



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-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

Par

Shabnam POOYA

**Effets sur le métabolisme énergétique mitochondrial myocardique
et hépatique de la carence en donneurs de méthyles au cours de la
gestation et de l'allaitement chez le raton**

Le 04 Juin 2012

Membres du jury

Rapporteurs :

Frédérique SAVAGNER

Maître de Conférence-HDR, CHU d'Angers, Angers

Patrick HILLON

Professeur des Universités, Université de Dijon, Dijon

Examineurs :

Rémy HOULGATTE

Directeur de Recherche, Inserm U915, Nantes

Yves MALTHIERY

Professeur des Universités, Université d'Angers, Angers

Yves JUILLIERE

Professeur des Universités, Université de Lorraine, Nancy
Directeur de thèse

Rosa-Maria GUÉANT-RODRIGUEZ

Professeur des Universités, Université de Lorraine,
Nancy, Co-directeur de thèse

Jean-Louis GUÉANT

Professeur des Universités, Université de Lorraine, Nancy

UMR Inserm 954, Laboratoire de Nutrition, génétique et exposition aux risques environnementaux

... "Students:

Say to yourselves first: what have I done for my instruction? And, as you gradually advance, what have I done for my country? Until the time comes when you may have the immense happiness of thinking that you have contributed in some way to the progress and to the good of humanity. But, whether our efforts are or not favored by life, let us be able to say, when we come near the great goal, I have done what I could.

Louis Pasteur

Tout d'abord je voudrais remercier le Professeur Jean-Louis Guéant, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour son soutien, sa patience, sa disponibilité et ses précieux conseils pendant ces années de thèse. Au cours de mon travail dans votre laboratoire, j'ai appris qu'il ne suffit pas de travailler dur pour devenir un bon scientifique, mais il faut surtout se poser les bonnes questions en les poursuivant avec une bonne ouverture d'esprit.

Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir donné la liberté et la souplesse nécessaire pour poursuivre ce qui m'a intéressée dans la recherche, et en me permettant de penser librement comme un chercheur scientifique. Cette expérience sera très importante pour ma carrière et les tâches auxquelles vous m'avez associée m'ont vraiment permis de consolider mes connaissances et de les développer dans ma nouvelle vie. Merci pour tout.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude au Professeur Yves Juillièrre pour la direction de ce travail.

Je tiens à remercier le Professeur Rosa-Maria Rodriguez-Guéant pour sa direction et tout ce qu'elle a fait pour moi pendant toutes ces années. Merci avant tout d'être pour moi plus qu'une directrice de thèse mais une très bonne amie, merci pour votre véritable gentillesse, votre enthousiasme et d'avoir été bienveillante avec moi.

Je remercie le Docteur Frédérique Savagner et le Professeur Patrick Hillon d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour l'intérêt que vous avez porté à évaluer ce travail.

Professeur Rémy Houlgatte et Professeur Yves Malthiery, Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Patrick Brachet pour sa collaboration dans la réalisation de ce travail, principalement dans l'analyse protéomique.

Je remercie le Docteur Jean-Marc Alberto et Docteur Céline Chery, pour leur patience et leur aide pendant toutes ces années et aussi pour leur amitié et leur humanité. Je tiens également à remercier le Docteur Shyue-Fang Battaglia pour sa compagnie et Professeur Bernard Namour et Professeur Laurent Peyrin-Biroulet pour leur soutien.

Je suis très reconnaissant à tous mes camarades de laboratoire et à l'hôpital pour leur aide et leur soutien : Violette, Dominique, Catherine, Deborah, Carine, Grégory, Remy, Elise, Vincent, Marc, Brigitte, Aude, Philippe, Pierre, Frank, Carole, Justine, Sophie et Thierry. Un merci tout spécial pour le Docteur Jean Giudicelli, madame Florence Coste et le Docteur Bernard Beck pour leurs nombreux conseils. Je veux aussi remercier madame Aline Caze pour son aide dans la mise en page de ma thèse.

Je suis très reconnaissant à tous mes amis au labo qui ont fait de 'Nancy une maison loin de la maison' pour moi. Leur compagnie merveilleux et soutien ont fait de ces années difficiles des études supérieures en douceur, amusantes et mémorables. Je remercie mes amis, Fereshte, Sarah, Rania, Eva, Sonia, Nicolas, Anais, Georges, Rachia, Rose, Maatem, Hélène, Maira, Soufiane et Patrice pour avoir été à mes côtés chaque fois que j'en avais besoin. Merci aussi à Nazanin, Mojdeh et tous mes amis en Iran qui d'ailleurs ont gardé ma vie riche en plaisanterie.

Je voudrais également remercier mes parents et mes frères de leurs soutiens et de leurs encouragements. La philosophie de mes parents a toujours été de garder des objectifs plus élevés pour ma vie. La confiance qu'ils me portent est une grande source de motivation dans ma vie. Votre amour et votre soutien dans ce qui m'a permis de réaliser mes rêves.

En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans votre soutien.

Merci de tout mon cœur

Publications

Articles publiés

- **Pooya S**, Moreno Garcia M, Blaise S, Giudicelli, J, Alberto J, Guéant-Rodriguez R, Jeannesson E, Peyrin-Biroulet L, Bronowicki J, Guéant JL. **Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypomethylation and decreased ER- α , ERR- α and HNF4- α , in rat liver.** *Journal of Hepatology*, 2012, Apr 17. [Epub ahead of print] PMID: 22521344
- Guéant Rodriguez RM, Spada R, **Pooya S**, Jeannesson E, Pharm D, Moreno Garcia MA, Anello G, Bosco P, Elia M, MD, Romano A, Alberto JM, Ziegler O, Juillièze Y, Guéant JL. **Homocysteine predicts increased NT-pro-BNP through impaired fatty acid oxidation.** *International Journal of Cardiology*, 2012, Mar 27 [Epub ahead of print], PMID:22459404
- Bressenot A, **Pooya S**, Bossenmeyer-Pourie C, Gauchotte G, Germain A, Chevaux JB, Coste F, Vignaud JM, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. **Methyl donor deficiency affects small intestinal differentiation and barrier function in rats.** *British Journal of Nutrition*, 2012 Jul 16:1-11. [Epub ahead of print] PMID: 22794784
- Moreno Garcia M,* Guéant-Rodriguez RM,* **Pooya S,*** Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Guéant JL. **Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1.** *Journal of Pathology* 2011 Nov; 225(3):324-35.
*Equal contribution
- **Pooya S**, Djalali M, Djazayery A, Saedisomeoliaa A, Reza Eshraghiana M, Toorang F. **The efficacy of omega-3 fatty acid supplementation on plasma homocysteine and malondialdehyde levels of type 2 diabetic patients.** *Journal of Nutr Metab Cardiovasc* 2010; 20:326-31.

Communications orales

- **Advances and Controversies in B-Vitamins and Choline**, Methyl Donor Deficiency influences development, mucosal barrier, inflammation, and innate immunity in the Small Intestine of New Born Rats, **Leipzig, Allemagne, 08.03.2012**
- **Second Luxembourgish Nutrition Conference (Nulux)**, Dietary Composition, Pattern and Health. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. **Luxembourg, 09.05.2011**

- **Scientific meeting Nutralor**, Deficiency of methyl donors, fetal programming and dysregulation of lipid oxidation. **Institut national polytechnique de Lorraine (INPL), Nancy, France, 03.03.2011**

Communications affichées

- **7^{ème} Journée Claude Huriet de la recherche médicale de la faculté de médecine et du CHU de Nancy.** Methyl Donor Deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypermethylation in rats liver, **Nancy, France, 02.03.2012**
- **6^{ème} Journée Claude Huriet de la recherche médicale de la faculté de médecine et du CHU de Nancy.** Methyl Donor Deficiency produces a Cardiomyopathy Related to Imbalanced Methylation/Acetylation of PGC-1 α and Modification of Expression of PPARs group, **Nancy, France, 17.12.2010**
- **8^{èmes} journées francophones de nutrition** - Maternal Methyl Donor Deficiency has related with the Cardiomyopathy in the postnatal rats, **Lille, France, 08.12.2010**

Tables des Matières

Abréviations -----	1
Contexte de l'étude -----	4
Données bibliographiques -----	6
Partie 1 : Cycle de monocarbone -----	7
1. Homocystéine-----	7
2. Métabolisme de l'homocystéine-----	7
2.1. Voie de la réméthylation-----	7
2.2. Voie de la transsulfuration-----	8
3. Adénosylhomocystéine (AdoHcy)-----	10
4. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie-----	10
4.1. Facteurs nutritionnels-----	10
4.1.1. Les folates ou vitamine B9-----	10
4.1.2. Vitamine B12-----	11
4.2. Facteurs environnementaux-----	12
4.3. Facteurs Génétiques-----	13
Partie 2 : Pathologies en lien avec une hyperhomocystéinémie -----	15
1. Homocystéine et grossesse :-----	15
1.1. Facteurs nutritionnels et génétiques chez la femme-----	15
1.2. Les changements de la concentration d'Hcy pendant la grossesse normale-----	15
1.3. Embryon, placenta, et développement fœtal-----	15
1.3.1. Anomalies du tube neural (NTD)-----	15
1.3.2. Cardiopathies congénitales-----	16
1.3.3. Développement du placenta-----	16
1.3.4. Taille du fœtus et retard de croissance-----	17
2. Homocystéine et maladies hépatiques-----	17
2.1. Stéatose hépatique-----	17
2.2. Stéatose hépatique chez l'homme-----	18
2.3. Stéatose hépatique chez l'animal-----	18
3. Hcy et maladies cardio-vasculaires-----	19
3.1. MCV chez l'homme-----	19
1.1. MCV chez l'animal-----	20
Partie 3 : Métabolisme énergétique mitochondrial -----	24
1 La chaîne respiratoire-----	24
1.1 NADH-ubiquinone oxydoréductase ou Complexe I:-----	25
1.2 Succinate-ubiquinone oxydoréductase ou Complexe II :-----	25
1.3 Complexe BC1 s ou ubiquinone cytochrome C réductase ou Complexe III :-----	26
1.4 Cytochrome C Oxydase ou Complexe IV :-----	27
1.5 F0F1-ATPase/ATP synthétase ou Complexe V :-----	28
1.6 NADH déshydrogénase ubiquinone flavoprotéine 2-----	29
1.7 NADH déshydrogénase ubiquinone alpha subcomplexe 10-----	29
1.8 Chaperonin HSPD1 (<i>heat shock 60kDa protein 1</i>)-----	29
2 Transport à travers la membrane plasmique et activation des acides gras-----	30
3 Cycle de la β -oxydation-----	30
3.1 Régulation de la β -oxydation-----	32
3.2 Rôle de la Carnitine dans le métabolisme-----	32
3.3 Régulation de l'absorption de la carnitine cellulaire-----	34
3.4 Carnitine palmitoyl-transférase 1 (CPT1)-----	34
3.5 Fatty-acid-binding proteins (FABPs)-----	35

3.6	Acyl-CoA deshydrogénases-----	36
3.7	Mitochondrial trifunctional protein (MTP) -----	37
3.8	Electron-Transferring Flavoprotein (ETF)-----	37
3.9	Acyl-CoA thioestérases (ACOTs)-----	38
4	Les erreurs innées du métabolisme de l'oxydation des acides gras-----	39
4.1	Prévalence -----	39
4.2	Une brève description des troubles de l'oxydation des acides gras-----	39
4.2.1	Carence en transporteur de Carnitine plasmatique membranaire (OCTN2)-----	39
4.2.2	Déficit en carnitine palmitoyltransférase I (CPT I) -----	40
4.2.3	Déficit en carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) -----	40
4.2.4	Déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne très longue -----	41
4.2.5	Déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne -----	42
4.2.6	Déficit en acyl-CoA déshydrogénase à chaînes courtes -----	42
4.2.7	Déficit en Acyl-CoA déshydrogénase 9 -----	43
4.2.8	Déficit en 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue -----	43
4.2.9	Déficit en protéine trifonctionnelle mitochondriale-----	44
Partie 4 : Biogénèse mitochondriale -----		46
1.	Proliférateur-Activated Receptor- γ Coactivateur- α (PGC1- α)-----	46
1.1.	Signalisation de PGC-1 dans le cœur-----	47
1.2.	Signalisation de PGC-1 et la fonction hépatique -----	47
2.	PGC α et Récepteurs Nucléaires-----	48
2.1.	Peroxisome Proliférateur-Activated Receptor (PPARs) -----	49
2.1.1.	Mécanisme général d'action des PPARs -----	50
2.1.2.	PPAR α -----	50
2.1.2.1.	PPAR α et β -oxydation peroxisomale-----	51
2.1.2.2.	PPAR α et β -oxydation mitochondriale-----	51
2.1.3.	PPAR β -----	52
2.1.4.	PPAR γ -----	53
2.2.	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α)-----	53
2.3.	Estrogène Receptor (ER α):-----	54
2.4.	Estrogène Related Receptor (ERR) -----	55
3.	Régulation de PGC-1 α -----	57
3.1.	Modifications post-traductionnelles -----	58
3.1.1.	Méthylation-----	59
3.1.1.1.	La famille des Arginine méthyltransférases -----	59
3.1.1.2.	Les substrats de PRMT1 -----	62
3.1.2.	Acétylation -----	62
3.1.2.1.	GCN5 (general control of amino acid biosynthesis 5')-----	63
3.1.2.2.	Sirtuines -----	64
3.1.2.3.	Régulation de SIRT1-----	65
3.1.2.3.1.	Régulation de l'activité SIRT1 par l'état nutritionnel-----	65
3.1.2.3.2.	Régulation de l'activité SIRT1 par le métabolisme NAD ⁺ -----	66
3.2.	Modification de PGC1 par acétylation/desacétylation-----	67
4.	Interaction de PGC-1 α avec SIRT1 et GCN5 (Fonctions métaboliques tissu-spécifiques) -----	68
4.1.	Foie-----	68
4.2.	Muscle squelettique et cardiaque -----	71
Objectif -----		73
Résultats -----		76
Partie 1 : Effets de la carence en groupement méthyles sur la dysrégulation de la bêta oxydation mitochondriale sur le myocarde de rats à 21 jours -----		77

1.	Analyse protéomique du myocarde -----	77
2.	Etude de l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique par Western Blot dans les cœurs des rats -----	79
3.	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i> -----	79
4.	Analyse de Western Blot des récepteurs nucléaires -----	81
5.	Effets post traductionnels de PGC-1 α -----	82
Partie 2: L'homocystéine prédit l'augmentation de NT-pro-BNP par perturbation de l'oxydation acide gras -----		
1.	Caractéristiques cliniques et biologiques des populations. -----	85
2.	Association entre les peptides natriurétiques de type B (NT-proBNP et BNP), les acylcarnitines et l'homocystéine -----	87
2.1.	Peptides natriurétiques et acylcarnitines en fonction des quartiles d'homocystéine -----	87
2.2.	Correlation entre NT-pro-BNP et acylcarnitines plasmatique et aussi entre Hcy et acylcarnitines plasmatique chez 358 patients atteints de maladies cardiaques -----	89
2.3.	Corrélation entre l'Hcy avec les acylcarnitines plasmatiques et le BNP chez les sujets âgés volontaires--	90
3.	Analyse de la carnitine et des acylcarnitines comme indicateurs des altérations des activités enzymatiques des enzymes de la bêta oxydation : -----	95
4.	Influence des polymorphismes MTHFR, MTR et TCN2 sur le BNP. -----	96
Partie 3: Effets de la carence en donneurs de méthyles sur la bêta oxydation mitochondriale dans le tissu hépatique des rats de 21 jours -----		
1.	Paramètres anthropométriques et biologiques. -----	98
2.	Caractérisation de la stéatose hépatique. -----	99
3.	Marqueurs histologiques et biologiques de fibrose et d'inflammation -----	100
4.	Impact de la déficience sur le stress oxydant et le stress du réticulum. -----	102
5.	Conséquence de la carence en groupements méthyles sur le stress du réticulum. -----	102
6.	Altérations de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'oxydation des acides gras. -----	103
7.	Modifications en la méthylation de PGC1- α et les conséquences sur les récepteurs nucléaires -----	106
Discussion/Conclusion -----		
Partie 1 : Effet de la carence maternelle en donneurs de méthyles sur le myocarde des rats -----		
Partie 2: L'Homocystéine prédit l'augmentation de NT-pro-BNP par diminution de l'oxydation mitochondriale des acides gras -----		
Partie 3 : La carence en donneurs de méthyle provoque un petit poids à la naissance et une stéatose hépatique -----		
Conclusion générale -----		
Bibliographie -----		
Matériels et Méthodes -----		
1.	Modèle animal -----	142
1.1.	Régime alimentaire -----	142
1.1.1.	Contenu et spécification du régime -----	143
1.2.	Prelevement et gestion des échantillons -----	145
2.	Etude de population -----	145
2.1.	Sujets -----	145
2.1.1.	Cohorte du service de cardiologie -----	145
2.1.2.	Cohorte Oasi -----	146
2.2.	Prélèvement et gestion des échantillons -----	146
3.	Dosage plasmatiques / sériques et tissulaires -----	147
3.1.	Métabolisme de l'homocystéine -----	147
3.1.1.	Folates et vitamine B12 -----	147
3.1.2.	Dosage de l'homocystéine, acide methylmalonique et acide succinique -----	150
3.1.3.	Analyse de molécules adénylées (SAM/SAH) par dérivation fluorescente -----	154

3.1.4.	Concentration méthionine -----	155
3.2.	Métabolisme lipidique -----	155
3.2.1.	Triglycérides, cholestérol et lipides totaux -----	155
3.2.2.	Concentration de Carnitine et acylcarnitines -----	156
3.3.	Métabolisme énergétique -----	157
3.3.1.	Analyse NADH/NAD par séparation en HPLC -----	157
3.3.2.	Analyse ATP/ADP/AMP et AMP _C par séparation en HPLC -----	158
3.3.3.	Peptides natriurétiques -----	160
3.3.4.	Marqueurs du stress cellulaire (ALAT/ASAT) -----	160
3.3.5.	Dosage Radio-Immunoassey de l'insuline -----	161
3.3.6.	Dosage du glucose -----	162
4.	Dosages enzymatiques -----	163
4.1.	Mesure de l'activité methionine synthase (MTR) -----	163
4.2.	Mesure de l'activité de la methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) -----	165
4.3.	Mesure de l'activité enzymatique de la cystathionine -β- synthase (CBS) -----	167
4.4.	Bétaïne-Homocystéine Méthyltransférase (BHMT) -----	169
4.5.	Mesure d'activité enzymatique de Sirt1 -----	169
4.6.	Mesure d'activité enzymatique de Caspase-1 -----	172
5.	Immunohistochimie -----	173
5.1.	Inclusion des lames et coupe au cryostat -----	173
5.2.	Technique d'immunohistochimie par fluorescence indirect -----	174
5.3.	Duolink -----	176
5.4.	Technique d'Immunohistochimie par Rouge Sirius et Masson Trichrome Stain kit -----	179
6.	Western blot -----	180
6.1.	Extraction des protéines à partir de tissu -----	180
6.2.	Dosage des protéines par kit BCA -----	181
6.3.	Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante -----	183
6.3.1.	Liste des anticorps primaires utilises en western blot -----	189
6.3.2.	Liste des anticorps secondaire utilises en western blot -----	190
6.4.	Déshybridation de membrane western blotting (STRIPPING) -----	191
6.5.	Immunoprécipitation -----	192
7.	RT-PCR -----	194
7.1.	Extraction des ARN totaux -----	194
7.2.	Dosage des ARN par Spectrophotometre -----	196
7.3.	Transcription inverse des ARN (RT-PCR) -----	196
7.4.	PCR semi-quantitative en temps réel -----	198
7.5.	Préparation d'un gel d'agarose pour analyse qualitative d'ARN ou ADN par electrophorese -----	200
8.	Génotypages -----	201
8.1.	MTHFR, méthylènetetrahydrofolate réductase -----	202
8.2.	MTR, Methionine Synthase -----	206
8.3.	MTRR, Methionine Synthase Reductase -----	209
8.4.	TCN2, TC II Transcobalamine -----	212
9.	Analyses Statistiques -----	214

Liste des figures

Figure 01.	Métabolisme de l'homocystéine.....	9
Figure 02.	Structure de la vitamine B12	12
Figure 03.	Anomalies du tube neural.....	16
Figure 04.	Différents stades du développement (J13, J21).....	21
Figure 05.	Coupes du cœur de rats âgés de 21 jours	21
Figure 06.	Analyses fonctionnelle du cœur de rats témoin et carencé	22
Figure 07.	Concentrations plasmatiques en dérivés de carnitine chez les rats.....	22
Figure 08.	Détermination de l'expression d'OCTN2 par analyse immunohistochimique.....	22
Figure 09.	Activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire.....	23
Figure 10.	NADH-ubiquinone oxydoréductase.....	25
Figure 11.	Succinate-ubiquinone oxydoréductase.....	26
Figure 12.	Ubiquinone cytochrome C réductase.....	27
Figure 13.	Cytochrome C oxydase.....	28
Figure 14.	FOF1-ATPase/ATPsynthétase.....	29
Figure 15.	Cycle de la β -oxydation.....	31
Figure 16.	Fonction de la carnitine dans le transport intracellulaire d'acyl- et d'acetyl-CoA.....	33
Figure 17.	Localisation des transporteurs de CoA et d'acyl-CoA dans le cytosol et les mitochondries.....	34
Figure 18.	Différentes formes d'Acyl-CoAdéshydrogénases.....	36
Figure 19.	Electron-Transfer Flavoprotein.....	37
Figure 20.	Schéma de la chaîne respiratoire et de la β -oxydation.....	38
Figure 21.	Intéraction de PGC-1 avec les récepteurs nucléaires.....	48
Figure 22.	Schéma général de l'activation des PPARs.....	50
Figure 23.	La régulation des récepteurs nucléaires des enzymes du métabolisme.....	56
Figure 24.	Modifications post traductionnelles de PGC-1.....	58
Figure 25.	La famille d'arginine méthyltransférase protéines.....	60
Figure 26.	Types et des sites de méthylation d'arginine dans les queues des histones.....	61
Figure 27.	La famille de SIRTUIN et sa localisation intracellulaire.....	65
Figure 28.	Régulation de l'activité SIRT1.....	67
Figure 29.	Modèle de régulation d'acétylation de PGC-1 α	68
Figure 30.	Régulation de PGC-1 α dans le foie.....	71
Figure 31.	Analyse protéomique.....	77
Figure 32.	Analyse protéomique.....	78
Figure 33.	L'expression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique.....	79
Figure 34.	L'Ingenuity pathways analysis (IPA).....	80
Figure 35.	L'expression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique.....	82
Figure 36.	L'expression de protéines impliquées dans la modification de PGC-1 α	83
Figure 37.	Concentration du NT-proBNP en fonction des quartiles d'Hcy.....	87
Figure 38.	Concentration des acylcarnitines à chaîne courte, moyenne et longue en fonction des quartiles d'homocystéine, chez les patients coronarographiés.....	88
Figure 39.	Corrélations entre la concentration plasmatique des acylcarnitines à chaîne courte, moyenne et longue avec Log de concentration plasmatique de NT-proBNP.....	89
Figure 40:	Corrélations entre la concentration plasmatique des acylcarnitines à chaîne courte, moyenne et longue avec Log de concentration plasmatique d'homocystéine.....	90
Figure 41.	Concentration du BNP en fonction des quartiles d'Hcy et concentration des acylcarnitines.....	91
Figure 42.	Concentration des acylcarnitines à chaîne courte, moyenne et longue en fonction des quartiles d'homocystéine, chez les patients coronarographiés.....	91
Figure 43:	Corrélation entre le Log de la concentration plasmatique en Hcy et le BNP chez des sujets ayant une concentration en folates < 7 nmol /L.....	92

Figure 44.	Influence de polymorphismes génétiques de MTHFR 677C>T et 1298A>C, MTR 2798A>G, etTCN2 776 C>G sur la concentration plasmatique de NT-proBNP	97
Figure 45.	Microscopie électronique Stéatose hépatique modérée de type microvésiculaire	100
Figure 46.	Marqueurs de fibrose et inflammation dans le foie des ratons témoins et carencé	100
Figure 47.	Analyse de western blot de marqueurs de fibrose et d'inflammation	101
Figure 48.	Expression du TNF- α par RT-PCR et activité de la Caspase-1	101
Figure 49.	Activités des enzymes du stress oxydant	102
Figure 50.	Conséquence de la carence en groupements méthyles sur le stress du réticulum	103
Figure 51.	Activités de complexes de la chaîne respiratoire	103
Figure 52.	Activités de la palmitoyl-CoA et de la palmitoyl-L-carnitine	104
Figure 53.	Concentration de carnitine libre et totale	104
Figure 54.	Corrélation entre carnitine et S-adenosylmethionine	105
Figure 55:	L'expression des protéines de la bêta oxydation et de la chaîne respiratoire	105
Figure 56.	Analyse par western blot des mécanismes épigénomiques en relation avec altération oxydation mitochondriale des acides gras	106
Figure 57.	L'expression de protéines impliquées dans la modification de PGC-1 α	107
Figure 58.	Activité enzymatique de SIRT1	107
Figure 59.	Interaction d' hypométhylated de PGC-1 α avec PPAR- α , ERR- α et HNF-4 α	108
Figure 60.	Le mécanisme liée à la carence de groupement méthyle	110
Figure 61	Résumé de mécanismes liés à la carence en groupements méthyles et l'augmentation d'homocystéine et des peptides natriurétiques	115

Liste des tableaux

Tableau .1	Causes d'une hyperhomocystéinémie	14
Tableau 2.	Marqueurs métaboliques des acyl-caarnitines pour le diagnostique des nomalies de la bet- oxydation	45
Tableau 3.	Récepteurs nucléaires en interaction avec PGC-1 α comme facteur de transcription	49
Tableau 4.	Effets de l'activation de PPAR α	52
Tableau 5.	Caractéristiques cliniqueset biologiques chez les patients coronarographiés et chez les sujets âgés	86
Tableau 6.	Analyse univariéet multivariéedesdéterminants du NT-pro-BNP chez patients coronarographiés	93
Tableau 7.	L'analyse univariée et multivariée des déterminants du BNP chez sujets âgés	94
Tableau 8.	Ratios des acylcarnitinesselon le seuil pathologique du NT-proBNP et selon le quartile de l'Hcy	96
Tableau 9.	Paramètres anthropométriques et métaboliques de ratons à 21 jours	98
Tableau 10.	Paramètres biologiques dans le tissu hépatique des ratons à 21jours	99

Abréviations

ACC:	Acetyl CoA Carboxylase
ACOT2:	Acyl-coenzyme A thioesterase
ADMA:	Dimethyl-Arginine, asymmetric antibody
AdoCbl:	Adenosylcobalamin
AdoHcy:	S-adenosylhomocysteine
AFU:	Arbitrary fluorescence unit
AG :	Acides gras
AGL :	Acides gras libres
Akt:	Alpha serine/threonine-protein kinase
ALAT:	Alanine aminotransferase
Alpha-SMA:	Alpha-Smooth Muscle Actin
AND:	Acide desoxyribonucleique
Apo A-I:	Apolipoprotein A-I
ASAT :	Aspartate aminotransferase
BAT :	Tissu adipeux brun
BHMT:	Bétaïne-Homocysteine methyltransferase
BiP/GRP78:	Immunoglobulin heavy chain-binding protein / Glucose-regulatory protein
BNP:	natriuretic peptide type B
Bp:	Base pair - paire de base
BSA:	Bovine serum albumin
BTG1:	B-cell translocation gene 1
CARM1:	Coactivator-associated arginine methyltransferase1
Cbl:	Cobalamine
CBS:	Cystathionine-β-synthase
CGL:	Cystathionine-β-lyase
CHD:	Coronary heart disease
CNS:	Central nervous system
CoA:	Coenzyme-A
COL1A1:	Collagen, type I, alpha 1
COL1A2:	Collagen, type I, alpha 2
COX:	Cytochrome-c oxydase
CPT1:	Carnitine palmitoyl-transférase
CREB:	cAMP response element-binding
Da:	Dalton
DAC:	Desacetylases
DAPI:	4', 6'-diamidino-2-phenylindole
DBP:	diastolic blood pressure
DHF:	Dihydrofolate
DHFR:	Dihydrofolate reductase
DMG:	Dimethylglycine
DNMT:	DNA methyltransferase - ADN methyltransferase
DNP:	Dinitrophenol
DS:	Sodium dodecylsulfate 5
DSVG :	Dysfonction systolique ventriculaire gauche
DTT :	Dithiotreitol
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
eNOS:	Endothelial nitric oxide synthase
ER :	Estrogen receptor
ERK1\2:	Extracellular signal-regulated kinase
ERR:	Estrogen related receptor alpha
ETF:	Electron-transferring flavoprotein
FABP:	Fatty acids binding protein
FAD:	Flavin adenine dinucleotide

FAO:	Fatty acids oxidation
GAR:	Glycine and Arginine
GCN5:	General control nondepressible (ubiquitous histone acetyltransferase)
GLUT2:	Glucose transporter 2
HADHA:	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
HAT:	Histones acetyltransferases
Hcy:	Homocysteine
HDAC:	Histone deacetyltransferases
HDL:	High-density lipoprotein
HDL-C:	High density lipoprotein-cholesterol
HERP:	Homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein
HNF4:	Hepatocyte Nuclear Factor 4
HOMA:	Homeostasis Model for Assessment of Insulin Resistance
HSP60:	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
IDH3A :	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha
IL-1 beta :	Interleukin-1 beta
IPA:	Ingenuity Pathways Analysis
IR-beta :	Insulin receptor beta
KO:	knock out
LBD:	Ligand-binding domain
LCAD	long-chain acyl-CoA dehydrogenase
LVEF:	left ventricular ejection fraction
MAT:	Methionine adenosyltransferase
MCAD:	Methyl-CoA deshydrogenase
MCM:	Methylmalonyl CoA mutase
MCV:	Maladies cardiovasculaires
MDA:	Malondialdehyde
mHMG-CoAS:	Mitochondrial Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase
MMA:	Methylmalonic acid
MMCoA:	Methylmalonylcoenzyme A
MMP2:	Matrix metalloproteinase-2
MODY:	Maturity onset diabetes of the young
MTHFR:	Methylenetetrahydrofolate reductase
MTP:	Mitochondrial trifunctional protein
MTR:	Methionine synthase
MTRR:	Methionine synthase reductase
Nampt:	Nicotinamide phosphoribosyltransferase enzyme
NASH:	Nonalcoholic steato-hepatitis
NDUFA10:	NADH dehydrogenase (ubiquinone) alpha subcomplex 10
NDUFV2 :	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2
NF-κB:	Nuclear factor kappa B
NR2A1:	Nuclear receptor subfamily 2, group A, member 1
NTD:	Neural tube anomalies
NT-proBNP:	N-terminal natriuretic peptide type B
OCTN2:	The organic cation/carnitine transporter
OR:	Odds ratio
OSCP:	Oligomycin sensitivity-conferring protein
OXPHOS:	Oxidative phosphorylation
PAGE:	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBEF:	Pre-B cell enhancing factor
PBS:	Phosphate buffered saline
PCR:	Polymerase chain reaction
PGC-1:	Proximal proliferator activator receptor gamma coactivator alpha
PL :	Phospholipids

Pol2 :	RNA <i>polymerase II</i>
PPAR alpha:	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPAR gamma:	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPREs :	PPAR response elements
PRMT1 :	Protein arginine methyl transferase
PTM :	Modification post-traductionnelle
RE:	Reticulum endoplasmic
RIP140:	Receptor interacting protein 140
RNase:	Ribonuclease
RNs:	Recepteurs nucleares
RPC:	PGC-1-related coactivator
RT:	Reverse transcription
RT-PCR:	Real-time Reverse Transcription-Polymerase
RXR:	Retinoid X receptor
SBP:	systolic blood pressure
SCAD:	Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase
SDMA	Dimethyl-Arginine, symmetric antibody
SHMT:	Serine hydroxymethyltransferase
Sir2:	Silent information 2
Sirt1:	Silent information regulator1
SOD:	Superoxide dismutase
SREBP-1:	Sterol regulatory element-binding protein 1
TBS:	Tris buffered saline
TC II:	Transcobalamine II
TGF beta-1:	Transforming growth factor beta 1
THF:	Tetrahydrofolate
TIMP-1:	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TML :	Trimethyllysine
TNF-α :	Facteur de nécrose de tumeur
TORC2:	Transcription coactivateur
TRAP:	Thyroid Hormone Receptor-associated Proteins
UCP:	Uncoupling protein
VLCAD	Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase

Contexte de l'étude

Au cours du développement fœtal et postnatal, les tissus et les organes sont progressivement modelés, alternant période de prolifération, différenciation et apoptose, en réponse à des programmes génétiques et épigénétiques bien précis. Tout au long de ce cycle de développement, des facteurs alimentaires ou métaboliques modulent l'expression de certains gènes et toute inadéquation entre les apports nutritionnels et métaboliques, tant qualitatifs que quantitatifs, et les besoins précis de ces processus de maturation/formation durant la fenêtre qui leur est impartie, pourra résulter en un développement anormal ou en une fonction défectueuse de ces tissus ou organes, souvent irréversible.

Le chercheur britannique David Barker, apportait, en 1989 le lien entre la coronaropathie et la malnutrition pendant la vie fœtale. En effet, Barker a mené une étude auprès de 15000 personnes nées avec un poids insuffisant et constaté une forte incidence des maladies cardiovasculaires chez ces sujets. Des études ultérieures sont venues confirmer sa théorie appelée «hypothèse de Barker», selon laquelle l'environnement prénatal et périnatal influe sur les probabilités d'être atteint d'une maladie cardiovasculaire, obésité, insulino-résistance ou diabète, dans la vie adulte.

Au cours de l'embryogenèse, les donneurs de méthyles jouent un rôle essentiel dans les mécanismes épigénétiques et épigénomiques (méthylation/acétylation) qui influencent l'expression des gènes et la signalisation cellulaire et jouent un rôle important dans la physiopathologie du retard de croissance intra-utérin avec des répercussions au cours du développement et tout au long de la vie. Lors d'une carence en donneurs de méthyles, la dysrégulation de ces mécanismes épigénétiques et épigénomiques est observée dans le cerveau, le foie, le cœur et l'estomac.

Cependant, la plupart de ces études portent sur des carences protéino-énergétiques, peu d'études se sont intéressées aux carences de donneurs de méthyles (folates et B12). Récemment, deux études faites en Inde et au Népal ont montré que la carence en B12 pendant la gestation est corrélée à un faible poids à la naissance et à une insulino-résistance.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une exposition des données bibliographiques relatives au sujet de cette thèse. La deuxième partie est dédiée aux articles publiés au cours de ma thèse qui ont permis de mieux comprendre les conséquences d'une

carence en donneurs de méthyles dans les périodes critiques de la vie (gestationnelle et lactation) sur le métabolisme énergétique du tissu hépatique et cardiaque dans un modèle animal, mais également sur une cohorte de sujets sains et cardiaques. La troisième partie consiste en une discussion de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Enfin, la dernière partie est une annexe qui détail le matériel et méthode.

Données bibliographiques

Partie1 : Cycle de monocarbone

1. Homocystéine

L'homocystéine (acide 2-amino-4-mercaptopbutyrique), a été synthétisée par Butz et Vigneaud [1] en 1932, elle doit son nom à sa structure analogue à la cystéine. L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré, formé par la déméthylation de la méthionine [2].

L'Hcy est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. L'Hcy n'est pas codée génétiquement et elle n'est pas incorporée dans la synthèse des protéines. Son rôle est de servir comme intermédiaire dans le métabolisme de la méthionine. Son catabolisme se fait principalement dans les tissus hépatique et rénal par deux voies : la voie de la reméthylation et la voie de la transsulfuration (figure 1) [3]. Le métabolisme de l'Hcy est régulé par l'interaction entre des facteurs génétiques et nutritionnels et dépend largement de l'apport alimentaire en vitamines du groupe B: l'acide folique, la cobalamine, la pyridoxine, la riboflavine et dans une moindre mesure, la choline et la bêtaïne [4]. Une carence dans l'un de ces micronutriments peut conduire à des perturbations du métabolisme de l'Hcy.

2. Métabolisme de l'homocystéine

L'Hcy est métabolisée selon deux voies : soit par reméthylation en méthionine, soit par transsulfuration en cystathionine (Figure 1). Chez l'Homme, 56 % de la méthionine transméthylée est catabolisée par la voie de trans-sulfuration en cystéine et le reste est reméthylé en méthionine [5].

2.1. Voie de la reméthylation

Elle assure la reméthylation de l'Hcy en méthionine selon deux réactions enzymatiques distinctes.

La principale réaction fait intervenir deux enzymes : la 5-MéthylèneTétraHydroFolate (5-MTHF), donneuse de groupement méthyle dont la formation est sous la dépendance d'une enzyme, la 5,10-MTHF réductase, et la Méthionine Synthase (MS) dont le cofacteur est la vitamine B12. Ce transfert du groupe méthyl, qui permet la synthèse de la méthionine, n'est possible qu'en présence de méthylcobalamine ; d'où la synergie d'action entre la vitamine B9 et la vitamine B12.

L'activation de la méthionine en S-Adénosyl-L-Méthionine (SAM) se fait sous l'influence de la Méthionine-Adénosyl-Transférane (MAT) et nécessite une molécule d'ATP. La SAM,

principal donneur de groupement méthyle de l'organisme, cède ensuite ce groupement pour donner naissance à la S-Adénosine-L-Homocystéine (SAH). Cette molécule est hydrolysée en adénosine et en homocystéine par la S-Adénosyl-L-Homocystéine Hydrolase. Dans de conditions physiologiques, la SAH est hydrolysée en homocystéine et en adénosine par une réaction réversible qui est catalysée par SAH hydrolase. D'autre part, l'hydrolyse de SAH dépend de l'élimination efficace de l'Hcy par reméthylation en méthionine ou sa dégradation en cystéine, mais la constante d'équilibre de SAH hydrolase favorise la synthèse de la SAH plutôt que l'hydrolyse.

La deuxième réaction se déroule en grande partie au niveau du foie. Elle est de faible activité, et fait intervenir une enzyme hépatique, la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT). La BHMT joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme de la méthionine par le maintien des concentrations hépatiques de la méthionine pendant les périodes de consommation inadéquate de cet acide aminé [6] et en éliminant de l'Hcy en excès [7]. La bétaine est la molécule donneuse de groupement méthyle. Mais cette voie est moins importante que la précédente au niveau de la paroi vasculaire et même absente dans certains tissus, comme le tissu myocardique [8].

2.2. Voie de la transulfuration

La majorité de l'Hcy n'est pas reméthylée mais catabolisée en cystéine par la voie de la transulfuration. Cette voie permet à la méthionine d'apporter un atome de soufre pour la formation de cystéine.

Sous l'influence de la Cystathionine- β -Synthase (CBS), l'Hcy se condense ensuite avec la sérine pour former la cystathionine, elle-même clivée et désaminée en cystéine et en α -céto butyrate (par la Cystéine γ Lyase [CGL]).

Ces deux réactions nécessitent la présence d'un cofacteur enzymatique, le phosphate de pyridoxal ou vitamine B6.

Contrairement aux autres voies métaboliques, cette dernière est irréversible, ce qui a pour conséquence que la cystéine ne peut être un précurseur pour la synthèse de méthionine [9]. La suppression définitive de l'Hcy dans le cycle de la méthionine se produit par la voie de transulfuration, réaction non réversible, qui implique deux enzymes vitamine B6-dépendantes : la cystathionine β -synthase (CBS) et la cystathionine γ -lyase (CSE) [10]. La

CBS condense l'Hcy avec la sérine pour former la cystathionine et ensuite, le CSE convertit la cystathionine en cystéine et α -cétobutyrate [11].

Chez l'homme, la CBS est exprimée dans le foie, les reins, les muscles, le cerveau et les ovaires mais aussi durant l'embryogenèse dans les systèmes neuronaux et cardiaques [3]. Après la naissance la CBS n'est plus exprimée dans les cardiomyocytes [8]. Le foie est l'organe principal de la dégradation de l'excès de méthionine, il permet le maintien de l'homocystéine à des niveaux adéquats grâce à un ensemble unique d'enzymes, incluant : MAT I / III, CBS, CTH, BHMT, GNMT (glycine N-méthyltransférase). Pour cette raison, dans le tissu hépatique il y a une concentration élevée de méthionine qui peut à son tour augmenter la concentration d'AdoMet. Les principaux mécanismes régulateurs des niveaux d'Hcy sont l'inhibition de la MTHFR et l'activation de la CBS [12, 13].

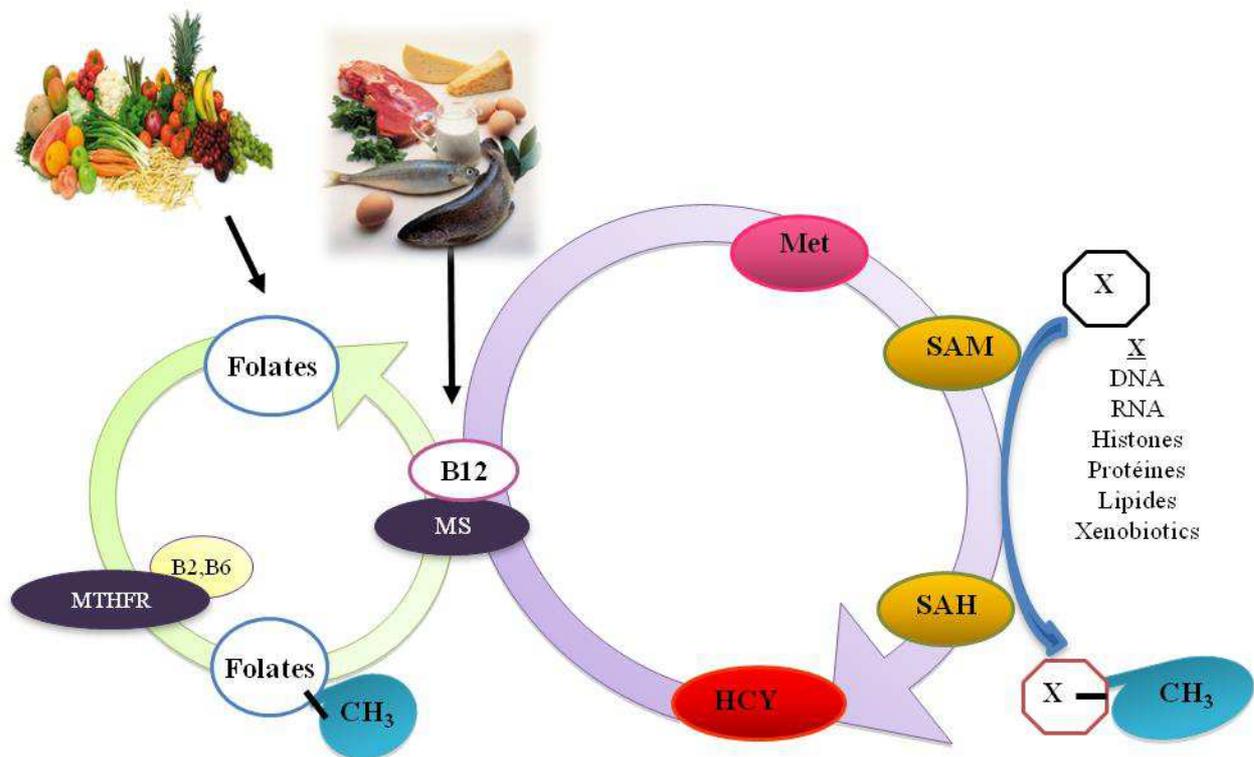


Figure 1. Métabolisme de l'homocystéine

3. Adénosylhomocystéine (AdoHcy)

Il existe plus de cent méthyltransférases différentes. Chacune de ces réactions produit de la S-adénosylhomocystéine (AdoHcy) qui est un fort inhibiteur de la plupart des méthyltransférases. L'AdoHcy hydrolase (SAHH) hydrolyse l'AdoHcy en l'adénosine et en Hcy. L'équilibre métabolique de la SAHH favorise la formation d'AdoHcy. L'Hcy et l'adénosine toutes les deux ont besoin d'être métabolisées ou transportées hors de la cellule pour empêcher l'accumulation d'AdoHcy [3].

4. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

Les déterminants de l'homocystéine totale plasmatique sont complexes et impliquent des facteurs nutritionnels, environnementaux, et génétiques (Tableau 1).

4.1. Facteurs nutritionnels

4.1.1. Les folates ou vitamine B9

La vitamine B9, comme toutes les vitamines du groupe B, est hydrosoluble [14]. Les folates facilitent le transfert des unités mono-carbonées à partir de multiples biomolécules vers des nombreuses réactions biosynthétiques telles que la synthèse de purine et de pyrimidine, la synthèse de la méthionine à partir de l'Hcy [15].

Pour être métaboliquement active, l'acide folique doit être réduit par une enzyme, la dihydrofolate réductase, qui fixe d'abord 2, puis 4 atomes d'hydrogène sur la molécule, ce qui explique sa grande sensibilité à l'oxydation, donnant formation au tétrahydrofolate (THF) et ses dérivés qui sont les formes biologiquement actives de l'acide folique, ces dérivés sont des co-substrats spécialisés pour une variété d'enzymes impliquées dans métabolisme des mono carbonés. Les principaux dérivés méthylés de folates sont : le N10-formyl tétrahydrofolate et le N5, N10-méthylène tétrahydrofolate (5,10-MTHF) ce sont des donneurs de groupements méthyles pour la synthèse des nucléotides. Le N5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) est un autre dérivé important biologiquement actif de l'acide folique produit à partir de 5,10-MTHF, la réaction étant catalysée par la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) [11], ainsi on obtient un groupement méthyl qui servira pour la réméthylation de l'Hcy en méthionine par la méthionine synthase (MS). L'activité méthionine synthase est très importante pour maintenir d'une part une concentration en méthionine suffisante et d'autre part, pour empêcher l'accumulation d'Hcy dans la cellule. L'activité de la méthionine synthase nécessite comme cofacteur la vitamine B12 et dépend également de la présence d'une deuxième enzyme, la

méthionine synthase réductase, qui maintient la liaison entre méthionine synthétase et cobalamine dans son état réduit et complètement actif [14].

4.1.2. Vitamine B12

La vitamine B12 appartient à la famille des corrinoïdes. La structure tridimensionnelle de la B12 a été déterminée par Dorothy Crowfoot Hodgkin en 1956, en utilisant cristallographie aux rayons X [16]. Elle est constituée d'un noyau corrine et d'un ribonucléotide reliés entre eux par un pont amino-2-propanol (Figure 2) :

- **Le ribonucléotide** : il résulte de la condensation de la 5,6 - diméthylbenzimidazole (= base azotée) avec un sucre, le ribose 3' phosphate.

Le noyau corrine : il est formé d'un atome de Co central relié à 4 noyaux pyrroles ainsi qu'à un ligand anionique (- X), dont la nature permettra de définir :

- **La cyanocobalamine** (- X = - CN), l'hydroxocobalamine (- X = -OH) : ces 2 composés sont à Co 3^+ , stables et utilisés en thérapeutique.
- **La méthylcobalamine** (- X = - CH₃), et la 5'-désoxyadenosyl cobalamine (- X = -5'd Ad) sont les formes coenzymes actives (avec Co 1^+).

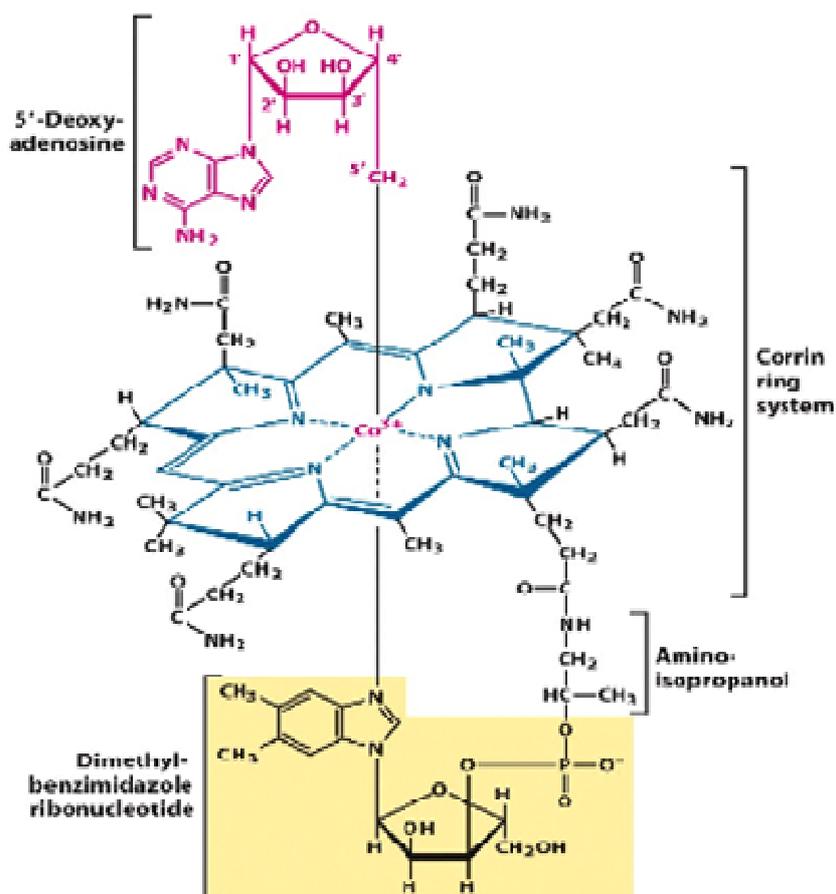


Figure 2. Structure de la vitamine B12-(d'après Leninger Principles of Biochemistry, Firth Edition, 2008) [14]

La vitamine B12 est un nutriment essentiel qui fonctionne comme une coenzyme dans deux processus métaboliques : la conversion de la méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA par la méthylmalonyl CoA mutase (MCM) au niveau de la mitochondrie. Et la réméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase (MS) [5], au niveau du cytosol des cellules [17].

4.2. Facteurs environnementaux

Les principaux facteurs environnementaux qui contribuent à une hyperhomocystéinémie modérée, incluent l'âge, le sexe, certains médicaments et différentes conditions pathologiques. Les personnes âgées ont des taux d'Hcy plus élevés. Dans ce groupe d'âge, le statut vitaminique a une influence majeure [18]. Les hommes ont une Hcy plus élevée que les femmes, ceci est dû à une plus grande masse musculaire, mais aussi aux effets des hormones sexuelles [19, 20]. L'hyperhomocystéinémie modérée peut-être liée à la prise des certains médicaments comme le méthotrexate, la phénytoïne, la carbamazépine qui interfèrent avec le métabolisme des folates, le monoxyde d'azote, qui inactivent la vitamine B12, l'azaribine qui

empêche l'activité de la CBS [21]. Les contraceptifs, la pénicillamine ou les oestrogènes oraux diminuent l'Hcy [21]. Mais d'une manière générale, des suppléments en folates et/ou en vitamine B12 sont suffisants pour abaisser le taux d'Hcy [22]. Des conditions pathologiques comme l'hypothyroïdie, l'insuffisance rénale, les affections inflammatoires (notamment intestinales), l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, le diabète de type II, les maladies lymphoprolifératives et certains cancers (sein, ovaire, pancréas) peuvent augmenter les taux d'Hcy [23].

4.3. Facteurs Génétiques

Certains polymorphismes des enzymes intervenant dans le cycle des folates et de la reméthylation de l'homocystéine sont associés à une augmentation de la concentration en Hcy. Il s'agit principalement des variantes génétiques des enzymes 5,10-Méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR C677T [rs59514310 –avant rs1801130-], A1298C [rs1801131]), Méthionine synthase (MTR A2756G [rs1805087]), Méthionine synthase réductase (MTRR A66G [rs1801394]). De plus, un polymorphisme présent sur un des transporteurs sérique de la vitamine B12, la transcobalamine (TCN C776G [rs1801198]) peut également s'associer à une hyperhomocystéinémie modérée [24, 25].

Tableau 1. Causes d'une hyperhomocystéinémie

Légère (15–30 $\mu\text{mol/L}$)
<ul style="list-style-type: none">• Insuffisance rénale légère à modérée• Médicaments : antiépileptiques, méthotrexate, théophylline, médicaments immunosuppresseurs, fibrates, lévodopa, la metformine• Hypothyroïdie• Certains cancers• Psoriasis• Variantes génétiques du gène du méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) 677C>T• Déficit en folates ou en vitamine B12• Age• Apport élevé en protéines• Faible consommation de légumes ou de fruits• Drépanocytose
Modérée (30–100 $\mu\text{mol/L}$)
<ul style="list-style-type: none">• Insuffisance rénale terminale• Carence modérée en vitamine B12• Carence en folates• Variante de MTHFR 677C>T associée à une carence en folates
Sévère ($\geq 100 \mu\text{mol/L}$)
<ul style="list-style-type: none">• Carence profonde en vitamine B12• Déficit héréditaire en cystathionine béta-synthase• Déficit héréditaire en méthylène tétrahydrofolate réductase• Déficit héréditaire en méthionine synthase (MTR)

Partie 2 : Pathologies en lien avec une hyperhomocysteinémie

1. Homocystéine et grossesse :

1.1. Facteurs nutritionnels et génétiques chez la femme.

Comme mentionné précédemment, le sexe est un déterminant important de la concentration en Hcy, les femmes ont des concentrations plus basse [26]. Les femmes possèdent une masse musculaire plus faible, il est également montré que l'Hcy est associée positivement à la quantité de créatinine dans le sérum [27, 28] et inversement associée à la densité minérale osseuse chez les femmes [27]. En dehors de la grossesse, les hormones féminines, sous leurs formes endogènes ou synthétiques, sont inversement corrélées à l'Hcy [29, 30]. Après la puberté, l'Hcy est inférieure chez les femmes par rapport aux hommes et restera moins élevée chez les femmes tout au long de leur vie féconde [27]. L'Hcy a également été signalée être plus basse dans la phase lutéale que dans la phase folliculaire au cours du cycle menstruel [30] et dans la période féconde comparée aux femmes ménopausées [27].

1.2. Les changements de la concentration d'Hcy pendant la grossesse normale

Pendant la grossesse, l'Hcy est affectée par les mêmes facteurs que dans l'état de non-grossesse. Cependant, la variation considérable d'Hcy qui survient pendant la grossesse peut-être le résultat d'une adaptation physiologique à cette condition [29, 30]. Quelques études montrent que la concentration en Hcy maternelle est sensiblement réduite au cours des deux premiers trimestres de la grossesse par rapport aux concentrations de la période préconceptionnelle [30, 31], cette réduction s'explique peut-être par la supplémentation en acide folique [30]. Indépendamment de la cause, le taux d'Hcy diminue pendant la grossesse [3].

1.3. Embryon, placenta, et développement fœtal

1.3.1. Anomalies du tube neural (NTD)

Au cours de la grossesse, une déficience en folates augmente le risque d'une anomalie dans la formation du tube neuronal (Figure 3) [31, 32].

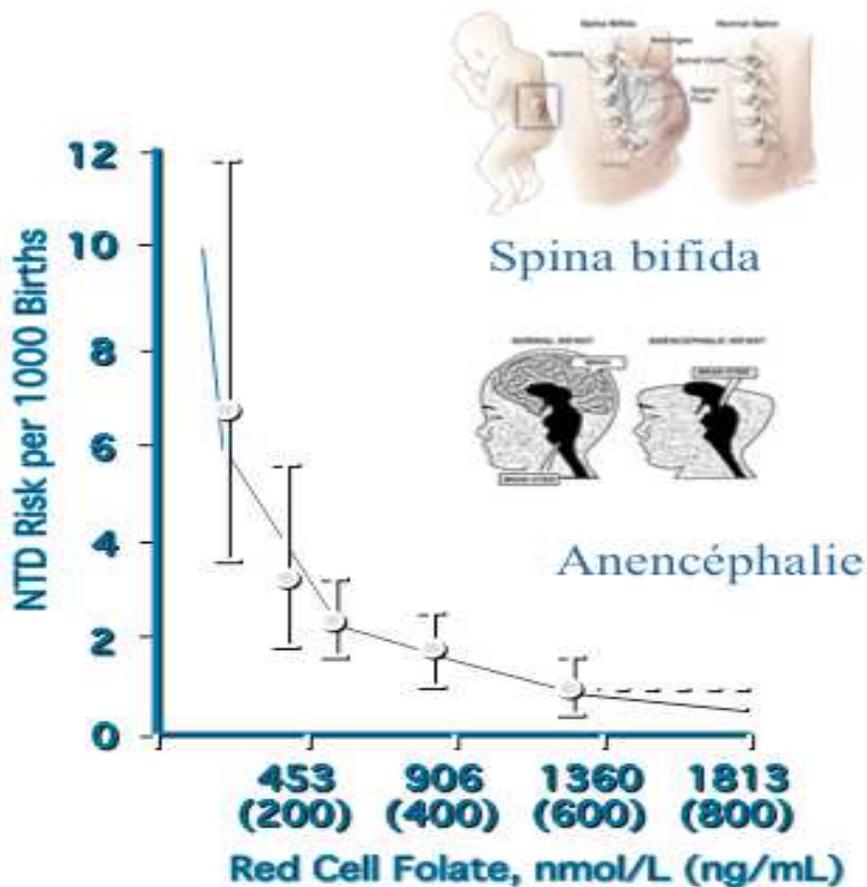


Figure 3. Anomalies du tube neural (d'après Daly et al 1995)[33]

1.3.2. Cardiopathies congénitales

Une concentration en Hcy maternelle plus élevée a également été associée à des malformations cardiaques congénitales. La moyenne en Hcy entre 3 et 6 mois après l'accouchement est plus élevée chez les mères des enfants atteints de malformations cardiaques congénitales que dans les contrôles [34].

1.3.3. Développement du placenta

Les ARN messagers correspondant à la méthionine synthase et à la 5,10-MTHFR sont fortement exprimés dans le placenta d'humain au cours de grossesse tandis que les niveaux d'expression des transcrits de la CBS et de la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT) sont respectivement faibles et indétectables [35]. Une grande quantité de folates est donc nécessaire pour métaboliser l'homocystéine placentaire. Il a récemment été démontré que l'homocystéine peut traverser le placenta humain de la mère vers le fœtus [36].

La présence d'homocystéine dans la membrane du placenta pourrait potentiellement conduire à des altérations du métabolisme placentaire, de la fonction vasculaire, et de l'induction de l'apoptose [35].

1.3.4. Taille du fœtus et retard de croissance

Différentes études ont étudié l'association entre l'hyperhomocytéinémie et la croissance fœtale. Cependant, l'association négative entre l'Hcy maternelle et le poids à la naissance est controversée [37-39].

2. Homocystéine et maladies hépatiques

Le métabolisme de la méthionine, et ainsi la possibilité de méthylation, a lieu en majorité dans le foie (80 %). Trois des enzymes clés du métabolisme de l'homocystéine sont exclusivement hépatiques. C'est le cas de la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT) et de la méthionine adenosyltransférase (MAT) qui existe sous deux formes : MAT2 qui est ubiquitaire et MAT1 qui n'existe que dans les hépatocytes [40]. Enfin la voie de la transsulfuration est uniquement hépatique [40]. En effet, la première enzyme de cette voie, la cystathionine β -synthétase, est uniquement hépatique. En cas de cirrhose, la synthèse de SAM est profondément diminuée [41].

2.1. Stéatose hépatique

La stéatose hépatique non alcoolique (NASH) est la cause la plus importante de maladie hépatique chronique et est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique associé au diabète de type 2 [42]. La prévalence de la stéatose hépatique non alcoolique dans la population générale atteint 3 % [43], elle affecte 2,6 % des enfants, et 22,5 à 52,8 % chez les enfants obèses.

La stéatose hépatique non alcoolique se réfère à un large spectre de lésions hépatiques, qui vont de la stéatose simple ou accumulation de triglycérides intracellulaires, à l'inflammation, la fibrose et la cirrhose. Les mécanismes impliqués dans l'accumulation de triglycérides dans le foie et les lésions hépatocellulaires ultérieures sont multifactoriels et ne sont pas complètement élucidés [44, 45]. Les anomalies métaboliques primaires conduisant à une accumulation des lipides ne sont pas bien comprises, mais elles pourraient consister en des altérations dans les voies d'absorption, la synthèse, la dégradation, ou de la sécrétion des lipides hépatiques [46-48]. Il existe également une accumulation d'acide dicarboxylique,

celui-ci est potentiellement cytotoxique et il peut être produit par la ω -oxydation. Ce mécanisme est en lien avec la β -oxydation mitochondrial et péroxisomale. Une déficience des enzymes de la β -oxydation a été observée comme cause de stéatose micro vésiculaire et stéato-hépatite [49]. La déficience en acyl-coenzyme A oxydase perturbe l'oxydation des acides gras à très longue chaîne et des acides dicarboxyliques, ceci conduit à une stéatose micro vésiculaire et à une stéatose-hépatite. La déficience de l'acyl-coenzyme A oxydase provoque aussi une activation du « Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha » (PPAR- α), et par conséquent la transcription des gènes qui sont régulés par PPAR- α [50].

2.2. Stéatose hépatique chez l'homme

Les travaux concernant la recherche d'un lien entre stéatose et homocystéine chez l'homme sont peu nombreux et portent en général uniquement sur des analyses de sous-groupes.

Gulsen et al. [51] ont étudié 71 malades atteints de stéatopathie, 48 avec une NASH (Non-alcoholic –steato-hepatitis), 36 malades atteints d'hépatite virale (20 hépatites B) et 30 sujets témoins. Tous les malades ont eu un dosage d'homocystéine plasmatique. Les concentrations en homocystéine étaient significativement plus élevées dans le groupe stéatopathie, comparées aux groupes hépatite virale et témoin. De plus, l'homocystéine était significativement plus élevée en cas de NASH qu'en cas de stéatose simple. Il existait une forte corrélation entre la concentration d'homocystéine, le score de fibrose et le score nécrotico-inflammatoire ($P < 0,01$).

Enfin, les auteurs ont trouvé un seuil de concentration d'homocystéine plasmatique de 11,9 ng/mL pour affirmer le diagnostic de NASH, avec une sensibilité de 91,7 %, et une spécificité de 95,6 %. En analyse multivariée, il existait une association entre l'index d'insulino-résistance mesurée par test HOMA (*Homeostasis Model for Assessment of Insulin Resistance*) et la concentration plasmatique d'homocystéine. Les auteurs ont suggéré que l'homocystéine favoriserait la stéatose hépatique par surexpression de SREBP-1, et l'inflammation par la stimulation de cytokines pro-inflammatoires, notamment par l'activation du facteur transcriptionnelle NF kappa B [52].

2.3. Stéatose hépatique chez l'animal

Les souris invalidées pour certaines enzymes régulant le métabolisme de l'homocystéine ont une stéatose hépatique massive. En effet, les souris invalidées en cystathionine synthétase ont une stéatose hépatique sévère de type microvésiculaire [53]. Les souris déficitaires en MAT 1

ont une stéatohépatite avec risque accru de carcinome hépatocellulaire [54]. Enfin, les souris KO pour le gène MTHFR [55] ont une hyperhomocystéinémie avec élévation, au niveau hépatique, de S-adenosyl homocystéine (SAH) et baisse de S-adenosyl methionine (SAM). Ces souris ont toutes une stéatose hépatique sévère.

Ainsi toute anomalie enzymatique du métabolisme de l'homocystéine responsable d'hyperhomocystéinémie est associée au minimum à une stéatose hépatique de type microvésiculaire. Chez l'animal, au cours de l'alcoolisation aiguë, de nombreux travaux expérimentaux ont montré un stress du réticulum endoplasmique lié à une hyperhomocystéinémie [52].

Les mécanismes cellulaires possibles par lesquels l'élévation de l'homocystéine favorise la stéatose peuvent être de différentes natures: stress oxydant, stress du réticulum endoplasmique (RE), altération du métabolisme de l'homocystéine ou des problèmes de facteurs de transcription différents nécessaires pour la régulation des gènes dans la voie de synthèse des lipides. L'oxydation des acides gras, et la fonction mitochondriale sont principalement altérées dans la maladie du foie [45].

3. Hcy et maladies cardio-vasculaires (MCV)

3.1. MCV chez l'homme

En 1976, Wilcken *et al.* [56] ont suggéré une association entre les niveaux d'homocystéine circulante et les maladies cardiovasculaires (MCV). Clarke *et al.* [57] ont démontré dans une étude cas-témoins que l'association avec les MCV est indépendante des facteurs de risque classiques, comme le tabagisme, l'hypercholestérolémie et l'hypertension artérielle. Ces résultats ont été ensuite reproduits par plusieurs études de cas-témoins, et dans la première méta-analyse de toutes ces études par Boushey *et al.* [58] où a montré qu'une augmentation de la concentration d'Hcy de 5 $\mu\text{mol/L}$ est associée aux maladies cardiovasculaires avec un odds ratio (OR) de 1,6 [intervalle de confiance 95 % (IC) 1,3 à 1,9]. En effet, cette méta-analyse suggère que l'augmentation du risque de maladies coronariennes avec une homocystéine plus élevée de 5 $\mu\text{mol/L}$, est comparable à celui d'un taux de cholestérol de 0,5 mmol/L plus élevé [59].

La régulation de la production d'oxyde nitrique vasculaire par l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) peut influencer l'athérogènes et la thrombose. En effet, l'expression de

l'eNOS dans l'endothélium vasculaire est déterminée en partie par méthylation de l'ADN et par des modifications des histones [60].

