de polyacrylamide

Gel de Séparation		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%	Eau MILLIQ	2.7	5.3	8	10.6	13.3	15.9	21.1	26.5
	Acrylamide Mix 29:1 ②	1	2	3	4	5	6	8	10
	Tris 1.5M pH 8.8 ⑦	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10% ⑧	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10% ⑨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ⑩	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%	Eau MILLIQ	2.3	4.6	7	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
	Acrylamide Mix 29:1 ②	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.4
	Tris 1.5M pH 8.8 ⑦	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10% ⑧	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10% ⑨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ⑩	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%	Eau MILLIQ	2	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	20
	Acrylamide Mix 29:1 ②	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.6
	Tris 1.5M pH 8.8 ⑦	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10% ⑧	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10% ⑨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ⑩	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%	Eau MILLIQ	1.7	3.3	5	6.6	8.3	9.9	13.2	16.4
	Acrylamide Mix 29:1 ②	2	4	6	8	10	12	14	20
	Tris 1.5M pH 8.8 ⑦	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10% ⑧	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10% ⑨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ⑩	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%	Eau MILLIQ	1.2	2.3	3.5	4.6	5.7	6.9	9.2	11.4
	Acrylamide Mix 29:1 ②	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
	Tris 1.5M pH 8.8 ⑦	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10% ⑧	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10% ⑨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ⑩	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

Gel de concentration		1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
17%	Eau MILLIQ	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
	Acrylamide Mix 29:1 ②	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7
	Tris 0.5M pH 6.8 ⑩*	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25
	SDS 10% ⑧	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
	APS 10% ⑨	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
	TEMED ⑩	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

① Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② Acrylamide : bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad Laboratories)

③ Isopropanol VWR Prolabo

④ Tampon Laemmli X2 ; Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑤ Marqueurs de poids moléculaires : *Low Molecular Weight* ; LMW - Amersham Pharmacia, UK

⑥ Appareil d'électrophorèse Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)

⑦ Tris-HCl 1,5M pH 8,8 : 18,165 g de Tris/100ml Eau MilliQ, ajuster à pH 8,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑧ SDS : (Lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate) 10%

10 g de SDS/100ml eau MilliQ, sous agitation douce pour éviter que cela mousse, conserver à température ambiante, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑨ APS : Persulfate d'ammonium 10%, 1g/10ml eau MilliQ, aliquoter par 400µl, conserver à -20°C, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑩ TEMED, Tetramethylethylenediamine, Euromedex

⑩* Tris-HCl 0,5M pH 6,8: 6,055 g de Tris/100ml eau MilliQ, ajuster à pH 6,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Fiche 25

Transfert des protéines sur membrane de Polyvinylidene fluoride (PVDF)

➤ Préparation du tampon de transfert : pour un litre 10X concentré

→ Tris ① 480 mM 58,1g

→ Glycine ① 390 mM 29,3g

→ SDS ① 0,375 % (13 mM) 3,75g

qsp eau MilliQ

→ A utiliser 1X concentré : 100ml de la solution 10X + 200ml de éthanol + qsp eau MilliQ

→ pH ≈ 9,2 – ne pas ajuster le pH

→ Conserver à +4°C

→ Utiliser froid

➤ Préparation de la membrane②

→ Découper la membrane à la dimension du gel : 7x8,5cm minimum (gants)

→ Mettre la membrane PVDF au moins 30 sec dans du méthanol

→ Equilibrer la membrane dans le tampon de transfert froid (5min max) ainsi que les éponges et les filtres

→ Démontez l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et équilibrer les gels dans le tampon de transfert froid (5mn max)

➤ Transfert ③ :

→ Préparation du sandwich : placer la face blanche en haut et noire en bas, superposer sur la face blanche dans l'ordre :

- une éponge
- un papier filtre ④
- la membrane
- le gel
- un papier filtre ④: expulser les bulles d'air à l'aide d'une pipette plastique
- une éponge

→ Expulser les bulles d'air en faisant rouler une pipette plastique, sur le sandwich

→ Fermer le sandwich

→ Placer les cassettes dans le module de transfert, face noire vers face noire

→ Mettre le glaçon

→ Remplir la cuve avec du tampon de transfert froid

→ Transfert à ampérage constant :

350 mA pendant 45mn

ou 90 mA toute une nuit

→ Démontez le sandwich et récupérez la membrane PVDF

→ Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S^⑤ pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon de papier.

→ Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane

① Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② Membrane polyvinylidène difluoride membrane, (PVDF), porosité 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)

③ Appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot® SD (Bio-Rad Laboratories)

④ Papier filtre Whatman ou blotting paper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑤ Solution filtrée de rouge Ponceau S à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Fiche 26

Immunodétection en révélation par chimiluminescence de l'activité peroxydase

➤ Préparation du tampon de lavage : pour un litre 10X concentré :

→ Tris ① 200 mM 24,2g

→ NaCl ① 1,5 M 87,5g

→ A utiliser 1X concentré : TBST :100ml de la solution 10X + qsp eau MilliQ + 1ml de Tween 20① à 0,1%

→ pH 7,4 à ajuster avec HCl

→ Conserver à 4°C

➤ Préparation du tampon de blocage :

→ Dissoudre du lait écrémé à 5% dans le tampon de lavage TBST

→ Agiter jusqu'à complète dissolution

➤ Immunodétection :

→ Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane dans du tampon de blocage pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente

→ Incuber la membrane avec l'anticorps primaire dirigé contre une protéine donnée (voir tableau ci-dessous) dans du tampon de blocage pendant 1 nuit à +4°C, sous agitation rotative lente, dans de petits sacs en plastique scellés

→ Laver la membrane PVDF 4 fois 10 min avec le tampon de lavage

→ Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaires conjugués à la peroxydase (voir tableau ci-dessous) pendant 1 h sous agitation rotative lente à température ambiante dans de petits sacs en plastique scellés

→ Laver 4 fois 10 min la membrane avec du tampon de lavage

→ L'activité peroxydase est révélée par chimiluminescence ②

→ Déposer la membrane (protéines vers le haut) sur un film plastique ③

→ Appliquer le volume indiqué par le fournisseur de mélange réactionnel

- Laisser 5 min, puis sécher la membrane
- Disposer la membrane entre 2 films plastique
- Mettre en contact la membrane ainsi protégée avec un film autoradiographique ④ pendant 1 à 5 min
- Révélation du film autoradiographique dans un bain de révélation ⑤ jusqu'à apparition des premières bandes (~30 s)
- Rinçage à l'eau
- Plonger la membrane dans le bain de fixation ⑥ jusqu'à transparence du film (~2 min)
- Vérifier que les bandes ainsi révélées se trouvent à la bonne taille en superposant le film sur la membrane et en reportant le marqueur de taille sur le film par transparence.

➤ Anticorps utilisés :

Anticorps primaires	Source	Dilution	Fournisseur
BHMT	Mouse monoclonal	1/1000	Abcam, Ab52144
BHMT2	Mouse polyclonal	1/1000	Abcam, Ab67469
MTR	Rabbit polyclonal	1/1000	Abcam, Ab66039
GAPDH	Mouse monoclonal	1/1000	Millipore, MAB374
Histone H3 diméthyl R2	Rabbit monoclonal	1/1000	Upstate, 05-808
Histone H4 triméthyl K20	Rabbit polyclonal	1/2000	Upstate, 07-463
Histone H3 triméthyl K9	Rabbit polyclonal	1/4000	Abcam, Ab8898
Histone H3 diméthyl K4	Rabbit polyclonal	1/10 000	Abcam, Ab7766
Histone H3 triméthyl K4	Rabbit polyclonal	1/2000	Abcam, Ab8580
Histone H4 acétyl K16	Rabbit polyclonal	1/1000	Upstate, 07-329
Histone H3	Mouse monoclonal	1/500	Abcam, Ab10799
Histone H4	Mouse monoclonal	1/1000	Abcam, Ab31827

Anticorps secondaires	Source	Dilution	Fournisseur
Horseradish Peroxydase conjugated anti-	Rabbit	1/2000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	Mouse	1/2000	

① Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② ECL+Plus (Amersham Pharmacia Biotech, UK) est basé sur la synthèse enzymatique d'un ester acridinique émettant une lumière intense

③ Saran® (Dow Chemical Company, Midland, MI, USA)

④ BIOMAX MR (Kodak Scientific Imaging Film, NY, USA)

⑤ Révélateur radio (LX24 – Kodak, France)

⑥ Fixateur radio (AL4 – Kodak, France)

Fiche 27

Traitement des échantillons tissulaires pour immunohistochimie

- Après fixation pendant 24h dans le formol, les prélèvements sont mis en cassette.
- Ils sont ensuite déshydratés et imprégnés de paraffine dans un automate de type Excelsior ES ① par passages dans une série de bains successifs de formol, d'alcool, de toluène et de paraffine.
- A partir des blocs de paraffine ainsi obtenus, des coupes de 5 µM d'épaisseur sont réalisées.
- Ces coupes sont ensuite montées à l'eau albumineuse sur des lames de verre traitées à la poly-L-lysine ② pour les colorations ordinaires ou spéciales ou à l'eau sur des lames de type X-tra™ Adhesive ③ pour les techniques immunohistochimiques.

① Excelsior ES Thermoscientific, Pittsburg

② Poly-L-lysine™, VWR International, Leuven, Belgique

③ Lames X-tra™ Adhesive, Leica, Peterborough, UK

Fiche 28
Réalisation de la coloration HES

- Les coupes sont colorées dans un automate ① par bains successifs :
 - Toluène ②
 - Alcool 100° ③
 - Alcool 95° ③
 - Hematoxyline ④
 - Eau acétifiée à 1% (eau + acide acétique) ⑤
 - Eosine 1% ⑥
 - Alcool 100° ③
 - Safran ⑦
 - Alcool 100° ③
 - Toluène ②
- Montage des lames avec lamelles 24x60mm ③ et Eukitt^R ⑧

Les techniques de coloration sont réalisées au Service d'Anatomopathologie à l'Hôpital Central, Nancy

① Automate tissue-Tek DRS, Sakura, Nagano

② Toluène, Carlo-Erba, Val de Reuil

③ Tous les produits sont fournis par VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois

④ Hématoxyline, Shardon Gill 2 Hematoxylin, Thermoscientific

⑤ Eau acétifiée, Merck, Darmstadt

⑥ Eosine, Diapath, Microstain Division, Martinengo

⑦ Safran, Microm Microtech, Francheville

⑧ Eukitt^R, Freiburg

Fiche 29 Immunohistochimie

- Etude immunohistochimique réalisée selon le protocole EnVision FLEX ① dans un automate Dakocytomation AutoStainer ① selon le protocole suivant :
- Les coupes sont déparaffinées et réhydratées
 - Un démasquage des sites antigéniques est réalisé par incubation des coupes pendant 20 min à 97°C dans une solution EnVision™ FLEX Retrieval Solution, low Ph dans un automate (PT Link, Dakocytomation) ①
 - Rinçage dans une solution EnVision™ FLEX Wash Buffer (20X) ① diluée au 1:20^{ème} dans de l'eau distillée
 - Blocage de l'activité des peroxydases endogènes par dépôt sur chaque coupe pendant 5 min de 100µL de la solution EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent ①
 - Rinçage dans une solution EnVision™ FLEX Wash Buffer (20X) ① diluée au 1:20^{ème} dans de l'eau distillée
 - Dépôt de 100µL de l'anticorps primaire sur chaque coupe selon les dilutions indiquées (voir tableau ci-dessous), à température ambiante (diluant anticorps : EnVision™ FLEX Antibody diluent ①)
 - Rinçage dans une solution EnVision™ FLEX Wash Buffer (20X) ① diluée au 1:20^{ème} dans de l'eau distillée
 - Dépôt de 100µL d'une solution EnVision™ FLEX/HRP ① pendant 30 min
 - Double rinçage dans une solution EnVision™ FLEX Wash Buffer (20X) ① diluée au 1:20^{ème} dans de l'eau distillée
 - Dépôt de 200µL pendant 10 min d'une solution EnVision™ FLEX Substrate Working Solution ① (obtenue par mélange d'1 goutte de EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen avec 1 mL de EnVision™ FLEX Substrate Buffer)
 - Rinçage dans une solution EnVision™ FLEX Wash Buffer (20X) ① diluée au 1:20^{ème} dans de l'eau distillée
 - Contre-coloration des coupes par dépôt de 200µL d'EnVision™ FLEX Hematoxyline ①
 - Double rinçage dans une solution EnVision™ FLEX Wash Buffer (20X) ① diluée au 1:20^{ème} dans de l'eau distillée

- Rinçage à l'eau distillée
- Bains d'alcool ② et toluène ③
- Montage des lames
- A noter la réalisation pour chaque technique de témoins négatifs par omission de l'anticorps primaire

	Anticorps (anti-)	Source	Dilution	Fournisseur
Anticorps primaires	BHMT	Souris	1/100	Abcam, ab52144
	BHMT2	Souris	1/100	Abcam, ab67469
	MTR	Lapin	1/100	Abcam, ab66039

Les techniques d'immunohistochimie sont réalisées au Service d'Anapathologie à l'Hôpital Central, Nancy

① Dako, Glostrup, Denmark

② Toluène, Carlo-Erba, Val de Reuil

③ Tous les produits sont fournis par VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois

Fiche 30

Extraction des protéines cytosoliques à partir des tissus

➤ Avant de commencer :

→ Préparer une solution hypotonique de PBS ① 1X avec 5% de Proteinase Inhibitor Cocktail ①

➤ Procédure :

→ Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote et la carboglace et garder environ 50 mg de tissu puis conserver le reste à -80°C

→ Reprendre le broyat tissulaire dans du tampon hypotonique à raison de 400 µL de tampon pour 50 mg de tissu

→ Passer le broyat 5 fois dans une seringue munie d'une aiguille de 0.9 mm de diamètre

→ Lyser les cellules à l'aide d'un sonicateur à sonde ②, pendant 1 min en mode pulsé, microtype (*dutty cycle* 30%) LIMIT 7 en maintenant les échantillons dans la glace

→ Centrifuger 30 min à 20000 g à 4°C

→ Récupérer le surnageant et doser les protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) (fiche 19)

① Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② *Cell sonifier disruptor*, Branson®

Fiche 31 Dosage des vitamines B9 et B12

Technique radioisotopique, SimulTRAC-SNB ①

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant.

- Extraire les échantillons protéiques à partir des cultures cellulaires (fiche 25)
- Les courbes d'étalonnages sont réalisées sur 6 points :
 - Vitamine B12 (0, 74, 148, 296, 740 et 1480 pM)
 - Folates (0, 2.3, 4.5, 9.1, 23 et 45 nM)
- Déposer 200 µL d'homogénat protéique ou de milieu de culture dans un tube à hémolyse
- Ajouter 200 µL de solution active de marquage/DTT ②, agiter
- Incuber à température ambiante pendant 15 min
- Ajouter 100 µL de réactif d'extraction, vortexer
- Incuber à température ambiante pendant 15 min
- Ajouter 1000 µL de réactif de liaison SimulTRAC-SNB, agiter
- Incuber les tubes à température ambiante pendant 60 min, à l'abri de la lumière
- Centrifuger pendant 10 min à 1000 g
- Eliminer le surnageant
- Compter la radioactivité du culot à l'aide d'un compteur gamma ③

① Kit ICN Pharmaceuticals, Inc, USA coffret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals)

② DTT : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

③ Fluostar Galaxy (BMG LabTechnologies, Champigny sur Marne, France)

Compteur COBRA-IIrTM autogamma (Packard) à double canal

Coup total par minutes Cobalt 57 : 10.000-25.000

Coup total par minutes Iode 125 : 15.000-35.000

Fiche 32
Dosage de l'homocystéine (HCY)

➤ Préparation des réactifs :

→ Préparation d'aliqots de solutions mères de standards non deutérés et deutérés à 1 mmol/L

	Homocystine ①	Homocystine d8 ② (98%)
Poudre (mg) *	13,27	13,8
HCl 0,1 N (<i>T° amb, hormones</i>)	50 mL	50 mL
	Vortexer, Soniquer	
NaOH 10 M (+ 4°C, hormones)	1 mL	1 mL
DTT	132,7 mg	132,7 mg
HCl 0,1 N	qsp 100 mL	
	Vortexer, Soniquer	
Concentration sol. mère	1 mM d'homocystéine	1 mM d'homocystéine d4
Aliquoter par fraction de 0,7 mL Congeler à – 20°C.		

* NB : Vérifier les quantités à peser pour chaque nouveau flacon en fonction de la masse et de la pureté du produit

→ Préparer la gamme d'étalonnage : diluer S8 au ½ jusque S1 dans le pool de plasma :

Concentration finale (µM)	S8	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1
Homocystéine	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0.781

→ Préparer le mélange de standards internes :

- 150 µL de HCY d4 à 1 mmol/L
- 4,5 ml de DTT ③ 200 mmol/L

→ Préparation des contrôles d'homocystéine :

Plasma Control Level I (n°0072) + II (n°0073) lyophilisé ④

Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée HPLC grade, laisser reposer 10 à 15 minutes et agiter jusqu'à dissolution totale. Faire des aliquots de 200 µL à conserver à -20°C

→ Préparation de la solution d'extraction MeOH 0,1% (v/v) d'acide formique ⑤

➤ Préparation des échantillons :

→ Préparation des extraits protéiques selon la procédure décrite précédemment (fiche 25)

→ Ultra soniquer pour dilution complète, conserver à -80°C

→ Décongeler les plasmas, les vortexer et les centrifuger (10 min, 3500 tours/min)

→ Allumer la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffage)

→ Dans un tube de 1,5 mL en polypropylène :

	Double blanc	Standard S0	Standard S1 à S8	Contrôle (pool, level 1 et 2)	Extraits tissulaires
Echantillon	50 µL pool	50 µL pool	50 µL	50 µL	50 µL
Standard interne	0		50 µL	50 µL	50 µL
DTT 200 mM	50 µL		0	0	0
	Vortexer et attendre 15 min à température ambiante				
meOH 0,1% ac. formique	100 µL		100 µL	100 µL	100 µL

→ Vortexer et incuber 30 min à + 4°C

→ Vortexer et centrifuger à 16000 rpm, 10 min

→ Reprendre 100 µL de surnageant dans un microtube de 1,5 mL (congeler éventuellement si nécessaire de faire ultérieurement l'étape LCMSMS) par 400 µL d'eau 0,1% (v/v) ac formique (= dilution au 1/5ème)

- Vortexer et centrifuger à 16000 rpm pendant 10 min
- Transférer sur microplaque Waters 350 µL ou 1 mL (ne pas remplir les puits à plus d'1/3)
- Sceller les plaques avec un film plastique à l'aide de la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffage)
- Passer sur LC/MSMS selon la technique ci-après

➤ Méthodes :

→ Lancement de la méthode LCMSMS *via* Analyst © :

- Méthode UPLC Acquity: &ISO_2.80 MIN_95-5_ FL.method

- Méthode d'acquisition : \&T3_HCY_MMA_AC SUCC_ISO_FL_H6.dam

2 périodes : MRM + pour HCY puis MRM – pour MMA & acide succinique et présence d'une valve pour permettre un switch vers la poubelle)

- Méthode de quantification : HCY –AC SUCC-MMA.qmf

① DL Homocystine, acide succinique, Dithiothréitol (DTT) en poudre (Sigma-Aldrich, St Louis, USA),

② Standards internes (SI) d8 Homocystine (DLM 3619, Cambridge isotopes),

④ Homocystéine Plasma Control Level I (n°0072) & Level II (n°0073) lyophilisé (Chromsystems)

⑤ Acide Formique 98% : (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)

⑥ Colonne UPLC : Acquity UPLC HSS T3 (1,8µm ; 2,1 x 50 mm)

UPLC Acquity Waters, Boucle d'injection de 10 µl

Spectromètre de Masse 4000 QTrap Applied Biosystems / MDS Sciex

Fiche 33

Mesure de la concentration des métabolites SAM, SAH à partir d'homogénats tissulaires par CLHP

➤ Préparation des solutions pour la phase mobile :

Tampon A (ajusté à pH 3,2 avec H₃PO₄ 85%)

- NaH₂PO₄ ① 50 mM
- Acide Heptansulfonique ② 10 mM
- Acétonitrile ② 10%

Tampon B (ajusté à pH 3,2 avec H₃PO₄ 85%)

- NaH₂PO₄ ① 50 mM
- Acide Heptansulfonique ② 10 mM
- Acétonitrile ② 50%

➤ Procédure :

→ Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote et la carboglace et garder environ 30 mg de tissu puis conserver le reste à -80°C

→ Reprendre le broyat dans l'acide perchlorique ② à 3% à raison de 10 µL pour 1 mg de tissu

→ Traiter chaque échantillon par sonication ③ en mode pulsé pendant 1 min sur glace

→ Centrifuger l'homogénat obtenu à 20 000 g/4°C/30 min

→ Filtrer le surnageant avec un filtre PVDF de 4mm ④ de diamètre et de porosité 0,45 µm.

→ Injecter l'échantillon (20 µL) dans un système de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) constitué d'une pompe à haute pression ⑤, un injecteur d'échantillon automatisé ⑥, une colonne contenant une résine de silice de 5 µm de granulométrie comportant des greffons hydrophobes (18 carbones) ⑦ maintenu à 30°C dans un four à colonne ⑧, à un débit constant de 0,75 mL/min (générant environ une pression de 115 bar)

→ L'absorbance est mesurée à 254 nm (maximum d'absorbance des purines par un spectrophotomètre UV-visible ⑨)

N.B : L'ordre d'élution des différents métabolites est la SAH puis la SAM. En parallèle, des standards contenant différentes concentrations de SAH et SAM ® (8-6-4-2-1 et 0,5µM) sont passés pour obtenir une gamme étalon réalisée en mesurant l'aire sous le pic en fonction de la concentration de standards. Ceci permettra de déterminer la concentration des échantillons selon une droite d'équation $y=ax+b$

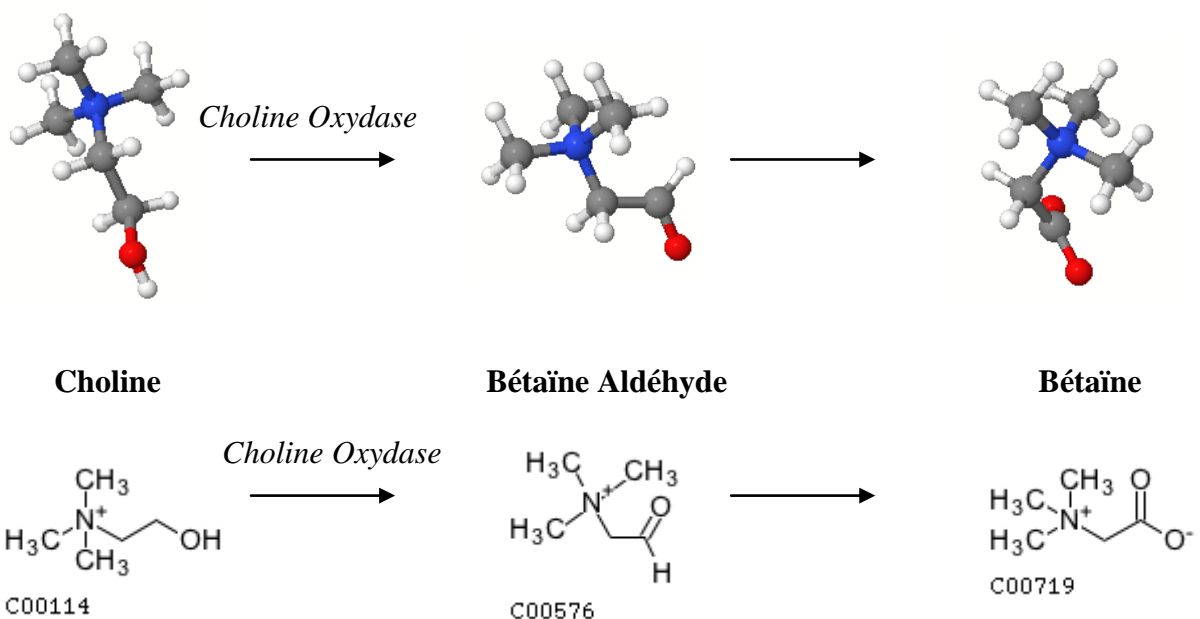
Loehrer FM, *et al.* Atherosclerosis. 2001

- ① Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
- ② Acétonitrile, acide heptansulfonique, VWR Prolab
- ③ *Cell sonifier disruptor*, Branson®
- ④ Membrane PVDF 4 mm, 0,45 µm, Dutscher
- ⑤ Pompe à haute pression, SpectraSystem, P1000XR, TSP
- ⑥ Injecteur d'échantillon automatisé, AS100, TSP
- ⑦ Colonne K5OD2QS25, 250x4 mm, Lichrospher (Interchim)
- ⑧ Four à colonne, Waters
- ⑨ Spectrophotomètre, SpectraSeries UV100, TSP
- ⑩ Standards SAM et SAH, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Fiche 34
Synthèse et purification de [³H]-bétaine à partir du chlorure de [méthyl-³H]-choline

➤ Synthèse de la bétaine tritiée :

La bétaine radiomarquée est préparée à partir de chlorure de [méthyl-³H] choline ① en présence de choline oxydase ② qui produit la réaction suivante :



→ La choline oxydase est préparée dans un tampon de conservation :

- Tris ② 10 mM pH 7,4
- KCl ② 0,1 M
- EDTA ② 0,1 M
- β-mercaptoéthanol ② 10 mM
- BSA ② 0,1 g/L
- Glycérol ② 50 %

→ Tampon réactionnel :

Volume réactionnel : 1000 µL	Concentration réactionnelle	Concentration stock	Volume
K ₂ H/KH ₂ (PO ₄) ② pH 7,8	100 mM	1 M	100 µL
Choline oxydase ②	5 U	0,1 U/µL	50 µL
[³ H-méthyl-]choline ①	100 µCi	100 µCi/µL	100 µL
H ₂ O qsp 100 µL			750 µL

→ Incuber 2 h /37°C

→ Arrêter la réaction avec 400 µL de méthanol ③

→ Extraire le produit avec 200 µL de chloroforme ③

→ Séparer les deux phases par ajout de 100 µL de chloroforme et 100 µL d'eau

➤ Purification de la bétaïne tritiée :

→ Séparer la phase aqueuse de la phase organique après centrifugation à 12 000 g/25°C/10 min

→ Concentrer la phase aqueuse avec un appareil concentrateur (Speed Vac®) ④ jusqu'à obtenir un volume d'environ 100 µL

→ Charger le concentré sur une colonne de chromatographie liquide à haute performance en phase normale ⑤ (CLHP- Lichrosorb Si60 5 µm, 250 x 4 mm). La séparation de la choline et de la bétaïne se fait à l'aide d'un gradient de tampons A et B à un débit de 0,6 mL/min ⑤

Constituants	Concentration stock	Tampon A	Tampon B
Acétonitrile ③	100 %	79,21 %	39,60 %
Ethanol ③	100 %	6,73 %	6,73 %
Acide acétique ③	100 %	0,20 %	4,36 %
Acétate d'ammonium ②	1 M	0,30 %	8,71 %
NaH ₂ PO ₄ ②	100 mM	0,99 %	0,99 %
Eau		12,57 %	39,60 %

Temps (min)	Proportion A	Proportion B
0	100 %	0 %
5	100 %	0 %
11	50 %	50 %
21	0 %	100 %
25	0 %	100 %
31	100 %	0 %
35	100 %	0 %

→ Collecter des fractions de 1 mL à l'aide d'un collecteur de fraction ⑥

→ Mesurer la radioactivité totale de la [³H]-bétaine (100 µL) dans des flacons en polyéthylène ⑦ contenant 2 mL de liquide de scintillation ⑦ (Pico-Fluor) à l'aide d'un compteur à scintillation Tri-Carb® 1900 CA ⑦.

