



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 Gaili CHEN

Le transcriptome et le méthylome du foie des rats dénutris en période périnatale identifient les gènes principaux impliqués dans les pathologies métaboliques.

Le 28 Novembre 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :

Nicolas Pollet Chargé de recherche-HDR, CNRS, Evry
Pascale Chavatte-Palmer Directeur de recherche-HDR, INRA UMR 1198, Jouy en Josas

Examineurs :

Rémi Houlgatte Directeur de recherche, Inserm U954, Nancy, Directeur de thèse
Francisco Bolaños Chargé de Recherche-HDR, INRA UMR 1280, Nantes
Jean-Louis Guéant PU-PH, Université de Lorraine, Nancy. Directeur de l'INSERM U954
Olivier Ziegler PU-PH, Université de Lorraine, Nancy
Gérard Ramstein Maître de Conférence-HDR, CNRS, UMR_C 6241, Nantes
Rosa-Maria Rodriguez-Guéant PU-PH, Université de Lorraine, Nancy

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

Remerciements

J'exprime tout d'abord mes remerciements à Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant, directeur de l'unité INSERM U954, toute ma gratitude pour son accueil et pour m'avoir aidé dans ces recherches et donné des précieux conseils pendant ces années de thèse. Il m'a appris à avoir une attitude prudente et l'esprit d'exploration en recherche scientifique, ce qui sera très important pour ma carrière à l'avenir.

A mon directeur de thèse, Rémi Houlgatte, mes remerciements les plus sincères pour m'avoir encadrée et soutenue au cours de ma thèse. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir donné la liberté et la confiance nécessaires pour poursuivre ce qui m'a intéressée dans la recherche, pour avoir cultivé ma capacité à travailler de façon autonome, et aussi pour sa grande gentillesse dans la vie.

Je suis très reconnaissante envers Sébastien Hergalant, ingénieur de notre équipe de bioinformatique et de génomique intégrative, je le remercie pour son aide lors de ma thèse: pour les analyses de transcriptome et de méthylome, pour la bioinformatique et pour les analyses statistiques. Je le remercie aussi pour son aide dans la rédaction de ma thèse. Il a été non seulement un collègue mais aussi un très bon ami.

Je suis très reconnaissante envers Rose, Florence, Hassan, Sébastien, Julien et Maryvonne, collègues de bureau anciens et actuels. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre gentillesse et votre aide. Je n'oublie pas les moments heureux passés ensemble. Je vous souhaite le meilleur pour l'avenir.

A Jean-Marc Alberto, Florence Coste et Aurélie Robert, techniciens du labo, je vous remercie bien pour votre aide et votre soutien.

A Catherine Chevalier et Audrey Donnart, Ingénieures à Nantes; je vous remercie pour m'avoir appris les expériences de transcriptome et de méthylome, je vous suis aussi très reconnaissante d'avoir pris soin de moi à Nantes.

Au Dr Pascale Chavatte-Palmer et au Dr. Nicolas Pollet, rapporteurs de ma thèse, mes remerciements pour leur participation et pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

A Dr Francisco Bolaños, examinateur de ma thèse, mes remerciements pour sa participation au jury de ma soutenance de thèse et pour son évaluation. Je le remercie pour ses nombreux conseils très intéressants pour la recherche.

Au Pr Olivier Ziegler, Dr Gérard Ramstein et Pr Rosa-Maria Rodriguez-Guéant, examinateurs de ma thèse, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier le Dr Shyue-Fang Battaglia pour sa compagnie et son aide dans ma vie pendant toutes ces années.

A Dominique Guillaume et Catherine Tavera, secrétaires du labo; un grand merci pour leur disponibilité et leur patience.

A tous les gens du laboratoire, merci pour votre aide, votre gentillesse et votre soutien.

Merci à tous mes amis chinois à Nancy pour leur amitié et leur soutien moral, leur compagnie merveilleuse et leur soutien qui ont fait de ces années difficiles des études supérieures en douceur, amusantes et mémorables, et aussi à mes amis en Chine qui m'ont toujours apporté leur encouragement et leur soutien.

A ma famille, mes sœurs et mon petit frère, pour leur soutien, leurs encouragements et leur confiance en moi. Ils ont toujours été là pour me donner l'espoir; je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans votre soutien.

A mon chéri, le Dr Huangang Jiang, pour son sens de l'humour, son caractère optimiste, patient et tolérant, qui a rendu ces trois ans d'études difficiles moins difficiles. Chaque jour plein d'espoir, la confiance qu'il me porte est une grande source de motivation dans ma vie.

A mes parents.

Merci de tout mon cœur.

Publications et Communications

Articles

- **Gaili Chen**, Julien Broséus, Sébastien Hergalant, Audrey Donnart, Catherine Chevalier, Francisco Bolaños-Jiménez, Jean-Louis Guéant, Rémi Houlgatte. **Identification of master genes involved in liver key functions through transcriptomics and epigenomics of methyl donor deficiency in rat: Relevance to non-alcoholic liver disease.** Mol Nutr Food Res. 2014 Nov 7. doi: 10.1002/mnfr.201400483.
- Catherine Thieblemont, Samia Mourah, Gérard Ramstein, Nicolas Mounier, Julien Broseus, **Gaili Chen**, Wendy Cuccuini, Philippe Gaulard, Christian Gisselbrecht, Josette Brière, Rémi Houlgatte. **Soluble isoform of vascular endothelial growth factor, VEGF121, is predictor for survival in activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma (ABC-like DLBCL) and is related to an immune response gene signature conserved in cancer.** 2014. Soumis à Leukemia.
- **Gaili Chen**, Julien Broséus, Sébastien Hergalant, Audrey Donnart, Catherine Chevalier, Jean-Louis Guéant, Francisco Bolaños-Jiménez, Rémi Houlgatte. **Genome-wide hepatic methylation and gene expression modifications in rats following maternal protein restriction contribute to metabolic disorders in adulthood.** Soumis à MNFR.

Communications orales

8^{ème} journée de la Recherche en Santé CHU de Nancy-Faculté de Médecine-Pôle BMS (24 mai 2013).

Communications affichées

9^{ème} journée de la Recherche Biomédicale CHU de Nancy-Faculté de Médecine-Pôle BMS (21 mars 2014).

Second colloque de la SF – DOHAD (A Nantes les 6-7 Novembre 2014).

Sommaire

Liste des figures	1
Liste des tableaux	2
Liste des abréviations	3
Avant-propos	7
Introduction	9
Partie 1 : Cycle des monocarbone	11
1. Les déterminants nutritionnels du métabolisme des monocarbone	11
1.1. Folates (vitamine B9)	11
1.1.1. Définition.....	11
1.1.2. Structure	11
1.1.3. Absorption, distribution et transport cellulaire des folates.....	12
1.1.4. Les fonctions physiologiques et le métabolisme des folates	13
1.1.5. Carence en folates	14
1.2. Vitamine B12	16
1.2.1. Définition.....	16
1.2.2. Structure	16
1.2.3. Absorption de la Vitamine B12	17
1.2.4. Les fonctions physiologiques et le métabolisme de la vitamine B12.....	18
1.2.5. Carence en B12	18
2. Métabolisme des monocarbone	22
2.1. Homocystéine	22
2.2. Métabolisme de l'homocystéine.....	22
2.2.1. Voie de reméthylation ou cycle de la méthionine	22
2.2.2. Voie de trans-sulfuration	24
3. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie	25
3.1. Facteurs nutritionnels	25
3.1.1. Les folates.....	25
3.1.2. Vitamine B12	27
3.1.3. Vitamine B6	27
3.2. Facteurs génétiques	27
3.3. Facteurs environnementaux.....	28
4. Pathologies en lien avec une hyperhomocystéinémie	28
4.1. Les maladies neurologiques	28

4.2.	Les maladies cardiovasculaires	28
4.3.	Les maladies hépatiques	29
4.4.	Les maladies hématologiques.....	29
4.5.	Les maladies obstétriques.....	29
4.6.	Les cancers	30
Partie 2 : Les protéines		31
1.	Définition.....	31
2.	Structure	31
3.	Digestion et absorption des protéines.....	33
4.	Les fonctions physiologiques	34
5.	Pathologies en lien avec une dénutrition en protéine	35
Partie 3 : Hypothèse de la programmation fœtale		37
1.	Hypothèse de la programmation fœtale.....	37
2.	Mécanismes sous-jacents à la programmation fœtale	39
2.1.	Croissance diminuée de certains organes	39
2.2.	Excès persistant de corticoïdes.....	39
2.3.	Modifications épigénétiques.....	40
3.	« Gatekeeper hypothesis ».....	42
Partie 4: Profils génomiques et épigénomiques		43
1.	Génome : Du gène à la génomique fonctionnelle	43
1.1.	La génomique	43
1.2.	Les outils de la génomique	46
1.2.1.	Mesure de l'expression des gènes	47
1.2.2.	Etude des facteurs de transcription.....	49
1.2.3.	La découverte de motifs	49
2.	L'épigénome.....	51
2.1.	Epigénomique.....	51
2.2.	Epigénétique et hérédité épigénétique.....	54
2.3.	Les outils de mesure de la méthylation de l'ADN	56
2.3.1.	Mesure de la méthylation de l'ADN	56
2.3.2.	MeDIP-Chip	57
3.	La génomique intégrative	59
4.	Puces à ADN	61
4.1.	Puces à ADN pour le transcriptome	62

4.2.	Puces à ADN pour l'épigénome et les interactions protéines-ADN	64
5.	Analyse des données génomiques et épigénomiques issues de puces à ADN	67
Objectifs	69
Résultats	73
Partie 1 : Effets de la carence en groupements méthyles sur les transcriptome et méthylome de foie de rats à 21 jours	75
1.	Caractéristiques biologiques des MDD (pour Methyl Donor Deficiency).....	75
2.	Caractérisation du tissu hépatique.....	75
3.	Transcriptome du foie.....	76
4.	Méthylome du foie.....	81
5.	Croisement entre transcriptome et méthylome du foie.....	82
6.	Validation des résultats du transcriptome et du méthylome.....	86
Partie 2 : Effets de la carence en protéines sur les transcriptome et le méthylome du foie de rats à 180 jours	89
1.	Caractéristiques métaboliques des rats MPR (pour Maternal Protein Restriction).....	89
2.	Transcriptome du foie	89
3.	Méthylome du foie	94
4.	Croisement entre le transcriptome et le méthylome du foie des rats MPR	97
5.	Validation des résultats du transcriptome	100
Partie 3 : « Gatekeeper hypothesis »	101
1.	Comparaison entre MDD J21 et MPR J180	101
2.	Comparaison entre MDD J21 et MPR J1	105
3.	Comparaison entre MPR J180 et MPR J1	107
4.	Comparaison des trois modèles	109
Partie 4 : Effets transgénérationnels, projet TransG	111
Discussion/Conclusion	115
Partie 1 : Effets de la carence en groupement méthyles sur le transcriptome et le méthylome du foie de rats à 21 jours	117
Partie 2 : Effets de la carence en protéines sur le transcriptome et le méthylome du foie de rats à 180 jours	121
Partie 3: Programmation fœtale, « Gatekeeper genes » et « Master genes »	123
Perspectives	127
Références Bibliographiques	131
Matériel et Méthodes	153

1.	Modèle animal	155
1.1.	Régime alimentaire.....	155
1.1.1.	Modèle carencé en Vitamine B12 et Folates.....	155
1.1.2.	Modèle carencé en protéine.....	158
1.2.	Prélèvement et gestion des échantillons.....	159
2.	Dosages plasmatiques / sériques et tissulaires	160
2.1.	Métabolisme de l'homocystéine.....	160
2.1.1.	Folates et vitamine B12.....	160
2.1.2.	Dosage de l'homocystéine (HCY)	160
2.1.3.	Analyse des molécules adényliques (SAM/SAH) par dérivation fluorescente à l'aide du chloroacétaldéhyde	163
2.1.4.	Concentration en méthionine.....	164
2.2.	Métabolisme lipidique : Triglycérides, cholestérol et lipides totaux	165
2.3.	Métabolisme énergétique	165
2.3.1.	Marqueurs du stress cellulaire (ALAT/ASAT).....	165
2.3.2.	Dosage Radio-Immunologique de l'insuline.....	166
2.3.3.	Dosage du glucose.....	167
2.4.	Dosages enzymatiques	167
2.4.1.	Mesure de l'activité de la méthionine synthase, MS.....	168
2.4.2.	Mesure de l'activité de la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase, BHMT	170
3.	Mesure d'expression des gènes au moyen de puces à ADN	172
3.1.	Extraction et contrôle de qualité de l'ARN	172
3.2.	Puces à ADN pour le transcriptome	179
3.2.1.	Préparation des échantillons.....	179
3.2.2.	Hybridation.....	184
3.3.	Analyse des données	188
3.3.1.	Normalisation des données.....	188
3.3.2.	Clustering des données : K-Means	190
3.3.3.	Annotations fonctionnelles des clusters	190
3.4.	Validation des résultats du transcriptome par RT-qPCR	192
4.	Mesure de la méthylation de l'ADN : MeDIP-CHIP (Roche NimbleGen) ...	198
4.1.	Extraction de l'ADN	198
4.2.	MeDIP-Chip	200
4.2.1.	MeDIP (Methylated DNA immunoprecipitation)	200

4.2.2.	Contrôle-qualité du MeDIP par qPCR	203
4.2.3.	Amplification de l'ADN après ChIP	206
4.2.4.	Marquage des échantillons (NimbleGen Dual-Color Labeling Kit)	207
4.2.5.	Hybridation & lavage	211
4.3.	Analyse des données	213
4.3.1.	Normalisation des données.....	213
4.3.2.	Sélection des sondes positives et des gènes positifs en ChIP.....	213
4.3.3.	Faire les figures « BedGraph Track Format » sur UCSC.....	213
4.3.4.	Annotations fonctionnelles des gènes positifs en ChIP.....	215
4.4.	Validation des résultats du méthylome par MeDIP-qPCR.....	215

Liste des figures

- Figure 1.** La structure chimique de l'acide folique et de quelques formes réduites des folates.
- Figure 2.** Absorption et distribution des folates dans le foie et les tissus périphériques.
- Figure 3.** Fonctions physiologiques et le métabolisme des folates.
- Figure 4.** Structure de la vitamine B12.
- Figure 5.** Absorption et le transport de la vitamine B12.
- Figure 6.** Fonctions physiologiques et le métabolisme de la cobalamine intracellulaire.
- Figure 7.** Principales étiologies des carences en vitamine B12.
- Figure 8.** Métabolisme de l'homocystéine.
- Figure 9.** Rôle de la méthionine synthase et de la méthionine synthase réductase.
- Figure 10.** Niveaux d'organisations structurales des protéines.
- Figure 11.** Digestion des protéines et absorption des acides aminés et des oligopeptides.
- Figure 12.** Programmation et développement des maladies et pathologies de la malnutrition foetale.
- Figure 13.** L'évolution du concept du gène.
- Figure 14.** Etapes pour l'hybridation d'une puce à ADN.
- Figure 15.** Mécanismes de régulation de la transcription.
- Figure 16.** Méthylation de l'ADN et modifications des histones.
- Figure 17.** Le cycle de la méthylation de l'ADN : la dynamique de la méthylation de l'ADN au cours de développement.
- Figure 18.** Epigénétique et hérédité épigénétique.
- Figure 19.** Processus de MeDIP-CHIP.
- Figure 20.** Plateforme de génomique intégrative.
- Figure 21.** Schéma type d'une analyse de données génomiques.
- Figure 22.** Gènes différentiellement exprimés dans le foie de rat MDD par rapport au contrôle.
- Figure 23.** Voie de signalisation de PPAR.
- Figure 24.** La chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie a été affectée.
- Figure 25.** La carence en donneur de méthyle influence le système rénine-angiotensine.
- Figure 26.** Modifications de l'expression et des niveaux de méthylation de certains gènes impliqués dans le foie de rat MDD.
- Figure 27.** Gènes modifiés au niveau du méthylome de MDD et validés par MeDIP-qPCR.

- Figure 28.** Gènes modifiés au niveau du transcriptome de MDD et validés par RT-qPCR avec le technique TLDA.
- Figure 29.** Gènes différentiellement exprimés dans le foie des rats MPR par rapport aux rats contrôles.
- Figure 30.** Illustration schématique des gènes altérés par MPR – β -oxydation des acides gras, cycle de Krebs.
- Figure 31.** Illustration schématique des gènes altérés par MPR - la chaîne respiratoire.
- Figure 32.** Illustration schématique des gènes altérés par une restriction protéique maternelle - développement et régulation de la transcription et de la chromatine.
- Figure 33.** Modifications des gènes soumis à l’empreinte et du gène Dnmt3a au niveau du méthylome.
- Figure 34.** « Master genes » impliqués dans le syndrome métabolique.
- Figure 35.** Modifications de l’expression et des niveaux de méthylation de certains gènes impliqués dans le foie des rats MPR.
- Figure 36.** Gènes validés par RT-qPCR.
- Figure 37.** Gènes du transcriptome communs aux 3 modèles.
- Figure 38.** La chronologie de la formation des cellules germinales primordiales (PGCs) chez le rat par rapport au protocole nutritionnel.
- Figure 39.** Projet TransG : étude du transcriptome de G1 et G2.
- Figure 40.** Protocole nutritionnel du modèle de rat carencé en donneurs de méthyles (MDD).
- Figure 41.** Protocole nutritionnel du modèle de rat carencé en protéines (MPR).
- Figure 42.** Normalisation des données à haut débit avec Lowess.
- Figure 43.** K-means : Première étape d’analyse des données du transcriptome.
- Figure 44.** Exemples d’ontologies des gènes.
- Figure 45.** Design de la plaque du TLDA.

Liste des tableaux

- Tableau 1.** Définition de la carence en vitamine B12.
- Tableau 2.** Étapes du métabolisme de la vitamine B12 et causes correspondantes de la carence.
- Tableau 3.** Causes d’une hyperhomocystéinémie.
- Tableau 4.** Exemples d’association entre les atteintes périnatales et les maladies de l’adulte.
- Tableau 5.** Résumé des méthodes utilisées pour mesurer la méthylation de l’ADN.

- Tableau 6.** Paramètres physiologiques et métaboliques, comparaison avec d'autres régimes alimentaires de la littérature des rats MDD.
- Tableau 7.** Paramètres biologiques dans le tissu hépatique des rats MDD.
- Tableau 8.** Annotations fonctionnelles des gènes enrichis dans le transcriptome de foie de rats MDD.
- Tableau 9.** Ontologies des gènes enrichis au niveau de l'épigénome du foie de rats MDD.
- Tableau 10.** Ontologies fonctionnelles des « master genes » du foie MDD.
- Tableau 11.** Master genes et annotations fonctionnelles correspondantes.
- Tableau 12.** Master genes connus pour être impliqués dans la NAFLD.
- Tableau 13.** Caractéristiques phénotypiques des rats témoins et MPR.
- Tableau 14.** Annotations fonctionnelles des gènes enrichis dans le transcriptome du foie des rats MPR.
- Tableau 15.** Annotations fonctionnelles des gènes enrichis dans le méthylome du foie des rats MPR à jour 180.
- Tableau 16.** Annotations fonctionnelles des « master genes » du foie des rats MPR.
- Tableau 17.** Gènes communs au niveau du transcriptome du foie des rats MDD et MPR.
- Tableau 18.** Annotations fonctionnelles des gènes en commun dans le foie des rats MDD et MPR.
- Tableau 19.** Annotations fonctionnelles des gènes modifiés dans les méthylomes du foie des rats MDD et MPR.
- Tableau 20.** Master genes en commun (29 gènes).
- Tableau 21.** Annotations fonctionnelles des « master genes » en commun.
- Tableau 22.** Annotations fonctionnelles des gènes en commun chez les rats MDD J21 et MPR J1.
- Tableau 23.** Annotations fonctionnelles des gènes en commun chez les rats MPR J180 et MPR J1.
- Tableau 24.** Annotations fonctionnelles des gènes du transcriptome communs aux 3 modèles.
- Tableau 25.** Paramètres physiologiques et métaboliques des rats MDD et témoins de G1 et G2.
- Tableau 26.** Liste des gènes choisis pour validation par RT-qPCR.
- Tableau 27.** Amorces désignées contre les sondes des gènes significatifs.

Liste des abréviations

ADN Acide DesoxyriboNucléique

AdoCbl	Adenosylcobalamin
AdoHcy	S-adenosylhomocysteine
AG	Acides gras
AGL	Acides gras libres
ALAT	Alanine aminotransférase
ARN	Acide RiboNucléique
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine TriPhosphate
BHMT	Bétaïne-Homocystéine méthyltransférase
Cbl	Cobalamine
CBS	Cystathionine- β -synthase
CGH	Comparative Genomic Hybridization
ChIP-chip	Chromatin ImmunoPrecipitation on chip
ChIP-seq	Chromatin ImmunoPrecipitation followed by sequencing
CoA	Coenzyme-A
COX	Cytochrome-c oxydase
CPT1	Carnitine palmitoyl-transférase
CREB	cAMP response element-binding
CRM	Cis Regulatory Module
DAC	Désacétylases
DHF	Dihydrofolate
DHFR	Dihydrofolate réductase
DNMT	DNA méthyltransférase - ADN méthyltransférase
d-TMP	Désoxy-thymidine monophosphate
d-UMP	Désoxy-uracidylnonophosphate
EST	Expressed Sequence Tag, marqueur de séquence exprimée
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
FABP	Fatty acids binding protein
FAD	Flavine-Adénine-Dinucléotide
FAO	Fatty acids oxidation
FPG	Polyglutamates de folate
FMG	Monoglutamates de folate
FRS	Récepteurs aux folates
GCPII	Glutamate carboxypeptidase II

GGH	G-glutamyl hydrolase
GO	Gene Ontology
GWAS	Genome-Wide Association Study
HADHA	Hydroxyacyl-Coenzyme A déhydrogénase/3-kétoacyl-Coenzyme A thiolase/énoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
HAT	Histones acétyltransférases
Hcy	Homocystéine
HDAC	Histone Déacétylase
HDL	High-density lipoprotein
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal
IFC	Intestinal folate carrier
KDM1	Lysine (K)-Specific Demethylase
KO	Knock out
LCAD	Long-chain acyl-CoA dehydrogenase
LC-MSMS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
Lowess	Locally weighted scatterplot smoothing
MAT	Méthionine adénosyltransférase
MCAD	Mcyl-CoA déshydrogénase
MCM	Méthylmelanoyl CoA mutase
MDD	Méthyl Donneur Déficience
MeDIP	Methylated DNA immunoprecipitation
MiRNA	micro RiboNucleotide Acid
MPR	Maternal Protéine Restriction
MTHF	Méthylénetétrahydrofolate
MTHFR	Méthylénetétrahydrofolate réductase
MS	Méthionine synthase
MTRR	Méthionine synthase réductase
MTX	Méthotrexate
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NDUFA10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) alpha subcomplex 10
NDUFV2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2
NGS	Next Generation Sequencing
PCFT1	Récepteur aux folates couplés aux protons
PCR	Polymerase chain reaction

PGC-1	Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPARα	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PTM	Modification post-traductionnelle
RCIU	Restriction de croissance intra-utérine
RE	Réticulum endoplasmique
RFC	Reduced folate carrier
RIP140	Receptor interacting protein 140
RNase	Ribonucléase
RT	Reverse transcription
RT-PCR	Real-time Reverse Transcription-Polymerase
RXR	Retinoid X receptor
SAGE	Analyse en série de l'expression des gènes
SAH	S-adénosylhomocystéine
SAM	S-adénosylméthionine
SCAD	Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase
SHMT	Sérine hydroxyméthyltransférase
Sirt1	Silent information regulator1
SOD	Superoxide dismutase
SREBP-1	Sterol regulatory element-binding protein 1
TBS	Tris buffered saline
TC II	Transcobalamine II
TFBS	Transcription Factor Binding Site
TGFβ1	Transforming growth factor beta 1
THF	Tetrahydrofolate
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TM	Triméthyllysine
TNF-α	Facteur de nécrose de tumeur
TORC2	Transcription coactivateur
TRAP	Thyroid Hormone Receptor-associated Proteins
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
VLCAD	Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase

Avant-propos

L'environnement au cours du développement fœtal et néonatal, en particulier la nutrition, joue un rôle très important pour la prolifération, la différenciation et l'apoptose des tissus et les organes. La nutrition peut influencer directement le développement embryonnaire et « programmer » l'enfant pour des problèmes de santé à l'âge adulte, comme des maladies cardiovasculaires, des maladies métaboliques, des cancers, etc. C'est l'hypothèse de la programmation fœtale, proposée par David Barker en 1986.

Le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU) avec un faible poids à la naissance est souvent associé avec la malnutrition périnatale en donneurs de méthyles (folates et la vitamine B12) ou en protéine.

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 RCIU 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 coeur et l'estomac.

Les protéines sont très importantes pour l'organisme à cause de leurs fonctions diverses au sein de la cellule et de l'organisme. Elles sont essentielles pour le processus du développement et le métabolisme de l'organisme, et ils sont aussi un des trois principaux composants des macronutriments. Une carence protéique peut avoir de graves conséquences sur l'organisme, comme un mauvais état nutritionnel accompagné d'un ralentissement de la guérison, un affaiblissement du système immunitaire etc ... La carence en protéines peut être particulièrement responsable des troubles de la croissance et s'intègre à une malnutrition plus globale si elle se passe pendant la période périnatale.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une introduction des données bibliographiques relatives au sujet de cette thèse et elle est présentée en quatre parties. Une première partie intitulée cycle des monocarbone avec les rôles détaillés des folates et de la vitamine B12. Une deuxième partie est dédiée aux protéines, à leur digestion et aux pathologies liées à une dénutrition en protéines. Une troisième partie sur l'hypothèse de la programmation fœtale. L'introduction se termine par une présentation des connaissances sur les études des profils génomiques et épigénétiques. La deuxième partie de ce manuscrit est dédiée aux

résultats au cours de ma thèse qui ont permis de mieux comprendre les conséquences d'une carence en donneurs de méthyles ou en protéines dans les périodes critiques de la vie (gestation et lactation) sur le métabolisme énergétique du tissu hépatique dans deux modèles animaux. La troisième partie consiste en une discussion des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Enfin, la dernière partie est une annexe qui détaille les matériels et méthodes.

Introduction

Partie 1 : Cycle des monocarbone

1. Les déterminants nutritionnels du métabolisme des monocarbone

1.1. Folates (vitamine B9)

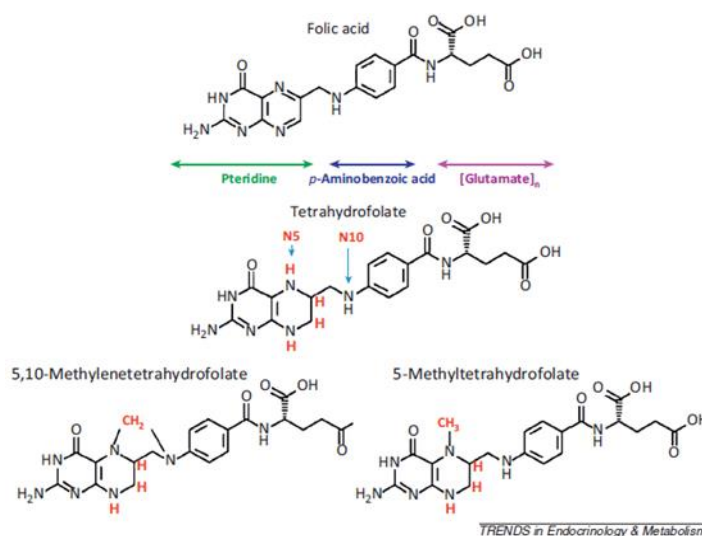
1.1.1. Définition

La vitamine B9, autre nom de l'acide folique (folate, folacine ou vitamine M, acide pteroyl-L-glutamique, pteroyl-L-glutamate et acide pteroylmonoglutamique), est une vitamine hydrosoluble. L'origine du nom folate provient du latin folium qui signifie feuille car ces substances ont été isolées à partir de feuilles d'épinard en 1941 par Mitchell et ses collaborateurs.

L'acide folique est le précurseur métabolique d'un coenzyme, le tétrahydrofolate (FH4 ou THF6), impliqué notamment dans la synthèse des bases nucléiques, purines et pyrimidines, constituant les acides nucléiques (ADN et ARN). Le THF intervient également dans la synthèse d'acides aminés tels que la méthionine, l'histidine et la sérine.

1.1.2. Structure

L'acide folique est un terme générique pour la vitamine B9 soluble dans l'eau, qui est notamment présente dans les aliments, sous forme de THF réduits pouvant porter différents groupes monocarbonés, liés à une chaîne de polyglutamates. Les folates alimentaires se retrouvent principalement dans les végétaux (épinards, salades, luzerne, grains de maïs et leurs dérivés), les fruits (orange), dans le foie des animaux et dans certaines préparations de levures ou de bactéries. Ils sont composés d'une base ptéridine, d'une molécule d'acide p-aminobenzoïque (PABA) et d'une chaîne, plus ou moins longue, formée d'une succession de



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Figure 1. La structure chimique de l'acide folique et de quelques formes réduites des folates. Modifié d'après Guéant, JL *et al*, Trends Endocrinol Metab. 2013 (1).

molécules d'acide glutamique liées par des liaisons peptidiques. Jusqu'à huit résidus glutamate ont été dénombrés dans cette chaîne (Figure 1). Un régime alimentaire contient des monoglutamates et des polyglutamates de folate (1) .

1.1.3. Absorption, distribution et transport cellulaire des folates

Les polyglutamates de folate (FPG), qui constituent les formes naturellement présentes dans les aliments (~90%), doivent être hydrolysés en monoglutamates de folate (FMG) par la glutamate carboxypeptidase II (GCP II) avant leur absorption par la muqueuse intestinale (2, 3). Alors que le monoglutamate est absorbé à plus de 90% par l'intestin, seulement 20 à 30% des polyglutamates sont absorbés à ce niveau grâce à l'IFC (Intestinal folate carrier) (Figure 2) (4). Les monoglutamates sont absorbés via le transporteur du folate couplé aux protons (PCFT1).

Les folates sont transportés à travers les membranes cellulaires sous leur forme monoglutamates. Trois systèmes de transport sont liés à l'absorption des folates dans le foie et les tissus périphériques : le transporteur du folate réduit (RFC), le mieux caractérisé et qui assure un transport facilité et bidirectionnel des folates ; les récepteurs des folates (FRS) qui permettent l'entrée des folates dans la cellule par endocytose (5) ; et le transporteur du folate couplé aux protons (PCFT1).

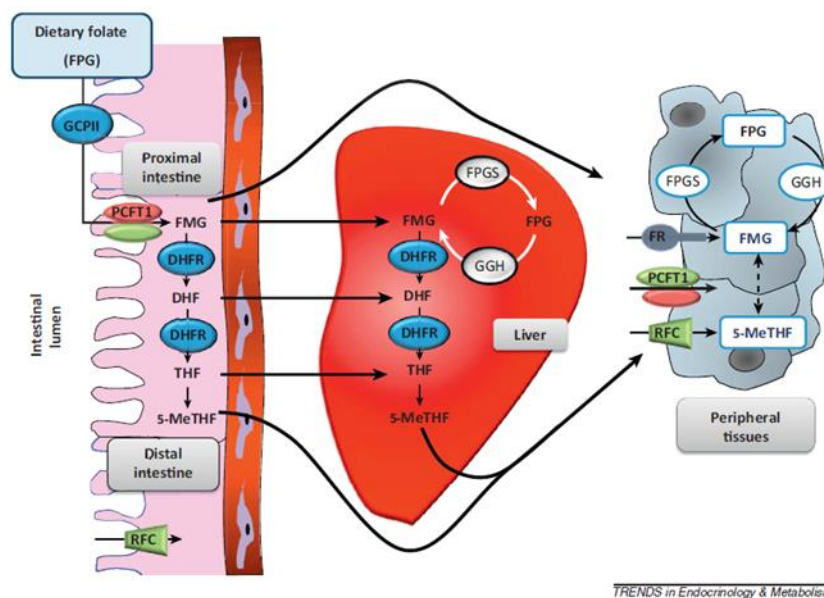


Figure 2. Absorption et distribution du folate dans le foie et les tissus périphériques. Modifié d'après Guéant, JL *et al*, Trends Endocrinol Metab. 2013 (1). FPG, folate polyglutamates ; FMG, folate monoglutamates ; GCP II, glutamate carboxypeptidase II ; PCFT1, proton-coupled folate transporter ; RFC, reduced folate carrier; FRs, folate receptors; FPGS, folylpoly-g-glutamate synthetase; GGH, g-glutamyl hydrolase.

Les folates se retrouvent majoritairement dans le foie et les globules rouges sous leurs formes polyglutamates, et sont synthétisés à partir de la forme monoglutamate grâce à la folylpolyglutamate synthétase (FPGS) (3, 6). C'est sous cette forme qu'ils sont actifs comme coenzymes. Inversement, les FPG peuvent être hydrolysés en FMG par la g-glutamyl hydrolase (GGH).