La plupart des études indiquent qu'une hyperhomocystéinémie est associée à des altérations dans le métabolisme des lipides et peut jouer un rôle dans la pathologie vasculaire [61-63], et des études ultérieures suggèrent que des altérations épigénétiques peuvent jouer un rôle dans ces processus [64, 65]. De plus, dans notre laboratoire, Guéant-Rodriguez et al.[66], ont démontré une association entre l'hyperhomocystéinémie modérée et la dysfonction systolique ventriculaire gauche (DSVG) et plus spécifiquement avec la fraction d'éjection ventriculaire gauche chez 709 patients recrutés de manière consécutive lors de la réalisation d'une angiographie coronaire diagnostique et groupés en fonction de la présence ou non de lésions des artères coronaires. L'analyse de régression confirme l'association significative de l'Hcy avec la FEVG. C'est-à-dire, la fraction d'éjection est un déterminant de l'homocystéine chez les patients avec une dysfonction ventriculaire gauche, indépendamment de la maladie coronaire, cela peut expliquer le rôle néfaste de l'homocystéine dans les maladies cardiovasculaires.

1.1. MCV chez l'animal

Des études réalisées chez l'animal suggèrent que l'homocystéine altérerait les propriétés élastiques de la paroi artérielle. Des études récentes ont évoqué la possibilité d'interaction de l'homocystéine avec les médiateurs physiologiques de la matrice endothéliale par l'intermédiaire de mécanisme oxydatif et d'une diminution de l'activité biologique du monoxyde d'azote conduisant à un dysfonctionnement endothélial avec effets de proathérosclérose [67-69].

Plus récemment, une étude menée dans notre laboratoire par mon prédécesseur, Maira Moreno a montré pour la première fois, un lien entre l'insuffisance cardiaque (développement d'une cardiomyopathie chez le raton) et la carence maternelle pendant la grossesse et l'allaitement de donneurs/précurseurs méthylés (folates et vitamine B12). L'hypertrophie cardiaque qui a été observée dans cette étude résulte d'une altération de l'oxydation d'acides gras et du métabolisme énergétique comme conséquence d'une synthèse et d'une importation altérée du principal transporteur de la carnitine : OCTN2 [70]. Le résumé de ces résultats est montré ici : (figures 4, 5, 6, 7,8 et 9)

- Les ratons carencés sont nettement plus petits à la naissance par rapport aux ratons nés d'une mère non carencée.



Figure 4. Différents stades du développement (J13, J21) des ratons soumis à un régime déficient en groupement méthyles

Au niveau histologique, dans ce modèle nutritionnel, la carence en folates et en vitamine B12 induit une augmentation de l'épaisseur des parois du myocarde chez les ratons carencés par rapport aux témoins (Figure 5).

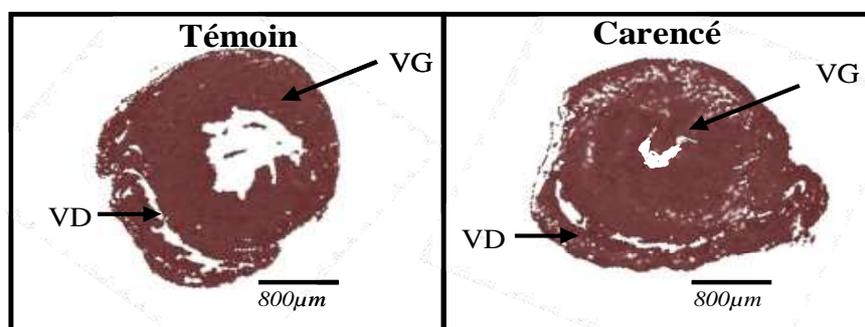


Figure 5. Coupes du cœur de ratons âgés de 21 jours et nés de mère ayant reçu un régime normal (gauche) ou un régime carencé (droite). Ventricule droit (VD) Ventricule gauche (VG).

En plus la tomographie à émission de positrons (PET) a montré que la cavité du ventricule gauche chez le raton carencé est plus petite par rapport au témoin (Figure 6). Ces résultats sont en accord avec l'analyse histologique qui montre une augmentation de l'épaisseur des parois du myocarde du ventricule gauche, ce qui conduit à une réduction du diamètre de la cavité. Ceci confirme la présence d'une hypertrophie cardiaque du ventricule gauche.

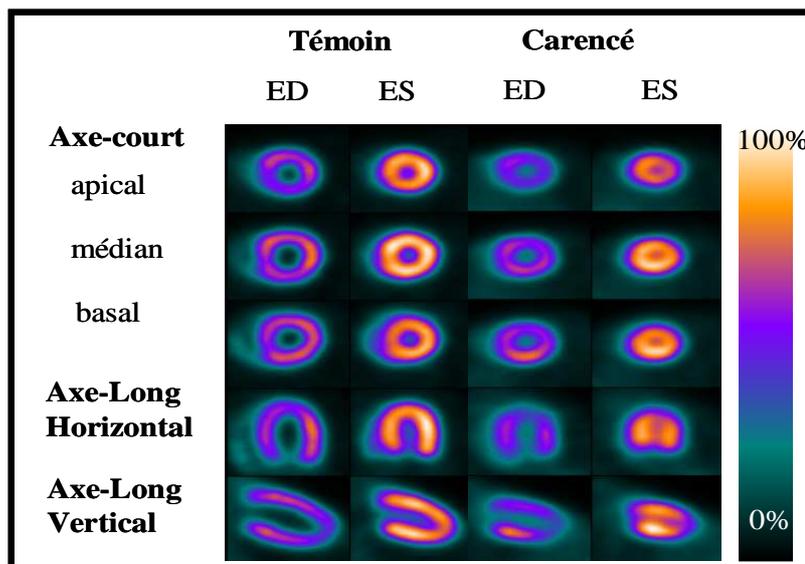


Figure 6. Analyses fonctionnelle du cœur de rats témoin et carencé en utilisant la tomographie à émission de positrons.

Au même temps, les animaux carencés ont une baisse significative des concentrations plasmatiques en carnitine libre, totale et acétylcarnitine. En revanche, il y a une augmentation significative des acylcarnitines à chaînes moyennes, courtes et longues chez les animaux carencés par rapport aux témoins (Figure 7).

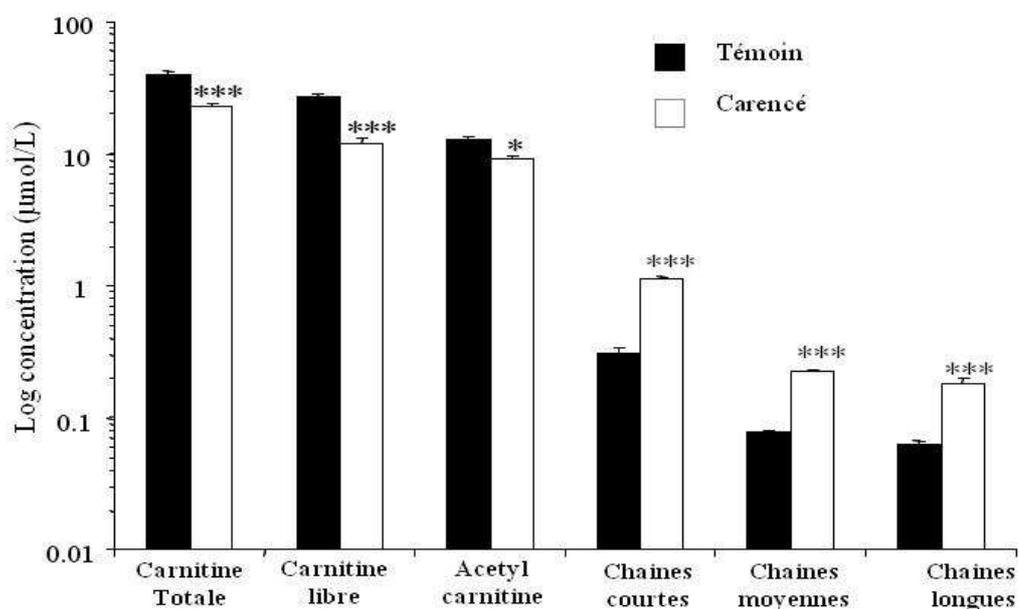


Figure 7. Concentrations plasmatiques en dérivés de carnitine chez les rats. Valeurs : Moyenne \pm écartypes (Différence significative * $p < 0,05$; *** $p = 0,001$), ANOVA, $n = 8$

Aussi l'analyse immunohistochimique du principal transporteur de carnitine dans les cardiomyocytes (OCTN2) a montré une diminution de la concentration de ce transporteur OCTN2 chez les animaux carencés.

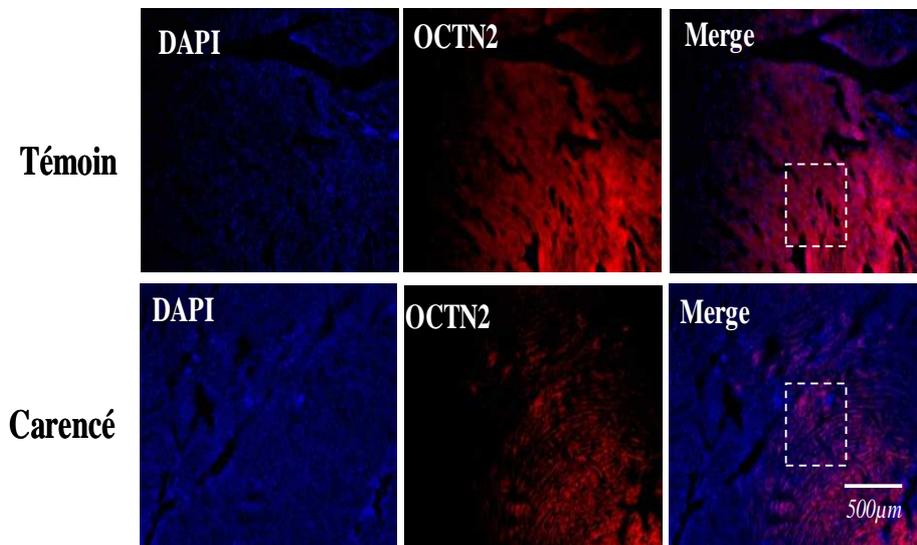


Figure 8. Détermination de l'expression d'OCTN2 par analyse immunohistochimique chez les rats. Les images ont été prises à partir d'un microscope Leica (objectif x4).

Par ailleurs l'étude des activités des enzymes de la chaîne respiratoire montre une diminution de l'activité des complexes I et II chez les animaux carencés, mais cette diminution est plus marquée pour le complexe I. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par les oxygraphies (Figure 9).

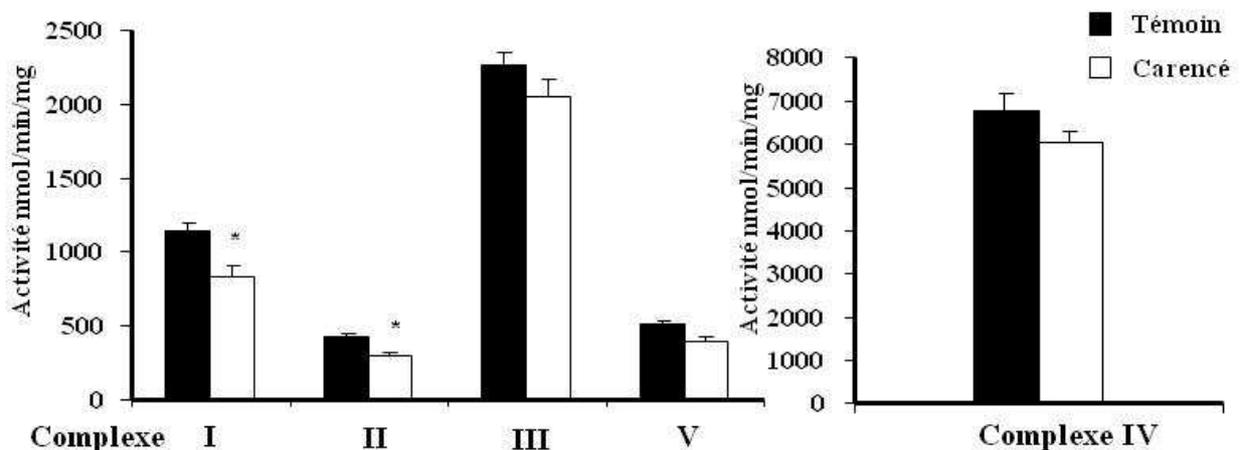


Figure 9. Activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire dans le cœur de rats de 21 jours. (*P<0, 05), ANOVA n=20

Partie 3 : Métabolisme énergétique mitochondrial

Selon l'hypothèse endosymbiotique, les mitochondries dérivent d'une ancienne α -protéobactérie endocytée par une cellule eucaryote primordiale (~1,5 à 2 milliards d'années). Les mitochondries ont un rôle central dans la conversion d'énergie [71]. En fait, les mitochondries sont considérées comme les «gardiens de la vie cellulaire ou de la mort». Les principales fonctions des mitochondries comprennent la production de plus de 90% de l'ATP cellulaire [72]. Le processus de la phosphorylation oxydative mitochondriale est responsable de la conversion de l'énergie de macronutriments à l'ATP grâce à des réactions exquisément couplées et coordonnées où les macronutriments sont oxydés (par exemple, le glucose, acides gras et acides aminés), l'oxygène est réduit en eau, et l'adénosine diphosphate (ADP) est phosphorylée en ATP [73].

1. La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire est un ensemble de complexes protéiques qui assurent un transfert de protons et/ou d'électrons. Elle produit de l'eau et conduit à la synthèse d'ATP. L'eau est produite à partir de l'hydrogène apporté par les coenzymes réduits FADH₂ et NDAH⁺, H⁺, qui sont les substrats des complexes enzymatiques constituant la chaîne respiratoire, et l'oxygène apporté par la respiration. L'ATP est obtenue par phosphorylation de l'ADP en utilisant l'énergie libérée par la chaîne d'oxydoréduction. La chaîne respiratoire est localisée dans la membrane interne mitochondriale [74, 75].

Composants de la chaîne respiratoire :

Complexe I : NADH-coenzyme Q oxydoréductase,

Complexe II : succinate-coenzyme Q oxydoréductase,

Complexe III : Coenzyme Q-cytochrome C oxydoréductase,

Complexe IV : Cytochrome C oxydase.

Complexe V: ATP synthétase

Le coenzyme Q (ubiquinone) et le cytochrome C sont des transporteurs mobiles de la chaîne respiratoire.

1.1 NADH-ubiquinone oxydoréductase ou Complexe I:

Le complexe I (CI), possède une masse d'environ 980 kDa, il est le premier et le plus important des complexes enzymatiques de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (ETC). Cette enzyme membranaire est une NADH-ubiquinone oxydoréductase et se compose de 45 à 48 sous-unités de protéines indépendantes [76, 77]. La fonction principale du complexe I est le transfert d'électrons de NADH vers l'ubiquinone dans une réaction qui est couplée à une translocation de protons à travers la membrane mitochondriale interne pour conduire à la synthèse d'ATP. CI joue un rôle crucial dans la production d'ATP et est également une source importante de production des espèces réactives à l'oxygène (ROS) [77].

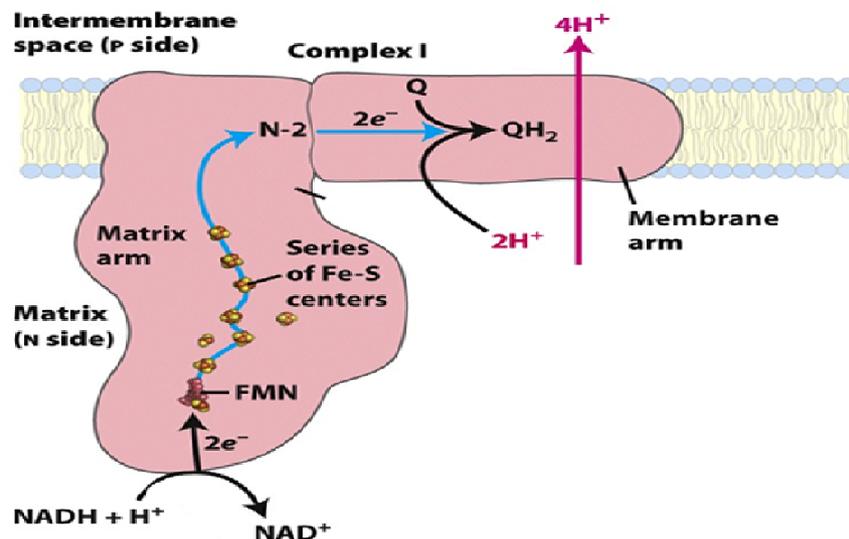


Figure 10. NADH-ubiquinone oxydoréductase (D'après Leninger Principles of Biochemistry, Freeman and Company 2008)[14]

1.2 Succinate-ubiquinone oxydoréductase ou Complexe II :

Le Complexe II mitochondrial est une protéine membranaire composée de quatre sous-unités. Elle catalyse le transfert de deux électrons sur l'ubiquinone en transformant le succinate en fumarate dans la membrane interne des mitochondries. En plus de sa fonction de déshydrogénase dans le système respiratoire, le complexe II joue un rôle important dans le cycle de Krebs. C'est la seule enzyme qui participe à la fois au cycle de l'acide citrique et à la chaîne de transport des électrons [78, 79].

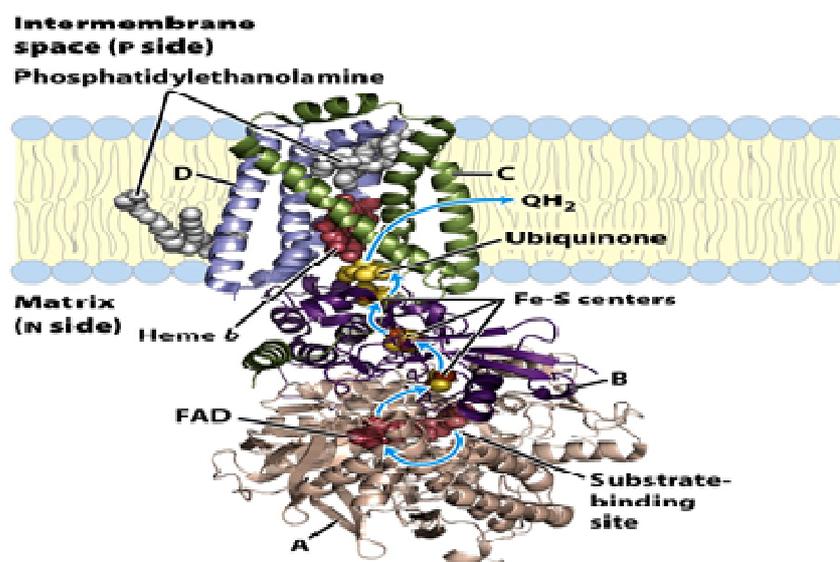


Figure 11. Succinate-ubiquinone oxydoréductase, (D'après Leninger Principles of Biochemistry, Freeman and Company 2008)[14]

1.3 Complexe BC1 s ou ubiquinone cytochrome C réductase ou Complexe III :

Les mitochondries des mammifères contiennent jusqu'à 11 sous-unités du complexe III (cœur, foie), mais seulement une seule, le cytochrome b, est codée par le génome mitochondrial [80]. Au contact du complexe III, l'ubiquinol QH₂ se réoxyde en ubiquinone Q et libère deux protons dans l'espace intermembranaire. Les électrons cédés se distribuent sur les deux groupements hème (bL et bH) du cytochrome b (cyt b), puis sont successivement donnés au cytochrome c (cyt c) via la protéine de Rieske (FeS) et le cytochrome c1 (cyt c1). Un cycle complexe de transferts d'électrons, mettant en jeu une seconde molécule d'ubiquinone (cycle Q), fait passer deux autres protons de la matrice à l'espace intermembranaire. Le Cytochrome c qui est une petite protéine (12000 Da) très mobile à la surface de la membrane (côté externe), transporte successivement les électrons, un par un, vers le complexe IV [81]. Le Complexe III utilise l'énergie libérée pour la translocation vectorielle de deux protons (H⁺ / QH₂) de la matrice vers l'espace intermembranaire, où il libère deux protons supplémentaires (scalaire, H⁺ / QH₂). La semi-ubiquinone participe au transfert d'électrons / protons catalysé par le complexe III [82].

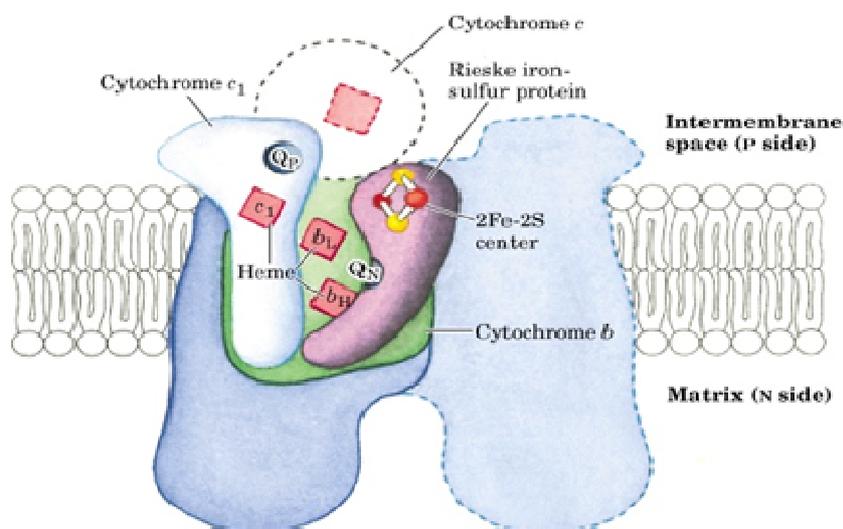


Figure 12. Complexe BC1s ou ubiquinone cytochrome C réductase, (D'après Leninger Principles of Biochemistry, Freeman and Company 2008)[14]

1.4 Cytochrome C Oxydase ou Complexe IV :

Chez les mammifères le cytochrome c oxydase (COX) est le complexe terminal (complexe IV) de la chaîne de transfert d'électrons. Le complexe contient deux groupes hèmes les cytochromes a (cys a) et a3 (cyt a3) ainsi que deux atomes de cuivre CuA et CuB portés par les protéines. Chez les mammifères trois sous-unités de ce complexe sont synthétisées dans les mitochondries. Ce complexe catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Dans le processus, l'oxygène se lie aux quatre protons de la phase aqueuse interne pour donner deux molécules d'eau, de plus, la translocation des quatre protons à travers la membrane aide à établir une différence transmembranaire de protons, potentiel électrochimique que l'ATP synthétase utilise ensuite pour synthétiser l'ATP. Le complexe cytochrome c oxydase a également été suggéré comme un site majeur pour la régulation de la phosphorylation oxydative [83].

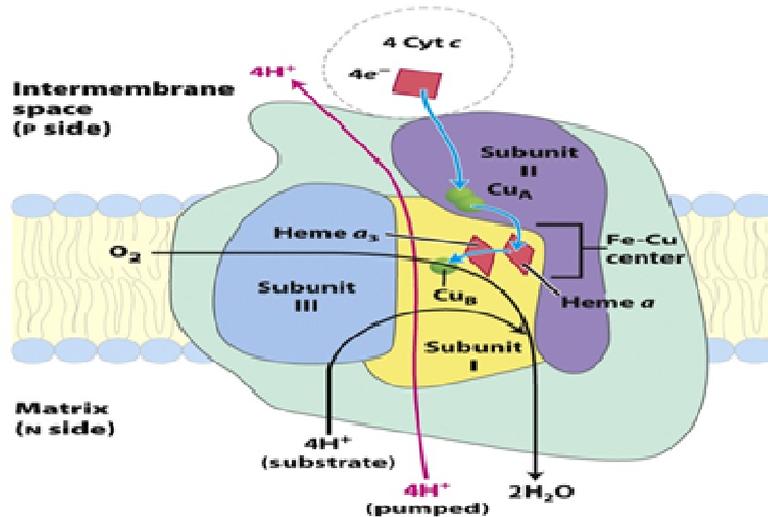


Figure 13. Cytochrome C oxydase, (D'après Leninger, Principles of Biochemistry, Freeman and Company 2008)[14]

1.5 F₀F₁-ATPase/ATP synthétase ou Complexe V :

La F₀F₁-ATPase est une enzyme ubiquitaire qui est présente dans la membrane interne des mitochondries eucaryotes et agit comme le moteur de la cellule en synthétisant l'ATP. Sous certaines conditions, le complexe peut aussi fonctionner en sens inverse : hydrolyse de l'ATP et pompage des protons. L'enzyme peut être séparée en deux grands complexes: F₁ et F₀. La F₁ est un complexe soluble dans l'eau catalytique constitué de cinq sous-unités ($\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$), avec le site catalytique situé sur la sous-unité β . F₀ est composée de plusieurs protéines membranaires (a, b, c, d, e, F₆, A6L) et l'oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP), qui contribue à la région de la tige entre F₀ et F₁. De plus, un peptide natif est également lié à F₁ en sous tension, condition qui sert à inhiber l'activité ATPase de l'enzyme (F₁ inhibitor protein, IF₁). Le resvératrol et les isoflavones (par exemple, la génistéine) peuvent inhiber la synthétase mitochondriale F₀F₁-ATPase/ATP [84, 85].

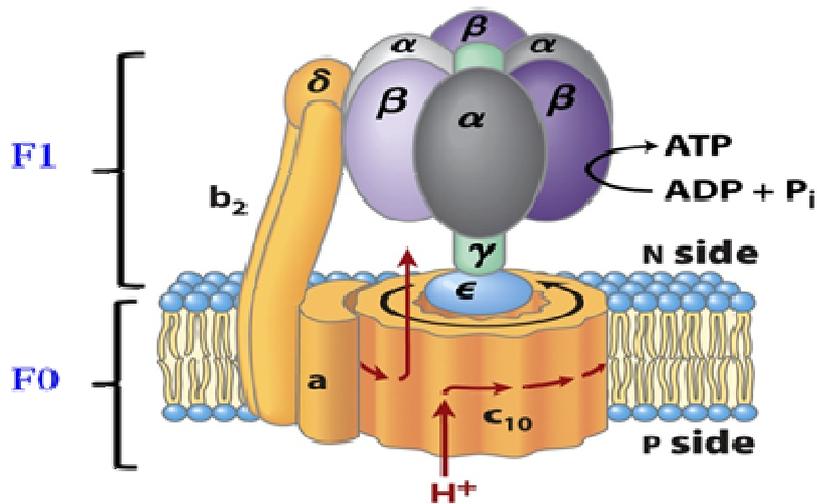


Figure 14. F0F1-ATPase/ATP synthétase, (D'après Leninger, Principles of Biochemistry, Freeman and Company 2008)[14]

1.6 NADH déshydrogénase ubiquinone flavoprotein 2

La NADH déshydrogénase (ubiquinone) flavoprotéine 2 (NDUFV2) est une protéine de 24kDa, appartenant à l'une des sous-unités de complexes I et qui est très conservée chez les bactéries et les mammifères. Chez les mammifères, l'enzyme contient 45 chaînes polypeptidiques séparées dont 7 sont codées par le génome mitochondrial. Elle catalyse le transfert des électrons de la NADH vers la coenzyme Q. Elle contient également 8 clusters fer-soufre [2Fe-2S] et un groupe prosthétique flavine [86].

1.7 NADH déshydrogénase ubiquinone alpha subcomplexe 10

NDUFA10 est une des sous unités du complexe I dans la fraction protéique hydrophobe de ce complexe et possède un poids moléculaire de 42kDa. Elle transfère les électrons du NADH vers l'ubiquinone [87].

1.8 Chaperonin HSPD1 (*heat shock 60kDa protein 1*)

Les protéines chaperonnes sont présentes dans les différents compartiments de la cellule et elles sont chargées du repliement et de l'assemblage des protéines récemment synthétisées. La HSP60 se compose de 573 acides aminés correspondant à un poids moléculaire de 61,05 kDa. L'ensemble des protéines HSP60 sont connues sous le nom de chaperonnes. Les chaperonnes sont divisées en deux sous-familles: le type I (HSP60/GROEL) et le type II (TCP-1 complexes anneau). Le type I est présent chez les procaryotes (eubactéries) et les organites eucaryotes (mitochondries et chloroplastes). Le type II est présent chez les archéobactéries et

dans le cytosol des eucaryotes [88]. Elles jouent un rôle important dans la chaîne respiratoire par le repliement de la chaîne moyenne des acyl-CoA déshydrogénases, et c'est la raison pour laquelle leurs localisations sont principalement dans les mitochondries. Cependant, de nombreuses preuves récentes ont montré qu'elles étaient également extra-mitochondriales, comme dans la surface des cellules, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique [89].

2. Transport à travers la membrane plasmique et activation des acides gras

Les mitochondries, ainsi que les peroxysomes, portent toutes les enzymes nécessaires à l'oxydation des acides gras (OAG). Les mitochondries sont le site principal pour l'oxydation des acides gras libres plasmatiques (AG) ou des lipoprotéines associées aux triglycérides. Cela implique que plusieurs étapes de transport sont nécessaires avant que les acides gras soient oxydés. Les triglycérides sont d'abord hydrolysés par l'action de la lipoprotéine lipase. L'absorption des acides gras semble être largement médiée par les protéines membranaires [74].

3. Cycle de la β -oxydation

La première voie de dégradation des acides gras est la β -oxydation, découverte dans la mitochondrie par Georg Franz Knoop en 1904 [90]. La β -oxydation est une voie métabolique clé pour le maintien de l'homéostasie énergétique dans les organes comme le foie, le cœur et le muscle squelettique. Elle se déroule dans les mitochondries en aérobose (sauf la première étape qui a lieu dans le cytoplasme), mais aussi dans d'autres organites, les peroxysomes.

Pendant le jeûne, quand la quantité de glucose devient limitée, la β -oxydation est d'une importance particulière. Sous cette condition, la plupart des tissus, à l'exception du cerveau, peuvent utiliser les acides gras directement pour produire de l'énergie. Par ailleurs, le foie transforme les acides gras en corps cétoniques, un processus pour lequel la β -oxydation est indispensable. Les corps cétoniques servent comme source d'énergie supplémentaire qui est utilisée par tous les tissus, y compris le cerveau [74].

La β -oxydation constitue une voie en spirale qui peut être divisée en quatre cycles répétitifs (hélice de Lynen) conduisant à un raccourcissement progressif de la chaîne carbonée par unité de 2 carbones.

L'oxydation du carbone β implique l'addition d'un atome d'oxygène provenant d'une molécule d'eau. Cette addition d'eau va se faire par hydratation d'une double liaison qu'il va

falloir générer au préalable en enlevant deux atomes d'hydrogène des deux carbones α et β . Après la réaction d'hydratation, une deuxième deshydrogénation va avoir lieu sur le carbone β , qui donnera alors un groupement cétonique $-\text{CO}-$. Les atomes d'hydrogène sont transférés, d'une part, sur le FAD lors de la première réaction et, d'autre part, sur le NAD^+ lors de la seconde réaction. Une thiolase va alors scinder la liaison entre les deux carbones α et β , afin de générer, d'une part, l'acétyl-CoA, et d'autre part, un acyl-CoA tronqué de deux carbones. Chaque étape produit 5 molécules d'ATP et 1 acétyl-CoA. S'il entre dans le cycle de Krebs, cet acétyl-CoA fournira 12 molécules riches en énergie (11 ATP et 1 GTP) [91].

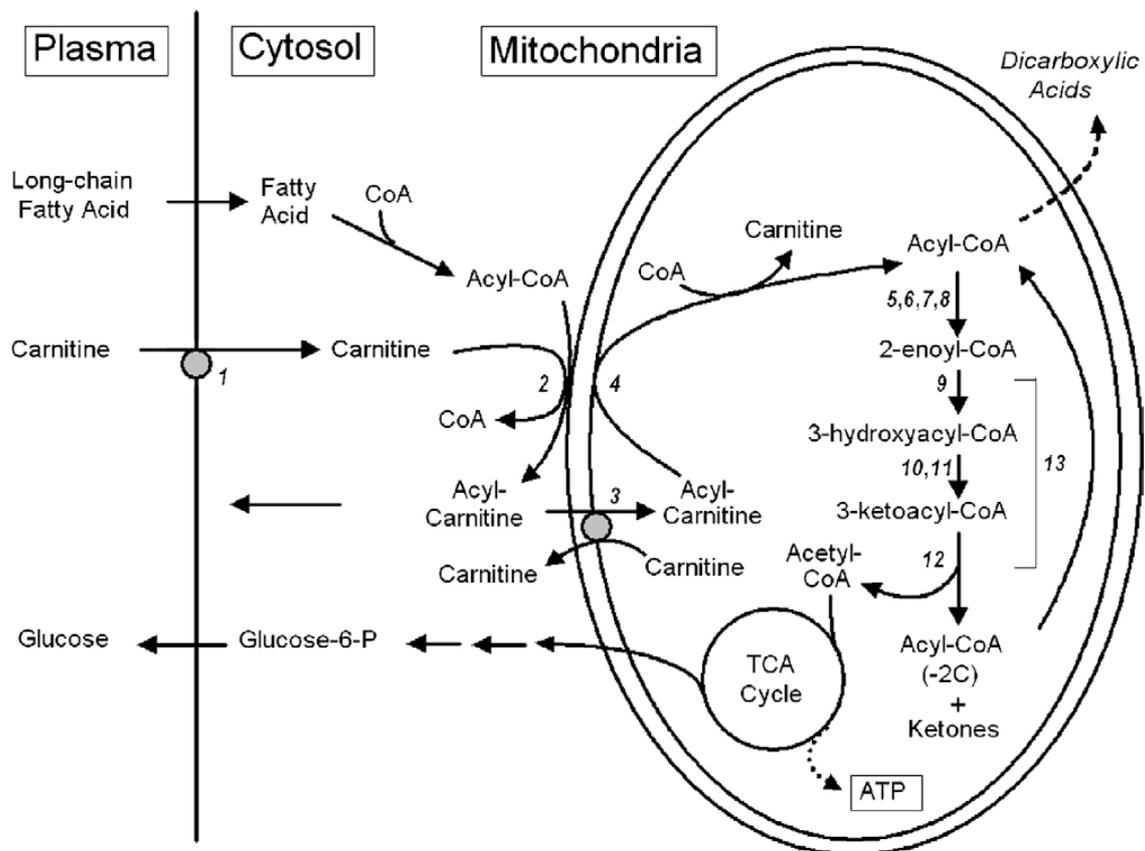


Figure 15. Cycle de la β -oxydation (D'après Kompare 2008). Les nombres se réfèrent aux protéines ou enzymes suivantes : 1, plasma membrane carnitine transporter, OCTN2; 2, Carnitine palmitoyl –transférase I (CPT I); 3, carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) !; 4, Carnitine palmitoyl –transférase III (CPT II); 5, Très longue chaîne acyl_CoA deshydrogénase (VLCAD); 6, moyenne chaîne acyl_CoA deshydrogénase (MCAD); 7, courte chaîne acyl_CoA deshydrogénase (SCAD); 8, Acyl Co A deshydrogénase-9 (ACAD9); 9, 2-enoyl-CoA hydratase; 10, chaîne acyl_CoA deshydrogénase (LCHAD); 11, hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD); 12, longue chaîne 3-kétoacyl-CoA thiolase (LCKAT); et 13, protéine trifonctionnelle mitochondriale (MTP). Les flèches solides indiquent des réactions uniques ; les flèches pointillées indiquent des étapes ou des réactions multiples [92].

3.1 Régulation de la β -oxydation

Pour un acide gras activé en acyl-CoA, il existe principalement deux destinées possibles : la β -oxydation si la cellule a besoin d'énergie (jeûne), ou la synthèse des triglycérides de réserve si la cellule est déjà pléthorique en énergie (période post-prandiale). La régulation est aussi déterminée par la malonyl-CoA, qui inhibe la carnitine acyltransférase.

Enfin, les enzymes de la β -oxydation sont régulées par les concentrations en substrats et en coenzymes FAD et NADH^+ [93].

3.2 Rôle de la Carnitine dans le métabolisme

La carnitine (L-3-hydroxy-4-N-N, N, triméthylaminobutyrate) a été largement étudiée depuis sa découverte il y a 100 ans. La carnitine est synthétisée à partir des acides aminés essentielles lysines et méthionine, La lysine fournit le squelette de carbone de la carnitine [94] et les groupes 4-N-méthyl proviennent de la S-adénosyl-méthionine, produite à partir de méthionine et d'ATP, elle peut être synthétisée par l'organisme dans le tissu hépatique et les reins, mais la plupart provient de l'alimentation. Il a été estimé que 75 % de la concentration de carnitine totale est apportée par l'alimentation et seulement 25 % provient de la synthèse endogène [95]. Pour cette raison, la carence en groupements méthyles peut avoir un effet délétère sur la synthèse de carnitine, et une carence en lysine et en méthionine dans l'alimentation peut affecter la biosynthèse de carnitine [96]. Chez l'homme et l'animal, la biosynthèse de carnitine est déterminée par la disponibilité de triméthyllysine Cette N9-triméthyl-lysine (TML) [97], provient de la triple N-méthylation des résidus lysine de protéines telles que la calmoduline, la myosine, l'actine, le cytochrome C et les histones [98]. Cela constitue donc une réaction post-traductionnelle, catalysée par des méthyltransférases qui utilisent la S-adénosylméthionine (SAM) comme donneur de méthyle.

La synthèse de la carnitine est un processus multi-étapes qui commence par l'ajout d'un groupement hydroxyle sur le troisième carbone par l'enzyme triméthyllysine dioxygénase (hydroxylase) dans les mitochondries du rein, foie, cœur, muscles et cerveau [99]. La L-carnitine est un métabolite important dont la fonction est indispensable pour le métabolisme intermédiaire dans les cellules eucaryotes. Sa première fonction est d'agir comme un transporteur des acides gras à longues chaînes du cytosol vers la matrice mitochondriale où la β -oxydation a lieu. D'autre part, la carnitine est impliquée dans le transfert des produits de la β -oxydation péroxysomale y compris l'acétyl-CoA, vers les mitochondries pour la

phosphorylation oxydative produisant CO₂ et H₂O, via le cycle de Krebs [100, 101]. D'autres fonctions de la carnitine comprennent la modulation du rapport acyl-CoA/CoA [102, 103], le stockage d'énergie sous forme d'acétylcarnitine et la modulation des effets toxiques de groupes acyles mal métabolisés pour les excréter sous forme d'esters de carnitine [104]. Afin de rejoindre la β-oxydation, l'acyl-CoA cytosolique à longue chaîne doit être transporté à travers la membrane mitochondriale interne. La Carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1), située dans la membrane mitochondriale externe catalyse la trans-estérification de la carnitine avec l'acyl-CoA à longue chaîne pour former l'acylcarnitine. L'acylcarnitine cytosolique est ensuite transportée dans la matrice mitochondriale dans un échange simultané 1:1 avec la carnitine libre intra-mitochondriale via la Carnitine Acylcarnitine Translocase (CACT), qui est située à l'intérieur de la membrane mitochondriale interne [105] (Figure 16). Chez les mammifères, de très longues chaînes d'acides gras subissent un raccourcissement de la β-oxydation péroxysomale, tandis que les acides gras plus courts sont directement importés dans les mitochondries [106].

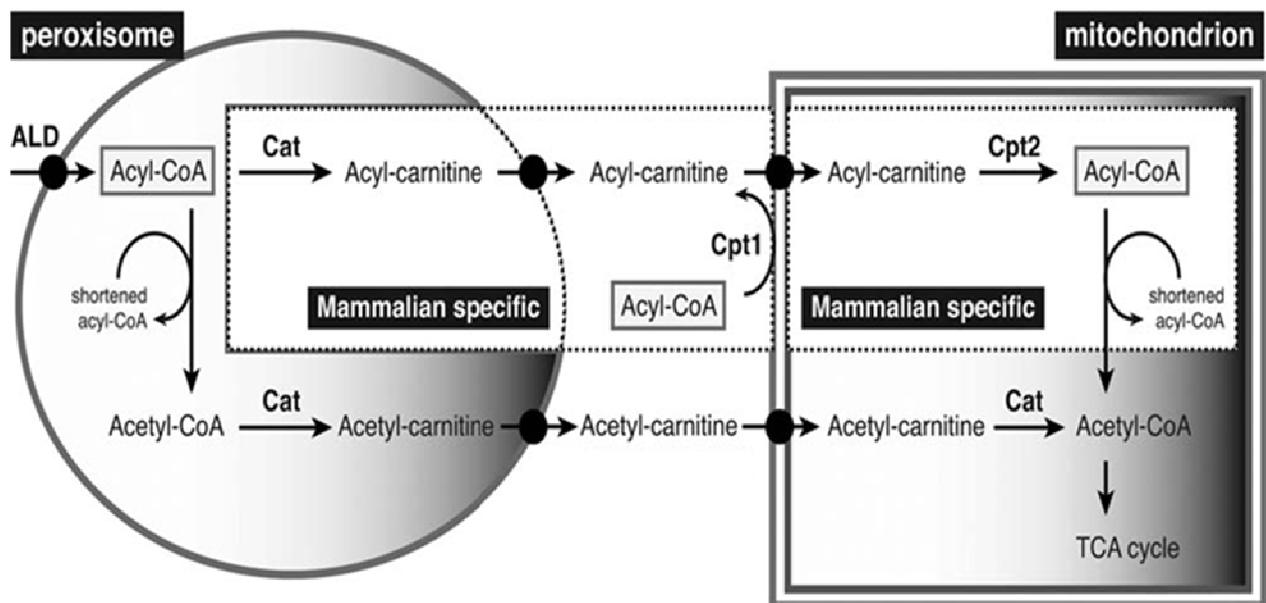


Figure 16. Fonction de la carnitine dans le transport intracellulaire d'acyl- et d'acétyl-CoA (d'après Strijbis et al. 2010)[105].

Chez les mammifères, la carnitine joue un rôle complémentaire entre le métabolisme énergétique et le transport de métabolites des compartiments intracellulaires. Elle joue également un rôle dans la modulation du ratio acyl-CoA/CoA, le stockage de l'énergie sous

forme d'acétyl-carnitine et l'excrétion de produits non-métabolisables, toxiques ainsi que des groupements acylés.[107].

3.3 Régulation de l'absorption de la carnitine cellulaire

La livraison de la carnitine dans les cellules, sa distribution dans le corps et son homéostasie intracellulaire sont contrôlées par des transporteurs de cations organiques (OCTN) qui appartiennent à la famille de transporteurs solubles 22A [108, 109]. Trois OCTN ont été identifiés jusqu'à présent, OCTN1, OCTN2 et OCTN3, localisés respectivement dans le plasma et la membrane mitochondriale [110, 111]. Les OCTN sont plurifonctionnels, ils transportent plusieurs cations (médicaments, substances xénobiotiques et des métabolites endogènes comme la L-carnitine [112]. Le transport de la carnitine est dépendante du sodium seulement pour OCTN1 et OCTN2, pas pour OCTN3 [110]. OCTN1 et OCTN2 sont exprimés dans différents tissus tels que le rein, intestin, muscle squelettique, le cœur, le foie et le cerveau [110, 113]. En revanche, OCTN3 est exprimé exclusivement dans les testicules, les reins et l'intestin [114]. Parmi les trois OCTN, OCTN3 a la plus grande spécificité pour la carnitine, et OCTN1 la plus basse [110]. OCTN2 fonctionne sur l'absorption intestinale et la réabsorption rénale de carnitine, et il joue un rôle majeur dans la distribution tissulaire, en catalysant l'absorption de la carnitine dans les cellules. En raison de son affinité de liaison élevée pour la carnitine et son expression vaste, OCTN2 est le plus important transporteur de carnitine [115].

3.4 Carnitine palmitoyl-transférase 1 (CPT1)

Seule la carnitine palmitoyl-transférase 1 (CPT1) qui transforme les acyl-CoA à longues chaînes en acylcarnitines a un accès direct au compartiment cytosolique. Comme les acylcarnitines à longues chaînes (LC-acyl) sont des substrats importants pour la formation de l'ATP mitochondrial, la CPT1 a un rôle central dans la régulation de l'énergie [116]. (Figure. 17).

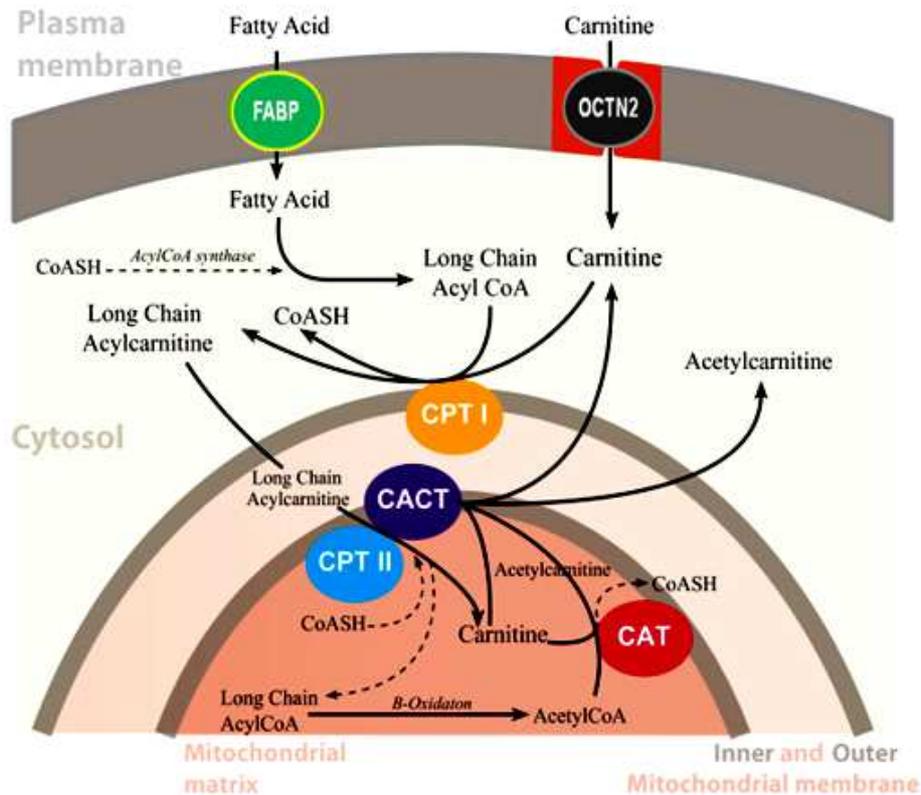


Figure 17. Localisation des transporteurs de CoA et d'acyl-CoA dans le cytosol et les mitochondries (d'après Flanagan *et al.* 2010)[117]

Les mammifères expriment trois gènes distincts pour CPT 1 [117]. CPT 1A est très exprimée dans le foie et les reins; CPT 1B dans le muscle cardiaque et squelettique, et CPT 1C dans le cerveau. CPT 1A et 1B ont une forte activité catalytique au contraire de CPT 1C [104]. Les isoformes de CPT1 existent aussi dans d'autres membranes intracellulaires comme celle du réticulum endoplasmique, où elles peuvent réguler le ratio acyl-CoA/acylcarnitine [118].

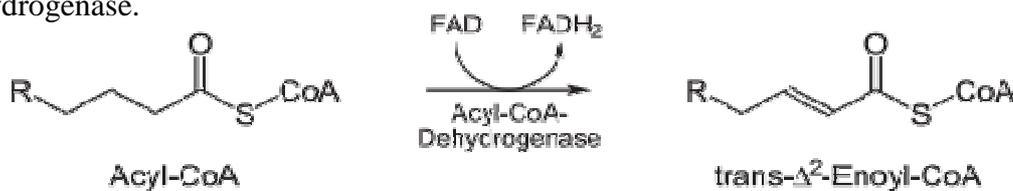
3.5 Fatty-acid-binding proteins (FABPs)

Les *fatty-acid-binding proteins* (FABPs) sont une famille de protéines porteuses d'acides gras et d'autres substances lipophiles comme les eicosanoïdes et les rétinoïdes. Ces protéines sont utilisées comme des transporteurs pour faciliter le passage des acides gras entre les membranes extra et intracellulaires. Certaines de ces FABPs seraient également impliquées dans le transport de molécules lipophiles à partir de la membrane cellulaire externe vers certains récepteurs intracellulaires comme les PPARs [119]. Pour maintenir des concentrations suffisantes d'AG dans le foie, le cœur et le muscle squelettique, il est nécessaire d'avoir dans le cytoplasme des protéines qui lient les acides gras, dont de la *fatty*

acid-binding proteins (FABPs). Il y a 8 types de FABPs chez l'homme, chacune codée par un gène, et chacune est spécifique à chaque tissu, par exemple la FABP dans le foie est codée par le gène *FABP1*, puis dans le cœur et muscle squelettique le gène codant est *FABP3* [120, 121].

3.6 Acyl-CoA deshydrogénases

Les études réalisées par Beinert et ses collègues dans les années 1950 ont établi la présence de plusieurs acyl-CoA deshydrogénases désignées comme deshydrogénases d'acyl-CoA à courte, moyenne et longue chaîne (SCAD, MCAD, LCAD, respectivement) [122]. L'action de ces enzymes représente la première étape du métabolisme des acides gras (le processus de rupture de longues chaînes d'acides gras en molécules d'acétyl-CoA). Leur action se traduit par l'introduction d'une double liaison trans entre C2 et C3 du substrat d'acyl-CoA thioester. Par ailleurs, la FAD est un co-facteur nécessaire à la réaction pour que l'enzyme se lie à son substrat. La réaction suivante illustre l'oxydation de l'acide gras par l'acyl-CoA deshydrogénase.



Les Acyl-CoA deshydrogénases sont une classe importante d'enzymes dans les cellules de mammifères en raison de leur rôle dans le métabolisme des acides gras via l'oxydation de ces derniers dans la mitochondrie [122].

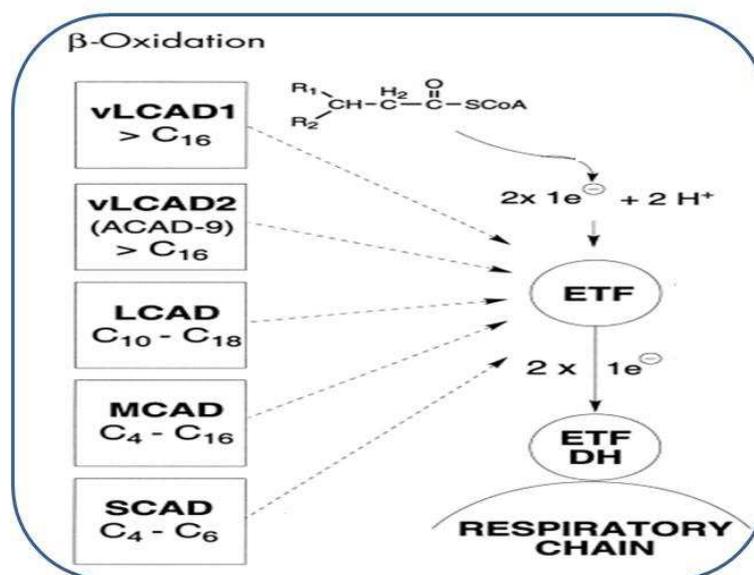


Figure 18. Différentes formes d'Acyl-CoA deshydrogénases, (d'après Ghisla, 2004)[122]

L'ensemble de ces enzymes, à l'exception du dimère membranaire à très longue chaîne acyl-CoA déshydrogénases sont des homo-tétramères contenant une molécule de FAD par sous-unité liée de façon non covalente. Toutes introduisent une double liaison trans dans leurs substrats, et toutes se débarrassent de leurs équivalents réducteurs dans la chaîne de transport d'électrons (chaîne respiratoire) via la flavoprotéine de transport d'électrons (ETF) [123].

3.7 Mitochondrial trifunctional protein (MTP)

La protéine trifonctionnelle mitochondriale (MTP) est un hétéro-octamère composé de quatre sous-unités α et quatre β , associé à la membrane mitochondriale interne utilisant comme substrat des acides gras à longue chaîne. La protéine catalyse les trois dernières étapes de la β -oxydation. La sous-unité α du MTP (MTP α) a un domaine N-terminal contenant la 3-énoyl-CoA possède une activité hydratase et catalyse la deuxième étape, par contre, l'activité de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (LCHAD) se situe dans le domaine C-terminal et catalyse la troisième étape. La sous-unité β de MTP (MTP β), la 3-cétoacyl-CoA thiolase catalyse la quatrième étape. Les gènes humains codant pour MTP α (HADHA, hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase) et MTP β (HADHB) sont localisés sur le chromosome [124].

3.8 Electron-Transferring Flavoprotein (ETF)

L'ETF est l'accepteur d'électrons physiologiques des déshydrogénases mitochondriales. En effet, une ETF-déshydrogénase de la membrane interne de la mitochondrie réoxyde l'ETC et transmet les hydrogènes à la coenzyme Q de la chaîne respiratoire. Ces réactions sont réversibles [125].

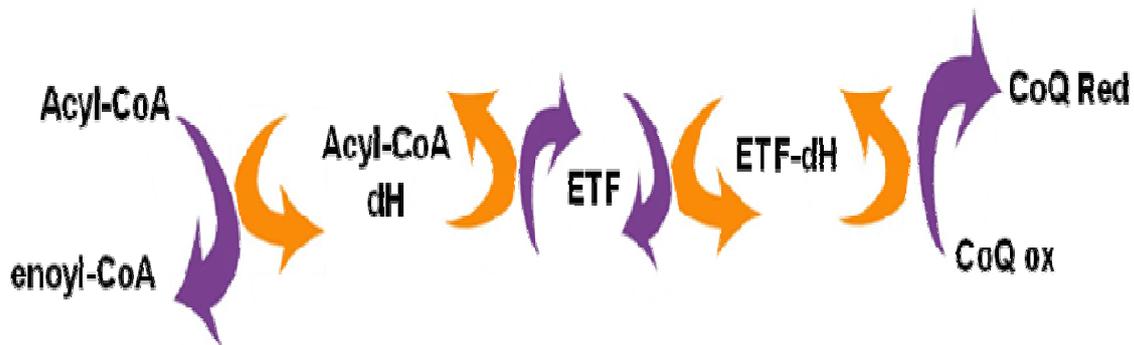


Figure 19. Electron-Transfer-Flavoprotein (modifié d'après Scott, 2004)[126]

3.9 Acyl-CoA thioestérases (ACOTs)

Connues aussi sous les noms de acyl-CoA hydrolases ou acyl-CoA thioesterhydrolases, elles catalysent l'hydrolyse des esters de CoA de divers composés, y compris les acides gras saturés, insaturés et ramifiés, les acides biliaires, les acides dicarboxyliques et les prostaglandines. Ces enzymes ont des fonctions importantes dans le métabolisme des lipides et dans la régulation du ratio ester de CoA des lipides et les acides gras libres et ont été localisées dans le cytosol, la mitochondrie et les peroxysomes [127]. Quatre type I d' ACOTs (quatre ACOTs de type I) sont codées dans le génome humain (ACOT1, ACOT2, ACOT4 et ACOT6) [128].

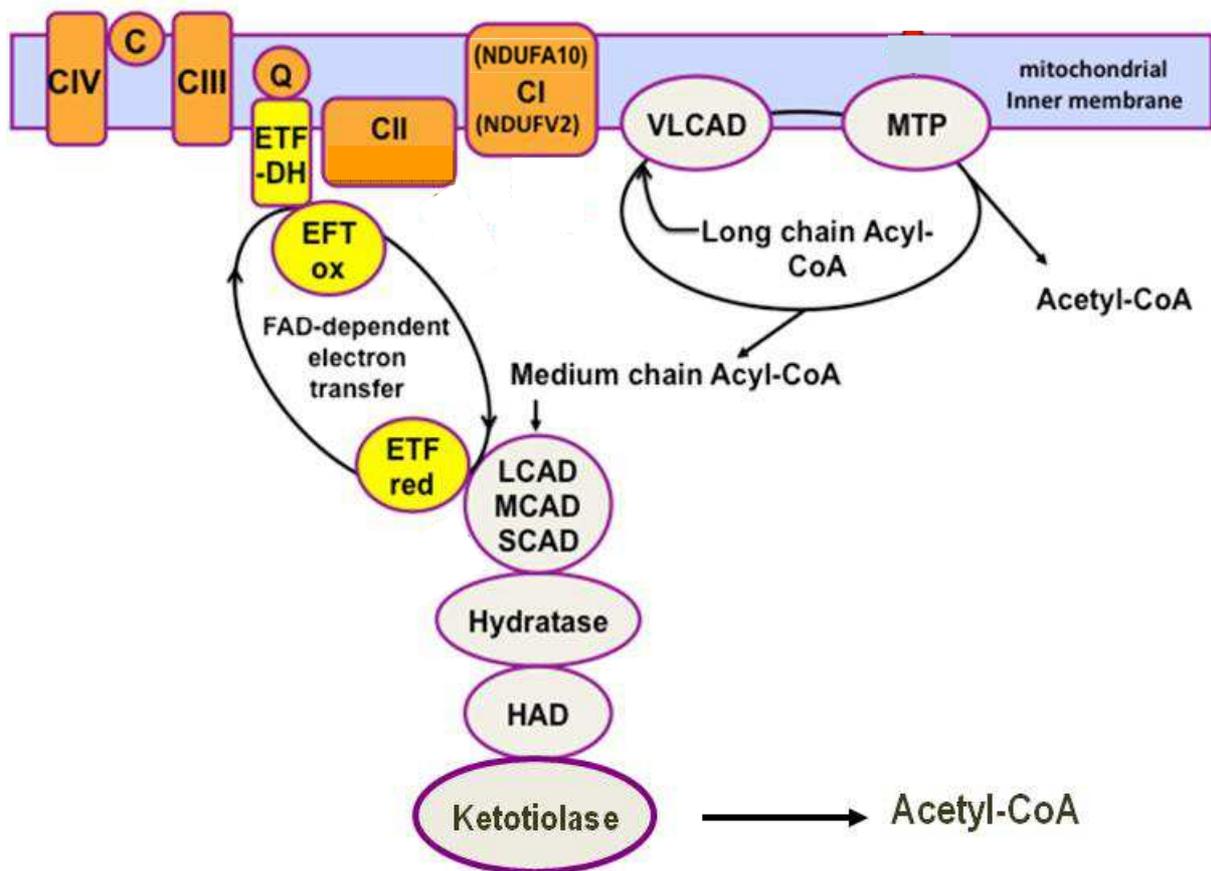


Figure 20. Schéma de la chaîne respiratoire et de la β-oxydation

4. Les erreurs innées du métabolisme de l'oxydation des acides gras

4.1 Prévalence

Prises individuellement, les maladies génétiques du métabolisme de l'oxydation des acides gras sont rares, mais en raison du nombre important d'enzymes potentiellement touchées, ces erreurs sont finalement assez fréquentes. Elles sont généralement transmises selon un mode autosomique récessif. L'incidence combinée de ces troubles se situe entre 1:5 .000 et 1:10 000 naissances) [129, 130]. Les défauts dans l'oxydation des acides gras sont aussi la conséquence d' anomalies des acyl-carnitine, combinées à un déficit en carnitine libre [105].

Lorsqu'il y a un défaut de dégradation des acides gras, les produits intermédiaires (acylcarnitines) en excès s'accumulent dans les tissus, y compris dans le cœur, le foie et le muscle squelettique, ceci peut conduire à un dysfonctionnement des organes. Le détournement des intermédiaires d'acyl-CoA dans l' ω -oxydation (voie métabolique mineure qui se déroule au sein du réticulum endoplasmique) résulte en une accumulation d'acides dicarboxyliques toxiques. Les acylcarnitines en excès dans le sang fournissent un marqueur diagnostique, y compris la détection précoce chez le nouveau-né [83].

Les patients atteints de troubles de l'oxydation des acides gras présentent généralement des symptômes épisodiques lorsque leur capacité oxydative est épuisée (réduite) pendant les périodes de jeûne, de stress, ou lors d'exercice prolongé. Chez les nourrissons, les symptômes se développent souvent au cours d'une maladie virale mineure ou lorsque leur alimentation diminue et en général pendant la période de jeûne. Ces troubles peuvent entraîner une morbidité et une mortalité importante si le diagnostic n'est pas fait à temps. Certains nouveau-nés meurent au cours du premier épisode et d'autres peuvent souffrir de séquelles neurologiques irréversibles.

4.2 Une brève description des troubles de l'oxydation des acides gras

4.2.1 Carence en transporteur de Carnitine plasmatique membranaire (OCTN2)

Le transporteur de carnitine plasmatique membranaire est nécessaire pour maintenir l'homéostasie en carnitine [131]. La carence en carnitine primaire est causée par un défaut du transporteur OCTN 2. Ce trouble autosomique récessif a une incidence d'environ 1:40 000 [132]. Dans la petite enfance, les symptômes comprennent une perte de l'appétit, une irritabilité, une léthargie et une diminution de la réactivité, ce qui peut évoluer vers le coma et la mort. L'hépatomégalie est souvent présente [131]. Ces symptômes s'accompagnent d'une hyperammoniémie, d'une élévation des transaminases, et d'une hypoglycémie hypocétotique

[133]. Chez l'enfant plus âgé, une cardiomyopathie et une faiblesse musculaire progressive sont souvent présentes. Une mort subite peut survenir chez les patients non traités [132].

Le diagnostic peut se faire sur la base de la recherche d'une diminution de la carnitine et des acylcarnitines plasmatiques. Le diagnostic peut être confirmé par une diminution du transporteur dans les fibroblastes des patients en culture [132].

4.2.2 Déficit en carnitine palmitoyltransférase I (CPT I)

Les patients atteints d'un déficit en CPT peuvent avoir des manifestations au cours de la période néonatale ou de la petite enfance après une maladie et/ou un jeûne prolongé. Les manifestations sont des épisodes de léthargie et de convulsions qui peuvent évoluer vers le coma et la mort. Un retard de développement peut suivre un épisode [134]. Les principales manifestations sont une hypoglycémie hypocétotique, une hyperammoniémie, une élévation des transaminases et une acidose métabolique légère. Dans le plasma, la carnitine est sensiblement élevée, et le niveau d'acide lactique est normal. Le dépistage néonatal en spectrométrie de masse montre une augmentation de la carnitine libre et une diminution des acylcarnitines à longue chaîne. La mesure de l'activité enzymatique dans les fibroblastes cultivés est utile pour un diagnostic définitif.

4.2.3 Déficit en carnitine/acylcarnitine translocase (CACT)

La carence en CACT est une maladie rare, de transmission autosomique récessive avec une gravité clinique variable. La carence précoce en CACT pendant la période néonatale se présente comme une maladie grave avec des symptômes épisodiques, y compris l'hypoglycémie, des convulsions, une cardiomyopathie, une arythmie cardiaque et une apnée, souvent déclenchées par le jeûne ou le stress [132]. Les épisodes ultérieurs entraînent progressive des lésions neurologiques, cardiaques et hépatiques. Une absence totale de CACT donne des manifestations fonctionnelles rapidement progressives souvent mortelles. Les patients avec une fonction résiduelle de la translocase peuvent avoir une forme atténuée de la maladie caractérisée par une hypoglycémie à jeûn, mais pas de symptômes cardiaques.

L'évaluation au laboratoire révèle une hypoglycémie sans cétose, une hyperammoniémie, la créatine kinase (CK) et transaminases élevées, ainsi qu'une élévation des acyl-carnitines à longue chaîne et des niveaux bas de carnitine libre. Le profil biochimique ressemble à un déficit en CPT II, le dosage de la translocase directe dans les fibroblastes est nécessaire pour le diagnostic final [135].

L'insuffisance rénale, voire un arrêt cardiaque peut survenir, mais la dialyse est rarement nécessaire [136]. Entre les épisodes, les patients sont asymptomatiques.

La présentation clinique d'un déficit en CPT II infantile est potentiellement fatale [137]. Les symptômes commencent entre 6 mois et 2 ans avec l'hypoglycémie sans cétose, une hépatomégalie, et des concentrations plasmatiques élevées CK après un jeûne. Ces patients peuvent aussi avoir une encéphalopathie, des convulsions, une détresse respiratoire, et une acidose métabolique. La cardiomyopathie et les arythmies peuvent survenir.

La forme la plus sévère de carence en CPT II présente dans la période périnatale et est très grave [137]. Ces nouveau-nés présentent une dysmorphie, une hypoglycémie sans cétose, une acidose métabolique, des convulsions, des arythmies, une néphromégalie, une hépatomégalie, et une cardiomégalie. L'imagerie par résonance magnétique peut révéler des défauts de migration neuronale.

Une déficience en CPT II montre le même profil qu'une déficience en CACT, c'est à dire une élévation des acyl-carnitines à longue chaîne. Par conséquent, le diagnostic doit être confirmé par l'analyse des enzymes dans les fibroblastes, leucocytes, hépatocytes, ou myocytes.

4.2.4 Déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne très longue ou VLCAD (*very long-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

Le déficit en VLCAD empêche l'oxydation des acides à longue chaîne [138]. La présentation clinique est hétérogène. La forme la plus grave est celle qui apparaît dans la période néonatale avec le jeûne, une cardiomyopathie hypertrophique et une hypoglycémie hypocétonique. Les autres caractéristiques comprennent une acidose métabolique et hépatomégalie avec une élévation des transaminases. Ce déficit néonatal est souvent fatal. Une forme plus tardive, dans l'enfance est caractérisée par une hypoglycémie à jeun et une léthargie hypocétotique qui progresse vers le coma, mais sans cardiomyopathie. La présentation la plus bénigne est la forme tardive qui survient généralement après l'adolescence avec des symptômes de douleurs musculaires, induites l'exercice et par une rhabdomyolyse, et myoglobinurie [138-140].

Le profil des acylcarnitines montre une élévation de C12:0, C14:1 et C16:0 [139], la concentration sérique de carnitine est souvent faible, et l'analyse des acides organiques urinaires montre une augmentation des acides dicarboxyliques. La myoglobine peut être trouvée dans les urines après un épisode infectieux aigu [138]. La déficience de la VLCAD peut être évaluée à l'aide de cultures des fibroblastes.