① Chlorure de [méthyl-³H] choline, Amersham Biosciences

② Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

③ Méthanol, chloroforme, acétonitrile, éthanol, acide acétique, VWR Prolabo

④ Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA

⑤ Colonne de chromatographie liquide à haute performance en phase normale,

CLHP- Lichrosorb Si60 5 µm, 250 x 4 mm, Merck

Pump 305, GILSON

Biologic Workstation, BioRad

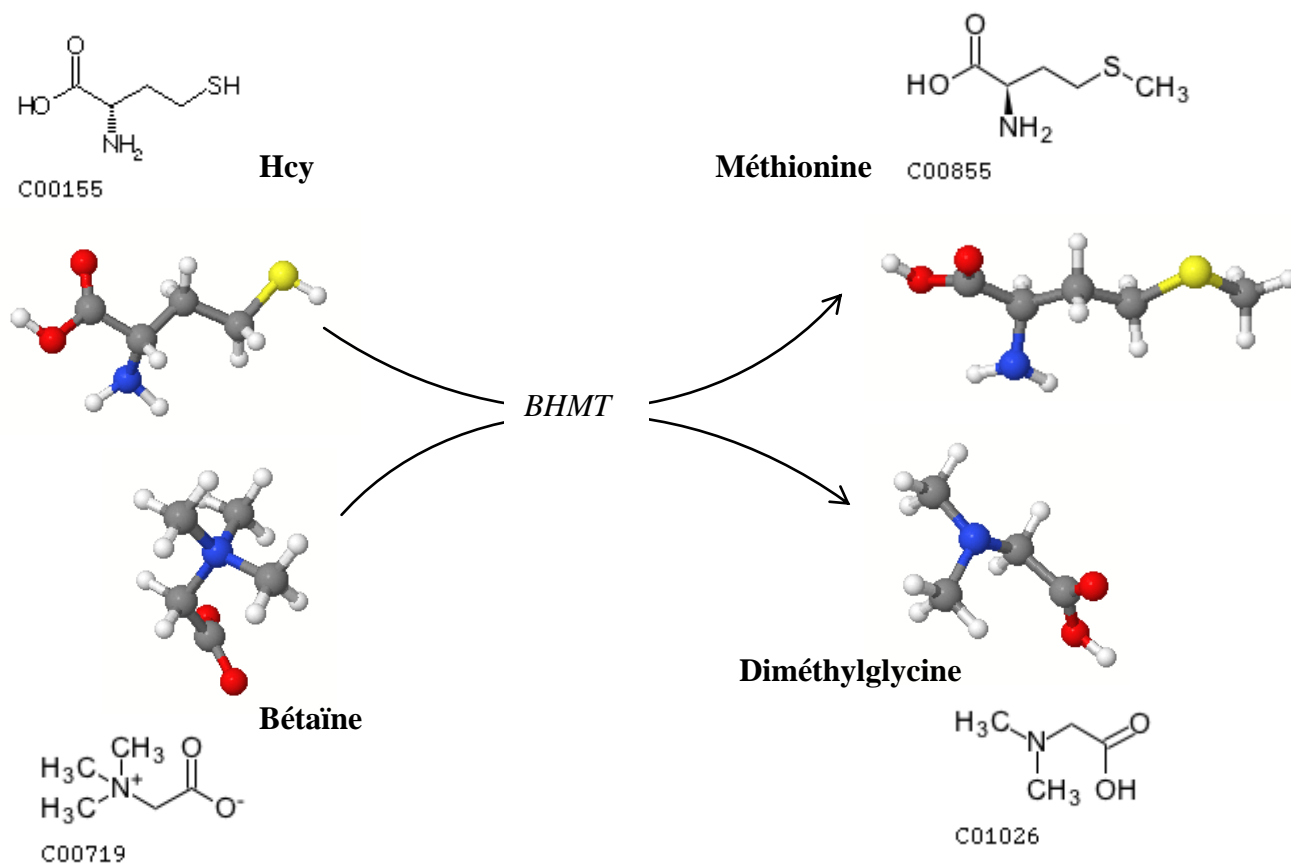
⑥ Collecteur de fraction, Model 2128, BioRad

⑦ Tous les produits sont fournis par Packard Biosciences®

Fiche 35

Mesure de l'activité de la Bétaïne Homocystéine Méthyltransférase (BHMT)

La BHMT catalyse la reméthylation de l'Hcy en méthionine en utilisant la bétaïne selon la réaction suivante :



- Détermination de la quantité de bétaïne tritiée nécessaire à la mesure de l'activité de la BHMT

A partir de la radioactivité totale mesurée, la radioactivité spécifique (Rs) de la [³H]-bétaïne est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Rs} = \frac{\text{Radioactivité totale pour un échantillon (cpm)} \times 10^{-9}}{\text{Concentration totale en bétaïne (M)} \times \text{volume réactionnel (L)}}$$

Rs exprimée en cpm / nmol de groupement hydrogènes et permet le calcul de l'activité spécifique de l'enzyme qui est exprimée en nmol/h/mg de protéines.

➤ Préparation du mélange réactionnel :

Volume réactionnel : 100 μ L	Concentration réactionnelle	Concentration stock	Volume
Protéines	~ 500 μ g	~ 20 μ g/ μ L	25 μ L
Tris-HCl ① pH 8	100 mM	1 M	20 μ L
DTT ① (H₂O)	25 mM	580 mM	μ L
Bétaïne ① (H₂O)	2 mM	200 mM	20 μ L
D, L Homocystéine ① (HCl 1N)	5 mM	500 mM	20 μ L
[³H] Bétaïne	15 nM	1,5 μ M	2 μ L
H₂O qsp 200 μL			μ L

→ Incuber le mélange dans le bloc chauffant à 1 h / 37°C

→ Arrêter en chauffant à 95°C/5 min puis refroidir à 4°C.

→ Centrifuger à 20 000 g/4°C/10 min

→ Eliminer le culot

➤ Séparation de la méthionine tritiée synthétisée par chromatographie d'échange d'ions :

→ Déposer le surnageant sur une colonne de 0,8 x 4 cm ② contenant 2 mL de résine AG1x8 ② préalablement équilibrée en ions OH⁻ en lavant avec 4 x 5 mL de NaOH 1N et 5 x 2 mL d'eau MilliQ

→ Laver le gel avec 1 mL, 3 mL et 3 x 5 mL eau MilliQ pour éliminer la [³H] Bétaïne en excès dans l'échantillon

→ Eluer la [³H] Méthionine produite lors de la réaction en lavant le gel avec 5 x 2 mL de HCl 0,5 N

→ Mesurer la radioactivité dans des flacons en polyéthylène ③ (20 mL) contenant 1 volume d'éluat avec 4 volumes de liquide de scintillation ③ à l'aide d'un compteur à scintillation Tri-Carb 1900 CA ③. Les activités sont exprimées en nmol de produit par heure et par mg de protéines totales.

① Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② Colonne de 0,8 x 4 cm, BioRad

résine AG1x8 ammonium quaternaire, BioRad

③ Tous les produits sont fournis par Packard Biosciences®

LISTE DES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

Communications

1. **H. Pellanda**, T. Forges, A. Bressenot, A. Chango, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, F. Namour. “FB1 fumonisin treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat pregnancy to produce alterations of H3- and H4- histone methylation patterns in foetuses” et **H. Pellanda**, F. Namour, M. Fofou-Caillierez, A. Bressenot, J.M. Albert, C. Chéry, A. Ayav, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, T. Forges. “A splicing variant leads to complete loss of function of betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) gene in hepatocellular carcinoma” **Congrès international “Advances and Controversies in B-Vitamins and Choline”** (Mars 2012, Leipzig, Allemagne), **obtention du 3^{ème} prix de la meilleure communication affichée.**
2. **H. Pellanda**, T. Forges, A. Bressenot, A. Chango, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, F. Namour. “FB1 fumonisin treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat pregnancy to produce alterations of H3- and H4- histone methylation patterns in foetuses” et **H. Pellanda**, F. Namour, M. Fofou-Caillierez, A. Bressenot, J.M. Albert, C. Chéry, A. Ayav, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, T. Forges. “A splicing variant leads to complete loss of function of betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) gene in hepatocellular carcinoma” **VII^{ème} Journée Claude Huriet** de la recherche médicale (Février 2012, Nancy, France).
3. **H. Pellanda**, T. Forges, A. Bressenot, A. Chango, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, F. Namour. “FB1 fumonisin treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat pregnancy to produce alterations of H3- and H4- histone methylation patterns in foetuses” et **H. Pellanda**, F. Namour, M. Fofou-Caillierez, A. Bressenot, J.M. Albert, C. Chéry, A. Ayav, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, T. Forges. “A splicing variant leads to complete loss of function of betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) gene in hepatocellular carcinoma” **Second Luxembourgish Nutrition Conference (Nulux) “Dietary Composition, Pattern and Health”** (Mai 2011, Mondorf-lès-Bains, Luxembourg)

4. **H. Pellanda**, F. Namour, M. Fofou-Caillierez, A. Bressenot, J.M. Albert, C. Chéry, A. Ayav, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, T. Forges. “La bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT) est absente dans les proliférations tumorales hépatiques. **VI^{ème} Journée Claude Huriet** de la recherche médicale : (Décembre 2010, Nancy, France).
5. **H. Pellanda**, T. Forges, A. Bressenot, A. Chango, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, F. Namour. “Modifications épigénétiques induites par la carence en donneurs de méthyles et la fumonisine sur le développement embryonnaire chez le rat”. **Journées Nationales Homocystéine** (Groupe Homocystéine France GHF) (Octobre 2009, Montpellier, France).
6. **H. Pellanda**, F. Namour, M. Fofou-Caillierez, A. Bressenot, J.M. Albert, C. Chéry, A. Ayav, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, T. Forges. L’absence d’expression de la Bétaine homocystéine méthyltransférase est-elle associée à la prolifération cellulaire ? **1^{ère} Journée Scientifique de la Fédération scientifique FR3209** : Bioingénierie moléculaire, cellulaire et thérapeutique : (Décembre 2009, Nancy, France)
7. **H. Pellanda**, F. Namour, M. Fofou-Caillierez, A. Bressenot, J.M. Albert, C. Chéry, A. Ayav, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, T. Forges. La bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT) est absente dans les proliférations tumorales hépatiques. **Vème Journée Claude Huriet** de la recherche médicale : (Décembre 2009, Nancy, France).
8. **H. Pellanda**, F. Namour, M. Fofou-Caillierez, A. Bressenot, J.M. Albert, C. Chéry, A. Ayav, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, T. Forges. La bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT) est absente dans les proliférations tumorales hépatiques. **Journée scientifique de l’école doctorale BIOSE** (Décembre 2009, Nancy, France), **obtention du prix de la meilleure communication affichée.**

Publications

1. **Pellanda H**, Forges T, Bressenot A, Chango A, Bronowicki JP, Guéant JL, Namour F. FB1 fumonisin treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat pregnancy to produce alterations of H3- and H4- histone methylation patterns in foetuses, *Molecular Nutrition and Food Research*, 2012
2. **Pellanda H**, Namour F, Fofou-Caillierez M, Bressenot A, Alberto JM, Chéry C, Ayav A, Bronowicki JP, Guéant JL, Forges T. A splicing variant leads to complete loss of function of betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) gene in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2011
3. Forges T, **Pellanda H**, Diligent C, Monnier P, Guéant JL. Do folates have an impact on fertility? *Gynecol Obstet Fertil*, 2008



A splicing variant leads to complete loss of function of betaine–homocysteine methyltransferase (BHMT) gene in hepatocellular carcinoma[☆]

Hélène Pellanda, Farès Namour, Ma'atem Fofou-Caillierez, Aude Bressenot, Jean-Marc Alberto, Céline Chéry, Ahmet Ayav, Jean-Pierre Bronowicki, Jean-Louis Guéant*, Thierry Forges

INSERM U954 «Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure», Faculté de Médecine, Nancy Université, 9 Avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2011

Received in revised form 7 November 2011

Accepted 17 November 2011

Available online 26 November 2011

Keywords:

BHMT

BHMT2

Hepatocellular carcinoma

HepG2

Methionine

Betaine

Choline

ABSTRACT

The remethylation of homocysteine into methionine is catalyzed either by methionine synthase (MTR) or by betaine–homocysteine methyltransferase (BHMT), in the liver. Choline/betaine deficiency and impaired BHMT pathway have been associated with hepatocellular carcinogenesis, in animal models. The molecular mechanisms that impair the BHMT pathway are unknown. We aimed to investigate *BHMT*, *BHMT2*, and *MTR* expression in HepG2 cells and human hepatocarcinoma tissues. Transcripts were quantified by RT-qPCR and splicing was assessed by analysis of exon junctions and sequencing of variants. Protein expression was studied by Western Blot, immunohistochemistry and enzyme activity. Tumor tissue was compared with surrounding healthy tissue. RT-qPCR of HepG2 cells and of tumor samples showed a strong decrease of transcripts of *BHMT* and *BHMT2*, compared to normal. *MTR* transcript levels were not different. The decreased *BHMT* expression resulted from the transcription of a splicing variant that produced a frameshift in exon 4, with a premature termination codon in exon 5 and a loss of function of the gene. This splicing variant did not fit with any mechanism resulting from known splicing consensus sequences and was not detected in normal adult and fetal liver. Consistently, BHMT activity was abolished in HepG2 and protein expression was not detectable in HepG2 and in 5 of the 6 tumor samples, compared to normal tissues. In conclusion, a transcription variant of exon 4 produces a loss of function of *BHMT* in human hepatocarcinoma. Whether this abnormal transcription of *BHMT* is part or consequence of liver carcinogenesis should deserve further investigations.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The sulfur-containing amino-acid methionine is either incorporated into various peptides and proteins or converted into S-adenosylmethionine (SAM) by methionine adenosyltransferase (MAT) which transfers an adenosyl group from ATP to methionine. SAM is the main methyl donor for DNA, RNA, protein and phospholipid methylation (Pajares and Perez-Sala, 2006). As an essential amino acid, methionine has to be provided by the diet, but it can also be regenerated from homocysteine (HCY) through two different remethylation pathways, which account each for

half of the remethylation capacity in the liver (Finkelstein and Martin, 1984). In most tissues, HCY is remethylated into methionine by methionine synthase, encoded by *MTR*, with methyltetrahydrofolate acting as the methyl donor and cobalamine (vitamin B12) as a cofactor. The second remethylation pathway depends on betaine–homocysteine methyltransferase (BHMT) (Fig. 1A). In contrast to the methionine synthase pathway, human BHMT, encoded by *BHMT*, is expressed only in kidney and liver (Delgado-Reyes et al., 2001) where it accounts for 0.6–1.6% of total protein content (Garrow, 1996). Betaine, the substrate of BHMT is originating either from the diet with wheat, spinach, sugar beets, and crustaceans as the major sources (Craig, 2004), or from choline oxidation in the mitochondria. A second gene called *BHMT2* has been located upstream of *BHMT*, encoding a 73% homologous protein (Chadwick et al., 2000). The functional significance of *BHMT2* has not yet been clearly identified (Li et al., 2008; Szegedi et al., 2008). The diet deficient in choline, folate, B12 and the methionine-deficient diet were shown to cause hepatocarcinogenesis (Copeland and Salmon, 1946; Ghoshal et al., 1983; Ghoshal and Farber, 1984). This was related with DNA hypomethylation, overexpression of proto-oncogenes such as *c-myc*, *c-fos* and *c-Ha-ras* (Pogribny and James, 2002; Pogribny et al., 2004; Wainfan et al., 1989; Wainfan

Abbreviations: MTR, methionine synthase; BHMT, betaine homocysteine methyltransferase; SAM, S-adenosylmethionine; MAT, methionine adenosyltransferase; HCY, homocysteine; HCC, hepatocellular carcinoma; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; POLR2A, RNA polymerase II; SAH, adenosylhomocysteine.

[☆] Financial support to complete this work was provided by the ligue contre le cancer (Grant project CIRCE), France.

* Corresponding author at: INSERM U 954, Faculté de Médecine – BP 184, 54511 Vandoeuvre les Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 32 92; fax: +33 3 83 68 32 79.

E-mail address: Jean-Louis.Gueant@medecine.uhp-nancy.fr (J.-L. Guéant).

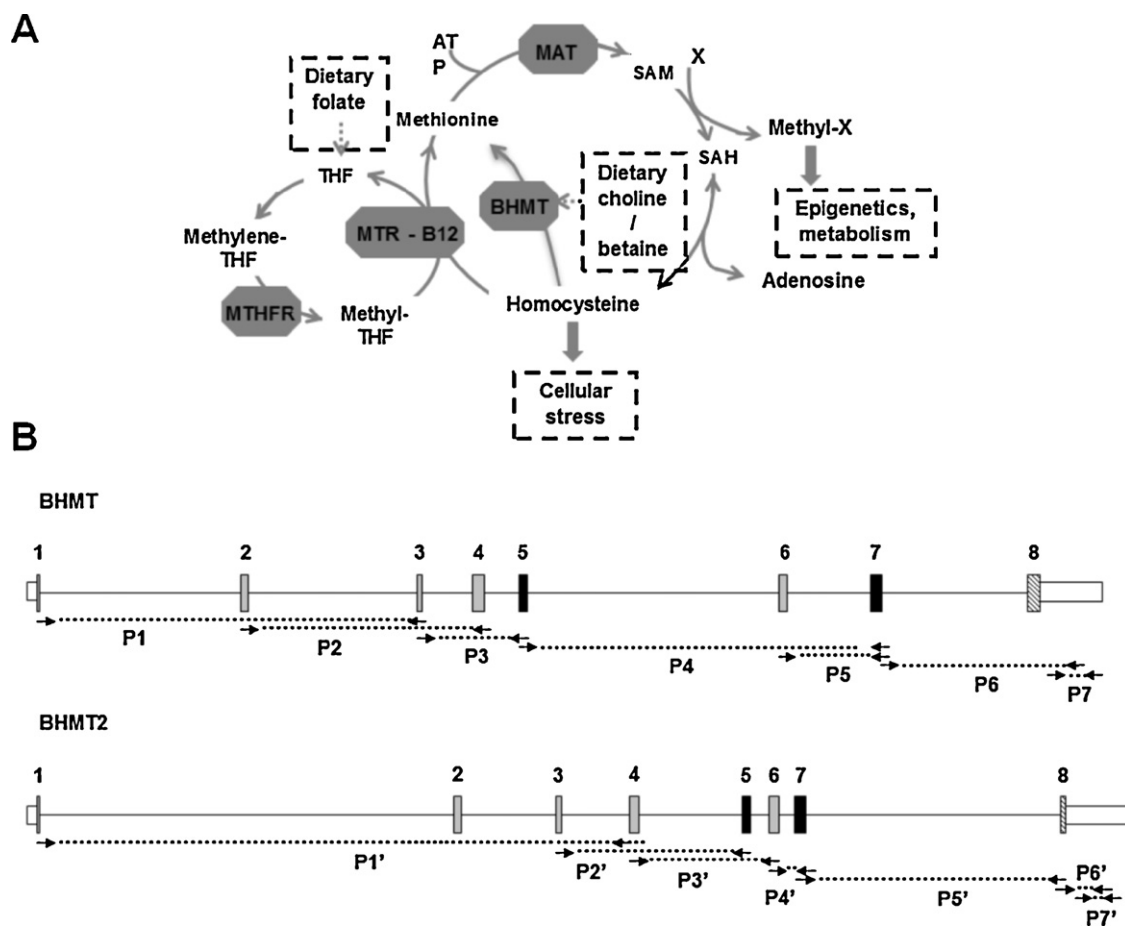


Fig. 1. (A) Folate and homocysteine metabolism. In the liver, homocysteine (HCY) is remethylated into methionine by methionine synthase (MTR) which uses methyltetrahydrofolate and cobalamin as a co-factors or by BHMT which uses betaine as methyl donor. Abbreviations: MAT, methionine adenosyltransferase; X, substrate to be methylated. (B) Schematic representation of *BHMT* and *BHMT2* genes with primer pairs position. *BHMT* and *BHMT2* exons are shown as numbered boxes, introns are represented by solid lines. Exons with 80–100% homology are colored in black, exons with 60–80% homology are colored in grey and exon 8 displaying 30% homology is shaded. White boxes indicate 3' and 5'-UTR. Arrows depict primer pairs position used in RT-PCR and numbered P1–P7 for *BHMT* and P1'–P7' for *BHMT2*.

and Poirier, 1992), and decreased expression of tumor-suppressive genes such as *p53* and *p16^{INK4A}* (Pogribny and James, 2002; Pogribny et al., 2004). The methyl-deficient diet enhances the chemical induction of hepatocellular carcinoma (HCC) in rats exposed to diethylnitrosamine (DEN) (Mikol et al., 1983; Yokoyama et al., 1985). In contrast, choline supplementation appeared to reduce the incidence of HCC in these models, underlining the importance of the BHMT-dependent methionine regeneration pathway in the prevention of hepatocarcinogenesis (Ghoshal and Farber, 1984; Wainfan and Dizik, 1987). In humans, a decrease of *BHMT* expression has been reported in tumor tissues, compared with normal liver (Avila et al., 2000; Liang et al., 2005; Sun et al., 2007). However, the underlying molecular mechanisms are not known. The aim of the present study was therefore to investigate the changes in MTR, BHMT and BHMT2 expression and to elucidate the underlying molecular mechanisms in HepG2 cells and liver carcinoma.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

HepG2 cells were purchased from LGC Standards (Molsheim, France). These cells were cultured in 75 cm² flasks at 37°C in a humidified CO₂ (5%) incubator in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL Life Technologies) with 10% fetal calf serum (v/v) (PAA Laboratories) and 1% (100 U) penicillin–streptomycin

(v/v) (Gibco). The medium was changed every two days until the cells reached 50%, 80% or complete confluence. Cells were then trypsinised after washing with 1× Dulbecco's phosphate buffered saline (Gibco), collected and centrifuged for 5 min at 200 × g, then frozen at –80°C, until extraction of RNA and proteins.