1.1.4. Les fonctions physiologiques et le métabolisme des folates

Au niveau cellulaire, les folates sont localisés dans le cytosol et la mitochondrie, et les formes présentes dans chacun des deux compartiments sont différentes (6). Par exemple, dans le cytoplasme des cellules du foie de rat, 45% des folates réduits sont sous forme de méthyle-THF, 30% sous forme de formyle-THF et 25% sous forme non-substituée.

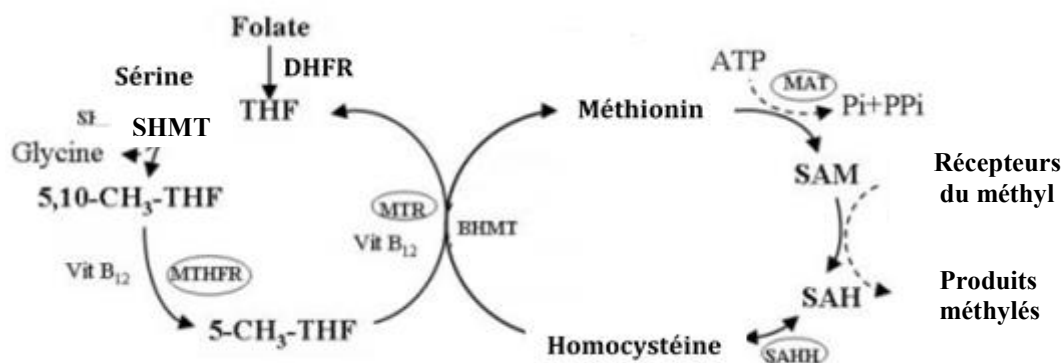


Figure 3. Fonctions physiologiques et le métabolisme des folates. Modifié d'après Moat SJ *et al*, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 (7).

Pour être métaboliquement actif, l'acide folique doit être réduit par une enzyme, la dihydrofolate réductase (DHFR), en tétrahydrofolate (THF) et ses dérivés qui sont les formes biologiquement actives des folates. Ces dérivés sont des co-substrats spécifiques d'une variété d'enzymes impliquées dans le métabolisme des monocarbones. Les principaux dérivés méthylés des 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 des folates, biologiquement actif, produit à partir du 5,10-MTHF, la réaction étant catalysée par la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR) (8). Ainsi on obtient un groupement méthyle qui servira pour la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine par la méthionine synthase (MS) (Figure 3). 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 la vitamine

B12 comme cofacteur et dépend également de la présence d'une deuxième enzyme, la méthionine synthase réductase (MTRR), qui maintient la liaison entre la MS et la cobalamine dans son état réduit et complètement actif.

Les folates facilitent le transfert des unités monocarbonées à partir de multiples biomolécules vers de nombreuses réactions biosynthétiques telles que la synthèse de purines et de pyrimidines, ou la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine (9). La conversion de la sérine en glycine s'effectue dans la mitochondrie en présence de THF et aboutit à la synthèse du 5,10-MTHF. L'enzyme clé de cette réaction est la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) (10). Le 5-MTHF est le donneur de groupement méthyle qui sera transféré sur l'homocystéine par transméthylation à l'aide de la vitamine B12, cofacteur de la méthionine synthase. La réaction aboutit à la régénération du THF et à la formation de méthionine. La méthionine pourra alors être transformée en S-adenosylméthionine (SAM), donneur universel de groupements méthyles pour les réactions de méthylation dans l'organisme (ADN, ARN, protéines, lipides...) et ceci aboutit à la formation de S-adenosylhomocystéine (SAH) (Figure 3).

1.1.5. Carence en folates

Les folates sont essentiels pour la santé et le développement de l'organisme. Une carence arrive quand le besoin du corps en folates est augmenté (comme dans le cas des femmes enceintes ou des personnes qui souffrent de certaines maladies comme la drépanocytose), lorsque l'apport alimentaire en acide folique est insuffisant, ou lorsque le corps excrète plus de folates que d'habitude (comme dans l'hémolyse chronique). La fréquente carence en folates durant la grossesse produit un effet négatif sur celle-ci et reste un problème important de santé publique au niveau mondial (11).

La principale cause de déficience en folates est la carence d'apport (pour 10 % de la population mondiale). Elle résulte de la malnutrition, de régimes amaigrissants, de la cuisson prolongée des aliments et de l'inadéquation entre les apports et les besoins, qui s'accroissent notamment au cours de la grossesse et des états d'hyperactivité médullaire: anémies hémolytiques et proliférations cellulaires malignes, taux élevé du renouvellement cellulaire dans le cas des cancers, certaines anémies et troubles de la peau. Dans les pays industrialisés, les sujets âgés dénutris, les alcooliques et les personnes économiquement défavorisées sont concernés. Les autres causes de carence sont liées à des problèmes de malabsorption dans le cas de plusieurs pathologies digestives (gastrectomies, résections intestinales étendues, maladie de Crohn, gastrite atrophique, maladies coeliaques, sprue tropicale). Certains médicaments contre les

cancers, l'épilepsie, la polyarthrite rhumatoïde et le SIDA peuvent également provoquer une carence en folates à cause de leurs effets secondaires (comme le méthotrexate et la pyriméthamine).

La carence en folates entraîne une accumulation de métabolites. En effet, la reméthylation de l'homocystéine est bloquée, elle s'accumule et provoque ainsi une hyperhomocystéinémie et une homocystinurie.

Selon l'hypothèse de la programmation fœtale, une susceptibilité accrue à la maladie serait en partie due à la programmation fœtale via des liens entre la nutrition et les mécanismes épigénétiques et épigénomiques. Lors du développement, les folates jouent un rôle clé dans les interactions entre la nutrition, la programmation fœtale et l'épigénomique. En effet, le statut maternel en folates, en influençant la méthylation de l'ADN, produit des effets épigénétiques pouvant se transmettre à la deuxième génération. Des études ont montré qu'une carence en folates dans l'alimentation pouvait affecter non seulement la santé de l'enfant, mais aussi celle des générations futures (12).

1.2. Vitamine B12

1.2.1. Définition

La vitamine B12, également appelée cobalamine (Cbl), est une vitamine hydrosoluble essentielle au fonctionnement normal du cerveau (elle participe à la synthèse de neuromédiateurs), du système nerveux (elle est indispensable au maintien de l'intégrité du système nerveux et tout particulièrement de la gaine de myéline qui protège les nerfs et optimise leur fonctionnement) et à la formation du sang. C'est l'une des huit vitamines B. Elle est normalement impliquée comme cofacteur dans le métabolisme de chacune des cellules du corps humain, plus particulièrement dans la synthèse de l'ADN et sa régulation ainsi que dans la synthèse des acides gras et dans la production d'énergie. Elle est aussi impliquée dans la reméthylation de l'homocystéine en méthionine comme cofacteur de la MS.

1.2.2. Structure

Les cobalamines appartiennent à la famille des corrinoïdes. Il existe différentes Cbl en fonction du ligand fixé à l'atome de cobalt qui peut être tri-, bi- ou monovalent (3 niveaux d'oxydation) : [Cob(I) alamine], [Cob(II) alamine], [Cob(III) alamine]. Les Cbl sont composées d'un noyau corine et d'un ribonucléotide reliés par un pont amino-2 propanol (Figure 4).

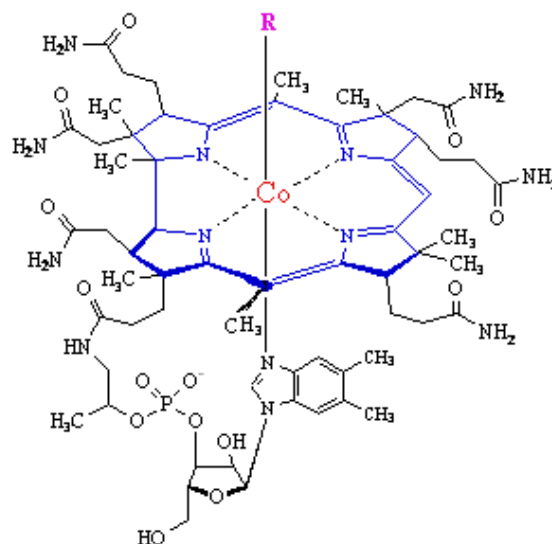


Figure 4. Structure de la vitamine B12. R=CN: cyanocobalamine ; R=OH: hydroxocobalamine ; R=CH3: méthylcobalamine ; R=5'd Ado: 5'-désoxyadénylsylcobalamine.

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

1.2.3. Absorption de la Vitamine B12

L'absorption et le métabolisme de la vitamine B12 sont complexes et nécessitent de nombreux processus, dont un seul s'il n'est pas présent, peut conduire à une carence en vitamine B12.

La vitamine B12 ingérée est liée à des protéines alimentaires et elle est absorbée par un processus en plusieurs étapes. Une bonne compréhension du cycle de l'absorption de la vitamine B12 contribue à éclairer les causes potentielles de carence. La vitamine B12 est dissociée des protéines alimentaires sous l'influence des sucs gastriques, en particulier de l'acide chlorhydrique et de la pepsine. Puis, elle se lie aux haptocorrines, glycoprotéines porteuses présentes dans les sécrétions salivaires et gastriques. Dans le duodénum, ces protéines sont progressivement digérées et la vitamine B12 libre se lie alors au facteur intrinsèque (FI), sous l'effet des sécrétions biliaires et pancréatiques. Le FI sécrété par les cellules gastriques, en se liant à la vitamine B12, la protège du catabolisme bactérien iléal (13, 14) (Figure 5).

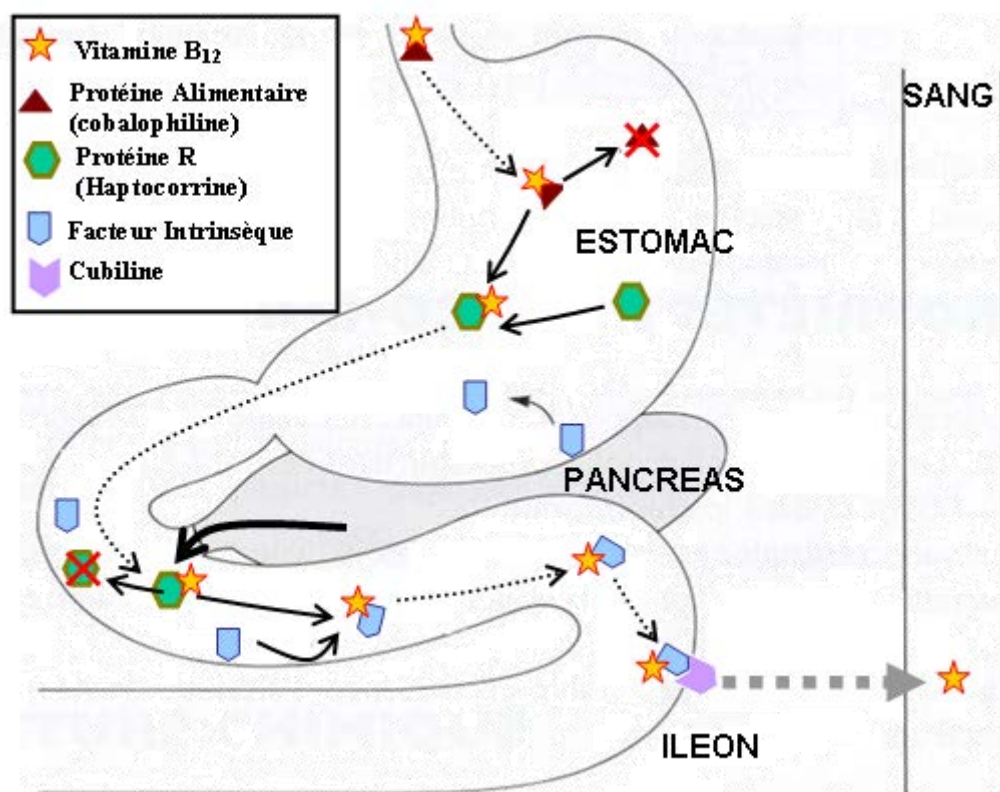


Figure 5. Absorption et le transport de la vitamine B12 (Tiré de Le Grusse et Watier, 1993).

En plus de ce procédé d'absorption, il existe un autre système indépendant du facteur intrinsèque. Environ 1% d'une forte dose orale de vitamine B12 est absorbée par ce second mécanisme (15). Cette voie est importante en ce qui concerne le remplacement de l'absorption par voie orale. Une fois absorbée, la vitamine B12 se lie à la transcobalamine II (TCII) et est transportée dans tout le corps. L'interruption de l'une ou l'autre de ces étapes conduit au risque de développer une carence.

Une fois métabolisée, la vitamine B12 est un cofacteur et un coenzyme de nombreuses réactions biochimiques, incluant la synthèse d'ADN, la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine et la conversion de la propionyl-coenzyme A en succinyl méthylmalonate.

1.2.4. Les fonctions physiologiques et le métabolisme de la vitamine B12

Dans le corps humain, deux voies peuvent synthétiser des quantités importantes de vitamine B12 dans l'intestin grêle. Des quantités physiologiques sont absorbées dans l'ileum. Les fèces humaines en contiennent des quantités appréciables (16). Une carence peut survenir à la suite de maladie de l'estomac, des intestins, du foie, des reins... (17).

La vitamine B12 est un nutriment essentiel qui fonctionne comme un 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 reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase (MS) au niveau du cytosol des cellules (Figure 6) (18-20).

1.2.5. Carence en B12

Dans les pays industrialisés, la prévalence est de 20% environ avec des cas extrêmes allant de 3 à 60% selon les critères utilisés. Chez les Américains, par exemple, elle est de 40% (21), chez les sujets âgés elle est de 20 à 40% (14) et dans les pays en voie de développement de 50% (22). Ces valeurs sont cependant discutées par différents auteurs car les critères utilisés ne sont pas toujours les mêmes. Les carences d'apport sont plutôt rares chez l'adulte en bonne santé dans les pays industrialisés mais plus fréquentes chez les sujets végétaliens car la vitamine B12 est exclusivement apportée par l'alimentation d'origine animale. Les maladies digestives et la malabsorption peuvent être à l'origine d'une carence en vitamine B12. Les gastrectomies totales

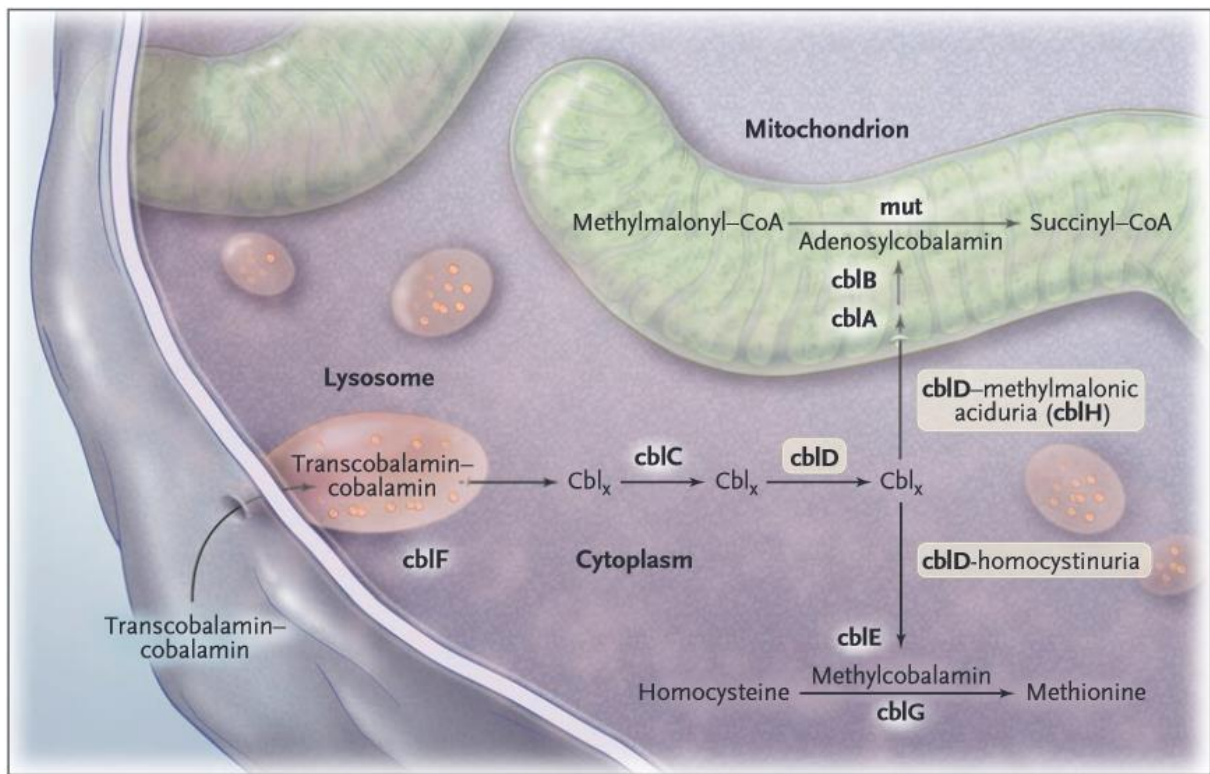


Figure 6. Fonctions physiologiques et le métabolisme de la cobalamine intracellulaire. Tiré de Coelho, *D et al*, *N Engl J Med* 2008 (20).

ou partielles, la pullulation bactérienne de l'intestin grêle ou le syndrome de l'anse borgne, la bothriocéphalose provoquée par des parasites intestinaux, la pancréatite chronique, la maladie de Crohn, les lymphomes, la tuberculose intestinale et l'anémie de Biermer en sont des exemples (23).

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

Les déficits congénitaux du métabolisme de la vitamine B12 sont liés à un déficit en TCII ou en récepteurs du FI (24).

Les définitions de la carence en vitamine B12 ne sont pas toujours les mêmes (Tableau 1) (25). A ce jour, la déficience en vitamine B12 est souvent définie en termes de concentrations en vitamine B12 sérique, en homocystéine et en acide malonique de méthyle, les deux composants de la voie métabolique de la vitamine B12 (Figure 6). Cependant, en clinique pratique, aucun test standard n'a émergé pour le diagnostic de la déficience en vitamine B12

en particulier chez les patients âgés. La Figure 7 et Tableau 2 résument les principales étiologies des carences en vitamine B12 (14, 25, 26).

Tableau 1. Définition de la carence en vitamine B12.

I	Concentration en vitamine B12 du sérum <150 pmol/L avec symptômes cliniques et /ou anomalies hématologiques liés à la carence en vitamine B12.
II	Concentration en vitamine B12 du sérum <150 pmol/L (200pg/mL) en deux occasions différentes.
III	Concentration en vitamine B12 du sérum <150 pmol/L avec une concentration totale en l'homocystéine > 13 µmol/L ou en acide méthylmalonique > 0.4 µmol/L (en l'absence d'insuffisance rénale et d'une carence en folates et vitamine B6).
IV	Faible niveau d'holotranscobalamine dans le sérum < 35pmol/L.

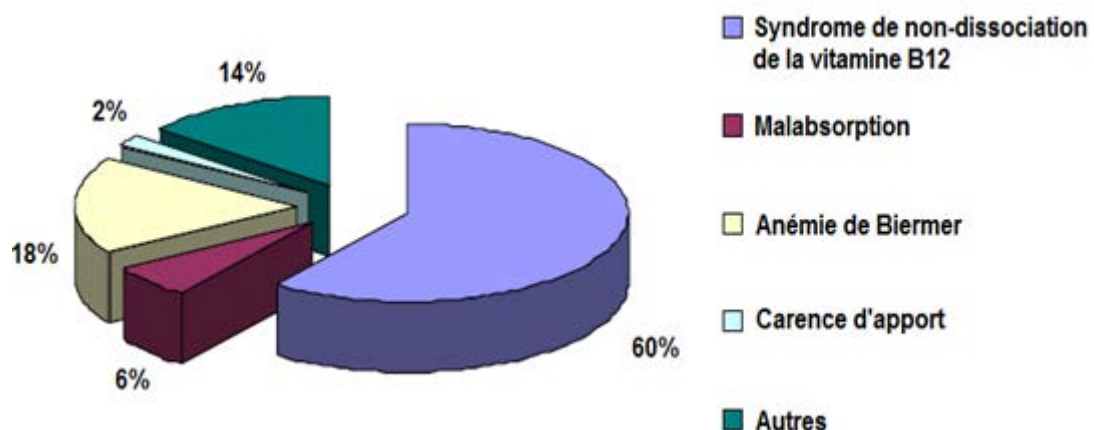


Figure 7. Principales étiologies des carences en vitamine B12. Modifié d'après Bosco, C *et al*, Rev Med Suisse 2012 (27).

Tableau 2. Étapes du métabolisme de la vitamine B12 et causes correspondantes de la carence.

Métabolisme de vitamine B12	Causes correspondantes de la carence
Vitamine B12 alimentaire	<ul style="list-style-type: none">• Régime végétarien strict sans supplémentation en vitamine• Patients malades en établissement ou en hôpitaux psychiatriques
Arrivée à l'estomac sous forme liée	<ul style="list-style-type: none">• Gastrectomie• Anémie pernicieuse
Dissociation (HCl, pepsine, bile, pancréas)	<ul style="list-style-type: none">• Malabsorption de la vitamine B12 alimentaire due à la non-dissociation de la vitamine B12 de ses protéines porteuses• Certains médicaments (IPP, antagonistes des récepteurs H₂)
Absorption (Liaison au FI à 99%) (Absorption passive 1%)	<ul style="list-style-type: none">• Malabsorption• Anémie pernicieuse• Résection iléale• Certains médicaments (biguanides, colchicine)
Transport par les transcobalamines	<ul style="list-style-type: none">• Déficit congénital en transcobalamine II
Captation et utilisation cellulaire	<ul style="list-style-type: none">• Déficits enzymatiques congénitaux

Note: HCl = hydrochloric acid ; IPP=inhibiteur de la pompe à protons ; FI=facteur intrinsèque.

2. Métabolisme des monocarbones

2.1. Homocystéine

L'homocystéine (acide 2-amino-4-mercaptobutyrique), a été synthétisée par Butz et Vigneaud (28) en 1932; c'est un acide aminé non protéinogène soufré résultant du catabolisme de la méthionine ou de la cystathionine. Inversement, l'homocystéine peut être recyclée en méthionine ou convertie en cystéine à l'aide des vitamines de type B.

2.2. Métabolisme de l'homocystéine

L'homocystéine est un homologue de la cystéine, et diffère par un groupe méthylène supplémentaire. Son métabolisme se produit principalement dans le foie et le rein par deux voies : la voie de la reméthylation et la voie de la trans-sulfuration (29) (Figure 8). Chez l'Homme, 56 % de l'Hcy est catabolisée en cystéine par la voie de la trans-sulfuration et le reste est reméthylé en méthionine par la voie de la reméthylation (18).

Le métabolisme de l'Hcy est régulé par l'interaction entre des facteurs génétiques (30) et nutritionnels et dépend largement de l'apport alimentaire en vitamines du groupe B: vitamine B9 (folates), vitamine B12 (cobalamine), vitamine B2 (riboflavine), vitamine B6 (pyridoxine), choline et bétaïne (31, 32). Une carence dans l'un de ces micronutriments peut conduire à des troubles du métabolisme de l'Hcy et à son accumulation.

2.2.1. Voie de reméthylation ou cycle de la méthionine

Cette voie, illustrée par la Figure 8, sert à recycler l'Hcy. Ce recyclage a pour effet non seulement d'éviter l'accumulation de l'Hcy en la reméthylant en méthionine, mais aussi à transférer les donneurs de méthyles nécessaires à la régulation de différents substrats comme les phospholipides, les protéines, l'ADN, l'ARN, la créatine, la carnitine, la myéline, les catécholamines et les polysaccharides. Ce cycle a besoin des vitamines du groupe B, en particulier la vitamine B9 et la vitamine B12.

Deux enzymes sont impliquées dans la réaction principale: la 5-MéthylèneTétraHydroFolate (5-MTHF), donneuse de méthyle dont la formation est sous la dépendance d'une enzyme, la 5,10-MTHF réductase (MTHFR) qui utilise la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur, et la Méthionine Synthase (MS) dont le cofacteur est la vitamine B12. Ce transfert du groupe méthyle, qui permet la synthèse de la méthionine, n'est possible qu'en présence de méthylcobalamine ; d'où la synergie d'action entre vitamine B9 et vitamine B12.

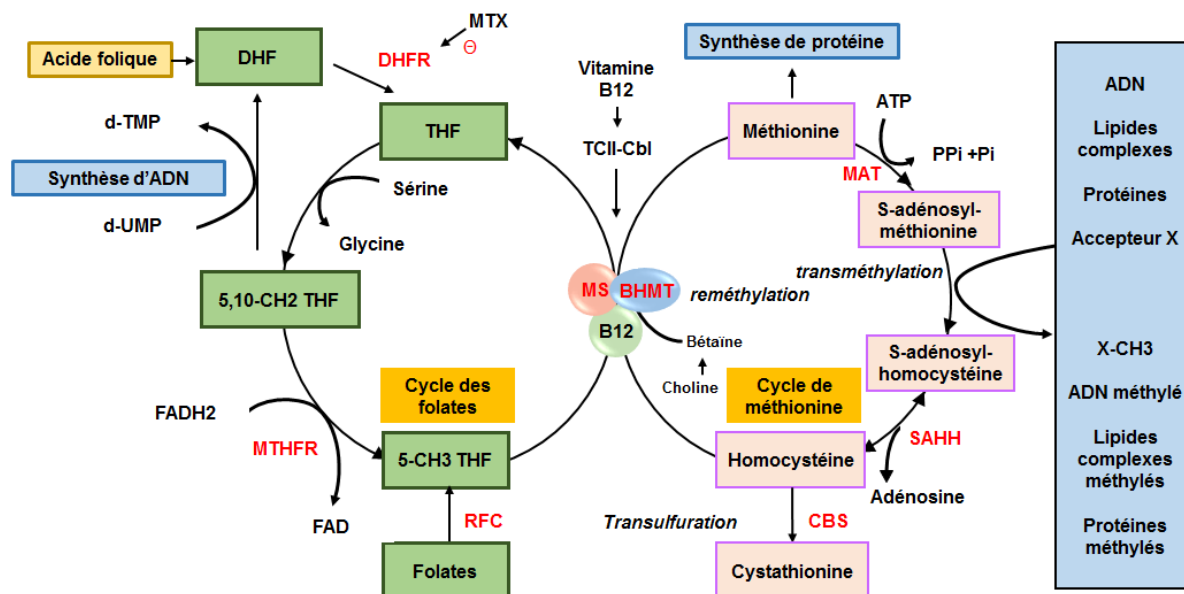


Figure 8 : Métabolisme de l'homocystéine (Iconographie d'après laboratoire Inserm U954). CBS : Cystathionine β -synthase, MAT : Méthionine adénosyl-transférase, THF : Tétrahydrofolate, DHF : Dihydrofolate, MTX : Méthotrexate, MTHFR : Méthylène tétrahydrofolate réductase, DHFR : Dihydrofolate réductase, RFC : Reduced Folate Carrier, TCII-Cbl : Trans-CobalamineII-Cobalamine, 5-CH3 THF/5-MTHF : 5-Méthyltétrahydrofolate, ATP : Adénosine Tri-Phosphate, FAD : Flavine-Adénine-Dinucléotide, d-UMP : désoxyuracidyldiphosphate, d-TMP : désoxy-thymidine monophosphate ; MS : méthionine synthase ; SAHH : S-adenosylhomocystéine hydrolase ; BHMT : bétaïne homocystéine méthyltransférase.

La deuxième réaction se passe principalement au niveau du foie car la bétaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT) est exprimée abondamment seulement au niveau du foie (33), et la fraction subcellulaire du foie de rat a démontré que l'activité BHMT n'existe que dans le cytosol (34). Comme la MS, la BHMT catalyse la reméthylation de l'homocystéine en méthionine en utilisant la bétaïne qui provient principalement de l'alimentation, comme les fruits de mer et les céréales, ou de l'oxydation de la choline. 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 (35) et en éliminant l'accumulation de l'Hcy (36).

En bref, la méthionine adénosyl transférase (MAT) catalyse la formation de la S-adenosyl-méthionine (SAM) en transférant le fragment adénosyl de l'ATP à l'atome de soufre de la méthionine (Figure 8). La SAM est le donneur universel de groupements méthyles nécessaires pour la synthèse d'acides nucléiques, des phospholipides, de la créatine, de polyamines et la méthylation de nombreuses molécules bioactives (37). La S-adenosylhomocystéine (SAH) est le produit de déméthylation des réactions de méthylation et elle est hydrolysée en homocystéine et adénosine.

2.2.2. Voie de trans-sulfuration

L'homocystéine est un élément indispensable au recyclage de la méthionine et des folates, mais dans des contextes nutritionnels particuliers ce recyclage n'est plus assuré (excédent de protéines alimentaires, déficience en folates ou en vitamine B12). L'homocystéine est exportée dans le sang mais a tendance à s'accumuler. L'élimination par les urines n'est pas suffisante et il est donc nécessaire de dégrader cet acide aminé. En fait la majorité de l'Hcy n'est pas reméthylée mais catabolisée en cystéine par la voie de la transsulfuration. Cela permet dans le même temps de produire de la cystéine et ainsi de pallier les besoins immédiats.

L'Hcy est clivée de manière irréversible par la Cystathionine- β -synthase (CBS), une enzyme cytosolique, PLP-dépendante (Phosphate de pyridoxal, dérivé de la vitamine B6), puis elle se condense 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).

Contrairement aux autres voies métaboliques, cette dernière est irréversible, ce qui fait que la cystéine ne peut pas être un précurseur pour la synthèse de méthionine (38). Ceci est important en particulier dans le cadre de recommandations diététiques.

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 neurones et les cellules cardiaques (29). Après la naissance la CBS n'est plus exprimée dans les cardiomyocytes (39). 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 (cystathionase), BHMT, GNMT (glycine N-méthyltransférase). Pour cette raison, il y a dans le tissu hépatique une concentration élevée de méthionine qui peut à son tour augmenter la concentration de la SAM. Les principaux mécanismes régulateurs des niveaux d'Hcy sont l'inhibition de la MTHFR et l'activation de la CBS (40, 41).

3. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

L'homocystéine est catabolisée soit par la voie de la reméthylation en méthionine, soit par la voie de la trans-sulfuration en cystathionine. A l'état physiologique, ces deux voies sont autorégulées, ce qui permet de garder un taux constant d'Hcy (taux cellulaire de 1 $\mu\text{mol/L}$ et taux plasmatique de 10 à 15 $\mu\text{mol/L}$). Cependant, de nombreux facteurs (nutritionnels, environnementaux, et génétiques) peuvent être responsables d'une hyperhomocystéinémie (42). Celle-ci peut se présenter sous trois formes : modérée (de 15 à 30 $\mu\text{mol/L}$), intermédiaire (de 30 à 100 $\mu\text{mol/L}$) et sévère ou majeure ($> 100 \mu\text{mol/L}$) (43) (Tableau 3).

Il existe plusieurs facteurs qui ont une influence sur l'augmentation de l'homocystéine comme la carence en folates, en pyridoxine ou les troubles dans les mécanismes d'absorption de la vitamine B12 ; les altérations du foie, des reins, l'hypothyroïdie, la néoplasie et la transplantation ; la toxicité due aux médicaments ou à l'excès d'alcool ou de café et les troubles enzymatiques (Tableau 3).

3.1. Facteurs nutritionnels

De nombreuses études ont montré qu'il existait une hyperhomocystéinémie chez les sujets adultes soumis à une carence vitaminique, notamment les vitamines du groupe B (44, 45). Il existe 3 principaux types de carences vitaminiques B associées à une accumulation d'homocystéine.

3.1.1. Les folates

Les folates facilitent la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine et la déficience en folates est directement corrélée à l'hyperhomocystéinémie. Les principaux dérivés méthylés des folates sont : le N10-formyltétrahydrofolate (10-MTHF) 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 ; il est produit à partir de 5,10-MTHF, la réaction étant catalysée par la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) comme illustré dans la Figure 8 (8). Ainsi on obtient un groupement méthyle qui servira pour la reméthylation de l'Hcy en méthionine par la MS. L'activité de la MS 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.

Tableau 3. Causes d'une hyperhomocystéinémie.

Légère (15–30 $\mu\text{mol/L}$)

- Insuffisance rénale légère à modérée
- Médicaments : antiépileptiques, méthotrexate, théophylline, médicaments immunosuppresseurs, fibrates, lévodopa, 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 $\mu\text{mol/L}$)

- Insuffisance rénale terminale
- Carence modérée en vitamine B12
- Carence en folates
- Variante de MTHFR 677C>T associée à une carence en folates

Sévère (≥ 100 $\mu\text{mol/L}$)

- Carence profonde en vitamine B12
- Déficit héréditaire en cystathionine béta-synthase
- Déficit héréditaire en méthylène tétrahydrofolate réductase
- Déficit héréditaire en MS

3.1.2. Vitamine B12

L'activité de la MS nécessite la vitamine B12 comme cofacteur et dépend également de la présence d'une deuxième enzyme, la méthionine synthase réductase, qui maintient la liaison entre la MS et la cobalamine dans son état réduit et complètement actif (Figure 9).