4.2.5 Déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne ou MCAD (*medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

Le déficit en MCAD est le plus commun des troubles de l'oxydation des acides gras et est transmis d'une manière autosomique récessive [141]. Le déficit en MCAD se présente habituellement entre la période néonatale et l'âge de 2 ans [142]. Même si l'apparition des symptômes peut survenir dès les premiers jours de vie, les enfants sont généralement asymptomatiques, sauf pendant les périodes de stress métabolique, le jeûne ou une maladie virale [143]. Ils présentent à jeun une hypoglycémie non cétosique associée à des vomissements, une léthargie, une apnée, un coma, une encéphalopathie et un risque de mort subite. Si l'anomalie n'est pas diagnostiquée, 20 % à 25 % des patients atteints mourront au cours du premier épisode [141]. Quelques cas de déficit en MCAD ont été diagnostiqués à tort comme « syndrome de mort subite du nourrisson ». La paralysie cérébrale peut être observée dans certains patients [141]. La stéatose hépatique et cardiaque sont des résultats post-mortem fréquents [141, 144].

De nombreux cas sont désormais diagnostiqués grâce au dépistage néonatal, où la spectrométrie de masse montre une élévation de l'octanoyl-carnitine (C8: 0) [142] et d'autres acylcarnitines à chaîne moyenne. Des examens de laboratoire de routine au cours d'une maladie aiguë peuvent montrer une hypoglycémie hypocétonique, une acidose métabolique, une acidose lactique, une hyperammoniémie, et une élévation de l'urée sanguine. Parfois, une élévation de l'urée, des transaminases, et d'acide urique, peut être présente. La carnitine libre sérique et urinaire peut être normale ou basse. Des taux élevés de suberylglycine et d'hexanoylglycine (esters d'acides dicarboxyliques de la glycine) sont généralement trouvés dans l'urine. La déficience de l'enzyme MCAD peut être montrée dans les fibroblastes. Le séquençage du gène *ACADM* permet dans 85 % des cas la mise en évidence d'une mutation commune A985G [141].

4.2.6 Déficit en acyl-CoA déshydrogénase à chaînes courtes ou SCAD (*short-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

Le déficit en SCAD est une maladie autosomique récessive. Les symptômes se présentent généralement entre 2 mois et 2 ans au cours d'une maladie ou d'une période de jeûne et l'apparition est parfois transitoire [145]. Le premier est l'hypoglycémie épisodique avec cétose, et le second est un retard du développement. Les épisodes aigus peuvent entraîner le coma ou la mort. Les symptômes du système nerveux central sont attribués au cumul des

acides gras à chaîne courte. Le déficit en SCAD est souvent confondu avec le syndrome de Reye ou la mort subite du nourrisson [146].

Le diagnostic de SCAD est posé en cas d'une élévation de la C4-carnitine plasmatique, en plus des symptômes au dépistage néonatal. Dans les urines il y aura une élévation d'acide éthylmalonique et de cétones [147], mais les métabolites sont présents uniquement pendant les périodes symptomatiques [148]. Les examens de laboratoire de routine peuvent montrer une hypoglycémie, une acidose métabolique et lactique, une hyperammoniémie, une urée élevée, un acide urique et des transaminases anormaux. L'analyse de l'activité enzymatique dans les fibroblastes est un diagnostic définitif. L'analyse moléculaire du gène de la SCAD (*ACADS*) est utile pour détecter les mutations fréquentes [144].

4.2.7 Déficit en Acyl-CoA déshydrogénase 9

Le rôle de l'acyl-CoA déshydrogénase 9 (*ACAD9*) dans l'oxydation des acides gras n'est pas encore défini, mais l'enzyme semble être active contre les substrats insaturés à longue chaîne. Le déficit de *ACAD9* n'a été décrit que récemment et les symptômes sont variables il peut y avoir une insuffisance hépatique aiguë, mais aussi une cardiomyopathie et des lésions cérébrales.

L'acylcarnitine plasmatique et les profils sont normaux, mais de grandes quantités d'acétylcarnitine sont excrétées dans les urines. Le déficit enzymatique en *ACAD9* est diagnostiqué dans les fibroblastes cultivés [149, 150].

4.2.8 Déficit en 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue ou LCAD (*Long-chain Acyl CoA Dehydrogenase*)

La 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue (*LCAD*) est un des constituants de la protéine trifonctionnelle mitochondriale. Le déficit isolé en *LCAD* est une affection autosomique récessive qui se manifeste généralement de la naissance à 3 ans. L'hypoglycémie non cétonique à jeun est la plus fréquente manifestation, parfois associée à des convulsions [23, 151]. Une autre manifestation peut être une neuropathie périphérique et une rétinopathie pigmentaire. La cécité peut survenir en raison d'un dépôt des intermédiaires toxiques de l'hydroxyacyl-CoA et de la dégénérescence de l'épithélium pigmentaire de la rétine [151-153].

Les examens en laboratoire pendant les épisodes symptomatiques révèlent une hypoglycémie, une élévation de la créatine phosphokinase et des transaminases. Des acides

dicarboxyliques et hydroxy-dicarboxyliques peuvent être trouvés dans les urines. A l'autopsie, les lipides sont trouvés stockés dans le foie, le muscle squelettique, les tubules rénaux, les poumons et le myocarde [154]. La déficience en LCHAD peut être confirmée dans les fibroblastes.

4.2.9 Déficit en protéine trifonctionnelle mitochondriale MTP (*mitochondrial trifonctionnelprotéine*)

La carence en MTP est une maladie autosomique récessive caractérisée par une activité réduite de l'ensemble des 3 enzymes situées sur la protéine [154]. Les manifestations cliniques d'apparition précoce sont caractérisées avec une hypoglycémie sans cétose, une encéphalopathie hépatique et parfois une hypotonie, une aréflexie, une rhabdomyolyse, et une cardiomyopathie entraînant la mort [104]. Les fœtus atteints d'un déficit en MTP ont une incidence élevée de prématurité, retard de croissance intra-utérine, et mort intra-utérine [83].

Le profil plasmatique d'acylcarnitine peut être normal ou seulement légèrement anormal lors des périodes asymptomatiques. Au cours des épisodes aigus, il y a une élévation des esters acylcarnitine et de 3-hydroxy-formes de C16:0, C16:1, C18:0, et C18:1, qui est similaire à celle observée dans le déficit en LCHAD isolée [155].

Tableau 2 Marqueurs métaboliques des acyl-caarnitines pour le diagnostique des anomalies de la β -oxydation [156, 157]

Anomalie de l'oxydation des Acides Gras	Marqueur métabolique
Carnitine acylcarnitine translocase	C16, C18 C16/C14 :1
Carnitine plasma membrane transporter defect	Diminution de la carnitine libre (C0)
Carnitine palmitoyl transférase I (CPT I)	Augmentation du ratio C0/C16 +C18
Carnitine palmitoyl transférase II (CPT II)	C16, C18
Déficience en MCAD	C8, C10, C6, C10:1 C8/C10
Déficience multiple en acyl CoA déhydrogénase	C4, C5, C8, C12, C14, C5DC
Déficience en LCAD	C16OH
Déficience en SCAD	C4
Déficience en VLCAD	C14:1, C14, C16 C14 :1/C12:1 C14 :1 /C16

Partie 4 : Biogénèse mitochondriale

Il existe 3 types de signaux extracellulaires contrôlant la biogénèse : l'exercice musculaire, l'exposition au froid et le stress oxydatif (« dérivés réactifs de l'oxygène ») [158].

Un ensemble de données expérimentales suggèrent que ces stimuli convergents, via des voies de signalisation spécifiques, vers un régulateur majeur de la biogénèse : le PGC1- α (peroxisome proliferators-activated receptor gamma coactivator-1 α) [159, 160].

1. Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivateur- α (PGC1- α)

Jusqu'au milieu des années 1990, on pensait que la plupart des voies de régulation de l'expression des gènes et leurs conséquences biologiques impliquaient uniquement les facteurs de transcription. Cependant, les découvertes des premiers coactivateurs transcriptionnels et corépresseurs des récepteurs nucléaires d'hormones et d'autres facteurs de transcription ont apporté de nouvelles perspectives centrées autour du contrôle des programmes génétiques spécifiques coordonnés au niveau du cofacteur transcriptionnel [161].

Les trois membres de la famille, PGC-1 α , PGC-1 β , et PGC-1-Related Coactivator (RPC), sont régulés différemment par des signaux environnementaux régissant les voies de la thermogénèse, de la gluconéogénèse et de la différenciation musculaire et cellulaire.

Régulateur clé du métabolisme énergétique, PGC-1 α est un membre de la famille des coactivateurs de la transcription et joue un rôle central dans la régulation du métabolisme énergétique cellulaire. Son activation est fortement induite par l'exposition au froid, afin d'activer la thermogénèse adaptative. PGC-1 α stimule la biogénèse mitochondriale et favorise le remodelage du tissu musculaire par un changement de la composition des fibres vers un phénotype métaboliquement plus oxydatif et moins glycolytique. De plus, Il participe à la régulation des métabolismes glucidiques et lipidiques. Il est fort probable que PGC-1 α soit intimement impliqué dans des pathologies telles que l'obésité, le diabète et les cardiomyopathies [160].

Le gène PGC-1 α est situé sur le chromosome 4 chez l'homme (chromosome 5 chez la souris) et code pour une protéine de 91 kDa. Des études structurales et fonctionnelles ont indiqué que PGC-1 α a un domaine d'activation transcriptionnel fort à l'extrémité N-terminale. PGC-1 α a été initialement identifié comme une protéine agissant en interaction avec PPAR γ - dans le

tissu adipeux brun (BAT) qui pourrait réguler la thermogenèse adaptative en réaction au froid en augmentant l'oxydation des acides gras mitochondriaux. Cependant, des études antérieures ont révélé que la fonction principale de PGC-1 α était de stimuler la biogenèse mitochondriale et le métabolisme oxydatif et il exprimé dans les tissus à forte demande énergétique, y compris dans les BAT, le cœur, le muscle squelettique, le rein et le cerveau [158].

1.1. Signalisation de PGC-1 dans le cœur

La très forte demande d'énergétique du cœur est assurée par un système à haute capacité mitochondriale. En conséquence, il n'est pas surprenant que PGC-1 α et PGC-1 β soient fortement exprimés dans cet organe. Bien que les rôles exacts de PGC-1 β et de PGC-1-Related Coactivator (RPC) dans le cœur n'aient pas été définis, plusieurs preuves indiquent que PGC-1 α contrôle les voies métaboliques énergétiques cardiaques pendant le développement et aussi en réponse aux facteurs de stress physiologique : Premièrement, l'expression de PGC-1 α dans le tissu cardiaque est induite après la naissance au moment où le cœur passe d'un métabolisme glucidique à l'oxydation mitochondriale des acides gras comme source principale d'énergie [159]. De plus, l'expression plus élevée de PGC-1 α est également activée dans le cœur lors d'une période de jeûne [100], stimulus physiologique qui augmente nettement la dépendance du cœur à l'oxydation des lipides pour la production d'ATP mitochondrial. Deuxièmement, PGC-1 α est un coactivateur des récepteurs nucléaires PPAR α et ERRA, récepteurs, qui contrôlent les gènes impliqués dans l'oxydation [162] des acides gras cardiaques et la fonction respiratoire mitochondriale. Enfin, la surexpression de PGC-1 α dans les myocytes en culture active la biogenèse mitochondriale [163].

1.2. Signalisation de PGC-1 et la fonction hépatique

Dans des conditions normales, l'expression de PGC-1 α et de PGC-1 β est relativement faible dans le foie par rapport à d'autres tissus qui dépendent du métabolisme aérobie pour la production d'ATP. Toutefois, l'expression des gènes PGC-1 α et PGC-1 β hépatique est fortement induite par le jeûne. Pendant la période de jeûne, la voie de l'oxydation des acides gras est une source clé de substrats pour la production d'ATP, la cétogenèse, et la néoglucogenèse. PGC-1 α et PGC-1 β activent l'expression de PPAR α , récepteur nucléaire, dont la fonction et la régulation de la transcription des gènes cibles impliqués dans l'oxydation des acides gras hépatiques. Les taux d'oxydation des acides gras sont diminués dans les hépatocytes isolés chez les souris déficientes en PGC-1 α [164].

En somme, l'induction de l'expression de PGC-1 α et de PGC-1 β dans le foie est un événement critique qui conduit à l'activation des voies métaboliques énergétiques et sert à augmenter la production d'ATP en exerçant un contrôle homéostatique, en particulier dans le contexte de jeûne. Vu l'importance des troubles hépatiques métaboliques des lipides dans les maladies fréquentes telles que la stéatose hépatique non alcoolique (NASH) et alcoolique, l'insulino-résistance et le diabète, les voies régulées par PGC-1 α représentent un potentiel de nouvelles cibles thérapeutiques pour les pathologies hépatiques [160].

2. PGC α et Récepteurs Nucléaires

Les récepteurs nucléaires (RN) des facteurs de transcription ont été initialement décrits comme des facteurs de transcription ligand-dépendants, c'est le cas pour environ la moitié des RN chez les mammifères. Ces dernières années, un certain nombre de récepteurs ont été identifiés sans connaissance préalable de leurs ligands. Ces RN répondent aux intermédiaires lipidiques dérivés de l'alimentation, y compris les acides gras à longue chaîne, les oxystérols et les acides biliaires. Activés par des ligands, les RN sont prêts à répondre rapidement à des niveaux fluctuants de substrats [163].

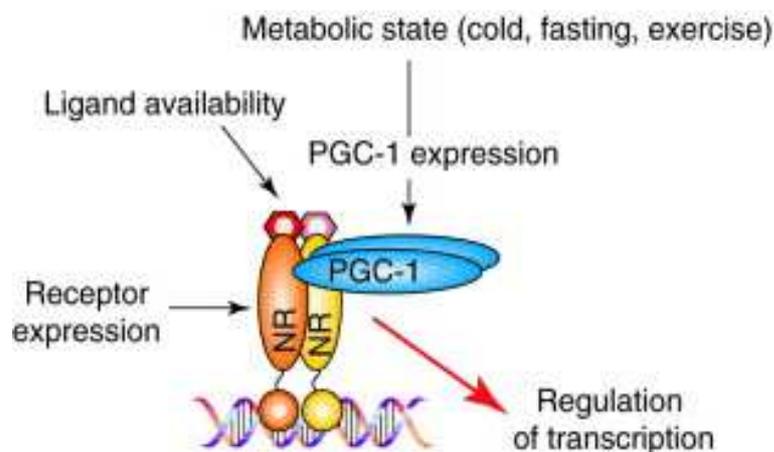


Figure 21. Intéraction de PGC-1 avec les récepteurs nucléaires, complexe indispensable pour la régulation de la transcription (modifié d'après Knutti 2001)[165]

Tableau 3. Récepteurs nucléaires en interaction avec PGC-1 α

Récepteurs nucléaires	Fonction
NRF1	Biogenèse mitochondriale
NRF2	Biogenèse mitochondriale
ERR α \ \beta\ \gamma	Biogenèse mitochondriale
PPAR α	Oxydation des acides gras
PPAR δ (β)	Oxydation des acides gras
TR β	Induction CPT-I
FXR	Métabolisme des triglycérides
LXR α \ \beta	Secretion des lipoprotéines
GR	Gluconéogenèse
HNF 4 α	Gluconéogenèse
FOXO1	Gluconéogenèse
PPAR γ	Différenciation des adipocytes; induction UCP1

2.1. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPARs)

Les peroxysomes sont des organites cellulaires présents dans pratiquement toutes les cellules eucaryotes. Actuellement, plus de 60 protéines associées aux peroxysomes ont été trouvées chez les mammifères, plus de la moitié de ces protéines participent au métabolisme lipidique : catabolisme et anabolisme des acides gras. L'oxydation des acides gras se produit dans les mitochondries, les peroxysomes, et le réticulum endoplasmique lisse. La transcription de certaines des enzymes essentielles de ces systèmes d'oxydation est contrôlée par le peroxisome proliferator-activated α (PPAR α).

Le terme PPARs vient de la dénomination de divers composés structurellement appelés proliférateurs de peroxysomes, et qui ont la capacité d'induire des réponses prévisibles pléiotropiques dans le foie des rongeurs, y compris le développement de tumeurs du foie. Cette famille est composée de trois isotypes, PPAR α , PPAR δ (aussi appelé β), et PPAR γ , qui sont codés par de gènes différents, mais ils ont le même profil de régulation et d'expression [166].

2.1.1. Mécanisme général d'action des PPARs

L'hétérodimère PPAR/RXR se lie à l'élément de réponse DR-1 dans les régions régulatrices des promoteurs des gènes cibles. La liaison d'un ligand agoniste à l'hétérodimère favorise le recrutement des protéines coactivatrices et provoque l'activation de la transcription [167].

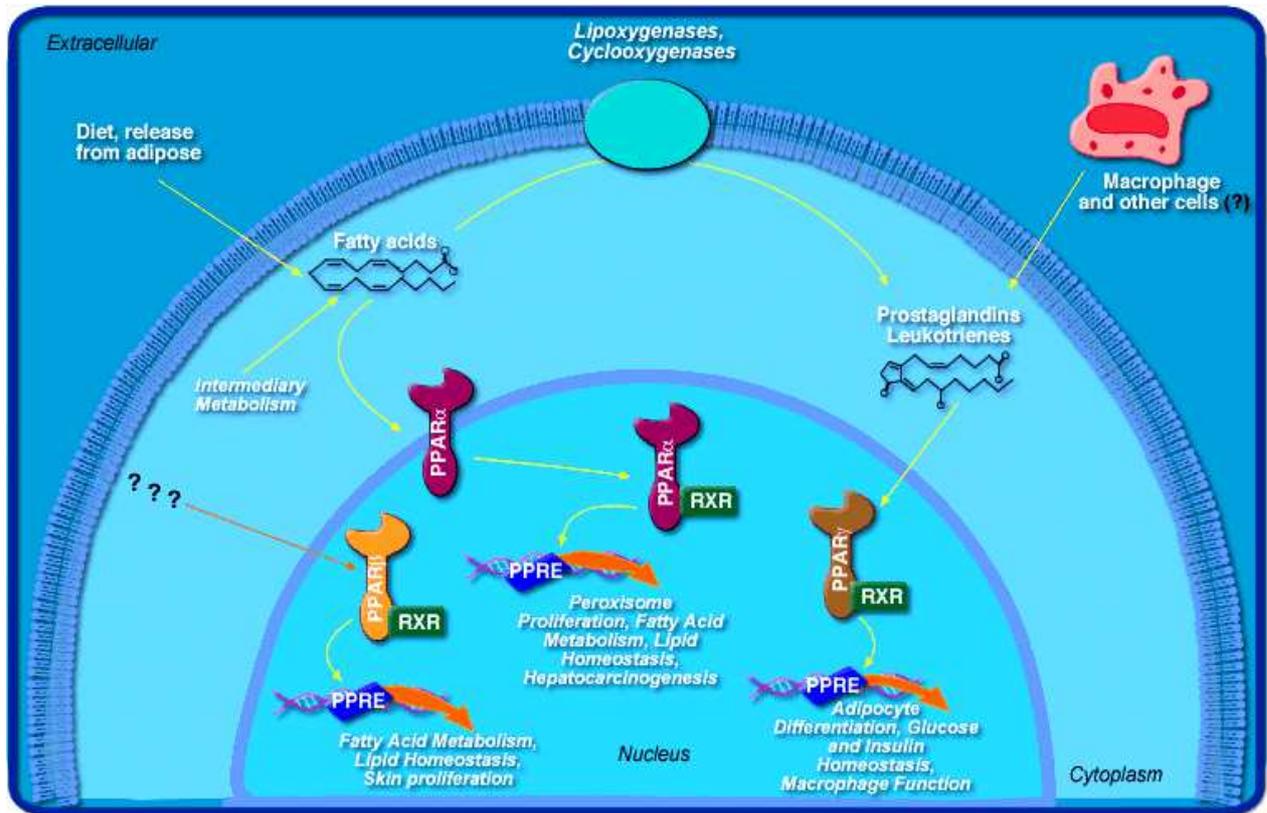


Figure 22. Schéma général d'activation des PPARs (modifié d'après Fanen-PCEM2-Biochimie-2005)[168].

2.1.2. PPAR α

PPAR α est exprimé principalement dans les tissus métaboliquement actifs : foie, rein, cœur, muscle squelettique et le tissu adipeux brun, mais également dans les monocytes, les cellules endothéliales vasculaires et les cellules musculaires lisses.

PPAR α est activé par de très nombreuses molécules (ligands). Parmi les 3 types de PPAR(s), seul PPAR α lie une multitude d'acides gras. Les ligands naturels majeurs sont les acides gras saturés et insaturés (acides palmitique, oléique, linoléique et arachidonique) avec une

constante d'affinité de l'ordre d'une micromolaire. Il existe aussi d'autres ligands naturels: eicosanoïdes (dérivées de l'acide arachidonique par la voie de la lipooxygénase ou de la cyclooxygénase) avec une constante d'affinité élevée mais une concentration tissulaire très faible.

Il a été suggéré que PPAR α puisse jouer le rôle de régulateur de besoins en lipides des tissus en régulant leur captation et leur oxydation, en opposition à la fonction de PPAR γ , qui favorise la capture et le stockage ultérieur des lipides dans le tissu adipeux [169].

Les ligands synthétiques sont des médicaments hypolipidémiants de la famille des fibrates, mais aussi les phtalates et les herbicides. Chez les rongeurs, les fibrates provoquent la prolifération des péroxysomes et une hépatomégalie (prolifération des hépatocytes et l'inhibition de l'apoptose). Ce phénomène n'a pas été observé chez l'homme, Puisque l'utilisation des fibrates en clinique, n'augmente pas le nombre des cancers hépatiques.

L'expression hépatique de PPAR α suit un rythme diurne et est stimulée par les conditions de stress corrélé aux variations de concentration de glucocorticoïdes [169, 170].

2.1.2.1. PPAR α et β -oxydation peroxisomale

Les gènes activés par PPAR α codent des enzymes de la β -oxydation peroxysomale, telles que l'acyl-CoA oxydase, l'énoyl-CoA hydratase / déhydro-oxygénase, enzyme multi fonctionnelle et la céto-acyl-CoA thiolase [167].

2.1.2.2. PPAR α et β -oxydation mitochondriale

La fonction de PPAR α dans l'homéostasie énergétique est également liée à la régulation de la β -oxydation mitochondriale. La première étape limitante de ce processus est l'afflux d'acides gras dans les mitochondries, qui est favorisé par la carnitine palmitoyl transférase-1 (CPT 1), dont l'expression est fortement induite par PPAR α . Ce récepteur nucléaire semble également réguler la β -oxydation mitochondriale par une augmentation de l'expression du gène de l'acyl-CoA déshydrogénase (MCAD). Dans les mitochondries l'hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase (mHMG-CoAS) est la principale enzyme impliquée dans la formation de corps cétoniques et elle est directement sous le contrôle de PPAR α [171].

Tableau 4. Effets de l'activation de PPAR α

Effets sur le métabolisme lipidique
<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du taux de HDL par stimulation de la synthèse des APO-AI et AII • Diminution AG disponibles pour la synthèse hépatique des triglycérides (TG) et des VLDL <ul style="list-style-type: none"> ✓ Par Augmentation de l'entrée des AG dans les mitochondries et activation de leur β-oxydation. ✓ Par activation de la lipoprotéine lipase (LPL) ✓ Par la baisse de la synthèse de l'apo CIII (inhibiteur de la LPL) <p style="text-align: center; margin-left: 40px;">➤ Diminution de la triglycéridémie (de 40 à 50% avec le Fénofibrate)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Diminution CETP (transporteur de TG et de cholestérol entre lipoprotéines) <ul style="list-style-type: none"> ✓ Diminution des échanges entre VLDL et HDL : enrichissement des HDL ✓ Diminution des échanges entre VLDL et HDL : appauvrissement des LDL en TG, LDL de grandes tailles et moins athérogènes
Effets sur l'athérosclérose
<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression des récepteurs CD36 qui reconnaissent les LDL oxydés dans les macrophages et favorisent leur internalisation • Augmentation SRB1 et ABCA1 → favorise l'afflux de cholestérol des macrophages vers les HDL → limite l'apparition de cellules spumeuses
Effets anti-inflammatoires
<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de l'expression de molécules d'adhésion de l'endothélium (VCAM-1) • Diminution d'IL6, COX-2 (médiators de l'inflammation) et de la protéine C-réactive
Effet sur l'hémostase
<ul style="list-style-type: none"> • Diminution du taux plasmatique de fibrinogène (limite les dépôts fibreux qui risquent de d'obstruer les vaisseaux)

2.1.3.PPAR β

PPAR β (nommé également PPAR δ) est une protéine ubiquitaire, avec des niveaux relativement élevés d'expression dans le cœur, le muscle squelettique, le cerveau et la peau. Elle participe à la régulation de l'oxydation des acides gras. PPAR β joue un rôle essentiel dans la différenciation adipocytaire et le stockage des lipides. Bien que les ligands endogènes

sélectifs pour les PPARs n'aient pas été établis avec certitude, les ligands naturels non sélectifs sont les acides gras et les prostacyclines dépendantes de COX2 (PG12) [170].

2.1.4.PPAR γ

PPAR γ comme PPAR α et PPAR β est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires et un facteur de transcription ligand-spécifique qui a pour fonction d'être un régulateur clé du métabolisme. Il forme un hétérodimère avec les récepteurs X des rétinoïdes (RXR) et se lie en particulier au motif DR-1 de PPAR response elements (PPREs). Il y a deux variants d'épissage, PPAR γ 1, qui possède une expression relativement ubiquitaire et PPAR γ 2, dont l'expression est restreinte aux adipocytes matures. Ces variants sont régulés par des promoteurs distincts. Leurs séquences N-terminale sont différentes mais ils gardent les mêmes activités transcriptionnelles. Il est bien établi que PPAR γ est un régulateur clé de l'adipogenèse. Il est exprimé dans les adipocytes, le colon et les cellules hématopoïétiques mais moins dans les macrophages, les ostéocytes, les cellules endothéliales, le placenta, le rein, le foie, les muscles squelettique et lisse, le pancréas et l'intestin grêle. Le rôle de PPAR γ dans les macrophages implique la lutte contre l'inflammation, l'absorption et le transport inverse du cholestérol. Le grand intérêt de la recherche sur PPAR γ n'est pas seulement dû à son fort niveau d'expression dans le tissu adipeux, mais également à son rôle important dans l'adipogenèse [172].

Ses ligands naturels sont les acides gras et leurs dérivés (eicosanoides, prostaglandines). Ainsi que les ligands synthétiques sont les thiazolidinediones (glitazones), et les AINES (ibuprofène, indométacine).

2.2. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α)

Hépatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α) aussi connu comme sous le nom de NR2A1 (nuclear receptor subfamily 2, group A, member 1) fait partie de la famille des récepteurs nucléaires. Il se lie à l'ADN sous forme d'un homodimère et régule l'expression de nombreux gènes clés impliqués dans le métabolisme du cholestérol, des acides gras et du glucose. Son activité peut être modulée par la liaison de l'acyl-CoA thioesters [173]. La protéine HNF4 joue un rôle dans le développement du foie, des reins et des intestins et des cellules du pancréas. Les changements d'expression du gène d'HNF4 α peuvent provoquer un diabète de type I en réduisant la quantité d'insuline [174]. Il existe quatre sous-familles d'HNF, dont les protagonistes sont HNF1 (famille homéo-domaine), HNF3 (*forkhead family*), HNF4 (famille des récepteurs nucléaires orphelins) et HNF6 (*onecut family*). Tous les 4 sont impliqués dans

la régulation de la gluconéogenèse hépatique. Des mutations d'HNF4 α et d'HNF1 altèrent l'homéostasie du glucose, et sont à l'origine d'une forme spécifique du diabète familial appelée MODY (*maturity-onset diabetes of the young*). Le diabète est de survenue précoce (dès l'enfance à l'âge et jusqu'à moins de 25 ans), sa transmission est autosomique dominante et le plus souvent non insulino-dépendante à sa découverte [175].

PGC-1 α est un coactivateur d'HNF-4 α nécessaire pour induire l'expression de gènes impliqués dans la gluconéogenèse [176]. PGC-1 α interagit avec HNF-4 d'une manière non ligand-dépendant. Ceci suggère fortement que l'inhibition chimique de PGC-1 α sur HNF4 α pourrait avoir des effets cliniques importants [177].

2.3. Estrogène Receptor (ER α):

Les œstrogènes régulent de nombreux processus cellulaires dans une grande variété de tissus cibles pendant la croissance, le développement et la différenciation. Les œstrogènes sont principalement impliqués dans la régulation et le développement du tractus reproducteur féminin, mais aussi jouent un rôle dans le système nerveux central, le système cardiovasculaire, et dans le métabolisme osseux [178]. Les effets biologiques des œstrogènes sont principalement observés via leurs actions sur leurs récepteurs nucléaires dont le rôle est de réguler l'expression des gènes sensibles aux œstrogènes.

Le récepteur aux œstrogènes ER α (NR3A1) est un membre de la famille de ces récepteurs nucléaires, qui sont des facteurs de transcription ligand-dépendant [179]. Les mitochondries sont également des cibles importantes pour l'action des œstrogènes et des récepteurs aux œstrogènes (ERs). Plusieurs données de la littérature ont souligné que l'absence d'ER α provoque une hyperplasie/hypertrophie adipocytaires, une résistance à l'insuline, et une intolérance au glucose et une diminution des dépenses énergétiques dans les deux sexes, révélant ainsi que la signalisation de E2/ER α est essentielle autant chez les femmes que chez les hommes [180]. Dans les adipocytes humains matures, ER α est l'isoforme la plus fortement exprimée quel que soit le sexe, tandis qu'ER β semble être plus fortement exprimé chez les femmes. De plus, seul ER α , est exprimé dans les préadipocytes, même si son expression est très faible comparée à celle dans les adipocytes matures. Les deux ERs sont également exprimés dans les tissus adipeux chez le rat, à nouveau avec une prédominance d'ER α . Bien que les mécanismes responsables de la régulation des œstrogènes sur l'adipogenèse restent flous, l'absence d'œstrogènes entraîne une altération de l'activité de la lipoprotéine Lplase (LPL), une enzyme lipogénique qui régule le métabolisme des triglycérides plasmatiques, des

acides gras libres et l'augmentation du stockage des lipides par les adipocytes [181]. La transcription du gène de la LPL est notamment régulée par les œstrogènes. Chez les femmes, les niveaux de LPL augmentent après la ménopause. De plus, les œstrogènes favorisent la voie de la lipolyse au détriment de la lipogénèse par augmentation de l'expression des lipases qui sont hormono-sensibles et catalysant ainsi l'hydrolyse du triacylglycérol stocké et la libération des acides gras [182].

2.4. Estrogene Related Receptor (ERR)

Les premiers récepteurs orphelins clonés furent $ERR\alpha$ et $ERR\beta$, et des années plus tard furent rejointes par la découverte de $ERR\gamma$. $ERR\alpha$ est largement exprimé dans les tissus adultes, en particulier dans les tissus qui utilisent ou peuvent utiliser la β -oxydation des acides gras, en plus, de nombreuses études ont montré son implication dans le métabolisme énergétique cellulaire. La perte de l'expression de $ERR\beta$ entraîne des malformations placentaires et la mort gestationnelle embryonnaire malgré son expression relativement limitée chez l'adulte. $ERR\gamma$ est fortement exprimé dans les tissus à haute activité métabolique (par exemple le cœur, les reins, les muscles à contraction lente, le tissu adipeux brun et le système nerveux central), et la perte d'expression de ce récepteur dans les souris a pour conséquence une plus grande mortalité néonatale, probablement en raison d'une altération de l'allaitement maternel [183].

En effet, $PGC-1\alpha$ possède un domaine d'interaction protéique qui est dédié spécifiquement aux ERRs. L'interaction entre $ERR\alpha$ et $PGC-1\alpha / \beta$ est un processus moléculaire clé, plusieurs études ont mis en évidence que des protéines mutantes de $PGC-1\alpha$ n'ont pas la capacité d'interagir avec tous les récepteurs nucléaires (NRs), y compris les ERRs, et donc ne parviennent pas à induire l'expression des gènes du métabolisme énergétique. L'activité $ERR\alpha$ peut être inhibée par des siRNA ou par un antagoniste de $ERR\alpha$ ce qui entraîne une altération de la capacité de $PGC-1\alpha$ à induire l'expression des gènes du métabolisme énergétique et à améliorer la biogenèse mitochondriale et la capacité oxydative [184].

En réponse à l'activation de $PGC-1\alpha$ et/ou $PGC-1\beta$, $ERR\alpha$ régule la fonction de gènes importants pour la biogenèse mitochondriale. Les souris KO $ERR\alpha$ ont des anomalies dans la biogenèse mitochondriale et dans la voie oxydative mitochondriale favorisant un dysfonctionnement cardiaque et présentant un risque infectieux plus important. En résumé, l'activité $ERR\alpha$ est principalement contrôlée par l'interaction de ses ligands protéiques, tels que $PGC-1\alpha$ et de $PGC-1\beta$ [179, 185].

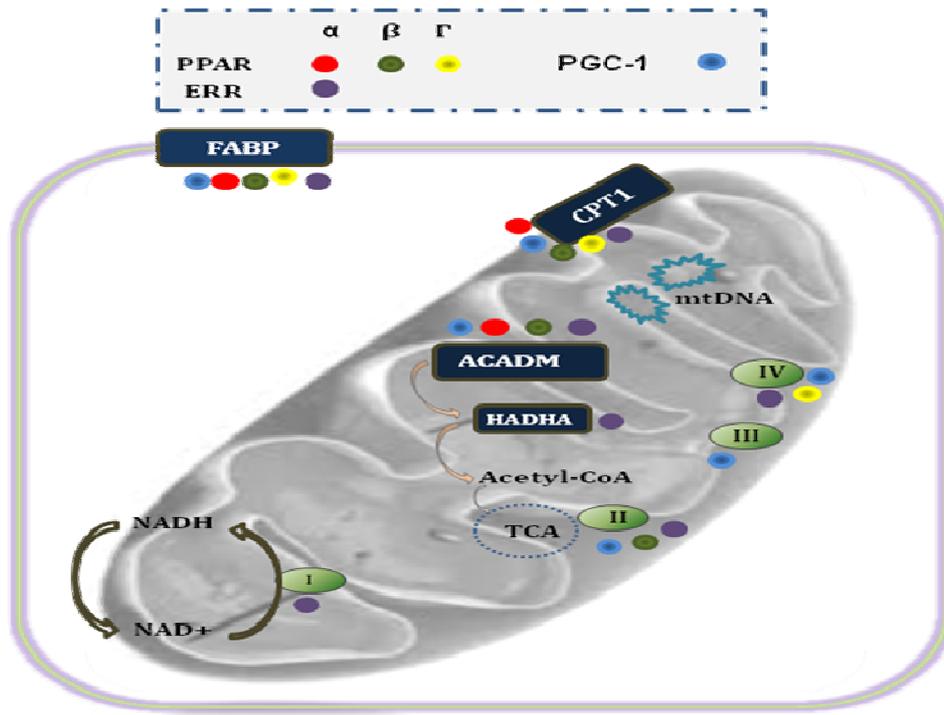


Figure 23. La régulation des récepteurs nucléaires des enzymes du métabolisme (modifié d'après Alaynick et al. 2008). Les récepteurs nucléaires peuvent influencer l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme lipidique notamment le métabolisme des lipoprotéines, l'absorption d'acides gras, la navette dans l'oxydation des acides gras et les mitochondries[185]

3. Régulation de PGC-1 α

Le coactivateur PGC-1 α a la capacité de réguler sa propre transcription en réponse à des états de jeûne ou de prise alimentaire. Toutefois, un niveau supplémentaire de régulation est exercé par des modifications post-traductionnelles. En particulier, l'acétylation réversible, la phosphorylation et la méthylation sont les principaux mécanismes par lesquels la fonction de PGC-1 α est maintenue. PGC-1 α et PGC-1 β sont trouvés dans un complexe avec GCN5, une acétyl-transférase qui acétyle PGC-1 sur plusieurs résidus lysine et inhibe son activité transcriptionnelle. Inversement, la Sirtuine-1 (SIRT1) désacétyle un certain nombre de cibles qui ne sont pas des histones, y compris PGC-1 α et de PGC-1 β , activant ainsi ces deux cofacteurs. Ainsi, SIRT1 s'oppose à l'action des GCN5 et induit l'expression des gènes cibles de PGC-1. SIRT1 est située dans le compartiment nucléaire dont les régulations positive et négative passent respectivement par le cofacteur NAD⁺ et le cofacteur NADH, H⁺ ou par les produits de désacétylation de nicotinamides. SIRT1 consomme un NAD⁺ pour chaque groupe acétyle retiré d'un substrat protéique. Une diminution du ratio de NAD⁺/NADH inhibe l'activité de SIRT1. Cette dépendance en NAD oxydé peut lier l'activité de SIRT1 au métabolisme cellulaire [186]. D'autre part, PGC-1 α est phosphorylé par les kinases p38-MAPK qui sont elles-mêmes activées par l'AMP cyclique, conduisant ainsi à une protéine plus stable et plus active. En revanche, la phosphorylation de PGC-1 α par Akt / protéine kinase B (impliquée dans la cascade de signalisation de l'insuline) dans le foie entraîne une diminution de la stabilité et de l'activité de PGC-1 α . Par ailleurs, la fonction de PGC-1 α peut augmenter par méthylation de plusieurs résidus arginine dans la région C-terminale par la protéine arginine méthyltransférase I (PRMT1) qui coactive également les récepteurs nucléaires [187].

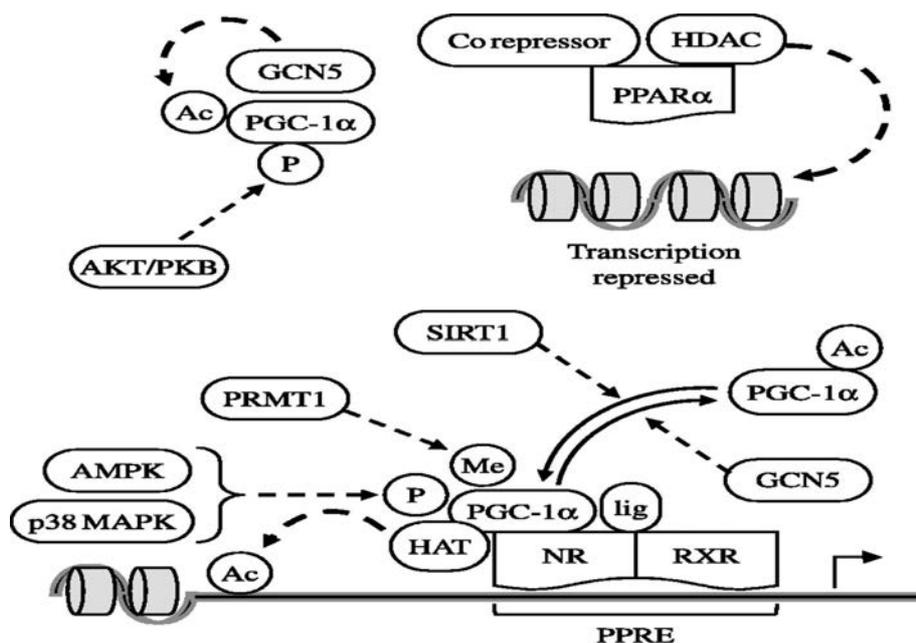


Figure 24. Modifications post-traductionnelles de PGC-1, (D'après Sugden *et al.* 2010)[188]

3.1. Modifications post-traductionnelles

Les chromosomes eucaryotes sont des structures très organisées. La chromatine est constituée d'ADN, d'histones et de différents complexes protéiques qui facilitent les modifications dynamiques se produisant lors de la réplication de l'ADN, de la progression du cycle cellulaire, des événements de régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, de la réparation de l'ADN et de la recombinaison. Les changements réversibles héréditaires dans la fonction des gènes qui se produisent sans aucune modification de la séquence nucléotidique d'ADN ont été explorés au cours de cette dernière décennie. Ainsi, il a été démontré que l'expression des gènes pouvait être régulée par la modulation des histones. Les histones jouent un rôle structural et fonctionnel dans toutes les traitements nucléaires. Bien que, historiquement connu comme "le matériel d'emballage" pour l'ADN nucléaire, les fonctions des histones ont été récemment découvertes dans les années 1990s. Les nucléosomes sont les unités structurales de base de la chromatine et sont évolutivement conservées chez tous les eucaryotes. La particule de cœur du nucléosome (ou noyau nucléosomique) se compose de deux exemplaires de chacun des H2A, H2B, H3 et H4 histones, autour desquelles s'enroule 146 paires de bases d'ADN. La liaison de l'histone H1 stabilise l'assemblage du noyau octamérique en chromatine-spécifique des structures d'ordre supérieur. En plus du nucléosome, la chromatine contient une grande variété de protéines accessoires

supplémentaires et de nombreux variants d'histones qui ne sont pas distribués au hasard dans la chromatine, mais sont exprimés selon les différents contraintes du développement et définissent les différents types cellulaires.

Les modifications des histones, y compris l'acétylation, les méthylations de la lysine et de l'arginine et la phosphorylation de la sérine, jouent des rôles importants dans la régulation transcriptionnelle d'initiation et d'élongation et épigénétique de la mémoire cellulaire. Ces modifications fournissent une source d'informations qui peuvent être utilisées comme des marqueurs épigénétiques pour la transduction du signal et la dynamique cellulaire [189].

3.1.1. Méthylation

Fréquemment, ces deux mécanismes de régulation des gènes sont accomplis par modification post-traductionnelle spécifique des protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle. Ces modifications altèrent la fonction des protéines de manière spécifique. Le rôle de la phosphorylation dans la régulation transcriptionnelle a été largement étudié, mais récemment, l'importance des autres types de modifications des protéines, y compris l'acétylation et la méthylation, ont commencé à être reconnu. La méthylation des protéines est l'une des modifications protéiques les plus souvent rencontrées. Par exemple, environ 2 % des résidus arginine ont été trouvés diméthylés dans des extraits de protéines totales à partir des cellules de foie de rat [190].

3.1.1.1. La famille des Arginine méthyltransférases

La méthylation de l'arginine a d'abord été décrite comme une modification post-traductionnelle des histones à la fin des années 1960 [191, 192]. Mais des enzymes responsables et la grande variété de substrats de cette modification ont été identifiés plus récemment. Les interactions d'une protéine méthylée avec ses partenaires peuvent donc être affectées par cette modification et avoir un impact sur les fonctions physiologiques de la protéine. Les substrats de la protéine arginine méthyltransférase (PRMT) comportent des facteurs de transcription, des facteurs liaison aux acides nucléiques, des transducteurs du signal, des facteurs d'épissage et les histones. Du fait du nombre important de substrats, les PRMTs *via* leur réaction de méthylation de l'arginine régulent divers processus cellulaires, y compris la différenciation, la réparation de l'ADN, la maturation de l'ARN, la transduction du signal, la localisation cellulaire et l'apoptose [193].

Il existe 11 membres de la famille de PRMT. Chez l'homme, 8 ont montré une activité enzymatique bien établie. La famille PRMT peut être divisée en deux groupes majeurs : les enzymes de type I : PRMT1, -2, -3, -4, -6 et -8, elles catalysent l'addition de 2 groupements méthyle sur le même groupe azote terminal de l'arginine, générant l'Asymétrique diméthyl arginine (ADMA) [194]. Inversement, les enzymes de type II : PRMT5, -7 et -9 et la protéine F-box (FBXO) transfèrent le second groupement méthyle vers l'autre azote terminal, générant la Symétrique diméthyl arginine (SDMA). La diméthylation de l'arginine par les deux types d'enzymes passe par la génération d'un intermédiaire monométhyl arginine [195]. Certains substrats ne sont monométhylés que par PRMT7, qui est classé dans le type III. Les queues des histones sont une cible privilégiée de cette famille d'enzymes (Figure 25) [196].

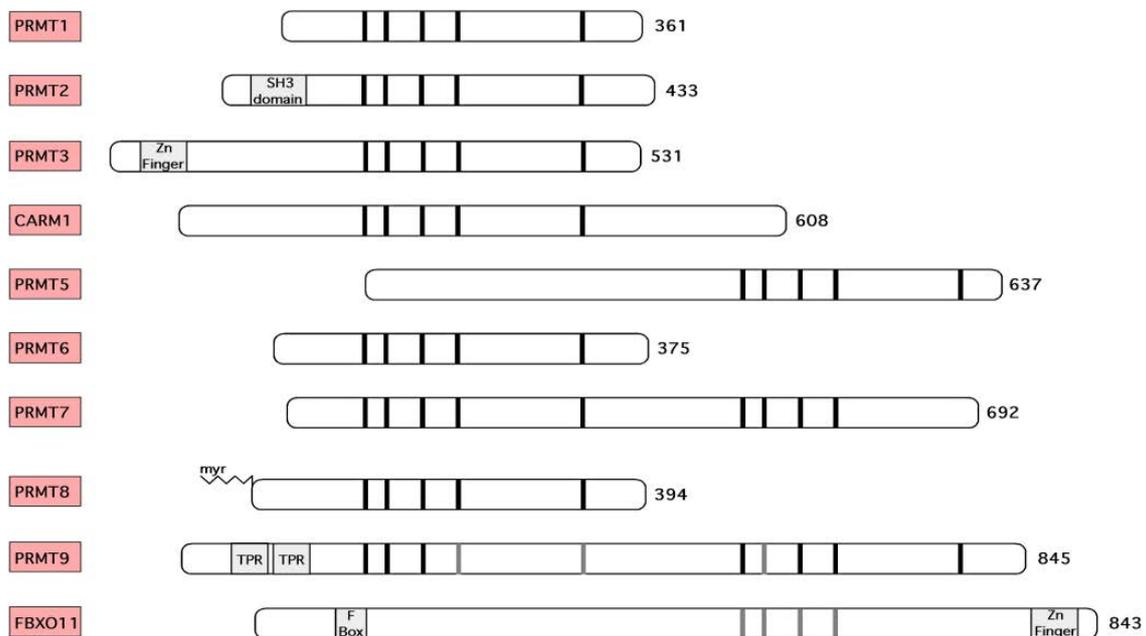


Figure 25. La famille des protéines arginine méthyltransférase, (D'après BedfordT, et al. Mol Cell 2009), La famille des PRMTs de mammifères contient actuellement neuf membres : hPRMT1 (AAF62893), hPRMT2 (AAH00727), hPRMT3 (AAC39837), hCARM1 (NP_954592), hPRMT5 (AAF04502), hPRMT6 (Q96LA8), hPRMT7 (NP_061896), mPRMT8 (DAA01382), hPRMT9 (AAH64403), and mFBXO11 (AAI28480).[194]

Les Type I et Type II de ces enzymes catalysent la formation d'un intermédiaire monométhylarginine puis les PRMTs de type I (PRMT1, 2, 3, 4, 6 et 8) catalysent davantage la production de l'ADMA, tandis que les PRMTs de type II (PRMT5 et 7) catalysent la formation de SDMA (Figure 26). Certains substrats ne sont monométhylés que par PRMT7. La queue d'histone est une cible privilégiée pour cette famille d'enzymes (Figure 26) [196].

H4R3me2a). En tant que coactivateur transcriptionnel, PRMT1 est recruté par un certain nombre de facteurs de transcription différents [198]. L'activité de PRMT1 peut être régulée de différentes façons. PRMT1 est présent aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau, et possède une grande mobilité entre ces compartiments. Sa localisation peut être régulée en partie par des protéines qui lui sont associées, comme pregnane X receptor (PXR) qui peut modifier la localisation de PRMT1, favorisant son accumulation dans le noyau. L'activité de PRMT1 est également stimulée par la liaison à d'autres protéines, telles que BTG1 (B-cell translocation gene 1), TIS2/BTG2 et hCAF1 (CCR4-associated factor 1) [199, 200].

3.1.1.2. Les substrats de PRMT1

La méthylation de l'arginine a été impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires, y compris la transduction du signal, la localisation subcellulaire des protéines, les interactions protéine-protéine, et la régulation transcriptionnelle. En effet, PRMT1 a un ensemble diversifié de substrats dans la cellule. En particulier, les histones qui sont les principales cibles des PRMTs, dont la méthylation joue un rôle important dans les modifications des histones. PRMT1 diméthyle spécifiquement l'histone H4 sur l'arginine 3. (H4R3) [201].

Les enzymes PRMT possèdent également comme substrat de nombreuses protéines liant l'ARN comme par exemple PGC-1 α . Ces substrats sont méthylés sur leurs résidus arginine en d'autre par PRMT1 ou CARM1, une enzyme faisant partie de la famille des PRMTs (PRMT4). Les données indiquent que la méthylation de PGC-1 α par PRMT1 sur ces deux ou trois résidus Arg se situe dans une séquence RERQR, localisée dans la région C-terminal. Cette réaction de méthylation joue un rôle essentiel dans la fonction de coactivateur de PGC-1 α et de sa capacité à fonctionner en synergie avec PRMT1. La méthylation de PGC-1 α par PRMT1 peut être régulée. Ainsi PGC-1 α dans le rôle de coactivateur à deux composantes, l'une indépendante de PRMT1 et une dépendante de PRMT1. Le domaine d'activation N-terminal semble être important pour ces deux activités, mais les mécanismes spécifiques qui interviennent en aval de ces deux composantes de l'activité de PGC-1 α restent à définir [202].

3.1.2. Acétylation

Parmi les modifications post-traductionnelles, l'acétylation a été bien étudiée, L'acétylation est une modification chimique consistant à ajouter un groupement acétyle (COCH₃) sur une molécule, par exemple une histone. L'acétylation est assurée par des enzymes spécifiques, les

acétyltransférases. L'acétylation est notamment observée sur les résidus lysine des protéines basiques histones, qui s'associent avec l'ADN, afin de réguler l'expression des gènes.

Bien que l'acétylation de la lysine ait été découverte sur les histones dans le contexte de régulation de la chromatine, il est maintenant clair que l'acétylation joue un rôle crucial dans la régulation et la fonction des facteurs de transcription et des enzymes métaboliques [203].

3.1.2.1. GCN5 (general control of amino acid biosynthesis 5')

GCN5 a été identifiée initialement comme un facteur de transcription impliqué dans la réponse cellulaire à la restriction en acides aminés [204]. GCN5 catalyse l'acétylation de l'histone H3 à la lysine 9 et 14 et à l'histone H4 à lysine 8 et 16 [189]. GCN5 acétyle directement PGC-1 α sur de multiples résidus de lysine. L'interaction de GCN5 et PGC-1 α dépend du domain C-terminale de GCN5 et d'une séquence d'acides aminés situés dans les 200 premiers résidus de PGC-1 α . GCN5 peut réguler négativement l'activité transcriptionnelle de PGC-1 α , au moins en partie, par sa sous-localisation nucléaire [205]. Une hypothèse mécanistique montre que lorsque PGC-1 α se lie à des facteurs de transcription spécifiques de promoteurs, il s'ensuit le recrutement de la protéine p300 et du complexe TRAP dont le rôle est de permettre l'ouverture de la chromatine par acétylation des histones permettant ainsi l'initiation de la transcription grâce à l'ARN polymérase 2 [189, 202].

Sous des conditions de surnutrition et de diminution de la concentration intracellulaires en NAD⁺, PGC-1 α est hyperacétylé par GCN5 et situé à proximité des corps nucléaires avec ses facteurs de transcription partenaires. Dans cet état, le complexe PGC-1 α est effectivement transcriptionnellement inactif. Comme les cellules sont confrontées à une disponibilité faible en nutriments, la concentration en NAD⁺ intracellulaires doit augmenter et conduire à une augmentation de la vitesse à laquelle PGC-1 α sera désacétylé par Sirt1. Le changement de l'acétylation de PGC-1 α coïncide avec un taux d'occupation accrue de PGC-1 α sur les promoteurs de ses gènes cibles et une augmentation de l'activation transcriptionnelle par un remodelage de l'environnement de la chromatine locale, par des protéines telles que p300, et de plus grande interaction avec la machinerie transcriptionnelle, facilité par des protéines telles que TRAP/complexe médiateur [189].

Enfin, l'acétylation est une modification réversible et le clivage est catalysé par des déacétylases.

3.1.2.2. Sirtuines

Lors de cette dernière décennie, des études ont mis en évidence une nouvelle classe de protéines appelés « *Silent information 2 regulator* » (SIR) qui est impliquée dans la régulation du vieillissement de plusieurs organismes tels que la levure, le ver *Caenorhabditis elegans* et la Drosophile, dont la longévité est accrue par la restriction calorique. Les mammifères possèdent sept homologues de SIR (sirtuines, SIRT 1-7). Les sirtuines catalysent la désacétylation d'histones et des protéines de façon NAD-dépendante, et régulent ainsi un grand nombre de fonctions cellulaires. Chez l'homme, la Sirtuine (SIRT1) est la protéine la plus étudiée de cette famille et les différentes données ont montré qu'elle était impliquée dans la protection du stress oxydant et de l'altération de l'ADN. SIRT1 apparaît jouer également un rôle important dans le métabolisme du pancréas, du tissu adipeux et du foie. Le nom «Sirtuines» a d'abord été donné à la famille de ces protéines par Roy Frye en 1991 qui a identifié pour la première fois SIRT 5 chez l'humain [206, 207].

La famille de sirtuines chez les mammifères se compose de sept sirtuines découverts chez l'homme jusqu'à présent, SIRT1-7. Tous ces éléments ont un domaine catalytique NAD⁺ dépendant, qui peuvent agir préférentiellement comme une désacétylase NAD⁺ dépendant (DAC) et / ou mono-ADP-ribose transférase (ART). Les séquences N-terminale et C-terminale qui flanquent la base catalytique varient en longueur entre les différentes sirtuines. Les SIRT étaient connues pour être des protéines nucléaires, mais plus récemment, il a été constaté que ces protéines se déplaçaient entre le compartiment nucléaire et cytoplasmique et que sa fonction dans le cytoplasme de la cellule était très importante. Parmi les sept sirtuines mammifères, SIRT1 est la plus étudiée, possédant plus d'une douzaine substrats connus à ce jour et des rôles impliqués dans un large éventail de processus cellulaires, y compris la survie cellulaire et les voies apoptotiques [208].

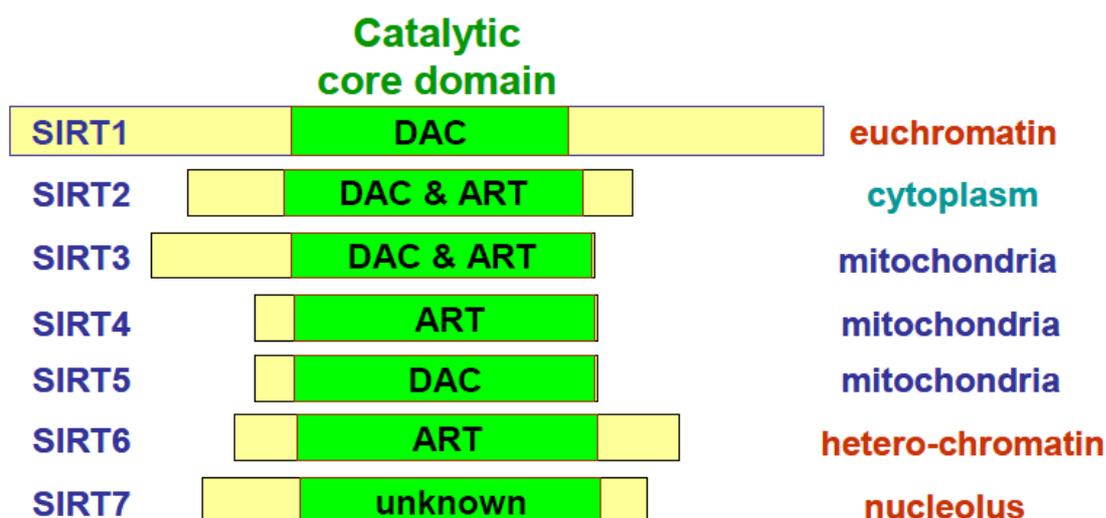


Figure 27. La famille de SIRTUINES et sa localisation intracellulaire : SIRT1, SIRT6 et SIRT7 étant principalement nucléaire, SIRT2 cytoplasmique et SIRT3, SIRT4 et SIRT5 mitochondrial (d'après Ghosh et al. 2010).[209]

3.1.2.3. Régulation de SIRT1

3.1.2.3.1. Régulation de l'activité SIRT1 par l'état nutritionnel

La restriction calorique (RC) et le jeûne stimulent la surexpression des protéines SIRT1 chez les mammifères dans plusieurs tissus, y compris le foie, le muscle squelettique et de la graisse [210]. Des résultats discordants ont été rapportés par deux études, dans lesquelles RC ne produit aucun changement de l'expression ou de la teneur en protéines SIRT1 dans les tissus musculaire et hépatique [129, 211].

Rodgers et al.[212] ont montré que l'expression de protéines SIRT1 dans le foie est spécifiquement régulée par le glucose et le pyruvate et non pas par les hormones liées à l'alimentation comme l'insuline ou le glucagon. Le glucose réduit les concentrations de protéines SIRT1, alors que le pyruvate augmente les concentrations de protéines SIRT1 dans les hépatocytes en culture. Le jeûne augmente les concentrations de pyruvate dans le foie de la souris, ceci est compatible avec une surexpression des protéines SIRT1 induite par le pyruvate [212]. Le jeûne augmente également les niveaux de NAD^+ , un cofacteur indispensable pour l'activité de sirtuines [213].

L'expression de SIRT1 pendant le jeûne semble être régulée positivement par un complexe protéique constitué d'un facteur de transcription: FOXO3a et p53. Par exemple, des souris déficientes en p-53 en condition de jeûne, il n'y a pas une surexpression de SIRT1 [210].

3.1.2.3.2. Régulation de l'activité SIRT1 par le métabolisme NAD⁺

Actuellement, Il est bien établi que l'activité SIRT1 est régulée par le NAD⁺, NADH et le ratio [NAD⁺] / [NADH] ratio dans les cellules de la levure et des mammifères (figure 28). Le NAD⁺ est un cofacteur requis pour la réaction de désacétylation de sirtuines de la levure et de mammifères [214]. La concentration estimée de NAD⁺ libre nucléaire se rapproche à des valeurs de Km de Sirtuines, cela confirme que l'activité de SIRT1 est régulée par la concentration de NAD⁺ cellulaire [215]. L'état de jeûne provoque une augmentation de la concentration en NAD⁺, alors qu'à l'inverse la restriction calorique n'interfère pas avec les concentrations en NAD⁺, mais diminue la concentration en NADH [216] chez la levure. NADH inhibe de manière compétitive la stimulation de NAD⁺ chez la levure. Contrairement à la levure, la RC et le jeûne chez les mammifères ne semblent pas moduler les concentrations en NADH dans les tissus des mammifères [212, 217]. Nonobstant le ratio [NAD⁺] / [NADH] pourrait déterminer l'activité de sirtuines. En effet, une augmentation du rapport [NAD⁺] / [NADH] a conduit à l'inhibition de l'expression du gène SIRT1 dans le muscle squelettique [215].

En outre, les changements d'activité des enzymes qui contrôlent les niveaux de ces métabolites peuvent affecter l'activité SIRT1. Par exemple, la biosynthèse de NAD⁺ et de nicotinamide est catalysée dans deux réactions, dont l'une des étapes est contrôlée par l'enzyme nicotinamide phosphoribosyltransférase (Nampt) aussi connu comme PBEF ou Visfatin. Les changements dans l'activité de cette enzyme dans des conditions de jeûne peuvent positivement réguler l'activité SIRT1 [218].

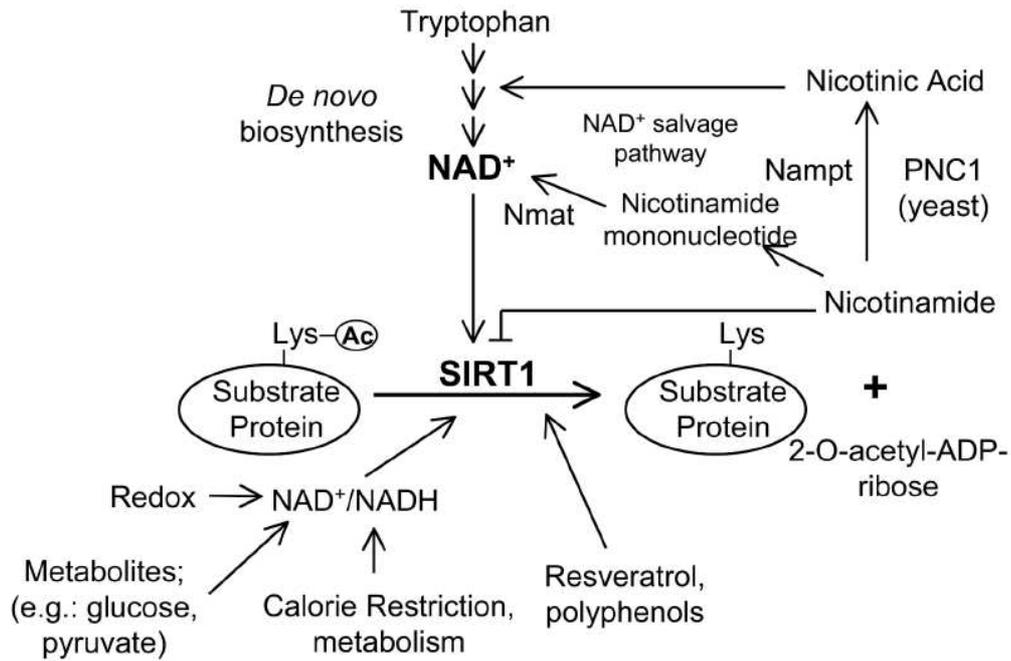


Figure 28. Régulation de l'activité de SIRT1 (d'après Rodgers et al. 2008)[161].

3.2. Modification de PGC1 par acétylation/désacétylation

Chez les mammifères, les cycles d'acétylation / désacétylation contrôlent différents processus métaboliques tissu-spécifique. Par exemple, la capacité de SIRT1 à réprimer PPAR α entraîne des augmentations des lipides dans le tissu adipeux blanc. SIRT1 régule le métabolisme des acides gras dans les mitochondries et les cellules musculaires squelettiques [212]. Il s'ensuit que la disponibilité des nutriments influe sur le niveau basal de PGC-1 α en modifiant les interactions protéiques avec ses partenaires au cours de laquelle la protéine est soit acétylée par GCN5 ou désacétylée par SIRT1, cela se traduit par un changement de l'activité de co-transcriptionnelle de la protéine (Figure 29). Lors de la prise alimentaire et en condition de concentrations basses en NAD⁺ intracellulaire, PGC-1 α est hyperacétylé par GCN5, par conséquent, PGC-1 α est inactif et incapable de jouer son rôle de co-activateur de facteurs de transcription. D'autre part, comme les cellules sont confrontées à une grande disponibilité des nutriments, le niveau intracellulaire de NAD⁺ augmente et conduit à un accroissement, de la vitesse de désacétylation de PGC-1 α par SIRT1. Le changement du taux d'acétylation de PGC-1 α coïncide avec une augmentation de la localisation nucléaire de PGC-1 α sur les promoteurs de ses gènes cibles et une augmentation de l'activation transcriptionnelle [202].

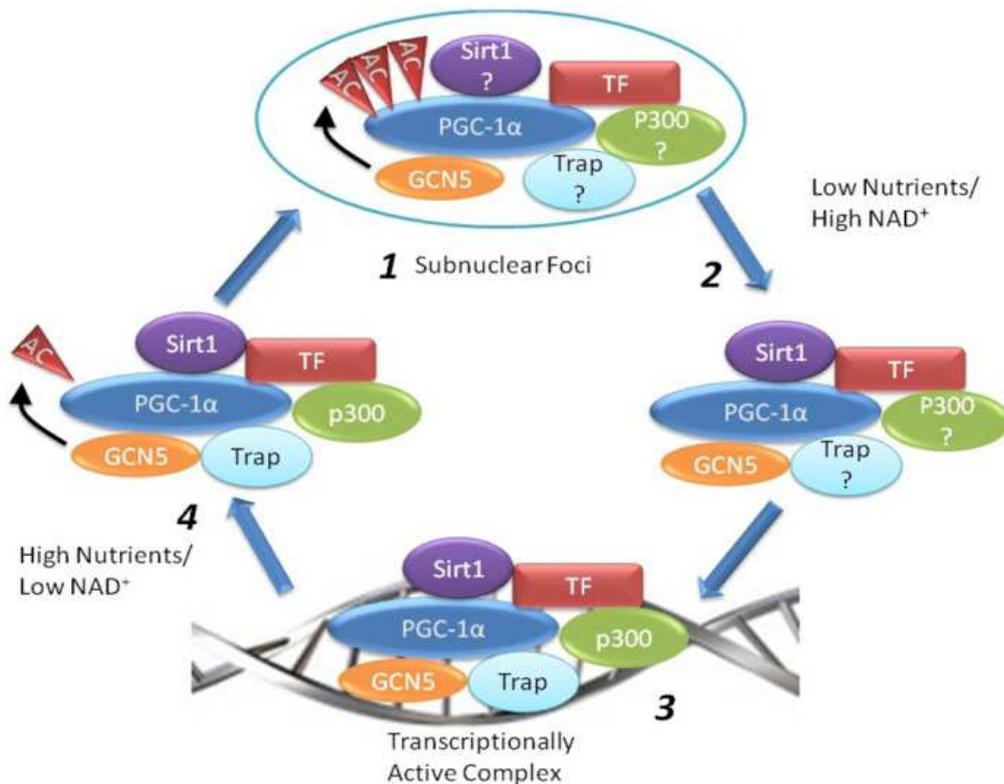


Figure 29. Modèle de régulation d'acétylation de PGC-1 α , (D'après Teyssier 2005)[219]

En plus, SIRT1 interagit avec PGC-1 α et désacétyle 13 lysines de PGC-1 α dans les différents domaines protéiques. La mutation de ces résidus avec l'arginine conduit à une activité plus importante de PGC-1 α . Il est également possible que SIRT1 possède des fonctions en dehors du contrôle transcriptionnelle de l'expression génique. Par exemple, les acétyl CoA synthétases, qui ont été identifiées comme des substrats très anciens de Sir2 chez les bactéries, sont spécifiquement désacétylées par SIRT1 augmentant ainsi l'activité enzymatique de ces enzymes [161, 220].