2.2. Liver tissues

Adult liver tumor samples were obtained from 6 patients undergoing surgery for hepatocellular carcinoma (patients T3–T6) and cholangiocarcinoma (patients T1 and T2). After surgical removal, tumor tissue was carefully dissected and paired with a sample of surrounding healthy tissue (C3–C6 and C1, C2, respectively). Paired specimens were frozen in liquid nitrogen then stored at –80°C until processing. The dissection was always performed by the same operator within 15 min after surgical removal. Representative sections were cut and subjected to histological examination, which showed that tumor samples (T1–T6) contained ≥80% tumor cells whereas their healthy counterparts (C1–C6) contained only normal cells. Age, sex, tumor type and etiology are given in Supplementary Table 1. Fetal liver tissue samples (F1 and F2) were obtained from two fetuses after spontaneous abortion at 27 and 38 weeks gestational age, respectively. All samples were obtained after patient consent. All study procedures were conducted in accordance with the institutional ethics committee approval.

2.3. RT-PCR

Total RNA was extracted from liver tissues and HepG2 cells using RNeasy Mini extraction kit (QIAGEN). First strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using Quantitect Reverse Transcription kit (QIAGEN). *BHMT* (GenBank ID: NM.001713.2), *BHMT2* (GenBank ID: NM.017614.4), *MTR* (GenBank ID: NM.000254.2) and *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GenBank ID: NM.002046.3) were cut out in overlapping fragments and each fragment was amplified with specific oligonucleotides listed in Fig. 1B (and Supplementary Table 2 in Supplementary data). Conditions of PCR were 2 µL of RT product, 0.2 µM of each primer, 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen) and 1× PCR Rxn buffer (Invitrogen) in a total volume of 50 µL. All fragments were amplified with the same protocol in an iCycler (BioRad) by using a touchdown program: 5 min of initial denaturation at 94 °C, followed by 10 cycles of amplification (30 s of denaturation at 94 °C, 30 s of annealing with T_m between 50 °C and 60 °C, and 30 s of elongation at 72 °C) and 25 additional cycles (30 s of denaturation at 94 °C, 30 s with constant T_m at 49 °C and 30 s of elongation at 72 °C). After the 35 cycles, a final extension was performed for 7 min at 72 °C. The amplification products were separated on an agarose gel (1.5%). PCR products were cut from the agarose gel, purified using the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) and sequenced with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

2.4. Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

The cDNA synthesized was also used for qPCR which was performed using the Quantitect SYBR Green PCR kit from Qiagen and iCycler (BioRad). *BHMT* (GenBank ID: NM.001713.2), *BHMT2* (GenBank ID: NM.0017614.4), *MTR* (GenBank ID: NM.000254.2) and *POLR2A* (RNA polymerase II, GenBank ID: NM.000937.4) genes were amplified with oligonucleotides described in Supplementary Table 3 (Supplementary data online). The qPCR was performed according to the following program: 15 min at 95 °C to activate the enzyme, followed by 45 cycles at 94 °C for 15 s, 57 °C for 20 s, and 72 °C for 15 s. Then melting curve analyses were performed by increasing temperature from 64 to 89 °C.

Relative gene expression was calculated by the $\Delta\Delta CT$ method, which gives the amount of target gene normalized to the endogenous reference gene and relative to a calibrator sample. Thus this method was used to determine the fold change in *BHMT*, *BHMT2* and *MTR* transcript copy numbers in tumor samples normalized to *POLR2A* and relative to the paired non-cancerous control samples.

2.5. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections using the DakoCytomation Envision+ Dual Link System-HRP protocol (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) in a Dakocytomation AutoStainer (Glostrup, Denmark). Sections were first deparaffinized and rehydrated. Antigen retrieval was performed by incubating the slides in Tris-citrate buffer pH 6.0 for 20 min at 97 °C (PT Link, Dakocytomation, Glostrup, Denmark). Any endogenous peroxidase activity was quenched by incubating the specimen for 10 min with Dual Endogenous Enzyme Block. Slides were then incubated with the monoclonal mouse anti-BHMT antibody (mouse monoclonal, 1/100, Abcam) for 30 min at room temperature, followed by incubation with the HRP-labeled polymer (goat anti-mouse immunoglobulin) for 30 min at room temperature. Staining was completed by a 10 min incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB+) substrate-chromogen. Sections were then counterstained

with hematoxylin. Negative control was made by processing sections in the absence of primary antibody.

2.6. Western Blot

Total proteins were extracted from liver samples and HepG2 cells using RIPA lysis buffer containing 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 1% Igepal (v/v), 0.5% sodium deoxycholate (w/v), 0.1% SDS (w/v). Immediately prior to protein extraction the RIPA lysis buffer was supplemented with 1% phenylmethanesulfonyl fluoride (v/v) (freshly diluted in ethanol), 1% Na₃VO₄ (v/v) (freshly diluted in distilled water) and 1.4% Protease Inhibitor Cocktail (v/v). All reagents were purchased from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France. Samples (20 µg) were mixed with an equal volume of 2× Laemmli buffer, denatured by heating the mixture for 5 min at 100 °C, and then resolved on 12% SDS-polyacrylamide gel. The membranes (0.45 µm polyvinylidene difluoride, PVDF, Millipore) were blocked for 1 h with Tris-buffered saline (pH 7.4) and 0.1% (v/v) Tween 20 (TTBS buffer) containing 5% (w/v) nonfat dry milk. They were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in TTBS buffer containing 5% nonfat dry milk as follows: anti-BHMT (mouse monoclonal, 1/1000 (v/v), Abcam), anti-MTR (rabbit polyclonal 1/1000 (v/v), Abcam), and anti-GAPDH (mouse monoclonal 1/1000 (v/v), Millipore) as internal standard. After washing with TTBS, membranes were incubated for 1 h at room temperature with the corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated preadsorbed secondary antibody (donkey anti-mouse IgG-HRP, Santa-Cruz, 1/8000 (v/v) for BHMT detection and 1/2000 (v/v) for GAPDH detection and donkey anti-rabbit IgG-HRP, Santa-Cruz, 1/1000 (v/v) for MTR detection). Subsequently, immunoreactive proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence protocol (ECL kit, Amersham Biosciences, Orsay, France). Images are representative of three independent immunoblots. ImageJ software was used to quantify signals.

2.7. BHMT enzyme assay

[³H] betaine was prepared and purified by a method adapted from Mar et al. (1995). The assay procedure was described by Garrow (1996). Positive and negative control was made with rat Wistar liver homogenate and bovine serum albumine respectively. The average activity was expressed in nmol/h/mg protein.

3. Results

3.1. Expression of MTR, BHMT and BHMT2 in HepG2 cells, tumor liver and normal adult and fetal liver

We evidenced the transcription of *MTR* by RT-PCR in HepG2 cells. In contrast, neither *BHMT* nor *BHMT2* transcripts were detected. Similarly, *MTR* was consistently expressed, whereas *BHMT* expression was nearly absent in tumor samples, as shown by the absence or the presence of a very faint band on the electrophoresis gel. As to *BHMT2* expression, we evidenced a reduced expression in HCC samples, compared to control tissue. This reduced expression was also observed in the cholangiocarcinoma sample. Transcripts of *MTR*, *BHMT* and *BHMT2* were found in all normal liver samples, as shown by the amplification of a DNA fragment of the expected size (Fig. 2A). Sequence analysis of these fragments was consistent with the reported gene sequences. To further investigate the relative amount of *BHMT*, *BHMT2*, and *MTR* transcripts, we performed quantitative RT-PCR, which confirmed similar *MTR* expression levels when comparing normal with tumor liver samples. In contrast, *BHMT2* transcripts were at very low levels

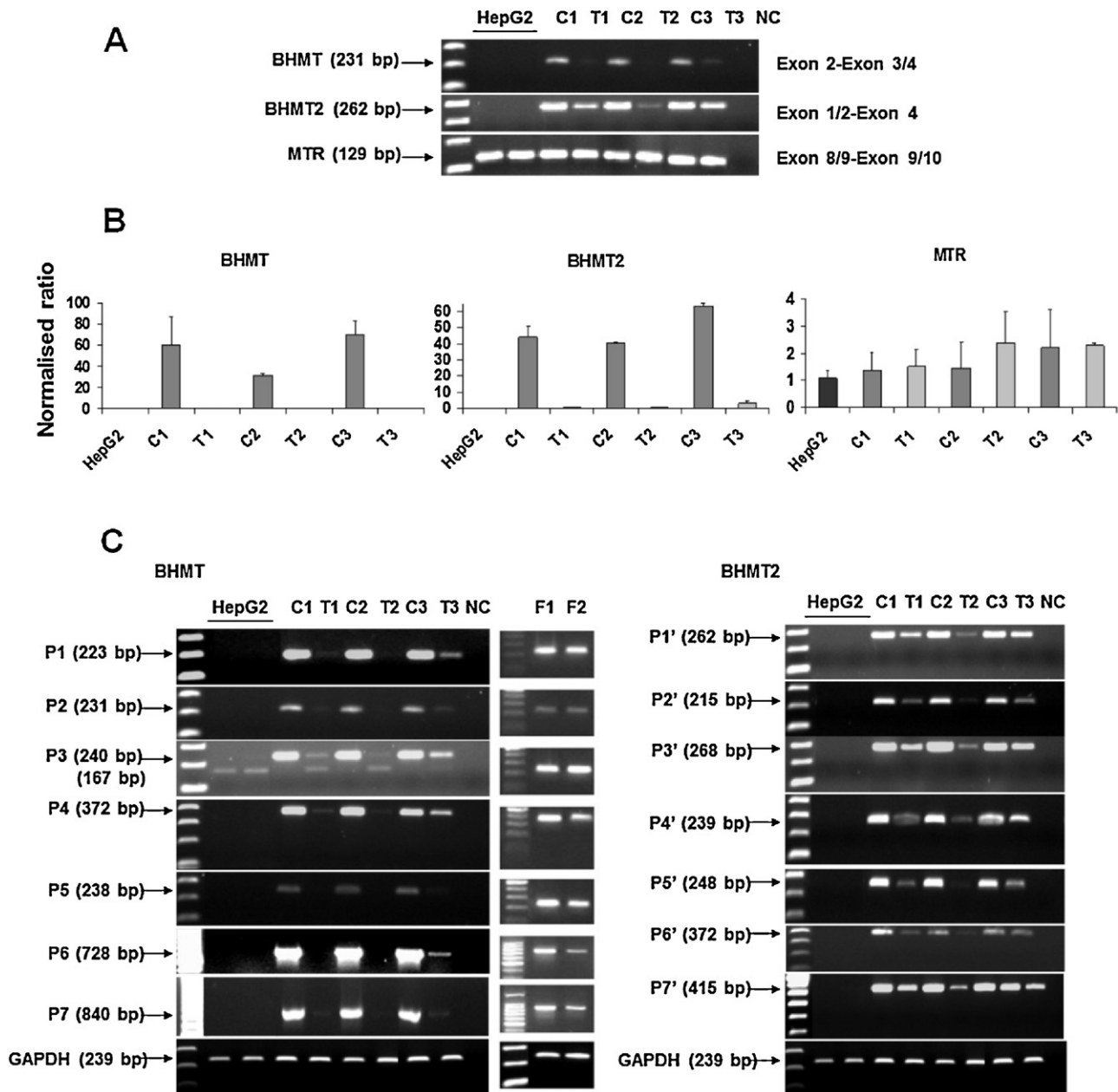


Fig. 2. (A and B) RT-PCR and RT-qPCR showing *BHMT*, *BHMT2* and *MTR* mRNA expression in HepG2 cells, normal adult liver and tumor liver. In tumor samples derived from patients and in HepG2 cells *BHMT* transcript is not detectable, *BHMT2* expression is nearly abolished and *MTR* is normally expressed. mRNA was quantified by using RNA polymerase 2 (*POLR2A*) as internal standard. Results are mean data of two RT \pm SEM and each sample was run in duplicate. (C) *BHMT* and *BHMT2* were divided in several overlapping fragments and each fragment was amplified with primers pairs P1–P7 and P1'–P7' as depicted in Fig. 1B. Primer pair P3 (forward primer overlapping exons 3/4 and reverse primer in exon 5), yields 2 *BHMT* transcripts in tumor liver tissues and HepG2 cells. One transcript has the expected size of 167 bp and the other is shorter. The transcript with the expected size is barely visible in HepG2 cells. The tumor samples are T1–T3 and C1–C3 are their normal counterparts. F1 and F2 are fetal liver samples. NC, negative control.

and *BHMT* transcripts were undetectable in HepG2 cells and tumor tissues, when compared to healthy liver (Fig. 2B).

Because of the apparent lack of *BHMT* and *BHMT2* expression in HepG2 and malignant liver samples, we performed further RT-PCR analysis using different overlapping primer pairs (P1–P7 for *BHMT* and P1'–P7' for *BHMT2*), in order to amplify both transcripts exon by exon (Fig. 1B and Table 2 in Supplementary data). RT-PCR with all these primer pairs yielded single amplification products of the expected sizes for *BHMT* and *BHMT2* in all normal tissue samples. In HepG2 cells, *BHMT2* was not detected whereas it displayed a low expression in tumor samples. *BHMT* overlapping amplification products of the expected size were nearly undetectable in tumor samples. In HepG2 cells, only primer pair P3

yielded a *BHMT* amplification product of the expected size but barely visible and all other primer pairs did not amplify any *BHMT* fragment. Surprisingly, primer pair P3 produced a second amplification product, about 75 bp smaller than the expected fragment. This shorter *BHMT* was observed in HepG2 and tumor samples and coexisted with the transcript of the expected size. This additional shorter transcript was completely absent in normal liver samples (Fig. 2C).

In order to test the hypothesis of the shorter transcript being an onco-fetal marker, RT-PCR with the same primer pairs specific for *BHMT* was performed in two fetal liver samples (F1 and F2). Fetal liver had the same expression pattern as normal adult liver, and no shorter *BHMT* transcript was detected (Fig. 2C).

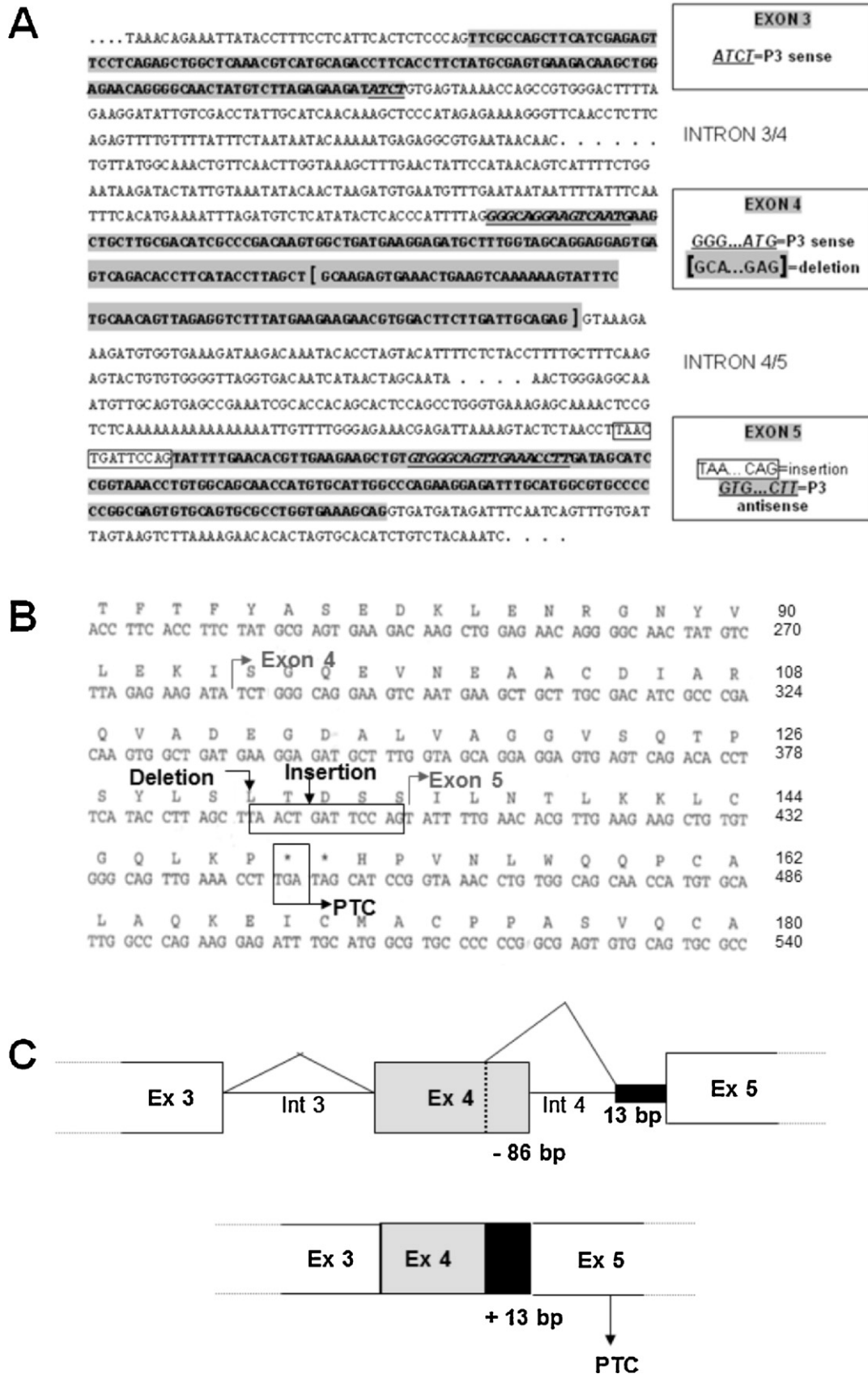


Fig. 3. (A) *BHMT* genomic sequence featuring exon 3 – exon 4 – exon 5 with the alternating intronic sequences. Primers pair P3 used in RT-PCR is underlined. Amplification with P3 yields 2 *BHMT* fragments: one has the expected size and the other is shorter and contains a mutation combining an 86bp deletion shown between brackets, and a 13bp insertion shown within a white box. (B) The deduced amino acid sequence of the short *BHMT* transcript amplified by primer pair P3. Localization of the deletion and the insertion are indicated. The combined deletion/insertion causes a premature termination codon (PTC) in exon 5. (C) Sketch depicting the putative aberrant splicing mechanism generating the short *BHMT* transcript in tumor liver and HepG2 cells with the PTC localized in exon 5.

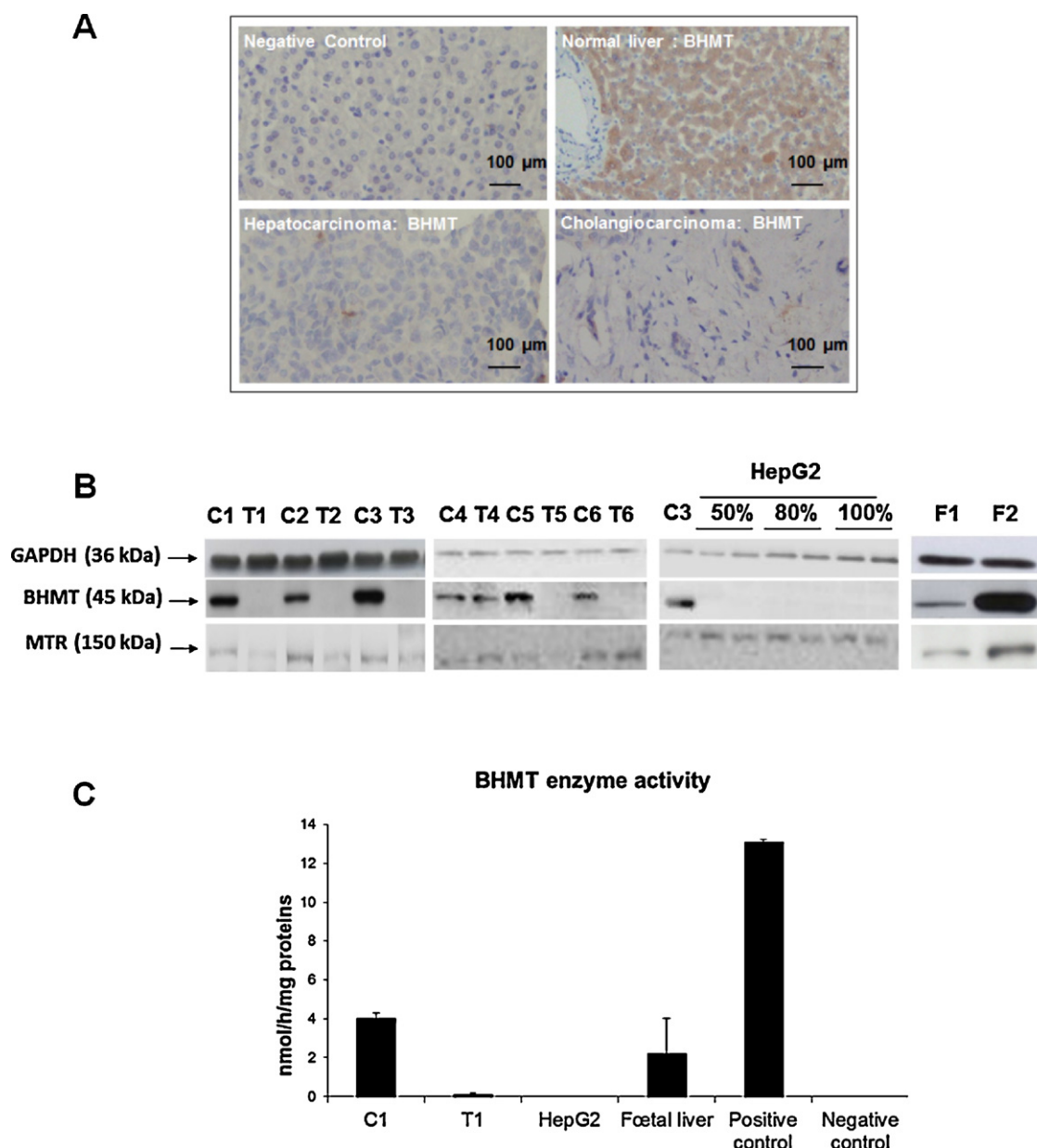


Fig. 4. (A) Immunohistochemical staining for BHMT in normal and tumoral liver tissues. BHMT is detected in normal hepatocytes but not in tumor liver sections. (B) Western Blot analysis. BHMT (45 kDa) is detected in fetal and adult normal liver samples and in tumoral sample T4 but not in tumor samples T1–T3, T5 and T6. BHMT is not detected neither in HepG2 cells (confluent and at 50%, 80%-confluence). The tumor samples are T1–T6 and C1–C3 are the normal counterparts. GAPDH was used to confirm equal protein loading. (C) Enzymatic activity quantification. No BHMT enzymatic activity is detected in tumor sample T1 neither in HepG2 cells. Samples were measured in duplicate and the results are mean data of 2 assays \pm SEM.

3.2. Sequence analysis of the alternative BHMT transcript

Sequencing of the additional BHMT transcript isolated from the tumor samples and HepG2 cells showed a 86 bp deletion at the 3'-end of exon 4, followed by an insertion of the last 13 bp of intron 4/5, thus accounting for the observed size difference between the two transcripts. Sequencing of the amplification products from normal liver was completely consistent with the established reference sequence (Fig. 3A). Sequencing of genomic BHMT DNA did not show any variations in healthy tissue samples as well as in HepG2 cells and tumor samples.

According to the sequencing results, the alternative BHMT transcript has a frameshift in exon 4 leading to a premature termination codon at the beginning of exon 5 (Fig. 3B). Thus if the transcript was translated, the corresponding protein would be expected to be truncated, missing the parts encoded by exons 6–8.

3.3. Immunodetection of BHMT in normal and tumor tissues

Immunohistochemistry showed the presence of immunoreactive BHMT in normal liver sections, whereas no labeling was detectable in tumor tissues (Fig. 4A). Consistently, BHMT protein expression was not detected in HepG2 at 50%, 80% and 100%-confluence and in 5 of the 6 tumor samples (T1–T3, T5 and T6), while the presence of a 45 kDa BHMT protein was found, as expected, in normal fetal and adult normal liver sections. An immunoreactive protein was also detected in tumor tissue T4 as well as in its normal counterpart C4, indicating that absence of BHMT protein expression is frequent but not systematic in liver tumors.

The presence of 150 kDa MTR protein was observed in all samples, either tumoral or not, although at variable levels. MTR expression was downregulated in 4 of the 6 tumors (T1–T3 and T5),

in comparison with the normal counterparts and was not altered in HepG2 cells. Therefore, MTR downregulation was not constant (Fig. 4B).