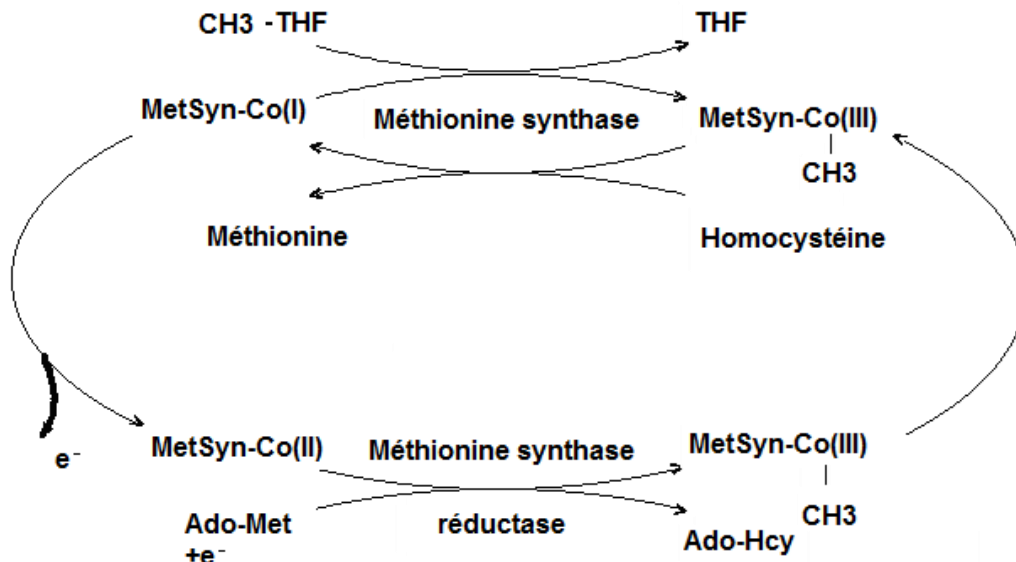


Figure 9. Rôle de la méthionine synthase et de la méthionine synthase réductase. Modifié d'après Leclerc D *et al*, Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 (46).

3.1.3. Vitamine B6

La majorité de l'homocystéine n'est pas reméthylée mais catabolisée en cystéine par la voie de la trans-sulfuration. La voie de la trans-sulfuration est médiée par la CBS, une enzyme cytosolique, PLP-dépendante (Phosphate de pyridoxal, dérivé de la vitamine B6). L'interruption de la voie de la trans-sulfuration du fait de l'absence de la forme active des coenzymes de la vitamine B6 (PLP) est un type de carence en vitamines B associée à une accumulation de l'Hcy.

3.2. Facteurs génétiques

Il existe plusieurs polymorphismes des enzymes intervenant dans le cycle des folates et la reméthylation de l'homocystéine qui sont associés à une augmentation de la concentration en Hcy. Il s'agit principalement des variantes génétiques des enzymes MTHFR (677 C→T, 1298 A→C), MS (2756 A→G), MSR (66 A→G) (47-49). De plus, un polymorphisme portant sur une

protéine de transport de la vitamine B12, la transcobalamine, a été rapporté et peut également s'associer à une hyperhomocystéinémie relative (TC 77 C→G) (50). Le BHMT rs3733890 est significativement associées à l'anomalie de fermeture du tube neural (51).

3.3. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux contribuant à une hyperhomocystéinémie modérée, sont l'âge, le sexe, certains médicaments et certains états pathologiques. Par exemple, les personnes âgées ont des taux d'Hcy plus élevés, et pour lesquels le statut en vitamines a une influence majeure (52). Les hommes aussi ont un taux d'Hcy plus élevée que les femmes à cause des effets des hormones sexuelles et d'une plus grande masse musculaire (53, 54). L'hyperhomocystéinémie modérée peut-être due aux médicaments comme le méthotrexate, la carbamazépine et la phénytoïne, qui interfèrent avec le métabolisme des folates, l'azaribine qui empêche l'activité de la CBS, le monoxyde d'azote, qui inactive la vitamine B12 (55). Les contraceptifs, les oestrogènes ou la pénicillamine diminuent l'Hcy (55). Mais d'une manière générale, la supplémentation en folates et/ou en vitamine B12 est suffisante pour abaisser le taux d'Hcy (56). Les pathologies comme l'insuffisance rénale, l'hypothyroïdie, les affections inflammatoires 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 (57).

4. Pathologies en lien avec une hyperhomocystéinémie

4.1. Les maladies neurologiques

La déficience en folates est impliquée dans certaines maladies cardiovasculaires, dans des maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) et des pathologies neuropsychologiques (dépression, schizophrénie, démence ...) (58). La vitamine B12 est nécessaire à la synthèse de la myéline (59). Sa carence affecte les nerfs optiques, les nerfs périphériques, la moëlle épinière et le cerveau. Ceci se traduit par des névrites, des neuropathies, une perte de la vision et des symptômes psychiatriques (60).

4.2. Les maladies cardiovasculaires

Une hyperhomocystéinémie peut conduire chez l'homme à des pathologies cardiovasculaires et à l'athérosclérose (61). Ainsi, une carence en vitamine B6, B9 ou B12 associée ou non à une

élévation de méthionine due à un régime alimentaire riche en protéines, conduit à une élévation de l'Hcy et à l'athérosclérose dans des modèles animaux (43, 62).

4.3. Les maladies hépatiques

Le métabolisme de la méthionine a lieu majoritairement (80%) dans le foie. Trois des enzymes clés du métabolisme de l'homocystéine sont exclusivement hépatiques: la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT) et les méthionine adénosyltransférase (MAT) MAT1 qui n'existent que dans les hépatocytes et MAT2 qui est ubiquitaire (63). Enfin la voie de la trans-sulfuration est uniquement hépatique; la cysthationine β -synthétase (CBS), première enzyme de cette voie, est uniquement exprimée dans le foie. La synthèse de SAM est profondément diminuée en cas de cirrhose (64), et la carence en donneur de méthyle produit une stéatose hépatique et prédispose au syndrome métabolique. Les dérégulations épigénomiques du métabolisme énergétique jouent un rôle important dans ce processus (65).

4.4. Les maladies hématologiques

Dans le cas d'une déficience sévère en folates, une anémie mégalo-blastique se développe. La synthèse d'ARN et d'ADN nécessaires à la division cellulaire et à la synthèse protéique est réduite et la moëlle osseuse produit des globules rouges géants et immatures. De plus, les folates jouant un rôle essentiel dans le métabolisme des monocarbones nécessaires à la formation de l'hème de l'hémoglobine, une carence conduit à la déficience en globules rouges (58).

4.5. Les maladies obstétriques

La grossesse est une période où les besoins en folates sont considérablement augmentés par les besoins du fœtus et par l'augmentation de l'érythropoïèse (66). Une carence en folates pendant la grossesse peut induire un décollement du placenta, une prééclampsie, une naissance prématurée, un faible poids à la naissance, un retard de croissance et des anomalies du développement (non fermeture du tube neural, fentes palatines, etc.) (67). La supplémentation en folates avant la conception réduit les risques d'anomalies du développement comme le spina bifida et l'anencéphalie (68). Un faible taux de folates dans la nourriture augmente aussi de 50 % le risque d'avortement spontané (69) et une supplémentation avec de l'acide folique avant la conception réduit la fréquence du Syndrome de Down chez l'enfant (70). La carence en folates entraîne également un retard de croissance et un retard de puberté chez l'enfant. Plusieurs études ont associé une concentration plasmatique en homocystéine élevée chez la mère à des fausses couches à répétition, des prééclampsies et des décollements placentaires, ainsi qu'à des retards

de croissance, des accouchements prématurés, des anomalies de fermeture du tube neural (spina bifida, anencéphalie), des anomalies de la face (fentes labiales et/ou palatines) et des stress hépatiques (71).

4.6. Les cancers

La cancérogenèse est un processus multiphasique et multifactoriel qui implique l'enchaînement de processus métaboliques, géniques et épigénomiques.

Les cellules cancéreuses prolifèrent rapidement, la synthèse de leur ADN est accélérée, et leurs besoins en folates sont plus importants (72). La capture des folates dans ces cellules est plus importante que dans les cellules saines. Malgré des teneurs sériques ou érythrocytaires en folates normales, une déficience tissulaire localisée, limitée à la zone atteinte, a été observée dans le cas de l'adénome colorectal (73) et la teneur en folates des cellules tumorales est inférieure à celle des cellules saines adjacentes (74). La carence en folates est ainsi associée au développement de plusieurs cancers : colon (75), rein (76, 77), pancréas (78), estomac (79), oesophage (80), poumon (81) et col de l'utérus (82).

Partie 2 : Les protéines

1. Définition

Les protéines sont une composante indispensable de l'alimentation et dont le rôle nutritionnel est de fournir des acides aminés, de l'azote et de l'énergie. Ce sont des éléments essentiels de la vie cellulaire : elles peuvent jouer un rôle structurel (comme l'actine), un rôle dans la mobilité (comme la myosine), un rôle catalytique (les enzymes), un rôle dans la compaction de l'ADN (les histones) ou d'expression des gènes (les facteurs de transcription), etc. En somme, l'immense majorité des fonctions cellulaires est assurée par des protéines.

Une protéine est une macromolécule biologique composée d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques (chaîne polypeptidique). En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient au moins 50 acides aminés, et de peptide pour des assemblages de plus petite taille.

2. Structure

La structure des protéines est complexe et influe sur le rôle qu'elles jouent dans la vie de la cellule. Les protéines sont des objets moléculaires dont la description précise introduit la notion de structures (de manière plus ou moins hiérarchique).

Pour la première fois en 1957, John Kendrew et Max Perutz, par cristallographie et diffraction des rayons X, ont pu décrire la structure en trois dimensions de la myoglobine et de l'hémoglobine.

La fonction des protéines est liée à leur structure tridimensionnelle, ou conformation c'est-à-dire la manière dont les acides aminés sont agencés les uns par rapport aux autres dans l'espace (Figure 10). C'est la raison pour laquelle les méthodes de détermination des structures tridimensionnelles ainsi que les mesures de la dynamique des protéines sont importantes et constituent depuis longtemps un champ de recherche très actif. En plus de ces méthodes expérimentales, de nombreuses études portent sur des méthodes informatiques de prédiction de la conformation spatiale à partir de la séquence.

L'ordre dans lequel les acides aminés s'enchaînent est codé par le génome et constitue la structure primaire de la protéine. La protéine se replie sur elle-même pour former des structures secondaires, dont les plus importantes quantitativement sont l'hélice alpha et le feuillet bêta, ce qui permet de créer des liaisons hydrogènes entre les atomes de carbone et d'azote des deux

liaisons peptidiques voisines. Puis, les différentes structures secondaires sont agencées les unes par rapport aux autres pour former la structure tertiaire, souvent renforcée par des ponts disulfure. Les forces qui gouvernent ces repliements sont les forces physiques classiques. Dans le cas des protéines formées par l'agencement de plusieurs chaînes, la structure quaternaire décrit la position relative des sous-unités les unes par rapport aux autres (Figure 10).

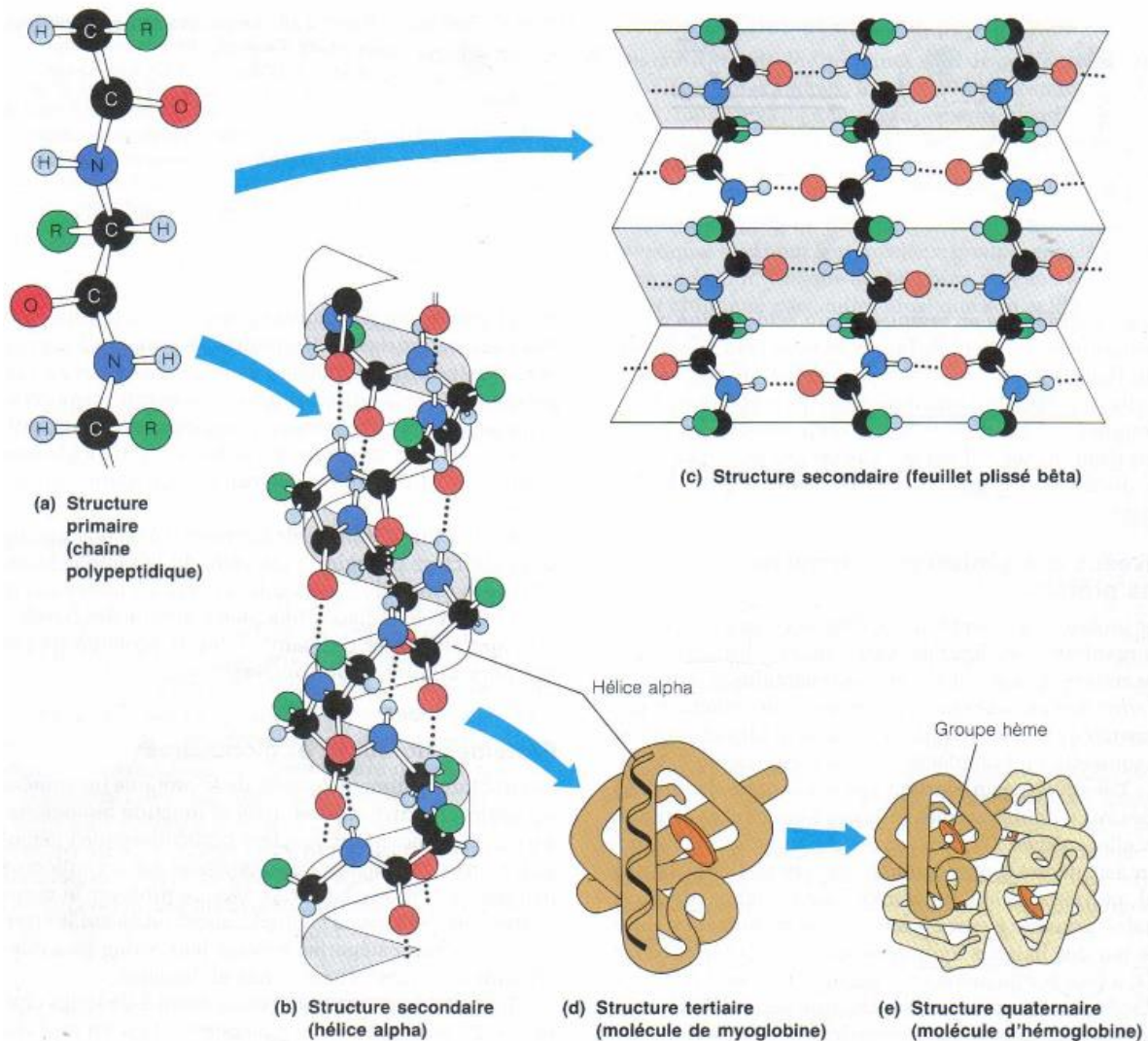


Figure 10. Niveaux d'organisations structurales des protéines.

Il existe plusieurs protéines chaperonnes qui facilitent, voire sont nécessaires, au repliement des protéines vers leur état actif. Le repliement des protéines fait l'objet de recherches intenses dans le domaine de la biologie structurale, alliant les techniques de biochimie, de biophysique moléculaire et de biologie cellulaire.

3. Digestion et absorption des protéines

Les protéines étant de grosses molécules, leur absorption est précédée par une phase de digestion dont le but est de couper les protéines en acides aminés (AA) libres et absorbables (83) (Figure 11).

Trois étapes sont nécessaires :

- Au niveau de l'estomac, l'acidité du milieu commence à dénaturer les protéines, elles perdent leur structure complexe. La pepsine, quant à elle, coupe les liaisons peptidiques entre certains AA de la chaîne, aboutissant à des polypeptides (peptides de grande taille) et quelques AA libres.
- Au niveau du duodénum, les endopeptidases (trypsine, chymotrypsine, élastase) du pancréas ainsi que des carboxypeptidases et aminopeptidases poursuivent le travail de digestion : 30% des AA sont sous forme libres, 70% sont encore sous forme de di- et tripeptides.

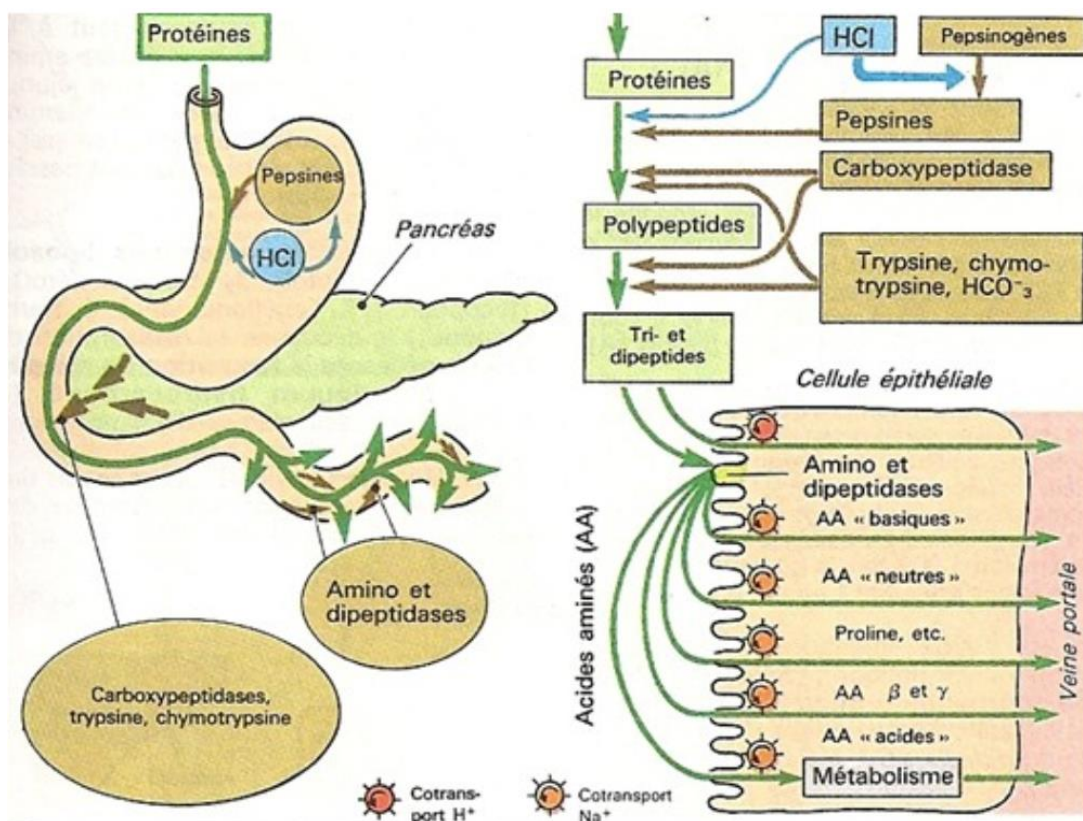


Figure 11. Digestion des protéines et absorption des acides aminés et des oligopeptides.

- Au niveau des entérocytes de la paroi interne de l'intestin grêle, les peptidases réduisent une grande partie des derniers peptides en AA absorbables. L'absorption a lieu au niveau de l'intestin grêle, les AA se retrouvant ensuite dans la circulation sanguine.

Ces AA vont servir à la synthèse et au renouvellement des protéines (300 à 400 grammes des protéines de l'organisme sont renouvelés chaque jour, ce qui représente 3 à 4% du stock total). Ils participent aussi à la production d'énergie selon la voie de la néoglucogenèse.

Les AA excédentaires seront dégradés. L'urée, qui est une molécule peu toxique et hydrosoluble, capte l'ammoniac issu de la dégradation des AA au niveau du foie. L'urée est ensuite transportée vers le rein où elle sera facilement éliminée.

4. Les fonctions physiologiques

Les protéines sont très importantes pour l'organisme à cause de leurs fonctions diverses au sein de la cellule et de l'organisme :

- *Catalyse* : Toutes les enzymes sont protéiques (sauf les ribozymes).
- *Transport* : L'hémoglobine (protéine des globules rouges du sang) qui transporte l'oxygène des poumons aux organes.
- *Communication* : De nombreuses hormones (comme l'insuline) sont des protéines et peuvent véhiculer un message dans l'organisme.
- *Signalisation* : Des protéines sont impliquées dans le chimiotactisme (attraction ou répulsion exercée par une substance chimique sur un être unicellulaire).
- *Reconnaissance* : Le système immunitaire possède des protéines spéciales – les immunoglobulines – qui permettent la reconnaissance moléculaire de formes « étrangères », c'est-à-dire n'appartenant pas aux formes moléculaires de l'organisme qui les fabrique.
- *Structure* : Les protéines du cytosquelette permettent la consolidation et la motilité des cellules, comme c'est le cas pour les flagelles bactériens. On peut aussi citer le collagène, qui structure la matrice extracellulaire.
- *Stockage* : Par exemple, le fer qui est stocké dans le foie en se liant à une petite protéine appelée ferritine.

5. Pathologies en lien avec une dénutrition en protéine

Les hydrates de carbone, lipides et protéines sont les trois principaux composants des macronutriments. La balance entre ces trois composants est importante pour la santé et un déséquilibre peut causer de nombreuses pathologies, et principalement des pathologies métaboliques.

Les adultes ont besoin d'un apport de protéines d'au moins 0,66g/kg/jour pour maintenir l'équilibre de l'azote (84). Cet équilibre dépend de l'azote nécessaire à la fois pour le maintien, et dans le cas de la croissance, le dépôt de protéines supplémentaires dans les tissus nouvellement formés. Le métabolisme des protéines est dépendant de l'âge et conduit à des besoins différents. Par exemple, la synthèse des protéines du corps entier est de 17,4 g/kg/jour chez les nouveau-nés, 6,9g/kg/jour chez les enfants, 3,0g/kg/jour chez l'adulte et 1,9g/kg/jour chez les personnes âgées (85).

Une carence protéique peut avoir de graves conséquences sur l'organisme, comme un mauvais état nutritionnel accompagné d'un ralentissement de la guérison, un affaiblissement du système immunitaire (avec une tendance plus prononcée aux infections), des troubles de la cicatrisation avec un haut risque d'escarres et une faiblesse physique accompagnée d'une perte de masse musculaire et osseuse. Tout ceci en raison des fonctions multiples qu'assument les protéines.

Les données épidémiologiques vont dans le même sens que les données cliniques et montrent un effet protecteur des protéines alimentaires face aux maladies cardiovasculaires. En effet, l'apport en protéines a été inversement associé à ces maladies dans une cohorte de 80.082 femmes (86). Les protéines alimentaires sont également inversement associées à la concentration d'homocystéine dans le sang (87), un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires.

Les populations qui mangent de la viande maintiennent des concentrations plasmatiques d'homocystéine inférieures à celles qui ne mangent pas de viande (88, 89). Dans de nombreuses études de population, résumées par Obarzanek *et al* (90), une pression artérielle élevée a été associée à une diminution des apports en protéines. Un changement de régime alimentaire pendant 4 semaines en hypertension a montré qu'un régime riche en protéines (25% de l'énergie) était efficace pour abaisser significativement la pression artérielle (91). En outre, de nombreuses études de population ont établi que la mortalité par accident vasculaire cérébral (AVC) est inversement associée à l'apport en protéines (92, 93).

Un nombre croissant de preuves indique que les régimes riches en protéines peuvent améliorer le profil lipidique sanguin (94-98) et réduire ainsi le risque de maladies cardiovasculaires. Wolfe et Giovannetti (96) ont montré que la substitution isocalorique de glucides par des protéines (23% de l'énergie) chez les sujets modérément hypercholestérolémiques a permis une diminution significative du LDL et du cholestérol VLDL total, des triglycérides et une augmentation du cholestérol HDL. Des changements similaires de lipides dans le sang ont été observés chez les patients diabétiques de type 2 en combinaison avec l'amélioration du métabolisme du glucose et de l'insuline (94, 95). Chez les femmes obèses, les régimes hypocaloriques et riches en protéines améliorent la sensibilité à l'insuline et préviennent la perte musculaire, tandis que les régimes hypocaloriques et riches en glucides favorisent une mauvaise sensibilité à l'insuline et une perte de masse musculaire et osseuse (99). Les essais cliniques ont montré que les régimes hypocaloriques riches en protéines sont plus efficaces que les régimes hypocaloriques riches en glucides pour la promotion (100) et le maintien (101) de la perte de poids chez les sujets obèses et produisant une sensation de faim moins intense et plus de satisfaction (102).

La carence en protéines peut être particulièrement responsable des troubles de la croissance et s'intègre à une malnutrition plus globale si elle se passe pendant la période périnatale. La cohorte de recherche liée à la famine aux Pays-Bas en 1944 est un très bon exemple pour étudier les effets d'une mauvaise alimentation dès le début de la vie chez les humains (103-105). En faveur de l'hypothèse de la programmation fœtale, les modèles des animaux carencés en protéines pendant les phases périnatales ont été utilisés pour étudier l'impact à long terme d'un environnement intra-utérin défavorable sur la susceptibilité au syndrome métabolique comme la résistance à l'insuline (106, 107), la stéatose hépatique (108, 109) et l'hypertension (110, 111). D'autres études ont montré que la carence périnatale en protéine pouvait aussi modifier les activités des animaux avec un impact négatif sur la croissance physique et les réflexes neurologiques, et évoquer des comportements anxieux et dépressifs (112).

Alors que les modèles de programmation de la fonction métabolique sont bien caractérisés, les mécanismes impliqués dans cette programmation restent encore mal compris.

Partie 3 : Hypothèse de la programmation fœtale

1. Hypothèse de la programmation fœtale

L'hypothèse de la programmation fœtale propose que l'environnement fœtal, en particulier la nutrition, peut directement influencer le développement embryonnaire et "programmer" la santé de l'enfant à l'âge adulte (113, 114) (Figure 12). Il a été clairement montré qu'un environnement intra-utérin défavorable se traduit par une Restriction de Croissance Intra-Utérine (RCIU), et peut conduire à un risque accru de troubles neurologiques, psychologiques et psychiatriques, à la résistance à l'insuline et au diabète, à de l'hypertension, aux maladies coronariennes, à une obésité centrale, une hyperlipidémie, etc... (115-121).

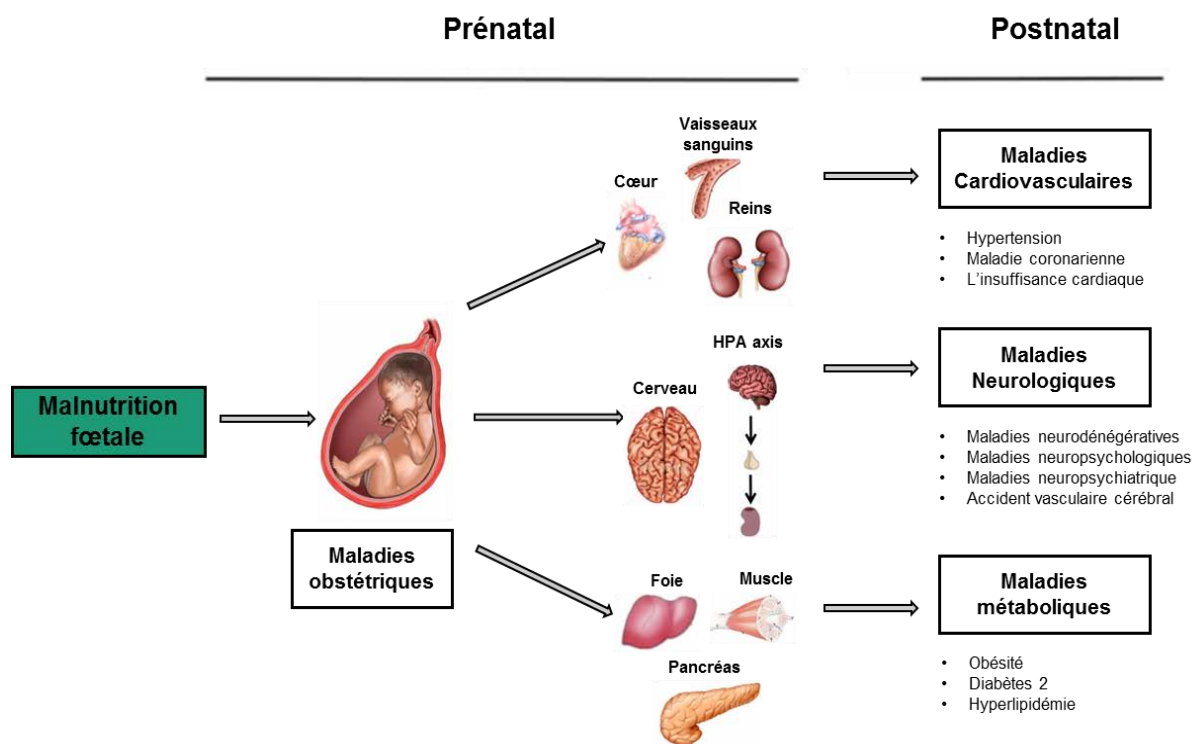


Figure 12. Programmation et développement des maladies et pathologies de la malnutrition fœtale. Le stress maternel influence le développement normal des tissus et des organes du fœtus et augmente le risque de développement des maladies cardiovasculaires, du syndrome métabolique, d'accidents vasculaires cérébraux et de diverses maladies neurocomportementales, neuropsychologiques, et neuropsychiatriques plus tard dans la vie. **HPA**, hypothalamic-pituitary-adrenal. D'après Li Y *et al*, Progress in neurobiology 2012 (114).

Il est intéressant de constater que le risque n'est pas seulement présent chez les enfants présentant des poids extrêmes à la naissance, mais augmente linéairement avec la diminution du poids du bébé.

Ces observations ont entraîné de nombreuses études épidémiologiques chez l'homme, et expérimentales chez l'animal, et ont mené à la découverte d'un grand nombre d'associations

entre des atteintes périnatales et diverses maladies de l'adulte (122) (Tableau 4). Le terme de «programmation fœtale» a été proposé pour décrire la manière dont des événements fœtaux ou périnataux agissent sur le fœtus et influencent le développement de maladies une fois atteint l'âge adulte.

Tableau 4 (122). Exemples d'association entre les atteintes périnatales et les maladies de l'adulte	
Facteurs environnementaux responsables de la programmation fœtale	Pathologies liées à la programmation fœtale
<ul style="list-style-type: none"> • Restriction alimentaire maternelle <ul style="list-style-type: none"> - Restriction calorique - Restriction protéique - Restriction en micronutriments • Substances exogènes <ul style="list-style-type: none"> - Glucocorticoïdes - Nicotine • Perturbations de la circulation utéro-placentaire 	Mortalité par accidents cardiovasculaires Maladies coronariennes Diabète (type 1 et 2) Obésité Hypertension Dyslipidémie Ostéoporose Schizophrénie Cancer (sein ; testicule ; leucémies...)
Hypoxie périnatale Prééclampsie	Hypertension artérielle pulmonaire

Des études épidémiologiques chez l'homme ont permis de démontrer que l'incidence des maladies métaboliques de l'adulte (obésité, hypertension, résistance à l'insuline, syndrome métabolique) est nettement augmentée quand la nutrition maternelle est perturbée à des périodes critiques du développement fœtal (123) et la phase périconceptionnelle joue un rôle important pendant cette programmation (124, 125). Il a été montré par de nombreuses études que l'alimentation maternelle durant la vie fœtale pouvait affecter le développement à long terme de la descendance, certains modèles animaux indiquent qu'une restriction en donneurs de méthyle ou en protéines pendant la période périconceptionnelle affectent le métabolisme de l'organisme et la régulation du métabolisme au niveau du foie et du coeur, le développement cardiovasculaire, le système neurologique ainsi que d'autres paramètres (65, 106, 126). Ainsi,

les fenêtres de susceptibilité à la programmation métabolique s'étend à la période préconceptionnel (127-130).

Les effets passent par l'altération de l'expression de gènes clés impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, comme le métabolisme du lipide et du glucose, l'adipogenèse, la fonction mitochondriale ou le processus du développement. Des mécanismes épigénétiques sont certainement aussi mis en jeu pendant la phase périconceptionnelle, comme cela a été démontré chez l'homme avec des modifications au niveau de la méthylation de l'ADN chez des gènes soumis à l'empreinte (IGF2, GNASAS et MEG3) et des gènes non soumis à l'empreinte jouant un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes et du métabolisme (IL10, LEP et ABCA1) (104, 105), et la recherche sur le gène IGF2 montre aussi un effet plus profond pendant le début de la gestation. De nombreuses études sur des modèles animaux carencés en donneurs de méthyle ou en protéines dans la période périnatale ont déjà été réalisées mais la plupart sont des études d'observation, les mécanismes sous-jacents ne sont pas très clairs. Nous avons de ce fait utilisé les deux modèles pour mieux étudier les mécanismes sous-jacents au niveau du transcriptome et du méthylome. Et les mécanismes suggérés auparavant sont présente comme suit.

2. Mécanismes sous-jacents à la programmation fœtale

Trois principaux mécanismes ont été suggérés : une altération de la croissance de certains organes, un excès de corticoïdes et des modifications épigénétiques (122).