4. Interaction de PGC-1 α avec SIRT1 et GCN5 (Fonctions métaboliques tissu-spécifiques)

4.1. Foie

Le foie est un tissu qui assure la disponibilité de l'homéostasie des nutriments dans des différentes conditions comme les états nourris ou le jeûne. L'adaptation métabolique au jeûne nécessite un contrôle important au niveau transcriptionnel. Le jeûne fait que PGC-1 α est induit pour activer les gènes de gluconéogenèse et oxydation d'acides gras. Des souris déficientes en PGC-1 α ne peuvent avoir cette réponse et elles présentent une l'hypoglycémie

et une stéatose hépatique. Dans le cas extrême de famine, le glucagon et les hormones glucocorticoïdes augmentent la transcription du gène PGC-1 α . Le complexe de PGC-1 α coactive avec FoxO1 et HNF-4 α , aussi essentiels que PPAR α , pour l'expression des gènes clés de la gluconéogenèse PCK1 et/ou G6P. Nonobstant, lors de jeûne prolongé (au delà de 12 heures) une autre voie alternative de la gluconéogenèse a été décrite, où PGC-1 α est désacétylé par SIRT1, cette voie alternative implique la dégradation de CRT2 par Sirt1 également. Cette signalisation régulée par des nutriments implique des augmentations de niveaux de pyruvate et NAD⁺ cellulaire, et par conséquent une activation de l'enzyme SIRT1. D'autre part, la désacétylation de PGC-1 α par SIRT1 joue un rôle important pour la régulation de l'oxydation des acides gras hépatique. La délétion de SIRT1 dans le tissu hépatique a comme conséquence une altération de la signalisation de PPAR α , tandis que la surexpression de SIRT1 active PPAR α et par conséquent augmente l'expression des gènes cibles de PPAR α [221]. De manière intéressante, SIRT1 n'affecte pas la formation du complexe PPAR α – PGC-1 α , ceci a été montré dans les hépatocytes invalidés de SIRT1. En effet, dans ces hépatocytes PGC-1 α est toujours présent. Toutefois si PGC-1 α reste acétylé pendant que SIRT1 n'est pas présent, alors PGC-1 α sera incapable d'induire l'expression des gènes cibles. Dans ce contexte, GCN5 joue un rôle important, Effectivement, comme cela était souligné précédemment, GCN5 affecte l'activité de SIRT1 en acétylant PGC-1 α , et cela inhibe son activité transcriptionnelle [222]. D'où, la balance entre les niveaux relatifs et les activités de SIRT1 et GCN5 converge pour l'induction des gènes cibles de PPAR α .

SIRT1 est induite dans le foie pendant le jeûne et désacétyle PGC-1 α pour activer la néoglucogénèse et les gènes d'oxydation des acides gras. Cette signalisation implique des augmentations de niveaux de pyruvate et de NAD⁺ résultant une augmentation du taux de protéines SIRT1 ainsi qu'une augmentation de son activité enzymatique. Une étude a montré que des mutations de PGC-1 α dans lesquelles 13 lysines ont été remplacées par des arginines entraînaient une inactivation de PGC-1 α en lien avec l'absence de réaction de désacétylation par SIRT1. La conséquence observée fut l'acétylation et une expression élevée des gènes impliqués dans la néoglucogénèse. Ces données impliquent que PGC-1 α subit des cycles de d'acétylation et de désacétylation au cours de la prise alimentaire et lors d'états de jeûne qui est dépendant de l'activité de SIRT1. Ceci a été démontré chez la souris par l'observation, de SIRT1 dans le tissu hépatique qui contrôle le taux de cholestérol et qui dépend probablement de l'augmentation de l'expression des LXR α et PGC-1 β , indépendamment de la prise alimentaire. La surexpression de SIRT1 était également accompagnée d'une diminution

significative de l'acétylation de PGC-1 α et d'une augmentation de l'expression de PGC-1 α . L'activation de l'activité endogène de SIRT1 par le Resvératrol (un activateur de SIRT1) [223] dans des cultures de myoblast C2C12 a également été capable d'induire la désacétylation de PGC-1 α et de potentialiser les effets de PGC-1 α sur MCAD, ERR α , et le cytochrome C. Une hypothèse actuelle affirme que l'augmentation des lipides intracellulaires altère la β -oxydation mitochondriale des acides gras dans des tissus comme le foie et le muscle squelettique et serait une cause possible de l'insulino-résistance et du diabète de type 2. Dans le foie, ce défaut métabolique conduit à la maladie hépatique non-alcoolique et à une stéatose hépatique non alcoolique. D'autres problèmes majeurs sont retrouvés chez les patients diabétiques comme l'insulino-résistance et l'activation constante de la lipogenèse, et contribuent également à l'accumulation de lipides et à un dysfonctionnement métabolique. Les souris KO PGC-1 α développent une stéatose hépatique qui peut jouer un rôle dans le développement de l'insulino-résistance [161]. En plus, des altérations importantes de l'oxydation des acides gras pourraient être compensées par des augmentations de l'utilisation du glucose afin de maintenir un statut énergétique optimal. Par ailleurs, la baisse de l'oxydation des acides gras et l'activité OXPHOS peuvent aussi conduire à une diminution de la glycogénèse qui pourrait améliorer la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. Notamment, le KO conditionnel de SIRT1 dans le foie provoque une augmentation des acides gras libres hépatiques qui pourrait aussi compromettre la voie de signalisation de l'insuline. Ainsi, dans des conditions physiologiques normales de sensibilité à l'insuline, cette hormone peut effectivement réprimer l'activité de PGC-1 α . Ce serait également compatible avec l'augmentation de la sensibilité à l'insuline et la glycémie normale observée chez les souris traitées avec du resvératrol [161, 223].

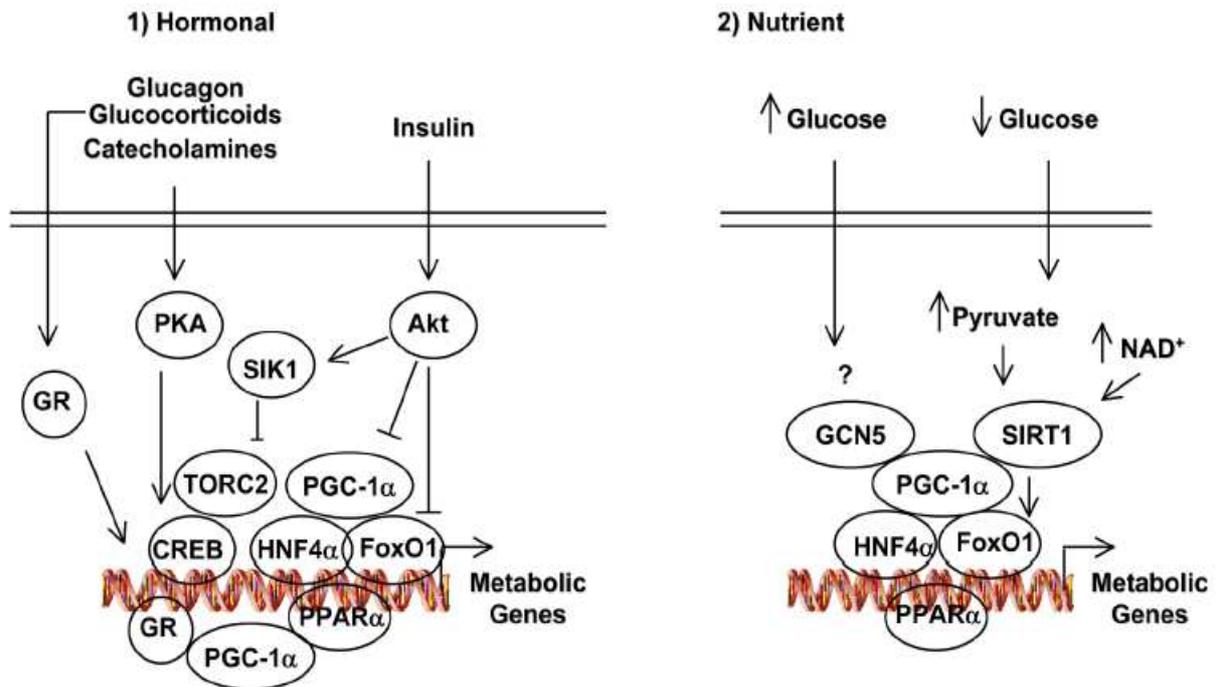


Figure 30. Régulation de PGC-1 α dans le foie, (d'après Rodgers et al. 2008). 1) Régulation hormonale : L'insuline, hormone postprandiale et glucagon, glucocorticoïdes et catécholamines, hormones et substances du jeûne 2) Régulation nutritionnel : par la concentration en glucose (rôle de l'acétylation)[161].

4.2. Muscle squelettique et cardiaque

Au niveau cardiaque SIRT1 peut avoir à la fois une localisation cytoplasmique ou nucléaire selon les stimuli du stress [224]. Sa fonction principale dans le muscle est la régulation de la β -oxydation en conditions de jeûne. En effet, le jeûne déclenche l'expression de SIRT1 dans le muscle squelettique, et conduit à la désacétylation de PGC-1 α , condition indispensable pour que ce dernier soit actif et co-active les récepteurs nucléaires impliqués dans la β -oxydation [222]. Chez la souris, les activateurs de SIRT1 : resveratrol et SRT1720 stimulent également la β -oxydation et la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique par activation de la désacétylation de PGC-1 α [223, 225]. D'autre part SIRT1 semble être un médiateur de la biogenèse mitochondriale dans le muscle induite par l'adiponectine [226]. Ceci peut avoir une influence dans le développement de l'insulino-résistance chez les sujets obèses.

En dehors de ses fonctions sur le métabolisme lipidique, SIRT1 est impliqué dans la croissance cellulaire en augmentant la taille des cardiomyocytes [227]. Alcendor et al [103], ont étudié dans un modèle cellulaire, l'effet des inhibiteurs de SIRT1 sur des cardiomyocytes soumis à des conditions de stress, et ils ont observé une prédisposition à la mort des cardiomyocytes, mais une diminution de l'hypertrophie. Sous conditions de stress, SIRT1

favorise la croissance des cardiomyocytes. Ces observations sont en accord avec des autres travaux qui montrent une augmentation de l'expression de SIRT1 dans le cas d'une hypertrophie ou d'une insuffisance cardiaque [228, 229]. Par ailleurs une augmentation de l'expression de SIRT2 faible ou modérée (2.5–7.5 plus de la normale) est protectrice contre l'hypertrophie, l'apoptose ou l'insuffisance cardiaque, tandis que, une surexpression plus importante (+ 12.5) est délétère est conduit à une dilatation des cavités et à une insuffisance cardiaque [103]. A contrario, une sous-expression de SIRT1 diminue la taille de l'infarctus et améliore la fonction cardiaque [230].

Ces phénotypes ont également été observés chez des souris transgéniques exprimant PGC-1 α dans le cœur. [103, 222].

Dans le cœur, la masse mitochondriale est également contrôlée par PGC-1 α et il est important de maintenir la fonction cardiaque en réponse à une variété de stress. De la même façon que dans le foie, PGC-1 α augmente le taux d'oxydation des acides gras qui sont importants dans des conditions de jeûne et lors de la période néonatale. Dans des cellules musculaires en culture, SIRT1 semble être impliqué dans les premières étapes de la différenciation de ces cellules en interagissant avec des facteurs myogéniques. Un des mécanismes par lequel SIRT1 exerce ces effets est la désacétylation de PGC-1 α . Conformément à l'activation de SIRT1, PGC-1 α est désacétylé lors du jeûne et dans des conditions de taux de glucose faible pour induire l'activation de toute une batterie de gènes impliqués dans l'oxydation mitochondriale des acides gras. Il serait également intéressant d'étudier si les effets bénéfiques de PGC-1 α dans la dégénérescence musculaire sont également améliorés par l'activation de SIRT1.

Au total, ces observations renforcent l'idée que SIRT1 est une molécule pro-croissance et pro-survie pour les cardiomyocytes et donc son expression, pourrait être contrôlée, soit par des inhibiteurs ou par des stimulateurs de SIRT1, afin d'obtenir ses effets désirables.

Objectif

Au cours du développement, les modifications du métabolisme des monocarbone liées à une malnutrition peuvent être délétères autant pour la mère que pour le nouveau-né. De plus, les conséquences à long terme d'une carence en période gestationnelle et périnatale sont mal connues, notamment en ce qui concerne les pathologies cardiaques. Les pathologies cardiaques sont aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays développés, en France elles sont à l'origine de près de 170 000 décès chaque année (32 % des décès, dont près de 10 % surviennent avant 65 ans). Les données épidémiologiques recueillies au cours de ces trente dernières années ont suggéré que des facteurs biologiques pouvaient être associés à l'augmentation du risque de développer une pathologie cardiovasculaire. Parmi ceux-ci, un intérêt croissant a été porté sur les niveaux élevés de l'homocystéine dans le plasma (hyperhomocystéinémie). Les premières observations cliniques ayant permis d'évoquer un lien entre hyperhomocystéinémie et maladies cardiovasculaires furent celles de jeunes adultes présentant une hyperhomocystinurie héréditaire. Ces malades qui ont des teneurs plasmatiques d'homocystéine très élevées présentent fréquemment des accidents vasculaires thromboemboliques liés à une athérosclérose précoce. Depuis une décennie, des nombreux travaux expérimentaux et cliniques, tentent de préciser les relations existant entre une hyperhomocystéinémie modérée et la survenue des maladies cardiovasculaires. Il existe des données contradictoires sur le rôle de l'hyperhomocystéinémie comme facteur de risque de la maladie coronarienne. L'hyperhomocystéinémie représente une augmentation du risque relatif faible, inférieur à 2. Cependant, l'hyperhomocystéinémie semble être significativement corrélée à la survenue de complications et à la survie des patients. Par ailleurs, l'homocystéine est impliquée dans la production de radicaux libres, dans la peroxydation lipidique et dans la prolifération des cellules musculaires lisses. Dans notre laboratoire, nous avons montré une association entre l'hyperhomocystéinémie modérée et la dysfonction systolique ventriculaire gauche (DSVG) et plus spécifiquement avec la fraction d'éjection ventriculaire gauche chez 709 patients recrutés de manière consécutive lors de la réalisation d'une angiographie coronaire diagnostique et groupés en fonction de la présence ou non de lésions des artères coronaires. L'analyse de régression multiple confirme une association significative de l'Hcy avec la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG). Nous avons montré que la fraction d'éjection est un déterminant de l'homocystéine chez les patients avec une dysfonction ventriculaire gauche, indépendamment de la maladie coronaire, cela peut expliquer le rôle néfaste de l'homocystéine sur les maladies cardiovasculaires. Le rôle de l'homocystéine comme cause ou conséquence des maladies cardiovasculaires n'est pas connu à ce jour.

Pour répondre à cette question, nous avons mis en œuvre un modèle nutritionnel de rates adultes carencées en donneurs de groupements méthyles (vitamines B12, B2, folates et choline) avant la gestation. Ces micronutriments participent à la régulation de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocysteine. Afin de nous placer dans un contexte de physiopathologie, proche de la situation clinique évaluée, nous avons choisi d'alimenter les rates avec un régime carencé un mois avant la mise en accouplement et de poursuivre ce régime pendant la période d'allaitement. Ensuite, nous avons comparé les répercussions d'un tel régime sur le myocarde des rats âgés de 21 jours. Cette étude, contrairement aux travaux menés sur des souris génétiquement modifiées, notamment l'inactivation du gène de la cystathionine bêta-synthase, conserve les caractéristiques génétiques et donc se rapproche d'une situation de malnutrition pendant les périodes gestationnelles et de l'allaitement.

Nous avons évalué les répercussions métaboliques et fonctionnelles du régime sur les tissus myocardiques et hépatiques, chez le nouveau-né à 21 jours.

Au niveau métabolique, nous avons étudié les activités enzymatiques du métabolisme de l'Hcy : MTHFR et Méthionie synthase ; les métabolites du cycle de l'homocystéine : SAM et SAH, et les effets potentiels de l'Hcy en aval du cycle de l'Hcy sur le métabolisme lipidique, sur le métabolisme énergétique et sur la carnitine.

Résultats

Partie 1 : Effets de la carence en groupement méthyles sur la dysrégulation de la bêta oxydation mitochondriale sur le myocarde de rats à 21 jours

1. Analyse protéomique du myocarde

L'analyse protéomique a montré qu'il y avait 8 protéines avec changements significatifs par rapport à leur abondance. Ces protéines sont impliquées dans le métabolisme énergétique et elles sont en relation avec PPAR- α et PGC-1 α . Parmi ces protéines nous avons trouvé que l'acyl-CoA déshydrogénase à chaîne courte (SCAD), l'aldose réductase (AKR1B), la NADH déshydrogénase 1 α sous-unité 10 (ubiquinone) (NDUFA10) et la NADH déshydrogénase (ubiquinone) flavoprotéine-2 (NDUFV2) diminuent leur expression chez les rats soumis au régime carencé de 42, 25 17, 34 et 20 % respectivement (Figure 31).

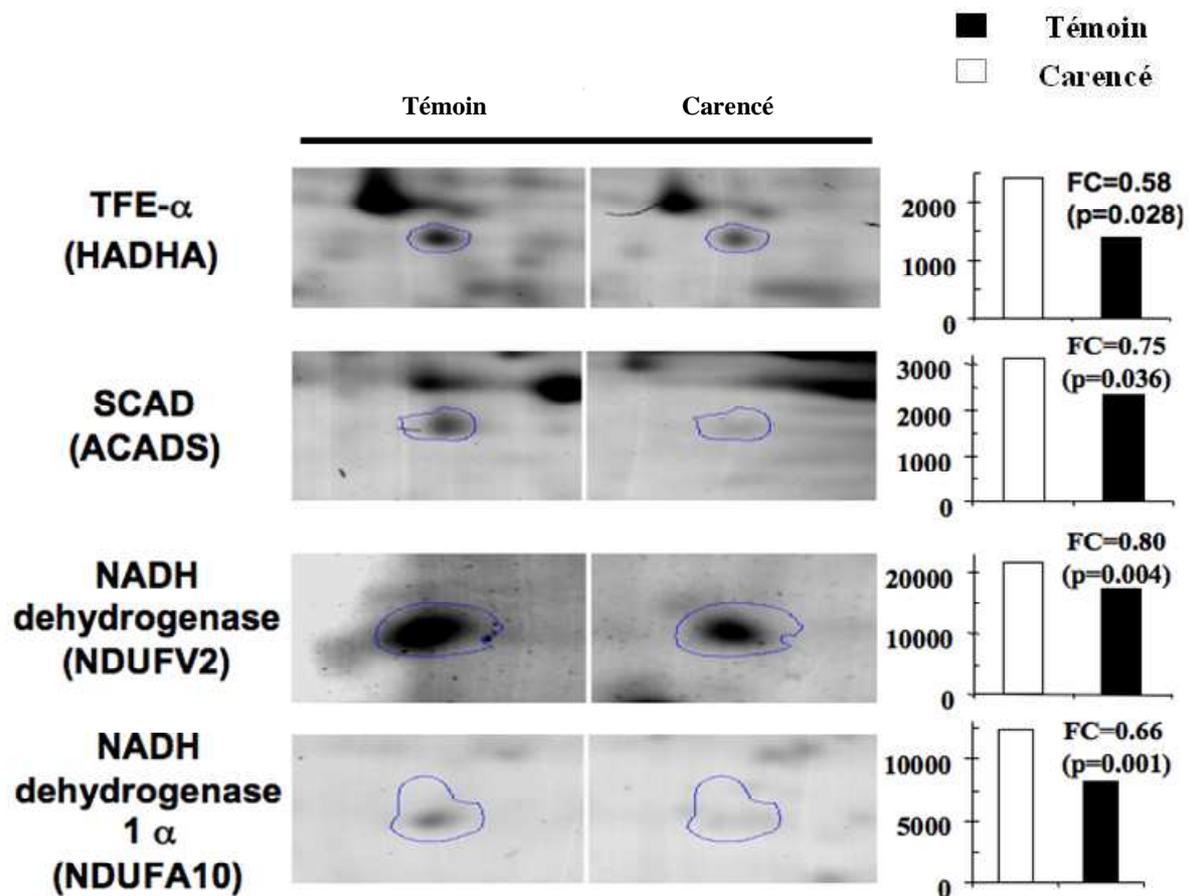


Figure 31. Analyse protéomique de quelques protéines impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial dans le cœur de rats de 21 jours

Chez les animaux carencés il existait une augmentation de l'abondance de certaines protéines comme par exemple : la *fatty acid binding protein-3* (FABP-3), l'acyl-coenzyme A thioestérase 2 (ACOT-2), l'isocitrate déshydrogénase (IDH3A) et la protéine Hspd1 (HSPD1), (37, 65, 26 et 19 %, respectivement) (Figure 32).

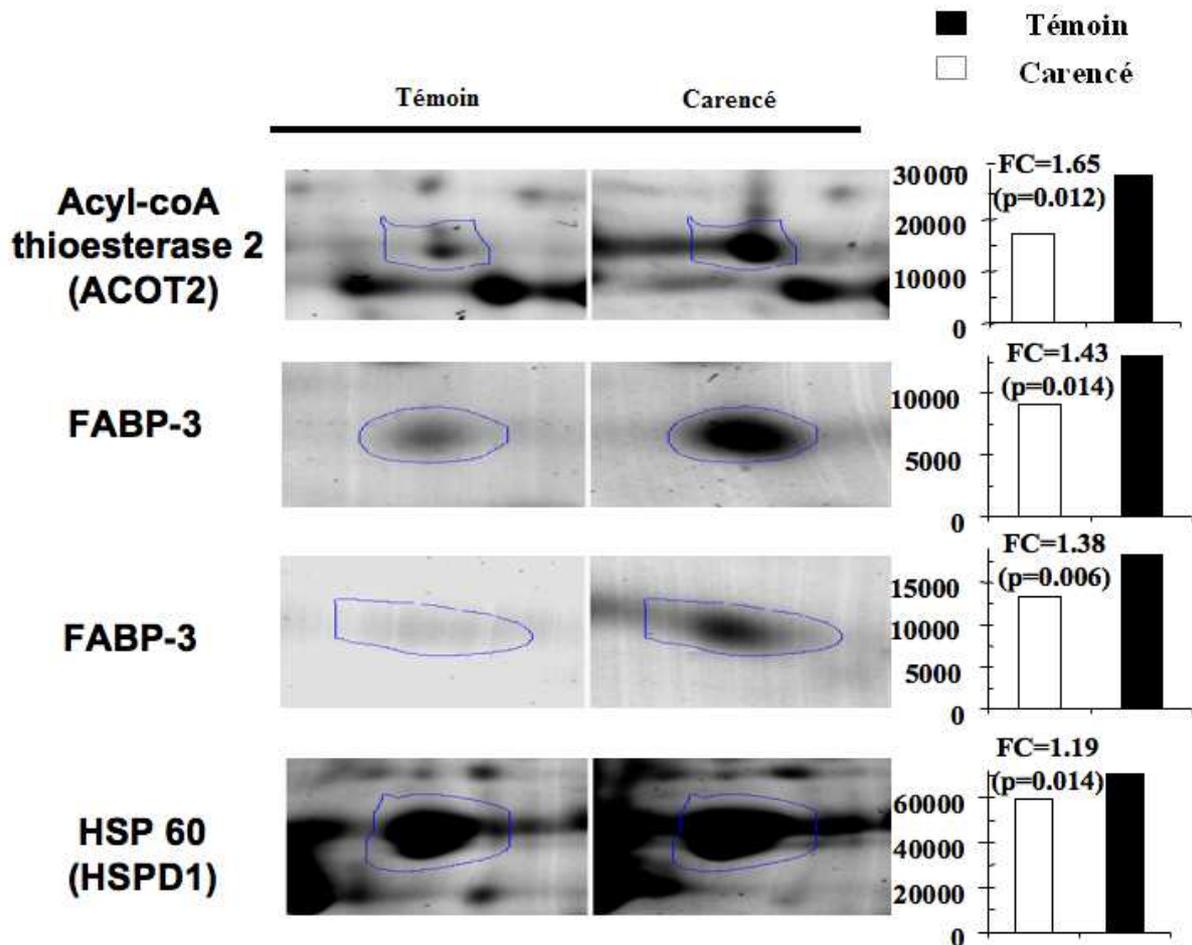


Figure 32. Analyse protéomique de quelques protéines impliquées dans le métabolisme énergétique mitochondrial dans le cœur de rats de 21 jours.

2. Etude de l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique par Western Blot dans les cœurs des ratons

Nous avons confirmé les résultats d'analyse protéomique par Western Blot (Figure 33).

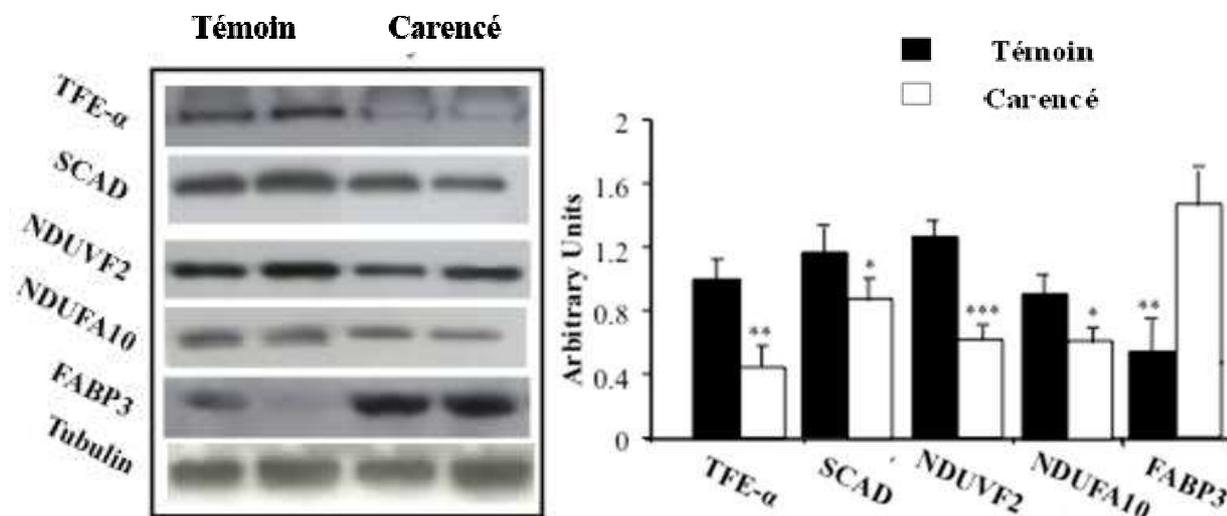
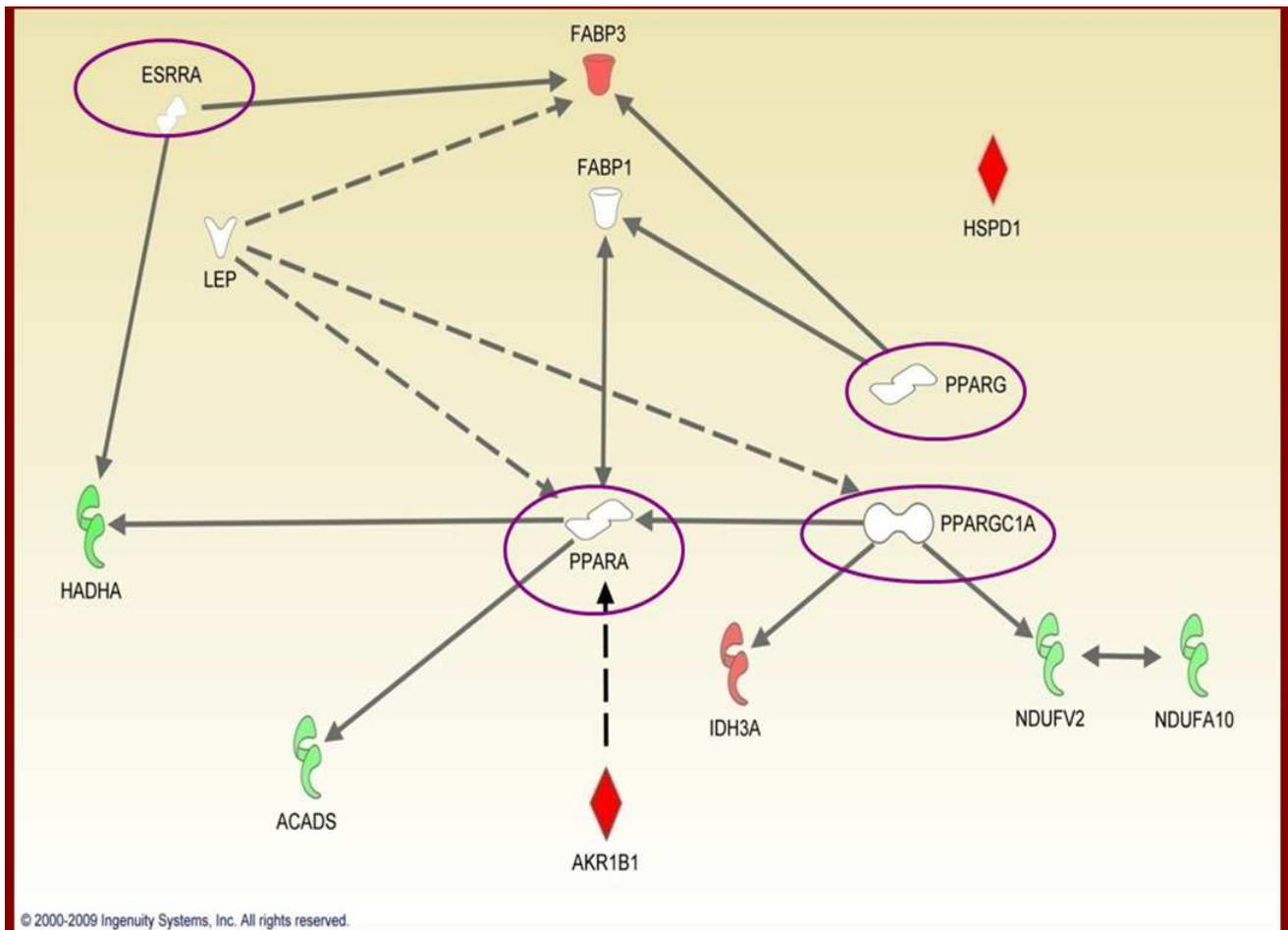


Figure 33. Etude de l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique par Western Blot dans les cœurs des ratons. Les bandes ont été mesurées par densitomètre et les niveaux d'expression ont été normalisés aux niveaux de la protéine Tubuline dans le même échantillon et ont été exprimés en unités arbitraires. Différences significatives * $p < 0,05$; ** $p = 0,001$, ANOVA, $n = 8$.

3. Ingenuity Pathway Analysis

La modélisation des résultats obtenus en protéomique par le logiciel « *Ingenuity Pathway Analysis* » a montré que les plus grands changements d'expression des protéines chez les ratons carencés en groupements méthyles étaient en relation avec des protéines du métabolisme énergétique. En effet, PGC-1 α , était en relation avec le *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α), l'*estrogen Related receptor- α* (ERR α) et avec *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ), et la diminution de l'expression de SCAD était en relation avec PPAR α et PGC-1 α . Par ailleurs, NDUF10, NDUVF2 et IDH3A avaient un lien avec PGC-1 α . FABP-3 et TFE- α étaient en relation avec ERR α , PPAR α et PGC-1 α ; l'ACOT2 avec PPAR α : et enfin, HSPD1 avec PPAR γ et PGC-1 α (Figure 34).



- **HADHA**, hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
- **ACADs**, Acyl-Coenzyme A dehydrogenase (short chain)
- **HSPD1**, heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
- **FABP3**, fatty acid binding protein 3
- **ACOT2** Acyl-coenzyme A thioesterase
- **NDUFV2**, NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2
- **NDUFA3**, NADH dehydrogenase (ubiquinone) alpha subcomplex 10

Figure 34. L'Ingenuity pathways analysis (IPA) montre que les changements d'expression des protéines en protéomique sont en lien avec l'oxydation d'acides gras et le métabolisme énergétique dans le myocarde.-Les symboles décrivent la fonction de la protéine et le type d'interaction : Interaction direct

Interaction indirect .

Publication liée à cette IPA sont (1) ESRRA/FABP3. Effet de l'expression: Huss JM *et al* Mol Cell Biol 2004;24:9079–91 [163]; (2) ESRRA/HADHA. Effet de l'expression: Huss JM *et al* Mol Cell Biol 2004;24:9079–91 [163]; (3) HADHA/PPARA. Protéine–DNA interactions: Liu YY *et al* Endocrinology 2007;148:1206–17; [231](4) PPAR γ /FABP3. Protéine–DNA interactions: Schachtrup C *et al* Biochem J 2004;382:239–45 [232]; (5) PPAR γ /FABP1. Activation: Nielsen R *et al* Mol Cell Biol 2006;26:5698–714. Expression: Barz T *et al* Cancer

Res 2006;66:11975–82 and Drori S *et al* Genes Dev 2005;19:362–75. Protéine–DNA interactions: Schachtrup C *et al* Biochem J 2004;382:239–45. Protéine–protéine interactions: Wolfrum C *et al* Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:2323–8; [232-236] **(6)** FABP1/PPARA. Activation: Nielsen R *et al* Mol Cell Biol 2006;26:5698–714. Expression: Lindén D *et al* J Biol Chem 2002;277:23044–53. Protéine–DNA interactions: Schachtrup C *et al* Biochem J 2004;382:239–45. Protéine–protéine interactions. Hostetler HA *et al* J Lipid Res 2009;50:1663–75 et Wolfrum C *et al* Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:2323–8.[232, 233, 237] [238] **(7)** PPARA/ACADS. Effet de l'expression: Aoyama T *et al* J Biol Chem. 1998 273(10):5678–84 and Yu S *et al* J Biol Chem 2001 Nov 9;276(45):42485–91 et Kersten S *et al* FASEB J 2001;15:1971–8.[239-241] **(8)** PPAR α /PPAR γ C1 α . Activation: Barger PM *et al* J Biol Chem 2000 ; 276:44495–501 et Miura S *et al* Endocrinology 2008;149:4527–33. Expression: Miura S *et al* J Biol Chem 2003;278:31385–90; Protéine–protéine interactions: Vega RB *et al* Mol Cell Biol 2000;20:1868–76, et Lin J *et al* J Biol Chem 2005;278:30843–8 et McGill JK *et al* Cell 2006;127:465–8.[242-246] **(9)** PPAR γ C1 α /NDFUV2. Effet de l'expression: Sandri M *et al* Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:16260–5; [247] **(10)** PPAR γ C1 α /IDH3 α . Effet de l'expression: Burgess SC *et al* J Biol Chem 2006;281:19000–8;[248] **(11)** NDFUV2/NDUFA10. Interaction de NADH déhydrogénase. **(12)** LEP/FABP3. Indirect Effet de l'expression: Hidaka S *et al* FASEB J. 2002 Apr;16(6):509–18; **(13)** LEP/PPAR γ C1 α . Effet de l'expression: Yoon JC *et al* Nature 2001;413:131–8;[249] **(14)** LEP/PPAR α . Effet de l'expression: Liang CP *et al* J Biol Chem 2001;276:49066–76, Gallardo N *et al* Endocrinology 2007;148:5604–10;[250, 251] **(15)** AKR1B1/PPAR α (Synonyme Ahr-1, Akr1b1, Akr1b3, Aldolase Reductase, Aldor1, Aldr1, ALR2, AR). Activation/phosphorylation: Qiu L *et al* J Biol Chem 2008; 283:17175–83;[252] **(16)** HSPD1 (HSP60)/ PPAR γ . Effet de l'expression: Artwohl M *et al* Thromb Haemost. 2005; 93:810–5. [253] **(17)** MTE1 (ACOT2)/PPARA. Effet de l'expression: Stavinoha MA *et al* Am J Physiol Endocrinol Metab 2004;287:E888–95;[254] **(18)** FABP3 (H-FABP)/PPARA. Protéine–DNA interactions: Schachtrup C *et al* Biochem J 2004; 382:239–45. Effet de l'expression: Kawabe K *et al* Int J Biochem Cell Biol. 2005;37:1534–46 [232, 255].

4. Analyse de Western Blot des récepteurs nucléaires

Nous avons ensuite évalué l'expression de PGC-1 α , PPAR α , ERR α et PPAR γ , parce qu'ils jouent un rôle clé dans la régulation du métabolisme mitochondrial. Les résultats montrent qu'il existe une diminution de l'expression de PPAR α et ERR α et une augmentation d'expression de PPAR γ , mais absence de changement d'expression de PGC-1 α , dans le groupe carencé (Figure 35).

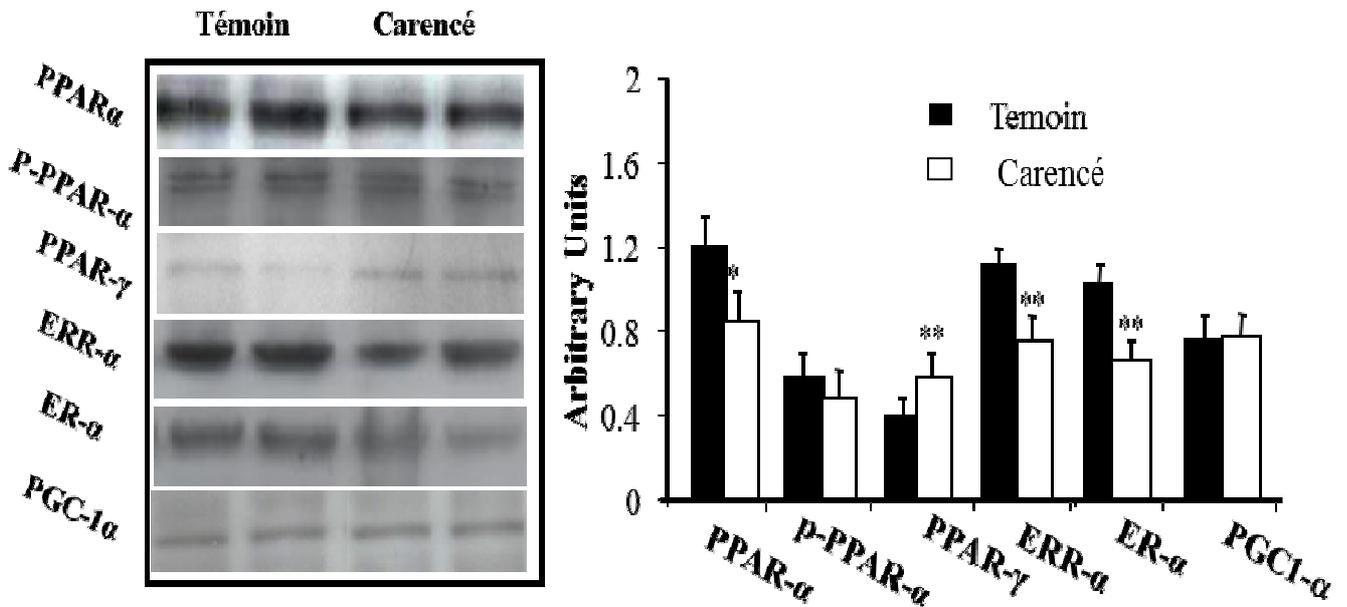


Figure 35. Etude de l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique par Western Blot dans les cœurs des ratons. Les bandes ont été mesurées par densitométrie et les niveaux d'expression ont été normalisés aux niveaux de la protéine Tubuline dans le même échantillon et ont été exprimés en unités arbitraires. Différence significative * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$ *** $p = 0,001$, ANOVA $n = 8$

5. Effets post traductionnels de PGC-1 α

Puisque PGC-1 α est un régulateur majeur du métabolisme mitochondrial, les possibles modifications étaient intéressantes pour nous. En effet, son activité est contrôlée par des modifications post traductionnelles qui peuvent être influencées par la carence en groupements méthyles. Nous avons confirmé par analyse d'immunoprécipitation que la carence en donneurs de méthyles provoque une diminution de la méthylation et une diminution de l'acétylation de PGC-1 α . Ce résultat peut être la conséquence de la diminution du ratio SAM/SAH (Figure 36). Nous avons ensuite évalué l'expression de PRMT1 qui est une méthyltransférase et qui peut méthyler et activer PGC-1 α , et comme prévu, l'expression était diminuée chez les ratons carencés. Finalement, nous avons observé une diminution de l'expression de SIRT1, une désacétylase qu'active PGC-1 α , cette diminution de l'expression par Western Blot de SIRT1 a été confirmée par une diminution de son activité enzymatique.

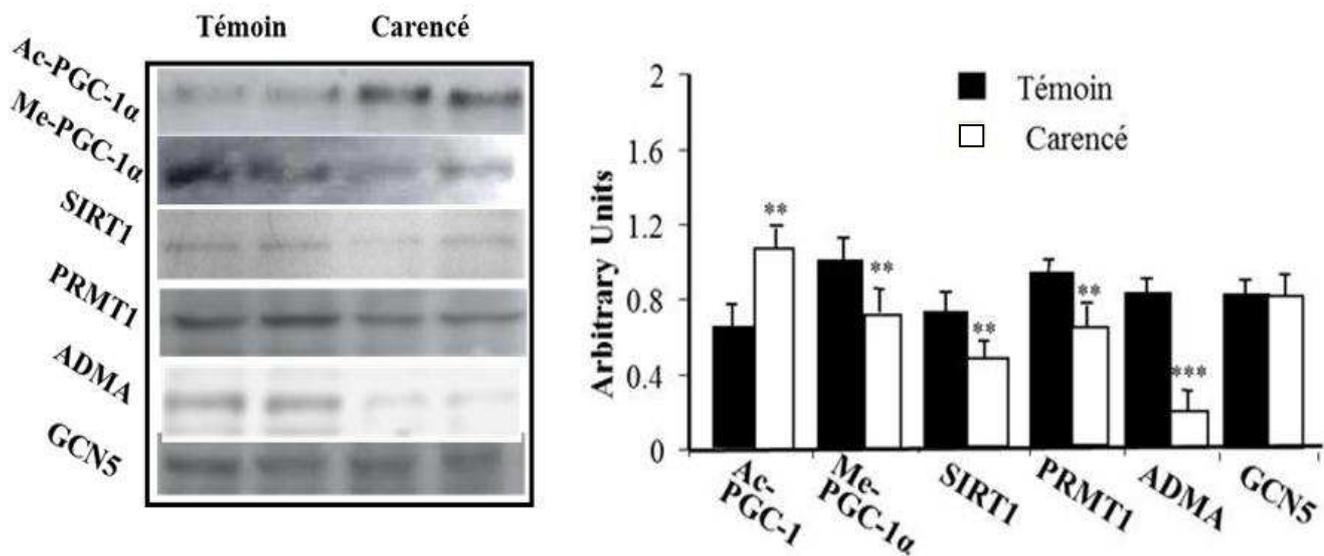


Figure 36. Etude de l'expression de protéines impliquées dans la modification de PGC-1 α par Immunoprécipitation et Western Blot dans les cœurs des rats. Les bandes ont été mesurées par densitométrie et les niveaux d'expression ont été normalisés aux niveaux de la protéine Tubuline dans le même échantillon et ont été exprimés en unités arbitraires * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$ *** $p = 0,001$, ANOVA $n = 8$

En résumé, le régime carencé en donneurs de méthyles induit une hypertrophie cardiaque avec une augmentation de l'épaisseur du myocarde et un agrandissement des cardiomyocytes. L'étude protéomique du myocarde et l'analyse des données par bioinformatique identifient PGC-1 α , PPAR α et ERR α comme les principaux déterminants des variations d'expression des protéines du métabolisme oxydatif mitochondrial. Nous avons observé une diminution d'expression de PPAR α et ERR α et une inactivation de PGC-1 α constaté à la fois par une hypométhylation et une hyperacétylation de la protéine, ceci est en lien avec une diminution d'expression de PRMT1 et de son produit de réaction : l'ADMA, et enfin une diminution de l'expression de SIRT1.

Partie 2: L'homocystéine prédit l'augmentation de NT-pro-BNP par perturbation de l'oxydation acide gras

Les pathomécanismes de l'insuffisance cardiaque sont complexes, à côté des changements de structure et de géométrie du cœur, les problèmes métaboliques sont potentiellement impliqués comme cause d'insuffisance cardiaque [256]. Les données épidémiologiques recueillies au cours de ces trente dernières années ont suggéré que des facteurs biologiques pouvaient être associés à l'augmentation du risque de développer une pathologie cardiovasculaire. Parmi ceux-ci, un intérêt croissant a été porté sur les niveaux élevés de l'homocystéine dans le plasma (hyperhomocystéinémie) [257, 258]. Dans notre laboratoire, nous avons montré une association entre l'hyperhomocystéinémie modérée et la dysfonction systolique ventriculaire gauche (DSVG) et plus spécifiquement avec la fraction d'éjection ventriculaire gauche chez 709 patients recrutés de manière consécutive lors de la réalisation d'une angiographie coronaire diagnostique par suspicion d'une maladie coronaire ou dans le bilan d'insuffisance cardiaque, et les patients ont été groupés en fonction de la présence ou non de lésions des artères coronaires [66]. Moins d'attention a été portée sur l'influence de la carence en donneurs de méthyles sur les cardiomyopathies, au moins dans les populations qui ne sont pas soumises à une fortification systématique en folates. Car la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase et la *cystathionine- β -synthase* étant indétectables dans les cardiomyocytes, la reméthylation de l'Hcy en méthionine est métabolisée uniquement via la méthionine synthase. L'influence du métabolisme de groupes méthyles sur le métabolisme énergétique du myocarde pourrait aider à comprendre le lien entre l'hyperhomocystéinémie et les maladies cardiaques, chez les patients adultes souffrant d'une cardiomyopathie. Pour répondre à cette question, nous avons évalué les associations entre le NT-pro-BNP ou BNP, Hcy et les marqueurs métaboliques et les polymorphismes génétiques du métabolisme monocarbone et de la carnitine / acylcarnitines, utilisés comme marqueurs de l'oxydation des acides gras, sur 1020 sujets à partir de deux populations contrastées, comprenant 358 patients ayant subi une coronarographie recrutés dans le Nord-Est de la France et 662 sujets âgés ambulatoires de la cohorte OASI recrutés en Sicile (Italie).

1. Caractéristiques cliniques et biologiques des populations.

Les caractéristiques cliniques et biologiques des patients qui ont subi une coronarographie sont présentées dans le tableau 5.

Il s'agissait de 358 patients avec un âge moyen de 62 ans, 75 % étaient de hommes, et 191 avaient une sténose coronaire significative à la coronarographie (≥ 50 %). Le dosage du NT-proBNP dépassait le seuil de normalité de 250 pg/mL pour 230 patients (64,5 %) et 168 patients (47 %) avaient une dysfonction ventriculaire gauche, définie par une fraction d'éjection du ventricule gauche inférieure à 40 %, parmi ces patients certains avaient une insuffisance cardiaque sévère, avec une concentration très élevée en NT-proBNP (Tableau 5). 247 patients (88,4 %) avaient une concentration d'Hcy au-delà de 12 $\mu\text{mol/L}$ et un acide méthylmalonique supérieur à 0,5 $\mu\text{mol/L}$ pour 80 (28,6 %) cas. 71 patients (25,4 %) avaient une concentration en folates inférieure à 7 nmol/L et 38 (12,7 %) avaient une vitamine B12 inférieure à 150 pmol/L. Ces données indiquent une haute prévalence des déficits en folates et ou B12 chez ces patients.

Les caractéristiques cliniques et les paramètres biologiques de la cohorte des volontaires OASI sont présentés également dans le tableau 5. La moyenne d'âge était de 71,5 ans. 400 (60,0 %) étaient des femmes et 28,9 % avaient des antécédents d'une maladie cardiovasculaire. La concentration de BNP était supérieure au seuil donné par la fabricant (100 pg/mL) pour 58 (8,6 %) des sujets. L'Hcy et l'acide méthylmalonique étaient supérieurs à 12 $\mu\text{mol/L}$ et 0,5 $\mu\text{mol/L}$ pour 497 (74,1 %) et 51 (7,5 %) des sujets, respectivement. Un déficit en folates et en vitamine B12 était observé pour 85 (12,6 %) et 63 (9,5 %) volontaires, respectivement.

Tableau 5. Caractéristiques cliniques et biologiques chez les patients coronarographiés (358) et chez les 672 sujets âgés volontaires de la cohorte OASI.

Caractéristique*	Patients coronarographiés n=358	Cohorte OASI n=662
Age	62 ± 13	72 ± 7
Sexe masculin	269 (0,75, 0,71 – 0,80)	272 (0,41, 0,37 – 0,44)
Tabagisme	85 (0,24, 0,19 – 0,28)	81 (0,12, 0,09 – 0,15)
Histoire d'angor	79 (0,22, 0,18 – 0,27)	32 (0,05, 0,03 – 0,07)
Histoire d'infarctus du myocarde	102 (0,29, 0,24 – 0,33)	50 (0,07, 0,06 – 0,09)
Sténose coronaire ≥ 50%	191 (0,53, 0,48 – 0,59)	ND
FEVG (%)	44,5 ± 17,5	ND
FEVG ≤ 40%	168 (0,47, 0,42 – 0,52)	ND
Tension artérielle systolique (mmHg)	128,9 ± 24,1	141,2 ± 20,9
Tension artérielle diastolique (mmHg)	73,3 ± 13,7	78,9 ± 12,2
Fréquence cardiaque (pulsations/min)	75,2 ± 15,7	73,1 ± 9,1
Index de masse corporelle (kg/m ²)	27,1 ± 4,7	27,5 ± 4,7
Créatinine (mg/L)	12,8 ± 4,7	11,1 ± 3,6
Cholestérol total (g/L)	1,9 ± 0,5	2,0 ± 0,4
Triglycérides total (g/L)	1,4 ± 0,9	1,2 ± 0,7
LDL-cholestérol (g/L)	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,3
Acide urique (mg/L)	67,9 ± 21,9	55,9 ± 4,1
ALAT (IU/L)	30,4 ± 31,6	21,1 ± 12,4
Protéine C -réactive (mg/L)	9,3 ± 19,5	5,2 ± 8,3
Homocystéine (µmol/L)	16,2 ± 7,0	15,8 ± 5,9
Folates (nmol/L)	11,4 ± 6,6	13,8 ± 8,2
Vitamine B12 (pmol/L)	347 ± 217	350 ± 236
Acide méthylmalonique (µmol/L)	0,51 ± 0,76	0,74 ± 12,51
BNP (pg/mL)	ND	43,2 ± 35,1
NT-proBNP (pg/mL)	2308 ± 4632	ND
Carnitine libre (µmol/L)	59,2 ± 20,4	45,9 ± 15,4
Acyl carnitine (µmol/L)	4,3 ± 2,7	8,4 ± 3,0
A. à chaîne courte (µmol/L)	0,9 ± 0,6	1,3 ± 0,5
A. à chaîne moyenne (µmol/L)	2,0 ± 1,2	0,9 ± 0,5
A. à chaîne longue (µmol/L)	1,3 ± 0,5	1,1 ± 0,4

*Les données sont exprimées en moyenne ± écart type pour des variables continues et en nombre (fréquence et les intervalles de confiance à 95%) pour les variables qualitatives.

Abbreviations : FEVG: fraction d'éjection ventriculaire gauche; LDL: lipoprotéines de basse densité, NT-proBNP et BNP : peptides natriurétiques de type B

Toutes ces données indiquent une forte prévalence de carences en folates chez les patients coronarographiés, comparés aux sujets âgés volontaires ($P < 0,001$). Comme prévu, les sujets avec un déficit en vitamine B12 avaient une concentration élevée en acide méthylmalonique ($5,84 \pm 5,25$ versus $0,23 \pm 0,18$, $P < 0,001$) et ceux avec un déficit en folates avaient une concentration plus élevée en homocystéine ($19,3 \pm 6,8$ vs. $15,3 \pm 5,6$, $P < 0,001$).

2. Association entre les peptides natriurétiques de type B (NT-pro BNP et BNP), les acylcarnitines et l'homocystéine

2.1. Peptides natriurétiques et acylcarnitines en fonction des quartiles d'homocystéine

Nous avons fait une analyse en séparant les sujets par rapport au quartile supérieur et inférieur d'Hcy ($\geq 18 \mu\text{mol/L}$ et $\geq 12 \mu\text{mol/L}$, respectivement). Dans la cohorte des sujets coronarographiés, ceux dans le quartile supérieur avaient une concentration significativement plus élevée du peptide natriurétique, le NT-proBNP, comparés aux sujets avec une Hcy dans le quartile inférieur (Figure 37).

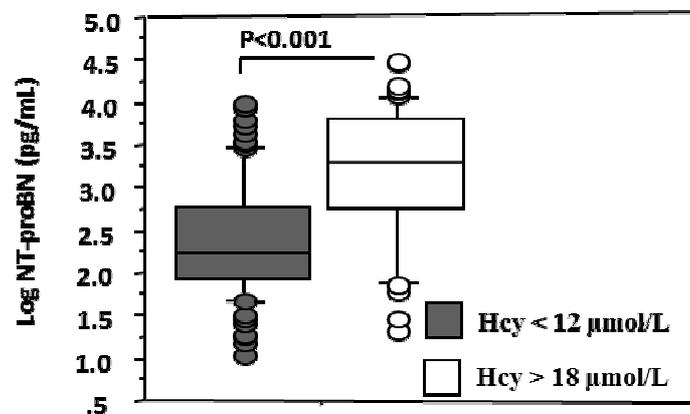


Figure 37. Concentration du NT-pro BNP en fonction du quartile inférieur ($< 12 \mu\text{mol/L}$) et supérieur d'Hcy ($\geq 18 \mu\text{mol/L}$)

De la même façon, les acylcarnitines à courte, moyenne et longue chaîne étaient beaucoup plus élevées chez les patients dans le quartile supérieur d'Hcy (Figure 38).

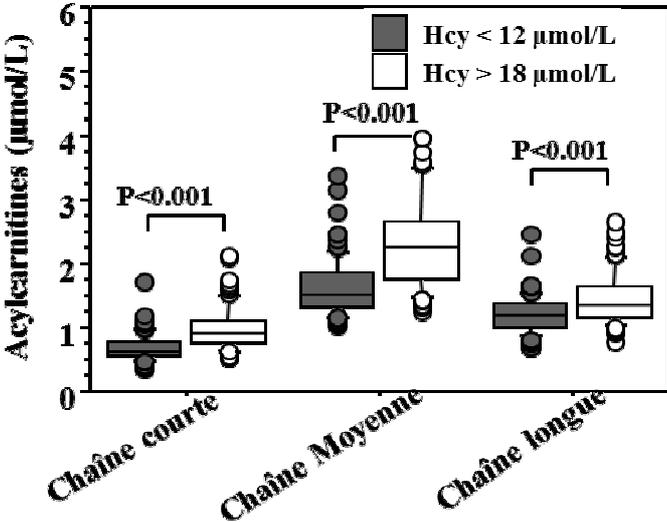


Figure 38: Concentration des acylcarnitines à chaîne courte, moyenne et longue en fonction du quartile inférieur (<12 µmol/L) et supérieur d'Hcy (≥18 µmol/L), chez les patients coronarographiés.

2.2. Corrélation entre NT-pro-BNP et acylcarnitines plasmatique et aussi entre Hcy et acylcarnitines plasmatique chez 358 patients atteints de maladies cardiaques

En plus, nous avons mis en évidence une étroite corrélation entre les acylcarnitines et le NT-proBNP (Figure 39).

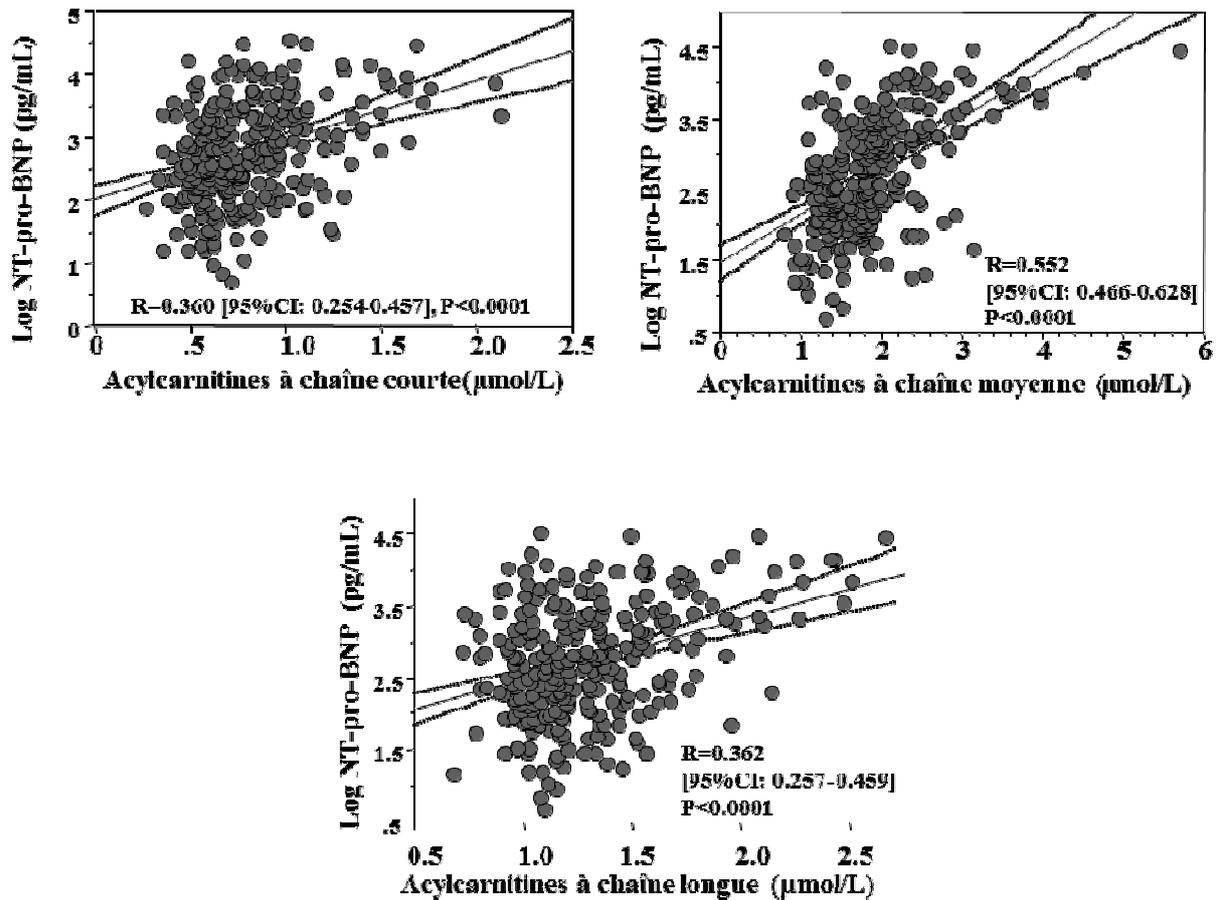


Figure 39. Corrélations entre la concentration plasmatique des acylcarnitines à chaîne courte, moyenne et longue avec Log de la concentration plasmatique de NT-proBNP.

R: coefficient de corrélation; C.I.; intervalle de confiance à 95 % ; les lignes pointillées représentent les intervalles de confiance de la pente de la régression linéaire

Mais aussi entre les acylcarnitines et l'Hcy (Figure 40).

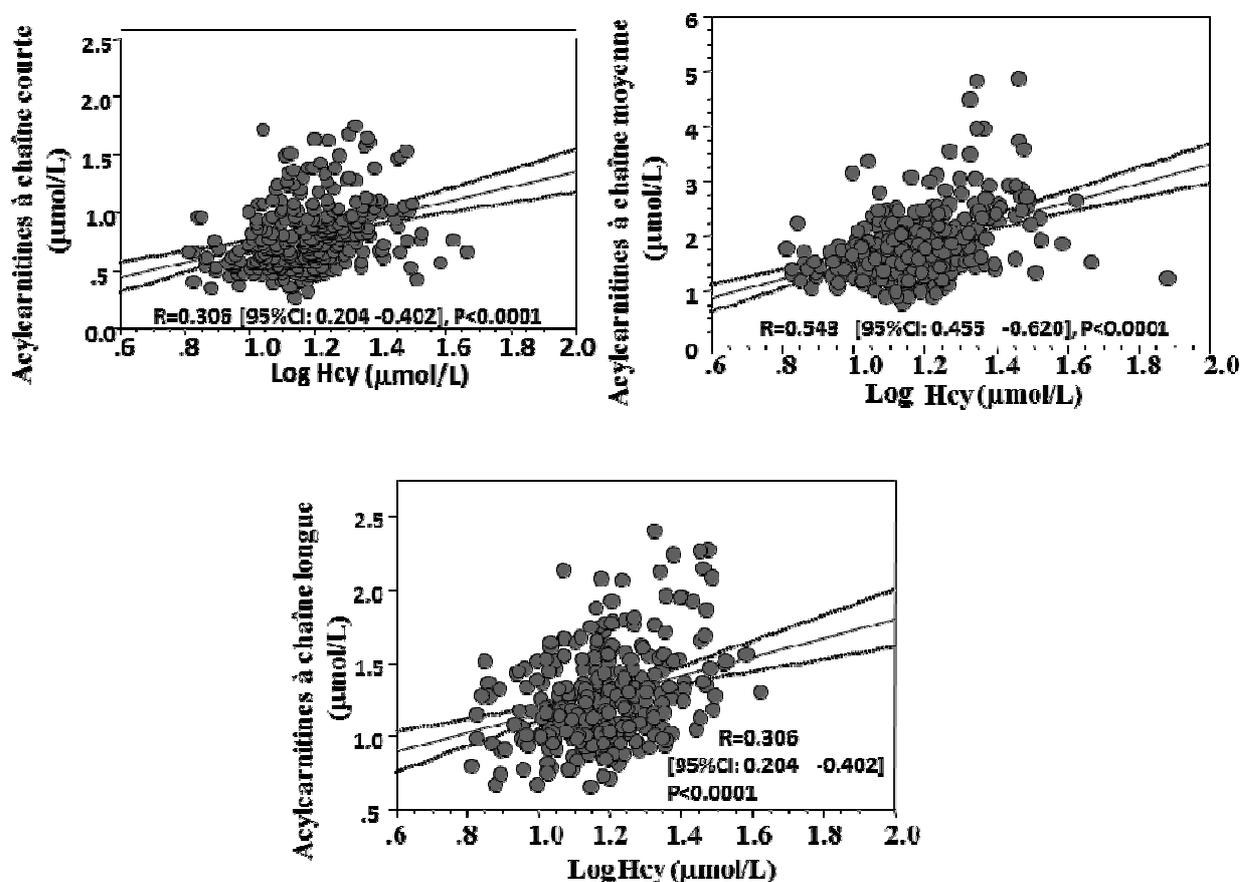


Figure 40. Corrélations entre la concentration plasmatique des acylcarnitines à chaîne courte, moyenne et longue avec Log de concentration plasmatique d'homocystéine

R: coefficient de corrélation; C.I.; intervalle de confiance à 95% ; les lignes pointillées représentent les intervalles de confiance de la pente de la régression linéaire

2.3. Corrélation entre l'Hcy avec les acylcarnitines plasmatiques et le BNP chez les sujets âgés volontaires

Nous avons observé également une concentration plus élevée du peptide natriurétique (BNP) et des acylcarnitines chez les sujets avec une Hcy dans le quartile supérieur, comparés à ceux dans le quartile inférieur (Figure 41).

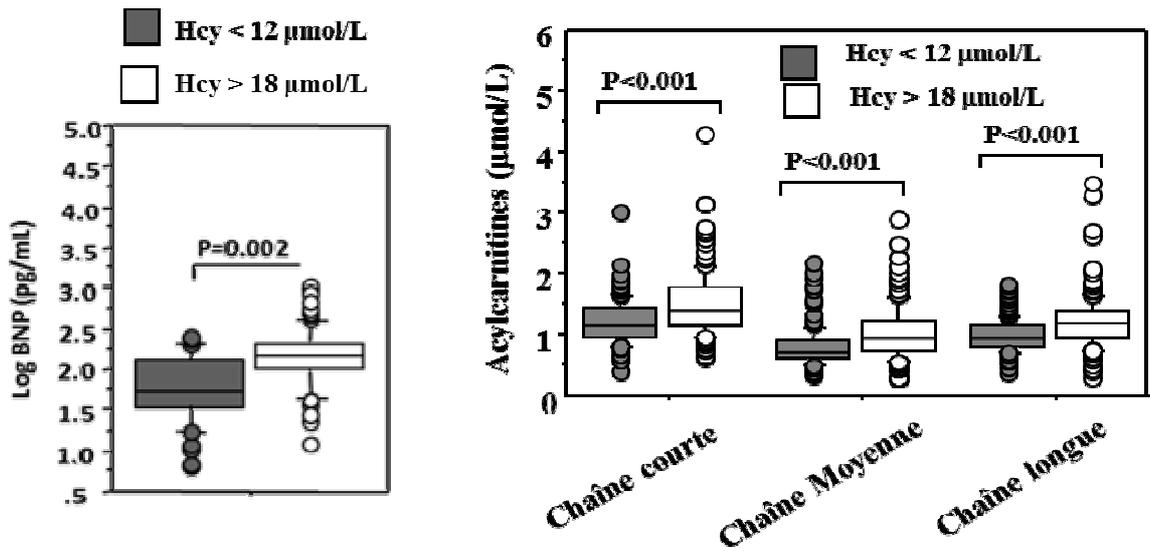


Figure 41. A : Concentration du BNP en fonction du quartile inférieur (<12 $\mu\text{mol/L}$) et supérieur d'Hcy ($\geq 18 \mu\text{mol/L}$), B : Concentration des acylcarnitines à chaîne courte, moyenne et longue en fonction des quartiles d'homocystéine, chez les sujets âgés volontaires. Les boîtes à moustaches indiquent la médiane et les quartiles.