3.4. BHMT enzyme activity

Tumor liver, as well as HepG2 cells did not show any detectable BHMT activity. Normal liver tissue and fetal liver tissues displayed an average activity of 4.08 nmol/h/mg and of 2.25 nmol/h/mg total protein, respectively (Fig. 4C).

4. Discussion

Our study demonstrated a striking reduction in gene expression of *BHMT* and *BHMT2* in HepG2 cells and HCC tissues. A transcript variant was identified for BHMT whereas a single *BHMT2* transcript was detected at the expected size. The *BHMT* transcript variant resulted from an aberrant splicing. These results provide an explanation to the decrease of *BHMT* mRNA levels in tumor tissues, compared with normal liver (Avila et al., 2000) and the down-regulation of BHMT in HCC at the protein level (Liang et al., 2005; Sun et al., 2007). Betaine-dependent HCY remethylation was completely abolished in HepG2 cells, as evidenced by undetectable BHMT activity. In contrast to a previous study in which *MTR* was also down-regulated in HCC (Liang et al., 2005), our results did not show any significant difference in *MTR* mRNA levels between normal and tumor tissue. This discrepancy may be accounted for by clinical differences between patients or the dissection conditions to separate normal tissues from HCC tissue samples.

At the molecular level, the present study revealed the presence of an alternative BHMT transcript with lower size in HepG2 and tumor tissues, but not in normal tissue. Sequence analysis of this transcript consistently confirmed a complex splicing pattern associating a partial deletion of exon 4 followed by the insertion of the 3'-end of intron 4. This genetic variation actually appeared at the transcriptional level, as genomic DNA from the same tumor samples did not show any sequence variation. So far, variants of BHMT have been reported as a result of either post-transcriptional modifications (Ichikawa et al., 2004) or genomic modifications, mainly single nucleotide polymorphisms with some of them being associated with enzyme activity and protein level (Feng et al., 2011). Alternative splicing of *BHMT* has not been published until now. The splice variant that we describe in the present study does not fit with any mechanism resulting from splicing consensus sequences. The subsequent frameshift induces a premature termination codon, which would lead to a truncated and non-functional protein. Since the premature termination codon is located more than 50 nucleotides upstream of the following exon-exon junction, it may be also targeted by the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway which degrades abnormal mRNAs from both 5'- and 3'-ends (Green et al., 2003; Ou et al., 2007). The rapid decay of the transcript is consistent with the very low level of BHMT transcripts and the absence of immuno-reactive protein in HepG2 cells and tumor tissues. This finding is in agreement with Ji et al. results (Ji et al., 2007) who reported that BHMT protein is not detected by Western Blot in HepG2 cells. They related this lack of protein expression to a low level of BHMT transcript but they did not amplify BHMT with primers encompassing exon 3/4–exon 5. In our study amplifying BHMT with primer pair P3 encompassing exon 3/4–exon 5 enables us to suggest that the discovered splicing variant prevents from producing the BHMT protein. It should be noted however that lack of BHMT protein, although frequent is not constant in tumor tissues. Indeed, BHMT is not detected in HepG2 cells and in 5 the 6 tumor samples.

In contrast to normal cells, many cancer cells, including HepG2 cells, cannot grow in a medium where methionine is replaced by homocysteine (Halpern et al., 1974; Mecham et al., 1983). This phenotypic characteristic is referred to as methionine dependence. The methionine dependence of HepG2 cells was related to a reduced HCY-remethylating activity explained by a low MTR activity (Ashe et al., 1974; Chango et al., 2009). This activity may be increased by cobalamin (Marguerite et al., 2007). Since BHMT is thought to account for half of the methionine-regenerating capacities in normal hepatocytes (Finkelstein and Martin, 1984), our results suggest therefore that the dramatic decrease of BHMT in HepG2 cells and HCC tissue produces a dramatic reduction of the rate of HCY remethylation. Consequently, the subsequent synthesis of SAM will be also impaired. This will be amplified by silencing of *MAT1A*, encoding the usual hepatic MAT isoform, and expression of *MAT2A* and *MAT2β*, encoding a low affinity MAT isoform (Mato et al., 2008). Consequently, the lack of BHMT activity that results from the transcription of the *BHMT* splicing variant could be a main contributor for the methionine dependence. It may also influence the growth and proliferation of HCC cells, which strongly depends on methionine cellular availability (Cellarier et al., 2003; Durando et al., 2008). In addition, impairing the cellular metabolism of vitamin B12 and the subsequent MTR activity decreases the proliferation rate of various cancer cells (Battaglia-Hsu et al., 2009; Lai et al., 2011). Consequently, our result suggest that impairing MTR could be a strategy in the chemotherapy of HCC, as it would selectively abolish the remethylation pathway in tumor cells lacking BHMT, but not in normal tissue, where BHMT activity is present.

To summarize, we have observed a dramatic decrease of expression and activity of BHMT in HepG2 cells and HCC tissue that results from an alternative splicing of *BHMT* in exon 4. The transcription variant produces a frameshift with a premature termination codon in exon 5 that leads to a loss of function of the gene. This molecular mechanism of impaired expression of BHMT may explain part of the methionine dependence of hepatocellular carcinoma. Whether this abnormal transcription of *BHMT* is cause or consequence of liver carcinogenesis should deserve further investigations.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biocel.2011.11.014.

References

- Ashe H, Clark BR, Chu F, Hardy DN, Halpern BC, Halpern RM, et al. N5-methyltetrahydrofolate: homocysteine methyltransferase activity in extracts from normal, malignant and embryonic tissue culture cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;57:417–25.
- Avila MA, Berasain C, Torres L, Martin-Duce A, Corrales FJ, Yang H, et al. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;33:907–14.
- Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE, et al. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:21930–5.
- Cellarier E, Durando X, Vasson MP, Farges MC, Demiden A, Maurizis JC, et al. Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2003;29:489–99.
- Chadwick LH, McCandless SE, Silverman GL, Schwartz S, Westaway D, Nadeau JH. Betaine-homocysteine methyltransferase-2: cDNA cloning, gene sequence, physical mapping, and expression of the human and mouse genes. *Genomics* 2000;70:66–73.
- Chango A, Nour AA, Bousserouel S, Eveillard D, Anton PM, Guéant JL. Time course gene expression in the one-carbon metabolism network using HepG2 cell line grown in folate-deficient medium. *J Nutr Biochem* 2009;20:312–20.

- Copeland DH, Salmon WD. The occurrence of neoplasms in the liver, lungs and other tissues of rats as a result of prolonged choline deficiency. *Am J Pathol* 1946;22:1059–79.
- Craig SA. Betaine in human nutrition. *Am J Clin Nutr* 2004;80:539–49.
- Delgado-Reyes CV, Wallig MA, Garrow TA. Immunohistochemical detection of betaine-homocysteine S-methyltransferase in human, pig, and rat liver and kidney. *Arch Biochem Biophys* 2001;393:184–6.
- Durando X, Thivat E, Gimbergues P, Cellarier E, Abrial C, Dib M, et al. Methionine dependency of cancer cells: a new therapeutic approach? *Bull Cancer* 2008;95:69–76.
- Feng Q, Kalari K, Fridley BL, Jenkins G, Ji Y, Abo R, et al. Betaine-homocysteine methyltransferase: human liver genotype-phenotype correlation. *Mol Genet Metab* 2011;102:126–33.
- Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem* 1984;259:9508–13.
- Garrow TA. Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem* 1996;271:22831–8.
- Ghoshal AK, Ahluwalia M, Farber E. The rapid induction of liver cell death in rats fed a choline-deficient methionine-low diet. *Am J Pathol* 1983;113:309–14.
- Ghoshal AK, Farber E. The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Carcinogenesis* 1984;5:1367–70.
- Green RE, Lewis BP, Hillman RT, Blanchette M, Lareau LF, Garnett AT, et al. Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics* 2003;19(Suppl. 1):i118–21.
- Halpern BC, Clark BR, Hardy DN, Halpern RM, Smith RA. The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:1133–6.
- Ichikawa A, Ohashi Y, Terada S, Natsuka S, Ikura K. In vitro modification of betaine-homocysteine S-methyltransferase by tissue-type transglutaminase. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1981–92.
- Ji C, Shinohara M, Kuhlenkamp J, Chan C, Kaplowitz N. Mechanisms of protection by the betaine-homocysteine methyltransferase/betaine system in HepG2 cells and primary mouse hepatocytes. *Hepatology* 2007;46(5):1586–96.
- Lai SC, Nakayama Y, Sequeira JM, Quadros EV. Down-regulation of transcobalamin receptor TcR/CD320 by siRNA inhibits cobalamin uptake and proliferation of cells in culture. *Exp Cell Res* 2011;317:1603–7.
- Li F, Feng Q, Lee C, Wang S, Pellemounter LL, Moon I, et al. Human betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and BHMT2: common gene sequence variation and functional characterization. *Mol Genet Metab* 2008;94:326–35.
- Liang CR, Leow CK, Neo JC, Tan GS, Lo SL, Lim JW, et al. Proteome analysis of human hepatocellular carcinoma tissues by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2005;5:2258–71.
- Mar MH, Ridky TW, Garner SC, Zeisel SH. A method for the determination of betaine in tissues using high performance liquid chromatography. *J Nutr Biochem* 1995;6:392–8.
- Marguerite V, Beri-Dexheimer M, Ortiou S, Merten Guéant JLM. Cobalamin potentiates vinblastine cytotoxicity through downregulation of mdr-1 gene expression in HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:967–76.
- Mato JM, Martinez-Chantar ML, Lu SC. Methionine metabolism and liver disease. *Annu Rev Nutr* 2008;28:273–93.
- Mechem JO, Rowitch D, Wallace CD, Stern PH, Hoffman RM. The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently in human tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;117:429–34.
- Mikol YB, Hoover KL, Creasia D, Poirier LA. Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1983;4:1619–29.
- Ou X, Yang H, Ramani K, Ara AI, Chen H, Mato JM, et al. Inhibition of human betaine-homocysteine methyltransferase expression by S-adenosylmethionine and methylthioadenosine. *Biochem J* 2007;401:87–96.
- Pajares MA, Perez-Sala D. Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2792–803.
- Pogribny IP, James SJ. De novo methylation of the p16INK4A gene in early preneoplastic liver and tumors induced by folate/methyl deficiency in rats. *Cancer Lett* 2002;187:69–75.
- Pogribny IP, James SJ, Jernigan S, Pogribna M. Genomic hypomethylation is specific for preneoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. *Mutat Res* 2004;548:53–9.
- Sun W, Xing B, Sun Y, Du X, Lu M, Hao C, et al. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1798–808.
- Szegedi SS, Castro CC, Koutmos M, Garrow TA. Betaine-homocysteine S-methyltransferase-2 is an S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem* 2008;283:8939–45.
- Wainfan E, Dizik M. Suppression by methionine and choline of onco-fetal patterns of liver tRNA methyltransferase activities in carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis* 1987;8:615–7.
- Wainfan E, Dizik M, Stender M, Christman JK. Rapid appearance of hypomethylated DNA in livers of rats fed cancer-promoting, methyl-deficient diets. *Cancer Res* 1989;49:4094–7.
- Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 1992;52:2071–7.
- Yokoyama S, Sells MA, Reddy TV, Lombardi B. Hepatocarcinogenic and promoting action of a choline-devoid diet in the rat. *Cancer Res* 1985;45:2834–42.

RESEARCH ARTICLE

Fumonisin FB1 treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat pregnancy to produce alterations of H3- and H4-histone methylation patterns in fetuses

Hélène Pellanda, Thierry Forges, Aude Bressenot, Abalo Chango, Jean-Pierre Bronowicki, Jean-Louis Guéant and Fares Namour*

INSERM U954 "Nutrition Genetics and Environmental Risk Exposure," Faculté de Médecine, Nancy Université, Vandoeuvre les Nancy, France

Scope: Prenatal folate and methyl donor malnutrition lead to epigenetic alterations that could enhance susceptibility to disease. Methyl-deficient diet (MDD) and fumonisin FB1 are risk factors for neural tube defects and cancers. Evidence indicates that FB1 impairs folate metabolism.

Received: September 20, 2011

Revised: March 7, 2012

Accepted: March 15, 2012

Methods and results: Folate receptors and four heterochromatin markers were investigated in rat fetuses liver derived from dams exposed to MDD and/or FB1 administered at a dose twice higher than the provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI = 2 µg/kg/day). Even though folate receptors transcription seemed up-regulated by methyl depletion regardless of FB1 treatment, combined MDD/FB1 exposure might reverse this up-regulation since folate receptors transcripts were lower in the MDD/FB1 versus MDD group. Methyl depletion decreased H4K20me3. Combined MDD/FB1 decreased H4K20me3 even more and increased H3K9me3. The elevated H3K9me3 can be viewed as a defense mechanism inciting the cell to resist heterochromatin disorganization. H3R2me2 and H4K16Ac varied according to this mechanism even though statistical significance was not consistent.

Conclusion: Considering that humans are exposed to FB1 levels above the PMTDI, this study is relevant because it suggests that low doses of FB1 interact with MDD thus contributing to disrupt the epigenetic landscape.



Keywords:

Epigenetic modifications / Folates / Fumonisin / Methyl donor deficiency / Prenatal nutrition

1 Introduction

The fumonisin mycotoxins are produced by several *Fusarium* species and are contaminant of corn and corn-based diet worldwide. About 30 types of fumonisins have been identified [1] with the most prevalent being fumonisin B1

(FB1) which was found to be a complete carcinogen [2–4]. In humans, FB1 is associated with esophageal cancer, particularly in areas with high levels of FB1 in corn such as the Transkei region in South Africa [5] or in China [6]. Recently, in Tanzania, a correlation between exposure to fumonisins and growth retardation was made for the first time in infants consuming corn-based food [7]. Moreover, maternal intake of fumonisin contaminated tortillas increases the risk of neural tube defects (NTDs) in offspring along the Texas–Mexico border [8].

FB1 disrupts sphingolipids biosynthesis by inhibiting the enzyme ceramide synthase thus leading to accumulation of free sphingoid bases and reduced formation of glycosphingolipids among which is sphingomyelin [9]. Sphingomyelin is

Correspondence: Professor Jean-Louis Guéant, INSERM U 954 "Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure," Faculté de Médecine, Nancy Université– BP 184, 54511 Vandoeuvre les Nancy, France
E-mail: Jean-Louis.Gueant@medecine.uhp-nancy.fr
Fax: 03-83-68-32-79

Abbreviations: FB1, fumonisin B1; FR, folate receptor; MDD, methyl-deficient diet; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; RT-qPCR, reverse transcriptase-qPCR; SAH, S-adenosylhomocysteine; SAM, S-adenosylmethionine

*Additional correspondence: Professosr Fares Namour E-mail: namour1771@gmail.com

a major component of the plasma membrane and is required for the proper function of glycosylphosphatidylinositol-anchored (GPI) proteins, such as the folate receptor (FR) [10]. We have reported that FB1 reduces the expression of the two ubiquitous folate cell transporters, the FR and the reduced folate carrier (Slc19a1) in the human hepatocarcinoma HepG2 cells [11]. Dosing pregnant dams with FB1 results in complex sphingolipids temporary decrease in placenta [12] and folate depletion in liver fetuses [13]. FR binds to folates with high affinity and internalizes folates by an endocytic mechanism, while Slc19a1 functions as an anion exchanger [14]. Several types of experiments in vitro [11, 15], ex utero [16], and in vivo [13] hint that FB1 alters folate uptake. These results suggest that the toxicity of FB1 may be mediated, at least in part, through its effects on folate status and methyl donor metabolism.

FB1 contamination depends on several factors including climate conditions (temperature, humidity), insect infestation, and pre- and postharvest handling. In some European countries, corn-based food was found to be contaminated by fumonisin at an overall incidence of 62% and fumonisin was detected at levels exceeding the legal limits in 7% of the analyzed samples [17]. In this context, the influence of FB1 on cellular uptake of folate may be partly neutralized in Northern America, where food is fortified with folate. This assumption is based on several lines of evidence. In LM/Bc mice, maternal FB1 exposure results in a dose-dependent increase in NTDs that could be prevented by maintaining adequate folate levels [13]. In HepG2 cells, 5-methyltetrahydrofolate attenuates FB1-induced apoptosis [11]. However, in other countries, the combination of folate deficiency and FB1 exposure strengthens the threat for public health.

Inside the cell, the role of folate is to transfer one-carbon units between compounds that act as donors or receivers of one-carbon moieties. Folate is a methyl group donor in the reaction that methylates homocysteine to methionine. The methionine produced is subsequently converted to S-adenosylmethionine (SAM), which in turn is converted to S-adenosylhomocysteine (SAH) by transferring its methyl group onto a variety of substrates. SAM is required for cytosine methylation and methylation of histones both of which are components of epigenetic mechanisms essential in many cell functions such as transcription, DNA repair, and replication [18]. The folate nutritional status and/or genetics have been linked to a vast array of pathologies including cancer. Overwhelming evidence has established that periconceptional fortification with folate has a protective effect on NTDs [19].

Histone modifications together with DNA methylation are involved in shaping the chromatin architecture, which can forbid or authorize gene accessibility to regulatory proteins. These epigenetic modifications play a critical role in the control of cell processes including embryonic development, transcription, X chromosome inactivation, and genomic imprinting [18]. Several cases have been reported indicating that the maternal fetal environment can change the epigenetic state in

adult offspring and at least in some cases this change seems to be reversible [20]. Methyl-deficient diet (MDD) can induce liver carcinogenesis in rodents and the development of the tumor is characterized by reduced repetitive DNA LINE-1 methylation and linear decline in H4K20me3 whereas global H3K9me3 decreases at the early stages but increases at the advanced stages of carcinogenesis [21]. To our knowledge, the role of FB1 in epigenetic events has not been addressed yet.

We used a rat model to investigate the synergic impact of prenatal methyl donor deficiency and low dosage of FB1 administration on the pattern of global histone modifications. We found that MDD decreased significantly H4K20me3, which is a marker of assembled heterochromatin. Amplifying the metabolic stress by adding FB1 to the methyl depletion triggered a defense mechanism in the fetuses that attempted to resist heterochromatin disorganization by increasing H3K9me3.

2 Material and methods

2.1 Experimental design

Animal treatments were conducted under institutional approval and in accordance with international guidelines for animal care and housing (Authorization n°54–547-22 delivered by the Departmental Direction for Populations Protection, Meurthe et Moselle, France).

Three-month-old sexually mature virgin Wistar female and male rats (Charles River, l'Arbresle, France) were left to acclimatize during 2 weeks under standard laboratory conditions. One month before mating, dams were exposed daily to a control (folates: 0.9 mg/kg, vitamin B12: 0.04 mg/kg, choline: 2100 mg/kg; SAFE, Augy, France) or methyl deficient (folates: 0.01 mg/kg, vitamin B12: 0 mg/kg, choline 0.06 mg/kg; Special Diet Service, Saint Gratien, France) diet with or without fumonisin FB1 (Sigma-Aldrich F1147–1 mg) administered daily by gavage at 4 µg/kg body weight, which amount to twice the provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI), defined at 2 µg/kg/day, by the Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA). The four female groups were established as follows: (i) animals exposed to control diet (Control, $n = 13$); (ii) animals exposed to MDD ($n = 15$); (iii) animals exposed to FB1 alone (FB1, $n = 2$); (iv) animals exposed to MDD and FB1 (MDD/FB1, $n = 3$). Number of females in the control and MDD groups is large because those females were dispatched on other teams in the laboratory working on topics related to methyl depletion but unrelated to FB1. The whole number of control and MDD dams was used to assess methyl depletion but only a subset was included in the analysis of FB1 and MDD interactions in fetuses. Females were paired with males overnight and successful mating was confirmed by the presence of sperm in the vaginal smears and used to determine the beginning

of pregnancy. The respective diets were maintained during mating and gestation and body weights and food consumption were recorded daily.

Dams were killed with excess halothane on day 20 of gestation; gravid uteri were removed and weighed. Blood samples and livers were collected from all dams for the measurement of vitamin B12, folate and homocysteine concentrations, and morphological study (Fig. 1). In order to analyze FB1 and MDD interactions, 2/13 control dams, 3/15 MDD dams, 2

FB1 dams, and 3 MDD/FB1 dams were utilized (Table 1). Fetuses were removed from the uterus, blotted dry, measured, weighed, and examined for gross malformations. Total numbers of fetuses derived from dams in each group were as follows: control group, $n = 23$; MDD group, $n = 39$; FB1 group, $n = 25$; MDD/FB1 group, $n = 25$ (Table 2). From each group, eight embryos were randomly selected and their livers were retrieved and used in all subsequent experiments (Fig. 2–4)

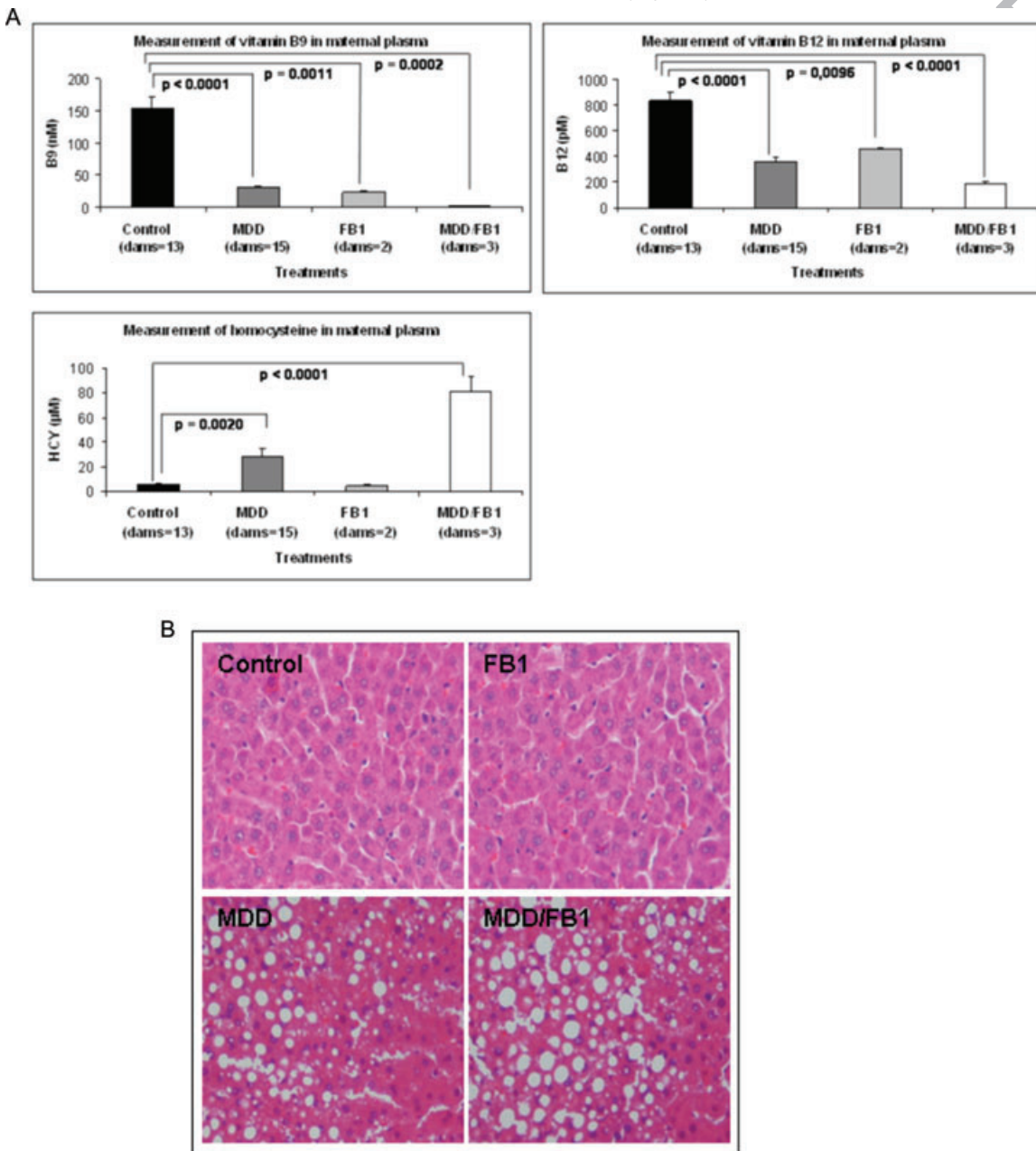


Figure 1. (A) The vitamins concentrations are reduced and homocysteine concentration is significantly increased in dams exposed to isolated MDD or to combined MDD/FB1 administration, compared to the control group. Each sample was analyzed in duplicate in three independent runs and values were compared by ANOVA. Histograms represent means and error bars standard errors of the means. (B) The morphological study reveals that the pericentrolobular steatosis caused by the MDD is aggravated by FB1 administration. MDD, methyl donor deficiency; FB1, fumonisin.