2.1. Croissance diminuée de certains organes

Lorsque le fœtus manque de substrats pour son développement à cause de la malnutrition maternelle ou de problèmes de transmission des nutriments de la mère au fœtus pendant la phase prénatale, la croissance de certains organes s'en trouve altérée (131). Par exemple, une alimentation hypocalorique induit une diminution du nombre de cellules bêta du pancréas qui peut expliquer, du moins en partie, le risque augmenté de diabète à l'âge adulte (132-134). Une diminution du nombre de néphrons à cause de la restriction en protéine pourrait être responsable de l'augmentation du risque d'hypertension à l'âge adulte (135), alors qu'une réduction du nombre total de cardiomyocytes à la naissance pourrait être associée à l'augmentation du risque des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte (136).

2.2. Excès persistant de corticoïdes

La malnutrition des rattes enceintes (réduction de 50% de l'apport énergétique) provoque une augmentation des glucocorticoïdes maternels et néonataux (137). Le même phénomène est observé chez le cochon d'Inde, où une réduction de 40% de l'apport énergétique de la nutrition maternelle augmente les concentrations de cortisol plasmatique maternel et fœtal (138). Le traitement des rattes enceintes nourries avec un régime à faible teneur en protéines, avec un inhibiteur de la synthèse des glucocorticoïdes (metyrapone), conduit à une progéniture qui n'avait pas d'augmentation de la pression artérielle. Un excès de corticostérone conduit aux mêmes effets (139, 140). Ces données soutiennent l'hypothèse que l'exposition excessive de l'unité foeto-placentaire aux glucocorticoïdes maternels réduit le poids à la naissance et l'hypertension ultérieure.

On pense que l'exposition fœtale à un excès de corticoïdes induit une diminution du nombre de récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hypothalamus fœtal. Il en résulte une perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire et une hypercortisolémie persistant après la naissance (141).

Bien qu'il n'existe actuellement que peu de données chez l'humain concernant les effets à long terme de l'exposition anténatale aux corticoïdes, il a été démontré que les enfants nés de telles grossesses présentent un plus faible poids à la naissance (141).

2.3. Modifications épigénétiques

L'épigénétique est l'ensemble des mécanismes moléculaires ayant lieu au niveau du génome, transmissibles d'une génération à l'autre, sans altération des séquences nucléotidiques. Les principales modifications sont des altérations de la méthylation de l'ADN qui se produit sur les cytosines, surtout au niveau des îlots CpG, et les modifications post-traductionnelles des histones entraînant des changements dans l'assemblage de la chromatine (142). Ces modifications se passent principalement au niveau des promoteurs des gènes et auront comme effet de réguler l'expression des gènes en exprimant fortement certains gènes, alors que d'autres seront réprimés.

De plus en plus d'études se concentrent maintenant sur les implications de l'épigénétique lors du déclenchement d'une maladie. Comme la régulation épigénétique au cours du développement subit des changements dynamiques, l'épigénome a un caractère labile, qui lui permet de répondre et de s'adapter aux facteurs de stress environnementaux, y compris la modification nutritionnelle (143, 144). Par exemple, la supplémentation ou la limitation de l'alimentation de la mère en folates, méthionine ou choline a permis de démontrer l'impact sur

les méthylations de l'ADN (145, 146). La méthylation de l'ADN ou des histones nécessite des donneurs de méthyle provenant des folates et donc nécessite la présence des vitamines B6 et B12, de la choline et de la méthionine pour le métabolisme du monocarbonate, ainsi qu'une gamme de méthyltransférases (147-151). Des changements épigénétiques dans les modèles de rat avec restriction maternelle en protéines ont été rapportés pour le récepteur de l'angiotensine II de type 1b dans la glande surrénale. L'hypométhylation du promoteur proximal de ce gène a pour effet d'en augmenter l'expression et d'induire une augmentation du nombre de récepteurs à l'angiotensine, et développement d'une hypertension artérielle (110, 152). Un autre exemple est les modifications de méthylation et de l'expression des gènes soumis à l'empreinte Igf2/H19 chez les rats mâles, causées par la restriction en protéines dans la nourriture maternelle (153).

En plus des modèles de restriction alimentaire de la mère, un certain nombre de travaux suggèrent que l'obésité maternelle et l'hypernutrition au début de la vie peuvent provoquer des changements épigénétiques chez la progéniture. Par exemple, l'hypernutrition pendant la période d'allaitement peut conduire à des modifications épigénétiques dans les gènes clés impliqués dans la voie de signalisation de l'insuline au niveau du muscle squelettique et conduire au développement ultérieur d'une résistance à l'insuline (154). Une autre étude a montré que l'obésité et le diabète maternel induisent des anomalies métaboliques latentes et des changements épigénétiques généralisés chez les souris isogéniques (155).

Une caractéristique importante des modifications épigénétiques de l'ADN est qu'elles sont transmises lors de la division cellulaire et perdurent durant la vie entière. On comprend donc aisément qu'une perturbation de ces mécanismes pourrait être à l'origine d'atteintes se manifestant des années plus tard (156, 157). Il existe des preuves pour les lignées germinales et somatiques de l'héritage des modifications épigénétiques qui peuvent être responsables de changements phénotypiques dans les générations futures (158). La transmission épigénétique transgénérationnelle des caractères permet une meilleure adaptation des générations à leur environnement (159). Dans cette hypothèse, les gènes programmés pour l'adaptation acquise au cours de la vie des parents persistent à la génération suivante, permettant aux générations futures de mieux survivre dans un environnement potentiellement défavorable. Cependant, il semble que des expositions environnementales telles qu'une nutrition pauvre au début de la vie, entraînent des réactions parentales inadaptées qui peuvent être transmises à la descendance. Ces changements épigénétiques ont le potentiel de favoriser la manifestation d'un phénotype au niveau de la population à l'échelle de plusieurs générations. Cette transmission peut exacerber l'apparition rapide de phénotypes tels que l'obésité et le diabète actuellement observés dans les

populations humaines (159). Étonnamment, cette transmission ne passe pas uniquement par la lignée maternelle. Des études ont montré que la nutrition durant l'adolescence du père (et même du grand-père) influence le méthylome et le transcriptome chez la descendance (12, 160).

Enfin, les modifications épigénétiques dues à des facteurs environnementaux n'ont pas lieu uniquement pendant la période fœtale, mais peuvent aussi se produire après la naissance. Une étude de Weaver *et al.* (161) a montré que les variations dans les soins maternels modifient directement le statut de méthylation de promoteur du gène GR, influençant directement la réponse au stress.

3. « Gatekeeper hypothesis »

Ozanne a montré que différents modèles d'animaux malnutris pendant la phase périnatale pouvaient tous développer un syndrome métabolique (162), peut-être par les mêmes mécanismes moléculaires. McMullen *et al.* a proposé la « gatekeeper hypothesis » : Les gènes et les voies modifiés de la même façon, par des stress nutritionnels différents peuvent être ceux qui sont responsables de la génération des phénotypes des maladies (163).

Dans ma thèse, j'ai travaillé au niveau du transcriptome et du méthylome de 2 modèles : le rat carencé en donneurs de méthyl et le rat dénutri en protéine. Ensuite, je vais comparer le transcriptome entre les 2 modèles pour regarder s'il existe des modifications en commun entre les 2 modèles. On suppose que les gènes qui changent la même façon au niveau du transcriptome soient des « gatekeeper genes ».

Partie 4: Profils génomiques et épigénomiques

1. Génome : Du gène à la génomique fonctionnelle

L'ADN est le support héréditaire de l'information. La découverte de la structure de l'ADN par James Watson et Francis Crick en 1953 (164) permet de comprendre comment l'information génétique est transmise de génération en génération. Cette découverte de la double hélice d'ADN, composée des 4 bases complémentaires Adénine - Thymine, et Guanine - Cytosine permet de comprendre le mécanisme de réplication d'un brin d'ADN, et donc les mécanismes d'apparition des mutations. La découverte de la structuration en codon de l'ADN par George Gamow a conduit à la notion de code génétique par Nirenberg (165) qui explique les mécanismes de transcription en ARN et de traduction en protéines. Au cours de la décennie suivante, Walter Fiers séquence pour la première fois un gène, celui codant pour la protéine de capsid du bactériophage MS2 (166), puis le génome complet de ce même organisme.

Les nouvelles connaissances sur les séquences des gènes permettent à Phillip Sharp et Richard J. Roberts d'identifier des gènes capables de produire plusieurs protéines, c'est la découverte de l'épissage alternatif (167). Dès lors, le dogme central de la biologie moléculaire « un gène, une protéine » est fortement compromis. Les progrès considérables de la biologie moléculaire, et les débuts de la bioinformatique permettant la détection *in silico* de gènes à partir des ORF (Open Reading Frame – phase ouverte de lecture) rendent alors possible des études plus complètes du génome, c'est le début de la génomique. La Figure 13 résume l'évolution du concept du gène (167).

1.1. La génomique

La génomique est l'étude exhaustive des génomes et en particulier de l'ensemble des gènes, de leurs dispositions sur les chromosomes, de leurs séquences, de leurs fonctions et de leurs rôles. Elle se décompose en deux orientations complémentaires: la génomique structurale et la génomique fonctionnelle. Les débuts de la génomique remontent au séquençage complet, par Frederick Sanger en 1977 du génome du phage Φ -X174 (168). De nombreux programmes internationaux d'étude systématique des génomes sont alors lancés dans les années 80, et les premières cartes génétiques, géniques et physiques des génomes ont été construites, en vue de leur séquençage.

Le premier axe de la génomique qui a été développé est celui de la génomique structurale. Elle comprend principalement le séquençage des génomes, la détermination de polymorphismes et

la détection d'altérations géniques. Cette branche de la génomique permet, en particulier, de reclasser l'ensemble des espèces en fonction de l'évolution de leurs génomes (génomique comparative), d'identifier précisément la position des gènes sur les génomes, et d'étudier les polymorphismes liés aux pathologies humaines.

Le deuxième axe de la génomique est la génomique fonctionnelle, qui a pour but d'identifier la fonction des gènes, ainsi que d'étudier la variation de leur expression. La génomique fonctionnelle a pour ambition de comprendre tous les mécanismes dynamiques de régulation transcriptionnelle à l'échelle d'un tissu ou d'un organe pour expliquer le phénotype observé.

Au-delà de l'aspect fondamental de ces études, elles permettent également de comprendre les dérégulations sous-jacentes aux pathologies étudiées, et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Toutes ces études de génomique, qu'elles soient structurales ou fonctionnelles, ont pour point commun de s'intéresser à l'intégralité du génome, et nécessitent donc la mise au point de technologies permettant d'analyser, en une seule fois et si possible dans les conditions physiologiques, le génome global.

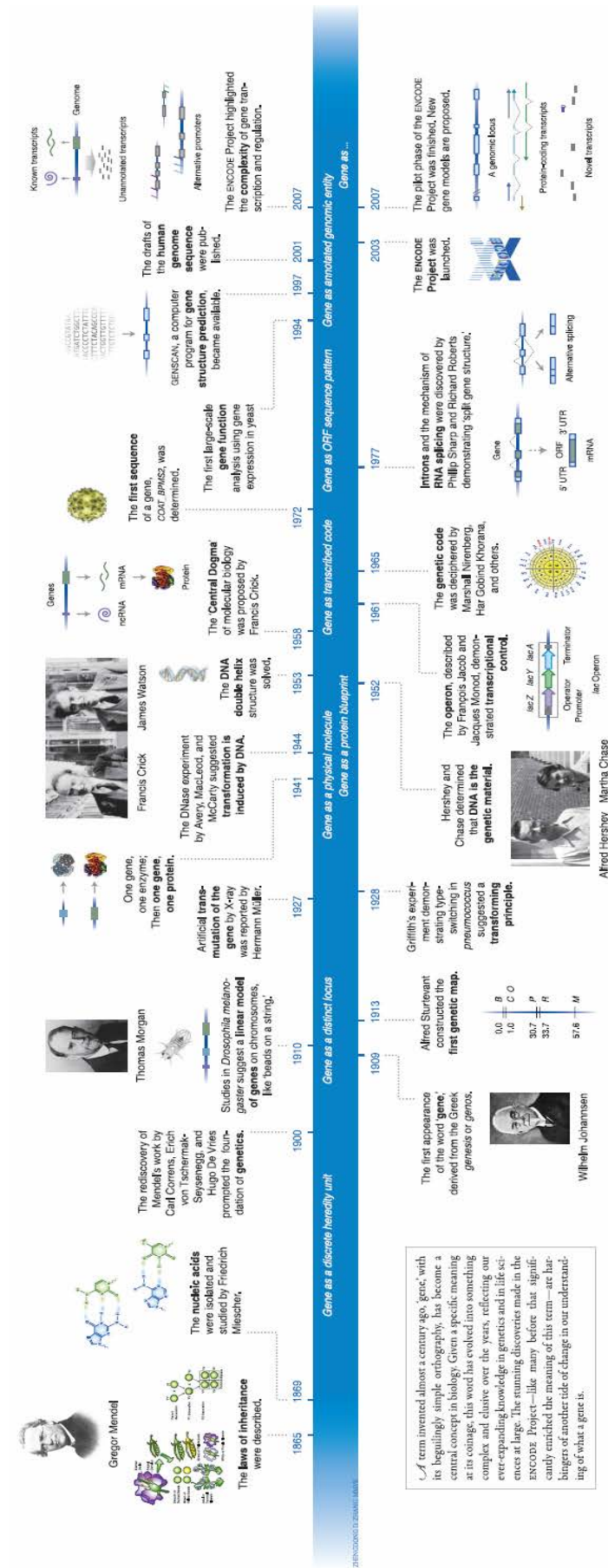


Figure 13. L'évolution du concept du gène. Historique des découvertes ayant fait évoluer les concepts du gène, depuis 1865. D'après Gerstein MB *et al*, Genome Res, 2007 (167).

1.2. Les outils de la génomique

Les deux principales méthodes de la génomique sont les puces à ADN et le séquençage.

Les puces à ADN ont été utilisées pour la première fois en 1995, notamment par l'équipe de Patrick O'. Brown (169) pour l'analyse de l'expression des gènes d'*Arabidopsis Thaliana*. Les puces à ADN se composent d'un support, généralement en verre ou en silicium, sur lequel est positionné un réseau de sondes ordonnées. Les 2 principales techniques de fixation des sondes sur le support sont le dépôt et la synthèse *in situ*. La technique de synthèse *in situ* présente l'avantage d'une reproductibilité parfaite lors de la production de plusieurs lames, ce qui n'était pas le cas avec la méthode par dépôt. Elle permet également d'augmenter la résolution des puces à ADN. Le nombre de sondes, variable en fonction du fournisseur, peut atteindre plusieurs millions sur une seule lame. L'ARN ou l'ADN de l'échantillon que l'on veut étudier va être amplifié et marqué, généralement par un fluorochrome, puis hybridé sur la puce à ADN. Le principe de fonctionnement des puces à ADN repose sur la découverte de la complémentarité des bases par Watson et Crick (164). En effet, chaque ADNc présent dans l'échantillon étudié va s'hybrider sur la sonde complémentaire à sa séquence précisément localisée sur la puce à ADN. Suite à l'hybridation et au lavage de la lame, une lecture laser permet de quantifier l'émission de fluorescence des sondes. Les puces à ADN, initialement utilisées principalement pour mesurer l'expression des gènes (transcriptome), ont maintenant de nombreuses autres applications. On les utilise notamment pour des études de CGH (Comparative Genomic Hybridization), de SNP (Single Nucleotide Polymorphism), de miRNA (les micro-ARN), de ChIP-chip (ChIP pour Chromatin Immuno-Precipitation, puis hybridation sur puce) ou encore de méthylation de l'ADN.

Le séquençage est une technique plus ancienne, mais dont les progrès récents ont rendu ses champs d'applications beaucoup plus importants. Les premières techniques de séquençage du génome humain nécessitaient l'utilisation de milliers de BAC (Bacterial Artificial Chromosome), chacun contenant un fragment d'ADN d'environ 100 kb. Ces BAC devaient ensuite être amplifiés par culture bactérienne, isolés puis coupés en plusieurs petits fragments de 2 à 3 kb qui sont alors clonés dans des plasmides. La séquence de chaque BAC est couverte en moyenne 8 fois par les plasmides afin de pouvoir par la suite reconstruire la séquence complète du génome. Depuis le projet génome humain, il est possible de fragmenter directement l'ADN génomique et de le cloner dans des plasmides, sans passer par l'étape des BAC. La technique de séquençage utilisée dans ces 2 cas de figure reste celle de Sanger (168), avec un système de capillarité. Les techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS pour Next Generation

Sequencing), disponibles depuis 2004, révolutionnent actuellement le séquençage, non seulement en termes de temps, de fiabilité et de coûts, mais aussi en termes d'applications.

1.2.1. Mesure de l'expression des gènes

La mesure de l'expression des gènes, le transcriptome, se fait par la mesure du nombre de copies d'ARNm transcrits pour chaque gène. Plus un gène dans une situation donnée est transcrit, et plus la quantité d'ARNm sera importante.

Les puces à ADN sont historiquement l'outil de référence pour l'étude du transcriptome. Le principe fondateur des puces à ADN est basé sur la technique d'hybridation entre des séquences complémentaires d'acides désoxyribonucléiques, conformément aux observations de E. Southern en 1975 (170). La particularité des puces à ADN réside dans la miniaturisation du procédé permettant des milliers d'hybridations simultanées en utilisant une moindre quantité de matériel génétique. Une puce à ADN est constituée d'un ensemble de plusieurs milliers à

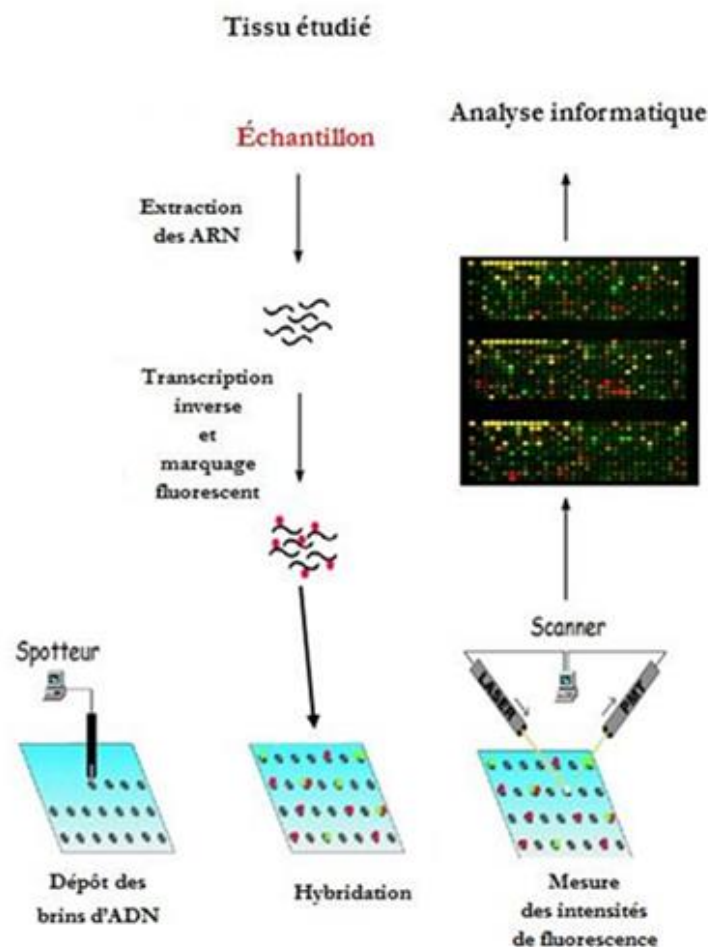


Figure 14. Etapes pour l'hybridation d'une puce à ADN. L'ARN messenger d'un échantillon est extrait, marqué par reverse transcription (ADNc) par un fluorochrome puis hybridé sur une puce à ADN.

plusieurs millions de sondes nucléotidiques déposées ou synthétisées sur un support solide de quelques centimètres carrés, chaque sonde étant spécifique d'un gène ou fragment de gène déterminé. Une fois les ARNm extraits des cellules, ils sont amplifiés et marqués par des fluorochromes. Les échantillons sont alors hybridés sur une puce à ADN. Ces étapes sont reprises dans la Figure 14.

La lame est alors scannée au moyen de lasers et les données d'expressions de chacune des sondes sont enregistrées. Des méthodes de normalisation et de traitement des données permettent alors d'identifier les gènes dont l'expression est différente entre les 2 situations étudiées.

L'objectif de ces études d'expression génique à large spectre est d'identifier les modifications de quantité d'ARNm de certains gènes en rapport avec une pathologie donnée, un paramètre de jugement clinique ou en réponse à un traitement. L'idée est que de l'analyse de ces modifications d'expression émergera l'identification des mécanismes impliqués dans la maladie étudiée ou la définition d'une signature moléculaire spécifique du diagnostic ou du pronostic. Deux stratégies d'utilisation majeures se détachent :

a. L'identification de « gènes candidats » :

L'objectif est d'identifier une relation entre un ensemble de gènes et une caractéristique (pathologie, malnutrition pendant période périnatale, phénotype particulier) sur la base de leurs variations d'expression entre les différentes situations étudiées. Ces gènes sont des candidats valables pour l'identification de variations génétiques associées à un risque morbide accru ou à une réponse au traitement anormale. L'identification d'un ensemble de variations génétiques permettant de prédire avec une bonne fiabilité un risque morbide permettrait la mise en place d'un test de dépistage individuel de ces anomalies à l'échelle des populations à partir d'un échantillon sanguin. Ceci aboutira à une meilleure prédiction du risque à l'échelle de l'individu. L'étude de ces gènes et de leur fonction permet également une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

b. L'identification de signatures moléculaires :

L'ensemble des gènes spécifiquement exprimés de manière différentielle dans une situation clinique ou biologique précise correspond à une signature moléculaire de cette situation. Cette signature peut être utilisée comme un biomarqueur. Les études d'expression génique peuvent

fournir une vision très précise, basée sur des milliers de caractéristiques, du phénotype moléculaires d'un individu. L'utilisation d'une signature basée sur plusieurs dizaines ou centaines de caractéristiques moléculaires permettrait une stratification fine du risque morbide ou de la réponse à un traitement à l'échelle de l'individu. Des applications dans le domaine de la cancérologie ont confirmé ce concept (171-173).

1.2.2. Etude des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines qui agissent sur le niveau d'expression des gènes, en régulant la transcription du gène en ARNm. Ils se lient à l'ADN grâce à leur domaine de liaison à l'ADN, ou en complexe avec d'autres facteurs de transcription (co-facteur), et peuvent activer, ou inhiber, l'expression des gènes. La Figure 15 présente les différents mécanismes de régulation de la transcription par les facteurs de transcription (174).

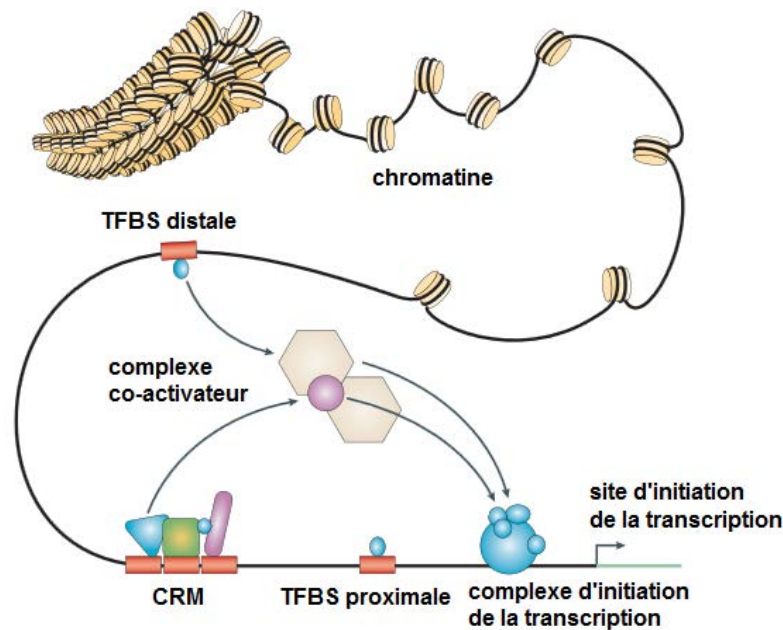


Figure 15. Mécanisme de régulation de la transcription. Représentation des principales zones de régulation de la transcription : le complexe d'initiation de la transcription, le TFBS (Transcription Factor Binding Site) proximal, les CRM (Cis Regulatory Module), et le TFBS distal. Tiré de Wasserman et Sandelin, Nat Rev Genet, 2004 (174).

1.2.3. La découverte de motifs

Les méthodes de découverte de motifs sont utilisées pour identifier les sites de fixation des facteurs de transcription sur l'ADN. Ces méthodes sont utilisées aussi bien sur les résultats de ChIP-chip (Chromatin ImmunoPrecipitation on chip) que de ChIP-seq (Chromatin ImmunoPrecipitation followed by sequencing), afin de localiser précisément le site de fixation. L'objectif des méthodes de découverte de motifs est d'identifier un motif, une courte séquence

d'ADN, statistiquement surreprésentée dans un jeu de séquences par rapport à ce que l'on attendrait par hasard. Il sera alors légitime de penser que ce motif est un bon candidat pour représenter un site de fixation de facteur de transcription. Cette recherche est effectuée, dans le cas d'une étude de ChIP, sur les séquences positives par comparaison à des séquences négatives de même nature.

2. L'épigénome

L'épigénome est l'ensemble des modifications épigénomiques d'une cellule. L'épigénétique est l'ensemble des mécanismes moléculaires ayant lieu au niveau du génome transmissible d'une génération cellulaire à l'autre, sans altérations des séquences nucléotidiques (ADN), et avec un caractère réversible.

L'étude de l'épigénome est essentielle pour comprendre le fonctionnement des génomes en général. C'est un domaine de la génétique fonctionnelle qui est très en vue actuellement. Il représente une interface réglementaire majeure du génome eucaryote et adresse la question de la plasticité génomique. Bien que toutes les cellules nucléées portent le même génome, elles expriment des gènes différents à des moments différents; ceci est régi entre autres, par des variations épigénomiques.

2.1. Epigénomique

L'épigénomique est l'étude de l'ensemble des modifications de l'épigénome d'une cellule. Les mécanismes épigénomiques peuvent être perturbés ou influencés *in utero* et dans l'enfance. La pollution chimique, les médicaments et les drogues, le vieillissement et l'alimentation sont des facteurs qui peuvent agir sur l'épigénome. Les cancers, l'auto-immunité, les troubles psychiatriques et le diabète peuvent résulter de dérangements épigénomiques.

L'épigénomique s'intéresse aux mécanismes dynamiques et réversibles permettant de réguler l'expression des gènes, sans affecter la structure primaire de l'ADN. Les modifications épigénomiques impliquent la méthylation de l'ADN ou les modifications post-traductionnelles des histones. Les histones sont des protéines autour desquelles l'ADN peut s'enrouler, ce qui le rend plus compact et en régule l'expression génique. Ces modifications sont connues pour réguler un large panel de processus physiologiques et pathologiques (175).

- Les modifications post-traductionnelles des histones incluent la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, l'ADP-ribosylation ou la SUMOylation de résidus spécifiques (176). Ces modifications modifient la compaction de la chromatine. Elles peuvent influencer l'expression des gènes en régulant l'accessibilité de l'ADN à des facteurs de transcription ou leur recrutement (Figure 16).

Ces mécanismes restent toutefois assez complexes. Par exemple, l'acétylation de la lysine est souvent corrélée à une activité transcriptionnelle alors qu'une méthylation de lysine peut avoir des effets différents sur la transcription selon la position de la lysine méthylée (177, 178).

- La méthylation de l'ADN s'effectue par l'ajout d'un groupement méthyle, grâce à des méthyltransférases de l'ADN, au niveau des cytosines chez la plupart des eucaryotes, et uniquement dans le contexte de dinucléotides CpG chez les mammifères (179). Le nombre et la façon dont sont méthylées ces bases influencent souvent l'expression des gènes : une faible méthylation se traduit le plus souvent par une forte expression du gène alors qu'un haut niveau de méthylation inactive le gène (Figure 16).

Ces dinucléotides, assez rares dans le génome (180) suivent une distribution non uniforme : il existe des domaines, appelés îlots CpG, où ils sont plus fortement représentés. Les îlots CpG sont fréquemment retrouvés directement en amont et dans le premier exon des gènes (181). Lorsqu'un îlot CpG d'une région promotrice est méthylé, le gène situé en aval est généralement réprimé (179, 182).

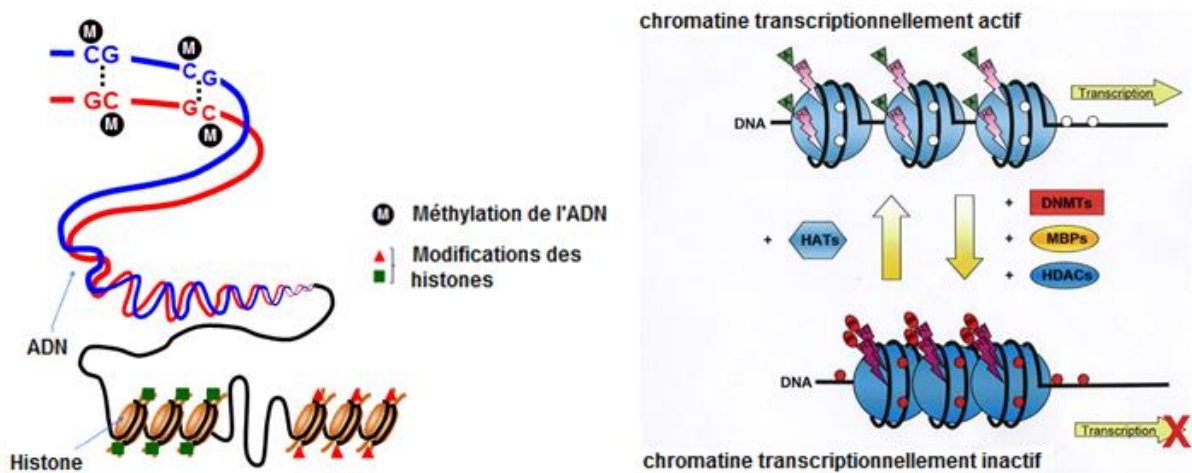


Figure 16. Méthylation de l'ADN et modifications des histones. HAT, Histone acétyl transférase; DNMT, ADN méthyltransférases; MBP, methylation binding protein; HDAC, Histone désacétylase. Modifié d'après <http://www.ncc.go.jp/en/nccri/divisions/14carc/14carc01.html> et Lindsey JC *et al*, Neurosurg Focus, 2005 (183).

La répression génique peut donc se faire par deux mécanismes :

La méthylation de l'ADN peut empêcher le recrutement de facteurs de transcription par l'ARN polymérase au niveau de la région promotrice et elle peut également entraîner une modification des histones, rendant ainsi l'ADN inaccessible.

La méthylation de l'ADN est impliquée notamment dans les processus de développement et de différenciation. Le profil de méthylation au cours du développement est présenté dans la Figure 17. La méthylation de l'ADN change lors de la reprogrammation épigénétique du développement. Des cellules germinales primordiales (PGCs) émergent dans les embryons à E7.5 et, en concomitance avec leur prolifération et leur migration vers la crête génitale, la méthylation de l'ADN est globalement effacée (ligne noire). Après la détermination du sexe,

un nouveau profil de la méthylation de l'ADN est établi dans les précurseurs des cellules germinales dans un mode asymétrique dans les embryons mâles et femelles. Dans l'embryon mâle (ligne bleue), la méthylation *de novo* a lieu avant la méiose dans les cellules mitose arrêtées (G1 phase ; prospermatogonia) et se termine avant la naissance. Dans l'embryon femelle (ligne rouge), les ovocytes primaires entrent en méiose et s'arrêtent en prophase I (stade diplotène). La méthylation de l'ADN est établie après la naissance au cours de la phase de croissance folliculaire / ovocyte. A la puberté, sous déclencheurs endocriniens spécifiques, les ovocytes de vésicule germinative (GV) adulte reprennent la première division de la méiose. Après l'expulsion du premier corps polaire, les ovocytes s'arrêtent en métaphase de la deuxième division de la méiose (MII ovocytes) et la méiose est terminée seulement à la fécondation. Après la fécondation, une nouvelle vague de déméthylation de l'ADN a lieu et elle est différente sur les génomes parentaux. Dans le zygote, la méthylation de l'ADN du génome paternel est rapidement effacée par un mécanisme actif (ligne bleue). La déméthylation du génome maternel est plus lente (ligne rouge) et elle est sous la dépendance de la réplication de l'ADN (déméthylation passive). Elle est concomitante avec l'implantation du blastocyste et la détermination des cellules de la lignée germinale, de nouveaux profils de la méthylation sont établis, associés à la différenciation cellulaire.