Et comme les sujets coronarographiés, il y a avait une très bonne corrélation entre l'Hcy et les acylcarnitines (Figure 42).

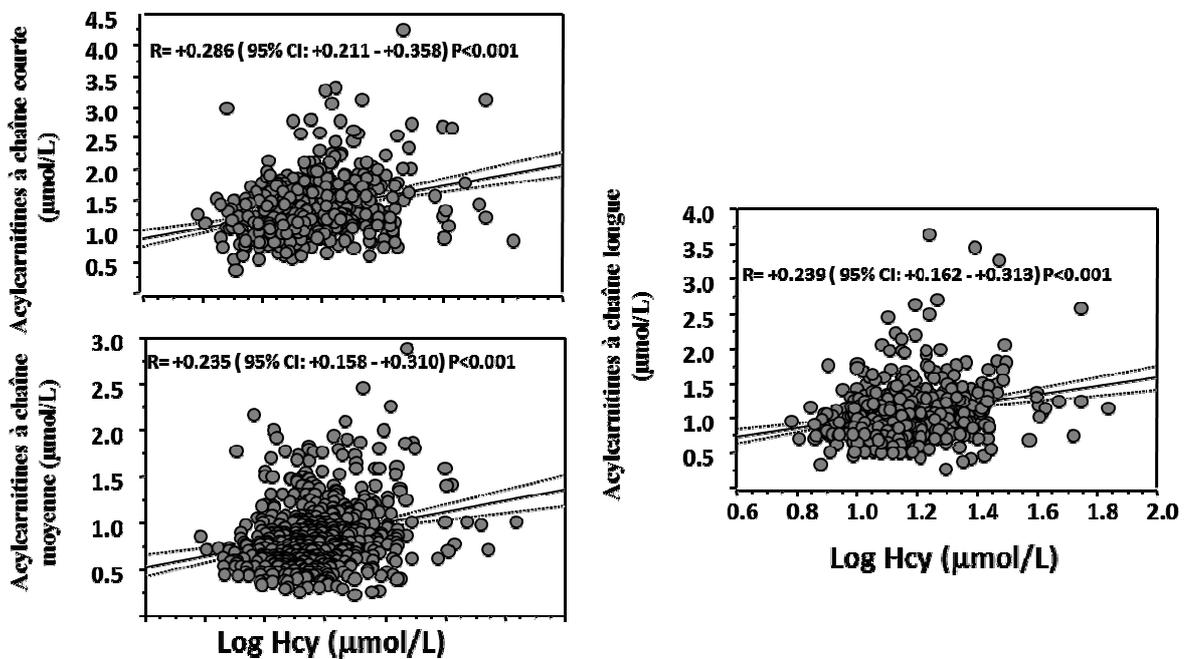


Figure 42. Corrélations entre la concentration plasmatique des acylcarnitines à chaîne courte, moyenne et longue avec Log de concentration plasmatique d'homocystéine, chez les patients coronarographiés.

A la différence des sujets coronarographiés, nous avons observé une association entre l'Hcy et le BNP uniquement chez les sujets avec une concentration en folates basse (Figure 43).

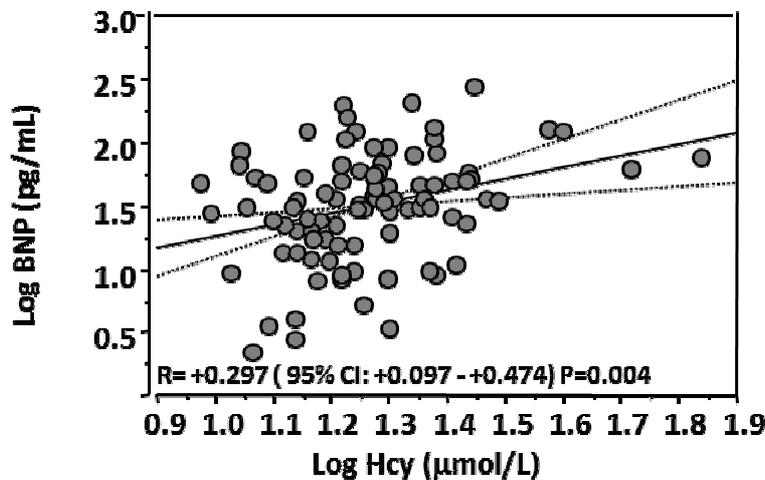


Figure 43: Corrélation entre le Log de la concentration plasmatique en Hcy et le BNP chez des sujets ayant une concentration en folates < 7 nmol /L. R: coefficient de corrélation; C.I.; intervalle de confiance à 95% ; les lignes pointillées représentent les intervalles de confiance de la pente de la régression linéaire

Chez les sujets coronarographiés avec une élévation de la concentration en acide méthylmalonique (>0,5 mmol/L), nous avons constaté une élévation plus importante du NT-proBNP (4779±5899 vs. 1751±4292, P<0,001). La même observation à été faite avec le BNP chez les sujets ambulatoires, mais de manière moins significative : 60±39 vs. 41± 34 (P=0,033). En plus, les patients avec une élévation de l'acide méthylmalonique avaient une augmentation de la concentration des acylcarnitines à chaîne courte (1,09±0,48 vs. 0,84±0,56, P<0,001), à chaîne moyenne (2,35±0,98 vs. 1,87±1,29, P=0,032) et de manière moins significative avec les chaînes longues (1,40±0,47 vs. 1,30±0,56, P=0,050). A la différence des sujets coronarographiés, nous n'avons pas observé une association entre la concentration de l'acide méthyl-malonique et les acylcarnitines.

En analyse univariée, les paramètres prédictifs la concentration du NT-proBNP étaient la tension artérielle systolique, la fraction d'éjection du ventricule gauche, l'index de masse corporelle, la créatinine, le LDL-cholestérol, l'acide urique, l'Hcy, la vitamine B12, l'acide méthylmalonique, la carnitine libre et les acylcarnitines dans la population française, (Tableau 6). Et, dans l'analyse multivariée par régression multiple, les paramètres indépendants déterminants du NT-proBNP étaient la fraction d'éjection l'index de masse corporelle, la créatinine, les folates et les acyl-carnitines à longue chaîne (Tableau 6).

Tableau 6. Analyse univariéeeet multivariéee des déterminants du NT-pro-BNP chez 358 patients coronarographiés.

Paramètre	Univariée		Multivariée					
			Tous les paramètres		sans carnitines		sans hcy	
	Corrélation	P-value	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
TAS	-0,283	<0,001						
TAD	-0,185	0,005						
Fréquence cardiaque	+0,216	0,001						
FEVG	-0,403	<0,001	-76	<0,001	-82	<0,001	-82	<0,001
IMC	-0,189	0,001	-133	0,009	-153	0,004	-136	0,007
Créatinine	+0,269	<0,001	160	0,001	184	<0,001	189	<0,001
Cholestérol total	-0,170	0,005						
Triglycérides	-0,113	0,063						
LDL-cholestérol	-0,199	0,001						
Acide urique	+0,319	<0,001						
Homocystéine	+0,236	<0,001	69	0,060	102	0,007		
Folates	+0,145	0,014	77	0,031	82	0,025		
Vitamine B12	+0,196	0,001						
AMM	+0,222	<0,001						
Carnitine libre	+0,203	0,001						
Acyl carnitine	-0,136	0,020						
Chaîne courte	+0,245	<0,001						
Chaîne moyenne	+0,250	<0,001						
Chaîne longue	+0,341	<0,001	2993	<0,001			3224	<0,001

Abbreviations : AMM: acide methyl malonique; FEVG: fraction d'éjection ventriculaire gauche; IMC: index de masse corporel; LDL: lipoprotéines de basse densité; TAD: tension artérielle diastolique; TAS: tension artérielle systolique.

Puisque en analyse univariée, nous avons mis en évidence une étroite association entre l'Hcy et les acyl-carnitines à longue chaîne, nous avons considéré ces variables comme covariables, donc paramètres de confusion, alors, nous avons réalisé l'analyse multivariée avec 2 modèles où l'Hcy et les acylcarnitines à longue chaînes étaient exclues de manière alternative. Dans le

premier modèle qui ne tenait pas compte des acylcarnitines à longue chaîne, l'Hcy était associée au NT-proBNP (P=0,007), et dans le deuxième modèle qui excluait l'Hcy, le NT-proBNP était associé aux acylcarnitines à longue chaîne (Tableau 6).

Concernant la population âgée, en analyse univariée, les déterminants du BNP étaient uniquement l'âge, l'Hcy et les triglycérides. Et en analyse multivariée, les déterminants indépendants du BNP étaient l'âge, l'Hcy et la carnitine libre (Tableau 7).

Tableau 7. L'analyse univariée et multivariée des déterminants du BNP chez 672 sujets âgés,

Paramètre	Univariée		Multivariée	
	Corrélation	P-value	Coefficient	P-value
Age	+0,415	<0,001	1,985	<0,001
TAS	+0,045	0,473		
TAD	-0,104	0,100		
IMC	-0,127	0,744		
Créatinine	+0,058	0,393		
Cholestérol	-0,092	0,172		
Triglycérides	-0,156	0,019		
LDL-cholestérol	-0,078	0,247		
Acide urique	-0,076	0,259		
Homocystéine	+0,225	<0,001	1,097	0,014
Folates	-0,036	0,586		
Vitamine B12	-0,067	0,318		
AMM	+0,097	0,147		
Carnitine libre	-0,098	0,146	-0,512	0,036
Acylcarnitines	-0,098	0,885		
Chaîne courte	-0,074	0,270		
Chaîne moyenne	0,077	0,252		
Chaîne longue	+0,084	0,212		

Abbreviations: AMM: acide methyl malonique; FEVG: fraction d'éjection ventriculaire gauche; IMC: index de masse corporel; LDL: lipoprotéines de basse densité; TAD: tension artérielle diastolique; TAS: tension artérielle systolique..

3. Analyse de la carnitine et des acylcarnitines comme indicateurs des altérations des activités enzymatiques des enzymes de la bêta oxydation : *very long chain acyl-CoA dehydrogenase* (VLCAD), *medium chain acyl-CoA dehydrogenase* (MCAD) et *carnitine palmitoyl transferase 1* (CPT1).

Nous avons étudié les ratios des acylcarnitines comme indicateurs des activités acyldehydrogénases mitochondriales [156, 259-261]. Comme il est signalé précédemment, il existe une association entre l'Hcy et les acylcarnitines à moyenne chaîne ($P < 0,001$). Donc, nous avons évalué et constaté une association entre l'Hcy et les acylcarnitines C8 et les ratios C8/C2 et C8/C10 acylcarnitines ratios, suggérant que l'Hcy peut influencer l'activité MCAD dans les deux populations (Figures 40,42 et 43 et Tableau 8). De manière similaire, l'association d'une Hcy élevée avec les acylcarnitines à longue chaîne et avec C14:1 et le ratio acylcarnitine C14:1/C16, dans les deux populations étudiées, suggère une influence de l'Hcy sur l'activité LCAD (Tableau 8) [262-265].

Tableau 8 Ratios des acylcarnitines selon le seuil pathologique du NT-proBNP et selon le quartile inférieur ou supérieur de l'Hcy. Ces ratios sont des marqueurs des altérations des enzymes de la bêta oxydation : chaîne longue acyl-CoA déhydrogénase (VLCAD), chaîne moyenne acyl-CoA déhydrogénase (MCAD) et lacarnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1)

Acylcarnitines ($\mu\text{mol/L}$) Et les ratios	Enzymes	Coronarographiés						Sujets âgés		
		NT-pro-BNP		P- value	Homocystéine		P- value	Homocystéine		P- value
		<250	\geq 250		Quartile inférieur	Quartile supérieur		Quartile inférieur	Quartile supérieur	
C8	MCAD	0,13 \pm 0,07	0,18 \pm 0,29	<0,001	0,14 \pm 0,08	0,20 \pm 0,10	<0,001	0,18 \pm 0,19	0,27 \pm 0,25	<0,001
C8/C2	MCAD	0,03 \pm 0,02	0,07 \pm 0,10	<0,001	0,04 \pm 0,3	0,06 \pm 0,04	<0,001	0,02 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	0,002
C8/C10	MCAD	0,72 \pm 0,51	0,96 \pm 0,95	0,024	0,76 \pm 0,93	1,23 \pm 0,87	<0,001	0,64 \pm 0,14	0,62 \pm 0,14	0,087
C14:1	VLCAD	0,08 \pm 0,04	0,11 \pm 0,08	<0,001	0,08 \pm 0,06	0,13 \pm 0,08	<0,001	0,10 \pm 0,05	0,15 \pm 0,09	<0,001
C14:1/C16	VLCAD	0,37 \pm 0,17	0,53 \pm 0,28	<0,001	0,40 \pm 0,20	0,62 \pm 0,30	<0,001	0,68 \pm 0,42	0,76 \pm 0,38	0,015
(C0/(C16:1+C18))	CPT1	193 \pm 88	231 \pm 105	0,004	210 \pm 93	245 \pm 126	0,079	205 \pm 201	189 \pm 79	0,444

4. Influence des polymorphismes MTHFR, MTR et TCN2 sur le BNP.

Nous avons déterminé les polymorphismes MTHFR 677 C>T (rs1801133), MTHFR 1298 A>C (rs1801131), MTR 2756 A>G (rs1805087) et TCN 776 C>G (rs1801198) par technique FRET sur l'appareil Roche 480, tous étaient en équilibre d'Hardy Weinberg (Valeurs P respectives et Chi-square: P=0,301, X²=1,067; P=0,547, X²=0,362; P=0,252, X²=1,311; P=0,608, X²= 0,262). Parmi toutes ces variants, seul MTHFR 667 C>T avait une influence significative avec la concentration en Hcy avec des concentrations à 14,5 \pm 4,4, 15,8 \pm 5,7, 18,1 \pm 7,6 $\mu\text{mol/L}$ pour les génotypes CC, CT et TT respectivement (P<0,001). De manière similaire, seul ce polymorphisme avait une influence sur la concentration du BNP (Figure 44). Aucun des polymorphismes n'influençait la concentration en acylcarnitines.

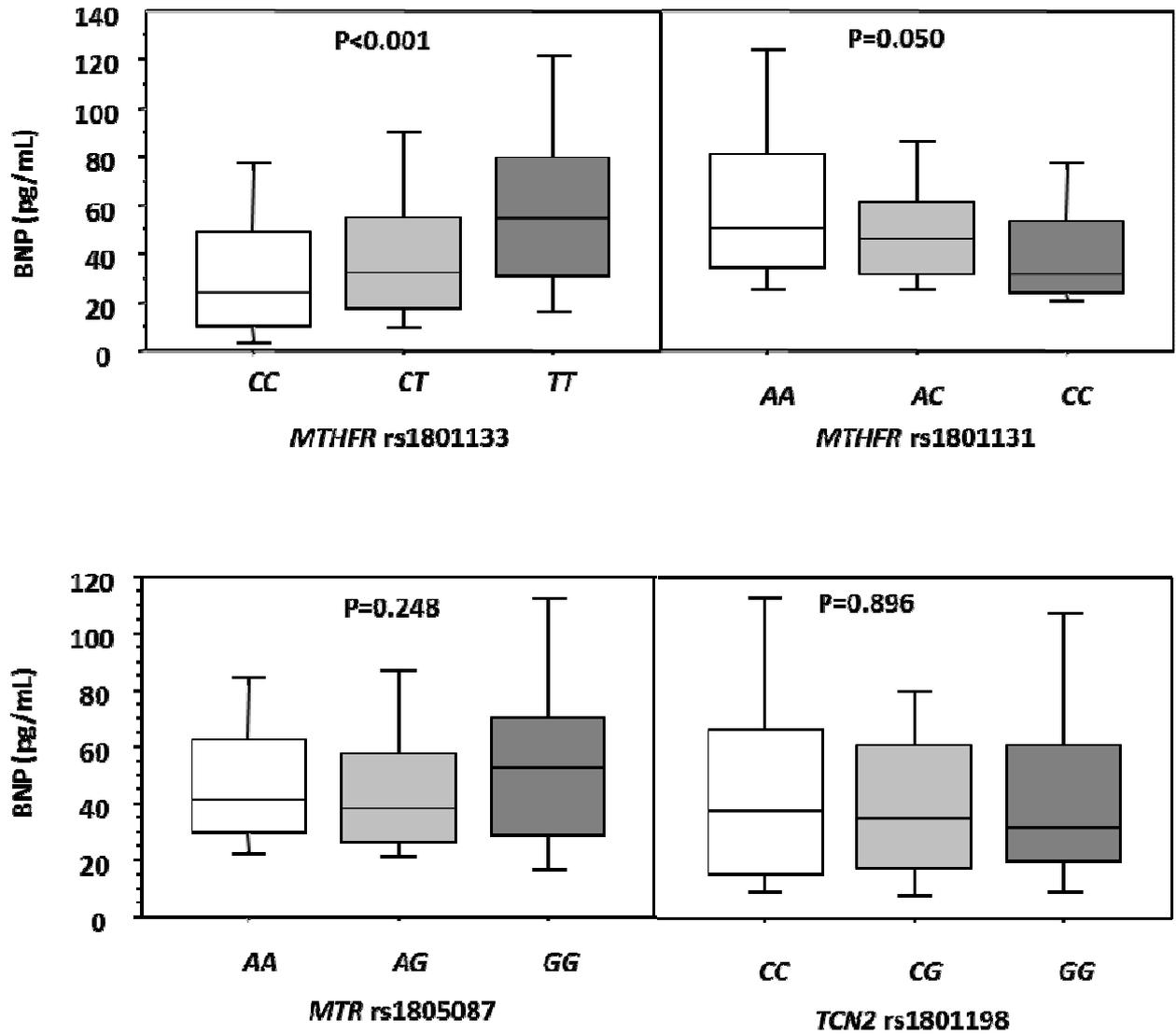


Figure 44. Influence de polymorphismes génétiques de *MTHFR* 677C>T et 1298A>C, *MTR* 2798A>G, et *TCN2* 2776 C>G sur la concentration plasmatique de NT-proBNP, chez 358 patients coronarographiés. Les boîtes à moustaches indiquent la médiane et les quartiles

Partie 3: Effets de la carence en donneurs de méthyles sur la bêta oxydation mitochondriale dans le tissu hépatique des rats de 21 jours

1. Paramètres anthropométriques et biologiques.

Chez les rats déficients, nous avons observé une diminution du poids corporel, tandis que les ratios poids hépatique / poids corporel et poids hépatique / longueur du tibia étaient augmentés (Tableau 9). Comme prévu, le groupe carencé avait une diminution en la concentration sérique en folates et en cobalamine, et au niveau tissulaire une diminution en folates, méthionine et en S-adénosylméthionine, ainsi qu'une réduction de l'activité de la méthionine synthase. Et par conséquent, une diminution de l'index de méthylation SAM/SAH.

Tableau 9. Paramètres anthropométriques et métaboliques de rats à 21 jours de mères carencées en groupement méthyle pendant la grossesse et l'allaitement et comparaison avec des autres régimes alimentaires dans la littérature.

Paramètres*	Témoins	Carencé	p-value	Restriction calorique ou protéique [référence]
Poids corporel(g)	40,4±0,6	20,0±1,6	<0,001	Diminution [266]
Foie (g)	1,5±0,1	1,6±0,1	0,471	
Index poids foie/ poids corporel	3,6±0,1	8,5±0,1	<0,001	Pas de modification [267]
Glucose (mg/dl)	138,3±3,8	75,4±5,5	<0,001	Diminution [268]
Vitamine B12 (pmol/L)	322,3±56,0	127,1±165,8	<0,001	Pas de modification
Folates (nmol/L)	74,8±18,5	35,4±16,3	<0,001	Pas de modification
Homocystéine (µmol/L)	6,28 ± 0,92	17,36 ± 5,80	<0,001	Diminution †
Insuline (µU/ml)	26,1±4,0	22,5 ± 2,6	0,4750	Pas de modification [267, 268]
Cholestérol total (mmol/L)	2,7±0,2	4,6 ± 0,3	<0,001	Pas de modification [266]
Triglycérides (mmol/L)	0,4±0,1	0,7±0,1	<0,001	Augmentation inconstante [266-268]
Acides gras libres (mmol/L)	200,6±34,9	884,8±178,4	<0,001	Augmentation inconstante [267, 269]
ASAT (IU/L)	185,8±13,4	1007,2±270,1	<0,001	Pas de modification †

- Moyenne ± écart type. Différences, statistiquement significative (p<0,05), ANOVA (n= 10).
 † Données de notre laboratoire avec des rats nés des mères avec une restriction en nourriture tous les 2 jours pendant la gestation et la lactation. Homocystéine: 5,2 ± 0,5 et 3,5 ± 0,4 µmol/L (p<0,001) et ASAT (IU/L): 190,2±15,4 et 207,2±20,1 UI/L, dans les groupes contrôle et restriction de la nourriture, respectivement.

2. Caractérisation de la stéatose hépatique.

Les rats carencés ont une augmentation très importante de la concentration en triglycérides et en acides gras libres (Tableau 10).

Tableau 10 Paramètres biologiques dans le tissu hépatique des rats à 21 jours des mères carencées en groupements méthyles

Paramètres *	Témoin	Carencé	p-value
Vitamine B12 (pmol/mg protéine)	2,3 ± 0,5	2,5 ± 0,5	0,614
Folates (nmol/mg protéine)	1,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,001
SAM (nmol/g tissu)	37,8 ± 9,3	13,9 ± 6,6	0,001
SAH (nmol/g tissu)	11,2 ± 3,2	10,3 ± 5,3	0,769
Ratio SAM / SAH	3,4 ± 0,6	1,8 ± 1,3	0,038
MTR (nmol/h/mg protéine)	2,5 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,008
BHMT (nmol/h/mg protéine)	7,0 ± 0,3	7,8 ± 1,4	0,691
Lipides totaux (µg/mg tissu)	65,9 ± 10,5	391,1 ± 183,4	<0,001
Cholestérol (µg/mg tissu)	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,271
Triglycérides (µg/mg tissu)	3,5 ± 1,2	21,3 ± 8,2	0,010

* Moyenne ± écart type. Différences statistiquement significatives ($p < 0,05$), ANOVA. (n= 10).

Chez les rats carencés, les coupes histologiques ont montré une stéatose microvésiculaire accompagnée d'une densité plus importante de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes de rats carencés comparés aux contrôles ($0,186 \pm 0,08$ vs. $0,003 \pm 0,002/\mu\text{m}^2$, respectivement, $p < 0,001$) (Figure 45).

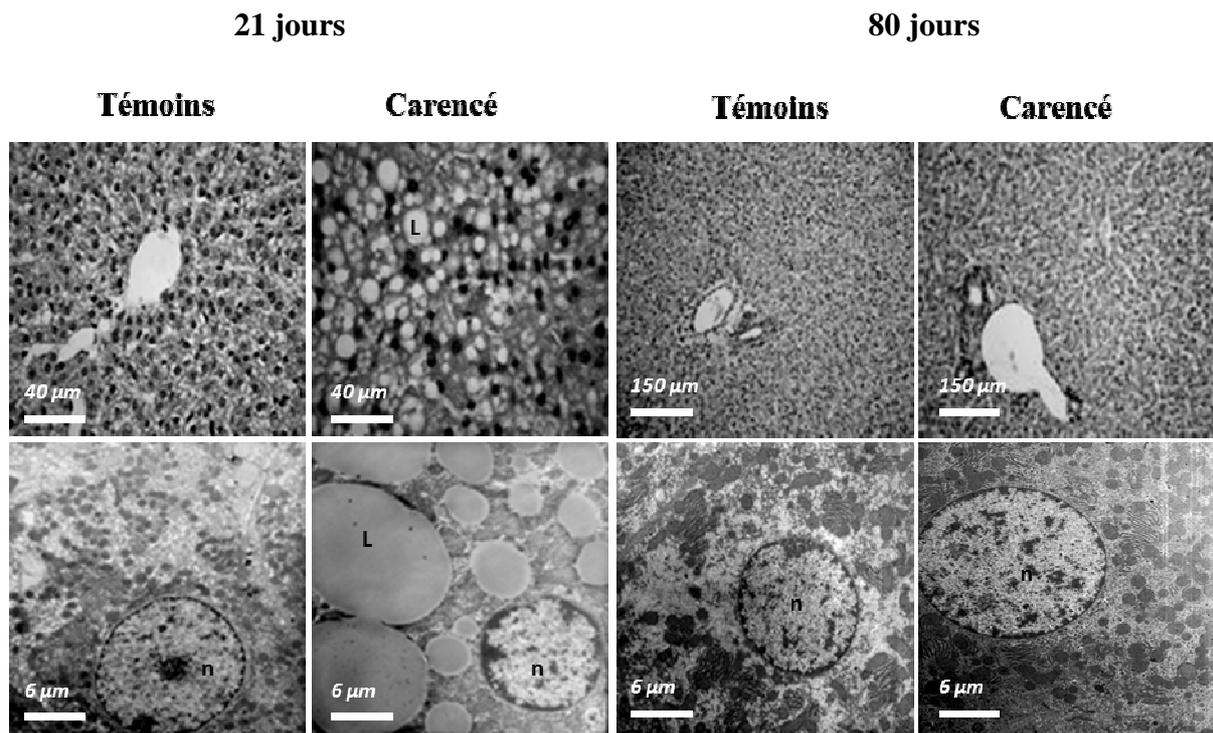


Figure 45. Microscopie électronique : A 21 jours : stéatose hépatique modérée de type microvésiculaire dans le groupe carencé à 21 jours (gauche, haut et bas) avec un aspect normal chez les témoins. A 80 jours : avec un retour à un régime normal disparition de la stéatose -absence de vésicules lipidiques- (droit, haut et bas)

3. Marqueurs histologiques et biologiques de fibrose et d'inflammation

Dans l'analyse par microscopie électronique avec une coloration Trichrome de Masson, triple coloration adaptée pour observer noyaux, cytoplasme et fibres de collagène, et une coloration rouge Sirius pour les fibres de collagène et de réticuline, nous n'avons pas observé de signes de fragmentation de l'ADN, d'inflammation, de fibrose ou de nécrose dans les 2 groupes (Figure 46).

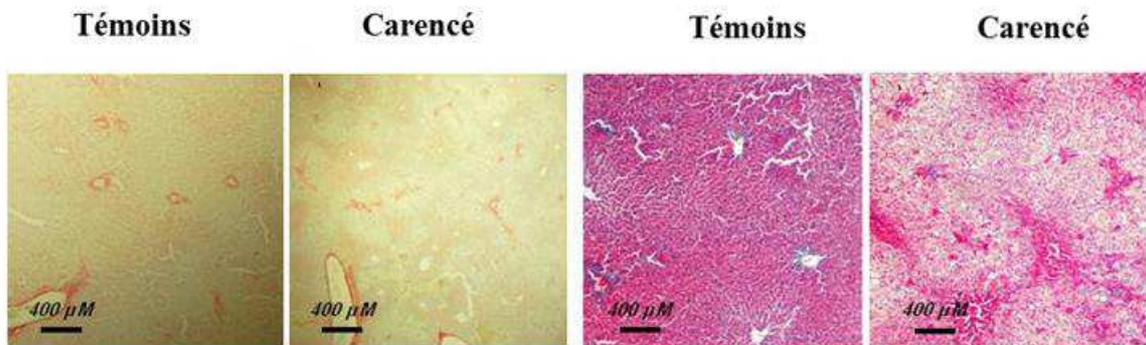


Figure 46. Marqueurs de fibrose et d'inflammation dans le foie des rats témoins et carencés. A gauche : coloration Rouge Sirius. A droite: coloration Trichrome Masson. Pas de changement significatif entre les deux groupes.

Par contre, en Western-Blot nous avons observé une augmentation de l'expression du Collagène-1, Caspase-1, IL-1 β et TIMP1 (Figure 47).

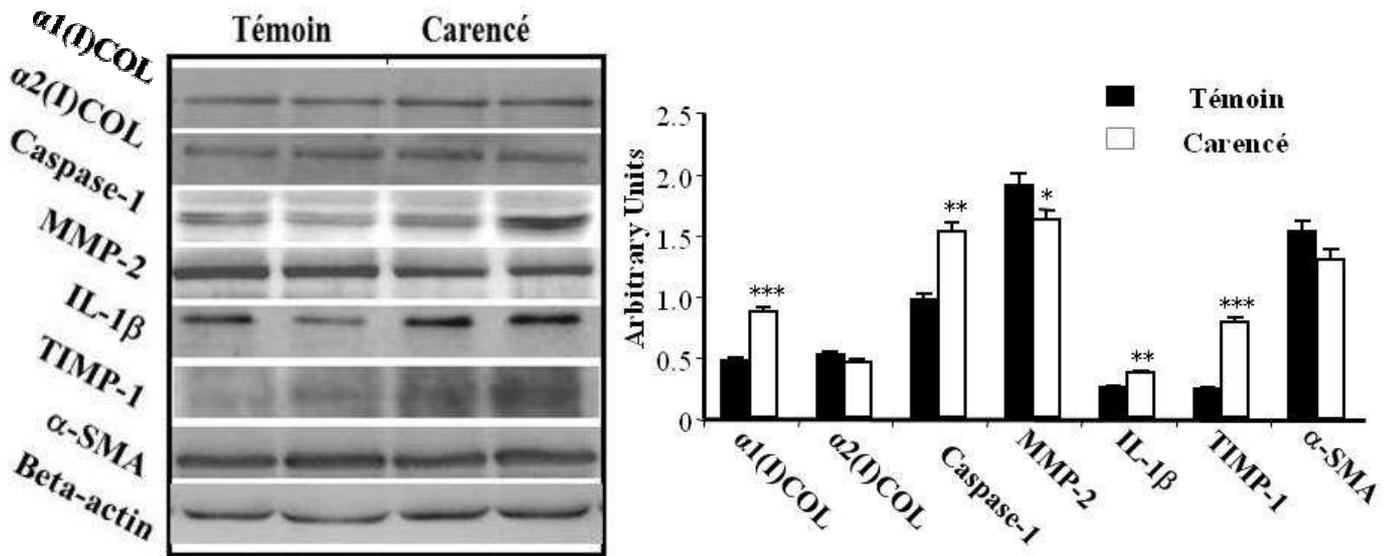


Figure 47. Analyse de western blot de marqueurs de fibrose et d'inflammation dans le foie des rats témoins et carencés. Une augmentation d'expression de collagène I α 1, caspase-1, IL-1 β et TIMP-1 est observée dans le groupe carencé. Les bandes ont été mesurées par densitométrie et les niveaux d'expression ont été normalisés au niveau d'expression de la protéine bêta-actine dans le même échantillon et ont été exprimés en unités arbitraires * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$ *** $p = 0,001$, ANOVA, $n = 8$.

Parallèlement, nous avons observé une augmentation de l'activité de la Caspase-1 dans le tissu hépatique des rats carencés sans aucun changement au niveau TNF- α . (Figure 48)

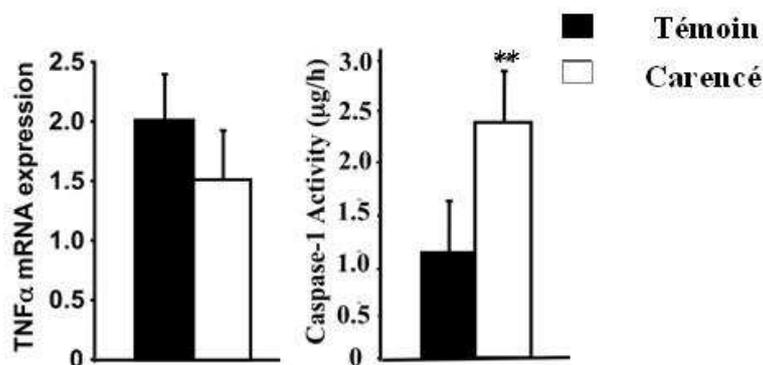


Figure 48. Expression du TNF- α par RT-PCR et activité de la Caspase-1 Moyenne \pm écart type Différence statistiquement significative ** $p < 0,01$, ANOVA, $n = 10$.

Ces changements histologiques observés chez les rats de 21 jours ont pratiquement disparu après le retour à un régime normal de 21 à 80 jours (Figure 45). En effet, très peu de gouttelettes lipidiques ont été observées et la densité de ces gouttelettes était semblable dans le groupe carencé et contrôle ($0,003 \pm 0,002$ vs. $0,005 \pm 0,002$ gouttelettes/ μm^2 , respectivement, $p=0,5634$).

4. Impact de la déficience sur le stress oxydant et le stress du réticulum.

Stress oxydant : nous n'avons pas observé de différences d'activités de la SOD Cu/Zn ni de la SOD Mn entre les groupes (Figure 49). En revanche, chez les rats carencés nous avons observé une augmentation de MDA et une diminution de l'activité de la GPX (Figure 49).

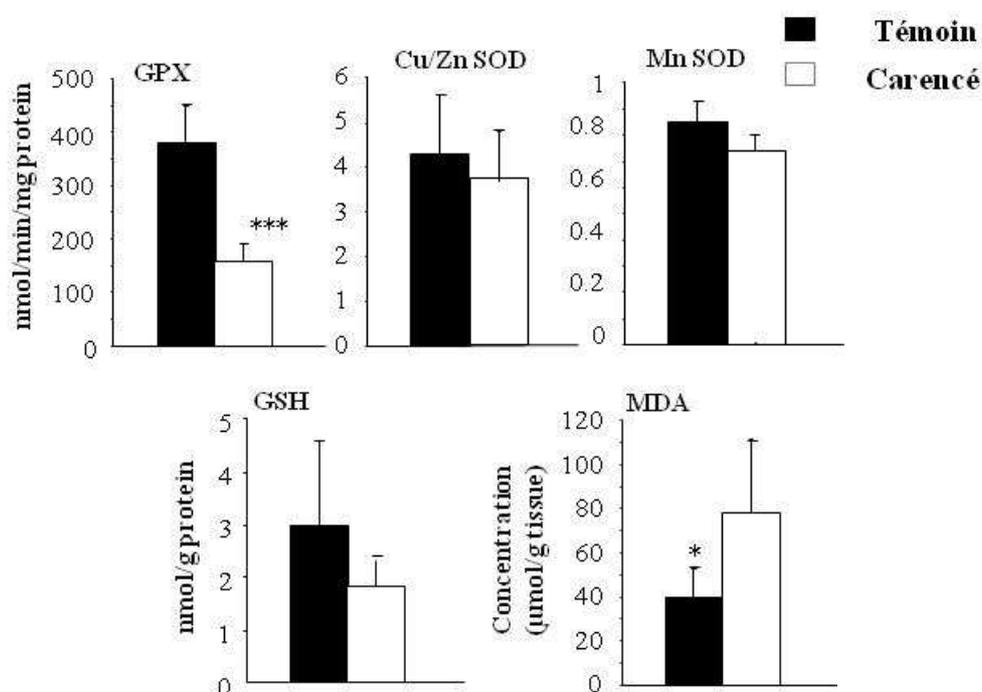


Figure 49. Activités des enzymes du stress oxydant : GPX, SOD Cu/Zn, et SOD Mn, et concentration en glutathion (GSH) et en Malondialdéhyde (MDA). Moyenne \pm écart Différences statistiquement significative * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, ANOVA, $n=8$.

5. Conséquence de la carence en groupements méthyles sur le stress du réticulum.

Le niveau d'expression des protéines p16, p21 était similaire dans les deux groupes, tandis que l'expression de p53 était très diminuée chez les rats carencés. Par ailleurs, la carence provoque une diminution de l'expression des protéines de marqueurs de stress du réticulum, les BiP/GRP78, les HERP et SREBP-1c (Figure 50).

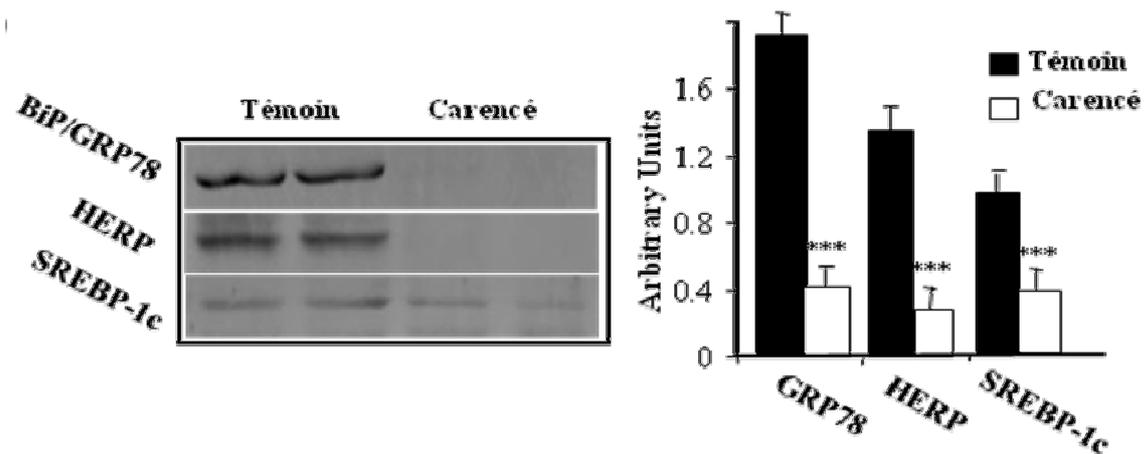


Figure 50. Conséquence de la carence en groupements méthyles sur le stress du réticulum: Diminution de l'expression de BiP/GRP78, HERP et SREBP-1c. Les bandes ont été mesurées par densitométrie et les niveaux d'expression ont été normalisés aux niveaux de la protéine Tubuline dans le même échantillon et ont été exprimés en unités arbitraires, ***p<0,001, ANOVA, n=8.

6. Altérations de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'oxydation des acides gras.

Nous avons observé une diminution de l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire chez les rats carencés (Figure 51).

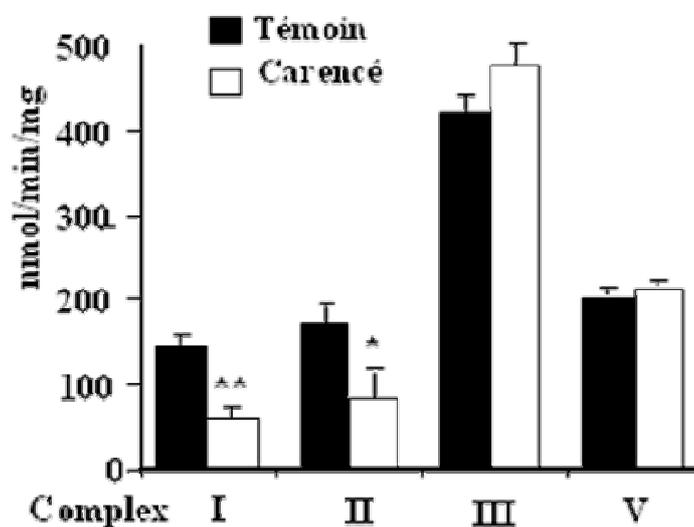


Figure 51 Activités de complexes de la chaîne respiratoire. Moyenne \pm écart Différences statistiquement significative *p<0,05 ; **p<0,01, ANOVA, n=10.

Dans le groupe carencé, nous avons observé des altérations de l'oxydation des acides gras à longue chaîne, puisque l'oxydation mitochondriale de la palmitoyl-CoA et de la palmitoyl-L-carnitine, était diminuée (Figure 52).

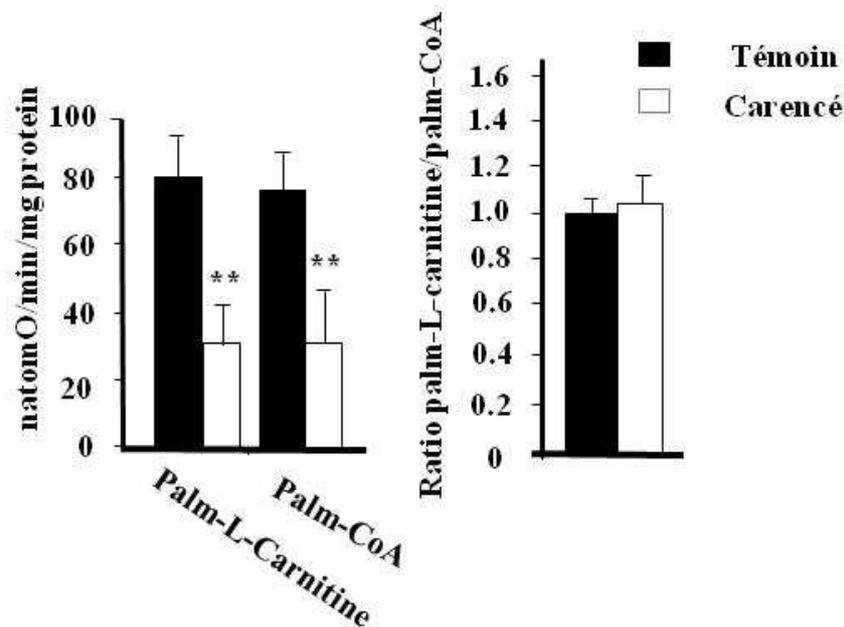


Figure 52. Activités de la palmitoyl-CoA et de lapalmitoyl-L-carnitine et ratio d'activités palmitoyl-L-carnitine / Palitoyl-CoA (témoin de l'activité CPT1) Moyenne \pm écart Différences statistiquement significative ** $p < 0,01$, ANOVA, $n = 20$.

En contrepartie, l'activité de la carnitine-O-palmitoyltransferase 1 (CPT1) était normale chez les rats carencés (Figure 52). Les concentrations en carnitine totale et libre étaient diminuées dans le tissu hépatique des rats carencés. Par ailleurs, nous avons observé une augmentation du ratio C14:1/C16 des acylcarnitines dans le groupe carencé ($p = 0.036$), témoin indirecte d'une réduction de l'activité de la *very long chain acyl dehydrogenase* (VLCAD) (Figure 53).

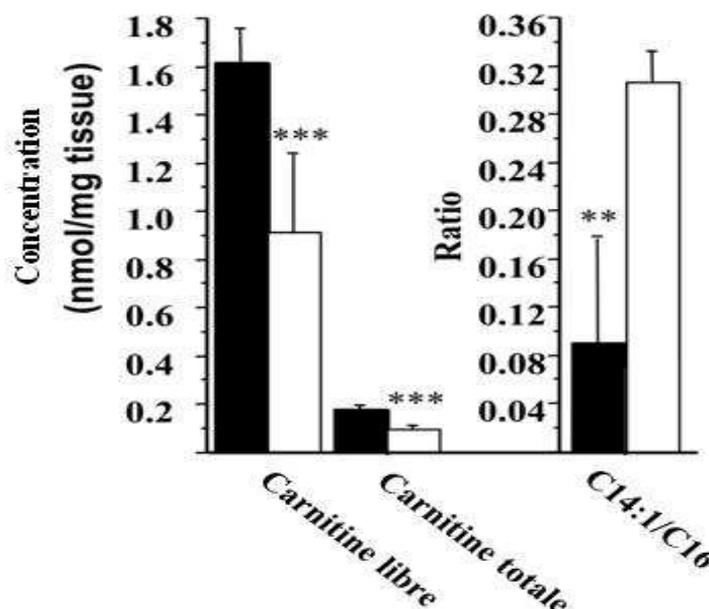


Figure 53. Concentration de carnitine libre et totale et ratio C14:1/C16 (VLCAD). Moyenne \pm écart Différences statistiquement significatives ** $p = 0,01$ *** $p = 0,001$, ANOVA, $n = 20$.

Par contre, nous n'avons pas observé de différence du ratio (C0/ (C16+C18)) entre les groupes, indicatif d'une activité normale de la CPT1 : 3,10 et 2,86 chez les contrôles et les carencés, respectivement, $p=0,820$. De manière intéressante dans notre modèle, nous avons observé une corrélation entre la carnitine libre et la SAM (Figure 54).

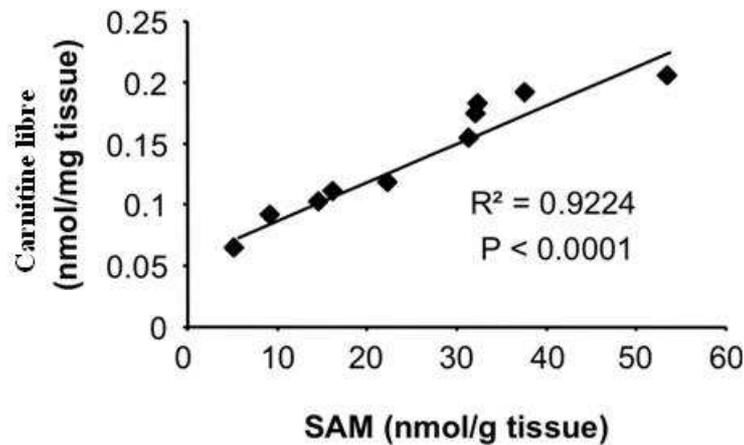


Figure 54. Corrélation entre carnitine et S-adenosylmethionine (SAM) chez les rats carencés,

D'autre part, nous avons constaté une diminution de l'expression des protéines en relation avec l'oxydation des acides gras, à savoir la protéine trifonctionnelle sous-unité alpha (TFE- α , connue aussi comme MTPA ou HADHA), la *short chain acyl-CoA dehydrogenase* (SCAD), NDUVF2 (protéine en relation avec le complexe I de la chaîne respiratoire), et une augmentation de l'expression de HSPD1, protéine chaperonne impliquée dans le repliement de la *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase* MCAD (Figure 55).

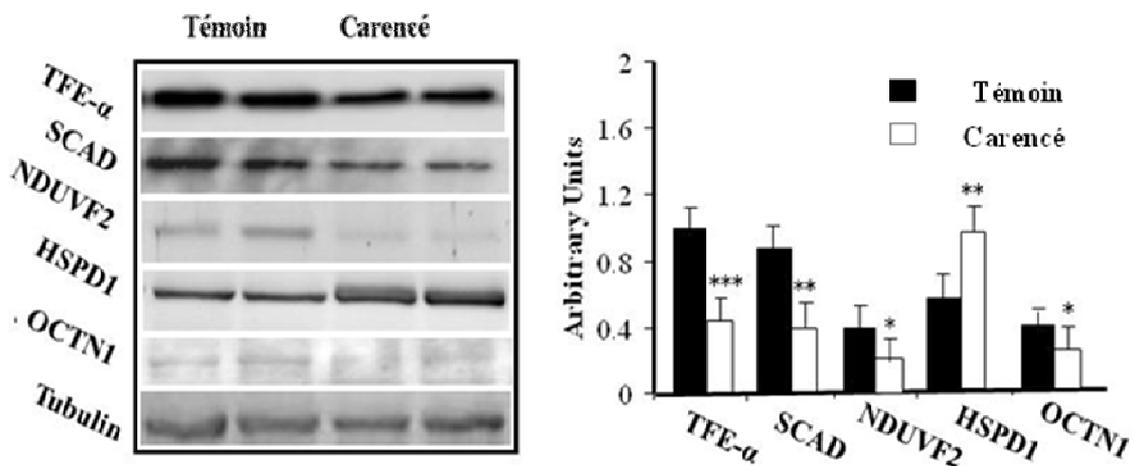


Figure 55. Diminution de l'expression des protéines de la bêta oxydation et de la chaîne respiratoire par Western Blot chez les rats carencés : *Trifunctional enzyme subunit alpha complex* (TFE- α), *short chain acylCoA dehydrogenase* (SCAD), *NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2* (NDUVF2) et *novel organic cation transporter* (OCTN1) Les bandes ont été mesurées par densitométrie et les niveaux d'expression ont été normalisés aux niveaux de la protéine Tubuline dans le même échantillon et ont été exprimés en unités arbitraires * $p<0,05$; ** $p=0,01$ *** $p=0,001$, ANOVA, $n=8$.

La diminution de l'expression de ces protéines est en étroite relation avec PGC-1 α selon l'analyse de modélisation à partir du logiciel *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA), ce résultat est tout à fait semblable à celui que nous avons observé dans le myocarde.

7. Modifications en la méthylation de PGC1- α et les conséquences sur les récepteurs nucléaires PPAR- α , ERR- α et HNF-4 α .

Finalement, nous avons étudié les possibles mécanismes épigénomiques en relation avec la méthylation PGC1- α et les interactions avec ses récepteurs nucléaires partenaires. Dans le tissu hépatique des rats carencés, nous avons observé une sous-expression des facteurs nucléaires ER- α , ERR- α et HNF-4 α , et une surexpression de PPAR- γ et absence de changement d'expression de PPAR- α et PGC-1 α (Figure 56).

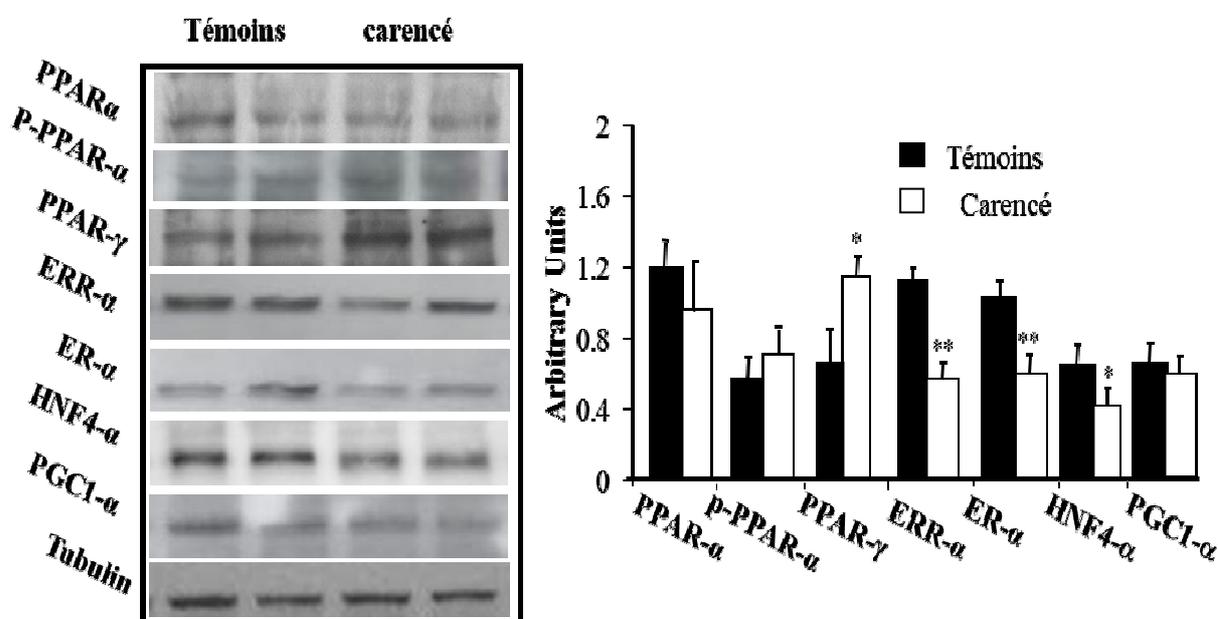


Figure 56. Analyse par western blot des mécanismes épigénomiques en relation avec l'altération de l'oxydation mitochondriale des acides gras. Les bandes ont été mesurés par densitométrie et les niveaux d'expression ont été normalisés aux niveaux de protéine Tubuline dans le même échantillon et ont été exprimé en unités arbitraires * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$ *** $p = 0,001$, ANOVA, $n = 8$.

Nous avons observé par immunoprécipitation, que la déficience en donneurs de méthyles provoque une diminution de la méthylation de PGC-1 α , ainsi qu'une diminution très significative de l'activité méthyl-tranfèrase, mesurée par le produit de réaction intracellulaire : l'asymétrique diméthyle-arginine (ADMA) (Figure 57).

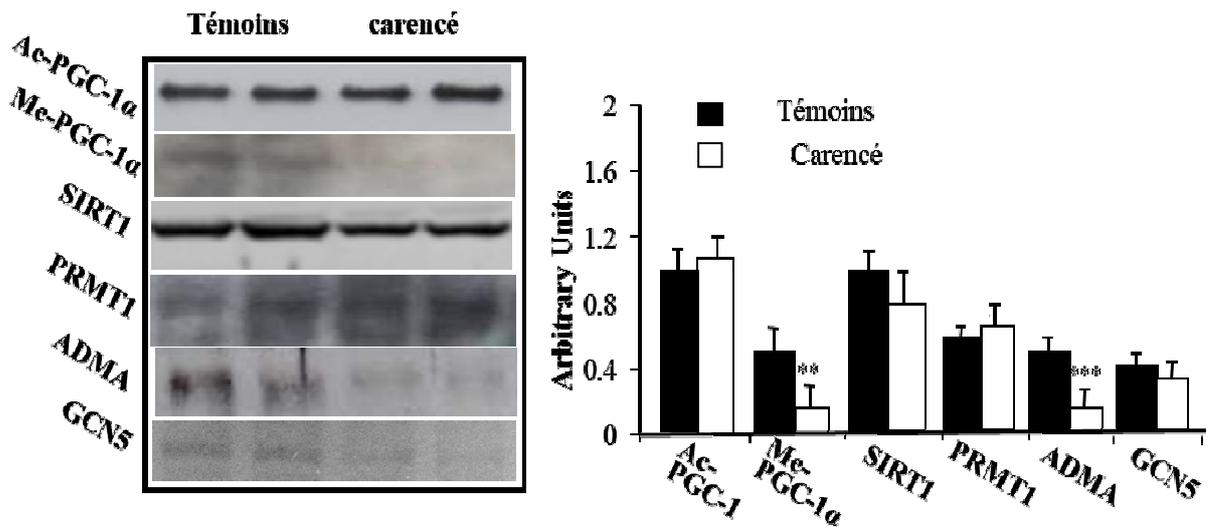


Figure 57. Immunoprécipitation de PGC-1 α et analyse par Western Blot de SIRT1, PRMT1, ADMA et GCN5. Les bandes ont été mesurées par densitométrie et les niveaux d'expression ont été normalisés aux niveaux de la protéine Tubuline dans le même échantillon et ont été exprimés en unités arbitraires * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$ *** $p = 0,001$, ANOVA, $n = 8$.

En revanche, nous n'avons pas observé des changements d'acétylation de PGC-1 α , en étudiant l'expression de l'acétylase GCN5 et la déacétylase SIRT1 ni de l'activité enzymatique de SIRT1 (Figures 57 et 58).

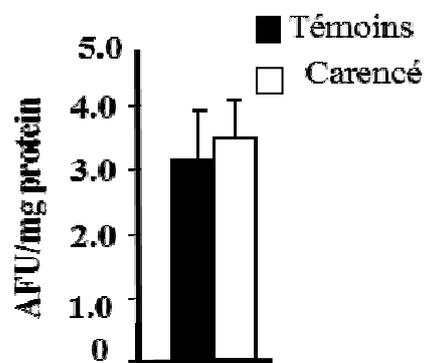


Figure 58. Activité enzymatique de SIRT1, Moyenne \pm écart, ANOVA, $n = 8$.

Par ailleurs, comme conséquence de l'hypométhylation de PGC1- α , nous avons remarqué par la technique Duolink[®] (*in situ proximity ligation assay*), une diminution significative des interactions de PGC1- α avec ses partenaires, les récepteurs nucléaires PPAR- α , ERR- α et HNF-4 α chez les rats carencés (Figure 59).

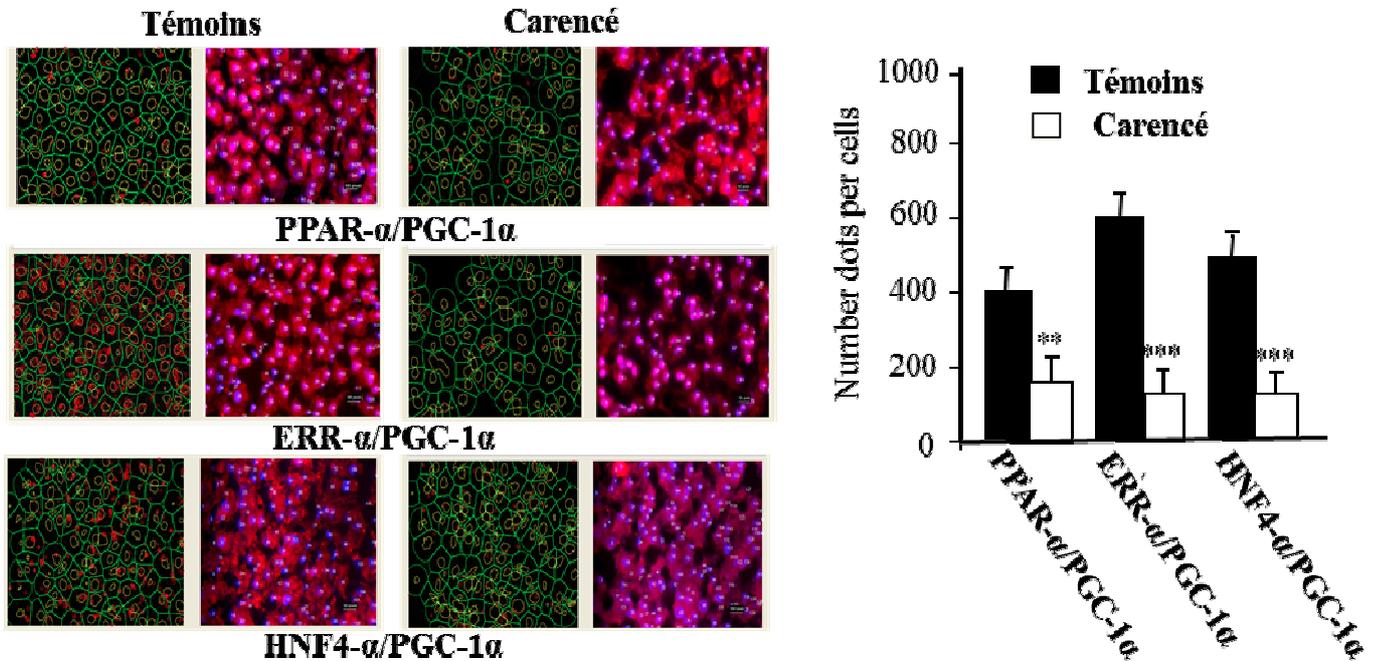


Figure 59. A gauche: Interactions entre PGC-1 α et PPAR- α , ERR- α et HNF-4 α , évaluées par la technique de Duo-Link dans le foie de rats à 21 jours. Gauche: Etiquetage et *Mat lab cell* design (points verts). Chaque blot rouge correspond à une dimerisation entre PGC-1 α et ses partenaires: PPAR- α , ERR- α et HNF-4 α . A droite: quantification de la méthylation (blot par cellule) Moyenne \pm écart type. Différences statistiquement significatives * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$ *** $p = 0,001$, ANOVA $n = 8$

En résumé la carence s'accompagne de l'apparition d'une stéatose hépatique microvésiculaire, avec une élévation des concentrations tissulaires de lipides et de triglycérides. De plus, nous avons observé une augmentation des marqueurs proinflammatoires sans augmentation des marqueurs de fibrose. A cet égard, nos résultats ont montré qu'un déficit de synthèse de carnitine, impliquée dans la β -oxydation et le stockage des acides gras, jouerait un rôle déterminant dans la pathogenèse de la stéatose chez le nouveau-né. Il existe également une dérégulation du métabolisme oxydatif des acides gras, avec diminution d'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire, qui résulte d'une hypométhylation de PGC1 et d'une diminution d'expression de PPAR α , ER α et ERR α .

Discussion/Conclusion

Partie 1 : Effet de la carence maternelle en donneurs de méthyles sur le myocarde des ratons

Notre étude fournit un lien entre la carence en donneurs de méthyles, l'acide folique, la vitamine B12 et le développement de l'hypertrophie du myocarde dans un modèle bien validé par de publications dans le passé [193, 270]. La cardiomyopathie a été caractérisée par un épaississement des parois du myocarde et une élongation des cardiomyocytes, en absence de fibrose et de dysfonction systolique, contrairement à ce qui a été observé chez le rat adulte avec une hyperhomocystéinémie produite par un régime alimentaire enrichi en homocystéine [197].

Le rôle de la carence dans le développement d'une hypertrophie du myocarde a été confirmé par une corrélation significative du rapport masse du cœur/masse corporelle avec les taux d'acide folique, de vitamine B12 et d'Hcys. Ce régime a entraîné une diminution du ratio SAM/SAH et une augmentation de la concentration d'Hcy évaluée par immuno-histochimie dans le myocarde des animaux carencés. La diminution du ratio SAM/SAH est la conséquence d'une altération de la voie de reméthylation avec absence de la cystathionine-β-synthase (CBS) qui induit la conversion de l'homocystéine en SAH par la SAH hydrolase, seule réaction réversible dans le cycle de l'Hcy (Figure 1) [191, 98].

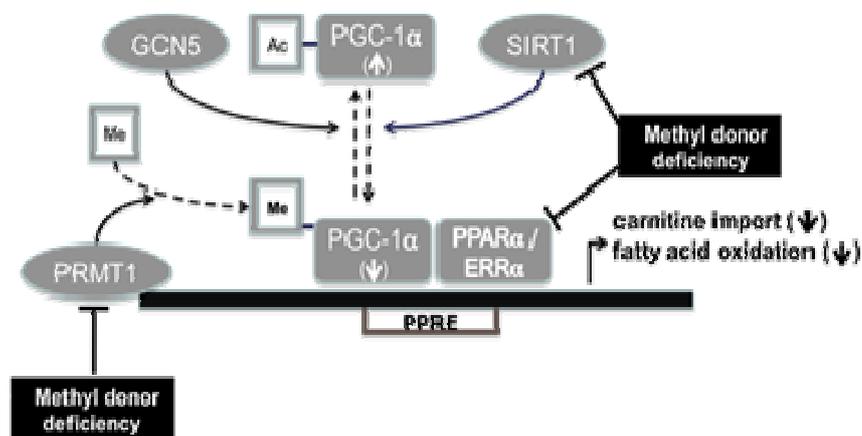


Figure 60. Mécanisme liée à la carence de groupement méthyle : altération de l'oxydation des acides gras par diminution de l'expression de PPARα et ERRα et aussi diminution de l'activité de PGC-1α qui peut être le résultat à la fois de une hypo méthylation et une hyper acétylation par diminution de l'expression de PRMT1 (méthyl transférase) et de SIRT1 (désacétylase) sans changement d'expression de GCN5 (acétyltransférase) (modifié après Holness et al. 2010)[271].

A titre de comparaison, des augmentations significatives d'Hcy dans le tissu cardiaque de souris d'un modèle génétiquement modifié ont été observées avec une concentration Hcy plasmatique élevée, ce qui n'est pas le cas chez les souris ayant un régime riche en méthionine avec un niveau d'Hcy plasmatique légèrement augmentée [195]. Outre les effets de l'homocystéine sur le tissu, la diminution du rapport SAM/SAH a un impact sur la méthylation des protéines impliquées dans les mécanismes épigénétiques, ces protéines jouent un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique du myocarde pendant la période périnatale [198, 271]. La perturbation de l'alignement des mitochondries et la concentration tissulaire de lipides étaient évocatrices d'un effet dramatique de la carence sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Cela a également été illustré par différentes altérations comme: l'accumulation de gouttelettes lipidiques proches des mitochondries, la diminution d'activité des complexes I et II et l'expression altérée de deux enzymes de ces complexes, NDUFV₂ et NDUFA₁₀, ainsi que le développement de l'hypertrophie cardiaque après la naissance, lorsque les acides gras sont les principaux fournisseurs d'énergie pour le cœur [265]. L'acétyl-CoA carboxylase (ACC) catalyse la synthèse de malonyl-CoA, qui est le substrat limitant de la synthèse d'acides gras qui contrôle directement l'activité de la CPT. Nos données indiquent que cette voie n'a pas été augmentée, étant donné que nous n'avons pas observé de changement dans l'activité de la CPT1 chez les animaux déficients [272]. L'analyse protéomique a également mis en évidence une modification d'expression des protéines impliquées dans l'oxydation des acides gras et le stockage des lipides.

MTPA, SCAD et HSP60 sont des protéines clés de l'oxydation des acides gras dans les mitochondries. Malgré une réduction modérée de leur expression sous l'influence de la carence en donneurs de méthyle, la diminution d'expression la MTP et de la SCAD a eu des conséquences importantes sur l'oxydation des acides gras du myocarde, comme en témoigne l'augmentation de la concentration d'acylcarnitines à -longue -moyenne et -courte chaîne. Cela peut être dû aux conséquences cumulatives de l'expression réduite des ces deux protéines, au début et à une étape clé en aval de l'oxydation des acides gras, respectivement (Figures 7,9 et 20).

Hspd1 est une protéine chaperonne impliquée dans le repliement de la chaîne moyenne de l'acyl-CoA déshydrogénase [186]. Parmi les protéines avec une expression altérée qui ont été mises en évidence dans les analyses protéomique et de Western Blot, la MTP, NDUFA10 et FABP3 ont été directement impliquées dans les mécanismes pathogéniques des cardiomyopathies dans des études précédentes [186, 203, 273, 274] .

MTPa est une partie de la protéine mitochondriale octamérique trifonctionnelle (MTPa) qui catalyse les trois dernières étapes de la β -oxydation des acides gras dans la mitochondrie. Les rats *mtpa-* - développent une cardiomyopathie sévère après la naissance et, comme chez les rats déficients en donneurs de méthyles on observe une augmentation du taux plasmatique de ces trois groupes d'acylcarnitines [187].