Table 1. Effects of methyl donor deficiency (MDD) and fumonisin (FB1) on various developmental and nutritional parameters. FB1 administration and/or exposition to MDD did not affect the number of fetuses per rat, maternal body weight, food intake, nor gravid uterus weight

Treatments	No. of fetuses/rat	Gain in maternal body wt. (g)	Feed intake (acclimatization) (g)	Feed intake (gestation) (g)	Gravid uterus wt. (g)
Control (dams = 2)	11.5 ± 0.5	121.5 ± 17.5	501.7 ± 16.4	284.9 ± 7.5	66.8 ± 3.6
MDD (dams = 3)	14.7 ± 1.8	137.7 ± 9.8	424.6 ± 36.5	264.0 ± 8.8	81.5 ± 12.8
FB1 (dams = 2)	13.0 ± 0	141.5 ± 0.5	448.5 ± 10.2	289.1 ± 0.3	71.6 ± 0.8
MDD/FB1 (dams = 3)	13.3 ± 1.5	139.7 ± 1.2	445.0 ± 20.9	254.8 ± 2.4	67.8 ± 6.7

± represents standard error to the mean.

2.2 Determination of vitamin, homocysteine, and hepatic metabolites concentrations

Plasma concentrations of vitamin B12 and folate were determined by radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB, ICN Pharmaceuticals). Homocysteine concentrations were measured by ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (Api 4000 Qtrap Applied Biosystems). SAM and SAH concentrations were measured by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography using a Nova-pack column C18, 150 × 3.9 mm, 4 μ [22, 23].

2.3 Morphologic study of pregnant dams liver

Tissue samples were fixed in 4% (m/v) formaldehyde pH 7.4 for 24 h. Tissue were routinely processed and embedded in paraffin. Paraffin blocks were used to generate 5-μm thick hematoxylin and eosin-stained sections. By using the non-alcoholic steatohepatitis scoring system [24], histological features were graded 0–3 (0 as < 5% parenchymal involvement by steatosis, 1 between 5–33%, 2 between 33–66%, and 3 as > 66%). The slides were examined by two different investigators blinded to samples origins.

Table 2. Effects of methyl donor deficiency (MDD) and fumonisin (FB1) on fetal body weight and height. Fetuses exposed to isolated MDD or to combined MDD/FB1 administration show significantly decreased weight and height, compared to the control group, whereas isolated FB1-treated fetuses show no significant change

Treatments	Average fetal body weight (g)	Average fetal height (cm)
Control (<i>n</i> = 23)	3.64 ± 0.05 ^{a)}	3.60 ± 0.03 ^{a)}
MDD (<i>n</i> = 39)	3.34 ± 0.07 ^{b)}	3.50 ± 0.03 ^{b)}
FB1 (<i>n</i> = 25)	3.60 ± 0.08 ^{a)}	3.58 ± 0.03 ^{a)}
MDD/FB1 (<i>n</i> = 38)	3.22 ± 0.05 ^{b)}	3.47 ± 0.02 ^{b)}

n represents the total number of fetuses derived from all litters born in a given group. ± represents standard error to the mean and means in the same column not sharing a common superscript letter are significantly different

2.4 FRs quantitation by reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted using RNeasy Mini extraction kit (Qiagen). First strand cDNA was synthesized using Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen). The qPCR was performed using the Quantitect SYBR Green PCR kit from Qiagen and iCycler (BioRad). *FR* (NM_133527.1) and the Reduced Folate Carrier Protein (*Slc19a1*, NM_017299.2) were amplified with *Tceb1* (Transcription Elongation Factor B polypeptide 1 NM_022593.3) used as the reference gene, with the oligonucleotides described in Table 3 (Supporting Information). The qPCR was performed according to the following program: 15 min at 95°C to activate the enzyme, followed by 45 cycles at 94°C for 15 s, 56°C for 20 s, and 72°C for 15 s. Then melting curve analyses were performed by increasing temperature from 64 to 89°C. Relative gene expression was calculated by the $\Delta\Delta\text{CT}$ method [25].

2.5 Histone extraction

Histones were extracted as previously described [26]. Acidic cell extracts were prepared from frozen liver tissues using a lysis buffer containing Tris 10 mM, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM KCl, dithiothreitol 1 mM (DTT) (v/v), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (v/v), protease inhibitor cocktail 2% (v/v), sodium orthovanadate 1 mM (NaVO₃) (v/v), sodium fluoride 2 mM (NaF) (v/v), sodium butyrate 5 mM (C₅H₈O₂Na) (v/v). The lysate was passed ten times through a 20 Gauge 1½ inch syringe needle and incubated during 30 min at 4°C in a rotator. Cell lysates were centrifuged at 10 000 × *g* at 4°C for 10 min. The supernatant was eliminated and the pellet resuspended in 400 μL of sulphuric acid (H₂SO₄) 0.2 M. The mixture was incubated 2 h/4°C in a rotator and centrifuged at 14 000 × *g*/4°C/10 min. The acid insoluble pellets were discarded. The supernatant fractions, which contain the acid soluble proteins, were purified by sequential dialysis (Slide-A-Lyser Dialysis Cassette, 3500 MWCO, 0.1–0.5 mL capacity, Pierce) against 200 mL acetic acid 2.5%. Then proteins were removed, transferred to an Eppendorf tube, and frozen at –80°C during 1 h. Extracts were lyophilized using speed vac

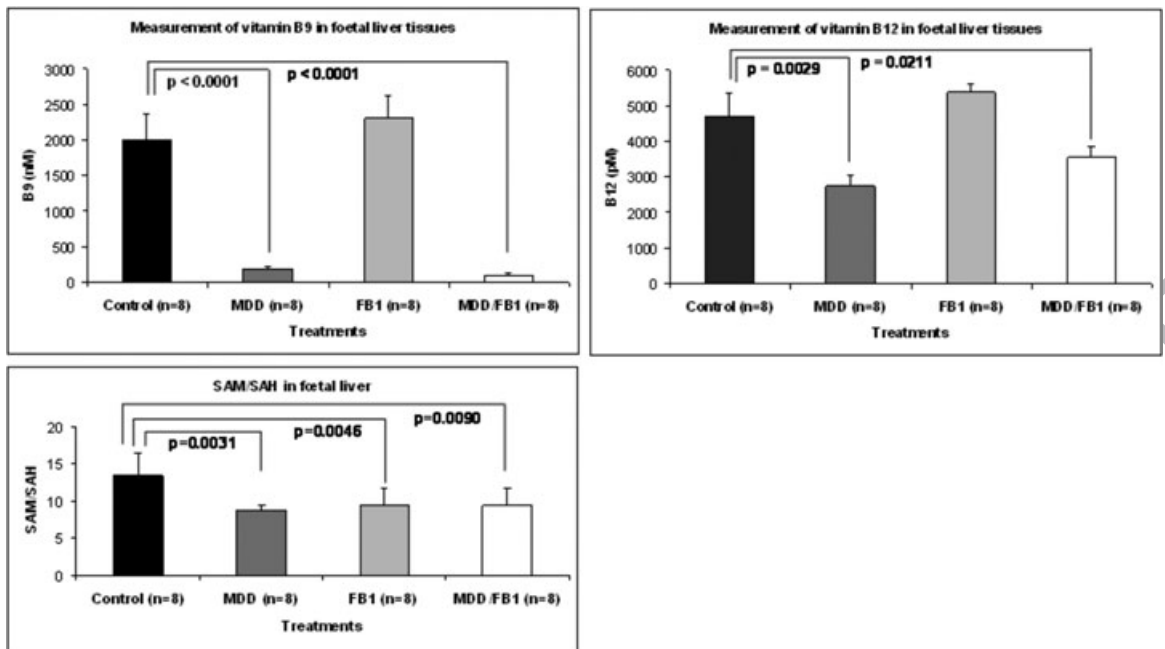


Figure 2. Folate and vitamin B12 are reduced in the isolated MDD and combined MDD/FB1 groups. The SAM/SAH ratio is significantly reduced in fetuses from dams exposed to isolated MDD, isolated FB1 administration, or to both factors in combination, compared to control fetuses. *n* represents the number of fetuses randomly selected and analyzed in each group. Histograms represent means and error bars standard errors of the means. Each fetus sample was tested in duplicate in three independent runs and averaged values of parameters per fetus were compared by ANOVA. MDD, methyl donor deficiency; FB1, fumonisin.

during 4 h minimum. Finally, lyophilisate was resuspended in 100 µL H₂O. Protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Interchim) and aliquots of total histones were stored at –80°C.

2.6 Analysis of histones modifications

For Western blot analyses proteins were resolved on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred

to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with nonfat dried milk, probed with antibodies, developed with the enhanced chemiluminescence protocol (ECL kit, Amersham Biosciences), and analyzed by Image J software. All membranes were stained with Coomassie Blue and probed with antihistone H3 and antihistone H4 antibodies to confirm equal protein loading. The selected histone modifications are markers of heterochromatin assembly (see Discussion for details): H4K20me3 and H3K9me3 [27],

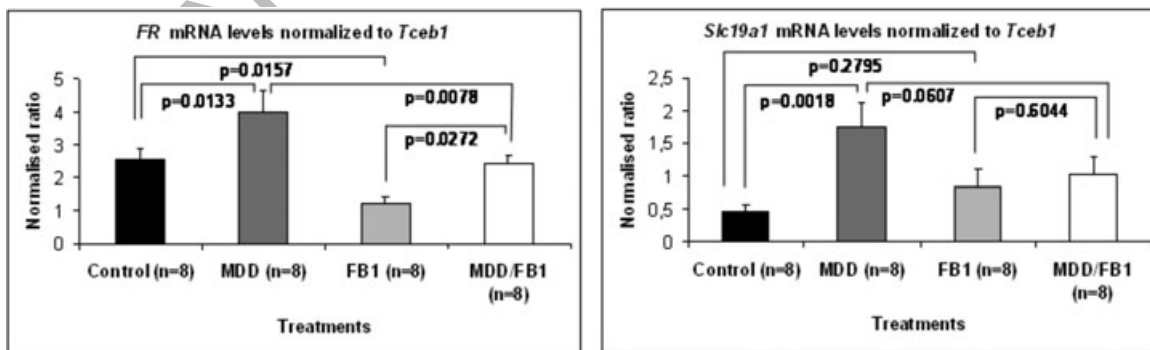


Figure 3. By comparing MDD and control groups and MDD/FB1 and FB1 groups, mRNA levels indicate that folate receptor transcription is up-regulated regardless of fumonisin treatment. However, combined methyl group deficiency and fumonisin exposure might neutralize folate receptors up-regulation since FR and Slc19a1 transcripts are diminished in MDD/FB1 group compared to MDD group. Isolated FB1 exposure reduces FR transcripts but not Slc19a1 transcripts. Representation and analyses of data are similar to Figure 2. MDD, methyl donor deficiency; FB1, fumonisin.

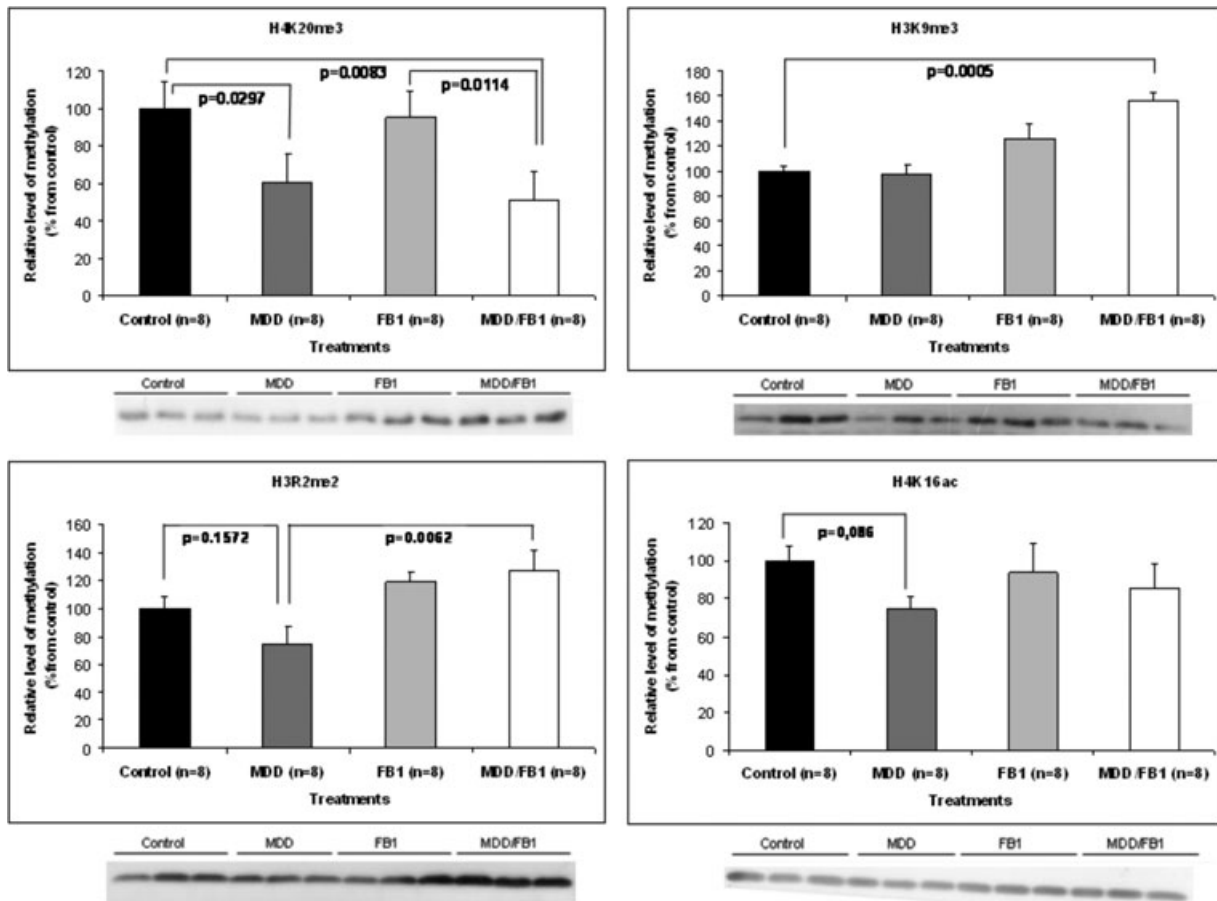


Figure 4. MDD results in decreased H4K20me3 and H4K16Ac in comparison to the control group. Combined exposure to MDD/FB1 decreases H4K20me3 and increases H3K9me3. This opposite variation is a defense mechanism to resist heterochromatin disorganization. Combined exposure to MDD/FB1 also increases H3R2me2 and H4K16Ac in agreement with the defense mechanism. Representation and analyses of data are similar to Figure 2. MDD, methyl donor deficiency; FB1, fumonisin.

H3R2me2 [28], H4K16Ac [29]. Antibodies characteristics are in Table 4 (Supporting Information).

2.7 Statistical analysis

Maternal parameters were compared by one-way ANOVA. All fetal analyses were performed including the litter of origin as a covariate in order to account for the possible variance between and within dams [30]. For the following parameters in fetus—folate, vitamin B12, SAM/SAH, FR, Slc19a1, and histone modifications—the expression data sets in each group were generated from eight fetuses selected randomly from the corresponding joint litters. For a given parameter, each fetus was tested in duplicate in three independent runs and the averaged values per fetus and per parameter were compared in statistical analyses. Statistical analyses were done with Statistica (<http://www.statsoft.com>) by using one-way ANOVA tests; p -values < 0.05 were judged significant. Error bars in figures represent standard error of the mean.

3. Results

3.1 MDD but not FB1 decreased fetuses weight and length

None of the groups showed differences concerning the number of fetuses/litter, maternal body gain, food intake, gravid uterus weight (Table 1). No maternal nor fetal death or implant occurred. Isolated MDD yielded significant decreased fetal body weight ($p = 0.0020$) and length ($p = 0.0089$). An identical result was observed for the combined exposure MDD and FB1 but not for FB1 administration alone (Table 2).

3.2 MDD-induced plasma homocysteine increase and induced hepatic steatosis in dams

MDD efficiently decreased plasma folate ($p < 0.0001$) and vitamin B12 ($p < 0.0001$) and increased homocysteine ($p = 0.002$) in comparison to the control diet. FB1 by itself also

decreased folate ($p = 0.0011$) and vitamin B12 ($p = .0096$) without significantly elevating homocysteine. However, combined MDD/FB1 resulted in significantly increased homocysteine ($p < 0.0001$) to a much greater extent than MDD. MDD yielded a pericentrolobular steatosis grade 1 in the liver of pregnant dams, aggravated to grade 2 by combined FB1 administration (Fig. 1B).

3.3 Unlike isolated MDD, isolated FB1 administration did not correlate with low folate concentrations in liver fetuses but both conditions resulted in reduced SAM/SAH ratio

In fetal liver tissues, MDD induced decreased folate ($p < 0.0001$) and vitamin B12 ($p = 0.0029$) concentrations in comparison to the control diet (Fig. 2). Combined MDD and FB1 administration also decreased folate ($p < 0.0001$) and vitamin B12 ($p = 0.0021$) significantly. FB1 by itself did not affect folate nor vitamin B12 levels but decreased SAM/SAH ratio ($p = 0.0046$) to the same extent as MDD ($p = 0.0031$) or combined MDD and FB1 ($p = 0.009$).

3.4 FB1 decreases FR transcripts

Methyl donor deficiency (MDD) up-regulated both *FR* and *Slc19a1* transcripts in animals fed control diet or exposed to FB1. FR was elevated in the MDD compared to the control group ($p = 0.0133$) and in the MDD/FB1 group compared to the FB1 group ($p = 0.0272$). *Slc19a1* was elevated in the MDD compared to the control group ($p = 0.0018$) and it was also elevated, but not significantly, in the MDD/FB1 group compared to the FB1 group ($p = 0.6044$) (Fig. 3).

However, it cannot be ruled out that combined exposure to methyl deficiency and FB1 reverses FR and *Slc19a1* transcripts up-regulation. This mechanism displays a more pronounced impact on FR than *Slc19a1* transcripts. The data show that FR transcripts have similar concentrations in the control group and the MDD/FB1 group. Moreover, FR transcripts are lower in the MDD/FB1 group compared to the isolated MDD group ($p = 0.0078$). *Slc19a1* transcripts variations exhibit a similar profile but with no statistical significance ($p = 0.0607$). Interestingly, isolated exposure to FB1 resulted in decreased FR mRNA ($p = 0.0157$) whereas *Slc19a1* mRNA was increased but not significantly ($p = 0.2795$). This result reinforces the hypothesis that one of the mechanisms by which FB1 alters folate transport might be the interference with sphingolipids metabolism.

3.5 Added stress generated by combining MDD and FB1 leads to loss of H4K20me3 accompanied by increased H3K9me3

The histone modifications were compared between the three treated groups and the control group (Fig. 4). MDD in-

duced significant decreased H4K20me3 ($p = 0.0297$) with no significant H3K9me3 alteration. Combined exposure to MDD/FB1 generated a bivalent mark associating significant decreased H4K20me3 ($p = 0.0083$) and increased H3K9me3 ($p = 0.0005$). Thus, amplifying the metabolic stress by adding FB1 to methyl donor depletion might trigger in the cell a defense mechanism that tries to resist heterochromatin disorganization.

H3R2me2 was low in the MDD group compared to the control group, but the difference between the two groups was not significant ($p = 0.1572$). However, combined MDD/FB1 exposure yielded significantly elevated H3R2me2 ($p = 0.0062$) in comparison to MDD only. H4K16Ac pattern was similar to H3R2me2 but the variations were not statistically significant. Isolated MDD resulted in decreased H4K16Ac in comparison to the control group. MDD/FB1 exposure slightly increased H4K16Ac in comparison to MDD only.

4 Discussion

As expected, the MDD used in this study induced in pregnant dams reduced plasma folate and vitamin B12 and increased homocysteine. This model of gestational methyl donor deficiency was established in our laboratory: as we have previously described in several publications, it is efficient in depleting methyl donors from the cells and slowing down enzymes involved in the methionine cycle [31, 32]. FB1 by itself did not increase homocysteine in pregnant dams; however, combined MDD/FB1 increased homocysteine to a much greater extent than isolated MDD. Moreover, FB1 aggravated the MDD-induced pericentrolobular steatosis in pregnant dams liver indicating that the association of both factors is more deleterious than each factor alone.

Isolated maternal MDD was associated with diminished fetal body weight and length and resulted in decreased vitamin B12 and folate levels and SAM/SAH ratio in fetuses liver. It is noteworthy that FB1 by itself produced a decreased SAM/SAH ratio in fetuses liver. That FB1 by itself did not alter folate and vitamin B12 levels can be attributed to the low dosage of FB1 administered ($4 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$). Low dosage was intentionally used because FB1 is present at low levels in maize throughout the world. Humans are chronically exposed to FB1 concentrations not largely exceeding the current recommended PMTDI set at $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$. Using high FB1 dose does not mimic the exposure likely to be achieved in humans. Using low FB1 dose offers the opportunity to characterize a threshold level beyond which cellular effects are observable.

A molecular mechanism of adaptation to folate deficiency [33] was triggered by activating *FR* and *Slc19a1* transcription in fetal liver. Overall, FR and *Slc19a1* transcription were increased by MDD regardless of FB1 treatment. However, FB1 exposure may introduce subtle changes in FRs transcription since combined MDD/FB1 might antagonize the adaptation to folate deficiency. Methyl depletion by itself significantly

increased FR and Slc19a1 in comparison to the control diet but these two receptors did not vary significantly between the MDD/FB1 and control groups. Furthermore, both FR and Slc19a1 transcripts were significantly diminished in the MDD/FB1 group compared to the isolated MDD group. This neutralizing effect was found to be stronger for FR transcripts consistent with a preferential interaction between FB1 and FR. Adding FB1 exposure to methyl deficiency might aggravate the maternal adverse environment and makes it harder for the fetus to adapt to the folate depletion.

Most importantly, FB1 reduced FR transcription in fetuses fed control diet but did not reduce Slc19a1 transcription. FR is a GPI-anchored protein associated with membrane domains enriched in sphingolipids [15]. Thus, this result lends support to previous reports showing that FB1 is involved in disruption of sphingolipid metabolism [12, 13]. Two restraints should be pointed out. First, only FR transcripts were measured but it is not known if the proteins were preserved or not. Second, FR is associated with membrane domains enriched with sphingolipids but also cholesterol and plasminogens. Therefore, possible interactions between FB1 and these complex structures should also be considered.

Of all histone modifications investigated, isolated MDD induced a significant decrease in H4K20me3 only. H4K20me3, together with H3K9me3, heterochromatin protein 1 (HP1) and DNA methylation, is an essential feature of constitutive heterochromatin. H4K20me3 is a conserved mark of constitutive heterochromatin that contributes to the maintenance of genome stability [34, 35]. Loss of H4K20me3 induced by MDD may contribute to weaken heterochromatin organization and interfere with the appropriate expression of genes thus leading to impaired cell function. One of the molecular mechanisms explaining the DNA instability observed in rodents exposed to MDD [36] may be the low levels of H4K20me3.

The HP1 family of proteins is a major constituent of heterochromatin. HP1 α and HP1 β bind to H3K9me3 to establish condensed transcriptionally inactive chromatin [37, 38]. It was reported that H4K20me3 occurs only after HP1 binds to H3K9me3 [27, 39]. We show in this work that when pregnant dams are exposed to MDD and FB1, fetuses display significant decrease in H4K20me3 and significant increase in H3K9me3. It looks like the elevated H3K9me3 is a part of a rescue attempt to restore H4K20me3 to normal levels. FB1, even at moderately elevated concentrations, adds up metabolic stress on the cell that tries then to escape these dire straits and attempts to preserve its functions by developing a defense mechanism that resists heterochromatin disorganization. This reciprocal interaction between H4K20me3 and H3K9me3 has been described before for adult rat males exposed to MDD but for a sustained period of 54 weeks at the end of which liver tumors develop [21]. In the maternal diet deprivation described here, dams are exposed to methyl donor depletion for a relatively short period, 1 month before mating then during gestation until fetuses are 20 days old. The diet-induced metabolic stress during this period may not

be sufficient enough to drive the fetuses to a defense reaction; however, addition of FB1 strengthens the threat and moves the cell faster toward the defense threshold.

Heterochromatin assembly depends on a large number of proteins that implement several distinctive marks other than H4K20me3 and H3K9me3. H3R2me2 was found to be enriched through heterochromatic loci and inactive euchromatic genes [28]. Isolated MDD yielded diminished H3R2me2 where as combined MDD/FB1 exposure yielded elevated H3R2me2. The difference between these two exposures was statistically significant. This result is in agreement with the defense threshold mechanism. The added metabolic stress represented by exposure to both MDD and FB1 constitutes a “second hit” that drives the cell to increase H3R2me2 in order to resist heterochromatin disorganization.