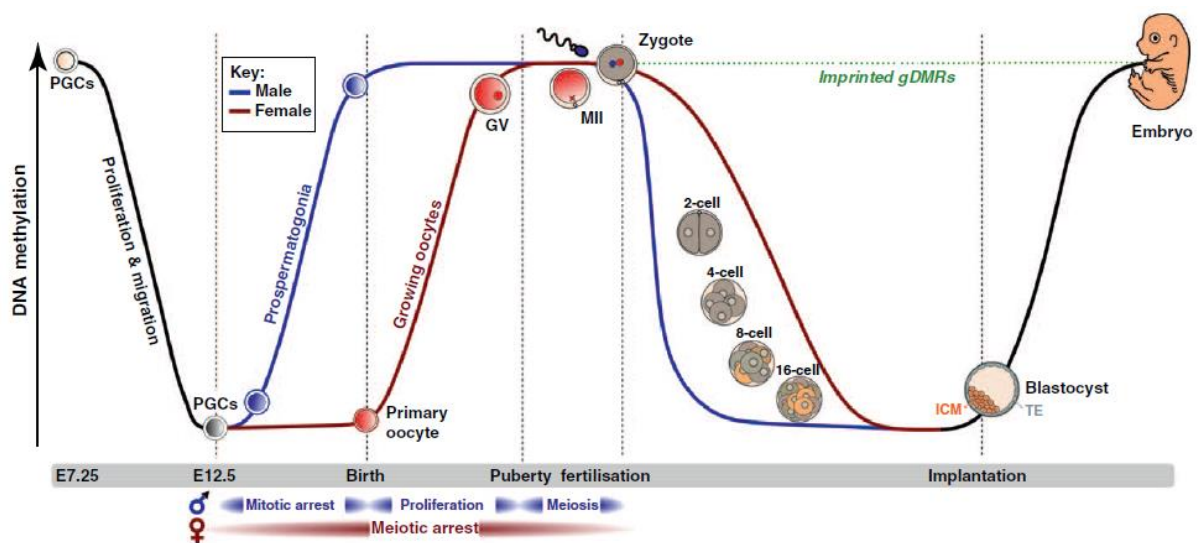


Figure 17. Le cycle de la méthylation de l'ADN : la dynamique de la méthylation de l'ADN au cours de développement. PGCs, Primordial germ cells ; GV, Germinal vesicle. Modifié d'après Smallwood et Kelsey (184).

Ces événements de déméthylation post-fécondation ne comprennent pas les gDMRs soumis à l'empreinte (ligne pointillée verte), ce qui entraîne la méthylation allèle-parental spécifique de ces éléments dans les embryons précoces et l'expression des gènes soumis à l'empreinte associés. Concomitante avec l'implantation du blastocyste et la détermination des cellules de la

lignée germinale, de nouveaux profils de la méthylation sont établis, associés à la différenciation cellulaire (184).

Un épigénome est la description de ces modifications au niveau de l'ensemble du génome, à un temps donné, dans des conditions données et dans un système biologique donné. Son étude permet d'avoir une distribution de ces modifications dans le génome. L'épigénome répond à des signaux environnementaux en modulant l'activité des gènes et sa variabilité peut être à l'origine de certaines maladies multifactorielles (185).

Au niveau de l'interaction ADN-protéines, les facteurs de transcription modulent également l'activité des gènes. Ce sont des protéines qui se lient généralement à une séquence bien précise de l'ADN et qui induisent, facilitent ou inactivent la transcription des gènes de diverses façons. Ils peuvent notamment agir au niveau de la condensation de la chromatine, de l'initiation de la transcription et de la phase d'élongation du transcrit. Déterminer la présence (ou non) d'un ou de plusieurs facteurs de transcription sur l'ADN peut renseigner sur l'activité transcriptionnelle des gènes.

2.2. Epigénétique et hérédité épigénétique

L'épigénétique transgénérationnelle est la transmission de marques épigénomiques au cours des générations. Nous avons l'habitude de penser que l'épigénome d'un nouvel embryon a été complètement effacé et reconstruit à partir de zéro (Figure 17). Mais ce n'est pas tout à fait vrai, certaines balises épigénétiques restent en place et se transmettent de génération en génération (12), un processus appelé hérédité épigénétique.

L'épigénétique joue un rôle essentiel dans le domaine nutritionnel, les modifications de la chromatine qui se produisent en réponse aux signaux métaboliques sont dynamiques ou stables et pourraient même être hérités de façon transgénérationnelle (186). Padmanabhan N *et al.* ont trouvé que des mutations dans le métabolisme des folates pouvait provoquer une instabilité épigénétique et des effets transgénérationnels sur le développement (12). Une étude sur des rats a montré que, la génération G0, carencée en protéines pendant la grossesse et la lactation, peut entraîner la résistance à l'insuline et de l'hypertension chez les rats de génération G1 et G2, malgré une nutrition normale de la génération G1 (187). Une étude sur les populations d'Överkalix, au nord de la Suède, de personnes nées en 1890, 1905 et 1920, a montré que si les grands-pères sont suralimentés au cours de leur croissance lente (c'est à dire avant la puberté, le pic de croissance), la mortalité due au diabète de leurs petits-enfants sera augmentée (188).

Une étude de Los Angeles a révélé que les enfants souffrent plus d'asthme si leurs grands-mères ont fumé pendant leurs grossesses, par rapport aux enfants de mères ayant fumé pendant leurs grossesses (189). Certains pensent que lorsque les mères sont nées, leurs ovaires ont déjà été influencés par le comportement de leur propre mère (la grand-mère) (151) (Figure 18). Lorsque la grand-mère transmet l'information épigénétique (lié au tabagisme par exemple) à la mère, elle transmet également des informations aux ovules qui serviront à constituer l'enfant de la génération G2.

Parce que trois générations à la fois sont exposées aux mêmes conditions environnementales, un changement épigénétique doit être observé dans la 4ème génération afin de fournir des arguments convaincants pour une hérédité épigénétique (190).

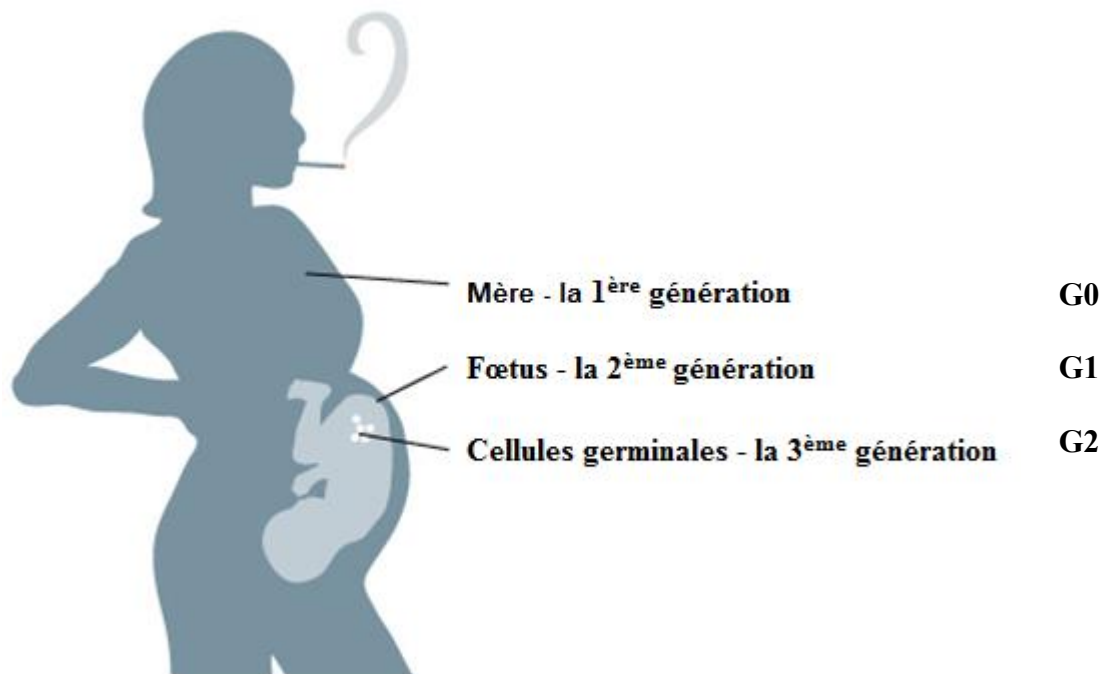


Figure 18. Epigénétique et hérédité épigénétique. Si la femme enceinte est exposée à un produit chimique toxique, alors il est possible que trois générations soient exposées, G0, G1 et G2. Hérité transgénérationnel épigénétique se produit lorsque la grande-petite-fille ou la quatrième génération (G3) qui n'a pas eu l'exposition mais présente des symptômes similaires. Tiré de <http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/inheritance>.

2.3. Les outils de mesure de la méthylation de l'ADN

2.3.1. Mesure de la méthylation de l'ADN

Tableau 5. Résumé des méthodes utilisées pour mesurer la méthylation de l'ADN (191).

Traitement de l'ADN	Principe	Résolution	Avantages	Inconvénients
Conversion au bisulphite	Le bisulphite de sodium convertit les cytosines non méthylées en uracile, tandis que les cytosines méthylées sont protégées de cette conversion	Haut: résolution de base unique	Applicable à tous les échantillons	Conversion complète est essentielle
<ul style="list-style-type: none"> • Combined bisulfite restriction analysis, COBRA • Representation Bisulfite-Seq, RRBS • Methylation-specific PCR, MS-PCR • Methylation-sensitive single nucleotide primer extension, Ms-SnuPE • Methylation-specific single-strand conformation analysis, MS-SSCA/Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP • Methylation-specific denaturing gradient gel electrophoresis, MS-DGGE • Methylation-specific melting curve analysis, MS-MCA • Methylight • Methylation-sensitive dot blot assay, MS-DBA 				
Méthodes utilisant des enzymes de restriction sensibles à la méthylation				
RLGS ; HELP assay	L'ADN est fragmenté avec une enzyme de restriction sensible à la méthylation. En se basant sur la taille du fractionnement, la méthode enrichit l'ADN méthylé	Modérée	Relativement simple	L'analyse est limitée à la méthylation sur les sites de restriction
Digestion MerBC	Digestion de l'ADN avec une enzyme de restriction spécifique de l'ADN méthylé, McrBC. En se basant sur la taille du fractionnement, la méthode enrichit l'ADN méthylé	Modérée	Efficace pour la dégradation de l'ADN le plus méthylé	----
DMH ; CpG island microarray	Digestion de l'ADN avec une enzyme de restriction sensible à la méthylation, Mse I, fragments méthylés enrichit sont hybridés sur la puce de l'îlot CpG	Modérée	Haut débit, facilité d'automatisation	Problème des faux positifs
Méthodes de purification par affinité				
Immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP)	Immunoprécipitation de l'ADN contenant des cytosines méthylées avec un anticorps monoclonal	Modérée	L'anticorps est disponible commercialement . Précipitation des cytosines méthylées dans tous les contextes	Nécessité d'une densité élevée en m5C
Purification par passage sur colonne d'affinité MBD	Immunoprécipitation de l'ADN contenant des CpG méthylés en utilisant une colonne MBD	Modérée	Récupération des CpG méthylés uniquement	Nécessité d'une densité élevée en mCpG
Purification par passage sur colonne d'affinité CXXC	Immunoprécipitation de l'ADN contenant des CpG non méthylées en utilisant une colonne CXXC	Modérée	Méthode directe pour l'extraction d'ADN non méthylé	Nécessité d'une densité en CpG élevée

La détection de la méthylation sur une séquence d'ADN se fait de différentes manières. Le Tableau 5 présente un résumé des méthodes utilisées actuellement pour les études de méthylation à haut débit (191). La mesure de la méthylation de l'ADN se fait par la mesure du nombre de copies de cytosine qui sont méthylées dans la région du promoteur pour chaque gène, appelé méthylome.

2.3.2. MeDIP-Chip

L'une des techniques pour mesurer les modifications des méthylation de l'ADN est le MeDIP-CHIP (Immunoprécipitation de l'ADN méthylé avec hybridation sur puce). Les étapes principales sont présentées dans la Figure 19.

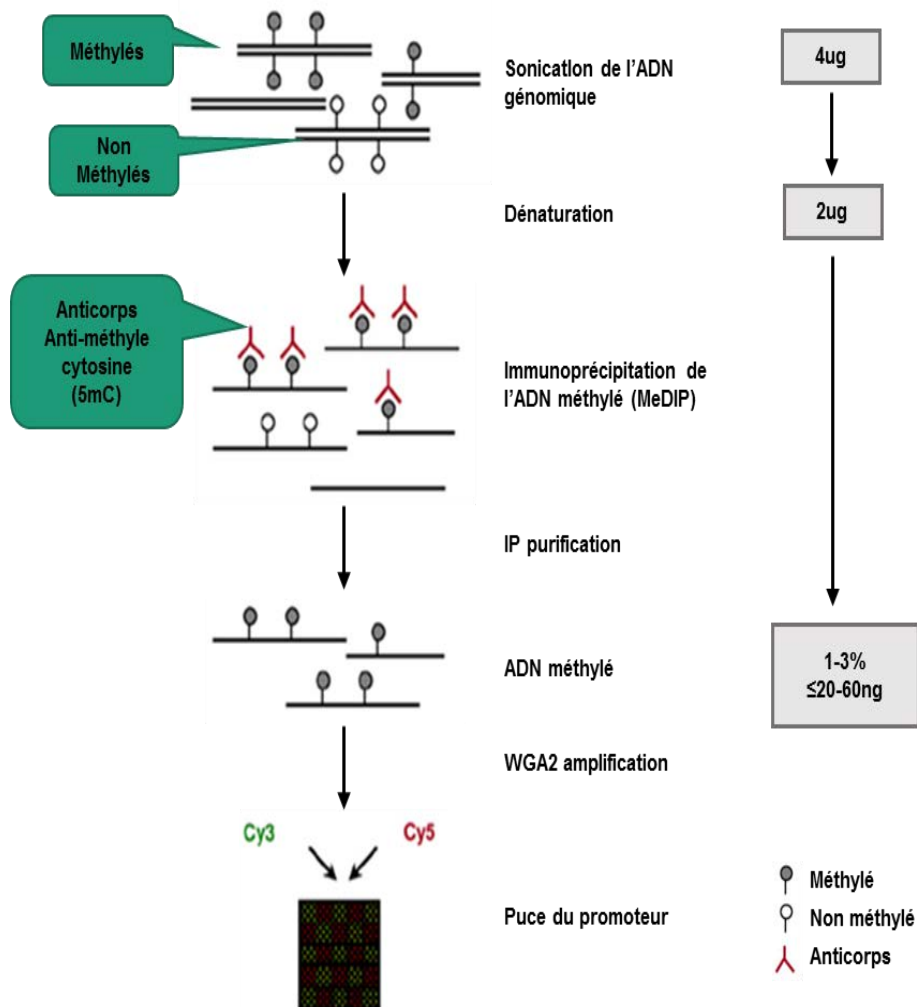


Figure 19. Processus de MeDIP-CHIP.

3. La génomique intégrative

La génomique a ouvert la voie à des mesures pan-génomique des variations du génome, de la structure de la chromatine et de l'expression des gènes. Ces mesures permettent la description complète de l'état biologique d'un organisme ou d'un biotope, et en particulier d'un organe normal ou malade. Ceci a permis de mettre en évidence dans de nombreuses pathologies des génotypes, des variations du nombre de copies, des changements de méthylation, l'expression particulière de gènes de micro-ARN ou protéines. Un enjeu actuel est de comprendre la mécanique de tous ces changements et c'est l'objectif de la Génomique Intégrative.

L'objectif de la Génomique Intégrative est d'intégrer les données génomiques issues de différentes techniques afin d'obtenir des résultats de meilleure qualité et de comprendre les mécanismes sous-jacents aux variations observées.

Par exemple, la prise en compte des données déjà disponibles dans les bases de données de génomique comme Gene Expression Omnibus (GEO) permettent de réaliser des méta-analyses renforçant la pertinence des marqueurs diagnostics (192), de revalider (193) ou mieux caractériser (194) des signatures.

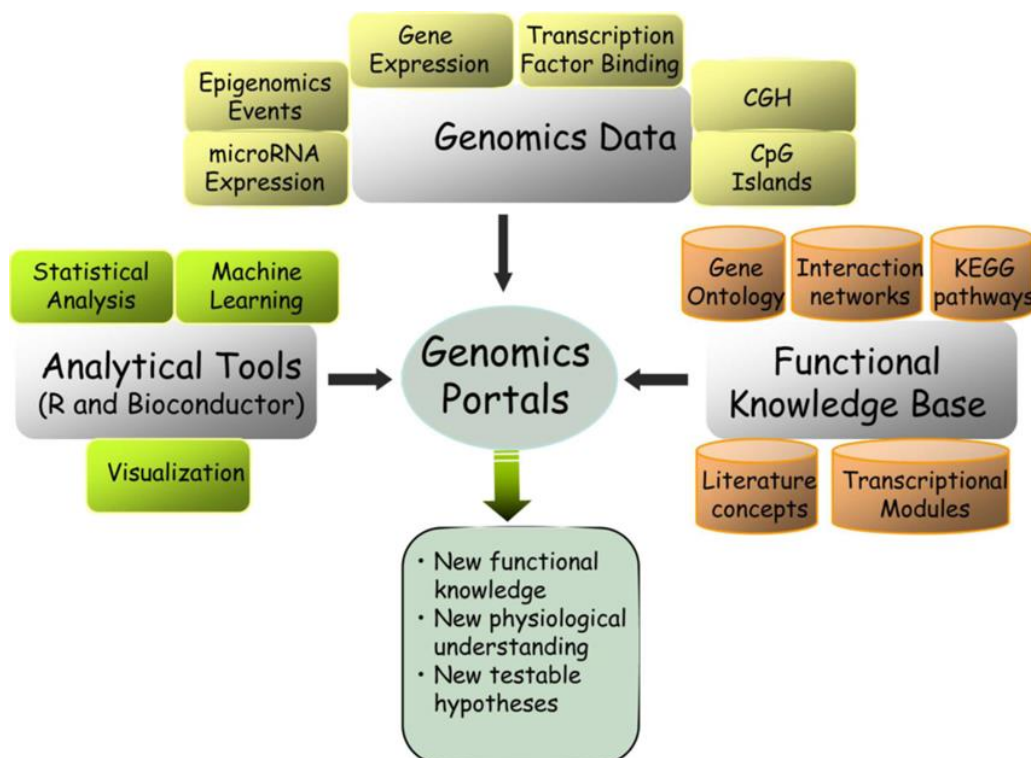


Figure 20. Plateforme de génomique intégrative. Structure conceptuelle d'un portail de génomique intégrative regroupant des données de génomiques, des connaissances fonctionnelles et des outils d'analyse. Tiré de Shinde *et al.* BMC Genomics, 2010 (195).

Le second enjeu de la Génomique Intégrative est d'intégrer les données issues de différentes technologies génomiques: polymorphismes génétiques SNP ou CNV, analyse de la méthylation de l'ADN, de la fixation de facteurs de transcription sur la chromatine, expression d'ARN messagers et de micro-ARN, données métaboliques et fonctionnelles. Ceci est essentiel pour la compréhension des mécanismes. Il est maintenant admis que l'intégration des données de transcriptome et de ChIP-chip permet de visualiser les réseaux de régulation génique, et que l'intégration du génotypage et de l'expression des gènes, l'approche Génomique génétique (196) permet de découvrir les voies de signalisation.

Cette approche passe par l'analyse, à différents niveaux, d'un même modèle d'étude afin d'appréhender l'ensemble des mécanismes sous-jacents. Une plateforme de génomique intégrative a d'ailleurs été mise en place sur internet (195) afin de faciliter l'accès à toutes les données génomiques publiques et de pouvoir les analyser afin de produire des connaissances nouvelles (Figure 20).

La génomique intégrative est également un préalable indispensable à toute étude de biologie des systèmes. En effet, la biologie des systèmes a pour objectif de modéliser l'organisme vivant dans son ensemble, ainsi que ses interactions avec l'environnement. Elle aura donc besoin des données issues de la génomique afin de comprendre les interactions entre les cellules, les organes, et l'environnement. L'étude du système biologique passera alors nécessairement par une modélisation mathématique du vivant, afin de pouvoir évaluer l'impact de différents événements sur l'organisme complet étudié.

Notre objectif de ce projet est de caractériser les dérégulations métaboliques des modèles de rat malnutris pendant la phase périnatale, analyser des pathologies associées et les mécanismes sous-jacents, au moyen des outils de la Génomique dans une approche de Génomique Intégrative.

4. Puces à ADN

Les premières biopuces développées ont été les puces à ADN, et sont probablement les plus abouties aujourd'hui.

Le champ d'application des puces à ADN est vaste. Initialement développées comme outil de criblage de banque (197), il est possible grâce aux puces à ADN de mesurer l'expression des gènes (169, 197), de décrire physiquement un génome (198), de définir le statut de méthylation de l'ADN (199, 200), des histones (201), et d'identifier des interactions ADN-protéines (202, 203). Elles peuvent participer à l'annotation d'un génome (204) et à la détection des gènes (205). Elles sont également utilisées en reséquençage pour identifier des mutations (206) ou l'effet des agents pathogènes (207).

La technique repose sur l'hybridation spécifique entre deux brins d'ADN de séquences complémentaires, selon le principe du Northern ou du Southern blot : l'ADN fixé sur la puce (ici la sonde) et l'ADN cible de l'échantillon que l'on cherche à mesurer. Cet ADN à doser est marqué par un isotope radioactif, une enzyme, un fluorochrome, ou de la biotine. Les technologies dites monocanal peuvent utiliser la radioactivité (P^{33} par exemple) ou les fluorochromes (Cyanine3, et Cyanine5 par exemple) pour marquer les cibles. Les technologies à double canaux utilisent deux fluorochromes différents (Cy3 et Cy5 par exemple) pour hybrider simultanément deux cibles sur une même puce. Le signal obtenu sur chaque sonde de la puce est analysé grâce à un lecteur capable de mesurer la radioactivité ou de discriminer les deux fluorochromes. Il reflète l'abondance de l'ADN complémentaire dans l'ADN cible. Le système à deux couleurs offre une certaine flexibilité, puisque le deuxième échantillon peut correspondre soit à une condition expérimentale, à une condition « normale » ou à un « standard ».

La particularité des puces à ADN réside dans la miniaturisation du procédé permettant des milliers d'hybridations simultanées en utilisant une moindre quantité de matériel génétique. Selon la problématique, les sondes utilisées pour fabriquer ces puces à ADN peuvent être des produits de PCR (169), des clones d'ADNc (208) ou d'ADN génomique (209), ou des oligonucléotides de synthèse (210). De plus, chaque sonde doit être spécifique d'une région précise du génome. Elles doivent être conçues de telle manière à éviter les hybridations croisées indésirables.

Ces sondes peuvent être déposées par un robot, par contact ou par jet-d'encre sur le support puis fixées de façon covalente sur ce dernier. Elles peuvent être également constituées

d'oligonucléotides synthétisés *in situ* par jet d'encre (211) ou photolithographie (212). Une technologie plus récente utilise un réseau ordonné de billes sur lesquelles ont été greffés des oligonucléotides (213).

La nature de la sonde et la méthode de fabrication de la puce présentent chacune des avantages et des inconvénients. L'utilisation de clones est par exemple utile pour l'étude de génomes pour lesquels on a peu d'information de séquence. Elle exige néanmoins de nombreuses manipulations (gestion de banque, amplification par PCR nécessaire avant dépôt...) offrant autant de sources de contaminations et d'artéfacts. Il est maintenant admis que l'emploi d'oligonucléotides constitue le meilleur choix pour des sondes. C'est notamment le choix des principales sociétés commercialisant des puces à ADN, comme Agilent, Affymetrix et Roche-NimbleGen. Elles ont aussi opté pour la synthèse *in situ*, plus coûteuse, mais plus flexible, s'affranchissant des biais potentiels de spottage et proposant des puces de plus forte densité (et par conséquent susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme). Ces sondes offrent une plus grande fiabilité, une meilleure spécificité grâce au contrôle du design des sondes, uniformisant notamment les concentrations et les propriétés d'hybridation (T_m : Temperature of melting) des spots. Leur emploi se limite cependant aux organismes dont on a une connaissance approfondie de la séquence du génome.

Grâce à près de quinze ans de progrès techniques, les puces à ADN ont atteint aujourd'hui une certaine maturité. Grâce à une densité plus importante, une seule puce peut par exemple contenir tous les gènes d'un génome, même le plus complexe. La miniaturisation et l'amplification des cibles (214, 215) permettent d'analyser des échantillons avec des quantités limitées de matériel, comme des biopsies. L'existence de puces de plus en plus fiables, de moins en moins onéreuses et de protocoles standardisés ont vulgarisé l'utilisation des puces à ADN.

Enfin, de nombreux outils bio-informatiques ont été développés pour améliorer la gestion, le traitement, l'analyse et l'intégration de la masse de données générées.

4.1. Puces à ADN pour le transcriptome

Pour comprendre la fonction d'un gène, le fait de savoir quand, où et dans quelle mesure un gène est exprimé est essentiel pour comprendre l'activité et le rôle biologique de ses protéines correspondantes. Cependant, pour accéder à la fonction cellulaire et physiologique d'un gène il est nécessaire de l'étudier dans le contexte de son interaction naturelle avec l'ensemble des autres gènes exprimés dans la cellule.

L'ensemble des transcrits dans un système biologique donné, dans des conditions biologiques précises, à un temps donné constitue le transcriptome. C'est un déterminant majeur du phénotype et des fonctions cellulaires. Il est dynamique et varie d'un type cellulaire à un autre, d'une condition biologique à une autre. L'intérêt d'une étude des transcrits à grande échelle est d'avoir une vue d'ensemble de l'expression du génome et de ses variations dans différentes conditions.

L'objectif est de comprendre comment les gènes aboutissent ensemble à la fonction biologique impliquée dans l'état physiologique ou pathologique d'un organisme.

L'étude du transcriptome d'un échantillon biologique permet de caractériser des signatures propres à cet échantillon.

L'application la plus commune des puces à ADN est l'étude du profil d'expression des ARNm. La puissance des puces à ADN réside dans leur capacité à mesurer simultanément le niveau d'expression de milliers de gènes fournissant ainsi un instantané du transcriptome dans un système biologique et dans une condition donnée. Les techniques de séquençage d'EST (Expressed Sequence Tags, marqueurs de séquence exprimée) à grande échelle (216), d'analyse en série de l'expression des gènes (SAGE pour Serial analysis of gene expression) (217), d'affichage différentiel (218) donnent également un profil transcriptionnel à grande échelle. Cependant, ces techniques sont beaucoup plus chères et moins flexibles que la technologie des puces à ADN.

Les puces à ADN pour l'analyse du transcriptome ont été les premières biopuces développées, cela pour des raisons techniques (l'accessibilité relativement simple au transcriptome d'un système, la facilité de manipulation de l'ADN) et biologiques (le niveau d'expression d'un gène reflète sa fonction) (169).

Les puces conçues pour mesurer l'expression des gènes sont généralement biaisées vers les gènes connus ou prédits codants pour des protéines. Des produits PCR issus de clone d'ADNc, des oligonucléotides (provenant d'EST par exemple) sont généralement employés comme sondes.

Pour une analyse classique du transcriptome, les sondes sont le plus souvent conçues dans la partie 3' des gènes. Des isoformes par épissage alternatif d'un gène peuvent néanmoins être distingués par des puces à exons, disponibles pour les génomes séquencés comme l'homme, la

souris ou le rat (219, 220). Ces puces à ADN, à très haute densité contiennent plusieurs sondes par exon connu ou prédit.

Les cibles, l'ensemble des ARNs de l'échantillon étudié, sont extraites, reverse transcrites en ADNc et marquées, puis hybridées sur la lame. Les signaux de la puce sont ensuite quantifiés par un logiciel informatique.

Enfin, notons que l'étude du niveau d'expression de petits ARN non-codants par les puces à ADN est possible malgré leur petite taille (221, 222).

4.2. Puces à ADN pour l'épigénome et les interactions protéines-ADN

L'utilisation de puces à ADN couplée à des techniques de biologie moléculaire permet l'étude de l'épigénome ainsi que l'identification des interactions ADN-protéines à grande échelle.

- Etudes des interactions protéines ADN : ChIP-chip

L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) est une approche pour identifier des interactions ADN-protéines *in vivo* dans des conditions physiologiques, applicable à tout type d'échantillon biologique (cellules, tissus, organes) (223). Elle est constituée de 3 étapes : les protéines qui sont fixées sur l'ADN sont liées de manière covalente. Puis l'ADN est découpé en courts fragments par sonication ou digestion enzymatique. Un anticorps contre la protéine souhaitée est alors utilisé pour l'immunoprécipiter et pour récupérer ainsi le complexe protéine-ADN. Enfin l'ADN est purifié après réversion du couplage covalent. L'existence d'un anticorps spécifique est un facteur crucial de cette technique.

Cet ADN peut être cloné et analysé par PCR, par séquençage, par hybridation (sur une puce à ADN) (202, 203). Pour cette dernière technique, l'ADN est amplifié, marqué puis hybridé sur une puce à ADN contenant des régions régulatrices. Ces puces peuvent être constituées de sondes couvrant une région d'intérêt (224), des îlots CpG riches en régions promotrices (181, 225) ou de sondes couvrant partiellement ou totalement le génome.

L'approche la plus commune pour détecter l'ADN enrichi par immunoprécipitation se fait en technologie double-canaux par co-hybridation du ChIP et d'un contrôle (ADN génomique, par exemple) sur la puce. En technologie mono-canal, le ChIP et le contrôle sont hybridés sur deux puces différentes puis les résultats sont comparés.

L'analyse de cet ADN à l'aide de puces à ADN fournit l'ensemble des sites de liaison de la protéine d'intérêt sur la chromatine à l'échelle génomique. Bien que le ChIP-chip ait été d'abord utilisé pour localiser les sites de liaison de facteur de transcription sur l'ADN (202, 203), une des applications consiste aussi à caractériser d'autres phénomènes de manière globale, comme les modifications d'histones (201). Dans ce dernier cas, les anticorps utilisés doivent être sensibles aux modifications post-traductionnelles des histones.

Une des principales limites de cette méthode est la nécessité d'un anticorps spécifique pour les protéines. Des alternatives, comme l'introduction d'un épitope fusionné à la protéine d'intérêt endogène (226), l'identification par une ADN adénine méthyltransférase (DamID) peuvent être envisagées. Cette dernière approche détecte les sites de liaison potentiels d'une protéine en analysant la méthylation de l'ADN au niveau des adénines dans les cellules exprimant la protéine d'intérêt fusionnée à une enzyme ADN adénine methyltransferase *d'Escherichia coli*. Les adénines se retrouvent méthylées au voisinage des sites de liaison de la protéine fusion. Ces sites sont alors isolés par action d'une enzyme de restriction et identifiés, comme en ChIP-chip, par hybridation sur puce à ADN (227). Cependant, contrairement au ChIP-chip, l'introduction d'un épitope et le DamID ne permettent pas de travailler dans des conditions physiologiques.

D'autre part, l'utilisation d'une puce à ADN double brin permet également d'identifier *in vitro* l'ensemble des sites de liaisons à l'ADN d'une protéine purifiée (228).

- La détection des régions d'ADN méthylées

Ceci peut être réalisé par l'utilisation d'enzymes de restriction sensibles à la méthylation, isolant ces régions génomiques, suivie de leur identification par puces à ADN (DMH, Differential Methylation Hybridation (229). Une autre méthode, similaire au ChIP-chip, implique l'immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP, Methylated DNA ImmunoPrecipitation) avec un anticorps dirigé contre la cytosine méthylée (5'-methyl cytosine) couplée à une hybridation sur puce à ADN. Ces deux méthodes emploient des puces contenant des clones d'îlots CpG (199) ou des sondes les couvrant, ou des BAC (230).

5. Analyse des données génomiques et épigénomiques issues de puces à ADN

Les expériences sur puces génèrent de grandes quantités de données qu'il faut traiter et interpréter. Il est important de distinguer au sein de ces données les variations biologiques et les variations techniques. Les variations biologiques sont intrinsèques à tous les organismes. Elles peuvent être influencées par des facteurs génétiques ou environnementaux. Ce sont celles qui sont principalement recherchées, alors que les variations techniques sont liées aux biais expérimentaux, parasitant alors les signaux biologiques d'intérêt : elles sont indésirables.

Il existe des moyens permettant de minimiser les signaux parasites. Un plan expérimental, décrivant les procédures et conditions expérimentales pour répondre à une question biologique, doit être défini avec soin, en particulier pour les études du transcriptome (231). Des méthodes de normalisation (232) adaptées à la technologie et aux données doivent rendre comparables les mesures des différentes puces.

Une fois que les échantillons sont normalisés, au niveau du transcriptome, on visualise les données grâce à la méthode de classification par k-means qui permet de regrouper entre eux les gènes et les échantillons qui se ressemblent le plus. Nous avons choisi de regrouper les gènes en 10 clusters. Chaque groupe de gènes a fait l'objet d'une classification hiérarchique à l'aide du logiciel Cluster 3.0 (233) afin de visualiser l'homogénéité des groupes. La visualisation des données a été effectuée à l'aide du logiciel Java Treeview (233, 234).