De manière intéressante, une étude récente de protéomique dans un modèle de rat hypertendu a montré que les deux protéines présentant le changement le plus significatif en ce qui concerne l'hypertrophie du myocarde étaient MTP et NDUFA10, c'est également ces deux protéines qui présentent le plus grand changement dans notre modèle de rats carencés (Figures 33, 35 et 36) [203]. Dans cette étude, l'expression altérée de ces deux enzymes mitochondriales a contribué à une hypertrophie cardiaque avant la survenue d'une hypertension [203].

Il peut être également supposé que l'expression altérée de NDUFV2 joue un rôle important dans l'hypertrophie du myocarde des rats déficients, car une mutation dans la sous-unité du complexe I de la mitochondrie provoque très tôt une cardiomyopathie hypertrophique [273]. L'expression accrue de FABP3, isoforme de FABP spécifique du cœur, peut également participer aux conséquences de la carence en méthyl sur le myocarde en exerçant des effets nocifs dans le métabolisme intracellulaire des acides gras et par l'intermédiaire d'un récepteur de haute affinité membranaire plasmique [274].

Dans l'analyse bio-informatique, « *ingenuity pathway analysis* » des données en protéomique, PGC1 α , PPAR α et ERR α étaient les déterminants majeurs des modifications produites par la carence alimentaire en groupements méthyles.

La désacétylation et la méthylation de PGC1 α sont deux mécanismes clés de la régulation du métabolisme oxydatif qui avaient un intérêt particulier dans notre modèle expérimental, où la méthylation et l'acétylation sont modifiées dans le contexte de diminution de ratio de SAM/SAH et retard de croissance intra-utérine [198, 271].

L'activité de PGC-1 α est induite par méthylation de plusieurs résidus arginine dans la région C-terminale par la protéine arginine méthyl transférase-I (PRMT1) [219]. L'acétylation de PGC-1 α diminue son activité. L'acétylation est régulée par une l'acétyltransférase (GCN5) et une histone désacétylase (SIRT1) (Figure 60) [202, 220, 271]. Nous avons mis en évidence une acétylation accrue et une diminution de la méthylation de PGC-1 α dans le myocarde des animaux carencés. Ces deux modifications post-traductionnelles étaient conformes à la

diminution de ratio de SAM /SAH ainsi que la diminution de l'expression de SIRT1 et PRMT1 chez les rats carencés et étaient indicatifs d'une désactivation fonctionnelle de PGC-1 α . De même, une réduction de l'expression de SIRT1 a été observée dans le muscle squelettique des nouveaux nés de mères sous restriction protéique [220]. Cela soulève l'hypothèse, encore à explorer, d'une programmation métabolique de restriction en donneurs de méthyle dans le cœur, qui pourrait être influencé par SIRT1 et PRMT1 [220, 265, 271, 275]. La diminution d'expression des protéines PPAR α et ERR α dans le myocarde des animaux déficients, en plus de la réduction de l'activation de leurs corégulateurs, est également conforme à la diminution de l'expression des enzymes mitochondriales impliquées dans l'oxydation des acides gras, y compris la sous-unité α de l'enzyme trifonctionnelle, l'acyl-Coa déshydrogénase des acides gras à chaîne courte et la FABP3 [163, 231, 232, 239, 247, 252, 255, 276-278]. Outre le rôle de la diminution du ratio SAM / SAH dans l'activation altérée de PGC-1 α , l'accumulation de l'Hcy dans les tissus pourraient participer à la réduction de l'expression de PPAR α , comme précédemment indiqué dans les monocytes, les cellules HepG2 et le tissu hépatique [65, 279].

Partie 2: L'Homocystéine prédit l'augmentation de NT-pro-BNP par diminution de l'oxydation mitochondriale des acides gras

Nous avons observé des concentrations anormales d'acylcarnitine et des ratios indicatifs des altérations des activités de l'acyl-CoA déshydrogénases mitochondriales, y compris l'acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne très longue (VLCAD) et à chaîne moyenne (MCAD), dans deux populations, une des patients coronarograhies et une autre des sujets âgés volontaires [259-261, 280]. L'association étroite entre l'Hcy et les ratios d'acylcarnitines et entre les ratios d'acylcarnitines et les peptides natriurétiques (NT-proBNP ou BNP) suggère un rôle sur la perturbation d'oxydation des acides gras. Par ailleurs, une association entre les peptides natriurétiques et l'Hcy a été déjà décrite [66, 258, 262, 281]. Ces données sont concordantes avec l'observation d'une cardiomyopathie dans le cas d'une mutation de l'acyl-CoA déshydrogénase déshydrogénases mitochondriales [263].

La carence en donneur de méthyles et l'association de l'homocystéine avec les peptides natriurétiques peut être responsable de la perturbation d'oxydation mitochondriale des acides gras. Dans notre étude, plusieurs arguments ont souligné le rôle du déficit en vitamine B12 et en acide folique dans le lien entre l'augmentation d'homocystéine, l'oxydation des acides gras et l'augmentation de NT-pro-BNP/BNP: (i) les deux populations avaient une prévalence élevée de déficit d'acide folique et vitamine B12 (ii) en analyse multivariée, l'acide folique, plutôt que d'Hcy était un prédicteur indépendant du NT-proBNP, (iii) l'association entre Hcy et BNP n'était signalée que dans les cas avec une concentration basse en acide folique, chez les sujets âgés italiens, et (iv) les patients avec une augmentation de l'acide méthylmalonique, marqueur métabolique d'une carence en vitamine B12, avaient des concentrations en acylcarnitines évocatrices d'une perturbation de l'oxydation des acides gras. En plus, dans une étude précédente [262], une association très forte a été observée entre le génotype MTHFR 677TT et le BNP (Figure 44) ce qui renforce les arguments mettant en évidence l'influence d'une perturbation de la voie de méthylation de l'homocystéine (Figure 1). En plus, ce génotype produit une réduction de la synthèse de méthyl-tétrhydrofolate dans le tissu cardiaque [198].

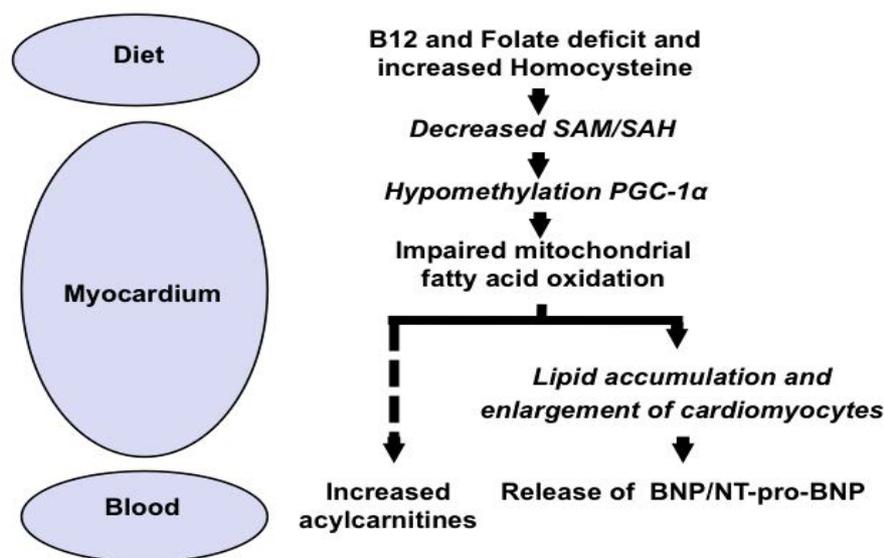


Figure 61. Résumé de mécanismes liés à la carence en groupements méthyles et l'augmentation d'homocystéine et des peptides natriurétiques (NT-pro-BNP/BNP) par altération de l'oxydation des acides gras, à la fois dans notre étude de population et notre modèle expérimental chez le raton.

En plus, un récent rapport clinique (cas report) a montré un lien entre la vitamine B12 et le cœur. Dans ce rapport, une cardiomyopathie dilatée prénatale était la manifestation de la carence en vitamine B12 chez un foetus présentant d'une déficience de type CblC, une erreur innée de la disponibilité intracellulaire de la vitamine B12 [264].

Ces résultats étaient très cohérents avec nos données récentes obtenues dans un modèle de raton, où la carence en folates et vitamine B12 augmente les acylcarnitines, et produit une hypertrophie cardiaque, sans modification de la pression artérielle systolique.

Les chaînes -courtes, -moyennes et -longues d'acylcarnitines ont été corrélées avec le poids du cœur et avec l'homocystéine plasmatique et le BNP, comme on l'observe dans nos deux populations adultes. L'altération de l'oxydation des acides gras est la conséquence d'une diminution de l'expression des protéines du myocarde liées aux activités des acyl-CoA déshydrogénases des acides gras à chaîne très longue (VLCAD), à chaîne moyenne (MCAD) et à chaîne courte (SCAD). Cela est expliqué par un déséquilibre de la balance acétylation/méthylation de PGC-1 α , par la diminution de rapport S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine et par la diminution de l'expression de SIRT1 et PRMT1 [70, 265, 271].

PGC-1 α est un régulateur clé du métabolisme énergétique et son activation dépend de sa méthylation par PRMT1, la SAM étant nécessaire en tant que donneur de méthyle [265, 271].

La SAM est également un substrat clé de la synthèse de carnitine [94]. Un déficit soit en vitamine B12 ou en folates pourrait donc conduire à une synthèse réduite de la carnitine, une condition qui produit également une cardiomyopathie [282]. Toutefois, la concentration plus élevée des deux acylcarnitines et de la carnitine libre n'était pas compatible avec cette hypothèse (Tableau 5) [156].

L'association de l'Hcy avec NT-pro-BNP peut expliquer que l'Hcy prédit la mortalité cardio-vasculaire. L'augmentation des peptides natriurétiques : NT-pro-BNP : BNP et une hyperhomocystéinémie modérée (Hcy > 20 µmol/L) sont fortement liées à l'incidence de la mortalité cardiovasculaire, chez les patients atteints de maladie coronarienne [283, 284].

Cependant l'implication de l'Hcy dans le risque cardiovasculaire est devenu un sujet de débat lors des études interventionnelles avec une supplémentation en vitamine B dès l'apparition d'une maladie cardiovasculaire n'a montré aucun bénéfice sur les événements cardiovasculaires secondaires, malgré l'efficacité des vitamines du groupe B à abaisser la concentration sanguine d'Hcy [256, 257, 285, 286]. La plupart des patients recrutés dans ces études interventionnelles avaient une concentration moyenne d'Hcy inférieure à 15 µmol/L (près de la normale ou légèrement augmentée) et sans déficit en vitamine B12 ou en folates.

Nos résultats suggèrent de reconsidérer l'influence de la supplémentation en vitamine B sur les événements cardiovasculaires secondaires chez les patients présentant des maladies cardiaques avec une augmentation des peptides natriurétiques et une hyperhomocystéinémie, simplement, ces augmentations doivent être associées à un déficit en folates et/ou en vitamine B12.

Limitations et force de notre étude.

Notre étude a subi certaines limites. L'absence d'échocardiographie et d'imagerie par résonance magnétique ne permet pas d'évaluer la relation entre l'Hcy et une altération de l'oxydation des acides gras avec une hypertrophie et/ou une stéatose du myocarde. Et nous n'avons pas pu effectuer les analyses génétiques chez les patients français.

La force de notre étude était de trouver les mêmes associations entre les marqueurs de la β -oxydation, l'homocystéine et aussi les peptides natriurétiques en deux analyses distinctes de deux populations contrastées, les patients avec maladies cardiaques et les bénévoles ambulatoires. En outre, nous avons évalué l'état de donneurs de méthyle en considérant non

seulement le taux sanguin d'acide folique, vitamine B12 et de l'Hcy, mais aussi de l'acide méthylmalonique.

En conclusion, cette étude a montré l'influence du déficit des donneurs/précurseurs de méthyle et un niveau augmenté d'homocystéine et des peptides natriurétiques (NT-pro-BNP ou BNP) par altération de l'oxydation mitochondriale des acides gras, dans deux populations contrastées.

Nos données métaboliques étaient très semblables à celles observées dans une étude animale récente, dans laquelle une carence en donneur de méthyle a produit une cardiomyopathie hypertrophique par hypométhylation de PGC-1 α , un régulateur clé du métabolisme énergétique dans le myocarde. Nous suggérons donc de reconsidérer l'intérêt de la supplémentation en vitamine B chez les patients qui présentent des maladies cardiaques qui ont une augmentation du NT-proBNP et un déficit en acide folique et/ou en vitamine B12.

Partie 3 : La carence en donneurs de méthyle provoque un petit poids à la naissance et une stéatose hépatique

Les rats carencés avaient un poids plus petit à la naissance en comparaison avec groupe contrôle et aucun changement dans la concentration d'insuline, comme on l'observe dans des modèles de rats ou rats avec une restriction protéique ou alimentaire [266-268]. Notre modèle montre que les animaux ont eu une augmentation plus importante des acides gras libres circulants, que les rats sous un régime restriction protéique et / ou calorique (Tableau 9) [266-268]. Cela pourrait expliquer pourquoi le déficit en donneurs de méthyl, mais pas la restriction protéique, produit une stéatose hépatique et une augmentation du ratio poids du foie / poids corporel [267, 270].

Le régime alimentaire de carence en donneurs de méthyle a été efficace dans la production d'une baisse du taux de SAM et du ratio de SAM/SAH similaire à celle observée chez les souris *methfr*^{-/+} et *mtr*^{-/+} [287, 288], en contraste avec l'augmentation de SAH chez les souris *cbs*^{-/-} [289].

A côté de la stéatose, le déficit en donneurs de méthyle a augmenté l'expression des protéines de la fibrose, les marqueurs inflammatoires et l'activité Caspase-1, comme précédemment observée chez les souris MCD (déficientes en méthionine et choline) [290, 291]. Ces effets peuvent être déclenchés par l'augmentation de concentration des peroxydes lipidiques (Figure 49), comme une conséquence de perturbations de l'oxydation des acides gras [291].

Cependant, ils ont eu un effet limité au niveau histologique, car aucune fibrose et inflammation n'a été trouvée dans le tissu hépatique. L'absence de fibrose irréversible a été confirmée par la disparition de la stéatose après que les rats carencés ont reçu une alimentation normale entre le jour 21 et 80 jours.

Le stress cellulaire et les voies de la lipogénèse ont eu une influence limitée sur la stéatose hépatique. SREBP-1c est un régulateur clé des voies lipogéniques qui est activé par le stress du réticulum et induit des gènes de biosynthèse et de l'absorption du cholestérol, dans les souris adultes *cbs*^{-/+} [61, 292, 293]. En revanche, notre modèle de raton n'a montré aucune modification de la concentration hépatique de cholestérol et une diminution dramatique de l'expression de protéine de SREBP-1c et de marqueurs de stress du réticulum (Figure 50). Et d'un autre côté, l'activité de CPT1 a resté sans changement est un autre argument suggérant une influence limitée de la synthèse des acides gras dans ce modèle

expérimental vu que CPT11 est sous le contrôle de la malonyl-CoA, le substrat initial et limitant de la synthèse des acides gras [293, 294].

L'oxydation mitochondriale des acides gras a été fortement affectée chez les rats carencés. A côté de l'influence limitée des voies lipogéniques, nous avons concentré notre attention sur le rôle contributif de l'oxydation des acides gras [70]. L'oxydation mitochondriale des acides gras a été fortement affectée, comme déjà montré par la diminution du taux d'oxydation de palmitoyl-CoA et l'augmentation du ratio de C14: 1/C16 des acylcarnitines, un marqueur de l'altération de la très longue chaîne acyl-CoA déshydrogénase (VLCAD) [156].

Ces résultats sont très cohérents avec la diminution de l'expression des protéines MTP et SCAD, enzymes clés de l'oxydation mitochondriale des acides gras, et avec la diminution de l'activité des complexes I et II. Par comparaison, des souris knockout homozygotes pour la sous-unité alpha de MTP développent une stéatose hépatique après la naissance, tandis que les souris adultes hétérozygotes développent une stéatose hépatique mais aussi l'insulino-résistance [295].

Une mutation dans la sous-unité β de MTP produit également une stéatose hépatique chez la souris [296]. Autres défauts d'oxydation des acides gras se présentent cliniquement avec une stéatose hépatique [297]. Enfin, les activités des complexes I et II sont diminuées dans le tissu hépatique de patients souffrant d'une stéatose hépatique non alcoolique [298].

La carence en donneur de méthyle produit un déficit en carnitine dans le foie. La diminution de l'expression de protéine OCTN1 est compatible avec la diminution de concentration hépatique de carnitine libre et totale, ce qui correspond à une altération d'importation des acides gras par OCTN 1 et, éventuellement, une perturbation de la synthèse de la carnitine [299]. La voie PPAR- α / PGC-1 α joue un rôle clé dans l'expression du gène des transporteurs OCTN [94, 300]. Sa désactivation par hypométhylation de PGC-1 α pourrait donc expliquer les changements du métabolisme de la carnitine chez les rats carencés [300]. En outre, SAM est nécessaire pour la production de triméthyllysine, le premier métabolite de la synthèse de carnitine [94]. Sur le plan clinique, nos résultats sont en corrélation avec la carence en carnitine trouvée chez certains patients avec une stéato-hépatite [301].

Alétarion de l'oxydation mitochondriale des acides gras par l'hypométhylation de PGC1- α et sa conséquence subséquente : la diminution de la liaison avec ses récepteurs nucléaires (PPAR- α , ERR- α et HNF4- α)

L'ensemble de nos données confirment l'hypothèse selon laquelle l'inefficacité de couplage la β -oxydation des acides gras à la respiration mitochondriale est une cause possible de stéatose hépatique non-alcoolique [295].

En accord avec nos résultats, une étude récente a montré que l'inhibition de l'importation mitochondriale des acides gras produit des changements transcriptomiques liée à l'altération des voies de PGC1- α et HNF-4 α [302]. La fonction de PGC-1 α est régulée via la méthylation par PRMT1 [271].

Nous avons observé une hypométhylation importante de PGC-1 α dans le foie des animaux carencés, ce qui était compatible avec la diminution du ratio de SAM/SAH et aussi avec la diminution d'expression de l'ADMA, et enfin avec la diminution par Duolink® de l'interaction de PGC-1 α avec PPAR- α , -ERR- α et HNF-4 α (Figure 59).

Ces résultats sont concordants avec les précédentes données de la littérature, qui ont montré le rôle régulateur de PGC-1 α dans le foie pour le métabolisme mitochondriale des lipides grâce à son partenariat avec PPAR- α , α -ERR et HNF-4 α [161, 271].

Les souris carencées en PGC-1 α sont déficitaires pour ces voies et présentent une stéatose hépatique [94]. Par ailleurs l'absence de PPAR- α renforce le développement de la stéato-hépatite, tandis que l'administration des agonistes de PPAR- α a l'effet inverse, chez les souris nourries avec le régime carencé en méthionine et en choline [303, 304].

L'hypoglycémie mise en évidence chez les rats carencés était conforme avec les observations précédentes sur l'effet de la restriction alimentaire et peuvent être le résultat de la perturbation de l'expression des enzymes de la gluconéogenèse par désactivation de PGC-1 α [268, 305].

Le petit poids à la naissance de notre modèle expérimental est un prédicteur potentiel du syndrome métabolique, selon l'hypothèse de la programmation foétale. Dans ce contexte, la stéatose du foie et de du myocarde pourraient être les deux premières manifestations de prédisposition au syndrome métabolique, dans lequel une dérégulation de l'homéostasie lipidique par désactivation de PGC1- α pourrait jouer un rôle clé [271, 305].

Cette dérégulation pourrait contribuer à expliquer les preuves émergentes d'un lien entre la carence en donneurs de méthyle, le petit poids à la naissance et les manifestations ultérieures de syndrome métabolique, dans les études de population [306-308].

Conclusion

En conclusion, la carence en donneurs de méthyles pendant la gestation et l'allaitement produit une stéatose hépatique, qui se traduit principalement par l'altération de l'oxydation mitochondriale des acides gras *via* la diminution de l'interaction de PGC1- α hypométhylé avec les récepteurs nucléaires PPAR- α , ERR- α et HNF-4 α .

Ce lien entre la carence en donneurs de méthyle et une dysrégulation épigénétique du métabolisme énergétique ouvre de nouvelles perspectives sur la pathogenèse de la maladie stéatosique, en particulier en ce qui concerne l'hypothèse de la programmation fœtale.

Conclusion générale

L'objectif général de notre projet était d'identifier les modifications nutrigenomiques en lien avec les dérégulations du métabolisme énergétique dans un modèle animal de carence en donneurs de méthyles pendant la gestation et l'allaitement. Il s'inscrit dans le projet de l'unité U954 sur l'évaluation d'effets de type foetal programming de la carence en donneurs de méthyles dans un modèle expérimental qui produit un petit poids à la naissance.

Plusieurs études épidémiologiques récentes menées en Inde, au Népal et en Europe montrent un effet de type foetal programming du déficit en donneurs de méthyles, et plus particulièrement en vitamine B12 sur l'obésité, l'insulinorésistance et les complications viscérales du syndrome métabolique [234, 235, 237]. Nous avons ciblé notre intérêt sur deux organes, le cœur et le foie, qui sont deux cibles importantes de la stéatose dans le syndrome métabolique, pour lesquels la recherche de mécanismes communs de dérégulation font l'objet de très nombreux travaux dans la littérature. Notre stratégie expérimentale comportait une première étape de caractérisation des conséquences métaboliques et protéomiques qui nous a permis, par approche bioinformatique simple de type IPA, d'identifier une diminution de la bêta-oxydation et PGC-1 α , PPAR α , ER α et ERR α comme principaux acteurs potentiels des mécanismes en jeu. La cohérence entre l'approche métabolique et l'approche protéomique s'est également traduite par la confirmation des hypothèses sur le plan mécanistique, en montrant très clairement l'importance de l'hypométhylation de PGC-1 α et de la diminution de l'expression des récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation de l'expression de gènes clés de la bêta-oxydation et des complexes d'entrée 1 et 2 de la chaîne respiratoire. Ces résultats observés dans un modèle expérimental sont d'un point de vue mécanistique très cohérents avec des résultats similaires observés dans deux populations l'une de sujets âgés ambulatoire, et l'autre de sujets hospitalisés pour suspicion d'insuffisance cardiaque avec ou sans maladie coronaire. Dans ces deux populations il existait en effet une association très étroite entre homocystéine et acylcarnitines, ainsi qu'entre l'homocystéine et les rapports d'acylcarnitines utilisés comme marqueurs d'activité des enzymes de la bêta-oxydation. Ces résultats apportent une explication plausible sur l'influence de l'homocystéine et de la carence en donneurs de méthyles sur un marqueur myocardique, le BNP, déjà rapportée dans la littérature par plusieurs groupes, dont le nôtre. L'hypométhylation de PGC-1 α est très logiquement liée à des modifications d'expression de PRMT 1 et de la diminution de synthèse de la SAM, en lien avec la diminution de la voie de reméthylation de l'homocystéine dépendante des deux donneurs de méthyles, la vitamine B12 et les folates.

S'il existe très clairement à la fois dans le foie et dans le cœur des mécanismes communs qui aboutissent dans les deux cas à la diminution de la bêta-oxydation, il existe cependant aussi des différences concernant certains aspects de cette dérégulation. En effet, la diminution d'expression de SIRT-1 et l'hyperacétylation de PGC1- α qui en découle constituent un mécanisme de dérégulation qui se surajoute à l'hypométhylation, dans l'inactivation de PGC-1 α liée à la carence en donneurs de méthyles, au niveau du muscle myocardique mais pas au niveau du foie. SIRT-1 est en effet très étudiée comme acteur impliqué dans les dérégulations métaboliques liées à la restriction protéique et à la restriction calorique, en lien avec la dérégulation de PGC1- α par acétylation (Figure 24) [161, 238, 240]. Le mérite et l'originalité de notre travail sont de montrer pour la première fois l'importance respective de l'hypométhylation dans une situation expérimentale de carence nutritionnelle.

La diminution d'expression de SIRT-1 dans le myocarde méritera d'être étudiée ultérieurement. Il est en effet important de noter que la carence en donneurs de méthyles produit un effet inverse à celui de la restriction calorique sur l'expression de SIRT-1, et produit le même effet que la surnutrition. L'une des pistes sera d'étudier le rapport NAD⁺/NADH et le rôle de Nampt (figure 28) [161, 241, 297]. Par ailleurs, il existe des interactions fortes avec l'AMPK qui agit également sur la phosphorylation de PGC-1 α . Ces mécanismes mériteront d'être explorés de façon plus approfondie dans la mesure où la diminution d'expression ou d'activité de SIRT-1 et de l'AMPK prédispose au syndrome métabolique et à l'insulino-résistance. La diminution de l'expression de SIRT-1 nous amènera également à étudier la voie mTOR qui est également sous son influence et qui joue un rôle majeur dans les mécanismes de dérégulation du métabolisme lié aux carences en acides aminés.

La plupart des travaux rapportent une augmentation de l'expression de SIRT-1 dans des modèles de restriction calorique [233, 242] et cet effet serait lié à FOXO3- α . Nous n'avons pas trouvé de modification de FOXO3 dans le cœur (résultats non présentés). La transcription de SIRT-1 est diminuée dans le tissu adipeux et le foie chez les obèses et dans les modèles animaux de surnutrition. Ceci nous a amené à poser l'hypothèse d'un mécanisme potentialisateur de la carence en donneurs de méthyles, dans un contexte de surnutrition. Ceci ouvre des perspectives importantes sur l'influence de la carence en donneurs de méthyles pour l'hypothèse du fœtal programming dans la mesure où nos animaux présentent un petit poids à la naissance. Nous n'avons pas retrouvé de profil insulino-résistant chez nos animaux, situation qui est l'un des facteurs majeurs de la stéatose hépatique non alcoolique. Nous avons observé une hypoglycémie avec une tendance à la diminution de l'insuline. Cette situation

reflète probablement une diminution de la néoglycogénèse, diminution qui peut être expliquée par la dérégulation de PGC1- α .

L'augmentation très importante des acides gras libres en lien avec la diminution de la bêta-oxydation périphérique, illustrée par le profil très perturbé des acylcarnitines plasmatiques, est très probablement un facteur causal majeur de la stéatose hépatique, qui se surajoute à la diminution de la bêta-oxydation. Nous n'avons pas observé d'augmentation de la lipogénèse hépatique qui est cohérente avec l'absence d'augmentation d'expression de SREB1-C et du stress du réticulum et de l'absence d'inhibition de CPT1. Ces travaux méritent cependant d'être complétés par l'étude de l'expression et de la régulation par l'AMPK de l'ACC-CoA. L'augmentation des acides gras tissulaires et circulants fait actuellement l'objet de nombreux travaux sur les hypothèses physiopathologiques du syndrome métabolique. Les acides gras libres ont un effet pro-inflammatoire en augmentant notamment l'expression des cytokines. Ils participent également aux mécanismes d'insulino-résistance en lien avec PKC et DAG [243]. Ces hypothèses reposent sur des données expérimentales obtenues chez des animaux soumis à une surnutrition ou des modèles génétiquement prédisposés à l'obésité [243].

Au total, notre observation d'un petit poids à la naissance associé à des mécanismes de dérégulation du métabolisme énergétique comparables à ceux observés dans la surnutrition, nous amènera à tester l'hypothèse du foetal programming selon une double séquence, carence gestationnelle en donneurs de méthyles, suivie d'une exposition ultérieure isolée ou contemporaine à une surnutrition (régime hypercalorique riche en lipides et sucres rapides). Cette situation correspond à des données épidémiologiques compatibles en termes de santé publique. La carence en donneurs de méthyles est très fréquente pendant la période gestationnelle, en Europe (apport insuffisant lié à une consommation insuffisante de fruits et de légumes frais), mais aussi en Inde et au Népal [234]. La surnutrition dès l'enfance et l'adolescence est également un facteur causal de la forte augmentation du syndrome métabolique et du diabète de type 2, depuis deux décennies. Cette hypothèse sera testée sur notre modèle de carence et également sur un modèle transgénique de souris ayant une expression conditionnelle du gène MTR et sur une souris transgénique ayant une invalidation pour le récepteur de la transcobalamine, qui est indispensable à l'internalisation cellulaire de la vitamine B12.

Bibliographie

1. Butz, L.W. and V. du Vigneaud, *The formation of a homologue of cystine by the decomposition of methionine with sulfuric acid*. Journal of Biological Chemistry, 1932. **99**(1): p. 135.
2. Finkelstein, J.D. and J.J. Martin, *Homocysteine*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2000. **32**(4): p. 385-389.
3. Murphy, M.M. and J.D. Fernandez-Ballart, *Homocysteine in pregnancy*. Adv Clin Chem, 2011. **53**: p. 105-37.
4. MacCoss, M.J., N.K. Fukagawa, and D.E. Matthews, *Measurement of intracellular sulfur amino acid metabolism in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(6): p. E947-55.
5. Rafnsson, S.B., et al., *Is a low blood level of vitamin B12 a cardiovascular and diabetes risk factor? A systematic review of cohort studies*. Eur J Nutr, 2011. **50**(2): p. 97-106.
6. Finkelstein, J.D., et al., *Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary methionine*. Biochem Biophys Res Commun, 1982. **108**(1): p. 344-8.
7. Finkelstein, J.D., *The metabolism of homocysteine: pathways and regulation*. Eur J Pediatr, 1998. **157 Suppl 2**: p. S40-4.
8. Chen, P., et al., *Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease*. Advances in enzyme regulation, 1999. **39**: p. 93.
9. Cantoni, L., et al., [*Relations between protidopoiesis and biological transmethylations: action of S-adenosylmethionine on protein crisis in chronic hepatopathies*]. Minerva Med, 1975. **66**(33): p. 1581-9.
10. Leclerc, D., et al., *Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3059-64.
11. Bhaskar, L.V., J. Murthy, and G. Venkatesh Babu, *Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts*. Arch Oral Biol, 2011. **56**(8): p. 723-37.
12. Vogel, T., et al., *Homocysteine, vitamin B12, folate and cognitive functions: a systematic and critical review of the literature*. Int J Clin Pract, 2009. **63**(7): p. 1061-7.
13. Obeid, R. and W. Herrmann, *Homocysteine and lipids: S-adenosyl methionine as a key intermediate*. FEBS Lett, 2009. **583**(8): p. 1215-25.
14. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. 2008: Freeman.
15. Bottiglieri, T., *Homocysteine and folate metabolism in depression*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. **29**(7): p. 1103-12.
16. Hodgkin, D.C., et al., *Structure of vitamin B12*. Nature, 1956. **178**(4524): p. 64-66.
17. Rosenberg, I.H., *Metabolic programming of offspring by vitamin B12/folate imbalance during pregnancy*. Diabetologia, 2008. **51**(1): p. 6-7.
18. Selhub, J., et al., *Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population*. Jama, 1993. **270**(22): p. 2693-8.
19. Jacobsen, D.W., et al., *Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects*. Clinical chemistry, 1994. **40**(6): p. 873.
20. Andersson, A., et al., *Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status*. European journal of clinical investigation, 1992. **22**(2): p. 79-87.
21. Ueland, P.M., H. Refsum, and L. Brattstrom, *Plasma homocysteine and cardiovascular disease. Atherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis, and endothelial function*. New York: Marcel Dekker, 1992. **183**.
22. Ueland, P.M. and H. Refsum, *Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy*. J Lab Clin Med, 1989. **114**(5): p. 473-501.

23. De Bree, A., et al., *Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease*. Pharmacological reviews, 2002. **54**(4): p. 599-618.
24. Ueland, P.M., et al., *Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism*. Trends in pharmacological sciences, 2001. **22**(4): p. 195-201.
25. Aléssio, A., et al., *Polymorphism C776G in the transcobalamin II gene and homocysteine, folate and vitamin B12 concentrations. Association with MTHFR C677T and A1298C and MTRR A66G polymorphisms in healthy children*. Thromb Res, 2007. **119**(5): p. 571-577.
26. Morris, M.S., et al., *Total homocysteine and estrogen status indicators in the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Am J Epidemiol, 2000. **152**(2): p. 140-8.
27. Refsum, H., et al., *The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease*. J Nutr, 2006. **136**(6 Suppl): p. 1731S-1740S.
28. Jacques, P.F., et al., *Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(3): p. 613-21.
29. Murphy, M.M., et al., *The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study*. Am J Clin Nutr, 2002. **76**(3): p. 614-9.
30. Powers, R.W., et al., *Renal handling of homocysteine during normal pregnancy and preeclampsia*. J Soc Gynecol Investig, 2004. **11**(1): p. 45-50.
31. Plotsky, A.R. and Y.M. Doroshenko, *Plasma homocysteine and birth defects*. 2007.
32. Joó, J.G., *Recent perspectives on the genetic background of neural tube defects with special regard to iniencephaly*. Expert review of molecular diagnostics, 2009. **9**(3): p. 281-293.
33. Daly, L.E., et al., *Folate levels and neural tube defects*. JAMA: the journal of the American Medical Association, 1995. **274**(21): p. 1698-1702.
34. Kapusta, L., et al., *Congenital heart defects and maternal derangement of homocysteine metabolism*. J Pediatr, 1999. **135**(6): p. 773-4.
35. Solanky, N., et al., *Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism*. Placenta, 2010. **31**(2): p. 134-43.
36. Tsitsiou, E., et al., *Homocysteine transport by systems L, A and y+L across the microvillous plasma membrane of human placenta*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 16): p. 4001-13.
37. Yajnik, C.S., et al., *Maternal total homocysteine concentration and neonatal size in India*. Asia Pacific journal of clinical nutrition, 2005. **14**(2): p. 179-181.
38. McMillen, I.C. and J.S. Robinson, *Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming*. Physiological Reviews, 2005. **85**(2): p. 571-633.
39. Refsum, H., *Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome*. British Journal of Nutrition, 2001. **85**(2): p. 109.
40. Mato, J.M., et al., *S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications*. Pharmacol Ther, 1997. **73**(3): p. 265-80.
41. Halsted, C.H., et al., *Ethanol feeding of micropigs alters methionine metabolism and increases hepatocellular apoptosis and proliferation*. Hepatology, 1996. **23**(3): p. 497-505.
42. Fracanzani, A.L., et al., *Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes*. Hepatology, 2008. **48**(3): p. 792-798.
43. Angulo, P. and K.D. Lindor, *Non-alcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17 Suppl**: p. S186-90.
44. Adams, L.A. and P. Angulo, *Recent concepts in nonalcoholic fatty liver disease*. Diabetic medicine, 2005. **22**(9): p. 1129-1133.
45. Sozio, M.S., S. Liangpunsakul, and D. Crabb, *The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis*. Semin Liver Dis, 2010. **30**(4): p. 378-90.

46. Anderson, R.M., et al., *Dynamic regulation of PGC-1alpha localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response*. Aging Cell, 2008. **7**(1): p. 101-11.
47. Méndez-Sánchez, N., et al., *Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease*. Liver International, 2007. **27**(4): p. 423-433.
48. Musso, G., R. Gambino, and M. Cassader, *Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Progress in Lipid Research, 2009. **48**(1): p. 1-26.
49. Fan, C.Y., et al., *Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(25): p. 15639.
50. Beinert, H., et al., *The reconstruction of the fatty acid oxidizing system of animal tissues*. Journal of the American Chemical Society, 1953. **75**(16): p. 4111-4112.
51. Gulsen, M., et al., *Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(9): p. 1448-1455.
52. Roblin, X., J. Pofelski, and J.P. Zarski, *Rôle de l'homocystéine au cours de la stéatose hépatique et de l'hépatite chronique C*. Gastroentérologie clinique et biologique, 2007. **31**(4): p. 415-420.
53. VanAerts, L.A., et al., *Development of methionine synthase, cystathionine-beta-synthase and S-adenosyl-homocysteine hydrolase during gestation in rats*. J Reprod Fertil, 1995. **103**(2): p. 227-32.
54. Martinez-Chantar, M.L., et al., *Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A*. FASEB J, 2002. **16**(10): p. 1292-4.
55. Schwahn, B.C., et al., *Homocysteine-betaine interactions in a murine model of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency*. FASEB J, 2003. **17**(3): p. 512-4.
56. Wilcken, D. and B. Wilcken, *The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment*. Journal of inherited metabolic disease, 1997. **20**(2): p. 295-300.
57. Clarke, R., et al., *Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37 485 individuals*. Arch Intern Med, 2010. **170**(18): p. 1622-31.
58. Boushey, C.J., et al., *A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease*. JAMA: the journal of the American Medical Association, 1995. **274**(13): p. 1049-1057.
59. Malinowska, A. and A. Chmurzynska, *Polymorphism of genes encoding homocysteine metabolism-related enzymes and risk for cardiovascular disease*. Nutrition Research, 2009. **29**(10): p. 685-695.
60. Handy, D.E., R. Castro, and J. Loscalzo, *Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease*. Circulation, 2011. **123**(19): p. 2145.
61. Werstuck, G.H., et al., *Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways*. Journal of Clinical Investigation, 2001. **107**(10): p. 1263-1292.
62. Namekata, K., et al., *Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 52961-9.
63. Mikael, L.G., et al., *Hyperhomocysteinemia is associated with hypertriglyceridemia in mice with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency*. Molecular genetics and metabolism, 2009. **98**(1-2): p. 187-194.
64. Devlin, A.M. and S.R. Lentz, *ApoA-I: a missing link between homocysteine and lipid metabolism?* Circ Res, 2006. **98**(4): p. 431-3.
65. Mikael, L.G., J. Genest, and R. Rozen, *Elevated homocysteine reduces apolipoprotein AI expression in hyperhomocysteinemic mice and in males with coronary artery disease*. Circulation research, 2006. **98**(4): p. 564-571.

66. GUÉANT RODRIGUEZ, R.M., et al., *Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007. **5**(6): p. 1209-1216.
67. Langman, L.J. and D.E.C. Cole, *Homocysteine: cholesterol of the 90s?* Clinica chimica acta, 1999. **286**(1-2): p. 63-80.
68. Engman, M., *Homocysteinemia: new information about an old risk factor for vascular disease*. Journal of insurance medicine (New York, NY), 1998. **30**(4): p. 231.
69. Fanapour, P.C., B. Yug, and M.S. Kochar, *Hyperhomocysteinemia: an additional cardiovascular risk factor*. WMJ: official publication of the State Medical Society of Wisconsin, 1999. **98**(8): p. 51.
70. Moreno-Garcia, M., *Hypertrophie myocardique, risque vasculaire et métabolisme des monocarbones. Conséquences métaboliques et moléculaires dans un modèle de raton carencé en donneurs de méthyles, et chez le sujet âgé*. 2011: p. 155.
71. Schmidt, O., N. Pfanner, and C. Meisinger, *Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010. **11**(9): p. 655-667.
72. Correia, S.C., et al., *Mitochondria: The missing link between preconditioning and neuroprotection*. Journal of Alzheimer's Disease, 2010. **20**: p. 475-485.
73. Lanza, I.R. and K.S. Nair, *Mitochondrial function as a determinant of life span*. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 2010. **459**(2): p. 277-289.
74. Houten, S.M. and R.J.A. Wanders, *A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid -oxidation*. Journal of inherited metabolic disease, 2010. **33**(5): p. 469-477.
75. Chance, B. and G. Williams, *The respiratory chain and oxidative phosphorylation*. Advances in enzymology and related areas of molecular biology, 1956: p. 65-134.
76. Carroll, J., et al., *Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(52): p. 50311.
77. Chinta, S.J. and J.K. Andersen, *Nitrosylation and nitration of mitochondrial complex I in Parkinson's disease*. Free Radical Research, 2011(0): p. 1-6.
78. Miyadera, H., et al., *Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase)*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(2): p. 473.
79. Cecchini, G., *Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain**. Annual review of biochemistry, 2003. **72**(1): p. 77-109.
80. Vazquez-Acevedo, M., et al., *Subunit structures of purified beef mitochondrial cytochrome bc 1 complex from liver and heart*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 1993. **25**(4): p. 401-410.
81. Crofts, A.R., *The cytochrome bc 1 complex: function in the context of structure*. Annu. Rev. Physiol., 2004. **66**: p. 689-733.
82. Bénit, P., S. Lebon, and P. Rustin, *Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2009. **1793**(1): p. 181-185.
83. Ludwig, B., et al., *Cytochrome c oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation*. ChemBiochem, 2001. **2**(6): p. 392-403.
84. Zheng, J. and V.D. Ramirez, *Inhibition of mitochondrial proton FOF1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals*. British journal of pharmacology, 2000. **130**(5): p. 1115-1123.
85. Roy, A., et al., *Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3, 3'-diindolylmethane through inhibition of FOF1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite Leishmania donovani*. Molecular pharmacology, 2008. **74**(5): p. 1292.
86. Liu, H.Y., et al., *Mitochondrial targeting of human NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2 (NDUFV2) and its association with early-onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy*. Journal of biomedical science, 2011. **18**(1): p. 29.
87. Hoefs, S.J.G., et al., *NDUFA10 mutations cause complex I deficiency in a patient with Leigh disease*. European Journal of Human Genetics, 2010.

88. Faried, L. and A. Faried, *HSPD1 (heat shock 60kDa protein 1)*. 2007.
89. Quintana, F.J. and I.R. Cohen, *The HSP60 immune system network*. Trends in immunology, 2010.
90. Knoop, F., *Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper*, 1904, Freiburg i. Br.
91. Scriver, C.R., et al., *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 4 Volume Set*. 2000: McGraw-Hill Professional Publishing.
92. Kompore, M. and W.B. Rizzo. *Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders*. 2008. Elsevier.
93. Eaton, S., K. Bartlett, and M. Pourfarzam, *Mammalian mitochondrial beta-oxidation*. Biochemical journal, 1996. **320**(Pt 2): p. 345.
94. Vaz, F.M. and R.J. Wanders, *Carnitine biosynthesis in mammals*. Biochem J, 2002. **361**(Pt 3): p. 417-29.
95. Rebouche, C., *Carnitine function and requirements during the life cycle*. The FASEB Journal, 1992. **6**(15): p. 3379.
96. Steiber, A., J. Kerner, and C.L. Hoppel, *Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective*. Molecular Aspects of Medicine, 2004. **25**(5-6): p. 455-473.
97. Paik, W.K. and S. Kim, *Protein methylation: chemical, enzymological, and biological significance*. Advances in enzymology and related areas of molecular biology, 1975: p. 227-286.
98. MATO, J.M., et al., *S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function*. The FASEB Journal, 2002. **16**(1): p. 15.
99. Hulse, J.D., S.R. Ellis, and L.M. Henderson, *Carnitine biosynthesis. beta-Hydroxylation of trimethyllysine by an alpha-ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase*. J Biol Chem, 1978. **253**(5): p. 1654-9.
100. Arany, Z., et al., *Transcriptional coactivator PGC-1 [alpha] controls the energy state and contractile function of cardiac muscle*. Cell Metabolism, 2005. **1**(4): p. 259-271.
101. Liang, H. and W.F. Ward, *PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism*. Adv Physiol Educ, 2006. **30**(4): p. 145-51.
102. Nicholson, T.B., T. Chen, and S. Richard, *The physiological and pathophysiological role of PRMT1-mediated protein arginine methylation*. Pharmacological Research, 2009. **60**(6): p. 466-474.
103. Alcendor, R.R., et al., *Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart*. Circulation research, 2007. **100**(10): p. 1512-1521.
104. Rebouche, C.J. and H. Seim, *Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals*. Annual review of nutrition, 1998. **18**(1): p. 39-61.
105. Strijbis, K., F.M. Vaz, and B. Distel, *Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway*. IUBMB Life, 2010. **62**(5): p. 357-62.
106. Kunau, W.H., V. Dommès, and H. Schulz, *beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress*. Progress in lipid research, 1995. **34**(4): p. 267-342.
107. Bremer, J., *Carnitine--metabolism and functions*. Physiological reviews, 1983. **63**(4): p. 1420.
108. Lahjouji, K., G.A. Mitchell, and I.A. Qureshi, *Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency*. Mol Genet Metab, 2001. **73**(4): p. 287-97.
109. Tein, I., *Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects*. Journal of inherited metabolic disease, 2003. **26**(2): p. 147-169.
110. Tamai, I., et al., *Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(51): p. 40064.
111. Tamai, I., et al., *Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(32): p. 20378.
112. Ohashi, R., et al., *Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2*. Molecular pharmacology, 2001. **59**(2): p. 358.
113. Slitt, A., et al., *Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels*. Drug metabolism and disposition, 2002. **30**(2): p. 212.

114. Duran, J., et al., *OCTN3: A Na⁺ independent L carnitine transporter in enterocytes basolateral membrane*. Journal of cellular physiology, 2005. **202**(3): p. 929-935.
115. Lamhonwah, A.M. and I. Tein, *Novel localization of OCTN1, an organic cation/carnitine transporter, to mammalian mitochondria*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **345**(4): p. 1315-1325.
116. Zammit, V.A., *The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function*. Biochemical journal, 1999. **343**(Pt 3): p. 505.
117. Flanagan, J.L., et al., *Review Role of carnitine in disease*. 2010.
118. Sierra, A.Y., et al., *CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(11): p. 6878.
119. Chmurzyńska, A., *The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism*. Journal of applied genetics, 2006. **47**(1): p. 39-48.
120. Binas, B., et al., *A null mutation in H-FABP only partially inhibits skeletal muscle fatty acid metabolism*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2003. **285**(3): p. E481.
121. Erol, E., et al., *Liver fatty acid binding protein is required for high rates of hepatic fatty acid oxidation but not for the action of PPARalpha in fasting mice*. FASEB J, 2004. **18**(2): p. 347-9.
122. Ghisla, S. and C. Thorpe, *Acyl-CoA dehydrogenases*. European Journal of Biochemistry, 2004. **271**(3): p. 494-508.
123. Zhang, J., F.E. Frerman, and J.J.P. Kim, *Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(44): p. 16212.
124. Rector, R.S., R.M. Payne, and J.A. Ibdah, *Mitochondrial trifunctional protein defects: clinical implications and therapeutic approaches*. Advanced drug delivery reviews, 2008. **60**(13-14): p. 1488-1496.
125. Watmough, N.J. and F.E. Frerman, *The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2010. **1797**(12): p. 1910-1916.
126. Scott, J.D. and R.A. Ludwig, *Azorhizobium caulinodans electron-transferring flavoprotein N electrochemically couples pyruvate dehydrogenase complex activity to N₂ fixation*. Microbiology, 2004. **150**(1): p. 117-126.
127. Wang, F., et al., *Identification of a type III thioesterase reveals the function of an operon crucial for Mtb virulence*. Chemistry & biology, 2007. **14**(5): p. 543-551.
128. Mandel, C.R., B. Tweel, and L. Tong, *Crystal structure of human mitochondrial acyl-CoA thioesterase (ACOT2)*. Biochemical and biophysical research communications, 2009. **385**(4): p. 630-633.
129. Chen, D., et al., *Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction*. Genes & development, 2008. **22**(13): p. 1753.
130. Cederbaum, S.D., et al., *Carnitine membrane transporter deficiency: a long-term follow up and OCTN2 mutation in the first documented case of primary carnitine deficiency*. Molecular genetics and metabolism, 2002. **77**(3): p. 195-201.
131. Stanley, C.A., *Carnitine deficiency disorders in children*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1033**: p. 42-51.
132. Longo, N., C. Amat di San Filippo, and M. Pasquali. *Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle*. 2006. Wiley Online Library.
133. Roe CR, D.J., *Mitochondrial fattyacid disorders, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds). The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease (ed 8). , 2001. New York, NY, McGraw-Hill: p. 2297- 2326.*
134. de Baulny, H.O., et al., *Neonatal hyperammonemia caused by a defect of carnitine-acylcarnitine translocase*. The Journal of pediatrics, 1995. **127**(5): p. 723-728.
135. Sigauke, E., et al., *Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical, and molecular review*. Laboratory investigation, 2003. **83**(11): p. 1543-1554.

136. Deschauer, M., T. Wieser, and S. Zierz, *Muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency: clinical and molecular genetic features and diagnostic aspects*. Archives of neurology, 2005. **62**(1): p. 37.
137. Bonnefont, J.P., et al., *Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects*. Molecular Aspects of Medicine, 2004. **25**(5-6): p. 495-520.
138. Voermans, N.C., et al., *Rhabdomyolysis caused by an inherited metabolic disease: very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. The American journal of medicine, 2006. **119**(2): p. 176-179.
139. Doi, T., et al., *Milder childhood form of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in a 6-year-old Japanese boy*. European journal of pediatrics, 2000. **159**(12): p. 908-911.
140. Hoffman, J.D., et al., *Rhabdomyolysis in the Military-Recognizing Late-Onset Very Long-Chain Acyl Co-A Dehydrogenase Deficiency*. Military medicine, 2006. **171**(7): p. 657-658.
141. Grosse, S.D., et al., *The epidemiology of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: an update*. Genetics in Medicine, 2006. **8**(4): p. 205-212.
142. Wilcken, B., et al., *Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study*. The Lancet, 2007. **369**(9555): p. 37-42.
143. Derks, T.G.J., et al., *The natural history of medium-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency in the Netherlands: clinical presentation and outcome*. The Journal of pediatrics, 2006. **148**(5): p. 665-670. e3.
144. Chace, D.H., et al., *Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry*. Clinical chemistry, 1997. **43**(11): p. 2106-2113.
145. van Maldegem, B.T., et al., *Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity in short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency*. JAMA: the journal of the American Medical Association, 2006. **296**(8): p. 943-952.
146. Bhala, A., et al., *Clinical and biochemical characterization of short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency*. The Journal of pediatrics, 1995. **126**(6): p. 910-915.
147. Amendt, B., et al., *Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. Clinical and biochemical studies in two patients*. Journal of Clinical Investigation, 1987. **79**(5): p. 1303.
148. Dawson, D.B., et al., *Transient organic aciduria and persistent lacticacidemia in a patient with short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency*. The Journal of pediatrics, 1995. **126**(1): p. 69-71.
149. Haack, T.B., et al., *Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency*. Nature genetics, 2010. **42**(12): p. 1131-1134.
150. He, M., et al., *A new genetic disorder in mitochondrial fatty acid β -oxidation: ACAD9 deficiency*. The American Journal of Human Genetics, 2007. **81**(1): p. 87-103.
151. Rakheja, D., M.J. Bennett, and B.B. Rogers, *Long-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a molecular and biochemical review*. Laboratory investigation, 2002. **82**(7): p. 815-824.
152. den Boer, M.E.J., et al., *Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients*. Pediatrics, 2002. **109**(1): p. 99-104.
153. Tyni, T., et al., *Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation in the Human Eye and Brain: Implications for the Retinopathy of Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency*. Pediatric research, 2004. **56**(5): p. 744-750.
154. Rebouche, C.J., *Renal handling of carnitine in experimental vitamin C deficiency*. Metabolism, 1995. **44**(12): p. 1639-43.
155. Jackson, S., et al., *Combined enzyme defect of mitochondrial fatty acid oxidation*. Journal of Clinical Investigation, 1992. **90**(4): p. 1219.
156. Carpenter, K.H. and V. Wiley, *Application of tandem mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening*. Clinica chimica acta, 2002. **322**(1-2): p. 1-10.
157. Kerner, J. and C. Hoppel, *Fatty acid import into mitochondria*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000. **1486**(1): p. 1-17.

158. Wu, Z. and O. Boss, *Targeting PGC-1 α to control energy homeostasis*. 2007.
159. Lehman, J.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis*. Journal of Clinical Investigation, 2000. **106**(7): p. 847-906.
160. Finck, B.N. and D.P. Kelly, *PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease*. Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(3): p. 615.
161. Rodgers, J.T., et al., *Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways*. FEBS Lett, 2008. **582**(1): p. 46-53.
162. Liang, H. and W.F. Ward, *PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism*. Advances in physiology education, 2006. **30**(4): p. 145-151.
163. Huss, J.M., et al., *Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(20): p. 9079-91.
164. Leone, T.C., et al., *PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis*. PLoS biology, 2005. **3**(4): p. e101.
165. Knutti, D. and A. Kralli, *PGC-1, a versatile coactivator*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2001. **12**(8): p. 360-365.
166. Reddy, J.K. and T. Hashimoto, *Peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor α : an adaptive metabolic system*. Annual review of nutrition, 2001. **21**(1): p. 193-230.
167. Abranches, M.V., F.C.E. de Oliveira, and J. Bressan, *Peroxisome proliferator-activated receptor: effects on nutritional homeostasis, obesity and diabetes mellitus Receptores activados por los proliferadores de peroxisomas: implicaciones sobre la homeostasis nutricional, en la obesidad y en la diabetes mellitus*. Nutr. Hosp, 2011. **26**(2).
168. Fanen-PCEM2, P., *Rôle des PPARs dans la régulation du métabolisme des lipides et des glucides*. Biochimie, 2005.
169. Khan, S.A. and J.P. Vanden Heuvel, *Reviews: current topics role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review)*. The Journal of nutritional biochemistry, 2003. **14**(10): p. 554-567.
170. Madrazo, J.A. and D.P. Kelly, *The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2008. **44**(6): p. 968-975.
171. Hihi, A., L. Michalik, and W. Wahli, *PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives*. Cellular and molecular life sciences, 2002. **59**(5): p. 790-798.
172. Sugii, S. and R.M. Evans, *Epigenetic Codes of PPAR [gamma] in Metabolic Disease*. FEBS letters, 2011.
173. Hertz, R., et al., *Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 α* . Nature, 1998. **392**(6675): p. 512-516.
174. GONZALEZ, F.J., *Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 α -mediated transcription*. Drug metabolism and pharmacokinetics, 2008. **23**(1): p. 2-7.
175. Ryffel, G., *Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 families: functional and pathological consequences*. Journal of molecular endocrinology, 2001. **27**(1): p. 11-29.
176. Rufibach, L.E., et al., *Transcriptional regulation of the human hepatic lipase (LIPC) gene promoter*. Journal of lipid research, 2006. **47**(7): p. 1463-1477.
177. Jitrapakdee, S., *Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2011.
178. Katzenellenbogen, B.S., *Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways*. Biol Reprod, 1996. **54**(2): p. 287-93.
179. Welboren, W.J., et al., *Genomic actions of estrogen receptor α : what are the targets and how are they regulated?* Endocrine-related cancer, 2009. **16**(4): p. 1073-1089.

180. Chen, J.Q., T.R. Brown, and J. Russo, *Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2009. **1793**(7): p. 1128-1143.
181. Cooke, P.S., et al., *The role of estrogen and estrogen receptor-[alpha] in male adipose tissue*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001. **178**(1-2): p. 147-154.
182. Pallottini, V., et al., *Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms*. *Infect Disord Drug Targets*, 2008. **8**(1): p. 52-60.
183. Alaynick, W.A., et al., *ERR [gamma] directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart*. *Cell Metabolism*, 2007. **6**(1): p. 13-24.
184. Villena, J.A. and A. Kralli, *ERR [alpha]: a metabolic function for the oldest orphan*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2008. **19**(8): p. 269-276.
185. Alaynick, W.A., *Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism*. *Mitochondrion*, 2008. **8**(4): p. 329-337.
186. Corydon, T.J., et al., *Down-regulation of Hsp60 expression by RNAi impairs folding of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase wild-type and disease-associated proteins*. *Molecular genetics and metabolism*, 2005. **85**(4): p. 260-270.
187. Ibdah, J.A., et al., *Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death*. *Journal of Clinical Investigation*, 2001. **107**(11): p. 1403-1450.
188. Sugden, M.C., P.W. Caton, and M.J. Holness, *PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC*. *Journal of Endocrinology*, 2010. **204**(2): p. 93-104.
189. Khan, S.N. and A.U. Khan, *Role of histone acetylation in cell physiology and diseases: An update*. *Clinica Chimica Acta*, 2010. **411**(19-20): p. 1401-1411.
190. Lee, Y.H. and M.R. Stallcup, *Minireview: protein arginine methylation of nonhistone proteins in transcriptional regulation*. *Mol Endocrinol*, 2009. **23**(4): p. 425-33.
191. Paik, W.K. and S. Kim, *Protein Methylase I PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE ENZYME*. *Journal of Biological Chemistry*, 1968. **243**(9): p. 2108-2114.
192. Paik, W.K. and S. Kim, *Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1967. **29**(1): p. 14-20.
193. Bossenmeyer-Pourié, C., et al., *Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat*. *The American journal of pathology*, 2010. **176**(1): p. 270.
194. Bedford, M.T. and S.G. Clarke, *Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why*. *Molecular cell*, 2009. **33**(1): p. 1-13.
195. Jakubowski, H., et al., *Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice*. *The FASEB Journal*, 2009. **23**(6): p. 1721-1727.
196. Di Lorenzo, A. and M.T. Bedford, *Histone arginine methylation*. *FEBS letters*, 2010.
197. Devi, S., et al., *Effect of long-term hyperhomocysteinemia on myocardial structure and function in hypertensive rats*. *Cardiovasc Pathol*, 2006. **15**(2): p. 75-82.
198. Forges, T., et al., *Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health*. *Human reproduction update*, 2007. **13**(3): p. 225.
199. Gianni, R., et al., *The Methyl Transferase PRMT1 Functions as Co-Activator of FXR/RXR and Regulates Transcription of FXR Responsive Genes*. *Molecular pharmacology*, 2005.
200. Berthet, C., et al., *Interaction of PRMT1 with BTG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects*. *Genes to Cells*, 2002. **7**(1): p. 29-39.
201. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1074.
202. Teyssier, C., et al., *Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation*. *Genes Dev*, 2005. **19**(12): p. 1466-73.
203. Meng, C., et al., *Alterations of mitochondrial enzymes contribute to cardiac hypertrophy before hypertension development in spontaneously hypertensive rats*. *Journal of proteome research*, 2009. **8**(5): p. 2463-2475.

204. Thireos, G., M.D. Penn, and H. Greer, *5'untranslated sequences are required for the translational control of a yeast regulatory gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984. **81**(16): p. 5096.
205. Dominy Jr, J.E., et al., *Nutrient-dependent regulation of PGC-1 [alpha]'s acetylation state and metabolic function through the enzymatic activities of Sirt1/GCN5*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics, 2010. **1804**(8): p. 1676-1683.
206. Menzies, K.J. and D.A. Hood, *The role of SirT1 in muscle mitochondrial turnover*. Mitochondrion, 2011.
207. Frye, R.A., *Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity*. Biochemical and biophysical research communications, 1999. **260**(1): p. 273-279.
208. Michan, S. and D. Sinclair, *Sirtuins in mammals: insights into their biological function*. The Biochemical journal, 2007. **404**(1): p. 1.
209. Ghosh, H.S., M. McBurney, and P.D. Robbins, *SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9199.
210. Nemoto, S., M.M. Fergusson, and T. Finkel, *Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway*. Science's STKE, 2004. **306**(5704): p. 2105.
211. Civitarese, A.E., et al., *Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans*. PLoS medicine, 2007. **4**(3): p. e76.
212. Rodgers, J.T., et al., *Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1*. Nature, 2005. **434**(7029): p. 113-118.
213. Gerhart-Hines, Z., et al., *Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α* . The EMBO Journal, 2007. **26**(7): p. 1913-1923.
214. Landry, J., J.T. Slama, and R. Sternglanz, *Role of NAD⁺ in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins*. Biochemical and biophysical research communications, 2000. **278**(3): p. 685-690.
215. BEDALOV, A., *METHODS FOR INHIBITING DEACETYLASE ACTIVITY*, 2003, WO Patent WO/2003/046,207.
216. Lin, S.J., et al., *Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH*. Genes & development, 2004. **18**(1): p. 12-16.
217. Cohen, D.E., et al., *Neuronal SIRT1 regulates endocrine and behavioral responses to calorie restriction*. Genes & development, 2009. **23**(24): p. 2812-2817.
218. Dvir-Ginzberg, M., et al., *Regulation of cartilage-specific gene expression in human chondrocytes by Sirt1 and nicotinamide phosphoribosyltransferase*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(52): p. 36300-36310.
219. Teyssier, C., et al., *Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 α by arginine methylation*. Genes & development, 2005. **19**(12): p. 1466.
220. Jenning, E.H., K. Schoonjans, and J. Auwerx, *Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility*. Oncogene, 2010. **29**(33): p. 4617-4624.
221. Purushotham, A., et al., *Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation*. Cell Metabolism, 2009. **9**(4): p. 327-338.
222. Gerhart-Hines, Z., et al., *Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α* . EMBO J, 2007. **26**(7): p. 1913-23.
223. Lagouge, M., et al., *Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 [alpha]*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1109-1122.
224. Sundaresan, N.R., V.B. Pillai, and M.P. Gupta, *Emerging roles of SIRT1 deacetylase in regulating cardiomyocyte survival and hypertrophy*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2011.
225. Milne, J.C., et al., *Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes*. Nature, 2007. **450**(7170): p. 712-716.

226. Iwabu, M., et al., *Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 [agr] and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1*. *Nature*, 2010. **464**(7293): p. 1313-1319.
227. Alcendor, R.R., et al., *Silent information regulator 2 α , a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes*. *Circulation research*, 2004. **95**(10): p. 971-980.
228. Vahtola, E., et al., *Forkhead class O transcription factor 3a activation and Sirtuin1 overexpression in the hypertrophied myocardium of the diabetic Goto-Kakizaki rat*. *Journal of hypertension*, 2008. **26**(2): p. 334.
229. Li, L., et al., *Sirt1 hyperexpression in SHR heart related to left ventricular hypertrophy*. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 2009. **87**(1): p. 56-62.
230. Hsu, C.P., et al., *Silent Information Regulator 1 Protects the Heart From Ischemia/ReperfusionClinical Perspective*. *Circulation*, 2010. **122**(21): p. 2170-2182.
231. Liu, Y.Y., et al., *A mutant thyroid hormone receptor α antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor α signaling in vivo and impairs fatty acid oxidation*. *Endocrinology*, 2007. **148**(3): p. 1206.
232. Schachtrup, C., et al., *Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins*. *Biochemical journal*, 2004. **382**(Pt 1): p. 239.
233. Cohen, H.Y., et al., *Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase*. *Science's STKE*, 2004. **305**(5682): p. 390.
234. Rinaudo, P., *Fetal Programming and Metabolic Syndrome*. *Annual Review of Physiology*, 2012. **74**(1).
235. Yajnik, C., et al., *Vitamin B 12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study*. *Diabetologia*, 2008. **51**(1): p. 29-38.
236. Stewart, C.P., et al., *Low Maternal Vitamin B-12 Status Is Associated with Offspring Insulin Resistance Regardless of Antenatal Micronutrient Supplementation in Rural Nepal*. *The Journal of nutrition*, 2011. **141**(10): p. 1912-1917.
237. Frelut, M.L., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C> T polymorphism: A link between birth weight and insulin resistance in obese adolescents*. *International Journal of Pediatric Obesity*, 2011. **6**(2-2): p. e312-e317.
238. Haigis, M.C. and L.P. Guarente, *Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction*. *Genes & development*, 2006. **20**(21): p. 2913-2921.
239. Aoyama, T., et al., *Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(10): p. 5678-5684.
240. Lopez-Lluch, G., et al., *Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(6): p. 1768-1773.
241. Sassone-Corsi, P., *Minireview: NAD⁺, a Circadian Metabolite with an Epigenetic Twist*. *Endocrinology*, 2012. **153**(1): p. 1-5.
242. Wakeling, L.A., L.J. Ions, and D. Ford, *Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions?* *Age*, 2009. **31**(4): p. 327-341.
243. Boden, G., *Obesity and free fatty acids*. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, 2008. **37**(3): p. 635-646.
244. Vega, R.B., J.M. Huss, and D.P. Kelly, *The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes*. *Molecular and cellular biology*, 2000. **20**(5): p. 1868-1876.
245. Lin, J., C. Handschin, and B.M. Spiegelman, *Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators*. *Cell Metabolism*, 2005. **1**(6): p. 361-370.

246. McGill, J.K. and M.F. Beal, *PGC-1 α , a New Therapeutic Target in Huntington's Disease?* Cell, 2006. **127**(3): p. 465-468.
247. Sandri, M., et al., *PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(44): p. 16260.
248. Burgess, S.C., et al., *Diminished hepatic gluconeogenesis via defects in tricarboxylic acid cycle flux in peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)-deficient mice.* Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(28): p. 19000-19008.
249. Yoon, J.C., et al., *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1.* Nature, 2001. **413**(6852): p. 131-138.
250. Liang, Y.C., et al., *Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ by flavonoids in mouse macrophages.* FEBS letters, 2001. **496**(1): p. 12-18.
251. Gallardo, N., et al., *Tissue-specific effects of central leptin on the expression of genes involved in lipid metabolism in liver and white adipose tissue.* Endocrinology, 2007. **148**(12): p. 5604-5610.
252. Qiu, L., et al., *Aldose reductase regulates hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α phosphorylation and activity to impact lipid homeostasis.* Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(25): p. 17175-17183.
253. Artwohl, M., et al., *R-(+)- α -lipoic acid inhibits endothelial cell apoptosis and proliferation: involvement of Akt and retinoblastoma protein/E2F-1.* American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2007. **293**(3): p. E681-E689.
254. Stavinoha, M.A., et al., *Diurnal variations in the responsiveness of cardiac and skeletal muscle to fatty acids.* American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2004. **287**(5): p. E878-E887.
255. Kawabe, K., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor [α] and its response element are required but not sufficient for transcriptional activation of the mouse heart-type fatty acid binding protein gene.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005. **37**(7): p. 1534-1546.
256. Clarke, R., et al., *Homocysteine and vascular disease: review of published results of the homocysteine-lowering trials.* Journal of inherited metabolic disease, 2011: p. 1-9.
257. Galan, P., et al., *Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomised placebo controlled trial.* BMJ: British Medical Journal, 2010. **341**.
258. Herrmann, W., et al., *Homocysteine, brain natriuretic peptide and chronic heart failure: a critical review.* Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(12): p. 1633-44.
259. Andresen, B.S., et al., *Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Mutations Identified by MS/MS-Based Prospective Screening of Newborns Differ from Those Observed in Patients with Clinical Symptoms: Identification and Characterization of a New, Prevalent Mutation That Results in Mild MCAD Deficiency**. The American Journal of Human Genetics, 2001. **68**(6): p. 1408-1418.
260. Gempel, K., et al., *Screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency by tandem mass spectrometry.* Journal of inherited metabolic disease, 2002. **25**(1): p. 17-27.
261. Fingerhut, R., et al., *Hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency: acylcarnitine profiles in blood spots are highly specific.* Clinical chemistry, 2001. **47**(10): p. 1763.
262. Cho, S.E., et al., *The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene mutation is associated with hyperhomocysteinemia, cardiovascular disease and plasma B-type natriuretic peptide levels in Korea.* Clin Chem Lab Med, 2006. **44**(9): p. 1070-5.
263. Vockley, J. and D.A.H. Whiteman, *Defects of mitochondrial β -oxidation: a growing group of disorders.* Neuromuscular Disorders, 2002. **12**(3): p. 235-246.
264. De Bie, I., S.D.P. Nizard, and G.A. Mitchell, *Fetal dilated cardiomyopathy: an unsuspected presentation of methylmalonic aciduria and hyperhomocystinuria, cblC type.* Prenatal diagnosis, 2009. **29**(3): p. 266-270.