An additional histone residue, H4K16, may be viewed as a docking site that recruits the complex Sir2-Sir3-Sir4 necessary to establish heterochromatin (Sir: Silent information regulator) [29]. Indeed, acetylated chromatin allows Sir2/Sir4 binding. Sir2 is a NAD-dependent histone deacetylase that specifically deacetylates H4K16. Sir3 binds to deacetylated H4K16 and turns chromatin off. The pattern of H4K16Ac was similar to H3R2me2 but the variations did not reach statistical significance. Levels of H4K16Ac were lower in the methyl deficient versus control group but were higher in the methyl-deficient group/fumonisin-exposed group versus methyl deficient only group.

The fact that environmental factors do not affect in the same way histone modifications marking heterochromatin is not surprising. Microarray analysis of global gene expression in human nasopharyngeal carcinoma KB cells grown in folate deplete and folate replete medium revealed that expression of only eight genes responded to variation of folate levels [40]. Among those genes, some were up-regulated and some were down-regulated, some were hypermethylated and some were hypomethylated. Thus, methyl deficiency is gene specific and does not alter epigenetic modifications uniformly. It is likely that this is the case for other environmental factors such as FB1.

Animal models and epidemiological studies show that maternal FB1 exposure increases the risk of NTDs that could be prevented by maintaining adequate folate levels [8, 13]. The interactions between FB1 and folate are complex and not fully elucidated and the role of FB1 and folate in NTD etiology still needs clarifications. NTDs are multifactorial in origin and involve complex gene–environment interactions. The beneficial effect of folate in NTDs may be ascribed to improved DNA methylation [41]. Another epigenetic mechanism may be at stake since emerging evidence show that histone modifications participate in the etiology of NTDs [41]. In *Splotch* mutant embryos (*Pax3*) which develop NTDs, H3K27me is increased [42]. Cranial NTDs are observed among knock-out embryos for p300 [43] and CITED [44] and knock-in embryos for Gcn5 [45, 46]. All three enzymes have acetyltransferase activities. Conversely, several histone deacetylases (*Hdac*) control the progression from neural precursors to neurons [47].

Particularly, NTDs were found to occur in a subset of *Hdac4* and *Sirt1* mutants [48, 49]. *Sirt1* is the mammalian homolog of *Sir2* that deacetylates H4K16. Moreover, Hdac inhibitors, such as valproic acid and trichostatin A, display teratogenic effect and can induce NTDs as well as axial skeletal defects [50, 51]. Accumulating evidence also underpin the global changes in histone modification patterns in many cancers [18]. Notably aberrant epigenetic alterations imposed by nutritional factors appear to be an essential mechanism leading to hepatocarcinogenesis in rodents [21].

The main interest of this study is to report that FB1, at low doses likely to contaminate food, can alter histone modifications. A common pathway through which folate and FB1 are involved in NTDs could be epigenetic regulation. One limitation of this study is the small number of animals analyzed. Additional investigations are needed to confirm on a larger scale that methyl deficiency and FB1 interact to cause a disruption of the epigenetic landscape potentially contributing to the onset of developmental disease or tumor proliferation.

Financial support was provided by INSERM U954.

The authors declare no conflict of interest

5 References

- [1] Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., Vismer, H. F., Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, *68*, 2101–2105.
- [2] Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G. et al., Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microsc.* 1988, *54*, 1806–1811.
- [3] Gelderblom, W.C.A., Kriek, N.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis* 1991, *12*, 1247–1251.
- [4] Howard, P. C., Eppley, R. M., Stack, M. E., Warbritton, A. et al., Fumonisin b1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ. Health Perspect.* 2001, *109*(Suppl 2), 277–282.
- [5] Marasas, W. F. O., Discovery and occurrence of the Fumonisin: a historical perspective. *Environ. Health Perspect.* 2001, *109*, 239–243.
- [6] Chu, F. S., Li, G. Y., Simultaneous occurrence of Fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, *60*, 847–852.
- [7] Kimanya, M. E., De Meulenaer, B., Roberfroid, D., Lachat, C. et al., Fumonisin exposure through maize in complementary foods is inversely associated with linear growth of infants in Tanzania. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, *54*, 1–9.
- [8] Missmer, S. A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E. et al., Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environ. Health Perspect.* 2006, *114*, 237–241.
- [9] Gelineau-van Waes, J., Voss, K. A., Stevens, V. L., Speer, M. C. et al., Maternal fumonisin exposure as a risk factor for neural tube defects. *Adv. Food Nutr. Res.* 2009, *56*, 145–181.
- [10] Marasas, W. F., Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L. et al., Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J. Nutr.* 2004, *134*, 711–716.
- [11] Abdel Nour, A. M., Ringot, D., Guéant, J. L., Chango, A., Folate receptor and human reduced folate carrier expression in HepG2 cell line exposed to fumonisin B1 and folate deficiency. *Carcinogenesis* 2007, *28*, 2291–2297.
- [12] Voss, K. A., Riley, R. T., Snook, M. E., Gelineau-van Waes, J., Reproductive and sphingolipid metabolic effects of fumonisin B₁ and its alkaline hydrolysis product in LM/Bc mice: hydrolyzed fumonisin B₁ did not cause neural tube defects. *Toxicol. Sci.* 2009, *112*, 459–467.
- [13] Gelineau-van Waes, J., Starr, L., Maddox, J., Aleman, F. et al., Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: mechanisms in an *in vivo* mouse model. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2005, *73*, 487–497.
- [14] Matherly, L. H., Membrane transport of folates. *Vitam. Horm.* 2003, *66*, 403–456.
- [15] Stevens, V. L., Tang, J., Fumonisin B₁-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. *J. Biol. Chem.* 1997, *272*, 18020–18025.
- [16] Sadler, T. W., Merrill, A. H., Stevens, V. L., Sullards, M. C. et al., Prevention of fumonisin B1-induced neural tube defects by folic acid. *Teratology* 2002, *66*, 169–176.
- [17] Lo Magro, S., Campaniello, M., Nardiello, D., Muscarella, M., Assessment of Fumonisin B1 and B2 levels in commercial maize-based food products by liquid chromatography with fluorimetric detection and postcolumn chemical derivatization. *J. Food Sci.* 2011, *76*, T1–T4.
- [18] Hirst, M., Marra, M. A., Epigenetics and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009, *41*, 136–146.
- [19] Smith, D. A., Kim, Y. I., Refsum, H., Is folic acid good for everyone? *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, *87*, 517–533.
- [20] Daxinger, L., Whitelaw, E., Transgenerational epigenetic inheritance: more questions than answers. *Genome Res.* 2010, *20*, 1623–1628.
- [21] Pogribny, I. P., Ross, S. A., Tryndyak, V. P., Pogribna, M. et al., Histone H3 lysine 9 and H4 lysine 20 trimethylation and the expression of Suv-20h2 and Suv-39h1 histone methyltransferases in hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats. *Carcinogenesis* 2006, *27*, 1180–1186.
- [22] Katayama, M., Matsuda, Y., Shimokawa, K., Tanabe, S. et al., Simultaneous determination of six adenyl purines in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence derivatization. *J. Chrom. B. Biomed. Sci. Appl.* 2001, *760*, 159–163.
- [23] Delabar, U., Kloor, D., Luippold, G., Muhlbauer, B., Simultaneous determination of adenosine, S-

- adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in biological samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. B. Biomed. Sci. Appl.* 1999, 724, 231–238.
- [24] Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Natta, M. V., Behling, C. et al., Design and validation of a histological scoring system for non alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005, 41, 1313–1321.
- [25] Livak, K. J., Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods* 2001, 25, 402–408.
- [26] Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D., Hake, S. B., Extraction, purification and analysis of histones. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 1445–1457.
- [27] Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A. et al., A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Gene. Dev.* 2004, 18, 1251–1262.
- [28] Kirmizis, A., Santos-Rosa, H., Penkett, C. J., Singer, M. A. et al., Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* 2007, 449, 928–932.
- [29] Johnson, A., Li, G., Sikorski, T. W., Buratowski, S. et al., Reconstitution of heterochromatin-dependent transcriptional gene silencing. *Mol. Cell.* 2009, 35, 769–781.
- [30] McMullen, S., and Langley-Evans, S. C., Maternal low-protein diet in rat pregnancy programs blood pressure through sex-specific mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004, 288, R85–R90.
- [31] Blaise, S., Alberto, J. M., Nédélec, E., Ayav, A. et al., Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatric Res.* 2005, 57, 777–782.
- [32] Blaise, S., Nédélec, E., Schroeder, H., Alberto, J. M. et al., Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am. J. Pathol.* 2007, 170, 667–679.
- [33] Ifergan, I., Assaraf, Y. G., Molecular mechanisms of adaptation to folate deficiency. *Vitam. Horm.* 2008, 79, 99–143.
- [34] Grewal, S. I., Jia, S., Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* 2007, 8(1), 35–46.
- [35] Yang, H., Mizzen, C. A., The multiple facets of histone H4-lysine 20 methylation. *Biochem. Cell Biol.* 2009, 87, 151–161.
- [36] Liu, J. J., Ward, R. L., Folate and one-carbon metabolism and its impact on aberrant DNA methylation in cancer. *Adv. Genet.* 2010, 71, 79–121.
- [37] Zeng, W., Ball, A. R., Jr., Yokomori, K., HP1: heterochromatin binding proteins working the genome. *Epigenetics* 2010, 5, 287–292.
- [38] Black, J. C., Whetstine, J. R., Chromatin landscape: methylation beyond transcription. *Epigenetics* 2011, 6, 9–15.
- [39] Kourmouli, N., Jeppesen, P., Mahadevaiah, S., Burgoyne, P. et al., Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J. Cell Sci.* 2004, 117, 2491–2501.
- [40] Jhaveri, M. S., Wagner, C., Trepel, J. B., Impact of extracellular folate levels on global gene expression. *Mol. Pharmacol.* 2001, 60, 1288–1295.
- [41] Green, N. D. E., Stanier, P. Moore, G., The emerging role of epigenetic mechanisms in the etiology of neural tube defects. *Epigenetics* 2011, 6, 875–883.
- [42] Ichi, S., Costa, F. F., Bischof, J. M., Nakasaki, H. et al., Folic acid remodels chromatin on Hes1 and Neurog2 promoters during caudal neural tube development. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 36922–36932.
- [43] Yao, T. P., Oh, S. P., Fuchs, M., Zhou, N. D. et al., Gene dosage dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional intergrator p300. *Cell* 1998, 93, 361–372.
- [44] Yin, Z., Haynie, J., Yang, X., Han, B. et al., The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1alpha, in heart development and neurulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 10488–10493.
- [45] Bu, P., Evrard, Y. A., Lozano, G., Dent, S. Y., Loss of GCN5 acetyltransferase activity leads to neural tube closure defects and exencephaly in mouse embryos. *Mol. Cell. Biol.* 2007, 27, 3405–34016.
- [46] Lin, W., Zhang, Z., Srajer, G., Chen, Y.C., Proper expression of the Gcn5 histone acetyltransferase is required for neural tube closure in mouse embryos. *Dev. Dyn.* 2008, 237, 928–940.
- [47] Montgomery, R. L., Hsieh, J., Barbosa, A. C., Richardson, J. A. et al., Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 7876–7881.
- [48] Vega, R. B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A. C. et al., Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 2004, 119, 555–566.
- [49] Cheng, H. L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J. P. et al., Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 10794–10799.
- [50] Finnell, R. H., Gelineau-van Waes, J., Eudy, J. D., Rosenquist, T. H., Molecular basis of environmentally induced birth defects. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002, 42, 181–208.
- [51] Menegola, E., Di Renzo, F., Broccia, M. L., Prudenziati, M., et al., Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2005, 74, 392–398.

Treizièmes Journées nationales de la FFER (Paris, 17–19 septembre 2008)

Les folates : quel impact sur la fertilité ?

Do folates have an impact on fertility?

T. Forges^{a,b,*}, H. Pellanda^a, C. Diligent^{a,b}, P. Monnier^c, J.-L. Guéant^a

^a *Inserm U724 « Pathologie cellulaire et moléculaire en nutrition », faculté de médecine de Nancy, 9, avenue de la Forêt-de-Haye, 54505 Vandœuvre-les-Nancy cedex, France*

^b *Unité biologique d'assistance médicale à la procréation (AMP), maternité régionale universitaire, 10, rue du Dr-Heydenreich, 54042 Nancy cedex, France*

^c *Unité de recherche clinique et évaluative en périnatalité, service d'endocrinologie de la reproduction, CHU Sainte-Justine, 3175, Côte-Sainte-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada*

Reçu le 26 juin 2008 ; accepté le 6 juillet 2008

Disponible sur Internet le 12 août 2008

Résumé

Les folates font partie des vitamines du groupe B et interviennent dans le métabolisme des monocarbones, principalement dans les synthèses des purines et pyrimidines, et donc de l'ADN, ainsi que dans la reméthylation de l'homocystéine en méthionine qui, conjuguée à l'adénosine, forme la S-adenosylméthionine, le donneur universel dans les transméthylations. Par ce biais, les folates jouent un rôle essentiel dans les régulations épigénétiques de l'expression des gènes. Un déficit en folates, par carence d'apport ou en rapport avec des polymorphismes nucléotidiques se traduit par une diminution de la synthèse et de la réparation de l'ADN, par une hypométhylation de l'ADN et d'autres molécules, ainsi que par une accumulation d'homocystéine. Cette situation a été associée à de nombreuses pathologies, cardiovasculaires, neurodégénératives et obstétricales. En revanche, l'impact de ce métabolisme sur les premières étapes de la reproduction, depuis la gamétogenèse jusqu'au développement embryonnaire précoce a été nettement moins exploré jusqu'à maintenant. La présente revue fait le point sur cette partie du métabolisme des folates, en rapport avec la fertilité de l'homme et de la femme.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Folates are group B vitamins involved in the one-carbon metabolism. They are required for purine and pyrimidine, and thus DNA synthesis, as well as for the remethylation of homocysteine into methionine which is further metabolized into S-adenosylmethionine, the universal methyl donor for transmethylation of DNA. By this way, folates play a key role in epigenetic regulation of gene expression. Folate deficiency, either by insufficient nutritional uptake or linked to some single nucleotide polymorphism, will lead to an impaired DNA synthesis and repair, a hypomethylation of DNA and other molecules, and homocysteine accumulation. This situation has been associated with several pathologies, such as cardiovascular and neurodegenerative diseases, and pregnancy complications. However, much less is known until now about the impact of one-carbon metabolism on initial events of human reproduction, from gametogenesis to early embryonic development. The present review will deal with these aspects of folate metabolism with respect to male and female fertility.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Folates ; Homocystéine ; MTHFR ; Polymorphisme ; Fertilité ; Assistance médicale à la procréation (AMP) ; Fécondation in vitro (FIV) ; Reproduction ; Grossesse

Keywords: Folate; Homocysteine; MTHFR; Polymorphism; Fertility; Assisted reproductive techniques (ART); In vitro fertilization (IVF); Reproduction; Pregnancy

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : t.forges@maternite.chu-nancy.fr (T. Forges).

1. Introduction

Au cours des dix dernières années, le métabolisme des folates et l'hyperhomocystéinémie qui résulte de leur déficit ont été incriminés dans un nombre croissant de pathologies, en particulier cardiovasculaires et neurodégénératives [1], mais aussi dans certaines malformations et complications de la grossesse, telles que la prééclampsie, l'hématome rétroplacentaire, le retard de croissance intra-utérin (RCIU) et la mort fœtale in utero (MFIU) [2–4].

Alors que de nombreux travaux scientifiques ont été consacrés à l'étude de ces pathologies et à leurs relations avec le métabolisme des folates, les rôles potentiels de ces derniers dans les événements plus précoces de la reproduction, comme la gamétogenèse, la fécondation, le développement de l'embryon pré-implantatoire et les différentes anomalies correspondantes, n'ont pas bénéficié, jusqu'à présent, de la même attention.

Cet article passe en revue les données actuelles concernant l'impact des folates sur ces événements, en insistant particulièrement sur l'infertilité et les anomalies du développement précoce, à l'exclusion de la pathologie malformative pour laquelle le lecteur est renvoyé vers d'autres revues récentes [5–8].

2. Quelques notions de biochimie

Les folates font partie des vitamines du groupe B et se distinguent par leur degré d'oxydation, le nombre de résidus glutamate et le type de maillon monocarboné qu'ils transportent. Ils sont obligatoirement apportés par l'alimentation, sous forme de polyglutamates que l'on retrouve entre autres dans les légumes à feuilles, certains fruits, la levure, les laitages, le foie. Les formes biologiquement actives se trouvent à l'état réduit, ce sont les tétrahydrofolates (THF), qui portent un groupement méthyl, méthylène, méthényle ou formyl. Les suppléments pharmacologiques se présentent le plus souvent sous forme d'acide folique, un monoglutamate à l'état oxydé qui possède une plus grande stabilité biochimique.

Les folates interviennent principalement dans deux processus biochimiques essentiels à la survie et à la multiplication cellulaires : d'une part, les synthèses d'acides nucléiques et par conséquent d'ADN et, d'autre part, la reméthylation de l'homocystéine en méthionine (Fig. 1).

2.1. Synthèses d'acides nucléiques

C'est le 5,10-méthylèneTHF qui constitue le donneur de monocarbonés nécessaire à ces synthèses. Il intervient soit directement, comme cofacteur de la thymidylate synthétase qui transforme le dUMP en dTMP, soit après transformation en méthényle puis en formylTHF, sous l'action d'un complexe enzymatique qui participe à la synthèse des purines. Dans les deux cas, le THF est recyclé pour reformer du 5,10-méthylèneTHF par transfert d'un élément monocarboné provenant de la transformation de la sérine en glycine.

2.2. Reméthylation de l'homocystéine

L'homocystéine est un acide aminé soufré qui n'intervient pas dans les synthèses protéiques. Sa reméthylation en méthionine nécessite la présence de 5-méthylTHF provenant de la réduction du 5,10-méthylèneTHF par une des enzymes-clés de ce métabolisme, la 5,10-méthylèneTHF réductase (MTHFR). Le méthylTHF interagit avec un complexe enzymatique, la méthionine synthétase (MTR) dont le cofacteur, la cobalamine (vitamine B12) prend en charge transitoirement le groupement méthyl avant qu'il ne soit transféré sur l'homocystéine pour former de la méthionine. Le THF est ensuite recyclé comme décrit précédemment. Une seconde enzyme, la MTR réductase (MTRR) est nécessaire pour maintenir la MTR dans un état fonctionnel. Alternativement, le groupement méthyl peut être fourni également par la bêtaïne grâce à la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT). Contrairement à la première réaction, qui a lieu de façon ubiquitaire, l'activité de la BHMT semble être limitée aux tissus hépatique et rénal [9]. Une fois produite, la méthionine entre alors dans les synthèses protéiques ou bien elle est couplée à l'adénosine fournie par l'adénosine triphosphate (ATP) pour former la S-adénylméthionine (SAM). Ce composé est le principal donneur de groupements méthyl dans un très grand nombre de réactions de transméthylation concernant aussi bien les protéines et lipides que l'ADN. De ce fait, la SAM joue un rôle central dans les phénomènes de régulation épigénétique de l'expression des gènes. Après la cession du groupement méthyl, la SAM est transformée en S-adénylhomocystéine (SAH), elle-même en équilibre réactionnel avec l'homocystéine sous l'action de la SAH-hydrolase. L'ensemble de ces réactions constitue le cycle de l'homocystéine [10].

Ainsi, ce cycle est intimement lié au cycle des folates dans lequel la MTHFR occupe une position stratégique puisque de son activité dépendra l'utilisation préférentielle des folates, soit pour la synthèse des acides nucléiques, soit pour la reméthylation de l'homocystéine. Cette enzyme a fait l'objet de nombreux travaux et il est actuellement démontré qu'elle fonctionne sous forme d'un homodimère dont chacun des monomères possède une extrémité catalytique qui interagit avec le flavine-adénine dinucléotide (FAD), son cofacteur, et une sous-unité régulatrice qui interagit avec la SAM, principal facteur de régulation inhibant l'activité de l'enzyme [11]. Le gène codant pour la MTHFR présente des polymorphismes nucléotidiques parmi lesquels le polymorphisme C677T est d'une importance clinique particulière. En effet, le variant code pour une enzyme qui présente une activité diminuée de 70 % chez les homozygotes et de 35 % chez les hétérozygotes, en raison d'une tendance à la dissociation du dimère et d'une perte d'affinité pour le FAD [12–14]. Dès lors, le recyclage de l'homocystéine est insuffisant et sa concentration plasmatique augmente, ce qui constitue un facteur de risque pour certaines pathologies, notamment cardiovasculaires et obstétricales [1,15]. Des situations similaires peuvent être dues à un déficit d'apport en folates ou en vitamine B12. Inversement, un apport important de folates permet de compenser la perte d'affinité du variant de la MTHFR pour le FAD et ainsi de masquer les effets

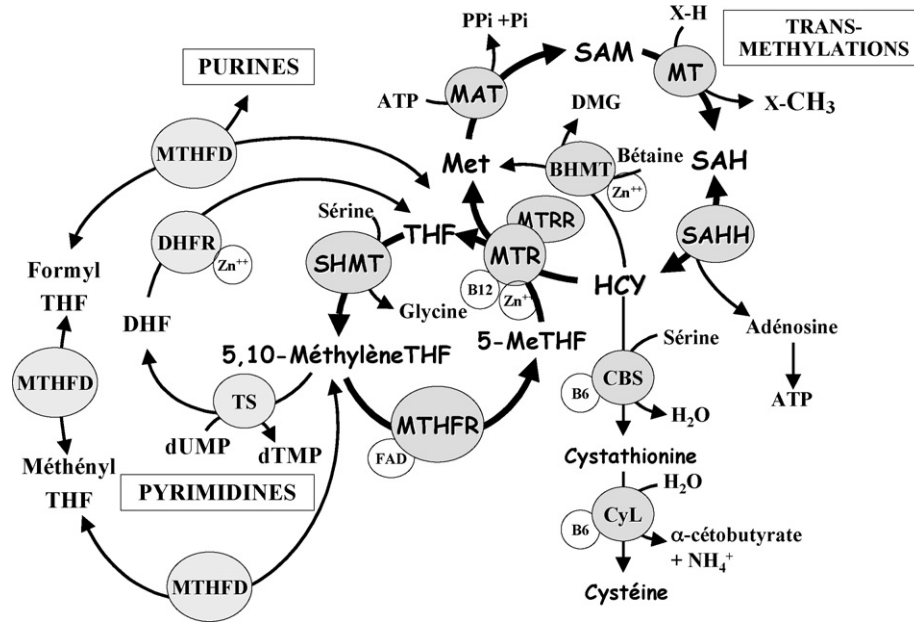


Fig. 1. Métabolisme des folates.

Le cycle des folates permet de réutiliser des folates et de les recharger en éléments mono-carbonés. Il alimente d'un côté les synthèses de purines et pyrimidines, et donc celle des acides nucléiques, de l'autre côté le cycle de l'homocystéine, permettant la reméthylation de celle-ci en méthionine, source directe de S-adenosylméthionine, le donneur universel de groupements méthyle dans les réactions de transméthylation.

Abréviations : THF : tétrahydrofolate ; MTR : méthionine synthétase ; Met : méthionine ; HCY : homocystéine ; MTHFR : méthylène-tétrahydrofolate réductase ; MAT : méthionine adényltransférase ; MT : méthyltransférases ; X : substrat à méthyler ; SAHH : S-adenosylhomocystéine hydrolysé ; dUMP : désoxyuridine 5'-monophosphate ; dTMP : désoxythymidine 5'-monophosphate ; TS : thymidylate synthase ; DHFR : dihydrofolate réductase ; MTHFD : 5,10-méthylène-tétrahydrofolate déshydrogénase ; CBS : cystathionine-bêta-synthétase ; CyL : cystathionine lyase.

de ce polymorphisme ; autrement dit, l'expression clinique de ce dernier sera maximale chez les sujets carencés en folates. De même, la prévalence de ce polymorphisme qui est globalement de 10 % de sujets homozygotes TT dans une population caucasienne varie en fonction du statut en folates : ainsi, notre équipe a décrit une prévalence maximale chez les italiens et les mexicains qui ont des apports élevés en folates, alors que cette prévalence est très faible en Afrique de l'Ouest où les apports sont les plus réduits [16]. Il convient de se rappeler ces interactions gène-environnement ou gène-nutrition en interprétant les résultats parfois contradictoires de certaines études dont il sera question par la suite.

D'autres polymorphismes ont été décrits au niveau des gènes *Mthfr* (A1298C), *MTR* (A2756G) et *MTRR* (A66G) et dont la signification reste moins bien documentée [17,18].