Au niveau du méthylome, toutes les sondes ont été annotées par rapport au site d'initiation de transcription (en anglais, *transcription start site*, TSS) le plus proche. Les distances entre la position de la sonde et le TSS vont de 0 à 14.1 kb avec une moyenne de 1.67 kb. Les changements dans les niveaux de méthylation entre les groupes témoins et expérimentaux sont déterminés à l'aide du test de Student. Nous avons utilisé le critère de sélection des gènes positifs avec au moins deux sondes avec une p-value $<0,01$ comme décrit par d'autres auteurs (235). Nous avons également déterminé les gènes positifs avec au moins une sonde avec une p-value $<0,001$. Ces critères ont sélectionné les 5% de valeurs extrêmes de la distribution.

Une fois trouvés les gènes qui sont modifiés au niveau du transcriptome ou du méthylome, des outils statistiques et bioinformatiques doivent aider à l'interprétation biologique des données

traitées, répondant ainsi à la question biologique posée. Par exemple, on utilise alors des ontologies (Gene Ontology), des voies biologiques (KEGG), des maladies associées (HGMD et OMIM) et des connaissances de la littérature (PubMed), pour caractériser les gènes différentiels.

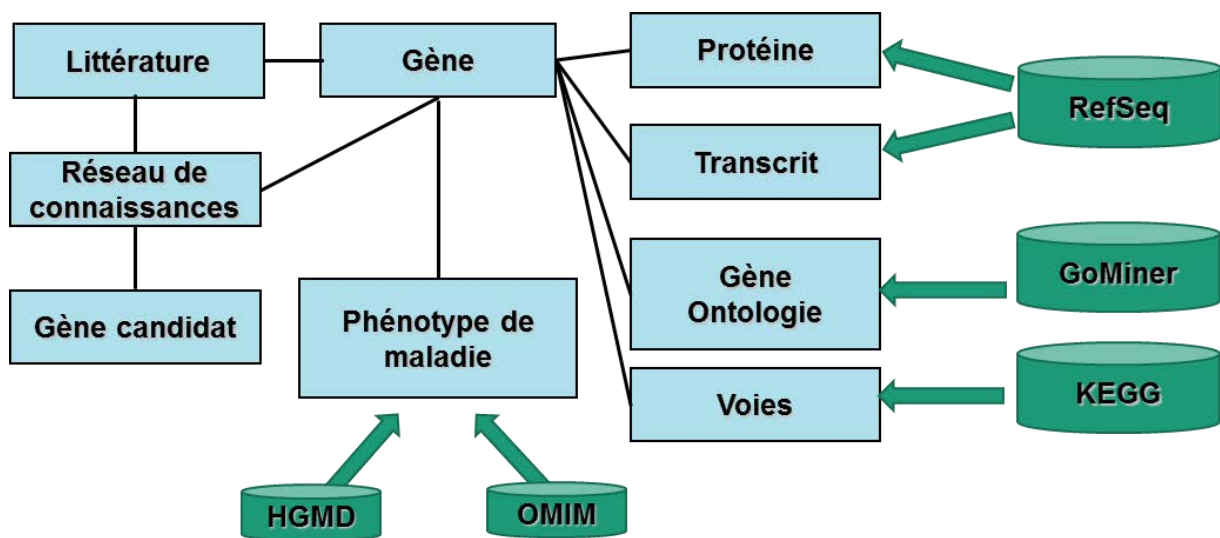


Figure 21. Schéma type d'une analyse de données génomiques. **HGMD**, Human Gene Mutation Database; **OMIM**, Online Mendelian Inheritance in Man; **KEGG**, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Objectifs

L'hypothèse de la programmation fœtale propose que l'environnement fœtal, en particulier la nutrition, peut influencer directement le développement embryonnaire et "programmer" l'enfant pour des pathologies à l'âge adulte. Au cours du développement, les modifications du métabolisme des monocarbone ou des protéines en lien avec une malnutrition peuvent être délétères autant pour la mère que pour le nouveau-né. De nombreuses études épidémiologiques sur de grandes populations indiquent que les maladies non transmissibles à l'âge adulte sont liées à des facteurs dans la vie fœtale ou pendant la petite enfance. Les problèmes de nutrition chez les femmes enceintes (surtout les micronutriments) sont régulièrement évoqués par l'organisation mondiale de la santé. L'étude de cohorte de la Famine Hollandais (1944-1945) est un très bon exemple pour étudier les effets d'une mauvaise alimentation au début de la vie chez les humains, accompagnés souvent avec un retard de croissance intra-utérin (ou RCIU). Les recherches sur les conséquences à long terme de l'exposition à la famine ont montré que les individus exposés à la famine pendant la gestation sont susceptibles à de nombreuses pathologies principalement métaboliques. Les mécanismes impliqués dans le processus sont compliqués. Un grand nombre de recherches sur les modèles animaux a été effectué. Mais la plupart des expériences sont des études d'observation, les mécanismes sous-jacents ne sont pas très clairs.

Pour mieux comprendre des mécanismes sous-jacents à la programmation fœtale, nous avons mis en œuvre deux modèles nutritionnels de rates adultes qui sont carencés en donneurs de méthyles (vitamine B12 et folates) un mois avant la gestation jusqu'au sevrage à jour 21 ou des rates adultes carencées en protéines pendant la gestation et la lactation. L'objectif général de notre projet était d'identifier les modifications génomiques et épigénomiques en lien avec les dérégulations du métabolisme dans les deux modèles. Nous avons pour cela utilisé des outils de génomique fonctionnelle pour étudier le niveau d'expression de tous les gènes au niveau du foie (le transcriptome) ainsi que les méthylations de l'ADN dans les régions promotrices intervenants dans la régulation de ces gènes (le méthylome). Le but ultime de ce travail était d'identifier les gènes qui sont modifiés à la fois au niveau de leur expression et de la méthylation de l'ADN (définis comme « master gene ») suite à une malnutrition périnatale afin de pouvoir mieux comprendre et modéliser les mécanismes sous-jacents aux pathologies associées.

Au niveau métabolique, nous avons étudié les effets de la malnutrition sur le métabolisme lipidique et le métabolisme énergétique dans les deux modèles. Nous avons aussi étudié la distribution des graisses dans le modèle de rat carencé en protéines, et les activités

enzymatiques du métabolisme de l'Hcy: MTHFR et Méthionie synthase ; les métabolites du cycle de l'homocystéine : SAM et SAH dans le modèle de rat carencé en donneurs de méthyles.

Il existe une hypothèse qui s'appelle le « gatekeeper hypothesis » qui dit que certains gènes sont modifiés la même façon par des stress nutritionnels différents, les « gatekeeper genes » conduisant à les mêmes phénotypes. Dans ma thèse, j'ai comparé les deux modèles pour trouver les gènes et les voies qui changent de la même façon dans les deux modèles. Nous nous sommes aussi focalisés sur les « Master genes » de chaque modèle pour regarder s'ils caractérisent des pathologies spécifiques.

Enfin, afin de vérifier si les modifications du transcriptome et du méthylome causées par la malnutrition peuvent se transmettre à la génération des petits-enfants, nous avons aussi étudié le transcriptome et le méthylome de la 3^{ème} génération sur le modèle MDD, avec une nutrition normale chez la 2^{ème} génération.

Résultats

Partie 1 : Effets de la carence en groupements méthyles sur les transcriptome et méthylome de foie de rats à 21 jours

1. Caractéristiques biologiques des MDD (pour Methyl Donor Deficiency).

Chez les rats déficients, nous avons observé une diminution du poids corporel, tandis que le ratio poids hépatique / poids corporel était augmenté (Tableau 6). Comme prévu, le groupe carencé avait une diminution en concentration sérique en folates et en cobalamine, une augmentation considérable en concentration de l'homocystéine. Il y avait également une augmentation considérable d'acides gras libres, du cholestérol total et des triglycérides dans le sang. La glycémie a diminué mais l'insuline n'était pas significativement différente entre les groupes. Toutes ces variations métaboliques sont indicatrices d'une maladie métabolique.

Tableau 6. Paramètres physiologiques et métaboliques, comparaison avec d'autres régimes alimentaires dans la littérature des rats MDD.

Paramètres *	Témoins	Carencés	p-value	Restriction calorique ou protéique (référence)
Poids corporel (g)	40.4 ± 0.6	20.0 ± 1.6	<0.001	Diminution (236)
Foie (g)	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.471	
Poids foie/corporel	3.6 ± 0.1	8.5 ± 0.1	<0.001	Pas de modification (237)
Glucose (mg/dL)	138.3 ± 3.8	75.4 ± 5.5	<0.001	Diminution (238)
Vitamine B12 (pmol/L)	322.3 ± 56.0	127.1 ± 16.58	<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	0.475	Pas de modification (237, 238)
Cholestérol total (mmol/L)	2.7 ± 0.2	4.6 ± 0.3	<0.001	Pas de modification (237, 238)
Triglycérides (mmol/L)	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1	<0.001	Augmentation inconstante (236-238)
Acides gras libres (mmol/L)	200.6 ± 34.9	884.8 ± 178.4	<0.001	Augmentation inconstante (236, 237)
AST (IU/L)	185.8 ± 13.4	1007.2 ± 27.0	<0.001	Pas de modification †

*Moyenne ± écart type. Différence statistiquement significative (p<0,05), Student t-test (n = 10 pour chaque groupe).

†Données de notre laboratoire avec des rats nés de 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 du tissu hépatique.

Au niveau tissulaire, on a observé une diminution en folates, méthionine et en S- adénosylméthione, ainsi qu'une réduction de l'activité de la MS. Et par conséquent, une diminution de l'index de méthylation SAM/SAH. Les rats carencés ont une augmentation très claire de la concentration en lipides totaux, qui est un indicateur très important de la maladie NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease). Il y avait également une augmentation considérable des triglycérides. (Tableau 7).

Tableau 7. Paramètres biologiques dans le tissu hépatique des rats MDD.

Paramètres*	Témoins	Carencés	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
MS (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	0.01

* Moyenne ± écart type. Différence statistiquement significative ($p < 0,05$), Student t-test ($n = 10$ pour chaque groupe).

3. Transcriptome du foie.

Au niveau du transcriptome, après normalisation des données, la comparaison du profil d'expression génique des 44 000 sondes pour les 26 456 gènes distincts constituant la puce a été effectuée par k-Means (239). Ceci a permis l'identification de deux groupes de gènes qui étaient différentiellement exprimés de manière significative dans le foie de rats MDD par rapport à celui des animaux contrôles: 3 269 gènes surexprimés ($P < 0,0009$) et 2.841 gènes sous-exprimés ($P < 0,0004$) (Figure 22).

Il a été montré que ces gènes, dont l'expression est corrélée, participent aux mêmes fonctions biologiques. De ce fait, on y cherche des annotations fonctionnelles sur-représentées. Pour chaque annotation on compare sa fréquence dans le groupe de gènes à sa fréquence dans la puce

de départ. Un biais significatif de fréquence indique un enrichissement de cette fonction dans le groupe de gènes. Les annotations que nous avons utilisé sont Gene Ontology (240) et le logiciel GoMiner (241). Les résultats montrent que les gènes sur-exprimés dans le groupe carencé par rapport au groupe contrôle sont impliqués dans le métabolisme des lipides, le stress du réticulum endoplasmique et le fonctionnement mitochondrial. Les fonctions des gènes sous-exprimés participent au métabolisme du glucose, à la coagulation et au métabolisme du cholestérol (Table 8).

Près d'un quart du transcriptome de rats MDD est modifié (23% des gènes avec un changement d'expression), y compris les gènes cibles directs et indirects. La base de données d'analyse des voies KEGG (242) utilisée sur des gènes exprimés différemment a révélé que la voie de signalisation de PPAR, qui régule principalement métabolisme des lipides, et la chaîne de transport des électrons des mitochondries, principale source d'énergie, ont été affectées (Figure 23 et 24).

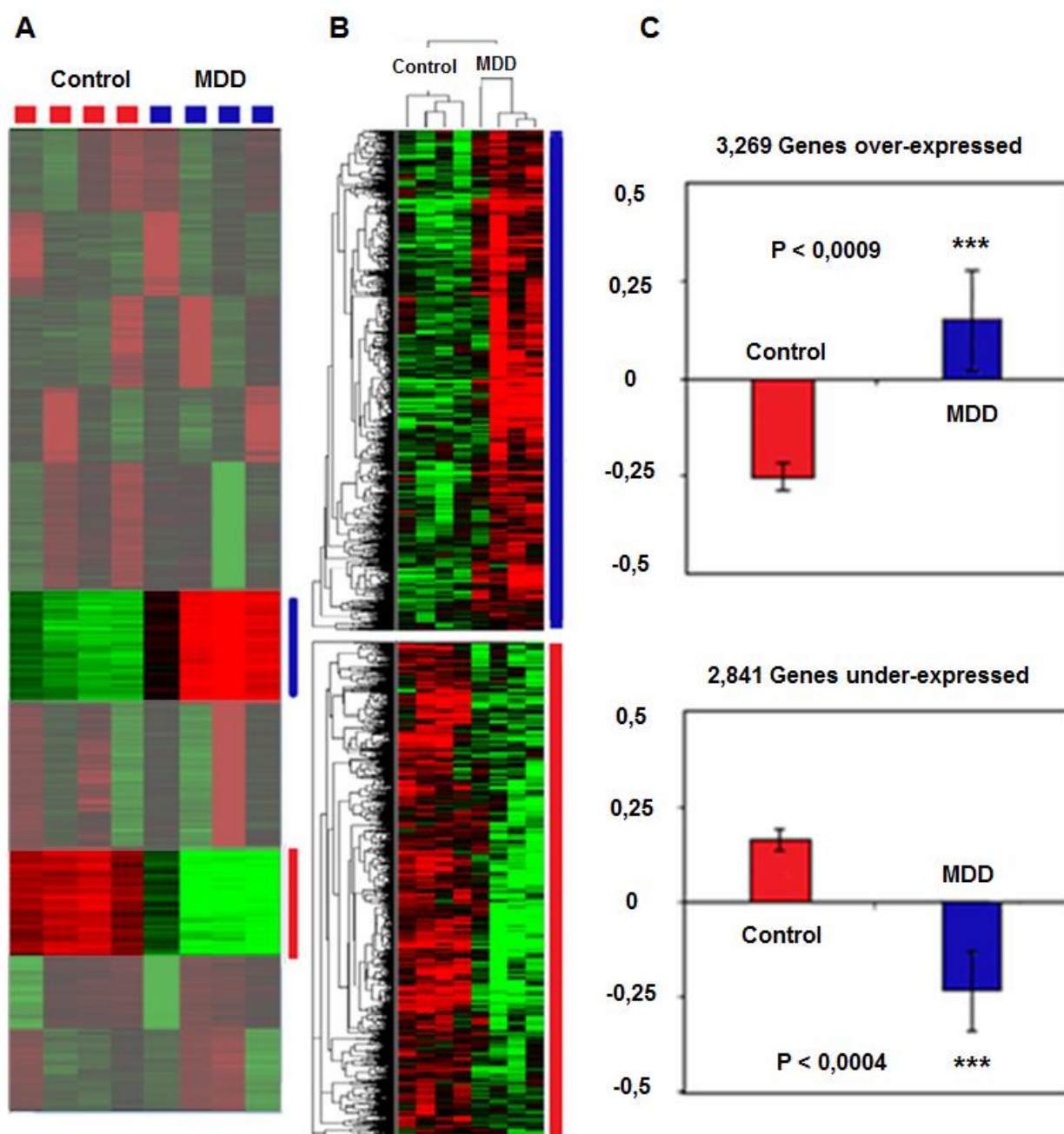


Figure 22. Gènes différentiellement exprimés dans le foie de rat MDD par rapport au contrôle. L'expression génique est présentée comme une matrice de couleur, où chaque ligne représente un gène et chaque colonne un échantillon. Les couleurs vert, noir et rouge correspondent aux valeurs inférieures, aux valeurs médianes et aux valeurs supérieures, respectivement. **A.** Les données de transcriptome sont classées par l'algorithme des k-means (avec $k = 10$). Deux groupes sont exprimés de manière différentielle entre les rats témoins et MDD. **B.** Classification hiérarchique de ces groupes afin de montrer l'homogénéité des deux groupes, et de montrer la capacité de ces deux groupes à séparer les rats MDD des contrôles ($p < 0.025$). **C.** Comparaison des profils moyens des deux groupes par le test t de Student entre les 2 groupes; *** $P < 0.001$.

Tableau 8. Annotations fonctionnelles des gènes enrichis dans le transcriptome de foie de rats MDD.

	Gene ontology category	GO Number	Total	Changed	%	P-value	Enrichment
Sous-exprimés	transition metal ion transport	GO:0000041	43	17	40	0.0000	2.75
	carbohydrate catabolic process	GO:0016052	75	25	33	0.0000	2.31
	response to glucose stimulus	GO:0009749	142	43	30	0.0000	2.1
	response to hexose stimulus	GO:0009746	148	44	30	0.0000	2.06
	tissue remodeling	GO:0048771	128	38	30	0.0000	2.06
	hindbrain radial glia guided cell migration	GO:0021932	5	5	100	0.0001	6.94
	cellular glucose homeostasis	GO:0001678	59	20	34	0.0001	2.35
	isoprenoid metabolic process	GO:0006720	71	23	32	0.0001	2.25
	bone remodeling	GO:0046849	68	22	32	0.0001	2.25
	cellular response to cholesterol	GO:0071397	11	7	64	0.0002	4.42
	iron ion transport	GO:0006826	17	9	53	0.0002	3.68
	serine family amino acid metabolic process	GO:0009069	24	11	46	0.0002	3.18
	cholesterol metabolic process	GO:0008203	73	23	32	0.0002	2.19
	sterol metabolic process	GO:0016125	74	23	31	0.0002	2.16
	heme binding	GO:0020037	36	14	39	0.0003	2.7
	cellular amino acid biosynthetic process	GO:0008652	53	18	34	0.0003	2.36
	Cellular response to carbohydrate stimulus	GO:0071322	58	19	33	0.0003	2.27
	cellular response to glucose stimulus	GO:0071333	54	18	33	0.0004	2.31
	cellular response to hexose stimulus	GO:0071331	54	18	33	0.0004	2.31
	cellular response to monosaccharide stimulus	GO:0071326	54	18	33	0.0004	2.31
Surexprimés	CoA hydrolase activity	GO:0016289	15	9	60	0.0000	5.08
	lipid transporter activity	GO:0005319	35	18	51	0.0000	4.36
	protein-lipid complex subunit organization	GO:0071825	22	10	45	0.0001	3.85
	cGMP biosynthetic process	GO:0006182	26	11	42	0.0001	3.58
	fatty acid beta-oxidation	GO:0006635	46	19	41	0.0000	3.5
	fatty acid catabolic process	GO:0009062	58	23	40	0.0000	3.36
	monocarboxylic acid catabolic process	GO:0072329	62	24	39	0.0000	3.28
	cellular lipid catabolic process	GO:0044242	102	34	33	0.0000	2.82
	fatty acid oxidation	GO:0019395	66	22	33	0.0000	2.82
	acyl glycerol metabolic process	GO:0006639	70	23	33	0.0000	2.78
	triglyceride metabolic process	GO:0006641	64	21	33	0.0000	2.78
	neutral lipid metabolic process	GO:0006638	72	23	32	0.0000	2.71
	lipid oxidation	GO:0034440	69	22	32	0.0000	2.7
	lipid catabolic process	GO:0016042	133	39	29	0.0000	2.48
	phospholipid transport	GO:0015914	23	11	48	0.0000	4.05
	acyl-CoA hydrolase activity	GO:0047617	14	8	57	0.0001	4.84
	phospholipid efflux	GO:0033700	11	7	64	0.0001	5.39
	regulation of cholesterol esterification	GO:0010872	8	6	75	0.0001	6.35
	plasma lipoprotein particle organization	GO:0071827	22	10	45	0.0001	3.85
	structural constituent of ribosome	GO:0003735	31	14	45	0.0000	3.83

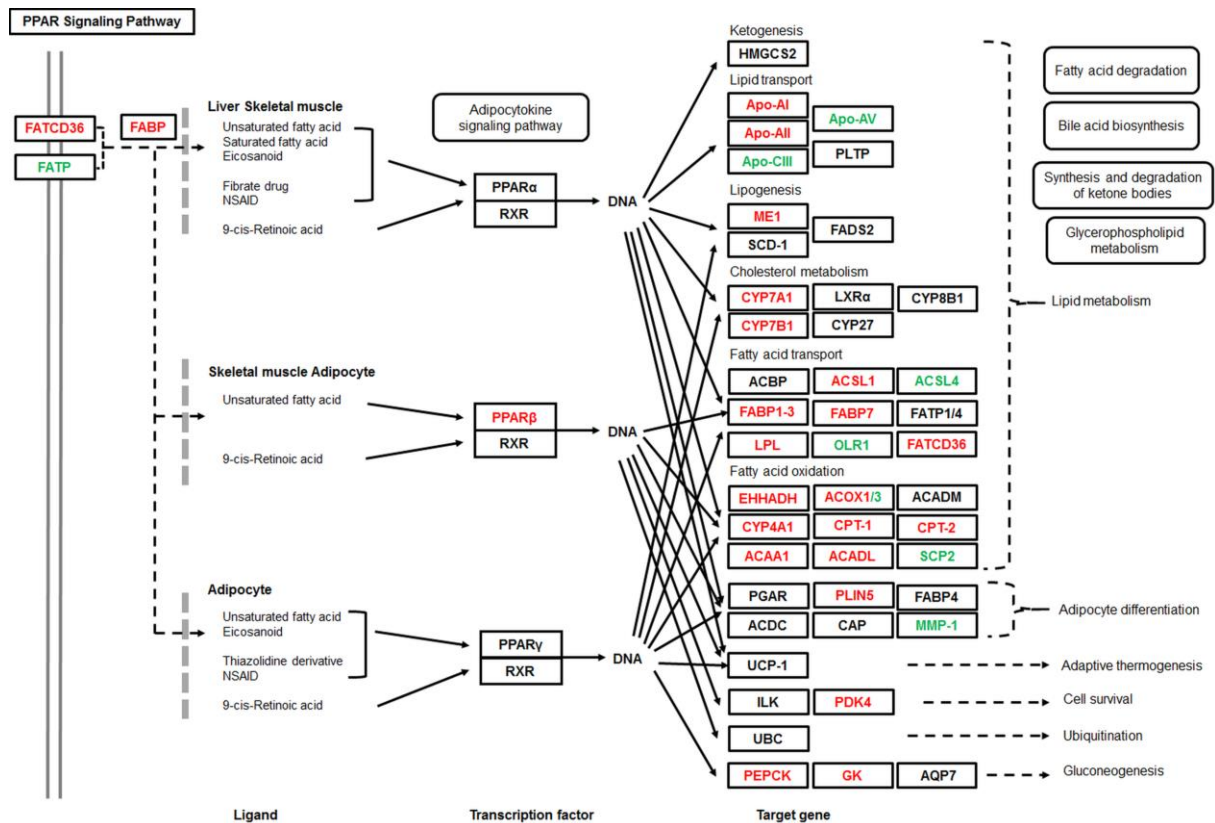


Figure 23. Voie de signalisation de PPAR. Il existe de nombreux gènes cibles de la voie PPAR qui ont été modifiés chez les rats MDD par rapport aux animaux témoins, en particulier les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et la néoglucogenèse. Le facteur de transcription, PPAR β , qui régule les gènes impliqués dans le transport des acides gras, l'oxydation des acides gras et la différenciation des adipocytes, a également été modifié. Schéma modifié de KEGG. Rouge, gènes surexprimés ; Vert, gènes sous-exprimés ; Noir, gènes non-modifié.

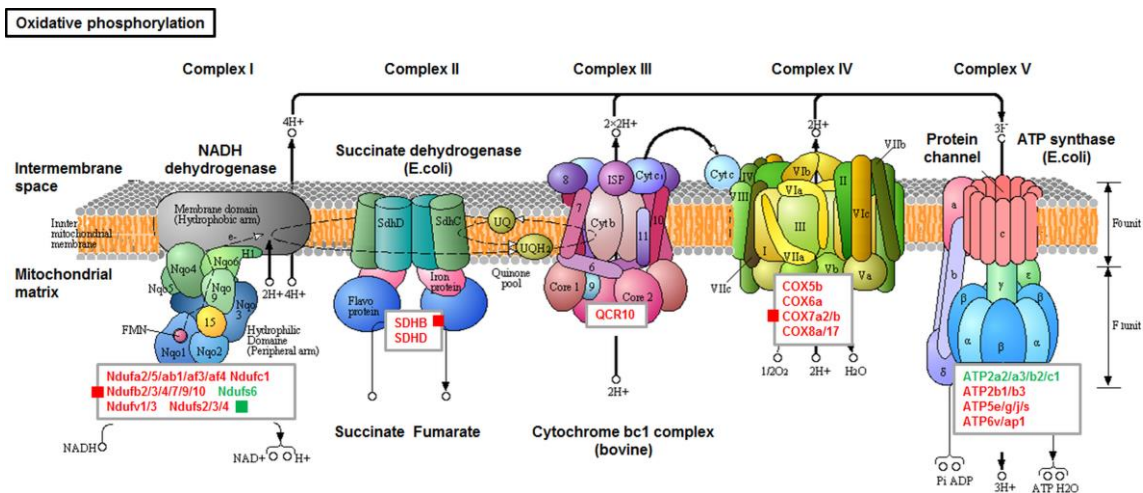


Figure 24. La chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie a été affectée. Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la chaîne ont été modifiés par une carence en donneurs de méthyle, comme la NADH déshydrogénase (Ndufs4, Ndufb9), la succinate déshydrogénase (SDHD) et la cytochrome c oxydase (COX7a). Schéma modifié de KEGG. Rouge, gènes surexprimés ; Vert, gènes sous-exprimés. Carré rouge, gènes avec promoteur hyperméthylé ; carré vert, gènes avec promoteur hypométhylé.

4. Méthylome du foie.

Pour explorer les effets de la MDD sur l'épigénome du foie, la méthylation de l'ADN du promoteur des gènes a été évaluée par immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP) suivie d'une hybridation sur des puces 3x720k Nimblegen Rat Deluxe promoteur (MeDIP-chip). Pour valider la procédure MeDIP, le gène de TSH2B a été choisi pour l'analyse par PCR en temps réel après sélection de la méthylation d'ADN par MeDIP. Les résultats de ces expériences ont montré un fort enrichissement de TSH2B après amplification à l'aide du kit de WGA2. Sur la puce comprenant les 720, 000 sondes pour 14, 981 gènes, deux paramètres de sélection ont été appliqués pour caractériser les gènes ayant une variation significative du niveau de méthylation. Les gènes avec au moins une sonde avec une P-value <0,001 et les gènes avec au moins deux sondes avec une P-value <0,01 ont été considérés comme significatifs. Avec cette stratégie, nous avons identifié 1 032 gènes ayant des profils de méthylation altérés dans le foie de rats MDD par rapport aux contrôles. Les annotations fonctionnelles de ces gènes sont indiquées dans le Tableau 9. Les gènes différenciellement méthylés sont principalement associés au métabolisme des lipides et d'autres fonctions clés du foie.

Tableau 9. Ontologies des gènes enrichis au niveau de l'épigénome du foie de rats MDD.

Gene ontology category	GO Number	Total	Changed	%	P-value	Enrichment
Golgi to plasma membrane protein transport	GO:0043001	27	8	30	0.0008	3.8030
ciliary cell motility	GO:0060285	7	4	57	0.0011	7.3344
glycosphingolipid binding	GO:0043208	8	4	50	0.0020	6.4176
cellular response to drug	GO:0035690	94	16	17	0.0023	2.1847
regulation of lipid biosynthetic process	GO:0046890	113	18	16	0.0027	2.0446
neuromuscular junction development	GO:0007528	71	13	18	0.0030	2.3501
negative regulation of fatty acid metabolic process	GO:0045922	14	5	36	0.0031	4.5840
histamine secretion	GO:0001821	9	4	44	0.0034	5.7046
negative regulation of fatty acid biosynthetic process	GO:0045717	9	4	44	0.0034	5.7046
phospholipid homeostasis	GO:0055091	9	4	44	0.0034	5.7046

5. Croisement entre transcriptome et méthylome du foie.

La méthylation de l'ADN joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique et la relation entre eux est complexe, même si une forte méthylation du promoteur est principalement associée à l'inhibition de l'expression des gènes.

Nous suggérons que les gènes modifiés, à la fois au niveau du transcriptome et au niveau de la méthylation d'ADN dans le foie de rat MDD, pourraient être des gènes avec des fonctions très particulières. Nous avons nommés ces gènes, « Master genes ». Leur nombre est limité à 266. Leurs annotations fonctionnelles sont présentées dans le Tableau 10 et les gènes les plus intéressants sont énumérés dans le Tableau 11. Nous observons que ces « Master genes » jouent un rôle important dans la régulation du système rénine-angiotensine, un système clé impliqué dans le contrôle de la pression artérielle (ADRB1, Agtr1a, F2R) (Figure 25), l'homéostasie des phospholipides (ABCA1, GPAM, Myp) et le métabolisme mitochondrial (Cox7a2, GPAM, GPX4, Gstk1, Ndufb9, Ndufs4, Ndufaf4, PSEN1, Slc25a4), en particulier les chaînes de transport d'électrons (Figure 24). L'état de méthylation de certains gènes de base est représenté sur la Figure 26, avec les modifications de leurs taux d'expression. Parmi ces « Master genes », au moins 19 pourraient être impliqués dans la NAFLD (Tableau 12). Ceci suggère que le MDD pourrait conduire à la NAFLD.

Tableau 10. Annotations fonctionnelles des « master genes » du foie MDD.

Gene ontology category	GO Number	Total	Changed	%	P-value	Enrichment
renin secretion into blood stream	GO:0002001	6	3	50	0.0001	28.8953
membrane	GO:0006020	4795	108	2	0.0003	1.3016
renal response to blood flow involved in circulatory renin-angiotensin regulation of systemic arterial blood pressure	GO:0001999	8	3	38	0.0003	21.6715
mitochondrial membrane	GO:0001966	419	18	4	0.0004	2.4827
phospholipid homeostasis	GO:0005091	10	3	30	0.0006	17.3372
vacuole organization	GO:0007033	86	7	8	0.0007	4.7039
pigmentation	GO:0003473	143	9	6	0.0008	3.6372
mitochondrial inner membrane	GO:0005743	308	14	5	0.0009	2.6268
mitochondrial envelope	GO:0005740	455	18	4	0.0009	2.2862
positive regulation of receptor recycling	GO:0001921	12	3	25	0.0010	14.4477

Tableau 11. « Master genes » et annotations fonctionnelles correspondantes. (GO: 0006020 membrane, excluded)

Gene ontology category	Gene Symbol
renin secretion into blood stream/ renal response to blood flow involved in circulatory renin-angiotensin regulation of systemic arterial blood pressure/ renal response to blood flow involved in circulatory renin-angiotensin regulation of systemic arterial blood pressure	ADRB1, AGTR1A, F2R
mitochondrial membrane/ mitochondrial inner membrane/ mitochondrial envelope	ACADL,ACAT1,COX7A2,GPAM,GPX4,GSTK1,HSD3B5,NDUFAF4,NDUFB9,NDUFS4,NLRX1,PDK4,PSEN1,SAMM50,SDHB,SFXN5,SLC25A4,TOMM70A
phospholipid homeostasis	ABCA1, GPAM, PPCS
vacuole organization	ABCA1, ATG4B, HPS1, HPS4, PSEN1, TPM1, YKT6
pigmentation	BBS2, HPS1, HPS4, LRP6, NF1, PSEN1, RAB11A,SEC23A , SLC24A5
positive regulation of receptor recycling	AGTR1A, PSEN1, RAMP3

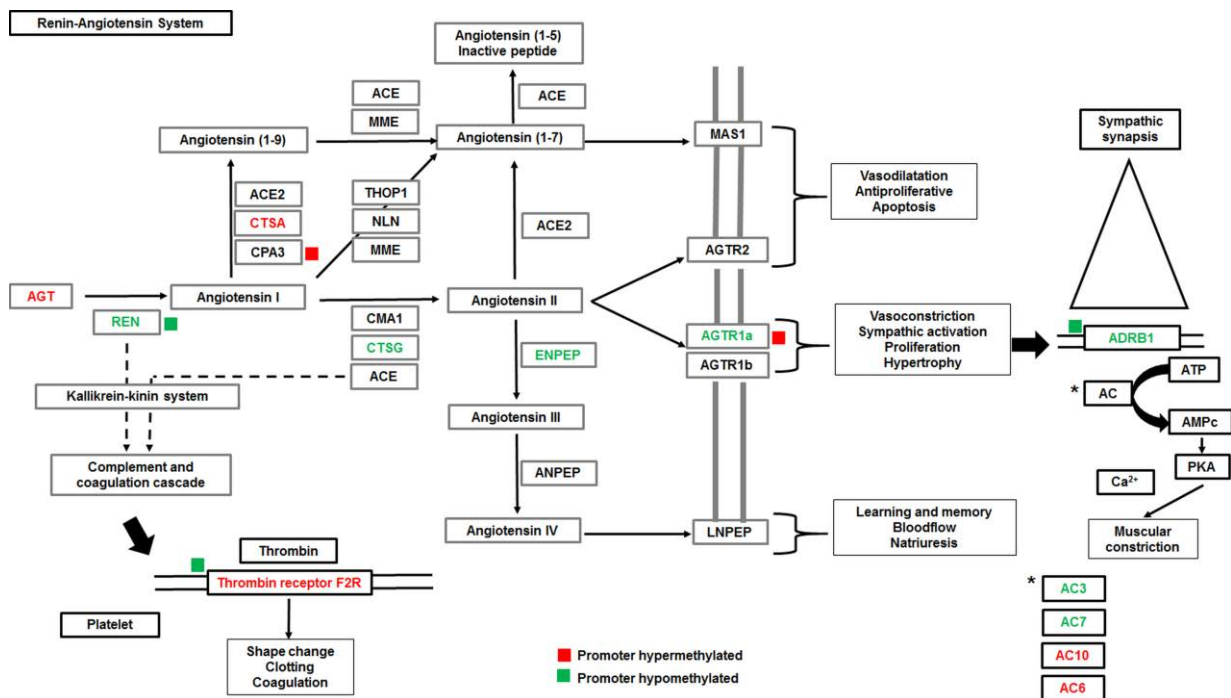


Figure 25. La carence en donneur de méthyle influence le système rénine-angiotensine. D'après KEGG. Rond, gènes différemment exprimés; carré, gènes différemment méthylés. REN: rénine; AGTR1: angiotensine II récepteur type 1; ADRB1: récepteurs adrénergiques bêta 1; F2R: facteur de coagulation II (thrombine) récepteur. Rouge, gènes surexprimés ; Vert, gènes sous-exprimés. Carré rouge, gènes avec promoteur hyperméthylé ; carré verte, gènes avec promoteur hypométhylé.