265. Ventura-Clapier, R., A. Garnier, and V. Veksler, *Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α* . Cardiovascular research, 2008. **79**(2): p. 208.
266. Tarry-Adkins, J.L., et al., *Poor maternal nutrition leads to alterations in oxidative stress, antioxidant defense capacity, and markers of fibrosis in rat islets: potential underlying mechanisms for development of the diabetic phenotype in later life*. FASEB J, 2010. **24**(8): p. 2762-71.
267. Burdge, G.C., et al., *Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition*. J Nutr, 2009. **139**(6): p. 1054-60.
268. Desai, N. and S.E. Fremes, *Intraoperative indocyanine green angiography: ready for prime time? J Thorac Cardiovasc Surg 2007;133:592-3*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007. **133**(5): p. 1396-7.
269. Tarry-Adkins, J.L., et al., *Poor maternal nutrition leads to alterations in oxidative stress, antioxidant defense capacity, and markers of fibrosis in rat islets: potential underlying mechanisms for development of the diabetic phenotype in later life*. The FASEB Journal, 2010. **24**(8): p. 2762-2771.
270. Blaise, S.A., et al., *Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats*. The American journal of pathology, 2007. **170**(2): p. 667.
271. Holness, M.J., P.W. Caton, and M.C. Sugden, *Acute and long-term nutrient-led modifications of gene expression: Potential role of SIRT1 as a central co-ordinator of short and longer-term programming of tissue function*. Nutrition, 2010. **26**(5): p. 491-501.
272. Folmes, C.D.L. and G.D. Lopaschuk, *Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity*. Cardiovascular research, 2007. **73**(2): p. 278.
273. Bénit, P., et al., *Mutant NDUFB2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy*. Human Mutation, 2003. **21**(6): p. 582-586.
274. Lamounier-Zepter, V., et al., *Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Suppresses Cardiomyocyte Contraction*. Circulation research, 2009. **105**(4): p. 326-334.
275. Chen, J.H., et al., *Maternal protein restriction affects postnatal growth and the expression of key proteins involved in lifespan regulation in mice*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4950.
276. Chang, Y.I., et al., *Protein-arginine methyltransferase 1 suppresses megakaryocytic differentiation via modulation of the p38 MAPK pathway in K562 cells*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(27): p. 20595.
277. Stavinoha, M.A., et al., *Evidence for mitochondrial thioesterase 1 as a peroxisome proliferator-activated receptor- α -regulated gene in cardiac and skeletal muscle*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2004. **287**(5): p. E888-E895.
278. Huss, J.M., et al., *The nuclear receptor ERR α is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload*. Cell Metab, 2007. **6**(1): p. 25-37.
279. Yideng, J., et al., *Homocysteine-mediated PPAR α , γ DNA methylation and its potential pathogenic mechanism in monocytes*. DNA and cell biology, 2008. **27**(3): p. 143-150.
280. Carpenter, K.H. and V. Wiley, *Application of tandem mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening*. Clin Chim Acta, 2002. **322**(1-2): p. 1-10.
281. Herrmann, M., et al., *Plasma B vitamins and their relation to the severity of chronic heart failure*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(1): p. 117-23.
282. Amat di San Filippo, C., et al., *Cardiomyopathy and carnitine deficiency*. Molecular genetics and metabolism, 2008. **94**(2): p. 162-166.
283. Omland, T., et al., *Prognostic value of B-type natriuretic peptides in patients with stable coronary artery disease: the PEACE Trial*. Journal of the American College of Cardiology, 2007. **50**(3): p. 205-214.
284. Nygård, O., et al., *Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease*. New England Journal of Medicine, 1997. **337**(4): p. 230-237.

285. Bønaa, K.H., et al., *Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction*. New England Journal of Medicine, 2006. **354**(15): p. 1578-1588.
286. Lonn, E., et al., *Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease*. N Engl J Med, 2006. **354**(15): p. 1567-77.
287. Chen, Z., et al., *Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition*. Human molecular genetics, 2001. **10**(5): p. 433-443.
288. Mato, J.M., M.L. Martínez-Chantar, and S.C. Lu, *Methionine metabolism and liver disease*. Annu. Rev. Nutr., 2008. **28**: p. 273-293.
289. Alberto, J.M., et al., *Mice deficient in cystathionine beta synthase display altered homocysteine remethylation pathway*. Mol Genet Metab, 2007. **91**(4): p. 396-8.
290. Zhang, D., et al., *Hyperhomocysteinemia Promotes Inflammatory Monocyte Generation and Accelerates Atherosclerosis in Transgenic Cystathionine {beta}-Synthase-Deficient Mice*. Circulation, 2009. **120**(19): p. 1893.
291. Csak, T., et al., *Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells*. Hepatology, 2011. **54**(1): p. 133-44.
292. Robert, K., et al., *Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver*. Gastroenterology, 2005. **128**(5): p. 1405-15.
293. Flamment, M., et al., *Endoplasmic reticulum stress: a new actor in the development of hepatic steatosis*. Curr Opin Lipidol, 2010. **21**(3): p. 239-46.
294. Neels, J.G. and J.M. Olefsky, *Cell signaling. A new way to burn fat*. Science, 2006. **312**(5781): p. 1756-8.
295. Reddy, J.K. and M.S. Rao, *Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(5): p. G852-8.
296. Kao, H.J., et al., *ENU mutagenesis identifies mice with cardiac fibrosis and hepatic steatosis caused by a mutation in the mitochondrial trifunctional protein beta-subunit*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(24): p. 3569-77.
297. Ruderman, N.B., et al., *AMPK and SIRT1: a long-standing partnership?* American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2010. **298**(4): p. E751-E760.
298. Perez-Carreras, M., et al., *Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2003. **38**(4): p. 999-1007.
299. Eder, K. and R. Ringseis, *The role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional regulation of novel organic cation transporters*. Eur J Pharmacol. **628**(1-3): p. 1-5.
300. Makowski, L., et al., *Metabolic profiling of PPARalpha-/- mice reveals defects in carnitine and amino acid homeostasis that are partially reversed by oral carnitine supplementation*. Faseb J, 2009. **23**(2): p. 586-604.
301. Bowyer, B.A., et al., *L-carnitine therapy in home parenteral nutrition patients with abnormal liver tests and low plasma carnitine concentrations*. Gastroenterology, 1988. **94**(2): p. 434-8.
302. van der Leij, F.R., et al., *Gene expression profiling in livers of mice after acute inhibition of beta-oxidation*. Genomics, 2007. **90**(6): p. 680-9.
303. Ip, E., et al., *Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice*. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1286-96.
304. Kashireddy, P.V. and M.S. Rao, *Lack of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis*. Hepatol Res, 2004. **30**(2): p. 104-110.
305. Rinaudo, P. and E. Wang, *Fetal programming and metabolic syndrome*. Annu Rev Physiol. **74**: p. 107-30.
306. Yajnik, C.S., et al., *Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study*. Diabetologia, 2008. **51**(1): p. 29-38.

307. Stewart, C.P., et al., *Low maternal vitamin B-12 status is associated with offspring insulin resistance regardless of antenatal micronutrient supplementation in rural Nepal*. J Nutr. **141**(10): p. 1912-7.
308. Frelut, M.L., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->T polymorphism: a link between birth weight and insulin resistance in obese adolescents*. Int J Pediatr Obes. **6**(2-2): p. e312-7.
309. McDermott, M.M., et al., *Elevated levels of inflammation, d-dimer, and homocysteine are associated with adverse calf muscle characteristics and reduced calf strength in peripheral arterial disease*. Journal of the American College of Cardiology, 2007. **50**(9): p. 897-905.
310. Vidula, H., et al., *Biomarkers of inflammation and thrombosis as predictors of near-term mortality in patients with peripheral arterial disease: a cohort study*. Annals of internal medicine, 2008. **148**(2): p. 85-93.
311. Senti, M., et al., *Lipoprotein profile in men with peripheral vascular disease. Role of intermediate density lipoproteins and apoprotein E phenotypes*. Circulation, 1992. **85**(1): p. 30-36.
312. Ridker, P.M., M.J. Stampfer, and N. Rifai, *Novel risk factors for systemic atherosclerosis*. JAMA: the journal of the American Medical Association, 2001. **285**(19): p. 2481.
313. Wald, D.S., M. Law, and J. Morris, *Serum homocysteine and the severity of coronary artery disease*. Thromb Res, 2003. **111**(1): p. 55-57.
314. Undas, A., J. Brozek, and A. Szczeklik, *Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence*. Thrombosis and haemostasis, 2005. **94**(5): p. 907.
315. Lentz, S., *Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2005. **3**(8): p. 1646-1654.
316. Khandanpour, N., et al., *Homocysteine and peripheral arterial disease: systematic review and meta-analysis*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2009. **38**(3): p. 316-322.
317. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-275.
318. Henry, R., et al., *Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase*. American journal of clinical pathology, 1960. **34**: p. 381.
319. Bergmeyer, H., P. Scheibe, and A. Wahlefeld, *Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase*. Clinical chemistry, 1978. **24**(1): p. 58.
320. Gueant, J.L., et al., *Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C->G variant in the transcobalamin gene (TCN2)*. J Med Genet, 2007. **44**(6): p. 363-7.

Matériels et Méthodes

1. Modèle animal

Les animaux ont été traités selon les recommandations décrites dans le « Guide for care and use of laboratory animals » (NIH, MD, 1985). Les rats adultes (Wistar Han IGS, Charles River, Saint germain sur l'Arbresle, France) sont maintenus en conditions standard d'élevage, avec un cycle d'alternance jour/nuit de 12 h, température ambiante ($23^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$), et la mise à disposition d'eau et de nourriture à volonté. Tous les animaux de laboratoire ont été gardés selon les exigences du Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale.

1.1. Régime alimentaire

Un mois avant la mise en accouplement, les rates ont été alimentées soit avec un régime standard type A04/A03⁽¹⁾ (Rats souris élevage, SAFE, Augy, France) soit avec régime carencé en vitamines B12, folates et choline⁽²⁾ (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). Les rats males ont été alimentés avec le régime standard avant l'accouplement. La carence en donneurs de méthyle se poursuit pendant toute la gestation (21 jours). Dans les 24 heures après la parturition, la portée a été réduite à dix individus pour la standardisation de l'étude. Pour les animaux concernés, la carence a été maintenue jusqu'au moment du sevrage (21 jours postnataux) au travers de l'allaitement maternel ; au-delà, une alimentation standard a été donnée aux animaux.

1.1.1. Contenu et specification du régime

(1)BASIC DIET INFORMATION: Code: 829452

Name: CONTROL B-VITAMINS (M)

CALCULATED ANALYSIS:							
		FRESH	10% H2O			FRESH	10% H2O
TOTAL	%	100,00	100,00	CL	%	0,37	0,35
MOISTURE	%	4,22	10,00	S CL	%	0,31	0,29
C FAT	%	5,46	5,13	K	%	0,51	0,48
C PROTEIN	%	17,21	16,17	S K	%	0,50	0,47
C FIBRE	%	2,46	2,31	MG	%	0,11	0,10
ASH	%	5,07	4,76	S MG	%	0,00	0,00
NFE	%	64,33	60,45	FE	mg/kg	153,32	144,07
PECTIN	%	0,00	0,00	S FE	mg/kg	111,65	104,91
HEMICELL	%	0,06	0,06	CU	mg/kg	11,08	10,41
CELLULOSE	%	2,88	2,71	S CU	mg/kg	10,00	9,40
LIGNIN	%	0,00	0,00	MN	mg/kg	50,99	47,91
STARCH	%	31,50	29,60	S MN	mg/kg	49,91	46,90
SUGAR	%	31,85	29,93	ZN	mg/kg	42,08	39,54
G ENERGY	MJ/kg	16,39	15,40	S ZN	mg/kg	18,00	16,91
D ENERGY	MJ/kg	15,27	14,35	CO	µg/kg	525,00	493,32
M ENERGY	MJ/kg	13,90	13,06	S CO	µg/kg	525,00	493,32
AF ENERGY	kcal/kg	3752,15	3525,72	I	µg/kg	0,00	0,00
C14 1 MYRI	%	0,01	0,01	S I	µg/kg	0,00	0,00
C16 1 PALM	%	0,03	0,03	SE	µg/kg	0,00	0,00
C18 1W9 OL	%	1,13	1,06	S SE	µg/kg	0,00	0,00
C18 2W6 LI	%	2,66	2,50	F	mg/kg	0,00	0,00
C18 3W3 LI	%	0,37	0,35	VIT A	iu/kg	5000,00	4698,27
C20 4W6 AR	%	0,01	0,01	S VIT A	iu/kg	5000,00	4698,27
C22 5W3 CL	%	0,00	0,00	VIT D3	iu/kg	2200,00	2067,24
C12 LAURIC	%	0,02	0,02	S VIT D3	iu/kg	1000,00	939,65
C14 MYRIST	%	0,03	0,03	VIT E	iu/kg	55,31	51,97
C16 PALMIT	%	0,55	0,52	S VIT E	iu/kg	50,00	46,98
C18 STEARI	%	0,21	0,20	VIT B1 THI	mg/kg	4,13	3,88
ARGININE	%	0,55	0,52	S VIT B1	mg/kg	4,05	3,81
LYSINE	%	1,10	1,03	VIT B2 RIB	mg/kg	0,34	0,32
S LYS	%	0,00	0,00	S VIT B2	mg/kg	0,00	0,00
METHIONINE	%	0,43	0,40	VIT B6 PYR	mg/kg	4,16	3,91
S METH	%	0,00	0,00	S VIT B6	mg/kg	4,08	3,83
CYSTINE	%	0,04	0,04	VIT B12 CY	µg/kg	50,00	46,98
S CYST	%	0,00	0,00	S VIT B12	µg/kg	50,00	46,98
TRYPTOPHAN	%	0,15	0,14	VIT C ASCO	mg/kg	7,00	6,58
S TRYPT	%	0,00	0,00	S VIT C	mg/kg	7,00	6,58
HISTIDINE	%	0,40	0,38	VIT K MENE	mg/kg	5,15	4,84
THREONINE	%	0,60	0,56	S VIT K	mg/kg	5,15	4,84
S THREO	%	0,00	0,00	FOLIC ACID	mg/kg	1,94	1,82
ISOLEUCINE	%	0,88	0,83	S FOLIC	mg/kg	1,90	1,79
LEUCINE	%	1,32	1,24	NICOTINIC	mg/kg	10,08	9,47
PHENYLALAN	%	0,72	0,68	S NICOTIN	mg/kg	9,80	9,21
VALINE	%	1,05	0,99	PANTOTHENI	mg/kg	10,45	9,82
TYROSINE	%	0,72	0,68	S PANTOTH	mg/kg	9,87	9,27
TAURINE	%	0,00	0,00	CHOLINE	mg/kg	1248,50	1173,16
GLYCINE	%	0,69	0,65	S CHOLINE	mg/kg	1027,50	965,49
ASPARTIC A	%	0,98	0,92	INOSITOL	mg/kg	98,00	92,09
GLUTAMIC A	%	2,84	2,67	S INOSITOL	mg/kg	98,00	92,09
PROLINE	%	1,19	1,12	BIOTIN	µg/kg	0,00	0,00
SERINE	%	0,65	0,61	S BIOTIN	µg/kg	0,00	0,00
HYD PROLIN	%	0,00	0,00				

(2) BASIC DIET INFORMATION:

Code: 821086

Name: LOW B VITAMINS (P)

CALCULATED ANALYSIS:		FRESH	10% H2O			FRESH	10% H2O
TOTAL	%	100,00	100,00	GLYCINE	%	0,69	0,65
MOISTURE	%	4,23	10,00	ASPARTIC ACID	%	0,98	0,92
CRUDE OIL	%	5,46	5,13	GLUTAMIC ACID	%	2,84	2,67
CRUDE PROTEIN	%	17,21	16,17	PROLINE	%	1,19	1,12
CRUDE FIBRE	%	2,46	2,31	SERINE	%	0,65	0,61
ASH	%	4,94	4,64	HYD, PROLINE	%	0,00	0,00
NFE	%	64,54	60,65	HYD, LYSINE	%	0,00	0,00
PECTIN	%	0,00	0,00	ALANINE	%	0,56	0,53
HEMICELLULOSE	%	0,06	0,06	Ca	%	0,65	0,61
CELLULOSE	%	2,88	2,71	P TOTAL	%	0,46	0,43
LIGNIN	%	0,00	0,00	P PHYTATE	%	0,00	0,00
STARCH	%	31,72	29,81	P AVAILABLE	%	0,46	0,43
SUGAR	%	31,86	29,94	Na	%	0,22	0,21
GROSS ENERGY	MJ/kg	16,43	15,44	Cl	%	0,27	0,25
SDS DIGESTIBLE ENERGY	MJ/kg	15,31	14,39	K	%	0,53	0,50
SDS METABOLISABLE ENERGY	MJ/kg	13,93	13,09	Mg	%	0,11	0,10
AF ENERGY	MJ/kg	15,72	14,77	Fe	mg/kg	106,08	99,69
C14 1 MYRISTOLEIC	%	0,01	0,01	Cu	mg/kg	11,08	10,41
C16 1 PALMITOLEIC	%	0,09	0,08	Mn	mg/kg	50,99	47,92
C18 1 W9 OLEIC	%	0,98	0,92	Zn	mg/kg	44,08	41,42
C18 2 W6 LINOLEIC	%	1,91	1,79	Co	µg/kg	525,00	493,37
C18 3 W3 LINOLENIC	%	0,33	0,31	I	µg/kg	0,00	0,00
C20 4 W6 ARICHIDONIC	%	0,01	0,01	Se	µg/kg	0,00	0,00
C22 5 W3 CLUPANODONIC	%	0,00	0,00	F	mg/kg	0,00	0,00
C12:0 LAURIC	%	0,10	0,09	VITAMIN A	iu/kg	5000,00	4698,76
C14:0 MYRISTIC	%	0,17	0,16	VITAMIN D3	iu/kg	1000,00	939,75
C16:0 PALMITIC	%	0,32	0,30	VITAMIN E	iu/kg	55,50	52,16
C18:0 STEARIC	%	0,19	0,18	VITAMIN B1 THIAMINE	mg/kg	4,98	4,68
ARGININE	%	0,55	0,52	VITAMIN B2 RIBOFLAVIN	mg/kg	0,34	0,32
LYSINE	%	1,10	1,03	VITAMIN B6 PYRIDOXIN	mg/kg	4,98	4,68
METHIONINE	%	0,43	0,40	VITAMIN B12 CYANOCOBALAMINE	µg/kg	0,00	0,00
CYSTINE	%	0,04	0,04	VITAMIN C ASCORBIC ACID	mg/kg	7,00	6,58
TRYPTOPHAN	%	0,15	0,14	VITAMIN K MENEDIONE	mg/kg	4,80	4,51
HISTIDINE	%	0,40	0,38	FOLIC ACID	mg/kg	0,01	0,01
THREONINE	%	0,60	0,56	NICOTINIC ACID	mg/kg	10,08	9,47
ISOLEUCINE	%	0,88	0,83	PANTOTHENIC ACID	mg/kg	10,45	9,82
LEUCINE	%	1,32	1,24	CHOLINE	mg/kg	0,06	0,06
PHENYLALANINE	%	0,72	0,68	INOSITOL	mg/kg	98,00	92,10
VALINE	%	1,05	0,99	BIOTIN	µg/kg	0,00	0,00

INGREDIENTS:

NAME

RICE STARCH

SUCROSE

CASEIN

SOYA OIL

VITAMINS, MINERALS, AMINO ACID AND TRACE ELEMENTS

CELLULOSE

CHOLINE BITARTRATE

1.2. Prelevement et gestion des échantillons

Les portées ont été sacrifiées avec un excès d'isoflurane à l'âge de 21 jours. Au préalable, un prélèvement sanguin intracardiaque a été réalisé pour l'analyse des concentrations plasmatiques ou sériques. Le sang est recueilli dans des tubes contenant Lithium Heparin pour plasma (Ref 368884) ou tubes contenant Clot Activator pour sérum (Ref 368498), les plasma et sérum ont récupérés en centrifugeant le sang à 4°C pendant 20 minutes à 3000g.

Le foie et le cœur sont ensuite prélevés, rincés dans une solution de PBS 1x (phosphate buffered saline) et soit congelés instantanément dans l'azote liquide, soit congelés dans une solution de méthylbutane maintenue à -30°C. Les organes ainsi préparés sont stockés au froid à -80°C. Une partie de foie a été stocké dans 10% formaldéhyde (pH 7.4) pendant 24h avant d'être inclus dans la paraffine pour l'étude histopathologie.

2. Etude de population**2.1. Sujets****2.1.1. Cohorte du service de cardiologie**

Un total de 358 patients consécutifs ont été recrutés dans un contexte d'une coronarographie diagnostique pour suspicion de maladie coronarienne et / ou de l'insuffisance cardiaque dans de Département de Cardiologie au CHU de Nancy Brabois. L'étude était réalisé conformément aux principes énoncés dans la Déclaration d'Helsinki et a reçu l'approbation du comité d'éthique local. Chaque patient a accepté de participer après avoir donné son consentement éclairé. Un questionnaire a fourni des informations sur les antécédents personnels d'angor, infarctus du myocarde, hypertension (définie par une tension artérielle systolique > 140 mmHg ou prise d'un traitement anti-hypertenseur), diabète, dyslipidémie ; mais aussi sur les antécédents familiaux, et sur la présence du tabagisme actif ou sevré. La

fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) et la maladie coronarienne ont été documentées par angiographie. Les critères d'exclusion étaient l'utilisation de l'acide folique ou supplémentation en vitamine B, les événements récents aigus comme l'infarctus du myocarde ou un angor instable, la myopéricardite virale, l'insuffisance rénale (créatinine > 20 mmol / L), la cachexie, ou l'insuffisance cardiaque congestive aiguë.

2.1.2. Cohorte Oasi

Six cent soixante deux volontaires ambulatoires âgés entre 60 et 85 ans, habitants de deux villages Siciliens ont été invités à participer à l'étude. San Teodoro et Cesaro sont deux villages d'environ 1500 habitants chacun dans le territoire des Monts Nebrodi, en Sicile (1150 m).. L'étude a été menée de porte à porte et un examen clinique et un entretien individuel a été effectué par un médecin, sur les conditions environnementales, socio-économiques et cliniques, l'utilisation de médicaments, les signes et les symptômes des maladies et leurs facteurs de risque [309-316] consentement éclairé par écrit, et le comité local éthique a approuvé le protocole de l'étude (IRCCS de l'arriération mentale et le vieillissement du cerveau, Oasi Maria SS, Troina, Sicile) conformément à la Déclaration d'Helsinki et de bonnes pratiques cliniques.

2.2. Prélèvement et gestion des échantillons.

Tous les participants ont subi un prélèvement d'échantillon de sang veineux à jeun, L'échantillon a été immédiatement centrifugé et conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse.

3. Dosage plasmatiques / sériques et tissulaires

3.1. Métabolisme de l'homocystéine

3.1.1. Folates et vitamine B12

Principe : La vitamine B12 et les folates non marqués entrent en compétition avec leurs homologues marqués (vitamine B12 [^{57}Co] et folates [^{125}I]) vis-à-vis d'un nombre restreint et constant de sites de fixation. Par conséquent, le taux de radioactivité lié est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon. Grâce à cette technique, les taux de vitamine B12 et de folates sont déterminés simultanément dans un seul tube.

Les dosages ont été effectués sur des échantillons de plasma à l'aide du coffret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals).

Préparation des réactifs

- Premier cas : si l'on doit utiliser un flacon de marqueur⁽¹⁾ dans les 30 jours → verser le contenu d'un flacon de DTT⁽²⁾ dans un flacon de marqueur (conserver à 4°C à l'abri de la lumière)
- Deuxième cas : si l'on doit utiliser un flacon de marqueur dans plus de 30 jours → ajouter la même quantité de marqueur et de DTT (100µl de chaque)

Procédure de dosage

- Numéroté 16 tubes pour le courbe étalon. A partir du numéro 17, numéroté 2 tubes supplémentaires pour chaque échantillon
- Ajouter les étalons⁽³⁾(A à F) et les échantillons conformément aux indications données par le tableau suivant :

<i>Tubes</i>	<i>1,2</i>	<i>3,4</i>	<i>5,6</i>	<i>7,8</i>	<i>9,10</i>	<i>11,12</i>	<i>13,14</i>	<i>15,16</i>	<i>échantillons</i>
Etalons ou échantillons (µl)		200A	200A	200B	200C	200D	200E	200F	200

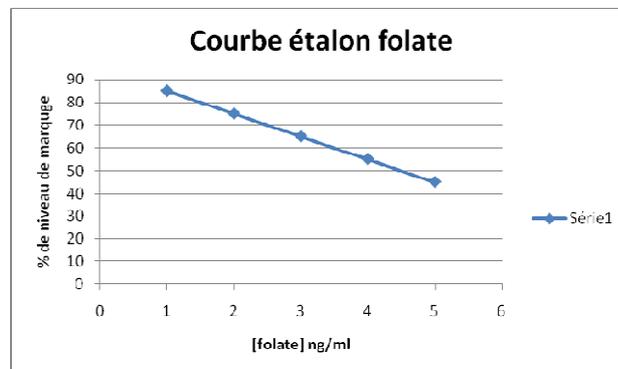
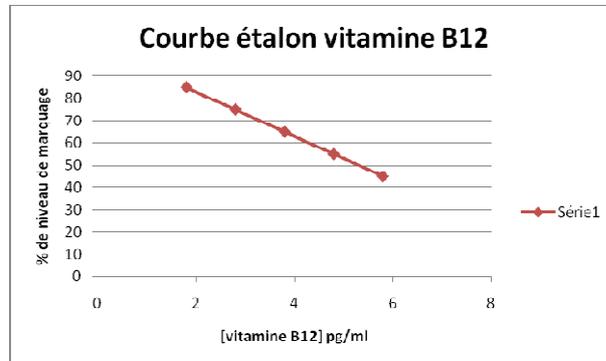
- Ajouter 200µl de solution active de marquage/DTT dans chaque tube y compris les tubes 1 et 2. Agiter les tubes au vortex
- Incuber à T°C ambiante ($\approx 21^\circ\text{C}$) pendant 15 minutes

- Ajouter 100µl de réactif d'extraction⁽⁴⁾ aux tubes 3 à 16 et aux tubes contenant les échantillons. Agiter les tubes au vortex
- Incuber à T°C ambiante pendant 10 minutes
- Bien agiter le flacon de réactif neutre⁽⁵⁾ et ajouter 1ml de ce réactif dans les tubes 3 et 4.
- Bien agiter le flacon de réactif de liaison⁽⁶⁾ et ajouter 1ml de ce réactif dans les tubes de 5 à 16 et dans les tubes contenant les échantillons. Agiter les tubes au vortex.
- Incuber les tubes 3 à 16 et tous les tubes échantillons à T°C pendant 1 heure à partir du dernier ajout de réactif de liaison. Recouvrir les portoir de papier aluminium pour protéger de la lumière
- Centrifuger les tubes 3 à 16 et les échantillons à 1000g pendant 10 minutes (4°C)
- Décanter avec précaution et jeter le surnageant. Retirer la dernière goutte en posant les tubes sur du papier absorbant
- Compter la radioactivité dans les culots des tubes et dans les tubes 1 et 2, l'un après l'autre à l'aide d'un compteur gamma⁽⁷⁾ (le nombre de coups total par minutes pour les tubes 1 et 2 doit se situer entre 10000 et 25000 pour le Cobalt 57 et entre 15000 et 35000 pour l'iode 125, en fonction de l'appareil et de l'âge du marqueur.

Calcul des résultats

- La courbe et les résultats pour la vitamine B₁₂ sont calculés à partir des résultats obtenus par comptage du Cobalt 57 et pour les folates, ils sont calculés à partir des résultats obtenus par comptage de l'Iode 125
- Faire la moyenne des mesures des tubes 3 et 4 (tubes « neutres ») et soustraire cette valeur de toutes les autres mesures pour obtenir des valeurs corrigées
- Faire la moyenne des mesures corrigées des tubes 1 et 2 pour obtenir le nombre de coups total corrigé pour chaque dosage
- Diviser la moyenne des mesures corrigées des tubes 5 et 6 par le nombre de coups total corrigé de façon à obtenir le coefficient de niveau de marquage B₀ (ce coefficient ne doit pas dépasser 36%)
- Diviser les mesures corrigées de chaque tube par la moyenne corrigée des tubes 5 et 6 pour obtenir le pourcentage de niveau de marquage de chaque tube.

- Tracer un courbe étalon : en abscisse la concentration des étalons de vitamine B₁₂ en pg/ml et la concentration des étalons de folates en ng/ml et en ordonnée → le pourcentage de niveau de marquage (B₁₂ ou folates)/B₀



- La concentration de la vitamine B₁₂ ou en folates dans le plasma est déterminée par extrapolation à partir de courbe étalon donnant le pourcentage de niveau de marquage par rapport à la valeur en pM/ml de vitamine B₁₂ ou la valeur en nM/ml de folates.

-
- (1) **Marqueur Vitamine B₁₂/Folates SimulTRAC-SNB** : contient moins de 1,5μCi (55,5kBq) de complexe Cobalt 57/vitamine B₁₂ et moins de 3μCi (111kBq) de complexe Iode 125/folates (conserver à 4°C a l'abri de la lumière)
 - (2) **Solution de Dithiothreitol SimulTRAC-SNB** (conserver à 4 °C)

(3) Etalons A-F de vitamine B₁₂/folates SimulTRAC-SNB : la vitamine B₁₂ et les folates sont dilués dans de la albumine de sérum humain, du chlorure de sodium et des agents stabilisateurs et de conservation.

<i>Étalon</i>	<i>Concentration Vitamine B₁₂</i>		<i>Concentration folates</i>	
	pg/ml	pmol/l	ng/ml	nmol/l
A	0	0	0	0
B	100	74	1	2,3
C	200	148	2	4,5
D	400	296	4	9,1
E	1000	740	10	23
F	2000	1480	20	45

3.1.2. Dosage de l'homocystéine, acide méthylmalonique et acide succinique par LC-MS/MS (COLONNE UPLC HSST3)

Principe : La concentration plasmatique en homocystéine est mesurée par une technique de chromatographie liquide ultra haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en mode MRM positif.

L'homocystéine liée aux protéines est libérée par ajout d'un réducteur. Les protéines sont précipitées au méthanol. Les standards internes deutérés sont ajoutés et quelques µL sont injectés dans l'UPLC. La quantification est faite grâce à une gamme d'étalonnage en plasma et à ajustement inter-échantillon grâce aux standards deutérés ajoutés en concentration connue et constante.

Ce dosage a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire du CHU de Nancy-Brabois

Préparation des réactifs

- Préparation d'aliquots de solutions mères de standards non deutérés et deutérés à 1 mmol/L

	<i>Homocystine</i> (MM 268,4)	<i>Homocystine d8</i> 98%	<i>MMA</i> (118,09 ; >99%)	<i>MMA d3</i> (98%)	<i>Acide succinique</i> (118,09 ; >99%)	<i>Acide succiniqued6</i> (MM 124,13 ; 98%)
Poudre (mg) *	13,27	13,8	11,809	12,356	11,806	12,666
HCl 0,1 N (T° amb, hormones)	50 ml	50 ml				
Vortexer, soniquer						
NaOH 10 N (+ 4°C, hormones)	1 ml	1 ml				
DTT	132,7 mg	132,7 mg				
HCl 0,1 N	Qsp 100 ml					
H2O Milli Q			100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Vortexer, ultrasons (15 min)						
Concentration Sol. mère	1 mM (d'homocystéine)	1 mM (d'homocystéine d4)	1mM	1mM	1mM	1mM
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

Préparation de la gamme d'étalonnage

- diluer S8 au ½ jusque S1 dans le pool de plasma :

<i>Concentration finale (µM)</i>	S8	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1
Homocystéine	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,781
Acide Succinique	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,781
Acide méthyl malonique (MMA)	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156	0,078

- Préparer le mélange de standards internes : 150 µL de **HCYd4** à 1 mmol/L
150 µL d'**ac succinique d6** à 1 mmol/L
10 µL de **MMA d3** à 2 mmol/L

4,5 ml de DTT 200 mmol/L

- Préparation des contrôles d'homocystéine : Plasma Control Level I (n°0072) + II (n°0073) lyophilisé
- Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée HPLC grade, laisser reposer 10 à 15 minutes et agiter jusque dissolution totale. Faire des aliquots de 200 µL à conserver à -20°C
- Préparation de la solution d'extraction Methanol/Ac. Formique 0.1% (v/v)

Préparation des échantillons

- Préparation des extraits protéiques selon la procédure décrite précédemment
- Faire un bain d'ultrasons pour dilution complète, conserver à -80°C
- Décongeler les plasmas, les vortexer et les centrifuger (10 min, 3500 tours par minutes)
- Allumer la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffe)
- Dans un Tube conique à centrifuger de 1,5 mL en polypropylène

	Double blanc	Standards S0	Standards S1 à S8	Contrôles (pool, levels 1 & 2)	Échantillon
volume prélevé	50 µL pool	50 µL pool	50 µL	50 µL	50 µL
Solution de SI	0	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
DTT 200 mM	50 µL	0	0	0	0
Vortexer ATTENDRE 15' à température ambiante					
MeOH + 0,1 %Ac formique	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

NB : Travail possible à partir de 25 µL de plasma. Dans ce cas, diviser tous les volumes par 2

- Vortexer et incuber 30 min à +4°C
- Vortexer et centrifuger à 16000 tours par minutes, 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'H₂O 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 préchauffe)
- 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.qm

3.1.3. Analyse de molécules adénylées (SAM/SAH) par dérivation fluorescente à l'aide du chloroacétaldéhyde

Préparation des solutions stocks (SAM ; SAH)

- Préparer de solutions stock de standard (SAM ; SAH) à 50mM dans de l'acide chlorhydrique 1N
- Ajouter 0.5v de NaOH 2N ,0.2v de citrate de sodium 1M (pH=5) et 0.3v d'eau ultra pure pour atteindre une concentration finale de 25mM
- Aliquoter et stocker à -20°C
- Préparer des solutions de travail stock de standard à 5µM final dans de l'eau ultra pure

Déprotéinisation des échantillons

- Mélanger 100µl d'échantillon (ou de standard) à 5µl d'HClO₄ à 60%, vortexer et incubé 5 minutes dans la glace
- Centrifuger à 20000g pendant 10 minutes (4°C)
- Éliminer le culot
- Ajouter un volume de KOH (0.5N) pour neutraliser et précipiter les sels de perchlorate et vortexer
- Ajouter 20 µl de KH₂PO₄ (1M) pour tamponner la solution, vortexer, centrifuger à 20000g pendant 10 minutes (4°C) et éliminer le culot

Dérivation des adényls

- Dans des microtubes noirs de 0.5ml, ajouter successivement :
 - 200µl d'échantillon ou de standard
 - 200µl d'acétate de sodium à 1M
 - 10µl de chloroacétaldéhyde à 50%
- Vortexer et incubé à 80°C pendant 20 minutes puis refroidir à 4°C

Procédure de séparation et d'analyse par HPLC

- Le matériel utilisé au laboratoire est une pompe à haute pression P1000XR, 0.8ml/minute (95 bar), une four à colonne à 30°C, une colonne Resolve n°85711 C18 (150x3.9mm, 5µ), un détecteur à fluorescence Shimadu RF10AXL (278nm : Ex/418nm : Em) et un intégrateur (logiciel Borwin 3.1)
- Déposer 50µl de quoi dans les inserts pour flacons d'échantillonneur automatisé AS100

- Injecter 10µl dans la colonne
- Solution pour la phase mobile

3.1.4. Concentration méthionine

Après l'analyse de l'activité SIRT1, les mêmes échantillons ont été utilisés pour déterminer la concentration de la méthionine avec la méthode colorimétrique à la ninhydrine par *JLC-500/V AminoTac™ Amino Acid Analyzer®*.

3.2. Métabolisme lipidique

3.2.1. Triglycérides, cholestérol et lipides totaux

Les mesures sont réalisées avec un automate multiparamétrique Olympus AU 2700® (Beckman-Coulter, France). Ces dosages ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de biochimie biologie moléculaire nutrition et métabolisme du CHU de Nancy-Brabois

3.2.2. Concentration de Carnitine et acylcarnitines

La mesure des concentrations en carnitine libre et acylcarnitines plasmatique a été réalisée à l'aide du kit de dosage (Chromosystems Diagnostics by HPLC&LC-MS/MS Germany) faisant appel à un spectromètre de masse.

La préparation des échantillons

La préparation des échantillons est basée sur l'extraction efficace des molécules sur papier buvard, avec post-derivatation en esters butyliques et pour assurer une quantification reproductible des molécules, la méthode est basée sur l'utilisation d'étalons internes stables présentant un marquage isotopique (deutérés) pour le calibrage et les mesures. Le dosage a été réalisé, conformément aux recommandations du fabricant. L'analyse de l'échantillon par HPLC couplé à un automate (KONE PRO) a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de biochimie du CHU de Nancy.

Dosages tissulaires

Après sacrifice des animaux, les tissus entiers ont été collectés et rincés dans une solution physiologique PBS et congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Lors de la préparation des homogénats tissulaires, les tissus sont broyés sous azote liquide et la masse du tissu est mesurée. Le broyat est suspendu dans 500 µL de tampon PBS contenant 5 % d'inhibiteur de protéase (*protease inhibitor cocktail*, sigma®) pour 100 mg de tissu. L'échantillon est maintenu dans la glace et traité par sonication (*cell sonifier disruptor*, Branson®) en mode pulsé (*duty cycle 30 %*) durant 1 minute. L'homogénat obtenu est centrifugé à 20,000 g/4°C/30 min et le culot est éliminé. Les concentrations des protéines totales cytoplasmiques sont mesurées à l'aide du kit *DC protein assay* (Bio-rad®) selon la méthode colorimétrique de Lowry [317].

3.3. Métabolisme énergétique

3.3.1. Analyse NADH/NAD par séparation en HPLC et détection UV254 nm

Principe : Le couple redox des cofacteurs NAD⁺/NADH, H⁺ est mesuré après séparation par CLHP couplée à un détecteur UV/Visible

Préparation des Tissus

- Peser 10 mg de chaque échantillon ou standards (0-100 µM NADH/NAD⁺)
- mettre en suspension dans 500 µL de Tampon de lyse (475 µL acide citrique 50 mM, phosphate de sodium 100 mM, pH 4,5 (NaOH) + 20 µL DTT 0,5 M + 5 µL SDS 10%).
- Extraire les composés en appliquant 3 cycles de congélation (azote liquide) et décongélation (37°C) des échantillons
- incuber les échantillons dans une cuve à ultrasons pour 15min/4°C avant d'ajouter 500 µL Phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) (sous hotte aspirante) en agitant à la main pendant 1 min.
- Centrifuger à 12000g/4°C/10 min
- récupérer la phase aqueuse (supérieure, ~ 450 µL) et ajouter 500 µL Chloroforme.
- Centrifuger à nouveau à 12000g/4°C/10 min, récupérer la phase supérieure (aqueuse) dans des microtubes noirs et stocker les échantillons à -20°C jusqu'au début de l'analyse NAD/NADH.

Analyse chromatographique : ⁽¹⁾

- dépôt d'échantillon : 50 µL
- Symmetry Waters, C18, 5 µ, 150x3,9 mm, 0,6 mL/min, 135bar, 10µLInj, 30°C, FL-340/460
- 80 bar, 10µL Inj, 30 °C, UV-254

-
- (1). Solutions pour la phase mobile :
 - Solution A : Citric acid 50 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, pH 4,5 (NaOH)
 - Solution B : Citric acid 50 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, pH 4,5 (NaOH) / Methanol 40%

3.3.2. Analyse ATP/ADP/AMP et AMP_c par séparation en HPLC

Principe: les dérivés de molécules adénylées (ATP, ADP, etc.) sont mesurés par fluorescence après dérivation des molécules puis séparation par HPLC. Les nucléotides portant des groupements adényl sont séparés par HPLC en phase inverse et analysés suite à une dérivation fluorescente du résidu adényl.

Préparer les Tissus

- Diluer 10 mg de tissu dans 100 µL de PBS 1x contenant 1% d'EDTA 0,5 M.
- Faire 3 cycles de congélation (azote liquide) et décongélation (37°C)
- Doser la concentration de protéines à l'aide du kit BCA.

Procédure

- Ajouter 500 µL du mélange de solvants Phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) aux échantillons et agiter à la main pendant 1 mn pour
- Eliminer les protéines. Après centrifugation à 12,000g/4°C/10 min.
- Récupérer la phase aqueuse (supérieure, ~450 µL)
- ajouter 100 µL de chloroforme.
- Centrifuger à nouveau à 12,000 g/4°C/10 min
- Récupérer 40µL de phase aqueuse (supérieure)
- transférer dans des microtubes noirs.
- Ajouter ensuite 40 µL d'acétate de sodium 1M et 4 µL Chloroacétaldéhyde ~50% (attention, très toxique).
- Incuber les échantillons à 80°C pendant 20 min dans un bon chauffant, puis refroidir dans la glace.

Les échantillons sont stockés à -20°C jusqu'au début de l'analyse.

Procédure de séparation et d'analyse par HPLC ⁽¹⁾

Matériel :

- Pompe à haute pression P1000XR, 0,8 mL/min (~85 bar)
- Déposer 50 µL dans les inserts pour flacons d'échantillonneur automatisé AS100,
- injecter 10 µL dans la colonne

Four à colonne réglé à 30°C

- Colonne Nova-Pack (Waters) C18, 60A, 4 μ , 150x3, 9 mm
- Détecteur à fluorescence Shimadzu RF10AXL, réglé à 278 nm (Ex) / 418 nm (Em), sensibilité de niveau 2, gain de niveau 2 et range de niveau 0

Intégrateur : logiciel Borwin 3,1

Les pics ainsi identifiés sont quantifiés à partir d'une gamme de standards, et les concentrations calculées sont rapportées à la concentration de protéines totales ou la concentration de tissu.

(1). Solutions pour la phase mobile :

- A – Citric Acid 50 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, pH 4,5
- B – Citric Acid 50 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, pH 4,5 / Méthanol 40%

3.3.3. Peptides natriurétiques

Le NT-proBNP a été testé sur de plasma EDTA- par immunochemiluminescence avec un automate Elecsys™ 2010- (Roche-Diagnostic, Meylan, France), comme décrit [66] et le BNP par l'automateTriage® BNP immunoassay (Société Alère, France).

3.3.4. Marqueurs du stress cellulaire (ALAT/ASAT)

Le dosage de l'Alanine AminoTransférase (ALAT) a été réalisé selon la méthode de Henry [318] et Bergmeyer [319]. Le principe de la méthode consiste à mesurer l'activité enzymatique de l'ALAT à partir de 2 réactions successives. La première transforme la L-alanine en pyruvate via l'ALAT, la seconde permet la transformation du pyruvate en L-lactate en utilisant comme co-facteur le NADH. La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD^+ , proportionnelle à l'activité ALAT dans l'échantillon, est mesurée à 340 nm. Le dosage de l'Aspartate AminoTransférase (ASAT) est réalisé selon la méthode développée par Henry [318]. Comme pour le dosage de l'ALAT, Le principe de la méthode consiste à mesurer l'activité enzymatique de l'ASAT à partir de 2 réactions successives. Le premier produit à partir du L-Aspartate, du L-Glutamate et de l'oxaloacétate via l'ASAT, la seconde permet la transformation de l'oxaloacétate en L-mactate en utilisant comme co-facteur le NADH. La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD^+ , proportionnelle à l'activité ASAT dans l'échantillon, est mesurée à 340 nm.

Les mesures sont réalisées avec un automate multiparamétrique, Olympus AU 2700 (Beckman Coulter, France). 12 μL de résumé pour le dosage de l'ALAT et 12 μL pour le dosage de l'ASAT. Ces dosages ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de biochimie biologie moléculaire nutrition et métabolisme du CHU de Nancy-Brabois.

3.3.5. Dosage Radio-Immunoassey de l'insuline⁽¹⁾

Principe : Le dosage radioimmunologique dépend de la capacité d'un anticorps à se lier à son antigène. Pour quantifier l'antigène, les formes radioactives et non radioactives de l'antigène sont en compétition pour les sites de liaison sur un anticorps spécifique. Plus l'antigène non radioactif est présent, moins l'antigène radioactif va se lier à l'anticorps. Dans le dosage de l'insuline ImmuChem™, l'anticorps est lié de façon covalente à la surface intérieure d'un tube en polypropylène. Ainsi, le complexe antigène-anticorps lié est également lié à la paroi du tube. Il n'y a pas de deuxième anticorps, de charbon actif ou tout autre agent précipitant nécessitant une centrifugation. À la conclusion de l'essai, l'antigène libre est aspiré ou décanté. La radioactivité [¹²⁵I] liée à l'anticorps, inversement proportionnelle à la quantité d'insuline non-radioactive, est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur gamma. L'insuline dans les échantillons est déterminée graphiquement à partir d'une courbe de standards d'insuline. Les dosages ont été effectués sur des échantillons de plasma à l'aide du coffret commercial ⁽¹⁾.

Préparation des réactifs

Reconstituer le lyophilisat d'insuline-[¹²⁵I] avec 5,0 mL d'eau distille et laisser 60 min à température ambiante

Procédure de dosage

- Numéroté 14 tubes pour la courbe étalon et 2 autres pour les contrôles positifs et négatifs. A partir du numéro 17, numéroté 2 tubes supplémentaires pour chaque échantillon
- Ajouter les étalons et les échantillons conformément aux indications données dans le tableau suivant :

<i>Tubes</i>	<i>1,2</i>	<i>3,4</i>	<i>5,6</i>	<i>7,8</i>	<i>9,10</i>	<i>11,12</i>	<i>13,14</i>	<i>15,16</i>	<i>17, ...</i>
Etalons ou échantillons	100 µL Standard1	100 µL Standar2	100 µL Standard3	100 µL Standard4	100 µL Standard5	100 µL Standard6	100 µL Standard7	100 µL control	100 µL échantillons
Description	0 µLU/mL	5,5 µLU/mL	15 µLU/mL	35 µLU/mL	70 µLU/mL	175 µLU/mL	330 µLU/mL	control µLU/mL	plasma

- Ajouter 900µl de solution active de marquage dans chaque tube y compris les tubes 1 et 2. Agiter les tubes au vortex
- Incuber à TA ambiante (≈ 21°C) pendant 18 h
- Décanter avec précaution et jeter le surnageant. Retirer la dernière goutte en posant les tubes sur du papier absorbant
- Laver chaque tube avec 4mL l'eau distille
- Aspirer de l'eau et sécher les tubes avec papier absorbant
- Mesurer la radioactivité des tubes vides, l'un après l'autre à l'aide d'un compteur gamma⁽²⁾. 1 minute pour chaque échantillon
- calculer les résultats avec la formule $\% B/B0 = \frac{\text{CPM échantillon}}{\text{CPM}(0 \mu\text{LU/mL})} \times 100$

(1) ImmuchemTM Coated Tube Insulin ¹²⁵I RIA Kit, (MP Biomedicals, LLC)

(2) COBRA-IITM autogamma (Packard) à double canal

3.3.6. Dosage du glucose

Le mesure a réalisée avec un automate multiparamétrique Olympus AU 2700® (Beckman-Coulter, France). Ce dosage a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de biochimie biologie moléculaire nutrition et métabolisme du CHU de Nancy-Brabois

4. Dosages enzymatiques

4.1. Mesure de l'activité méthionine synthase, MTR

La préparation des réactifs se fait avec de l'eau milli-Q désoxygénée (sous flux d'azote gazeux durant 30 minutes) et le mélange réactionnel est maintenu sous un flux d'azote durant toute la préparation. Le méthyltétrahydrofolate (MeTHF) et la méthylcobalamine (Me-B12) étant photolabiles, ils sont conservés dans des tubes noirs.

- La réaction est réalisée dans un volume final de 100 μ L contenant

<i>Volume réac : 100μl</i>	<i>C réaction</i>	<i>C stock</i>	<i>Volume (μl)</i>
Protéines	500 μ g	20 μ g/ μ l	25
K ₂ H/KH ₂ (PO ₄) pH 7,2	100 mM	1 M	10
DTT ⁽¹⁾ (H ₂ O)	25 mM	580 mM	4,3
Na/Ascorbate ⁽¹⁾ (H ₂ O)	25 mM	720 mM	3,5
SAM ⁽¹⁾ (H ₂ O)	20 μ M	2 mM	1
Methyl-B12 ⁽²⁾ (H ₂ O)	50 μ M	5 mM	1
Homocystéine ⁽¹⁾ (HCl 1N)	5 mM	500 mM	1
MeTHF ⁽¹⁾ (DTT 10mM)	0,225 mM	22,5 mM	1
[¹⁴ C] MeTHF ⁽³⁾ (DTT 10mM)	25 μ M	2,5 mM	1
H ₂ O qsp 100 μ l			52,2

- Incuber le mélange réactionnel pendant 20, 40 60 et 80 min à 37°C dans un bloc chauffant thermostaté ; dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme
- Arrêt de la réaction en chauffant les échantillons à 95°C, 5 min puis refroidir dans la glace

- Centrifuger à 12.000 g pendant 10 min à 4°C
- Equilibrer les colonnes⁽⁴⁾ par des lavages successifs (4x5 mL d'HCl 0,5 N), puis un autre lavage de 5x2 mL d'eau milli-Q
- Charger les colonnes avec l'échantillon (100 µL) puis rincer le gel avec 3x1 mL d'eau milli-Q
- La radioactivité est comptée dans des tubes en Polyéthylène⁽⁵⁾ en mélangeant 1 volume d'éluat à 4 volumes de Pico-Fluor^{TM(6)}
- La [¹⁴CH₃] méthionine produite a été mesurée sur un analyseur⁽⁷⁾ TRI-CARB, 1900CA
- Eluer le [¹⁴C] méthyl-tétrahydrofolate en régénérant les colonnes avec 4x5mL d'acide chlorhydrique.

(1) DTT(H₂O), Na/Ascorbate(H₂O), SAM(H₂O), MeTHF : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

(2) Methyl-B12(H₂O) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

(3) [¹⁴C]MeTHF : GE Healthcare

(4) Colonne AG1x8, résine cationique échangeuse d'anions Cl⁻ : Bio-Rad Laboratories, (Marnes-la-Coquette, France)

(5) Fioles de comptage en polyéthylène de capacité 20mL : Packard Biosciences, Etats-Unis

(6) PicoFluor : agent de scintillation (Packard Biosciences, (Etats-Unis). Colonnes AG 1-X8 BioRad Laboratories

(7) Analyseur TRI-CARB, 1990CA : Packard Biosciences, Etats-Unis

4.2. Mesure de l'activité de la méthylentetrahydrofolate reductase (MTHFR)

- La réaction est réalisée dans un volume final de 200 µL contenant

	<i>Concentration réaction</i>	<i>Concentration stock</i>	<i>Volume (µl)</i>	<i>Volume réactionnel par échantillon : 200µl</i>
Protéines			40	40
Tampon phosphate potassium pH6, 3	180 mM	1,8 M	20	Mix 160µl
Ménadione (K3) ⁽¹⁾	3,6 mM	90 mM	8	
EDTA ⁽¹⁾	1,4 mM	0,5 M	0,56	
Ascorbate ⁽¹⁾	7,2 mM	720 mM	2	
FAD ⁽¹⁾	178 µM	17,8 mM	2	
MeTHF ⁽¹⁾	50 µM	22,5 mM	0,44	
[¹⁴ C] MeTHF ⁽²⁾	50 µM	2,5 mM	2	
H ₂ O qsp 160µl			125	

- Incuber le mélange réactionnel pendant 20, 40 60 et 80 min à 37°C dans un bloc chauffant thermostaté ; dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme.
- Chauffer les échantillons à 95°C, 5 min puis refroidir dans la glace.
- Un mélange contenant du formaldéhyde, du dimédone et de l'acétate de sodium est ajouté dans les proportions suivantes :

	<i>Concentration réaction</i>	<i>Concentration stock</i>	<i>Volume réactionnel par échantillon (µl)</i>
Formaldéhyde ⁽¹⁾	20,6 mM	1 M	10
Dimédone ⁽¹⁾	103,1 mM	0,25 M	200
Acétate de sodium ⁽¹⁾	463,9 mM	3 M	75

- Vortexer le mélange pendant 10s
- Chauffer à 95°C durant 15min (les tubes sont percés et maintenus sous une hotte aspirante durant la réaction)
- Les tubes sont refroidis dans la glace 10 min
- Ajouter dans chaque tube 1mL de toluène⁽³⁾ (sous une hotte aspirante)
- Vortex pendant 30 s
- Centrifuger à 1000 g pendant 5 min à température ambiante
- La phase organique (supérieure) contient le [¹⁴C] provenant du produit final de la réaction : le méthylènetétrahydrofolate
- Ajouter chaque phase à 4 mL de Pico-Fluor^{TM(4)} dans des tubes en polyéthylène⁽⁵⁾ avant de compter la radioactivité du [¹⁴C] contenu dans chaque phase sur un compteur bêta⁽⁶⁾

(1) Ménadione bisulfite, EDTA, ascorbate, FAD, MeTHF : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

(2) [¹⁴C]MeTHF : GE Healthcare, (91898 Orsay Cedex, France)

(3) Toluène : VWR International, 94126 Fontenay sous-bois, France

(4) Picofluor : Pico-FluorTM peut être remplacé par de l'Ultima Gold non toxique pour l'environnement

(5) Fioles de comptage en polyéthylène de capacité 20 mL ; Packard Biosciences, (Etats-Unis)

(6) Analyseur TRI-CARB, 1990CA ; Packard Biosciences, (Etats-Unis)

4.3. Mesure de l'activité enzymatique de la cystathionine – β - synthase (CBS)

- La réaction est réalisée dans un volume final de 100 μ L contenant

	<i>C réaction</i>	<i>C stock</i>	<i>Volume (μl)</i>
Protéines	400 μ g	20 g/L	20
Tris-HCl pH 8,6	50 mM	2 M	2,5
PLP ⁽¹⁾ (HCl 1N)	1 mM	100 mM	1
Sérine ⁽²⁾ (H ₂ O)	5 mM	100 mM	5
[¹⁴ C] Sérine ⁽³⁾	0,05 μ Ci	50 μ Ci/ml	1
D, L Homocystéine ⁽⁴⁾ (HCl 1N)	15 mM	500 mM	3
H ₂ O qsp 100 μ l			67,5

- Incuber à 37°C pendant 20, 40,60 ou 80 min dans un bloc chauffant thermostaté (dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme)
- Arrêt de la réaction en chauffant à 95°C pendant 5min
- Refroidir à 4°C dans de la glace
- Le pH est diminué en ajoutant 50 μ L d'acide formique (98%) et 350 μ L de tampons A⁽⁵⁾
- Centrifuger les tubes à 12.000 g pendant 10 min à 4°C
- Eliminer le culot
- Déposer le surnageant sur une colonne⁽⁶⁾ PolyPrep Chromatography Columns préalablement équilibrée en ions Li⁺ en lavant avec 4 x 5 mL de tampon A
- La [¹⁴C] Sérine en excès dans l'échantillon est éliminée en lavant le gel avec 1 mL, 3 mL et 3 x 5 mL de tampon A.
- La [¹⁴C] cystathionine produite lors de la réaction est éluée en lavant le gel avec 2 x 3 mL de tampon B⁽⁷⁾
- La radioactivité est mesurée dans des flacons en polyéthylène (20 mL) contenant 3 mL d'éluat et 15 mL de liquide de scintillation⁽⁸⁾
- Compter la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation TriCarb 1900CA⁽⁹⁾

-
- (1) PLP : (Sigma-Aldrich, St Louis, France), pyridoxal 5'-phosphate, (vitamine B6) dissout à 100 mM dans HCl 1N. La solution est stockée à -20°C dans des tubes noirs car le PLP est photosensible
 - (2) D, L Sérine : (Sigma, S4375, (\pm)-2-Amino-3-hydroxypropionic acid) dissout à 100mM dans H₂O
 - (3) L-[U-14C] Sérine : (Amersham Pharmacia Biotech, CFB.72, (S)-2-Amino-3-hydroxypropionic acid) à 50 $\mu\text{Ci/mL}$ et 155mCi/mmol, soit 322 μM .
 - (4) D, L Homocystéine (Hcy) : (Sigma, H4628, 2-Amino-4-mercaptobutyric acid) dissout à 500mM dans HCl 1N. La solution est désoxygénée en passant un flux d'azote gazeux durant 30min, et stockée par aliquotes à -20°C
 - (5) Tampons A: Ac. Maléique 25 mM, pH 1,8 et LiCl 200 mM
 - (6) Colonne PolyPrep Chromatography Columns, 731-1550 de 0,8 x 4 cm (Bio-Rad Laboratories) contenant 1 mL de résine Dowex 50WX2-200 (Sigma) préalablement équilibrée en ions Li⁺ en lavant avec 4 x 5 mL de tampon A
 - (7) Tampon B : Acétate de sodium 50 mM, pH 5,2, LiCl 800 mM
 - (8) Liquide de scintillation : Hionic-Fluor, Packard Bioscience
 - (9) Compteur à scintillation TriCarb 1900CA ; Packard Bioscience, Etats-Unis

4.4. Bétaïne-Homocystéine Méthyltransférase (BHMT)

Principe

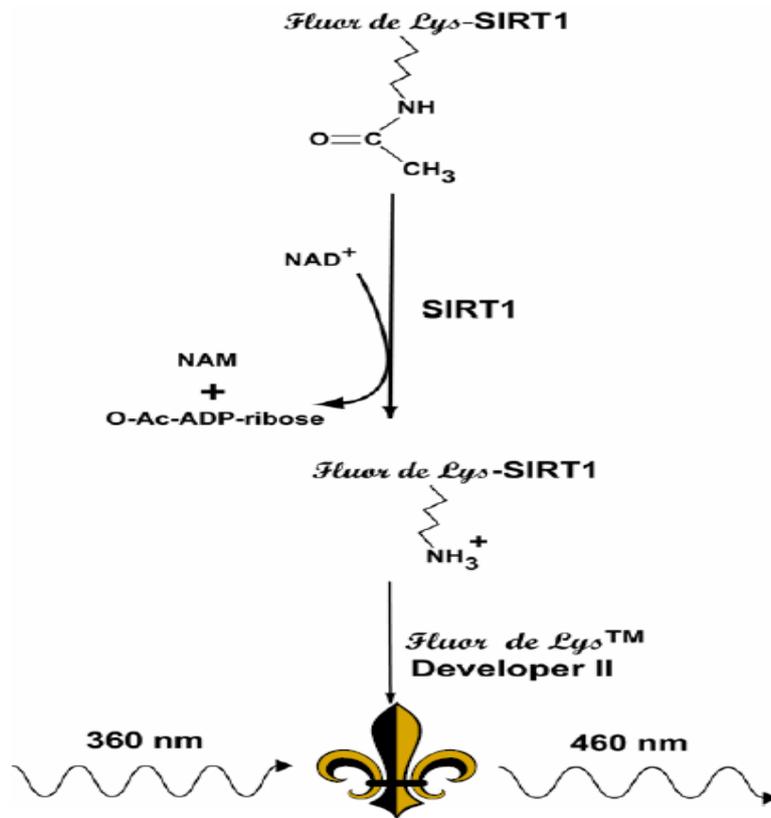
L'activité de la BHMT a été estimée selon la technique décrite par Garrow (1996). Cette mesure est basée sur le transfert d'un groupement méthyle radiomarké de la bétaïne sur l'homocystéine pour former de la méthionine. La séparation des deux éléments radiomarkés est obtenue après un passage sur une colonne chromatographique échangeuse d'anions (OH⁻). La fraction éluée (contenant la méthionine) est alors comptée.

Méthode

Les échantillons sont incubés avec 50 mmol/L de tampon Tris-HCl (pH 8) contenant 5 mmol/L d'homocystéine, 25 mmol/L de DTT, 2mM de bétaïne, 0,013 µmol/L de [³H] bétaïne pendant 60 minutes à 37°C. Après avoir arrêté la réaction en ajoutant 1 mL d'H₂O milliQ et centrifugé pendant 5 minutes à 12 000 g, les échantillons sont déposés sur une résine comportant un groupe fonctionnel d'ammonium quaternaire. La méthionine est éluée avec de l'HCl 0,5 N. La radioactivité contenue dans la fraction éluée a été mesurée sur un analyseur TRI-CARB, 1900CA (Packard Biosciences) après ajout d'un agent scintillant (Hionic Fluor, Packard Biosciences).

4.5. Mesure d'activité enzymatique de Sirt1

Principe: Le SIRT1 Fluorescent Activity Assay/Drug Discovery Kit est un système de dosage conçu pour mesurer l'activité Lysyl-désacétylase par SIRT1. La mesure de l'activité fluorescente de SIRT1 est basée sur la combinaison unique Substrat *Fluor de Lys-SIRT1* / Développeur II. Le substrat *Fluor de Lys-SIRT1* est un peptide comprenant les acides aminés 379-382 de la protéine p53 humaine (Arg-His-Lys-Lys (Ac)). Le signal fluorescent est généré en fonction de la quantité de désacétylation de la lysine correspondant à Lys-382, une cible connue *in vivo* de l'activité de SIRT1. *Fluor de Lys-SIRT1* était le substrat désacétylé plus efficacement en SIRT1 parmi un panel de substrats issus du site d'actéylation de p53, de l'histone H3 et de l'histone H4.



L'activité SIRT1 a été mesurée en utilisant un kit de dosage fluorométrique de SIRT1⁽¹⁾ comme décrit par le fabricant.

Préparation d'échantillon :

- Afin d'éliminer toute trace d'Hb ou de milieu de culture, rincer avec du PBS 1x environ 25 mg de cellules ou de tissus broyés et congelés à -80°C.
- Centrifuger à 600 g /5min/4°C et éliminer le surnageant,
- Ajouter 500 µL de tampon C⁽²⁾ (low salt) pour un 2ème rinçage suivi d'une centrifugation à 600 g /5mn/4°C et éliminer le surnageant
- Homogénéiser les échantillons avec un tampon N (high salt)⁽³⁾
- Déposer les échantillons sur un lit de glace les transférer dans un broyeur de Dounce
- broyer une quinzaine de fois avec piston A ou Loose
- compléter l'extraction des protéines en plongeant les tubes dans de l'azote liquide (-196°C) puis dans un bain marie (37°C), suivie d'une centrifugation à 12000g /4°C/30 min.
- transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- Doser la concentration de protéines à l'aide du kit BCA

Mesure de l'activité SIRT1

- Incuber 10 μ L d'homogénat avec 15 μ L de substrats *Fluor de Lys-SIRT1*[®] (100 μ M) et NAD^+ (100 μ M) pendant 30 min à 37 °C dans une plaque noire de 96 puits⁽⁴⁾.
- stopper la réaction en ajoutant 50 μ L de réactif développeur et le nicotinamide (2 mM)
- Mesurer la fluorescence pendant 45 min à 355nm (excitation) et 460nm (émission) à l'aide du lecteur de plaques Victor³⁽⁵⁾
- Normaliser le changement de fluorescence (unités arbitraires de fluorescence (AFU)) par minute et en rapportant à la quantité de protéines totales dans les échantillons

(1) SIRT1 Fluorescent Activity Assay/Drug Discovery Kit (BIOMOL, à Plymouth Meeting, PA, USA)

(2) Tampon C (low salt)

<i>Sol stock</i>	<i>Concentration finale</i>	<i>Vol. à prélever en μl</i>
Tris HCl 2M, pH 8,0	10 mM	50
KCL 3M	20mM	60
EDTA 0,5M Ph=8	1,5mM	30
Co, inh 500X	1X	20
PMSF 0,1M	1mM	100
MgCl2 1M	1mM	10
Glycérol 99%	10%	1000
H ₂ O qsp 10mL		

(3) Tampon N (High salt)

<i>Sol stock</i>	<i>Concentration finale</i>	<i>Vol. à prélever en μl</i>
Tris HCl 2M, pH 8,0	10 mM	50
KCL 3M	0,5M	1660
EDTA 0,5M Ph=8	1,5mM	30
Co. inh 500X	1X	20
PMSF 0,1M	1mM	100
H ₂ O qsp 10mL		

(4) Plaques de 96 puits noire, stériles: PerkinElmer; Courtaboeuf cedex, France

(5) Lecteur de plaques Victor³, 1420 Multilabel Counter, PERKIN ELMER Wallac Multilabel : Perkin Elmer

4.6. Mesure d'activité enzymatique de Caspase-1

Principe : Les cellules qui sont supposées entrer en apoptose sont d'abord lysées pour recueillir leur contenu intracellulaire. Les cellules sont alors testées pour l'activité de la protéase par l'ajout d'un peptide conjugué à la molécule p-nitroaniline (pNA), spécifique pour la caspase. Le clivage du peptide par la caspase relargue le chromophore pNA qui va être quantifié par la mesure de l'absorbance à 405 nm. Le niveau d'activité enzymatique des caspases dans le lysat cellulaire est directement proportionnel à la réaction colorée.