Parallèlement à sa reméthylation, l'homocystéine peut également être éliminée par transsulfuration grâce à la cystathionine-bêta-synthétase (CBS) qui la transforme en cystathionine. Celle-ci est ensuite métabolisée en cystéine par la cystathionine-lyase. Ces deux dernières enzymes ont pour cofacteur la vitamine B6. Par analogie avec la voie de la reméthylation, un déficit enzymatique sur cette voie, un polymorphisme du gène de la CBS ou un déficit en vitamine B6 peuvent entraîner une hyperhomocystéinémie et les pathologies qui en découlent.

Les mécanismes biochimiques selon lesquels une carence (réelle ou relative) en folates et l'hyperhomocystéinémie qui en résulte pourraient altérer la fertilité ne sont pas connus avec

certitude. Toutefois, un grand nombre de travaux a été consacré à cette question dans d'autres modèles cellulaires, en particulier dans les cellules endothéliales [19,20], ce qui permet de formuler un certain nombre d'hypothèses.

Tout d'abord, une inhibition de la synthèse des acides nucléiques est susceptible d'avoir des effets délétères sur des cellules à fort potentiel mitotique, telles que les spermatogonies pendant toute la vie adulte, les ovogonies pendant la vie intra-utérine ou encore les cellules de la granulosa au cours de la folliculogénèse. Ensuite, un ensemble de mécanismes comprenant la synthèse accrue de cytokines inflammatoires, la disponibilité réduite de l'oxyde nitrique, la génération excessive de radicaux libres, un stress du réticulum endoplasmique et l'activation de l'apoptose ont été mis en évidence dans les modèles vasculaires dans un contexte de carence en folates. Ces mêmes mécanismes existent également dans les gonades humaines, mais des relations causales avec le métabolisme des folates n'ont pas encore été démontrées jusqu'à présent.

Parmi ces mécanismes, l'hypométhylation de l'ADN résultant d'un déficit en SAM, lui-même secondaire au défaut de reméthylation de l'homocystéine en méthionine, a été étudiée plus particulièrement. Ainsi, l'utilisation de 5-azacytidine, un agent hypométhylant, entraîne chez la souris et le rat soit une atrophie des tubes séminifères avec azoospermie, soit une réduction importante de la spermatogénèse, du pouvoir fécondant et du développement embryonnaire précoce [21–23]. En plus de cibler la production de gamètes, les

réactions de méthylation interviennent probablement dans le contrôle de la stéroïdogenèse, comme le suggèrent l'effet stimulant de la SAM sur la synthèse de testostérone dans les cellules de Leydig du rat [24], ainsi que la régulation épigénétique de l'expression de l'aromatase dans les cellules de la granulosa bovines [25].

3. Données expérimentales

Chez l'animal, l'étude des relations entre le métabolisme des folates et la fertilité s'est essentiellement fondée sur l'administration de régimes carencés et sur l'inactivation de certains gènes codant pour des enzymes telles que la MTHFR ou la CBS.

Ainsi, il a été montré que chez le rat, une carence en folates était responsable d'une inhibition de l'ovulation et d'une diminution de la spermatogenèse [26], tandis que des femelles de hamster exposées à un régime sans folates pendant 16 semaines avant l'accouplement étaient toutes devenues stériles [27]. De même, l'usage d'inhibiteurs de la DHFR qui interrompent le recyclage des folates (Fig. 1), entraînait une diminution de la numération et de la mobilité des spermatozoïdes chez le rat et la souris [28–30]. Dans un modèle de rat carencé à la fois en vitamines B2, B9, B12 et choline pendant un mois avant l'accouplement, nous avons montré récemment le maintien d'une fertilité chez les femelles, mais les rats exposés à ce régime in utero et durant l'allaitement présentaient un retard de croissance important et une mortalité périnatale de 25 % [31]. L'analyse histologique de leurs gonades est actuellement en cours. Dans un modèle de primate, un régime carencé en folate entraînait des perturbations du cycle et de la stéroïdogenèse, ainsi qu'une atrésie folliculaire accrue [32].

L'inactivation du gène *Mthfr* entraîne chez les souris mâles une hyperhomocystéinémie importante et une infertilité avec des troubles de la spermatogenèse, tels qu'une absence de cellules germinales ou un blocage de la maturation [33]. Ces anomalies ont pu être prévenues en partie par l'administration de bétaïne, ce qui pose la question d'une éventuelle expression de cette voie alternative (BHMT) dans le testicule. Quant à la fertilité des femelles, aucune donnée n'a été publiée à ce jour.

Le gène *Cbs* a également été inactivé chez la souris et les mâles homozygotes se sont avérés normalement fertiles. En revanche, les femelles homozygotes présentent différentes anomalies telles qu'une perturbation de l'œstrus, une moindre réponse ovarienne à la stimulation, des espaces périvitellins élargis et, surtout, une poids fœtal et placentaire réduits et une très faible survie des souriceaux [34]. Ces anomalies sont totalement corrigées lorsque des ovaires de femelles homozygotes sont transplantés dans des souris de phénotype sauvage, ce qui suggère que c'est plutôt l'utérus qui est en cause dans ces anomalies, mais le mécanisme demeure inconnu.

4. Folates et fertilité masculine

La concentration des folates dans le plasma séminal est corrélée avec celle du plasma sanguin tout en étant environ une fois et demie supérieure [35,36]. Des protéines de transport des folates analogues à celles du lait maternel (*folate-binding protein*

[FBP]) ont été mises en évidence dans le liquide séminal. Ces protéines semblent être sécrétées uniquement par l'épithélium épидидymaire et déférentiel [37] et se retrouvent en partie dans des vésicules de type prostasome qui adhèrent aux spermatozoïdes une fois que ceux-ci ont traversé le canalicule épидидymaire [38]. Les raisons de cette localisation particulière ne sont pas connues, mais il n'est pas exclu qu'il s'agisse d'un système d'internalisation des folates dans les spermatozoïdes au cours de leur maturation dans les voies séminales, éventuellement avec le concours de la mégaline, une protéine de transport multi-ligands de très grande taille [39]. Ces observations, ainsi que les données chez l'animal précédemment décrites sont en faveur d'un rôle du métabolisme des folates dans la fertilité de l'homme. Dans ce contexte, plusieurs études ont cherché à mettre en évidence un effet d'une supplémentation en folates sur la production et la qualité des gamètes mâles, tandis que d'autres ont évalué le rôle des polymorphismes génétiques précités dans l'infertilité masculine.

Ainsi, un premier travail avait conclu à un effet bénéfique d'une supplémentation journalière de 15 mg d'acide folinique (5-formylTHF) pendant trois mois sur la numération et la mobilité chez 65 hommes infertiles [40]. Dans cette même étude, 24 couples avaient obtenu une grossesse dans les six mois qui suivaient ce traitement. Dans une étude contrôlée, randomisée contre placebo, conduite auprès d'une centaine d'hommes avec une oligospermie modérée, seule l'association de folates et de zinc permettait d'obtenir une amélioration significative de 79 % de la numération, alors que les folates seuls n'amélioreraient ce paramètre que de 40 % sans atteindre le seuil de significativité [41]. Plus récemment, cette équipe a confirmé le bénéfice d'un tel traitement combiné, mais l'amélioration de la numération n'était plus que de 18 %, sans modifications des paramètres endocriniens (testostérone, inhibine B et FSH) [42].

La recherche de corrélations entre l'infertilité masculine et les polymorphismes du gène *MTHFR* a donné des résultats parfois contradictoires. Ainsi deux études réalisées respectivement en Inde et en Corée du Sud ont mis en évidence une prévalence significativement augmentée du génotype 677TT parmi les sujets infertiles par rapport aux témoins fertiles [43,44]. Dans autre étude coréenne, il existait en plus des corrélations avec les génotypes *MTR* 2756GG et *MTRR* 66GG [45]. En revanche, les études européennes n'ont pas permis des conclusions univoques, montrant tantôt des corrélations significatives [46,47], tantôt l'absence de corrélations avec le génotype *MTHFR* 677TT [48,49]. Les raisons de ces disparités sont probablement liées à l'hétérogénéité des populations étudiées et de leur statut nutritionnel, ainsi qu'à l'interférence avec d'autres polymorphismes qui amplifient ou au contraire masquent les effets du polymorphisme *MTHFR* 677.

5. Folates et syndrome des ovaires micropolykystiques (SOMP)

Le SOMP est une pathologie endocrinienne complexe et fréquente, définie depuis 2003 selon les critères de

Rotterdam par l'association d'au moins deux des anomalies suivantes :

- anovulation chronique ;
- hyperandrogénie clinique ou biologique ;
- aspect polykystique des ovaires à l'échographie.

Par rapport aux critères de diagnostic antérieurs qui associaient simplement anovulation et hyperandrogénie (critères du National Institute of Health [NIH] en 1990), cette nouvelle définition élargit le diagnostic de SOMPK à d'autres catégories de patientes ce dont il faut tenir compte dans l'interprétation des études réalisées [50,51].

À l'exception de deux études, incluant, l'une, des patientes sur le seul critère échographique d'ovaires polykystiques [52], et l'autre, des patientes italiennes avec une très forte prévalence de l'allèle *MTHFR* 677T [53], de nombreux travaux ont conclu à la présence de taux circulants élevés d'homocystéine chez les patientes atteintes de SOMPK, qu'elles aient ou non une surcharge pondérale [54]. Ni le polymorphisme *MTHFR* C677T, ni le *MTR* A2756G ne semblent corrélés avec la prévalence du SOMPK [55–57]. Ainsi le mécanisme conduisant à l'excès d'homocystéine plasmatique reste controversé entre les partisans d'un impact de l'insulinorésistance et de l'hyperandrogénie [58–62] et ceux qui n'ont trouvé aucune relation entre ces paramètres [54,63,64]. Dans ce contexte, il a été montré, de façon inattendue, que l'administration d'agents insulino-sensibilisants, comme la metformine, proposés dans le SOMPK dans le but d'améliorer entre autres la réponse ovarienne à la stimulation [65], entraîne une élévation supplémentaire de l'homocystéinémie, malgré la réduction de l'insulinorésistance [66,67]. Cet effet pourrait s'expliquer par un déficit en folates induit par la metformine [68] et en effet, il peut être compensé par une supplémentation adéquate en folates [69]. Une telle supplémentation pourrait également prévenir l'élévation de l'homocystéinémie qu'entraîne habituellement la perte de poids, première mesure thérapeutique à mettre en œuvre chez ces patientes [70–72].

6. Folates et assistance médicale à la procréation (AMP)

Les connaissances sur l'impact des folates et de l'homocystéine en AMP et plus particulièrement en fécondation in vitro (FIV) s'appuient, d'une part, sur des dosages effectués dans le liquide folliculaire, un liquide biologique facilement disponible au moment de la ponction folliculaire et, d'autre part, sur l'analyse des polymorphismes, notamment ceux du gène *MTHFR*.

6.1. Étude du liquide folliculaire

Ce liquide dont la composition résulte à la fois de phénomènes de diffusion depuis le plasma sanguin et de sécrétions spécifiques par les cellules de la granulosa, est aspiré chez des patientes candidates à une FIV pour recueillir l'ovocyte. Une première étude de ce liquide remonte au début des années 1990, lorsqu'il a été montré que les concentrations en folates et homocystéine y

étaient similaires à celles du sérum [73]. Plus récemment, un groupe polonais a décrit des concentrations en homocystéine plus basses dans le liquide folliculaire de patientes prenant une supplémentation en acide folique par rapport aux patientes sans supplémentation [74]. Par ailleurs, le taux d'homocystéine folliculaire était inversement corrélé avec le degré de maturité ovocytaire. Sur une très petite série de patientes, d'autres auteurs n'ont pas pu mettre en évidence de relation entre l'homocystéine folliculaire et le succès de la FIV [75]. Dans une étude plus conséquente, portant sur plus de 150 patientes, l'homocystéine folliculaire était corrélée négativement à la qualité morphologique des embryons au troisième jour du développement [76]. Ainsi, une diminution de l'homocystéine de l'ordre de 1 $\mu\text{mol/l}$ correspondait à une probabilité multipliée par 2,4 de trouver un embryon de bonne qualité, mais les auteurs n'ont pas cherché de corrélations avec le taux de grossesse. La plus récente de ces études a tout d'abord confirmé que la supplémentation en folates modifiait le micro-environnement ovocytaire, en augmentant les folates folliculaires et en diminuant l'homocystéine folliculaire [77]. Ensuite, les auteurs ont décrit une corrélation positive entre l'homocystéine folliculaire et le diamètre du follicule, qui pourrait être due au fait que pendant la maturation folliculaire, la formation d'homocystéine augmente dans la granulosa ou dans l'ovocyte ou que les échanges avec les structures plus périphériques du follicule s'altèrent.

6.2. Étude des polymorphismes *MTHFR*

Plusieurs équipes ont analysé les polymorphismes maternels du gène *MTHFR* chez des patientes prises en charge en FIV, sans pour autant aboutir à des conclusions unanimes. Dans une série de 245 ponctions, la présence d'un allèle *MTHFR* 677 muté (génotype CT ou TT) était associée à une réponse ovarienne plus faible chez les patientes de plus de 35 ans, comme si un génotype muté accélérât le déclin de la réserve ovarienne [78]. Quant à l'association de ce polymorphisme avec le risque d'un échec d'implantation, une première équipe n'a pas trouvé de corrélation, en incluant des patientes qui en étaient majoritairement à leur première tentative [79], alors que d'autres auteurs considèrent le génotype TT comme un facteur de risque significatif, après avoir étudié une série de patientes qui avaient eu au moins quatre échecs d'implantation successifs, malgré le transfert de trois embryons en moyenne [80]. Une grande étude incluant plus de 600 patientes a conclu que le pronostic de la FIV était meilleur en cas de génotype 1298AA et, curieusement, 677CT, plutôt que 677CC [81]. Enfin, dans une série de près de 200 couples, l'étude de ces deux polymorphismes chez les deux membres du couple n'a pas permis d'identifier de relation, que ce fût avec la qualité embryonnaire ou avec le taux de grossesse [82]. Toutefois, dans ces deux dernières études, toutes les femmes avaient une supplémentation en folates, ce qui aurait pu masquer certains effets des polymorphismes.

Malgré les résultats non univoques de ces études, il est licite de poser la question d'un impact éventuel de la supplémentation en acide folique sur les chances de grossesse en FIV. Un premier élément de réponse est fourni par une équipe italienne qui a randomisé des patientes candidates à une première

tentative de FIV et atteintes d'une hyperhomocystéinémie supérieure à 17 $\mu\text{mol/l}$ [83]. Les patientes ont été divisées en un groupe supplémenté en folates, vitamine B6 et B12 jusqu'à normalisation de l'homocystéinémie et un groupe sans supplémentation. Dans le groupe supplémenté, il y avait une augmentation significative des taux de grossesse et d'implantation.

7. Folates et risque d'aneuploïdie

Le métabolisme des folates est susceptible d'interférer avec les synthèses d'ADN et la stabilité chromosomique essentiellement par deux mécanismes. Tout d'abord, l'apport de folate est indispensable à la synthèse des acides nucléiques, puisque le formyl-THF est le donneur de monocarbonate dans la synthèse des purines et que le méthylène-THF intervient dans la transformation du dUMP en dTMP. De ce fait, une carence en folates se traduit d'un côté par un ralentissement des synthèses d'acides nucléiques, et donc une altération des divisions cellulaires et une moindre efficacité des phénomènes de réparation de l'ADN. D'un autre côté, il existe une incorporation inadéquate d'uracile (au lieu de la thymidine) dans l'ADN, ce qui entraîne des mutations ponctuelles, ainsi que des cassures d'ADN simple ou double brin [84,85]. Le second mécanisme implique la carence en SAM, le donneur universel de groupements méthyl, avec pour conséquence une hypométhylation de l'ADN [84,86]. Plusieurs modèles cellulaires utilisant des lignées lymphoblastiques et des lymphocytes humains ont permis de montrer qu'une hypométhylation de certaines régions centromériques ou paracentromériques était associée avec des anomalies de la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose, responsables de cassures chromosomiques et d'aneuploïdies, en particulier pour le chromosome 21 [87–91].

C'est dans ce contexte que le risque de trisomie 21 dans la descendance a été étudié par rapport aux polymorphismes maternels pour les gènes *Mthfr*, *Mtr*, *Mtr* et *Cbs*. Cependant, depuis la première publication décrivant une association significative entre l'allèle *MTHFR* 677T et le risque de trisomie [92], de nombreux auteurs de différentes origines géographiques ont étudié cette question dans différentes populations, mais les résultats restent contradictoires [93]. Une récente méta-analyse conclut d'ailleurs à l'absence de corrélation significative entre ces polymorphismes et le risque de trisomie [94]. Comme pour d'autres associations avec les polymorphismes du métabolisme des folates, une prise en considération insuffisante des influences nutritionnelles ou environnementales dans ces études pourrait expliquer ces résultats discordants.

Le risque de trisomie 21 lié au polymorphisme maternel du gène *MTHFR*, si tant est qu'il existe, a été expliqué par les mécanismes d'hypométhylation décrits ci-dessus, mais un effet protecteur du génotype muté ne peut être exclu. En effet, le chromosome 21 héberge le gène *CBS* qui, en cas de trisomie, est surexprimé, conduisant à un déficit relatif en homocystéine par excès de transsulfuration, et donc à un déficit en SAM. Ce déficit entraînerait à son tour une hypométhylation de l'ADN et

une activation maximale de la *MTHFR*, et partant une utilisation préférentielle des folates disponibles pour la reméthylation de l'homocystéine aux dépens des synthèses d'acides nucléiques. Un génotype maternel *MTHFR* 677TT, et l'hyperhomocystéinémie qu'il entraîne en cas d'apports faibles en folates, pourraient alors compenser les pertes en homocystéine par la voie de la transsulfuration et conférer finalement un avantage permettant la survie accrue d'embryons trisomiques [11]. De ce fait, il y aurait davantage de cas de trisomie dans la descendance de mères porteuses du génotype muté, surtout dans des populations carencées, comme par exemple au Brésil [95] ou en Inde [96].

L'impact paternel du métabolisme des folates sur le risque d'aneuploïdie dans la descendance n'a fait l'objet que d'une seule étude jusqu'à présent. Ce travail mené auprès de 89 hommes a permis de montrer l'existence d'une relation inverse entre les apports en folates et l'incidence d'anomalies chromosomiques dans les spermatozoïdes (nullisomie ou disomie gonosomique, disomie 21), mises en évidence par FISH [97].

8. Folates et fausses couches précoces

Chez les patientes atteintes d'une homocystinurie liée à un déficit en CBS, les taux élevés en homocystéine plasmatique ont été mis en relation avec les avortements spontanés précoces habituellement décrits dans cette maladie [98]. Cependant, une hyperhomocystéinémie maternelle plus modérée constitue également un facteur de risque pour les fausses-couches précoces à répétition [99–102] et même pour une première fausse-couche [103], même s'il n'y a pas unanimité sur ce sujet [104]. L'observation que les femmes ayant des taux plasmatiques bas en folates, ont plus de risque de faire des fausses couches à répétition, va dans le même sens [105]. En revanche, la recherche de corrélations entre le génotype *MTHFR* maternel et le risque d'avortements spontanés précoces a conduit à des résultats contradictoires [106] et une méta-analyse a conclu à l'absence d'impact des polymorphismes de *MTHFR* sur ce risque [107]. Toutefois, le génotype fœtal n'a pas été pris en compte dans la plupart des études, alors qu'il a été montré que la présence de plus d'un allèle muté chez le fœtus, sur les deux loci *MTHFR* 677 et 1298, multipliait le risque d'avortement spontané par 14 [108]. Un effet potentialisateur des génotypes maternel et fœtal pourrait ainsi avoir lieu, comme il a été montré pour le risque d'anomalie de fermeture du tube neural [109]. Il est possible également que le polymorphisme de *MTHFR* soit modulé par d'autres polymorphismes, tel que celui du gène de la transcobalamine (TC), une protéine de liaison de la vitamine B12, en position 776. La mutation *TC* C776G est associée à des taux circulants abaissés de transcobalamine et à une tendance à une homocystéinémie augmentée [110]. Dans une série de fœtus ayant fait l'objet d'un avortement spontané avant 12 semaines de grossesse, la présence concomitante d'un génotype muté pour *MTHFR* et *TC* majorait le risque de fausses-couches à répétition [106,111].

Enfin, en ce qui concerne l'association entre homocystéinémie et risque de fausses-couches précoces, l'on ignore

actuellement si ce lien est de nature causale ou si l'hyperhomocystéinémie n'est qu'un marqueur biologique de ce risque. Ainsi, il n'existe pas d'étude contrôlée de l'effet d'une diminution de l'homocystéinémie sur le risque d'avortement spontané, mais une certaine nombre de cas individuels ou de petites séries, montrant la survenue de grossesses évolutives dans les suites d'une supplémentation en vitamines du groupe B, vont dans ce sens [112–115].

9. Folates et grossesses multiples

Une implication des folates dans l'incidence des grossesses multiples a été suspectée dès le milieu des années 1990, d'après l'étude de certains polymorphismes chez les mères de jumeaux, mais également celle des effets des programmes de fortification ou de supplémentation en folates. En effet, il a été montré que la prévalence de l'allèle 677T du gène *Mthfr* était significativement plus faible parmi les femmes ayant conçu spontanément des jumeaux que parmi celles ayant eu des grossesses uniques [116]. Ainsi, une activité MTHFR réduite et, par tant, une moindre disponibilité en SAM et une homocystéinémie plus élevée pourraient inhiber la polyovulation, mécanisme habituel des grossesses gémeillaires dizygotes [117]. Il est possible également que le déficit en folate et les défauts de méthylation qui en résultent aboutissent à des pertes embryonnaires partielles sur des grossesses gémeillaires au départ. Ce phénomène que les Anglo-Saxons appellent le *vanishing twin* serait en effet loin d'être exceptionnel [118]. Une autre observation qui va dans le même sens concerne le taux de gémeillité qui est faible dans les populations qui présentent une forte prévalence de l'allèle 677T, alors qu'il est plus élevé dans les populations dans lesquelles cet allèle muté est plutôt rare [116]. Toutefois, dans certaines populations, aucune corrélation entre le taux de gémeillité et le génotype MTHFR n'a pu être mise en évidence [119].

En ce qui concerne l'effet éventuel de la supplémentation en folates, telle qu'elle est préconisée actuellement dans le cadre de la prévention des anomalies de fermeture du tube neural, les résultats sont tout aussi controversés. Depuis la première étude publiée par une équipe hongroise et montrant une augmentation de 40 % des grossesses multiples chez des femmes prenant une supplémentation en folates [120], de nombreux autres travaux ont été consacrés à cette question et ont permis de mettre en évidence un certain nombre de biais, tels que l'inclusion de patientes ayant bénéficié d'une AMP (connue pour augmenter l'incidence des grossesses multiples) ou encore l'utilisation des compléments vitaminiques très variés tant dans leur composition que dans leur dosage. Ainsi, dans une étude plus récente, les mêmes auteurs hongrois, en considérant uniquement les suppléments en folates à forte dose, ne retrouvent plus qu'une augmentation non significative du risque de gémeillité [121]. Dans les pays ayant mis en place une supplémentation alimentaire systématique en folates, la comparaison des taux de gémeillité avant et après cette supplémentation a montré soit une absence d'impact, soit une augmentation très modérée de l'incidence des grossesses gémeillaires [122–126].

La question n'est donc pas tranchée et il reste possible que la supplémentation périconceptionnelle en folates soit responsable d'une augmentation de l'incidence des grossesses gémeillaires, comme le suggèrent deux études récentes qui tiennent compte d'un maximum de biais potentiels, l'une concernant la population générale en Suède [127], l'autre un groupe de patientes enceintes après FIV en Grande-Bretagne [81].

10. Conclusions

À travers cette revue, il apparaît clairement que le métabolisme des folates et de l'homocystéine est impliqué dans la physiologie et la physiopathologie de la reproduction, bien avant l'obtention d'une grossesse évolutive. Toutefois les connaissances dans ce domaine sont encore lacunaires et nécessitent d'être approfondies par des études qui tiennent compte des nombreux facteurs nutritionnels, environnementaux et génétiques qui interfèrent avec ce métabolisme. Par ailleurs, les bénéfices potentiels d'une supplémentation en folates, en dehors de la prévention des anomalies de fermeture du tube neural et autres malformations, devront être mieux caractérisés. Il en est de même de l'innocuité d'une administration de folates au long cours dans ces populations de couples infertiles.