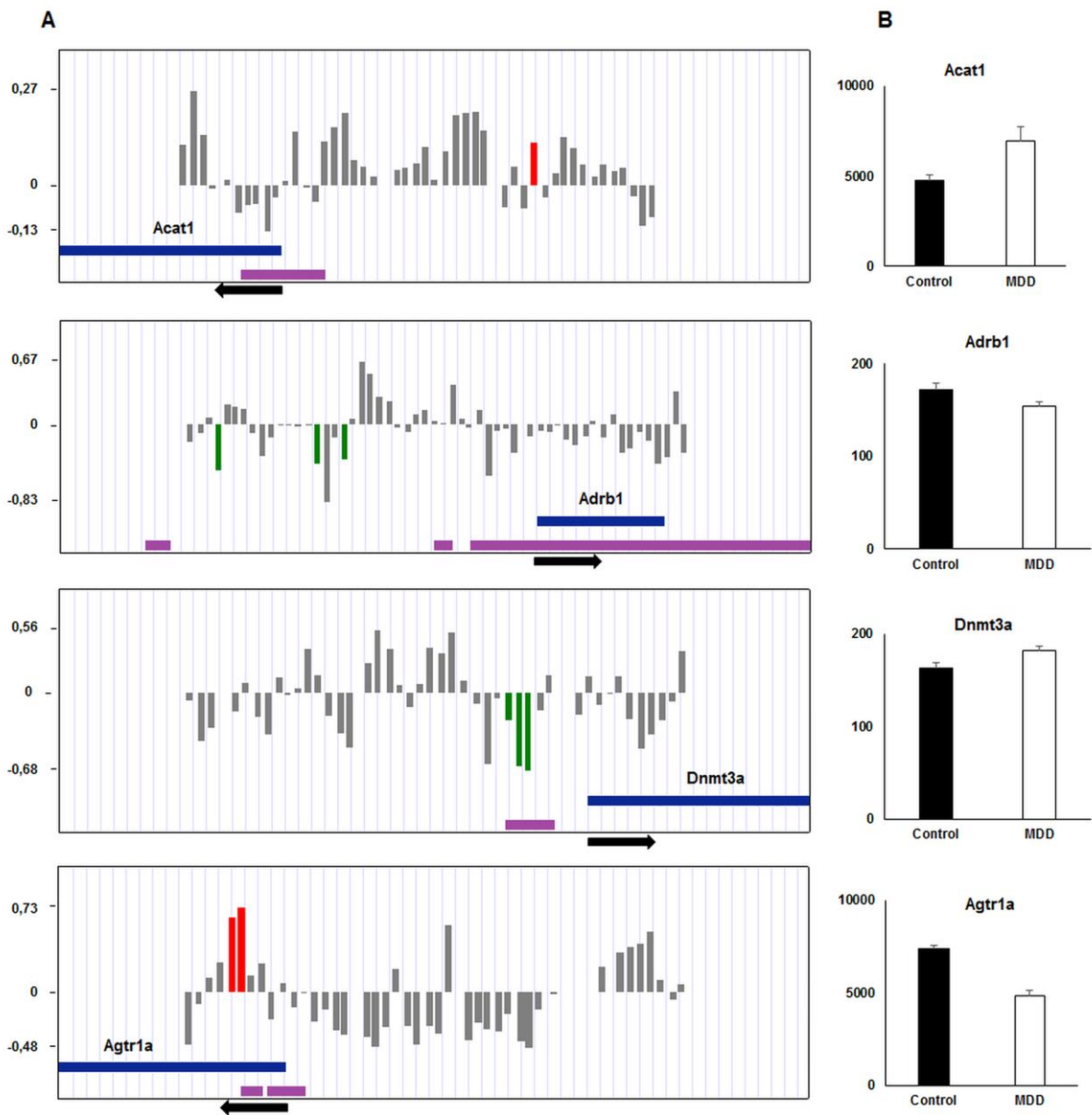


Figure 26. Modifications de l'expression et des niveaux de méthylation de certains gènes impliqués dans le foie de rat MDD. Pour chaque gène, le log2 ratio MDD/Contrôle de l'état de méthylation pour toutes les sondes dans la région du promoteur est calculé. Le schéma BedGraph a été généré avec UCSC Genome Browser (figure de gauche). Le site d'initiation de transcription est indiqué par une flèche. L'îlot CpG est représenté en violet. Les sondes significativement modifiées sont colorées en rouge (hyperméthylées) ou vert (hypométhylées). Les niveaux d'expression des gènes du foie des rats témoins et MDD (figure de droite). **Agtr1a**: Angiotensin receptor 1a est nécessaire pour la régulation de la pression artérielle; **Acat1**: Acétyl-CoA Acétyltransférase 1 est nécessaire pour le métabolisme des lipides; **Adrb1**: Adrenoceptor Beta 1 est nécessaire pour la régulation de la pression sanguine ; **Dnmt3a**: DNA methyltransférase 3a est impliquée dans les modifications épigénétiques de l'ADN.

Tableau 12. « Master genes » connus pour être impliqués dans la NAFLD.

Gene symbol	Gene function related	Expression-Methylation	Previous Studies
Abca1 (243, 244)	cholesterol efflux	down	down
Adrb1 (245)	regulate energy expenditure	down	KO
Agtr1a (246, 247)	fibrosis	down	polymorphisms
Cebpa (248, 249)	A major dominant repressor of Fabp; strong inhibitor of liver proliferation	down	activated
Cyp1a1	lipid peroxidation	down	down
Gpam (248, 250)	hepatic triglyceride synthesis, accumulation and secretion; involved in lipid synthesis	down	up
Lppr4 (251)	lipid metabolism	down	polymorphisms
Mbp	liver inflammation	down	?
Nfe2l2 (252-254) (Nrf2)	transcription factor stimulating expression of various antioxidant-associated genes in the cellular defense against oxidative stress	down	down/deficiency
Pon3 (255)	protection conferred by HDL against LDL oxidation	down	down
Rgn (256)	insuline resistance; lipid metabolic disorder	down	down
Serpinc1 (257)	relation between cardiovascular risk with NAFLD	down	down
Acadl (258-260)	fatty acid beta-oxidation	up	up
Acat1 (261)	cholesterol metabolism	up	up
Agpat3 (262)	triacylglycerol synthesis; obesity development and lipid metabolism	up	up
Hsd3b5 (263)	steroid metabolism	up	up
Klf6 (264, 265)	fibrosis	up	up
Nnmt (266)	the rs694539 variant of NNMT gene is a genetic risk factor for developing NASH	up	polymorphisms
Fabp2 (267)	fatty acid beta-oxidation; insulin resistance	up	up
Samm50 (268, 269)	development and progression of NAFLD	up	polymorphisms

6. Validation des résultats du transcriptome et du méthylome

Les gènes qui sont modifiés au niveau du transcriptome ou du méthylome ont été choisis pour vérifier les modifications par RT-qPCR et MeDIP-qPCR respectivement. La Figure 27 présente les résultats du MeDIP-qPCR et la Figure 28 présente les résultats de validation par RT-PCR.

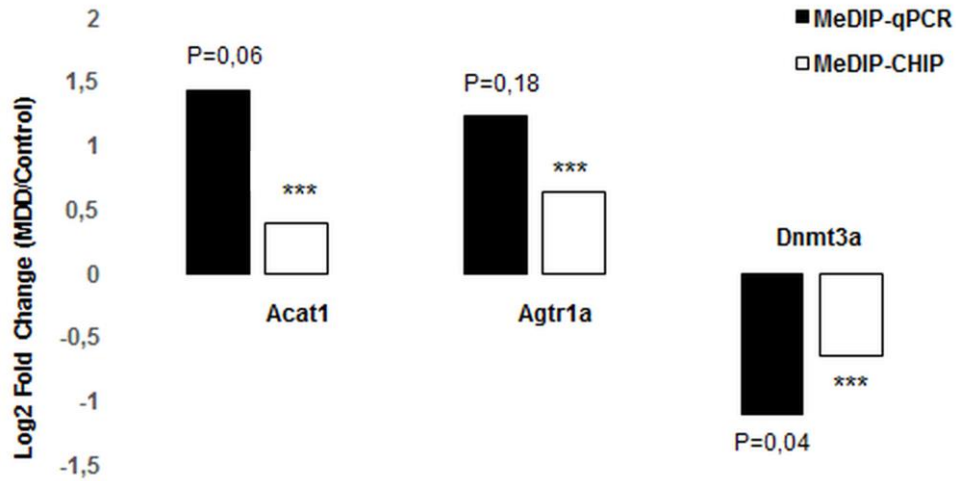


Figure 27. Gènes modifiés au niveau du méthylome de MDD et validés par MeDIP-qPCR. Les changements relatifs \log_2 (MDD / contrôle) du niveau de méthylation sont présentés avec des moyens de 3 déterminations. P-values : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ par rapport aux animaux témoins.

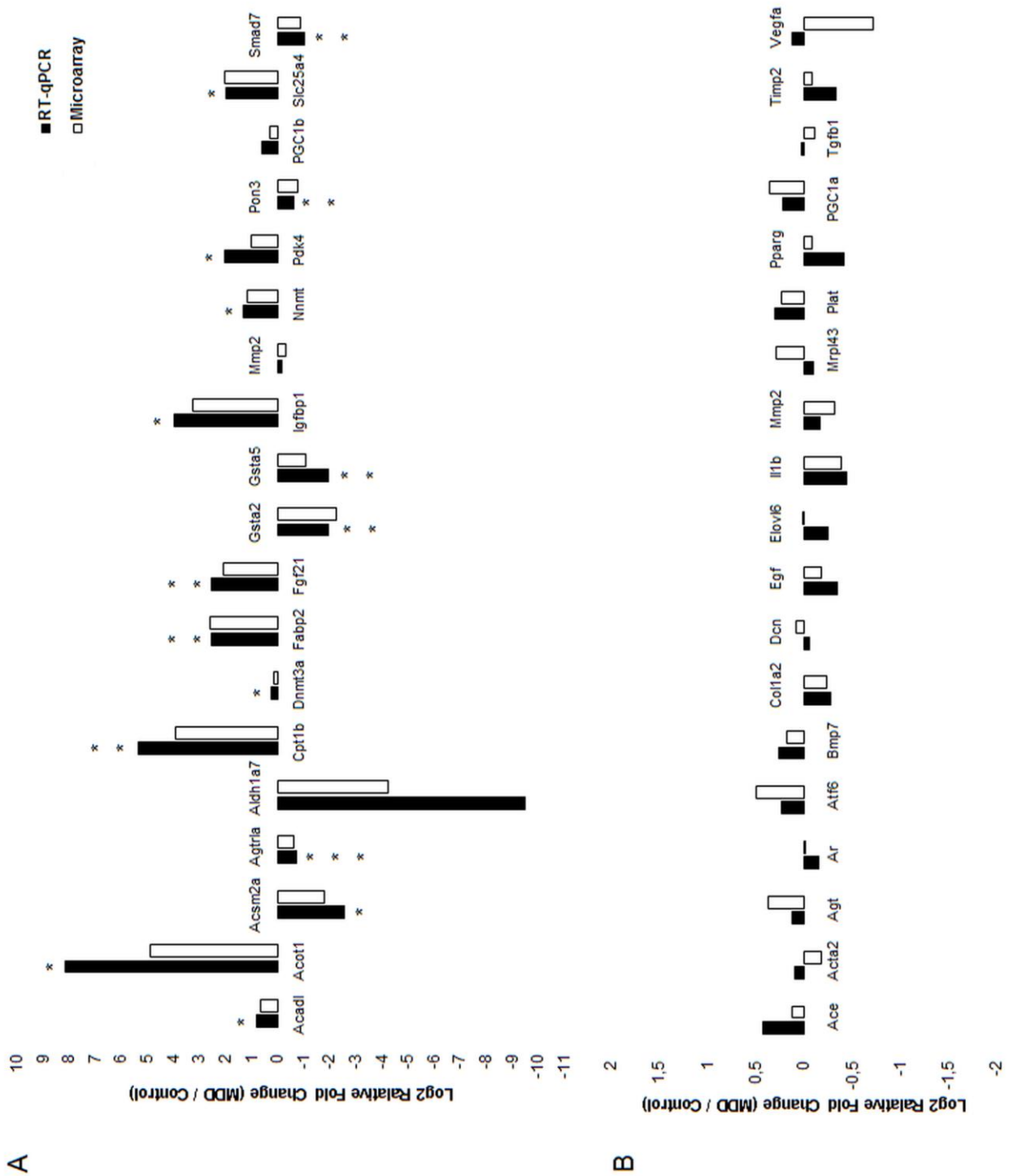


Figure 28. Gènes modifiés au niveau du transcriptome de MDD et validés par RT-qPCR avec le technique TLDA. Les modifications de l'expression des gènes sont représentées en log2 ratio (MDD / contrôle) des puces à ADN (barres blanches) et RT-qPCR (barres noires). Les données de RT-PCR ont été normalisées sur 4 gènes de ménage: 18S, ACTB, GUSB et HPRT1. La quantité relative des différents gènes est normalisée par rapport à l'expression endogène des gènes de référence et a été calculée par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gène} - Ct \text{ gène de référence}) \text{ rat MDD} - (Ct \text{ gène} - Ct \text{ gène de référence}) \text{ rat contrôle}$. P-values RT-PCR quantitative : * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 par rapport aux animaux témoins. **A.** Gènes exprimés de manière différentielle. **B.** Gènes dont l'expression reste inchangée.

Partie 2 : Effets de la carence en protéines sur les transcriptome et le méthylome du foie de rats à 180 jours

1. Caractéristiques métaboliques des rats MPR (pour Maternal Protein Restriction)

À la naissance, les rats nés de mères nourries avec un régime carencé en protéines présentaient une réduction du poids corporel par rapport aux petits nés de mères nourries avec un régime standard, mais ils ont montré plus tard un rattrapage de croissance au jour 180. Aucune différence statistiquement significative du poids corporel n'a été observée entre les deux groupes (Tableau 13). Les rats adultes MPR présentaient des taux sériques élevés de triglycérides, de cholestérol et d'acides gras libres ainsi qu'une augmentation du pourcentage de graisse abdominale (Tableau 13). Collectivement, toutes ces variations métaboliques soutiennent les résultats d'études antérieures indiquant que la restriction en protéines en début de vie induit des troubles métaboliques et de composition corporelle à l'âge adulte.

Tableau 13. Caractéristiques phénotypiques des rats témoins et MPR.

Paramètres	Contrôle	MPR	P-value
Poids à la naissance (g)	7.00±0.18	5.97±0.09	P<0.0001
Poids à J180 (g)	694±17	679±27	NS
Graisse abdominale (% du corps)	5.06±0.32	7.31±0.46	P<0.01
Triglycérides (mmol/l)	2.75±0.28	4.12±0.32	p<0.05
Cholestérol (mmol/l)	2.67±0.17	3.73±0.34	p<0.05
Acides gras libres (mmol/l)	0.39±0.04	0.61±0.07	P<0.05
Glucose (mmol/l)	9.19±0.54	8.77±0.66	NS
Insuline (ng/ml)	6.29±1.47	3.27±0.48	NS

*Moyenne ± écart type. Différences statistiquement significatives (p<0,05), Student t-test (n = 7 pour chaque groupe).

2. Transcriptome du foie

La comparaison du profil d'expression génique des 44 000 sondes pour les 26 456 transcrits distincts constituant la puce a été faite par k-means (239). Ceci a permis l'identification de deux groupes de gènes qui sont différenciellement exprimés dans le foie des rats MPR par rapport aux animaux témoins (Figure 29A). Parmi ceux-ci, 3 020 étaient des gènes surexprimés (P <0,0003) et 3 601 gènes étaient sous-exprimés (P <0,002) (Figure 29B).

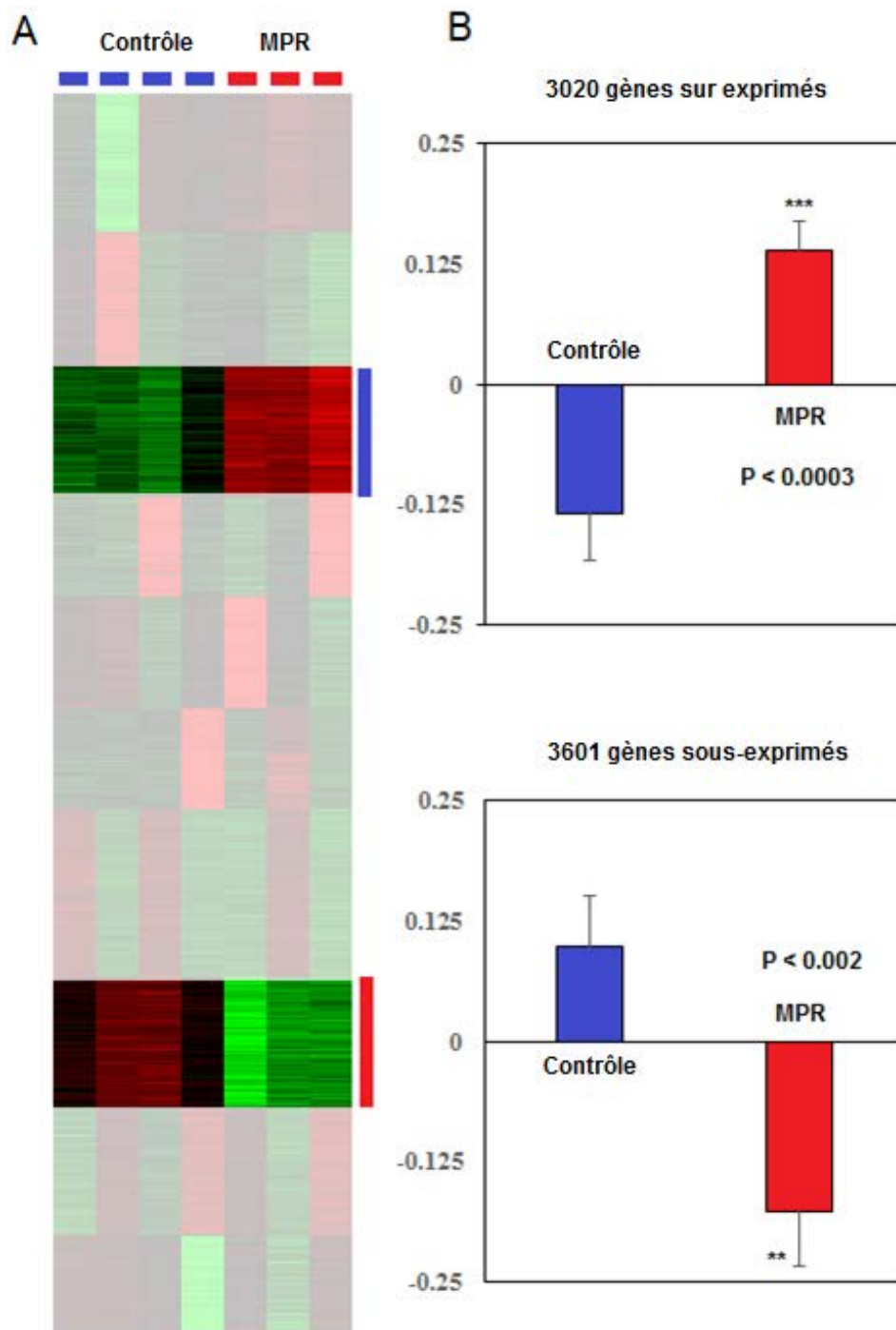


Figure 29. Gènes différentiellement exprimés dans le foie des rats MPR par rapport aux rats contrôles. A. Analyse par k-means du niveau d'expression des gènes. Chaque ligne représente une sonde, et chaque colonne représente un échantillon. **B.** La moyenne de toutes les sondes de chaque échantillon a été calculée et comparée avec t-test de Student pour les deux groupes; ***P<0.001, **P<0.01.

Les annotations fonctionnelles de ces gènes, en utilisant le logiciel GoMiner (241), montrent que les gènes surexprimés sont impliqués dans la régulation du métabolisme et correspondent en particulier à des enzymes impliquées dans le cycle Krebs, dans l'activité oxydoréductase et dans le métabolisme des acides gras. Les gènes sous-exprimés sont des facteurs qui sont principalement impliqués dans la régulation du processus de développement et correspondent

ainsi à des facteurs de transcription qui jouent un rôle clé dans l'intégration des signaux des éléments nutritifs, métaboliques et endocriniens, et à certaines enzymes impliquées dans la régulation épigénétique comme la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles (méthylation, acétylation et glycosylation) des histones (Tableau 14). Les gènes représentatifs sont montrés dans les Figures 30 à 32.

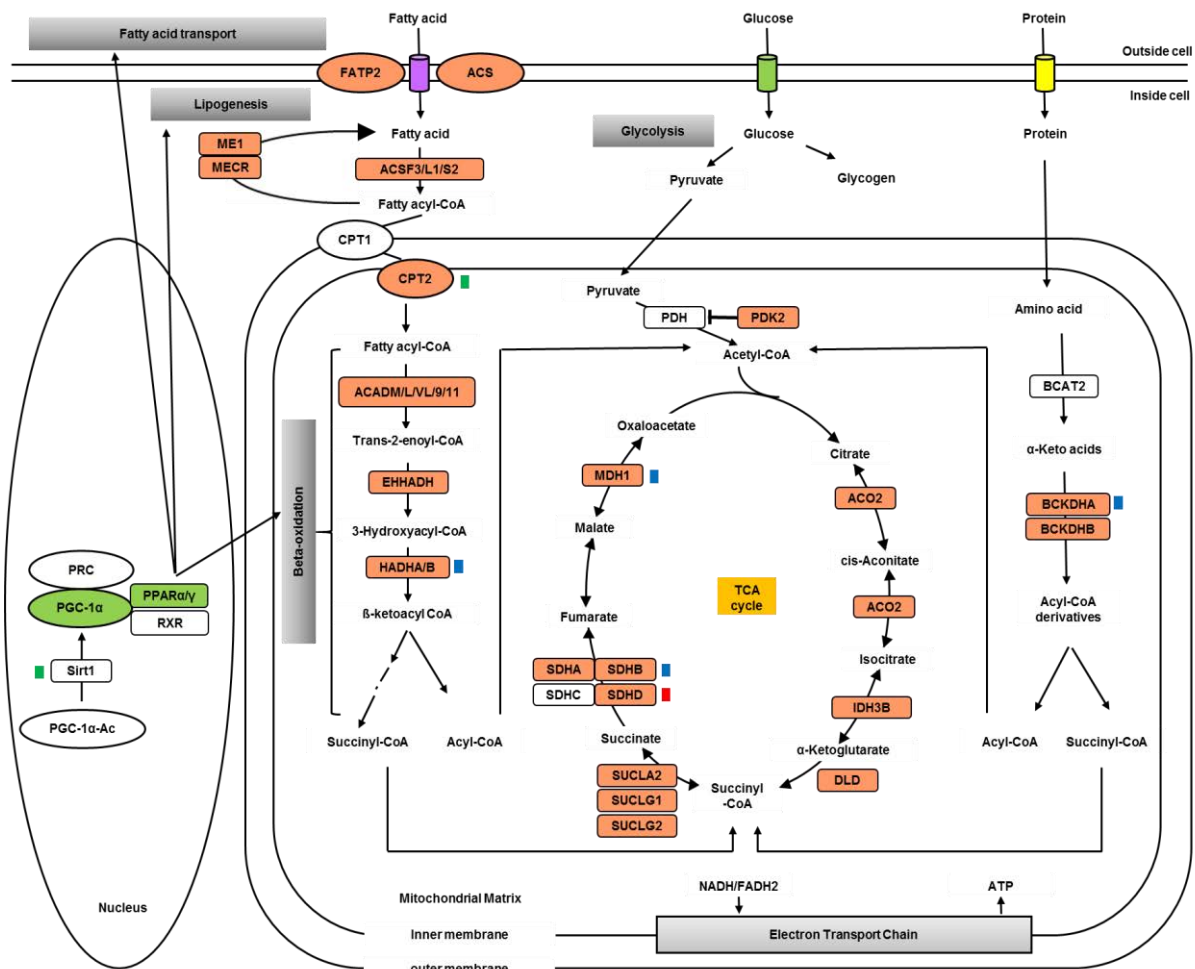


Figure 30. Illustration schématique des gènes altérés par MPR – β-oxdation des acides gras, cycle de Krebs. L'expression des gènes du métabolisme des lipides est régulée par la voie de signalisation de PPAR. Ovale orange foncé : gènes sur-exprimés ; ovalet vert foncé : gènes sous-exprimés. Les carrés rouge, vert et bleu représentent l'hyperméthylation, l'hypométhylation et l'hyperhypométhylation respectivement.

Tableau 14. Annotations fonctionnelles des gènes enrichis dans le transcriptome du foie des rats MPR.

	GO Number	Gene ontology category	Total	Change	Enrichment	LogP	FDR
Over-expressed	GO:0045239	tricarboxylic acid cycle enzyme complex	9	7	6.40	-4.95	0.0002
	GO:0016878	acid-thiol ligase activity	16	11	5.66	-6.69	0.0000
	GO:0016628	oxidoreductase activity acting on the CH-CH group of donors NAD or NADP as acceptor	19	10	4.33	-4.65	0.0003
	GO:0046356	acetyl-CoA catabolic process	23	11	3.93	-4.56	0.0006
	GO:0016877	ligase activity forming carbon-sulfur bonds	24	11	3.77	-4.34	0.0010
	GO:0009109	coenzyme catabolic process	28	12	3.53	-4.33	0.0009
	GO:0006084	acetyl-CoA metabolic process	50	21	3.46	-6.97	0.0000
	GO:0016627	oxidoreductase activity acting on the CH-CH group of donors	53	20	3.10	-5.77	0.0000
	GO:0045333	cellular respiration	62	20	2.65	-4.59	0.0006
	GO:0044455	mitochondrial membrane part	109	30	2.26	-4.97	0.0000
	GO:0050662	coenzyme binding	199	46	1.90	-4.97	0.0000
	GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	208	46	1.82	-4.45	0.0009
	GO:0006631	fatty acid metabolic process	247	53	1.77	-4.64	0.0003
	GO:0048037	cofactor binding	277	59	1.75	-4.99	0.0000
	GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	348	73	1.73	-5.76	0.0000
	GO:0031966	mitochondrial membrane	386	77	1.64	-5.18	0.0000
	GO:0016874	ligase activity	358	71	1.63	-4.73	0.0003
	GO:0044429	mitochondrial part	537	105	1.61	-6.39	0.0000
	GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	637	122	1.58	-6.82	0.0000
	GO:0043436	oxoacid metabolic process	637	122	1.58	-6.82	0.0000
Under-expressed	GO:0031100	organ regeneration	77	24	2.28	-4.22	0.0080
	GO:0045596	negative regulation of cell differentiation	272	61	1.64	-4.27	0.0083
	GO:0051093	negative regulation of developmental process	329	70	1.55	-4.03	0.0100
	GO:0016477	cell migration	506	102	1.47	-4.54	0.0064
	GO:0048870	cell motility	567	112	1.44	-4.53	0.0056
	GO:0051674	localization of cell	567	112	1.44	-4.53	0.0056
	GO:0006928	cellular component movement	599	117	1.43	-4.48	0.0047
	GO:0040011	locomotion	687	130	1.38	-4.24	0.0083
	GO:0009719	response to endogenous stimulus	789	146	1.35	-4.19	0.0081
	GO:0009888	tissue development	849	155	1.33	-4.11	0.0100
	GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	1325	237	1.31	-5.35	0.0029
	GO:0048523	negative regulation of cellular process	1875	334	1.30	-7.27	0.0000
	GO:0051641	cellular localization	1126	198	1.28	-4.10	0.0096
	GO:0048519	negative regulation of biological process	2047	348	1.24	-5.49	0.0033
	GO:0048513	organ development	1814	305	1.23	-4.45	0.0045
	GO:0051179	localization	3071	513	1.22	-7.13	0.0000
	GO:0048522	positive regulation of cellular process	2141	356	1.21	-4.72	0.0062
	GO:0048731	system development	2430	404	1.21	-5.34	0.0025
	GO:0007275	multicellular organismal development	2771	456	1.20	-5.53	0.0040
	GO:0016043	cellular component organization	2506	412	1.20	-4.94	0.0055

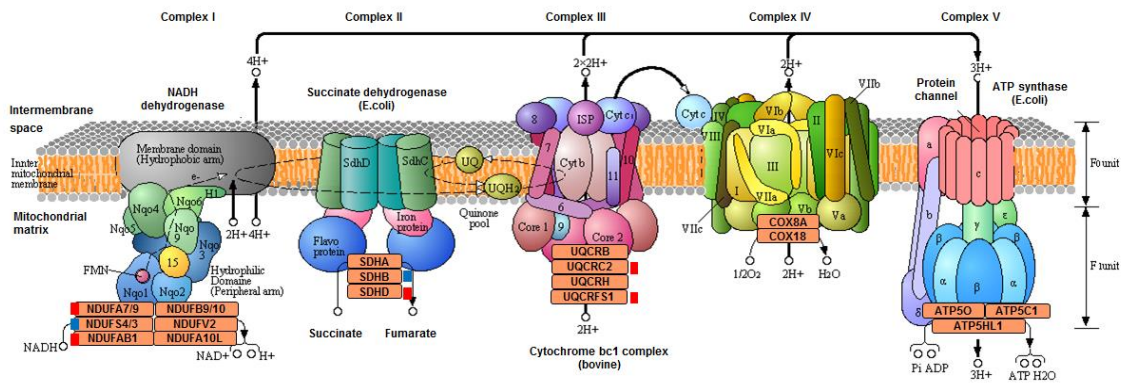


Figure 31. Illustration schématique des gènes altérés par MPR - la chaîne respiratoire Phosphorylation oxydative. Ovale orange foncé : gènes sur-exprimés ; ovale vert foncé : gènes sous-exprimés. Les carrés rouge, vert et bleu représentent l'hyperméthylation, l'hypométhylation et l'hyperhypométhylation respectivement.