Préparation d'échantillons

L'activité de Caspase-1 a été déterminée avec le kit de dosage colorimétrique Caspase-1 (R&D system)⁽¹⁾.

- Extraction des protéines avec le tampon de lyse et ensuite dosage de protéines avec le kit BCA, Uptima, (Interchim)
- Déposer les échantillons à tester (150µg protéines /50µL tampon de lyse pour chaque échantillons) en duplicate dans une plaque de 96 puits⁽²⁾
- Ajouter 50µL de tampon de réaction 2X et 5uL le substrat de Caspase-1 colorimétrique (WEHD-pNA) dans chaque puits
- Incuber la plaque 1h a 37°C
- Lire l'absorbance à 405 nm sur le spectrophotomètre (VICTOR³_{TM})⁽³⁾
- Normaliser le changement de fluorescence (unités arbitraires de fluorescence (AFU)) par minute et en rapportant à la quantité de protéines totales dans les échantillons

(1) Caspase-1 Colorimetric Assay ,No BF14100, R&D SYSTEMS

(2) Plaques de 96 puits blanches, stériles: PerkinElmer; Courtaboeuf cedex, France

(3) Lecteur de plaques Victor³, 1420 Multilable Counter, PERKIN ELMER Wallac Multilabel : Perkin Elmer

5. Immunohistochimie

5.1. Inclusion des lames et coupe au cryostat

Inclusion des lames en verre

Préparer une solution de gélatine porcine (Sigma) à 0,8%⁽¹⁾

- Pour dissoudre la gélatine, mettre au bain marie et chauffer entre 40 et 45°C (ne pas dépasser 45°C.)
- Laisser refroidir jusqu'à environ 35°C
- Mettre les lames à bords rodés (Menzel-Glaser) sur un portoir et faire 2 allers-retours dans la gélatine diluée
- Laisser sécher les lames pendant 24 heures à température ambiante ou dans une étuve à 37°C

Coupe des tissus au cryostat

- Régler la température à l'intérieur du cryostat à environ -24°C et du porte-objet à -26°C
- Inclure le tissu dans une solution de carboxyméthylcellulose à 4%⁽²⁾
- Attendre que la carboxyméthylcellulose se soit solidifiée avant de commencer à couper
- Faire des coupes de 8-16µm d'épaisseur
- Stocker les coupes sur lame à -80°C

(1) *Solution de gélatine porcine 0,8%* : 8g de gélatine porcine dans 1L d'eau distillée

(2) *Solution de carboxyméthylcellulose à 4%* : 4g de carboxyméthylcellulose dans 100ml d'eau distillé

5.2. Technique d'immunohistochimie par fluorescence indirect

Principe : L'anticorps primaire est dirigé contre l'antigène recherché. Ensuite on utilise un deuxième anticorps, marqué par un fluorochrome, et possédant une haute affinité pour l'anticorps primaire (dirigé contre l'isotype de l'anticorps primaire.)

Protocole

- Sortir les lames du congélateur et les laisser décongeler environ 2-3min à température ambiante (ne pas les laisser sécher)
- Entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Fixer les coupes en ajoutant 200µl de paraformaldéhyde⁽¹⁾ à 4% pendant 15min à température ambiante
- Rincer les lames dans un bain de PBS⁽²⁾ 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce (facultatif)
- Incuber les coupes dans un bain de Triton⁽³⁾ à 0,1% afin de perméabiliser les membranes, 2 fois pendant 10min à température ambiante
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.
- Entourer à nouveau les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Déposer 200µl d'une solution de BSA⁽⁴⁾ à 10% diluée dans du PBS 1X (attention à ce que la coupe soit bien recouverte de la solution) afin de bloquer les sites non spécifiques et laisser incuber entre 1h à température ambiante
- Déposer environ 100µl d'anticorps primaire (diluer l'anticorps dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) s'il y a deux anticorps sinon 200µl et laisser incuber de 24 à 72h selon anticorps dans une chambre humide à 4°C
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 100µl d'anticorps secondaire (dilution 1/2000^{ème} dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) si un seul anticorps primaire si deux 200µl et laisser incuber pendant 1h à l'obscurité dans une chambre humide à température ambiante
- Après cette étape mettre les lames dans du papier aluminium afin de les protéger de la lumière
- Laver les lames dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min sous agitation douce

- Déposer environ 200µl de DAPI⁽⁵⁾ (dilution 1/200^{ème} dans du PBS 1X soit une concentration finale de 5µg/ml) et laisser incuber de 30s à 1min à température ambiante
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min sous agitation douce
- Monter les lames au montage fluo (Fluoromount, Sigma) (verser sur le milieu de la coupe une goutte, poser une lamelle et laisser sécher à 4°C
- Conserver bien les lames à l'obscurité dans du papier aluminium à 4°C

(1) Paraformaldéhyde (PAF) à 4% → 20g de paraformaldéhyde dans 450 ml d'eau distillée+50 ml de PBS 10X

(2) PBS 10X → 12,1g de Na₂HPO₄ ; 7H₂O, 2g de KH₂PO₄, 80g de NaCl, 2g de KCl
Qsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4 avec HCL

Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée

(3) Triton 0,1% → Ajouter avec un cône coupé à l'extrémité 1ml de Triton dans 1l de PBS 1X

(4) BSA 10% → 10g de BSA dans 100ml de PBS 1X

(5) DAPI : Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous-bois, France

5.3. Duolink

Principe Cette technique permet de détecter, visualiser et quantifier des protéines individuelles, des modifications post-traductionnelle ou des interactions protéiques dans des échantillons cellulaires et tissulaires. Les réactifs Duolink sont basés sur le PLA[®] (Proximity Ligation Assay). Lorsque les sondes PLA sont à proximité (28Å), les brins d'ADN peuvent interagir et se lier grâce à un ajout ultérieur d'oligonucléotides et d'une ligase. Ils sont ensuite amplifiés plusieurs centaines de fois à l'aide d'une polymérase et l'ajout de sondes oligonucléotidiques complémentaires fluorescentes mettent en évidence le produit final. Le signal de chaque paire de sondes PLA détectées est visualisé comme un spot fluorescent individuel.

Protocole

- Sortir les lames du congélateur et les laisser décongeler environ 2-3min à température ambiante (ne pas les laisser sécher)
- Entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Fixer les coupes en ajoutant 200 µl de paraformaldéhyde⁽¹⁾ à 4% pendant 15min à température ambiante
- Rincer les lames dans un bain de PBS⁽²⁾1X, 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce (facultatif)
- Incuber les coupes dans un bain de Triton⁽³⁾ à 0,1 % afin de perméabiliser les membranes, 2 fois pendant 10min à température ambiante
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.
- Réentourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Déposer 200µl d'une solution de BSA⁽⁴⁾ à 10% diluée dans du PBS 1X (attention à ce que la coupe soit bien recouverte de la solution) afin de bloquer les sites non spécifiques et laisser incuber entre 1h à température ambiante
- Déposer environ 100µl d'anticorps primaire (diluer l'anticorps dans une solution de PBS 1X-BSA 10 %) si il y a deux anticorps sinon 200µl et laisser incuber de 24 à 72h selon anticorps dans une chambre humide à 4°C
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce

- Déposer environ 80 µl de chaque PLA probes⁽⁵⁾ (diluer les anticorps au 1/5° dans une solution PBS 1X-BSA 10 %) NB : les deux PLA probes utilisés doivent avoir une dénomination différente → un « espèce » minus et un « espèce » plus et incubé pendant 1h dans une chambre humide à 37°C
- Laver dans un bain de TBST⁽⁶⁾, 2 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 80µl de la solution de ligation (Diluer la solution stock de ligation au 1/5° dans de l'eau MilliQ puis diluer dans cette solution la ligase au 1/40°) et laisser incubé 30min dans une chambre humide à 37°C
- Laver dans un bain de TBST, 2 fois pendant 2min à température ambiante sous agitation douce

NB : ce réactif est sensible à la lumière donc à partir de cette étape procéder à l'obscurité. Déposer environ 80µl de la solution de ligation (Diluer la solution stock d'amplification au 1/5° dans de l'eau MilliQ puis diluer dans cette solution la polymérase au 1/80°) et laisser incubé 100min dans une chambre humide à 37°C

- Laver dans un bain de tampon de lavage B⁽⁷⁾, 2 fois pendant 10min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 200µl de DAPI⁽⁸⁾(dilution 1/200° dans du PBS 1X soit une concentration finale de 5µg/ml) et laisser incubé de 30s à 1min à température ambiante
- Laver dans un bain d'eau distillé, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Monter les lames au montage fluo (Fluoromount, Sigma) (verser sur le milieu de la coupe une goutte, poser une lamelle et laisser sécher à 4°C
- Conserver bien les lames à l'obscurité dans du papier aluminium à 4°C
- L'observation se fait au microscope à fluorescence à 555nm
- Pour le comptage, utiliser le logiciel

(1) Paraformaldéhyde (PAF) à 4% → 20g de paraformaldéhyde dans 450 ml d'eau distillée. Ajouter 50 ml de PBS 10X

(2) PBS 10X → 12,1g de Na₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄, 80g de NaCl, 2g de KClQsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4. Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée

(3) Triton 0,1% → Ajouter avec un cône coupé à l'extrémité 1ml de Triton dans 1l de PBS 1X

(4) BSA 10% → 10g de BSA dans 100ml de PBS 1X

(5) PLA probes : Mouse, Rabbit, Goat MINUS ou PLUS, Kit Duolink Detection reagent Orange (Olink Bioscience, Suède)

(6) *Solution de TBST* (Tris-Buffered Saline Tween-20) : diluer 100ml de la solution TBS 10X + qsp H₂O MQ 1 litre + 1ml de Tween 20 à 0,1%. TBS 10X (pour 1 litre) → Tris 200 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,4, qsp H₂O MQ 1 litre (à ajuster avec HCl ; conserver à 4°C)

(7) Tampon de lavage B : Dans 500 ml d'eau MilliQ dissoudre 5,84g de NaCl ; 4,24g de Tris base et 26g de Tris HCl. Ajuster le pH à 7,5 par ajout d'HCl et compléter à 1 litre avec de l'eau MilliQ. Filtrer la solution avec un filtre de 0,22µm et stocker à 4°C

(8) DAPI → Diamidino-4',6 phénylindol-2 dichlorhydrate

5.4. Technique d'Immunohistochimie par Rouge Sirius et Masson Trichrome Stain kit

Principe : Les tissus fixés sont inclus dans des blocs de paraffine. Les coupes de 4 µm d'épaisseur sont marquées à l'hématoxyline-éosine et avec des marqueurs spécifiques de ce tissu pour l'analyse des fibroses (coloration du collagène de type I et de la réticuline avec du rouge Sirius), les tissus conjonctifs et le muscle dans des échantillons de tissu (avec du Trichrome Stain Kit). L'analyse histologique a permis de semi-quantifier les lésions nécro-inflammatoires, les fibroses et les stéatoses sous la forme de scores décrits par Ishak méthode et rapportés dans le tableau ci-dessous. Cette évaluation a été réalisée en collaboration avec le laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Nancy.

Score de Sévérité

Fibrose	0 absente	1 faible	2 modérée	3 sévère	4 cirrhose
Inflammation portale	0 absente	1 faible	2 modérée	3 sévère	
Agrégat mononucléaire	absente	<1/3 tractus portal	1/3-2/3 tractus portal	>2/3 tractus portal	
nécrose	0 absente	1 faible	2 modérée	3 sévère	
Stéatose (micro et macrovacolaire)	0 absente	1 Faible <10%	2 Modérée 10-30%	3 Sévère >30%	
Dysplasie hépatocytaire	0 absente	1 présente			

6. Western blot

6.1. Extraction des protéines à partir de tissu

NB : L'extraction des protéines se fait en condition dénaturante à partir des microdissections de tissu

Extraction des protéines (travailler toujours sur de la glace)

- Préparer du tampon de lyse RIPA⁽¹⁾ (Radioimmunoprecipitation Assay)
- Mettre le volume correspondant de tampon RIPA froid selon la microstructure
- Incuber 10 minutes dans la glace
- Homogénéiser par 10 à 20 allers-retours avec une seringue de 1mL et l'aiguille de 0.60×25 mm BL /LB (23g x 1" IM BD Sterile Hypodermic Needle)
- Faire 3 cycles congélation-décongélation (azote liquide -196°C _ bain marie à 37°C)
- Centrifuger 30 minutes à 4°C, 12.000 g
- Récupérer le surnageant et Stocker par aliquots à -80°C.

Solutions stock

<i>Tampon RIPA</i>	NaCl	8 g/l	} Dissous dans de l'eau ultrapure
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l	
	KH ₂ PO ₄	0,24 g/l	
	NP40	1 %	
	DOC	0,5 %	
	SDS	0,1 %	
<i>PMSF</i>	10 mg/ml d'éthanol		
<i>Na₃VO₄ à 100mM</i>	18,39 mg/ml d'H ₂ O		

- **Tampon de lyse RIPA**

Tampon RIPA

<i>PMSF</i>	10µl/ml RIPA	}
<i>Na₃VO₄</i>	10µl/ml RIPA	
Cocktail antiprotéase	14µl/10ml RIPA	

6.2. Dosage des protéines par kit BCA ⁽¹⁾

Principe : Les concentrations protéiques ont été mesurées par la méthode BCA ⁽²⁾, ou BC Assay qui est un dosage colorimétrique basé sur l'acide bicinchoninique. Les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu(I), qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique entre 540 et 590nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines

Préparation d'une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumin)

- Préparer une gamme étalon (2 ; 1,6 ; 1,2 ; 0,8 ; 0,4 ; 0,2 ; 0,1 et 0 mg/ml, en doubles) à partir d'une solution stock de BSA ⁽³⁾ de concentration 2mg/ml diluée dans la même solution que les échantillons à doser (tampon de lyse RIPA)

	<i>Sol. BSA</i> <i>2mg/ml</i>	<i>Tp lyse</i> <i>RIPA</i>	[Protéines] µg/mL
A	50 µl BSA	0 µl	2000
B	40 µl BSA	10 µl	1800
C	30 µl BSA	20 µl	1200
D	20 µl BSA	30 µl	800
E	10 µl BSA	40 µl	400
F	5 µl BSA	45 µl	200
G	2,5 µl de BSA	47,5 µl	100
H	0	50µl	0

Dosage en microplaque

- Dans une plaque 96 puits à fond plat, mettre 25µl de chaque standard ou échantillon dans les puits (2 prises d'essai).
- Ajouter 200 µL de réactif (kit BCA : 50 sol. A /1 sol. B) dans chaque puits.
- S'il faut diluer l'échantillon, utiliser le tampon de lyse RIPA pour la dilution
- Couvrir la plaque et l'incuber 30 min à 37°C.
- Lire l'absorbance à 570 nm sur le lecteur de microplaque Microplate Reader™ (Bio-rad) et calculer la concentration en protéines de chaque échantillon en tenant compte des facteurs de dilution.

(1) BC Assay kit (Uptima-Interchim)

(2) D'après Paul Smith et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid, Anal.Biochem.

(3) 2mg /ml d'une solution à 0,9% NaCl et 0,05% sodium azide

6.3. Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS PAGE)

Préparation des gels

- Nettoyer les plaques de verre à l'alcool
- Monter l'appareil d'électrophorèse⁽¹⁾: plaques de verre et espaceurs (en général D'épaisseur 1,5 mm)
- Préparer le gel de séparation à la concentration souhaitée⁽²⁾. Pour 2 gels prévoir 20ml de solution
- Couler les gels entre les deux plaques de verre
- Déposer environ 500 µl d'isopropanol et laisser polymériser le gel environ 15 minutes (le temps de polymérisation est en fonction de la température ambiante)
- Rincer abondamment à l'eau distillée et éliminer toutes traces d'eau
- Préparer le gel de concentration à 5 % ⁽³⁾ (pour 2 gels prévoir 8ml) et couler le au-dessus du gel de séparation (couler en excès)
- Positionner le peigne en Téflon en évitant la formation de bulles et laisser polymériser.
- Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration⁽⁴⁾
- 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

Pour un premier essai, prévoir un dépôt de 20 à 30µg de protéines par puits.

- Dans un tube, ajouter 1 volume de tampon de dépôt Laemmli 2X⁽⁵⁾ à 1 volume d'échantillon
- Chauffer 5 mn les échantillons à 100°C
- Charger les puits avec les échantillons et les marqueurs de poids moléculaire⁽⁶⁾

Migration sur un générateur à voltage constant

- Laisser migrer à 80V les échantillons dans le gel de concentration environ 15mn
- Une fois dans le gel de séparation, laisser migrer à 110V les échantillons environ 2 heures
- Arrêter la migration quand le front de migration arrive en bas des plaques

Electro-transfert liquide

Préparation de la membrane

- Découper une membrane PVDF⁽⁷⁾ ou en nitrocellulose⁽⁸⁾ (le cas échéant) à la dimension du gel : 7 x 8,5 cm minimum
- Mettre la membrane (uniquement) PVDF dans du méthanol pendant 1 minute afin de la perméabiliser
- Equilibrer la membrane dans le tampon de transfert⁽⁹⁾ froid (5mn max) ainsi que les éponges et les filtres environ une demi-heure avant la fin de la migration.
- Démontez l'appareil de migration, éliminez le gel de concentration et équilibrez les gels dans le tampon de transfert froid (5mn max)

Transfert

- Préparer une cassette de transfert dans laquelle il faut superposer sur la face blanche dans l'ordre :
 - une éponge
 - un papier filtre⁽¹⁰⁾
 - la membrane PVDF ou nitrocellulose
 - le gel de polyacrylamide
 - un papier filtre (expulser les bulles d'air à l'aide d'une pipette plastique)
 - une éponge
- Et fermer la cassette
- Placer les cassettes dans le module de transfert⁽¹¹⁾, face noire vers face noire
- Mettre le glaçon et remplir la cuve avec du tampon froid
- Le transfert se fait à ampérage constant 350mA pendant 45mn.

Electro-transfert semi-sec

Préparation de la membrane

- Même procédure que pour le transfert liquide

Transfert

- Superposer les différents éléments du sandwich sur la plate-forme anodique du système de transfert dans l'ordre suivant :
 - un papier filtre Whatman® 3M
 - la membrane de PVDF ou nitrocellulose

- le gel de polyacrylamide
- un papier filtre Whatman® 3M
- Expulser les bulles d'air à l'aide d'un rouleau
- Eponger l'excédent de tampon autour du sandwich
- Placer la plaque cathodique au sommet du montage et refermer l'appareil avec son capot
- Brancher l'appareil⁽¹²⁾ sur un générateur de courant continu et transférer à une tension constante de 10V pendant 45 min

Vérification du transfert (non obligatoire)

- Colorer la membrane avec une solution de Rouge Ponceau S⁽¹³⁾ pendant 5mn puis décoloration à l'eau distillée.
- NB : A ce stade on peut laisser sécher la membrane et la conserver au frigo pour une révélation ultérieure. Avant de réutiliser une membrane sèche, la repasser dans un bain de méthanol.

Blocage

- Mettre les membranes dans une solution de TBST⁽¹⁴⁾ /lait écrémé 5% sous agitation pendant 1 heure à température ambiante afin de bloquer les sites aspécifiques.

Nota : suivant les anticorps, la solution de blocage peut être faite soit avec de la BSA soit avec du lait écrémé (idem pour la dilution des anticorps)

Anticorps primaire⁽¹⁵⁾

- Découper une pochette plastique légèrement supérieure à la surface de la membrane
- Préparer la solution avec le premier anticorps dilué à la concentration souhaitée dans TBST/lait ou BSA 5 % (4 à 5ml au total)
- Placer la membrane dans la pochette plastique, mettre la solution d'anticorps, souder la pochette et incuber pendant 1 nuit à 4°C sous agitation lente

Lavage

- Sortir la membrane de sa pochette plastique
- Rincer la membrane avec du TBST 4X 10mn sous agitation rapide à température ambiante

Anticorps secondaire⁽¹⁶⁾

- Procéder de la même façon qu'avec le 1^{er} anticorps
- Incuber 1 heure sous agitation lente à température ambiante

Lavage

- Sortir la membrane de sa pochette plastique
- Rincer la membrane avec du TBST 4X 10mn sous agitation rapide à température ambiante

Révélation ECL

- Préparer la solution ECL^{TM(17)} (pour une membrane prévoir 1ml au total)
- Sur un film SaranTM déposer l'ECLTM
- Sortir la membrane du tampon de lavage, la secouer pour éliminer l'excès de tampon, la poser sur l'ECLTM, protéines vers le bas en évitant la formation de bulles
- Incuber 1mn
- Bien sécher la membrane entre deux papiers absorbants et la mettre dans une cassette entre deux films SaranTM, protéines vers le haut
- Utiliser un détecteur FUSION-FX7⁽¹⁷⁾ pour révéler les membranes

Solution pour préparation des gels de concentration (pour une solution d'acrylamide a 30 %)

		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%	H ₂ O MQ	2,7	5,3	8	10,6	13,3	15,9	21,1	26,5
	Acrylamide Mix 29:1	1	2	3	4	5	6	8	10
	Tris 1,5M pH 8,8 ⁽²¹⁾	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10% ⁽²²⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10% ⁽²³⁾	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8%	H ₂ O MQ	2,3	4,6	7	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
	Acrylamide Mix 29:1	1,3	2,7	4	5,3	6,7	8	10,7	13,4
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10%	H ₂ O MQ	2	4	5,9	7,9	9,9	11,9	15,8	20
	Acrylamide Mix 29:1	1,7	3,3	5	6,7	8,3	10	13,3	16,6
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12%	H ₂ O MQ	1,7	3,3	5	6,6	8,3	9,9	13,2	16,4
	Acrylamide Mix 29:1	2	4	6	8	10	12	14	20
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15%	H ₂ O MQ	1,2	2,3	3,5	4,6	5,7	6,9	9,2	11,4
	Acrylamide Mix 29:1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20	25
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
(1) Solution pour gel de séparation (acrylamide à 30%)									
		1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
Stacking	H ₂ O MQ	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
	Acrylamide Mix 29:1	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1	1,3	1,7
	Tris 0,5M pH 6,8 ⁽²⁴⁾	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1	1,25
	SDS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
	APS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
	TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

Tampon de migration 10x concentré (pour 1 litre) :

Tris 250 mM 30g
Glycine 1,92 M 144g
SDS 1% (p/v) 10g

PH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl ; conserver à 4°C),

A utiliser 1X concentré : diluer 100ml de la solution 10X et compléter à 1 litre (Utiliser à température ambiante).

(2) Sigma-Aldrich

(3) Low Molecular Weight ; LMW - Amersham Pharmacia

(4) Membrane de polyvinylidene difluoride, porosité 0,45µm (Biorad)

(5) Biorad

(6) **Tampon de transfert 10X (pour 1 litre) :**

Tris 480 mM, 58.1g
Glycine 390 mM 29,3g
SDS 0,375% (13mM) 3,75

PH~9,2 (ne pas ajuster avec HCl ; conserver à 4°C).

A utiliser 1X concentré : diluer 100ml de la solution 10X+200ml d'éthanol 100% et compléter à 1 litre (Utiliser froid)

(7) Papier buvard d'épaisseur 1 mm (blotting paper, Sigma-Aldrich)

(8) Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (BioRad)

(9) Appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot® SD (Biorad)

(10) Solution aqueuse de Rouge Ponceau S à 0,2% (p/v), acide acétique 0,1% (v/v), filtrée 0,2µm, 4°C)

(11) **Solution de TBST** (Tris-Buffered Saline Tween-20) : **diluer 100ml de la solution TBS 10X + qsp H2O MQ 1**

litre + 1ml de Tween 20 à 0,1%. TBS 10X (pour 1 litre) → Tris 200 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,4, qsp H2O MQ 1 litre
(à ajuster avec HCl ;conserver à 4°C)

(12) Voir fiche « liste des anticorps primaires utilisés en western blot »

(13) Voir fiche « liste des anticorps secondaires utilisés en western blot »

(14) Amersham Pharmacia Biotech

(15) FUSION-FX7 fisher, S/N 10-201068

(16) **Tris-HCl 1,5M pH 8,8** : 18,165 g de Tris/100ml H2O MQ (ajuster à pH 8,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C)

(17) **SDS 10%** (sodium dodécylsulfate) : 10 g de SDS/100ml H2O MQ, sous agitation douce (conserver à température ambiante)

(18) **APS 10%** (ammonium persulfate) : 1g/10ml H2O MQ, aliquoter par 400µl (conserver à -20°C)

(19) **Tris-HCl 0,5M pH 6,8** : 6,055 g de Tris/100ml H2O MQ (ajuster à pH 6,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C)

6.3.1. Liste des anticorps primaires utilisés en western blot

Anticorps	Utilise pour	fournisseur	1 ^{er} anticorps	Host	2 ^{ème} anticorps	bloc age
ACADS	WB	Santa Cruz	1/700	goat	1/1000	Lait
Acetyl CoA Carboxylase (ACC)	WB	cell signaling	1/1000 Polyclonal	rabbit	1/2000	BSA
ACOT2	WB	Santa Cruz Biotechnology	1/300 Polyclonal	goat	1/1000	BSA
CARM1	WB	Cell signalling	1/700	rabbit	1/1000	BSA
Dimethyl-Arginine, asymmetric antibody (ADMA)	WB IP	Active Motif	1/1000 Polyclonal	rabbit	1/3000	BSA
ER	WB DUOLINK	Santa Cruz MC-20	1/1000 Polyclonal	rabbit	1/2000 WB 1/200DU	BSA
ERR	WB	Millipore	1/700	rabbit	1/1000	Lait
FABP	WB	Abcam	1/500 Monoclonal	mouse	1/1000	Lait
GCN5	WB	Abcam	1/500	mouse	1/1000	BSA
HADHA	WB	Abcam	1/2000	rabbit	1/3000	Lait
HERP(H-59)	WB	Santa Cruz Biotechnology	1/700 Polyclonal	rabbit	1/2000	BSA
HSP60	WB	Abcam	1/1000 Polyclonal	rabbit	1/3000	BSA
NDUFA10(C-14)	WB	Santa Cruz Biotechnology	1/700 Polyclonal	goat	1/1000	Lait
NDUFV2 (FL-249)	WB	Santa Cruz Biotechnology	1/700 Polyclonal	rabbit	1/1000	Lait
PGCalpha	DUOLINK	NOVUS Biologicals	1/200 Polyclonal	goat	-	BSA
Phospho - Ampk alpha (Thr 172)	WB	cell signaling	1/1000 Monoclonal	rabbit	1/2000	Lait
Phospho-Acetyl CoA Carboxylase (Ser 79)	WB	cell signaling	1/1000 Polyclonal	rabbit	1/2000	BSA
PPAR alpha	WB DUOLINK	Cayman	1/700 Polyclonal	rabbit	1/1000 WB 1/200DU	BSA
PPAR gamma	WB	Abcam	1/500	rabbit	1/2000	BSA
PPAR-PH S12	WB	Abcam	1/700	mouse	1/2000	BSA
PRMT1	WB	Cell signalling	1/700	rabbit	1/1000	BSA
Sirt1	WB	Santa Cruz (H-300)	1/500 Polyclonal	rabbit	1/2000	Lait

Anticorps	Utilise pour	fournisseur	1 ^{er} anticorps	Host	2 ^{eme} anticorps	Bloca ge
Acetylated-Lysine Antibody	IP	cell signaling	5µl polyclonal	rabbi t	-	-
alpha -SMA	WB IHC	Abcam	1/400 WB1/100IHC	rabbi t	1/2001	BSA
beta actin	WB	USBiological	1/1000	chick en	1/2000	Lait
BiP/GRP78	WB	cell signaling	1/1000 Polyclonal	rabbi t	1/3000	BSA
Caspase-1	WB	Abcam	1/500	rabbi t	1/2000	BSA
COL1A1	WB IHC	Santa Cruz Biotechnology	1/200 WB1/100IHC	goat	1/2000	BSA
COL1A2	WB IHC	Santa Cruz Biotechnology	1/200 WB1/100IHC	goat	1/2000	BSA
Glucokinase	WB IHC	Abcam	1/300 WB1/100IHC	rabbi t	1/2001	BSA
GLUT2	WB	Santa Cruz Biotechnology	1/500	rabbi t	1/2000	BSA
HNF4	WB DUOLINK	Abcam	1/1000 Monoclonal	mous e	1/3000 WB 1/200DU	BSA
IDH3A	WB	Abcam	1/1000 Monoclonal	rabbi t	1/2000	Lait
IL-1 beta	WB	Abcam	1/500	rabbi t	1/2000	BSA
IR-beta	WB	Santa Cruz Biotechnology	1/700	rabbi t	1/2000	BSA
MMP2	WB	Abcam	1/500	goat	1/2000	BSA
PGCalpha	WB	cell signaling	1/1000	rabbi t	1/2000	BSA
SREBP-1(C-20)	WB	Santa Cruz Biotechnology	1/700 Polyclonal	rabbi t	1/2000	BSA
TGF beta-1	IHC	Santa Cruz Biotechnology	1/100	goat	1/2000	BSA
TIMP-1	WB	Santa Cruz Biotechnology	1/200	mous e	1/2000	BSA

6.3.2. Liste des anticorps secondaire utilises en western blot

1. Donkey Anti mouse IgG – HRP sc 2314 Santa Cruz Biotechnology
2. Donkey Anti Rabbit IgG – HRP sc 2313 Santa Cruz Biotechnology
3. Donkey Anti goat IgG – HRP sc 2020 Santa Cruz Biotechnology
4. Goat Anti chicken IgG – HRP 6100 Southern Biotech

6.4. Déshybridation de membrane western blotting (STRIPPING)

Principe: Les membranes ayant déjà été incubées avec des anticorps primaire et secondaire peuvent être ré-incubées avec un autre anticorps après avoir été déshybridées

- Chauffer le tampon dans un bain marie à 50°C sous hotte
- Sous hotte, remplir un bac en verre de tampon de déshybridation⁽¹⁾ chaud
- Immerger les membranes pendant 30 mn à 50°C en agitant de temps en temps
- Rincer rapidement les membranes à l'eau distillée
- Rincer ensuite avec du TBST⁽²⁾ 2x10 mn sous agitation
- Reprendre le protocole de western à partir du tampon bloquant

(1) *Tampon de déshybridation* : Pour 1 litre

100 mM 2-mercaptoethanol	7 ml
2 % SDS	20g
62,5mM Tris HCL pH 6,7	7,57g

(2) *TBST 10x* : Pour 1 litre

Tris 200 mM	24,2g	} pH 7,4 à ajuster avec HCl
NaCl 1,5 M	87,5g	
		} qsp H ₂ O MilliQ
Conserver à 4°C		

6.5. Immunoprécipitation⁽¹⁾

Principe : L'immunoprécipitation est une méthode largement utilisée pour l'analyse d'antigènes cibles dans un complexe de protéines. Les protéines d'intérêt sont concentrées par Immunoaffinité et purifiées en une étape grâce à un anticorps spécifique. Les protéines immunoprécipitées sont actives et permettent une analyse de leur activité enzymatique, leurs interactions et de leurs modifications structurales.

Préparation des solutions

Wash buffer 1 :

<i>Composants du kit</i>	Concentration finale (25ml)
5 ml core buffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5
3,75 ml NaCl	150 mM NaCl
2,5 ml detergent mix	1% NP-40 0,5% sodium deoxycholate
1 complete tablet	1 tablet / 25-50 ml
+ H2O qsp 25ml	

Wash buffer 2 :

<i>Composants du kit</i>	Concentration finale (50ml)
10 ml core buffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5
25 ml NaCl	500 mM NaCl
0,5 ml detergent mix	0,1% NP-40 0,05% sodium deoxycholate
+ H2O qsp 50ml	

Wash buffer 3 :

<i>Composants du kit</i>	Concentration finale (25ml)
1 ml core buffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
0,25 ml detergent mix	0,1% NP-40 0,05% sodium deoxycholate
+ H2O qsp 25ml	

Immunoprécipitation de la protéine cible

- Ajouter 25-50 µl de la suspension homogène d'agarose protéine A ou G selon anticorp à l'échantillon (1-3 ml) et incubé 3h (ou toute la nuit) à 2-8 °C en agitation lente.
- Vortexer les tubes puis centrifuger à 12,000 g pendant 20 sec à +4°C. Transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- Ajouter à l'échantillon 5 µl d'anticorps (volume à adapter) et agiter doucement 2h à 4°C.
- Ajouter 25 µl de suspension homogène d'agarose protéine A ou G à l'échantillon et incubé 3h (ou toute la nuit) à 2-8 °C en agitation lente.
- Vortexer les tubes puis centrifuger à 12,000 g pendant 20 sec à +4°C.
- Eliminer le surnageant, ajouter 500 µl de Wash buffer 1, vortexer et incubé 20 min à 4°C sous agitation lente.
- Répéter les étapes précédant.
- Vortexer les tubes puis centrifuger à 12,000 g 20 sec 4°C. Enlever le surnageant, ajouter 500 µl de Wash buffer 2, vortexer et incubé 20 min à 4°C sous agitation lente.
- Répéter les étapes précédant.
- Vortexer les tubes puis centrifuger à 12,000 g 20 sec 4°C. Enlever le surnageant, ajouter 500 µl de Wash buffer 3, vortexer et incubé 20 min à 4°C sous agitation lente.
- Eliminer le surnageant.

Préparation pour gel d'électrophorèse

- Remettre en suspension le culot dans 100 µl de tampon Laemmli 1X (ou 50µl de tampon Laemmli 2X + 50 µl d'H₂O).
- Chauffer 3min à 100°C.
- Centrifuger à 12000 g 20 sec.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- Laisser refroidir l'échantillon à température ambiante avant de déposer dans le gel.

1. (Immunoprecipitation Kit (Protein A/G) Roche)

7. RT-PCR

7.1. Extraction des ARN totaux (RNeasy® Mini PLUS kit, Qiagen)

Le tumor necrosis factor alpha (TNF α) est une importante cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'inflammation systémique et dans la réaction de phase aiguë. On dénombre deux formes de TNF α : une soluble et une liée à la membrane cellulaire. Ces deux formes sont actives, mais ont des affinités différentes pour les récepteurs du TNF (TNFR-1 et TNFR-2).

- Broyer les tissus dans un mortier en présence d'azote liquide
- Placer les tissus broyés dans un tube de 2ml et ajouter 1 ml de Qiazol⁽¹⁾ (sous une hotte aspirante)
- Homogénéiser à l'aide d'une seringue de 1 mL en faisant 10 allers-retours et laisser reposer à température ambiante (TA) pendant 5 minutes
- Ajouter 200 μ l de chloroforme, secouer vigoureusement et laisser à TA pendant 2-3 minutes
- Centrifuger les tubes à 12000g pendant 15 minutes à 4°C
- Transférer la phase aqueuse (supérieure, contenant les ARN) un tube propre
- Ajouter 600 μ L d'éthanol à 70% (préalablement filtré à 0,2 μ m) et mélanger par aspiration-refoulement (ne pas vortexer)
- Transférer 700 μ l de la solution sur une colonne munie d'un filtre⁽²⁾ et adaptée sur un tube
- Centrifuger les tubes à 8000g pendant 15 secondes à TA puis vider le contenu du fond du tube.
- Transférer le reste de la solution contenant l'éthanol (capacité maximal de la colonne : 700 μ l)
- Centrifuger les tubes à 8000g pendant 15 secondes à TA puis vider le filtrat.
- Ajouter 350 μ L de tampon RW1 (fourni avec le kit) dans la colonne et centrifuger à 8000g pendant 15 secondes à TA puis vider le filtrat.
- Ajouter 80 μ L de DNase⁽³⁾ dans la colonne et incubé 15 minutes à T ambiante
- Ajouter 350 μ L de tampon RW1 et centrifuger à 8000g pendant 15 secondes à TA puis vider le filtrat.
- Ajouter 500 μ L de tampon RPE (Ajouter de l'éthanol au tampon RPE avant utilisation soit 44 ml d'éthanol 70% RNase-free dans les 11 ml de tampon RPE) et centrifuger à 8000g pendant 15 secondes à TA puis vider le filtrat

- Ajouter une nouvelle fois 500µL de tampon RPE et centrifuger à 8000g pendant 2 minutes à T ambiante puis éliminer le filtrat
- Centrifuger les tubes à 12000g pendant 1 minute à T ambiante
- Transférer la colonne sur un tube de 1,5 ml (hors kit), ajouter 40µl de tampon d'élution⁽⁴⁾ et centrifuger à 8000g pendant 1 minute à T ambiante
- Retirer la colonne du tube, l'ARN est au fond du tube
- Quantifier au spectrophotomètre à 260 nm et 280 nm et analyser les ARN sur gel d'agarose
- Stocker l'ARN à -80°C

(1) Qiazol lysis reagent™ (Qiagen, Courtaboeuf, France)

(2) RNeasy Mini Spin Column™ (Qiagen)

(3) DNase set (Qiagen)

(4) RNase free water (Qiagen)

7.2. Dosage des ARN par Spectrophotometre

- Diluer les échantillons d'ARN au 1/30 soit 2µl d'ARN dans 58µl d'eau Milli-Q
- Les mesures des densités optiques (DO) se font sur un spectrophotomètre UVIKON 923 (Kontron instruments)
- Prendre les deux cuves en quartz propre dans laquelle on dépose 60µl (volume minimum pour lire une DO) d'eau Milli-Q afin de faire le blanc
- Déposer les échantillons d'ARN (soit 60µl) dans une autre cuve en quartz et prendre les mesures à 260nm (acide nucléique) et 280nm (protéine). Pour avoir une bonne estimation de la concentration, la DO doit être comprise entre 0,1 et 1 unité de DO (si on se situe en dehors de cet intervalle, il faut diluer ou concentrer les échantillons)
- Le rapport de DO 260/280 doit être compris entre 1,8 et 2 pour considérer l'échantillon de qualité pur (Un ratio inférieur signifie une contamination par des protéines. Un ratio supérieur indique une dégradation des ARN)
- Pour calculer la concentration d'ARN : 1 mesure de DO=40µg/ml d'ARN et ne pas oublier de multiplier le résultat trouvé par la dilution choisie
- Faire des aliquotes de 1 µg d'ARN pour faire les RT-PCR

7.3. Transcription inverse des ARN (RT-PCR)

Principe : La RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) est une technique qui associe une transcription inverse (RT) suivie d'une PCR. Elle permet de synthétiser le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse).

NB : Utilisation du kit QuantiTect Reverse Transcription de Qiagen

Préparation des échantillons

- A partir des dosages fait précédemment, préparer un volume d'ARN équivalent à 1µg par échantillons et compléter avec de l'eau (RNase free water) jusqu'à 12µl
- Ajouter dans chaque tube 2µl de tampon gDNA Wipeout®
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement à la centrifugeuse de paillasse
- Incuber 9 minutes à 42°C au Thermocycleur
- Mettre les tubes rapidement dans la glace

Préparation des réactifs de la RT-PCR

- Dans un microtube stérile, mélanger dans l'ordre :

	<i>Pour 1 tube (échantillons)</i>	<i>Témoin négatif</i>
Quantiscript RT Buffer	4µl	4µl
RT Primer Mix	1µl	1µl
Quantiscript Reverse	1µl	0µl
Transcriptase (enzyme)		
ARN+gDNA Wipeout	14µl	14µl

- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement
- Placer dans le Thermocycleur préchauffé
- Sélectionner le programme RT suivant : 15 minutes à 42°C, 3 minutes à 95°C pendant 1 cycle
- Conserver les ADNc produit à -20°C.

7.4. PCR semi-quantitative en temps réel

Principe : cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent.

NB : Utilisation du Kit Quantitect™ SYBR® Green PCR de Qiagen

Préparation du mix de PCR en temps réel

- Préparer le mélange réactionnel suivant à l'abri de la lumière et transférer 19 µL pour POL2 ou 18 µL pour TNFα par puits⁽¹⁾

<i>Réactifs</i>	<i>Concentration finale</i>
RNase free water	-
Amorce S (10µM)	1µM
Amorce AS (10µM)	1µM
MgCl ₂ (10mM)	De 2,5mM à 5mM selon les amorces
QuantiTect SYBR Green PCR (2x)	1x

- Ajouter 1 ou 2 µL d'ADNc dilué ou non selon pour faire une gamme étalon ou pour quantifier un échantillon
- Insérer la plaque dans le I cyclor system ⁽¹⁾ et vérifier qu'il y a le même volume dans chaque puits

Conditions d'amplification et amorces choisies sur le I cycler system

Gène	Nombre de cycle	Étapes	Température	Durée
POL2	1	Activation de la Taq polymérase	95°C	15 minutes
	45	Dénaturation	94°C	15 secondes
		Hybridation	55°C	20 secondes
		Elongation	72°C	15 secondes
TNF α	1	Activation de la Taq polymérase	95°C	15 minutes
	45	Dénaturation	94°C	15 secondes
		Hybridation	54°C	20 secondes
		Elongation	72°C	15 secondes

Gène	Amorce Sens (5'→3') ⁽²⁾	Amorce Anti-sens (5'→3') ⁽²⁾	Taille de l'amplicon (pb)
POL2	GCA TTA ACA TCA GGA ACA ATA AAG GC	GAT CTC TCT AAA GTT GAC CTC ATT GG	90
TNF α	ATG GGC TCC CTC TCA TCA GT	GCT TGG TGG TTT GCT ACG AC	106

Calcul et Interprétation des résultats

- Utiliser le logiciel RelQuant software⁽²⁾ après avoir vérifié que le pic de la courbe de fusion correspond bien à la taille de l'amplicon sur gel.
- Les résultats seront exprimés en unité arbitraire.

(1) I cycler system: appareil thermocycler à fluorescence Bio-Rad

(2) Les oligonucléotides sont commandés chez Eurogentec. Les oligonucléotides 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>.

7.5. Préparation d'un gel d'agarose pour analyse qualitative d'ARN ou ADN par électrophorèse

- Pour préparer un grand gel 1x (pour 15/20 échantillons) → ajouter 0,8g d'agarose dans 80ml de tampon TBE⁽¹⁾ (Tris-Borate-EDTA) 1X
- Pour préparer un grand gel 1,5x (pour 15/20 échantillons) → ajouter 1,2g d'agarose dans 80ml de tampon TBE⁽¹⁾ (Tris-Borate-EDTA) 1X
- Pour préparer un petit gel 1x (pour 8 échantillons) → ajouter 0,5g d'agarose dans 50ml de tampon TBE 1X
- Pour préparer un petit gel 1,5x (pour 8 échantillons) → ajouter 0,75g d'agarose dans 50ml de tampon TBE 1X
- Prendre une cuve d'électrophorèse⁽²⁾ et positionner le peigne en Téflon
- Chauffer le mélange à la micro-onde afin de dissoudre l'agarose jusqu'à ce qu'il soit transparent (Attention à ne pas faire bouillir le mélange car il y a un risque de projection)
- Ajouter 1 goutte de BET (bromure d'éthidium) dans la solution (attendre que la solution refroidisse (environ 50°C) avant de l'ajouter) afin d'obtenir une concentration de 0,5 µg/ml et homogénéiser
- Couler le gel dans la cuve et laisser polymériser
- Déposer dans les puits du gel, 10µl d'échantillon mélangés à 2µl de solution de dépôt⁽³⁾ ainsi que les marqueurs de taille⁽⁴⁾.
- Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu (pôle négatif en haut de la cuve et pôle positif en bas de la cuve)
- Faire migrer les échantillons et les marqueurs de taille sous une tension constante selon la taille du gel : 80 volts pour un petit gel pendant 50min et 110 volts pour un grand gel pendant 50 min
- Les échantillons contenus dans le gel sont visualisés sur plaque UV (312nm) par Image Master™ VDS

(1) **Tampon TBE 10X** → Tris 890mM, acide borique 890mM et EDTA 20mM à pH=8,2-8,3 (ajuster le pH si nécessaire avec de l'acide acétique glaciale). Pour du tampon TBE 1X, diluer 100ml de TBE 10X dans 900ml d'eau distillée pour 1 litre.

(2) Wide Mini-Sub™ Cell (Bio-Rad)

(3) **Solution de dépôt 5X** → Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v) EDTA à 0,1mM (pH=8,0) et SDS 0,5% (p/v) (Sigma)

- (4) Pour faire aliquots de marqueur de taille → 10µl de marqueur+90µl d'eau miliQ+20µl de bleu (1 aliquot=12µl)

8. Géotypages

Géotypage du polymorphisme des *MTHFR* 677C>T, *MTHFR* 1298A>C, *MTR* 2798 A>G et *TCN2* 776 C>G a été réalisé par LightCycler 480 (Roche Molecular Biochemicals) [320].

Extraction de l'ADN génomique du sang

Kit commercial Bac Nucleon[®] 1

Lyse des Globules Rouges

- Pipeter 7-10 mL de sang total dans un tube Eppendorf[®] (2)
- Rajouter 4 volumes de réactif A pour 1 volume de sang
- Mélanger 4 minutes à température ambiante
- Centrifuger 5 minutes à 2800 rpm
- Rejeter le surnageant
- Rajouter 1 mL de réactif A
- Mettre dans la glace 5 minutes
- Centrifuger 5 min à 2800 rpm
- Rejeter le surnageant
- Garder le culot

Destruction des Membranes des Globules Blancs

- Rajouter au culot 2 mL du réactif B
- Vortexer jusqu'à dissocier le culot
- Rajouter 500 µL de perchlorate ¹
- Agiter par retournement 7 fois

Élimination des Protéines

- Rajouter 2 mL de chloroforme ⁽³⁾
- Agiter par retournement 7 fois
- Rajouter 250 µL de résine ¹
- Centrifuger 3 minutes à 2800 rpm

Récupération de l'ADN

- Récupérer la phase supérieure à la résine

- Rajouter 2.5 fois le volume récupéré d'éthanol 4 absolu froid
- Récupérer le filament d'ADN dans un tube Eppendorf® ⁽²⁾
- Eluer l'ADN avec 100 µL de tampon Tris ¹
- Agiter

1) Kit Nucleon Bac 3®. Ref .RPN8512 Amersham-Pharmacia-Biotch. Parc technologique, rue René Razel
91898 Orsay Cedex France

2) Eppendorf

3) Sigma Ref C-2432

4) RP Normapur™ Prolabo Ref 20821321

8.1. MTHFR 677 C>T rs59514310 (ou rs1801133) et 1298 A>C1801131

méthylènetétrahydrofolate réductase

Technique FRET Light Cycler 480®

Amorces ⁽¹⁾

MTHFR 677

Sens = 5' TGGCAGGTTACCCCAAAGG 3'

T_m = 60°C T_m=59°C

Antisens = 5' TGATGCCCATGTCCGGTGC 3'

T_m = 58°C

MTHFR 1298

Sens = 5' CTTTTGGGAGCTGAAGGACTACTAC 3'

T_m = 74°C T_m=71°C

Antisens = 5' CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG 3'

T_m = 68°C

Sondes fluorescentes ⁽²⁾

MTHFR 677

Probe Flu 5' TGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCT 3'

T_m = 112°C T_m=85°C

Probe Red 5' CGGGAGCCGATTCATCAT 3'

T_m = 58°C

MTHFR 1298

Probe Flu 5' AAGGAGGAGCTGCTGAAGATGTGGGGGAGGAGCT 3'

T_m = 112°C T_m=88°C

Probe Red 5' ACCAGTGAAGAAAGTGTCTTTGA 3'

T_m = 64°C

	μl	Concentration finale	X (Nb de capillaires ³ + 1)
H ₂ O ⁽⁴⁾	2.2		
MgCl ₂ ⁽⁵⁾ (25mM)	0.8	2mM	
Amorce sens MTHFR 677C>T 4 picoM/ μl	0.5	0.2 μM	
Amorce anti-sens 677C>T 4 picoM/ μl	0.5	0.2 μM	
Amorce sens MTHFR 1298A>C 4 picoM/ μl	0.5 de SF	0.2 μM	
Amorce anti-sens MTHFR A>C 4 picoM/ μl	0.5 de SF	0.2 μM	
PREPARER LES SOLUTIONS FILLES (SF) A PARTIR DES SOLUTIONS MERES (SM) FEUILLES AMORCES			
Probe Flu MTHFR 677C>T 4 picoM/ μl	0.5 de SM	0.2 μM	
	SM=1+24 μl ou 2+48 μl H ₂ O		
Probe Red MTHFR C>T 8 picoM/ μl LC Red640	0.5 de SM	0.4 μM	
	SM=2+23 ou 4+46 μl H ₂ O		
Probe Flu MTHFR 1298A>C 8 picoM/ μl	0.5 de SM	0.2 μM	
	SM=1+24 μl ou 2+48 μl H ₂ O		
Probe Red MTHFR A>C 8 picoM/ μl LC Red705	0.5 de SM	0.4 μM	
	SM=2+23 ou 4+46 μl H ₂ O		
Kit LC hybridization probe ⁽⁵⁾	1 de SM		
	SM=60 μl deb dans a		

Déposer 8 μl de mix dans chaque capillaire et ajouter ensuite 2 μl de DNA (concentration comprise entre 50 et 100ng /analyse).

Programme d'amplification PCR ⁽⁶⁾ (F2/F3)

DENATURATION		Type : None		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en min	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	10 : 00	4,4	None	

PCR		Type : Quantification		Cycles : 45	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	10	4,4	None	
2	55	10	2,2	Single	
3	72	10	4,4	None	

COURBES DE FUSION		Type : Melting curves		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	30	4,4	None	
2	45	20	2,2	None	
3	73	---	----	Continu	

REFROIDISSEMENT		Type : None		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	40	30	2,2	None	

Résultats ⁽⁷⁾ :

Selon les Températures de fusion :

- Lecture en F2

<i>MTHFR 677 C>T</i>	homozygote sauvage	CC	63°C
	homozygote muté	TT	55°C
	hétérozygote	CT	55°C+64°C

- Lecture en F3

<i>MTHFR 1298 A>C</i>	homozygote sauvage	AA	63°C
	homozygote muté	CC	60°C
	hétérozygote	AC	61°C

1) Synthétisées dans le Secteur Commun de Biologie Moléculaire ou par la société Tib MolBiol. Syntherselabor GmbH. D-12103 Berlin, Germany.

2) Tib MolBiol. Syntherselabor GmbH. D-12103 Berlin, Germany.

3) H₂O PCR Grade. Réf. 03315932. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

4) LC capillaries 20µl. Réf. 11909339. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

5) LC Fast Start Hyb Pr. Réf. 12239272. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

6) Light Cycler®. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

7) Calibration tous les 6 mois par le kit Color Compensation Set Réf. 2158850. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

Technique en Light Cycler®, modifiée de Nakamura et al. 2002.

8.2. MTR 2756 A>G rs1805087, *Methionine Synthase*

Technique FRET en Light Cyclers 480®

Amorces ⁽¹⁾

sens MTR1 = 5' TATGGCTATCTTGCATTTTCA G 3'

antisens MTR2 = 5' TTTACACTCCTCAAAAACCATT 3'

T_m = 60°C

T_m=58°C

T_m = 56°C

Sondes fluorescentes ⁽²⁾

Probe Flu = 5' AGACTCATAATGGCCCTGTCTATAT 3'

Probe Red = 5' TCATATTCTTCCATGATTTTCCTCAAAGTATTCATCCT3'

T_m = 72°C

T_m=85°C

T_m = 98°C

	µl/tube	Concentration finale	X (Nb de capillaires ⁽³⁾ + 1)
H ₂ O ⁽⁴⁾	3.2		
MgCl ₂ ⁽⁵⁾ (25mM)	0.8	2mM	
Amorce sens (5µM)	1	0.5µM	
Amorce antisens (5µM)	1	0.5µM	
Probe Flu (4µM)	0.5	0.2µM	
	(SM=1+24µL ou 2+48µL H ₂ O)		
Probe Red (8µM)	0.5	0.4µM	
	(SM=2+23 µL ou 4+46µL H ₂ O)		
Kit LC hybridization probe ⁽⁶⁾	1		
(60µl de b dans a)			

Déposer 8µl de mix dans chaque capillaire et ajouter ensuite 2µl de DNA (concentration comprise entre 50 et 100 ng/analyse)

Programme d'amplification PCR ⁽⁷⁾ (Programme : F2/F1)

DENATURATION		Type : None		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en min	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	10 :00	4,4	none	

PCR		Type : Quantification		Cycles : 50	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	10	4,4	None	
2	50	15	2,2	Single	
3	72	15	4,4	None	

COURBES DE FUSION		Type : Melting curves		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	5	4,4	None	
2	45	10	2,2	None	
3	95	---	---	Continuous	

REFROIDISSEMENT		Type : None		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	40	30	2,2	None	

Résultats :

Selon la température de fusion :

Homozygote sauvage	AA	56°C
Homozygote muté	GG	62°C
Hétérozygote	AG	56°C+62°C

1) Synthétisées dans le Secteur Commun de Biologie Moléculaire ou par la société Tib MolBiol. Syntherselabor GmbH. D-12103 Berlin, Germany.

2) Tib MolBiol. Syntherselabor GmbH. D-12103 Berlin, Germany.

3) H₂O PCR Grade. Réf. 03315932. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

4) LC capillaries 20µl. Réf. 11909339. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

5) LC Fast Start Hyb Pr. Réf. 12239272. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

6) Light Cycler®. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

7) Calibration tous les 6 mois par le kit Color Compensation Set Réf. 2158850. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

Technique en Light Cycler® mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brabois

8.3. MTRR 66 A>G rs1801394, *Methionine Synthase Reductase*

Technique FRET en Light Cyclor 480®

Amorces ⁽¹⁾

sens MTRR = 5' gCA AAg gCC ATC gCA gAA gAC AT 3' T_m = 60°C T_m=58°C
 antisens MTR2 = 5' gTg AAg ATC TgC AgA AAA TCC ATg TA 3' T_m = 56°C

Sondes fluorescentes ⁽²⁾

Probe Flu = 5'CCA CAg CTT gCT CAC ACA TTT C 3' T_m = 72°C T_m=85°C
 Probe Red = 5' CTg CgA Tgg CCT TTg CCT gTC CCT 3' T_m = 98°C

	µl/tube	Concentration finale	X (Nb de capillaires + 1)
H ₂ O ⁽³⁾	3.2		
MgCl ₂ ⁽⁴⁾ (25mM)	0.8	2mM	
Amorce sens (5µM)	1	0.5µM	
Amorce antisens (5µM)	1	0.5µM	
Probe Flu (4µM)	0.5	0.2µM	
	(SM=1+24µL ou 2+48µL H ₂ O)		
Probe Red (8µM)	0.5	0.4µM	
	(SM=2+23 µL ou 4+46µL H ₂ O)		
Kit LC hybridization probe ⁽⁵⁾	1		
	(60µl de b dans a)		

Déposer 8µl de mix dans chaque capillaire et ajouter ensuite 2µl de DNA (concentration comprise entre 50 et 100 ng/analyse)

Programme d'amplification PCR ⁽⁶⁾ (Programme : F2/F1)

DENATURATION		Type : None		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en min	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	10 :00	4,4	none	

PCR		Type : Quantification		Cycles : 50	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	10	4,4	None	
2	58	15	2,2	Single	
3	72	15	4,4	None	

COURBES DE FUSION		Type : Melting curves		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	20	4,4	None	
2	50	180	2,2	None	
3	70	---	---	Continuous	

REFROIDISSEMENT		Type : None		Cycles : 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	40	30	2,2	None	

Résultats : Selon la température de fusion :

Homozygote sauvage	AA	57°C
Homozygote muté	GG	62°C
Hétérozygote	AG	57°C+62°C

1) Synthétisées dans Secteur Commun de Biologie Moléculaire ou par la société Tib MolBiol. Syntherselabor GmbH. D-12103 Berlin, Germany.

2) Tib MolBiol. Syntherselabor GmbH. D-12103 Berlin, Germany.

3) H2O PCR Grade. Réf. 03315932. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

4) LC capillaries 20µl. Réf. 11909339. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

5) LC Fast Start Hyb Pr. Réf. 12239272. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

6) Light Cycler®. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

Technique en Light Cycler® mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brabois

8.4. TCN2 776C>G - Codon 259 rs1801198, TC II Transcobalamine

Technique FRET en Light Cyclers 480®

Amorces ⁽¹⁾

sens CAS = 5' CTC ATg ACT TCC CCC ATg CC 3'
 sens SIS = 5' CTC ATg ACT TCC CCC ATg Cg 3'
 antisens ERGE = ' TgC Cag ACA gTC Tgg gAA gA 3'

Préparation de la PCR ⁽²⁾

	µl	Concentration finale
DNA 250 ng/µl	1	250 ng
Tampon PCR 10X	5	1 X
MgCl ₂ 50 mM	2	2 mM
dNTP 1.25 mM	8	0.2 mM
Amorce sens CAS ou SIS 10µM	0.75	0.2 µM
Amorce antisens ERGE 10µM	0.75	0.2 µM
TaqDNA 5 U/µl	0.25	1.25 U
H ₂ O ⁽³⁾	32.25	

QSP 50 µl

DENATURATION		Type : None	Cycles : 1		
Segment	°C.	Temp en min	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	10 :00	4,4	none	

PCR		Type : Quantification	Cycles : 50		
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	10	4,4	None	
2	61	10	2,2	Single	
3	72	15	4,4	None	

COURBES DE FUSION		Type : Melting curves	Cycles : 1		
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	95	20	4,4	None	
2	68	60	2,2	None	
3	95	---	---	Continuous	

REFROIDISSEMENT		Type : None	Cycles : 1		
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Acquisiton Mode = Type	
1	40	30	2,2	None	

Resultats : Selon la température de fusion :

Lire simultanément les courbes des 2 puits pair et impair correspondant au même patient (amorce Cas : sauvage et amorce Sis : muté).

TC2 CODON259	CAS	SIS	génotypage	
Homozygote sauvage	+	-	PRO	CCT/CCT
Homozygote muté	-	+	ARG	CGT/CGT
Hétérozygote	+	+	PRO/ARG	CCT/CGT

1. Synthétisées dans le Secteur Commun de Biologie Moléculaire CHU Brabois

2. Kit 18038-026. Invitrogen Sarl, BP 96, 95613 Cergy Pontoise, Cedex, France

3. Réf. dNTP100mM : mélange dATP, dCTP, dGTP, et dTTP. Prendre 12.5µL de chaque solution et ajouter 950 µL de H₂O milliQ Sigma Aldrich BP 701, 38297 St Quentin Fallavier Cedex, France

9. Analyses Statistiques

Les données continues ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écartypes ou en médiane (25ème-75ème percentile), en fonction de la distribution des données. La prévalence a été rapportée en pourcentage. Nous avons utilisé les tests Mann-Whitney et U-test, pour évaluer les différences des médianes et des moyennes entre les deux groupes. Le coefficient de corrélation entre les deux variables a été calculé à l'aide de l'estimation ponctuelle du coefficient de Pearson. Son intervalle de confiance est déterminé par la transformée de Fisher. La corrélation de plusieurs variables a été testée par une analyse de régression multiple. Des données brutes ont été comparées en employant l'analyse d'ANOVA. Les différentes activités enzymatiques ou les métabolites liés au cycle de l'homocystéine sont analysés entre eux par des tests de régression multiple ou par une corrélation univariée (test Z). Pour les variables à distribution asymétrique, une transformation logarithmique a été réalisée avant l'analyse de régression multiple.. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives. Les corrections pour les comparaisons multiples ont été faites en utilisant le test de Bonferroni. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Stata version 12,0 SE (Stata Corp, Texas, USA).

Résumé : Au cours du développement, les modifications du métabolisme des monocarbones liées à une malnutrition peuvent être délétères autant pour la mère que pour le nouveau-né. De plus, les conséquences à long terme d'une carence en période gestationnelle et périnatale sont mal connues, notamment en ce qui concerne les pathologies cardiaques et hépatiques. Nous avons mis en œuvre un modèle nutritionnel de rates adultes carencées en donneurs de groupements méthyles (vitamines B12, folates et choline) avant la gestation. Ces micronutriments participent à la régulation de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine. Afin de se placer dans un contexte de physiopathologie, proche de la situation clinique évaluée, nous avons choisi d'alimenter les rates avec un régime carencé un mois avant la mise en accouplement et de poursuivre ce régime pendant la période d'allaitement. Nous avons évalué les répercussions métaboliques et fonctionnelles du régime sur les tissus myocardique et hépatique, chez le nouveau né à 21 jours. Nous avons étudié l'effet de cette carence en groupements méthyles sur le métabolisme énergétique lipidique et sur la carnitine. **Conséquences de la carence au niveau myocardique :** Le régime carencé en donneurs de méthyles induit une hypertrophie cardiaque avec une augmentation de l'épaisseur du myocarde et un agrandissement des cardiomyocytes. L'étude protéomique du myocarde et l'analyse des données par bioinformatique identifient PGC-1 α , PPAR α et ERR α comme principaux déterminants des variations d'expression des protéines du métabolisme oxydatif mitochondrial. Nous avons observé une diminution d'expression de PPAR α et ERR α et une inactivation de PGC1 α par hypométhylation et hyperacétylation, en lien avec une diminution d'expression de PRMT1 et de SIRT1 et une augmentation de SAH. **Conséquences de la carence au niveau du foie :** La carence s'accompagne de l'apparition d'une stéatose hépatique microvésiculaire, avec une élévation des taux tissulaires de lipides et de triglycérides. De plus, nous avons observé une augmentation des marqueurs pro inflammatoires sans augmentation des marqueurs de fibrose. A cet égard, nos résultats ont montré qu'un déficit de synthèse de carnitine, impliquée dans la beta-oxydation et le stockage des acides gras, jouerait un rôle déterminant dans la pathogenèse de la stéatose chez le nouveau-né. Il existe également une dérégulation du métabolisme oxydatif des acides gras, avec diminution d'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire, qui résulte d'une hypométhylation de PGC1 et d'une diminution d'expression de PPAR α , ER α et ERR α . En conclusion, nos résultats montrent que la carence maternelle en donneurs de méthyles, induit des modifications sur la fonction de PGC-1 α . Ces modifications sont associées à des altérations de l'oxydation des acides gras et sur la fonction mitochondriale pendant la période néonatale, ce qui entraîne l'accumulation de lipides dans les tissus myocardique et hépatique. Le lien entre la carence en donneurs de méthyles et l'altération de la méthylation de PGC-1 α modifie les activités des enzymes impliquées dans la méthylation et l'acétylation de PGC-1. Ces enzymes sont aussi liées à des modifications épigénomiques qui modulent la fonction et l'expression des protéines. Nos résultats sont en accord avec les études de population de Barker et al, qui suggèrent que la nutrition maternelle pendant les étapes précoces de la vie est corrélée avec le risque de maladies cardio-vasculaires dans la vie adulte indépendamment des autres facteurs de risque.

Mots Clés: Acide Folique, Vitamine B12, Homocystéine, Métabolisme, Cœur, Foie, Stéatose

Summary: During development, changes in carbon metabolism related to malnutrition may be deleterious for both the mother and the newborn. In addition, long-term consequences of a methyl deficiency gestational and prenatal are poorly understood. We are particularly interested in studying these effects on the heart and liver. We have used a nutritional model of adult rats deficient in methyl donors (vitamin B12, folate and choline) before pregnancy. To be placed in a context of pathophysiology, close to the clinical situation, we chose to feed the rats with a methyl deficient diet one month before mating and continue this diet during the suckling period. We evaluated the metabolic and functional effects of this diet on myocardial and hepatic tissues, in the newborn pups in 21 days old. We studied the effects of methyl deficient diet on lipid and energy metabolism and carnitine. **Consequences of the deficiency at the myocardial:** The diet deficient in methyl donors induces cardiac hypertrophy with an increase in myocardial thickness and enlargement of cardiomyocytes. The proteomics analysis of the bioinformatics data identifies PGC-1 α , ERR α and PPAR α as major determinants of changes in protein expression of mitochondrial oxidative metabolism. We observed a decreased expression of PPAR α and ERR α and an inactivation of PGC1 α by hypomethylation and hyperacetylation, in conjunction with a decrease in the expression of PRMT1 and SIRT1 and increased the level of SAH. **Consequences of the deficiency at liver:** Deficiency is accompanied by the appearance of microvesicular hepatic steatosis, with elevated tissue levels of lipids and triglycerides. Increase of inflammation was observed in this model with no changes in fibrosis score. In this respect, our results showed a deficiency of carnitine synthesis, involved in the beta-oxidation and storage of fatty acids, play a role in the pathogenesis of hepatic steatosis in the newborn. There is also a deregulation of the oxidative metabolism of fatty acids, with decreased activity of complex I and II of the respiratory chain, resulting in hypomethylation of PGC1 and decreased expression of PPAR α , ER α and ERR α . In conclusion, our results show that maternal deprivation in methyl donors impaired the function of PGC-1 α . These changes are associated with alterations in fatty acid oxidation and mitochondrial function during the neonatal period, with lipid accumulation in myocardial tissue and liver. The link between the methyl donor deficiency and impaired methylation of PGC-1 α alters the activities of enzymes involved in methylation and acetylation of PGC-1 α . These enzymes are also associated with epigenetic changes and the function and gene expression. Our results are consistent with population studies by Barker and colleagues, who suggest that maternal nutrition during early stages of life is correlated with the risk of cardiovascular disease in adult, independent of other risk factors.

Key words: Folic Acids, Vitamin B12, homocysteine, Metabolism, Heart, Liver, Steatosis