Références

- [1] Herrmann W. The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:666–74.
- [2] Gueant JL, Gueant-Rodríguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, et al. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1473–7.
- [3] Hague WM. Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17:459–69.
- [4] Steegers-Theunissen RP, Van Iersel CA, Peer PG, Nelen WL, Steegers EA. Hyperhomocysteinemia, pregnancy complications, and the timing of investigation. *Obstet Gynecol* 2004;104:336–43.
- [5] Tamura T, Picciano MF. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* 2006;83:993–1016.
- [6] Pitkin RM. Folate and neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2007;85:285S–85S.
- [7] Huhta JC, Hernandez-Robles JA. Homocysteine, folate, and congenital heart defects. *Fetal Pediatr Pathol* 2005;24:71–9.
- [8] Prescott NJ, Malcolm S. Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *Cleft Palate Craniofac J* 2002;39:327–31.
- [9] Delgado-Reyes CV, Wallig MA, Garrow TA. Immunohistochemical detection of betaine-homocysteine S-methyltransferase in human, pig, and rat liver and kidney. *Arch Biochem Biophys* 2001;393:184–6.
- [10] Fowler B. Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Semin Vasc Med* 2005;5:77–86.
- [11] Martinez-Frias ML. The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2008;146A:1477–82.
- [12] Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* 1999;6:359–65.
- [13] Fross P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111–3.

- [14] van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346:1070–1.
- [15] Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW, McMaster D, Young IS, McCrum EE, et al. The common ‘thermolabile’ variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia. *Q J Med* 1996;89:571–7.
- [16] Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006;83:701–7.
- [17] Laraqui A, Allami A, Carrie A, Coiffard AS, Benkouka F, Benjouad A, et al. Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2006;61:51–61.
- [18] Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B, et al. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost* 2005;94:510–5.
- [19] Lawrence de Koning AB, Werstuck GH, Zhou J, Austin RC. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin Biochem* 2003;36:431–41.
- [20] Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ* 2004;11(Suppl. 1):S56–64.
- [21] Oakes CC, Kelly TL, Robaire B, Trasler JM. Adverse effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on spermatogenesis include reduced sperm function and selective inhibition of de novo DNA methylation. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:1171–80.
- [22] Kelly TL, Li E, Trasler JM. 5-aza-2'-deoxycytidine induces alterations in murine spermatogenesis and pregnancy outcome. *J Androl* 2003;24:822–30.
- [23] Raman R, Narayan G. 5-Aza deoxyCytidine-induced inhibition of differentiation of spermatogonia into spermatocytes in the mouse. *Mol Reprod Dev* 1995;42:284–90.
- [24] Papadopoulos V, Kamtchouing P, Drosowsky MA, Carreau S. Effects of the transmethylation inhibitor S-adenosyl-homocysteine and of the methyl donor S-adenosyl-methionine on rat Leydig cell function in vitro. *J Steroid Biochem* 1987;26:93–8.
- [25] Vanselow J, Pohland R, Furbass R. Promoter-2-derived Cyp19 expression in bovine granulosa cells coincides with gene-specific DNA hypomethylation. *Mol Cell Endocrinol* 2005;233:57–64.
- [26] Mayr CA, Ingersoll R, Wallock LM, Ames BN. Folate levels and the effects of folate deficiency in the reproductive organs of male rats. *FASEB J* 1999;13:A229.
- [27] Mooij PN, Wouters MG, Thomas CM, Doesburg WH, Eskes TK. Disturbed reproductive performance in extreme folic acid deficient golden hamsters. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;43:71–5.
- [28] Malik NS, Matlin SA, Fried J, Pakyz RE, Consentino MJ. The contraceptive effects of etoprine on male mice and rats. *J Androl* 1995;16:169–74.
- [29] Cosentino MJ, Pakyz RE, Fried J. Pyrimethamine: an approach to the development of a male contraceptive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1431–5.
- [30] Kalla NR, Saggarr SK, Puri R, Mehta U. Regulation of male fertility by pyrimethamine in adult mice. *Res Exp Med (Berl)* 1997;197:45–52.
- [31] Blaise S, Alberto JM, Nedelec E, Ayav A, Pourie G, Bronowicki JP, et al. Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr Res* 2005;57:777–82.
- [32] Mohanty D, Das KC. Effect of folate deficiency on the reproductive organs of female rhesus monkeys: a cytomorphological and cytokinetic study. *J Nutr* 1982;112:1565–76.
- [33] Kelly TL, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R, Trasler JM. Infertility in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient male mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. *Biol Reprod* 2005;72:667–77.
- [34] Guzman MA, Navarro MA, Carnicer R, Sarría AJ, Acín S, Arnal C, et al. Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function. *Hum Mol Genet* 2006;15:3168–76.
- [35] Wallock LM, Tamura T, Mayr CA, Johnston KE, Ames BN, Jacob RA. Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril* 2001;75:252–9.
- [36] Boxmeer JC, Smit M, Weber RF, Lindemans J, Romijn JC, Eijkemans MJ, et al. Seminal plasma cobalamin significantly correlates with sperm concentration in men undergoing IVF or ICSI procedures. *J Androl* 2007;28:521–7.
- [37] Holm J, Hansen SI, Hoier-Madsen M. A high-affinity folate binding protein in human semen. *Biosci Rep* 1991;11:237–42.
- [38] Malm J, Birn H, Frohm B, Hansen SI, Hoier-Madsen M, Holm J. A minor fraction of a high-affinity folate binding protein from the epididymis is associated with membranous vesicles and spermatozoa in human semen. *Int J Androl* 2005;28:267–74.
- [39] Birn H, Zhai X, Holm J, Hansen SI, Jacobsen C, Christensen EI, et al. Megalin binds and mediates cellular internalization of folate binding protein. *FEBS J* 2005;272:4423–30.
- [40] Bentivoglio G, Melica F, Cristoforoni P. Folinic acid in the treatment of human male infertility. *Fertil Steril* 1993;60:698–701.
- [41] Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2002;77:491–8.
- [42] Ebisch IM, Pierik FH, DE Jonk FH, Thomas CM, Steegers-Theunissen RP. Does folic acid and zinc sulphate intervention effect endocrine parameters and sperm characteristics in men? *Int J Androl* 2006;29:339–45.
- [43] Singh K, Singh SK, Sah R, Singh I, Raman R. Mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with male infertility in an Indian population. *Int J Androl* 2005;28:115–9.
- [44] Park JH, Lee HC, Jeong YM, Chung TG, Kim HJ, Kim NK, et al. MTHFR C677T polymorphism associates with unexplained infertile male factors. *J Assist Reprod Genet* 2005;22:361–8.
- [45] Lee HC, Jeong YM, Lee SH, Cha KY, Song SH, Kim NK, et al. Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with non-obstructive male infertility. *Hum Reprod* 2006;21:3162–70.
- [46] Bezold G, Lange M, Peter RU. Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. *N Engl J Med* 2001;344:1172–3.
- [47] Paracchini V, Garte S, Taioli E. MTHFR C677T polymorphism, GSTM1 deletion and male infertility: a possible suggestion of a gene-gene interaction? *Biomarkers* 2006;11:53–60.
- [48] Ebisch IM, van Heerde WL, Thomas CM, van der Put N, Wong WY, Steegers-Theunissen RP. C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interferes with the effects of folic acid and zinc sulfate on sperm concentration. *Fertil Steril* 2003;80:1190–4.
- [49] Stuppia L, Gatta V, Scariolla O, Colosimo A, Guanciali-Franchi P, Calabrese G, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and male infertility in Italy. *J Endocrinol Invest* 2003;26:620–2.
- [50] Azziz R. PCOS: a diagnostic challenge. *Reprod Biomed Online* 2004;8:644–8.
- [51] Trivax B, Azziz R. Diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 2007;50:168–77.
- [52] Sills ES, Genton MG, Perloe M, Schattman GL, Bralley JA, Tucker MJ. Plasma homocysteine, fasting insulin, and androgen patterns among women with polycystic ovaries and infertility. *J Obstet Gynaecol Res* 2001;27:163–8.
- [53] Orzio Jr F, Palomba S, Di Biase S, Colao A, Tauchmanova L, Savastano S, et al. Homocysteine levels and C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:673–9.
- [54] Yilmaz M, Biri A, Bukan N, Karakoc A, Sancak B, Toruner F, et al. Levels of lipoprotein and homocysteine in non-obese and obese patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2005;20:258–63.

- [55] Tsanadis G, Vartholomatos G, Korkontzelos I, Avgoustatos F, Kakosimos G, Sotiriadis A, et al. Polycystic ovarian syndrome and thrombophilia. *Hum Reprod* 2002;17:314–9.
- [56] Palep-Singh M, Picton HM, Yates ZR, Barth J, Balen AH. Polycystic ovary syndrome and the single nucleotide polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase: a pilot observational study. *Hum Fertil (Camb)* 2007;10:33–41.
- [57] Palep-Singh M, Picton HM, Yates ZR, Barth JH, Balen AH. Plasma homocysteine concentrations and the single nucleotide polymorphisms in the methionine synthase gene (MTR 2756A > G): Associations with the polycystic ovary syndrome An observational study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;138:180–6.
- [58] Bayraktar F, Dereli D, Ozgen AG, Yilmaz C. Plasma homocysteine levels in polycystic ovary syndrome and congenital adrenal hyperplasia. *Endocr J* 2004;51:601–8.
- [59] Schachter M, Raziel A, Friedler S, Strassburger D, Bern O, Ron-El R. Insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome is associated with elevated plasma homocysteine. *Hum Reprod* 2003;18:721–7.
- [60] Vrbikova J, Tallova J, Bicikova M, Dvorakova K, Hill M, Starka L. Plasma thiols and androgen levels in polycystic ovary syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:216–21.
- [61] Wijeyaratne CN, Nirantharakumar K, Balen AH, Barth JH, Sheriff R, Belchetz PE. Plasma homocysteine in polycystic ovary syndrome: does it correlate with insulin resistance and ethnicity? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:560–7.
- [62] Yarali H, Yildirim A, Aybar F, Kabakci G, Bukulmez O, Akgul E, et al. Diastolic dysfunction and increased serum homocysteine concentrations may contribute to increased cardiovascular risk in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001;76:511–6.
- [63] Kilic-Okman T, Guldiken S, Kucuk M. Relationship between homocysteine and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Endocr J* 2004;51:505–8.
- [64] Loverro G, Lorusso F, Mei L, Depalo R, Cormio G, Selvaggi L. The plasma homocysteine levels are increased in polycystic ovary syndrome. *Gynecol Obstet Invest* 2002;53:157–62.
- [65] Stadtmayer L, Oehninger S. Management of infertility in women with polycystic ovary syndrome: a practical guide. *Treat Endocrinol* 2005;4:279–92.
- [66] Kilicdag EB, Bagis T, Zeyneloglu HB, Tarim E, Aslan E, Haydardeoglu B, et al. Homocysteine levels in women with polycystic ovary syndrome treated with metformin versus rosiglitazone: a randomized study. *Hum Reprod* 2005;20:894–9.
- [67] Vrbikova J, Bicikova M, Tallova J, Hill M, Starka L. Homocysteine and steroids levels in metformin treated women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002;110:74–6.
- [68] Wulffele MG, Kooy A, Lehert P, Bets D, Ogterop JC, Borger van der Burg B, et al. Effects of short-term treatment with metformin on serum concentrations of homocysteine, folate and vitamin B12 in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. *J Intern Med* 2003;254:455–63.
- [69] Kilicdag EB, Bagis T, Tarim E, Aslan E, Erkanli S, Simsek E, et al. Administration of B-group vitamins reduces circulating homocysteine in polycystic ovarian syndrome patients treated with metformin: a randomized trial. *Hum Reprod* 2005;20:1521–8.
- [70] Henning BF, Tepel M, Riezler R, Gillessen A, Doberauer C. Vitamin supplementation during weight reduction—favourable effect on homocysteine metabolism. *Res Exp Med (Berl)* 1998;198:37–42.
- [71] Volek JS, Gomez AL, Love DM, Weyers AM, Hesslink Jr R, Wise JA, et al. Effects of an 8-week weight-loss program on cardiovascular disease risk factors and regional body composition. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:585–92.
- [72] Ortega RM, Lopez-Sobaler AM, Andres P, Rodriguez-Rodriguez E, Aparicio A, Bermejo LM, et al. Changes in folate status in overweight/obese women following two different weight control programmes based on an increased consumption of vegetables or fortified breakfast cereals. *Br J Nutr* 2006;96:712–8.
- [73] Steegers-Theunissen RP, Steegers EA, Thomas CM, Hollanders HM, Peereboom-Stegeman JH, Trijbels FJ, et al. Study on the presence of homocysteine in ovarian follicular fluid. *Fertil Steril* 1993;60:1006–10.
- [74] Szymanski W, Kazdepka-Zieminska A. Effect of homocysteine concentration in follicular fluid on a degree of oocyte maturity. *Ginekol Pol* 2003;74:1392–6.
- [75] Jerzak M, Putowski L, Baranowski W. Homocysteine level in ovarian follicular fluid or serum as a predictor of successful fertilization. *Ginekol Pol* 2003;74:949–52.
- [76] Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, Wetzels AM, Peer PG, Steegers-Theunissen RP. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Reprod* 2006;21:1725–33.
- [77] Boxmeer JC, Brouns RM, Lindemans J, Steegers EA, Martini E, Macklon NS, et al. Preconception folic acid treatment affects the microenvironment of the maturing oocyte in humans. *Fertil Steril* 2008;89:1766–70.
- [78] Thaler CJ, Budiman H, Ruebsamen H, Nagel D, Lohse P. Effects of the Common 677C>T Mutation of the 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene on Ovarian Responsiveness to Recombinant Follicle-Stimulating Hormone. *Am J Reprod Immunol* 2006;55:251–8.
- [79] Martinelli I, Taioli E, Ragni G, Levi-Setti P, Passamonti SM, Battaglioli T, et al. Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. *Haematologica* 2003;88:789–93.
- [80] Azem F, Many A, Ben Ami I, Yovel I, Amit A, Lessing JB, et al. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. *Hum Reprod* 2004;19:368–70.
- [81] Haggarty P, McCallum H, McBain H, Andrews K, Duthie S, McNeill G, et al. Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study. *Lancet* 2006;367:1513–9.
- [82] Dobson AT, Davis RM, Rosen MP, Shen S, Rinaudo PF, Chan J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C variants do not affect ongoing pregnancy rates following IVF. *Hum Reprod* 2007;22:450–6.
- [83] Pacchiarotti A, Mohamed MA, Micara G, Linari A, Tranquilli D, Espinola SB, et al. The possible role of hyperhomocysteinemia on IVF outcome. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:459–62.
- [84] Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999;55:578–92.
- [85] Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3290–5.
- [86] Duthie SJ, Narayanan S, Brand GM, Pirie L, Grant G. Impact of folate deficiency on DNA stability. *J Nutr* 2002;132:2444S–9.
- [87] Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, et al. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet* 2000;89:121–8.
- [88] Beetstra S, Thomas P, Salisbury C, Turner J, Fenech M. Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei. *Mutat Res* 2005;578:317–26.
- [89] Gisselsson D, Shao C, Tuck-Muller CM, Sogorovic S, Palsson E, Smeets D, et al. Interphase chromosomal abnormalities and mitotic missegregation of hypomethylated sequences in ICF syndrome cells. *Chromosoma* 2005;114:118–26.
- [90] Sciandrello G, Caradonna F, Mauro M, Barbata G. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogenesis* 2004;25:413–7.
- [91] Wang X, Thomas P, Xue J, Fenech M. Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro—evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutat Res* 2004;551:167–80.
- [92] James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495–501.
- [93] James SJ. Maternal metabolic phenotype and risk of Down syndrome: beyond genetics. *Am J Med Genet A* 2004;127A:1–4.
- [94] Zintzaras E. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and risk of Down syndrome offspring: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2007;52:943–53.

- [95] Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res* 2008;7:33–42.
- [96] Sheth JJ, Sheth FJ. Gene polymorphism and folate metabolism: a maternal risk factor for Down syndrome. *Indian Pediatr* 2003;40:115–23.
- [97] Young SS, Eskenazi B, Marchetti FM, Block G, Wyrobek AJ. The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. *Hum Reprod* 2008;23:1014–22.
- [98] Mudd SH. Vascular disease and homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 1985;313:751–3.
- [99] Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000;74:1196–9.
- [100] Del Bianco A, Maruotti G, Fulgieri AM, Celeste T, Lombardi L, Amato NA, et al. Recurrent spontaneous miscarriages and hyperhomocysteinemia. *Minerva Ginecol* 2004;56:379–83.
- [101] D'Uva M, Di Micco P, Strina I, Alviggi C, Iannuzzo M, Ranieri A, et al. Hyperhomocysteinemia in women with unexplained sterility or recurrent early pregnancy loss from Southern Italy: a preliminary report. *Thromb J* 2007;5:10.
- [102] Dodds L, Fell DB, Dooley KC, Armson BA, Allen AC, Nassar BA, et al. Effect of homocysteine concentration in early pregnancy on gestational hypertensive disorders and other pregnancy outcomes. *Clin Chem* 2008;54:326–34.
- [103] Gris JC, Perneger TV, Quere I, Mercier E, Fabbro-Peray P, Lavigne-Lissalde G, et al. Antiphospholipid/antiprotein antibodies, hemostasis-related autoantibodies, and plasma homocysteine as risk factors for a first early pregnancy loss: a matched case-control study. *Blood* 2003;102:3504–13.
- [104] Hoffman ML, Scoccia B, Kurczynski TW, Shulman LP, Gao W. Abnormal folate metabolism as a risk factor for first-trimester spontaneous abortion. *J Reprod Med* 2008;53:207–12.
- [105] George L, Mills JL, Johansson AL, Nordmark A, Olander B, Granath F, et al. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *JAMA* 2002;288:1867–73.
- [106] Zetterberg H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:7.
- [107] Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003;361:901–8.
- [108] Zetterberg H, Regland B, Palmer M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L, et al. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *Eur J Hum Genet* 2002;10:113–8.
- [109] Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, et al. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 1999;84:151–7.
- [110] Namour F, Olivier J, Abdelmoutaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, et al. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2001;97:1092–8.
- [111] Zetterberg H, Zafiroopoulos A, Spandidos DA, Rymo L, Blennow K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2003;18:1948–50.
- [112] Candito M, Magnaldo S, Bayle J, Dor JF, Gillet Y, Bongain A, et al. Clinical B12 deficiency in one case of recurrent spontaneous pregnancy loss. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1026–7.
- [113] Gueant JL, Candito M, Andres E, Van Obberghen E, Nicolas JP. Familial pernicious anaemia with hyperhomocysteinaemia in recurrent early pregnancy loss. *Thromb Haemost* 2004;92:1147–9.
- [114] Quere I, Bellet H, Hoffet M, Janbon C, Mares P, Gris JC. A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 1998;69:152–4.
- [115] Quere I, Mercier E, Bellet H, Janbon C, Mares P, Gris JC. Vitamin supplementation and pregnancy outcome in women with recurrent early pregnancy loss and hyperhomocysteinemia. *Fertil Steril* 2001;75:823–5.
- [116] Hasbargen U, Lohse P, Thaler CJ. The number of dichorionic twin pregnancies is reduced by the common MTHFR 677C->T mutation. *Hum Reprod* 2000;15:2659–62.
- [117] Hall JG. Twinning. *Lancet* 2003;362:735–43.
- [118] Landy HJ, Keith LG. The vanishing twin: a review. *Hum Reprod Update* 1998;4:177–83.
- [119] Montgomery GW, Zhao ZZ, Morley KI, Marsh AJ, Boomsma DI, Martin NG, et al. Dizygotic twinning is not associated with methylenetetrahydrofolate reductase haplotypes. *Hum Reprod* 2003;18:2460–4.
- [120] Czeizel AE, Metneki J, Dudas I. The higher rate of multiple births after periconceptional multivitamin supplementation: an analysis of causes. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 1994;43:175–84.
- [121] Czeizel AE, Vargha P. Periconceptional folic acid/multivitamin supplementation and twin pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:790–4.
- [122] Kucik J, Correa A. Trends in twinning rates in metropolitan Atlanta before and after folic acid fortification. *J Reprod Med* 2004;49:707–12.
- [123] Lawrence JM, Watkins ML, Chiu V, Erickson JD, Petitti DB. Food fortification with folic acid and rate of multiple births, 1994–2000. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;70:948–52.
- [124] Li Z, Gindler J, Wang H, Berry RJ, Li S, Correa A, et al. Folic acid supplements during early pregnancy and likelihood of multiple births: a population-based cohort study. *Lancet* 2003;361:380–4.
- [125] Signore C, Mills JL, Cox C, Trumble AC. Effects of folic acid fortification on twin gestation rates. *Obstet Gynecol* 2005;105:757–62.
- [126] Waller DK, Tita AT, Annegers JF. Rates of twinning before and after fortification of foods in the US with folic acid, Texas, 1996 to 1998. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2003;17:378–83.
- [127] Kallen B. Use of folic acid supplementation and risk for dizygotic twinning. *Early Hum Dev* 2004;80:143–51.

Résumé

Le métabolisme des monocarbone relie le métabolisme cellulaire à la machinerie épigénétique à travers une molécule commune, la S-adénosylméthionine (SAM). Les changements dans le potentiel de méthylation cellulaire (ratio SAM/SAH) sont impliqués dans plusieurs maladies, notamment l'hépatocarcinome et les défauts de fermeture du tube neural (NTD). La perturbation du ratio SAM/SAH peut être liée à des déficits enzymatiques ou à une exposition à un facteur environnemental. La reméthylation de l'homocystéine (HCY) en méthionine est catalysée par la méthionine synthase (MTR) ou la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT) dans le foie. En comparant le tissu tumoral au tissu sain environnant dans le foie, les transcrits de BHMT étaient fortement diminués dans les échantillons mais pas les transcrits de MTR. La protéine BHMT n'a pas été détectée dans les cellules HepG2 et dans 5 des 6 échantillons tumoraux analysés. L'absence d'expression de BHMT était due à un variant génétique conduisant un codon stop prématuré. Une déficience pré-natale en donneurs de méthyle aggrave la susceptibilité face à certaines maladies. La fumonisine B1 (FB1) est une mycotoxine qui contamine les céréales et a été identifiée comme étant un facteur de risque de survenue de tumeur et des NTD. Nous avons étudié les récepteurs des folates et 4 marques de l'hétérochromatine dans le foie des fœtus de rat issus de mères exposées à un régime déficient en donneurs de méthyle et/ou à la FB1 à une dose deux fois supérieure à la dose journalière admissible. Le régime carencé et la FB1 diminuent le ratio SAM/SAH. La FB1 inverse le mécanisme d'adaptation consistant en une régulation positive de l'expression des récepteurs des folates lors d'une carence seule. Le régime carencé diminue H4K20me3 mais une combinaison carence/FB1 diminue encore davantage H4K20me3 et augmente H3K9me3. Cette augmentation de H3K9me3 peut être vu comme un mécanisme de défense incitant la cellule à résister à la désorganisation de l'hétérochromatine. H3R2me2 et H4K16ac varient également selon ce mécanisme. Cette étude est pertinente car elle suggère que de faibles doses de FB1 interagissent avec la carence en donneurs de méthyle pour perturber le profil épigénétique.

Mots clés : Acide folique, méthionine, choline, bétaine, homocystéine, bétaine-homocystéine S-méthyltransférase, carcinome hépatocellulaire, épigénétique, fumonisine B1.

Summary

Folate-mediated 1-carbon metabolism is a conduit that links cellular metabolism to the epigenetic machinery through the common molecule, AdoMet. There is strong evidence that changes in the cellular methylation potential (AdoMet/AdoHcy ratio) is involved in several types of disease notably tumor proliferation like hepatocarcinoma and developmental disease like neural tube defects. Perturbation of AdoMet/AdoHcy ratio may be related to a cellular cause like enzyme defect or to exposure to an environmental factor. The remethylation of homocysteine to methionine is catalyzed either by methionine synthase (MTR) or by betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) in the liver. By comparing tumor tissue to surrounding healthy tissue in the liver we have found that BHMT transcripts, but not MTR, are strongly decreased in tumor samples. Consistently, BHMT protein was not detected in HepG2 cells and in 5/6 tumors investigated. Abolition of BHMT expression was due to a genetic variant producing a premature termination codon. Prenatal methyl deficient diet (MDD) enhances susceptibility to disease. Fumonisin FB1 is a corn contaminating mycotoxin identified as a risk factor for tumor occurrence and neural tube defects. We have investigated folate receptors and 4 heterochromatin markers in rat fetuses liver derived from dams exposed to MDD and/or FB1 administered at a dose twice higher than the Provisional Maximum Tolerable Daily Intake. We found that MDD and even FB1 by itself decrease the AdoMet/AdoHcy ratio. FB1 reverses the adaptation mechanism consisting in upregulating folate receptors in case of folate depletion. MDD decreased H4K20me3 but combined MDD/FB1 decreased H4K20me3 even more and increased H3K9me3. The elevated H3K9me3 can be viewed as a defence mechanism inciting the cell to resist heterochromatin disorganisation. H3R2me2 and H4K16Ac varied according to this mechanism. This study is relevant because it suggests that low doses of FB1 interact with methyl depletion to disrupt the epigenetic landscape.

Key words: Folic acid, methionine, choline, betaine, homocysteine, betaine-homocysteine S-methyltransferase, hepatocellular carcinoma, epigenetic, fumonisine B1.