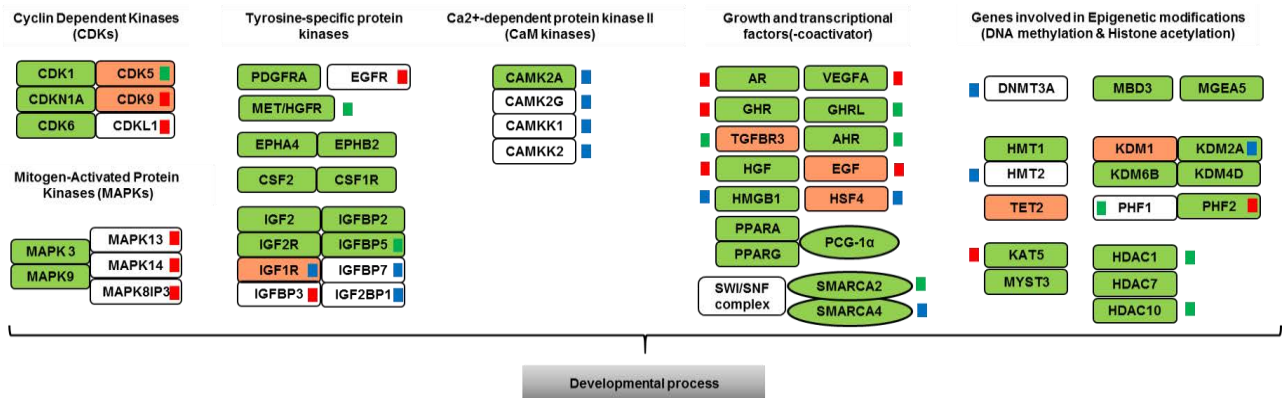


Figure 32. Illustration schématique des gènes altérés par une restriction protéique maternelle - développement et régulation de la transcription et de la chromatine. Activité des kinases, des facteurs de croissance, des facteurs transcription (-cofacteurs) et des gènes impliqués dans les modifications épigénétiques. Ovale orange foncé : gènes sur-exprimés ; ovale vert foncé : gènes sous-exprimés. Les carrés rouge, vert et bleu représentent l'hyperméthylation, l'hypométhylation et l'hyperhypométhylation respectivement.

3. Méthylome du foie

La méthylation de l'ADN est l'une des plus importantes modifications épigénétiques et est essentielle pour le développement des mammifères (270). Pendant les processus de spermatogenèse et d'ovogenèse, les modèles de méthylation d'ADN sont rétablis par des enzymes de DNMT3, ce qui est un processus complexe guidé par plusieurs facteurs tels que l'enzyme Dnmt3L, et marquent les histones (271). Cependant, le renouvellement complet de la méthylation de l'ADN fournit une fenêtre critique au cours de laquelle les modifications épigénétiques peuvent être influencées ou déterminées par l'environnement et l'état de la mère. Ce concept est connu sous le nom de programmation fœtale (272) et est supposé jouer un rôle important dans le développement et la prédisposition à des maladies métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2 (273, 274).

Pour explorer les effets du MPR sur la méthylation de l'ADN au niveau du foie, la méthylation de l'ADN du génome entier a été évaluée par immuno-précipitation de l'ADN méthylé (MeDIP) suivie d'une hybridation en utilisant la puce 3x720k Nimblegen Rat Deluxe promoteur (MeDIP-chip).

Sur la puce à ADN comprenant 720 000 sondes pour 14 981 gènes, deux paramètres de sélection sont appliqués pour caractériser les gènes et les variations des niveaux de méthylation. Les gènes avec au moins une sonde dont la p-value $<0,001$ et les gènes avec au moins deux sondes dont les p-values $<0,01$ ont été considérés comme significatifs. Avec cette stratégie, nous avons identifié 3 968 gènes ayant des profils de méthylation altérés au niveau du foie des rats MPR, par rapports aux contrôles. Les annotations fonctionnelles de ces gènes sont indiquées dans le Tableau 15. Les gènes différentiellement méthylés sont impliqués dans le processus de développement, la voie de la signalisation (modification des kinases), la régulation transcriptionnelle et la croissance, et les modifications épigénétiques, comme par exemple les gènes codant pour des enzymes qui participent à la méthylation de l'ADN (Dnmt3a) ou la méthylation et l'acétylation des histones (HMTS, KDM, KAT et HDAC) (Figure 32).

L'hypométhylation du gène Dnmt3a a été trouvée dans son îlot CpG (Figure 33) comme dans le modèle MDD (Figure 26). Dnmt3a est nécessaire pour préserver la méthylation des gènes soumis à l'empreinte. Pour les 6 gènes soumis à l'empreinte chez le rat, sauf l'absence du gène Impact dans le transcriptome et méthylome, nous avons trouvé les modifications des cinq autres gènes soumis à l'empreinte au niveau de méthylome (Figure 33).

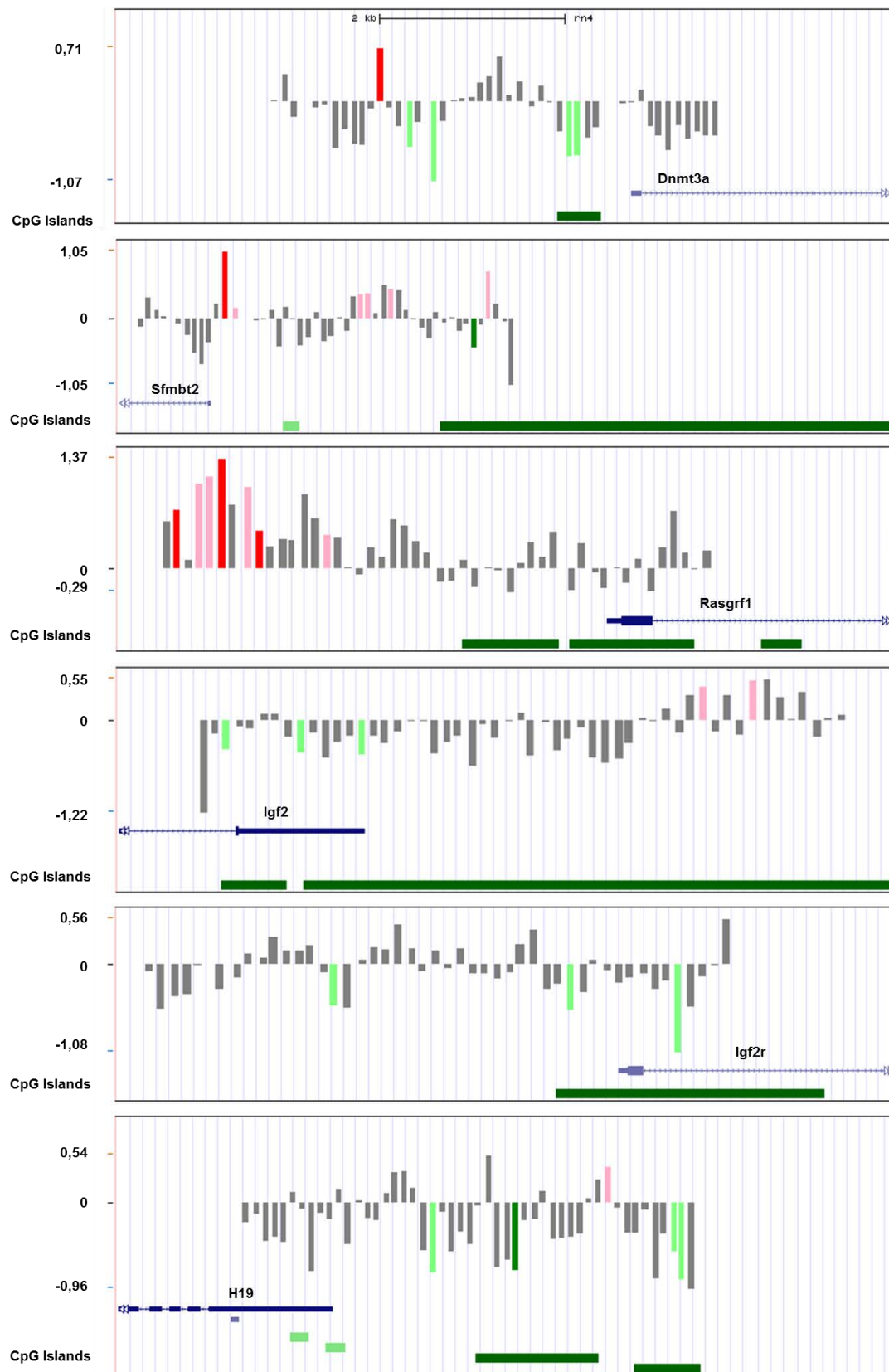


Figure 33. Modifications des gènes soumis à l’empreinte et du gène Dnmt3a au niveau du méthylome. Pour chaque gène, le log₂ ratio MPR/Contrôle de l’état de méthylation pour toutes les sondes dans la région du promoteur est calculé. Le schéma BedGraph a été généré avec UCSC Genome Browser. Le premier exon est présenté en bleu et la direction du brin est indiquée par une flèche. Les sondes significativement modifiées sont colorées en rouge/rose (hyperméthylées) ou vert/vert clair (hypométhylées) : rouge et vert, p-value < 0.01 ; rose/vert clair, p-value < 0.05. Les îlots CpG sont représentés en vert en bas de la figure et les îlots <300 bases sont en vert clair.

Tableau 15. Annotations fonctionnelles des gènes enrichis dans le méthylome du foie des rats MPR à jour 180.

GO Number	Gene ontology category	Total	Change	Enrichment	P-Value
GO:0060347	heart trabecula formation	12	10	3.00	0.0001
GO:0016577	histone demethylation	13	10	2.77	0.0003
GO:0008214	protein dealkylation	13	10	2.77	0.0003
GO:0006482	protein demethylation	13	10	2.77	0.0003
GO:0060350	endochondral bone morphogenesis	38	21	1.99	0.0003
GO:0070076	histone lysine demethylation	11	9	2.94	0.0003
GO:0060571	morphogenesis of an epithelial fold	25	15	2.16	0.0007
GO:0061384	heart trabecula morphogenesis	18	12	2.40	0.0007
GO:0005242	inward rectifier potassium channel activity	18	12	2.40	0.0007
GO:0005703	polytene chromosome puff	8	7	3.15	0.0008
GO:0030324	lung development	146	58	1.43	0.0011
GO:0030323	respiratory tube development	147	58	1.42	0.0014
GO:0035112	genitalia morphogenesis	17	11	2.33	0.0016
GO:0033197	response to vitamin E	17	11	2.33	0.0016
GO:0097480	establishment of synaptic vesicle localization	81	35	1.55	0.0020
GO:0048489	synaptic vesicle transport	81	35	1.55	0.0020
GO:0048382	mesendoderm development	7	6	3.08	0.0024
GO:0060343	trabecula formation	20	12	2.16	0.0025
GO:0019226	transmission of nerve impulse	765	246	1.16	0.0031
GO:0097479	synaptic vesicle localization	84	35	1.50	0.0041

4. Croisement entre le transcriptome et le méthylome du foie des rats MPR

Les « master genes » dont l'expression est modifiée à la fois au niveau du transcriptome et au niveau de la méthylation d'ADN dans le foie des rats MPR sont au nombre de 998. Les annotations fonctionnelles de ces gènes montrent qu'ils sont impliqués dans la différenciation, la migration cellulaire, la mort cellulaire, la synthèse d'ATP et les systèmes contractiles (Tableau 16). Un très grand nombre de ces « master genes » est associé aux manifestations de maladies métaboliques telles que l'hypertension, le diabète et l'obésité (Figure 34) (275).

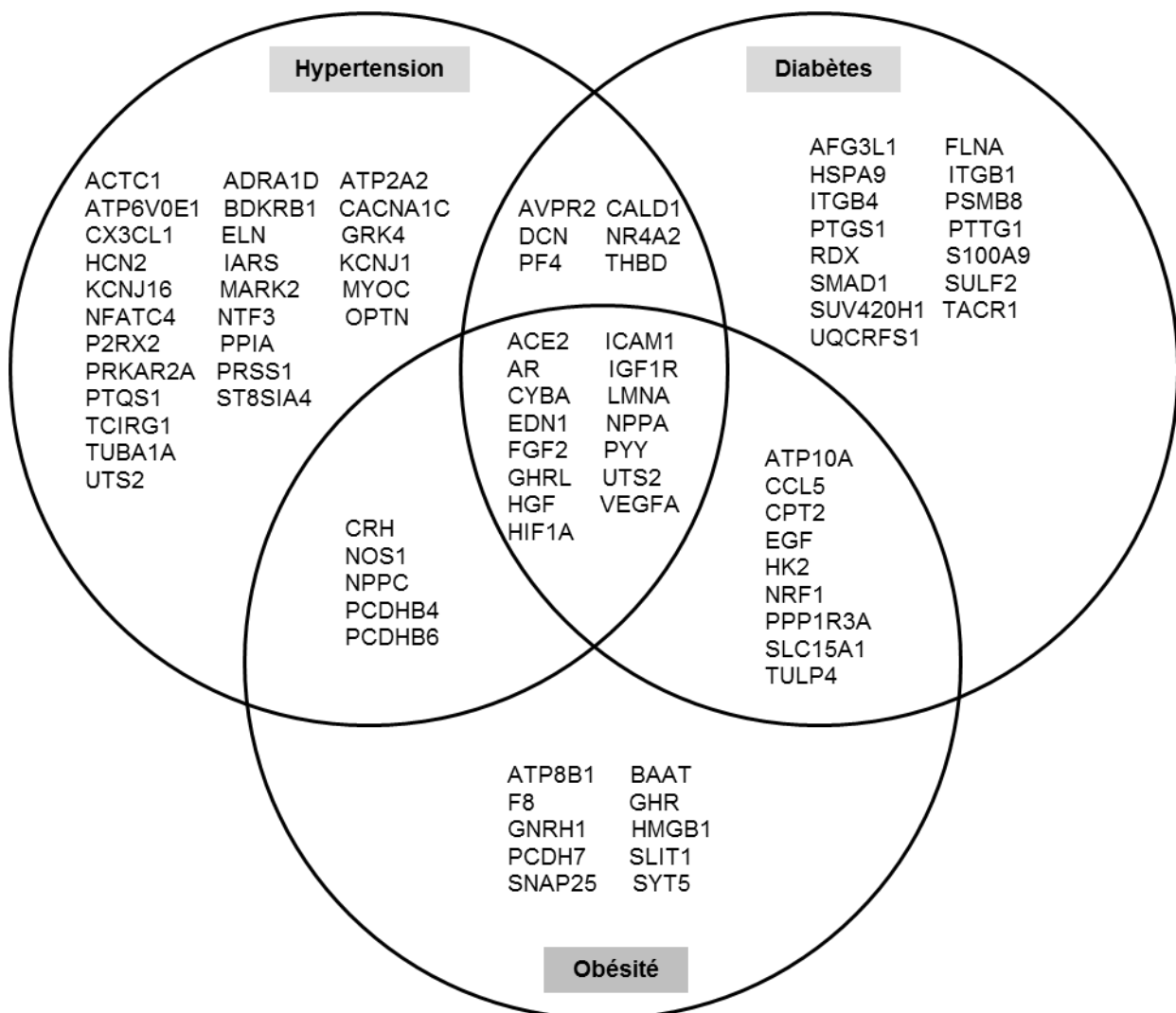


Figure 34. Master genes impliqués dans le syndrome métabolique. Les relations entre gènes candidats et maladies associées sont tirées de la base de données OMIM (<http://www.omim.org/>) et de l'analyse de la littérature (<http://SNPs3D.org>). Nous avons trouvé qu'il y a 53, 45 et 39 gènes qui sont liés à l'hypertension, au diabète et à l'obésité, respectivement.

Tableau 16. Annotations fonctionnelles des « master genes » du foie des rats MPR.

GO Number	Gene ontology category	Change	Enrichment	P	Genes
GO:0051145	smooth muscle cell differentiation	11	3.77	0.0001	ANKRD17, FOXO4, HES1, NFATC4, NTF3, SHH, SMARCA2, SMARCA4, TSHZ3, VEGFA, WNT7B
GO:0014848	urinary tract smooth muscle contraction	5	9.34	0.0001	CACNA1C, P2RX2, TACR1, TRPV1, TSHZ3
GO:0097060	synaptic membrane	18	2.48	0.0003	CACNA1C, CALB1, CHRNE, DLGAP1, DNAJA3, ENO1, F2R, ITPR1, MET, MTMR2, NPTN, NT5E, etc.
GO:0003018	vascular process in circulatory system	22	2.27	0.0003	ACE2, ADRA1D, AHR, CACNA1C, CX3CL1, CYSLTR1, EDN1, EGF, F2R, FGFBP3, HIF1A, ICAM1, NOS1, NPPA, NPPC, etc.
GO:0030335	positive regulation of cell migration	30	1.94	0.0004	ANGPT4, BDKRB1, CBLL1, CCL5, CX3CL1, CXCL13, DDR2, EDN1, EGF, F2R, FERT2, FGF2, etc.
GO:0017134	fibroblast growth factor binding	7	4.9	0.0004	CXCL13, FGF2, FGFBP3, FIBP, GLG1, HSPA9, TGFBR3
GO:0019229	regulation of vasoconstriction	11	3.24	0.0005	ADRA1D, AHR, CACNA1C, CX3CL1, CYSLTR1, EGF, F2R, HIF1A, ICAM1, PTGS1, TACR1
GO:0010243	response to organic nitrogen	74	1.47	0.0005	ABCC2, ABCC4, ABCC5, ABP1, AHR, AR, ATP2A2, ATP6V0D2, ATP6V0E1, BCKDHA, etc.
GO:0042056	chemoattractant activity	6	5.31	0.0006	CCL5, FGF2, HGF, HMGB1, NTF3, VEGFA
GO:0046870	cadmium ion binding	4	8.4	0.0007	NOS1, P2RX2, SLC24A2, TDH
GO:0014832	urinary bladder smooth muscle contraction	4	8.4	0.0007	CACNA1C, P2RX2, TACR1, TRPV1
GO:0044707	single-multicellular organism process	390	1.12	0.0008	ABCC4, ABI3, ABT1, ACE2, ACTC1, ACTN3, ADAMTS9, ADK, ADRA1D, AGPAT6, AHR, etc.
GO:0016192	vesicle-mediated transport	80	1.41	0.0009	ABCC4, ABP1, AP1S1, AP2B1, AP3M2, ARF3, B4GALT1, BTBD9, CACNA1C, CAR1, etc.
GO:0042623	ATPase activity, coupled	26	1.94	0.0009	ABCC2, ABCC4, ABCC5, ATP12A, ATP1B3, ATP2A2, ATP6V0E1, ATP8B1, CHD1, CHD2, etc.
GO:0030212	hyaluronan metabolic process	7	4.2	0.001	ABCC5, EGF, FGF2, GUSB, HGF, HMMR, VEGFA
GO:0060548	negative regulation of cell death	67	1.46	0.001	ACTC1, AHR, ANGPT4, AR, BARD1, CCL5, CDK5, CFL1, CRH, CX3CL1, DDT, DDX3X, etc.
GO:1901698	response to nitrogen compound	76	1.43	0.001	ABCC2, ABCC4, ABCC5, ABP1, AHR, AR, ATP2A2, ATP6V0D2, ATP6V0E1, BCKDHA, etc.

Des exemples de changement d'expression et de méthylation de certains « master genes » sont présentés dans la Figure 35. On remarquera que l'hyperméthylation du promoteur induit la sous-expression des gènes *Ar* et *Vegfa* et la surexpression du gène *DCN*. L'hypométhylation du promoteur conduit à la surexpression d'*Igf1r* mais n'induit pas de changement d'expression pour le gène *Ace*.

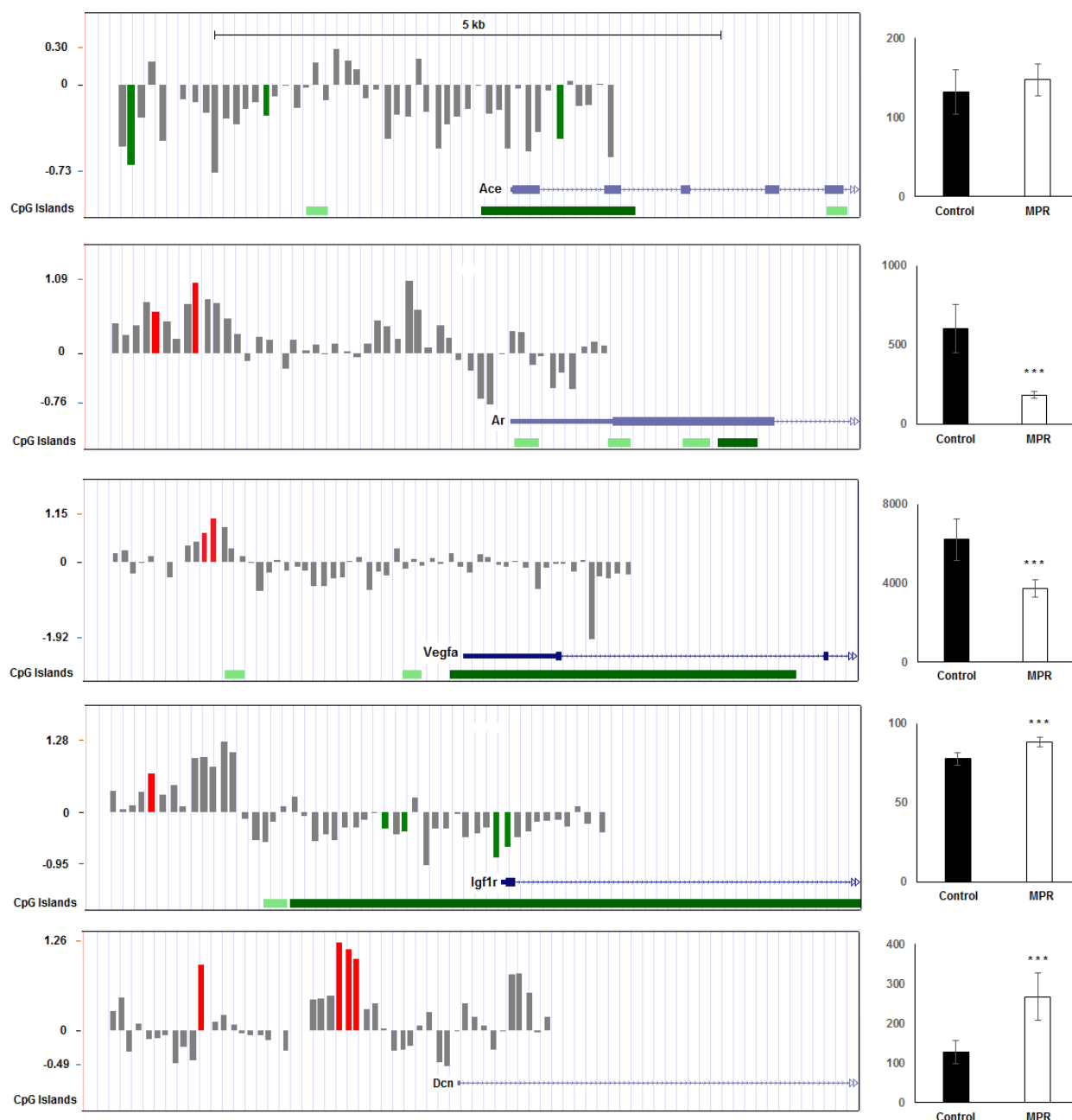


Figure 35. Modifications de l'expression et des niveaux de méthylation de certains gènes impliqués dans le foie des rats MPR. Pour chaque gène, le log2 ratio MPR/Contrôle de l'état de méthylation pour toutes les sondes dans la région du promoteur est calculé. Le schéma BedGraph a été généré avec UCSC Genome Browser (figure de gauche). Le premier exon est présenté en bleu et la direction du brin est indiquée par une flèche. Les sondes significativement modifiées sont colorées en rouge (hyperméthylées) ou vert (hypométhylées). Les niveaux d'expression des gènes du foie dans les rats témoins et MPR (figure de droite). Les îlots CpG sont représentés en vert en bas de la figure et les îlots <300 bases sont en vert clair.

5. Validation des résultats du transcriptome

Les gènes qui sont modifiés au niveau du transcriptome ont été choisis pour vérifier les modifications par RT-qPCR. La Figure 36 présente les résultats de validation par RT-PCR.

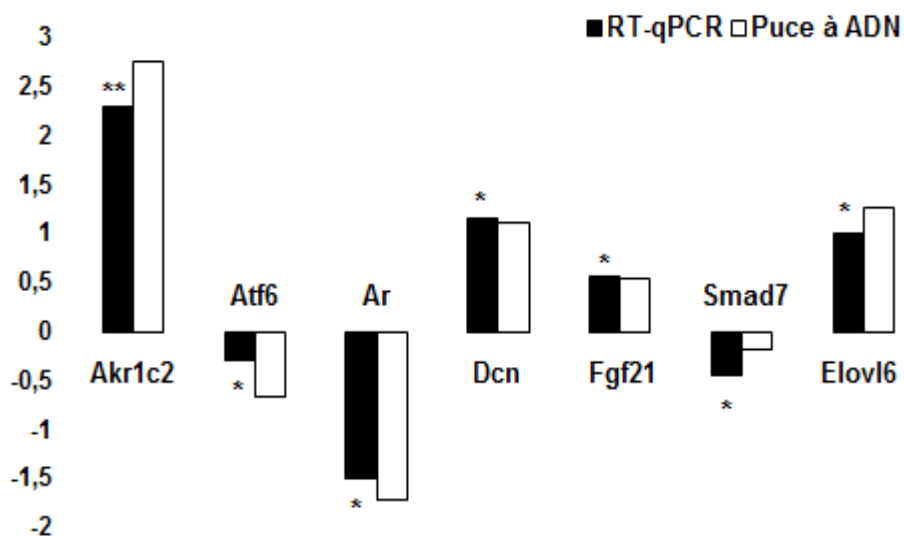


Figure 36. Gènes validés par RT-qPCR. Les modifications d'expression des gènes sont représentées en log₂ ratio (MPR / contrôle) mesuré par puces à ADN (barres blanches) et RT-qPCR (barres noires). Les données de RT-PCR ont été normalisées sur le gène de ménage: ACTB. La quantité relative des différents gènes est normalisée sur l'expression endogène de gènes de référence et a été calculée par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gène} - Ct \text{ gène de référence}) \text{ rat MDD} - (Ct \text{ gène} - Ct \text{ gène de référence}) \text{ rat contrôle}$. P-values de la RT-PCR quantitative : * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 par rapport aux animaux témoins.

En résumé, en étudiant les événements moléculaires associés à une carence en protéines pendant la phase périnatale et en analysant le transcriptome et le méthylome au niveau du foie, nous avons trouvé des gènes qui sont modifiés et impliqués dans les processus métaboliques et développementaux. Les « master genes » présentant des changements à la fois dans leur expression et au niveau de la méthylation de l'ADN dans la région du promoteur sont principalement impliqués dans des processus physiologiques comme la différenciation / la migration / la mort cellulaire, les réponses endogènes / organiques / hormonales et l'activité protéine kinase, principalement au niveau du système urinaire, du système circulatoire, du système musculaire et du système nerveux central. De plus, un grand nombre des gènes affectés à la fois au niveau de leur expression et l'état de méthylation de l'ADN à cause d'un régime MPR sont associés à des maladies métaboliques comme l'hypertension, le diabète et l'obésité.

Partie 3 : « Gatekeeper hypothesis »

Ozanne SE a montré que des modèles animaux différents malnutris pendant la phase périnatale pouvaient tous développer un syndrome métabolique (162), peut-être partagent-ils les mêmes mécanismes moléculaires. McMullen *et al.* ont posé le « gatekeeper hypothesis » : les gènes et les voies modifiés de la même façon par des stress nutritionnels différents peuvent être ceux qui sont responsables de la génération des phénotypes des maladies (163).

Dans ma thèse, j'ai travaillé sur deux modèles de foie de rat au niveau du transcriptome et du méthylome: MDD (methyl donor deficiency) pendant la phase périnatale et MPR (maternal protein restriction). Nous avons aussi comparé avec le modèle MPR développé par Altobelli G (276) mais à des temps différents.

On suppose que les gènes modifiés de la même façon entre les différents modèles au niveau du transcriptome sont les « Gatekeeper genes ». Les gènes modifiés à la fois au niveau du transcriptome et du méthylome sont les « masters genes » de chaque modèle.

1. Comparaison entre MDD J21 et MPR J180

Modifications communes des transcriptomes

Entre les deux modèles différents, il y a 437 gènes en commun qui sont surexprimés et 400 gènes sous-exprimés (Tableau 17). Les annotations fonctionnelles des gènes surexprimés sont principalement impliquées dans la régulation du métabolisme de la mitochondrie et les gènes sous-exprimés sont principalement impliqués dans la localisation cellulaire, dans la réponse au stimulus du glucagon, dans la régulation de la réponse inflammatoire aiguë et le transport d'unique-organisme et du vésicule (Tableau 18).

Tableau 17. Gènes communs au niveau du transcriptome du foie des rats MDD et MPR.

		MPR			
		Surexprimé	Sous-exprimé	Inchangé	Total
MDD	Surexprimé	437	542	2290	3269
	Sous-exprimé	423	400	2018	2841
	Inchangé	2160	2659	15527	20346
	Total	3020	3601	19835	26456

Tableau 18. Annotations fonctionnelles des gènes en commun dans le foie des rats MDD et MPR.

	GO ID	Total	Change	Enrichment	P-Value	FDR	Term
over-expressed	6635	68	12	8.1511	0.0000	0.0000	fatty acid beta-oxidation
	16627	51	9	8.1511	0.0000	0.0000	oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors
	19395	91	13	6.5985	0.0000	0.0000	fatty acid oxidation
	34440	94	13	6.3879	0.0000	0.0000	lipid oxidation
	9062	88	12	6.2986	0.0000	0.0000	fatty acid catabolic process
	72329	106	13	5.6648	0.0000	0.0000	monocarboxylic acid catabolic process
	44242	154	14	4.1991	0.0000	0.0000	cellular lipid catabolic process
	46395	215	19	4.0819	0.0000	0.0000	carboxylic acid catabolic process
	16054	215	19	4.0819	0.0000	0.0000	organic acid catabolic process
	44282	276	20	3.3471	0.0000	0.0000	small molecule catabolic process
	44712	277	20	3.3350	0.0000	0.0000	single-organism catabolic process
	44429	696	35	2.3228	0.0000	0.0000	mitochondrial part
	5739	1528	75	2.2672	0.0000	0.0000	mitochondrion
	44444	6088	166	1.2594	0.0000	0.0042	cytoplasmic part
	3995	8	4	23.0948	0.0000	0.0044	acyl-CoA dehydrogenase activity
	31966	419	24	2.6457	0.0000	0.0047	mitochondrial membrane
	5740	455	24	2.4364	0.0001	0.0048	mitochondrial envelope
	5743	308	20	2.9993	0.0000	0.0050	mitochondrial inner membrane
	6631	308	19	2.8494	0.0000	0.0050	fatty acid metabolic process
	5746	58	8	6.3710	0.0000	0.0055	mitochondrial respiratory chain
under-expressed	51234	3271	99	1.3928	0.0001	0.2400	establishment of localization
	51179	4088	116	1.3058	0.0003	0.2933	localization
	33762	46	6	6.0024	0.0004	0.3000	response to glucagon stimulus
	44425	2775	84	1.3930	0.0005	0.2400	membrane part
	44765	2936	87	1.3636	0.0007	0.2571	single-organism transport
	2673	68	7	4.7372	0.0007	0.2733	regulation of acute inflammatory response
	6810	3196	93	1.3391	0.0008	0.2533	transport
	51014	9	3	15.3395	0.0008	0.2750	actin filament severing
	44444	6088	158	1.1943	0.0009	0.2327	cytoplasmic part
	30133	93	8	3.9586	0.0009	0.2480	transport vesicle
	10543	22	4	8.3670	0.0012	0.3067	regulation of platelet activation
	43434	472	21	2.0474	0.0015	0.3660	response to peptide hormone stimulus
	31988	880	33	1.7257	0.0015	0.3800	membrane-bounded vesicle
	2674	11	3	12.5505	0.0015	0.3832	negative regulation of acute inflammatory response
	5793	39	5	5.8998	0.0015	0.4000	endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment
	43027	24	4	7.6698	0.0016	0.3695	cysteine-type endopeptidase inhibitor activity involved in apoptotic process
	51656	261	14	2.4684	0.0017	0.3582	establishment of organelle localization
	6112	154	10	2.9882	0.0020	0.3843	energy reserve metabolic process
	5737	7455	185	1.1420	0.0021	0.3767	cytoplasm
	44421	942	34	1.6610	0.0023	0.3776	extracellular region part

Modifications communes des méthylomes

En utilisant la même stratégie pour la sélection de gènes positifs dans les niveaux de méthylation comme précédemment décrits, 1 032 et 3 968 gènes ont été identifiés dans ces deux modèles respectivement, avec 326 gènes en commun. Les annotations fonctionnelles de ces gènes sont montrées dans le Tableau 19.

Tableau 19. Annotations fonctionnelles des gènes modifiés dans les méthylomes du foie des rats MDD et MPR.

GO ID	Total	Change	Enrichment	P-Value	Term
48873	23	5	8.7097	0.0002	homeostasis of number of cells within a tissue
43001	27	5	7.4194	0.0005	Golgi to plasma membrane protein transport
55091	9	3	13.3549	0.0012	phospholipid homeostasis
30864	35	5	5.7235	0.0016	cortical actin cytoskeleton
6893	35	5	5.7235	0.0016	Golgi to plasma membrane transport
8104	1143	44	1.5423	0.0021	protein localization
34405	24	4	6.6775	0.0027	response to fluid shear stress
9405	42	5	4.7696	0.0037	pathogenesis
7205	26	4	6.1638	0.0037	protein kinase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway
16338	27	4	5.9355	0.0042	calcium-independent cell-cell adhesion
45793	14	3	8.5853	0.0046	positive regulation of cell size
34067	14	3	8.5853	0.0046	protein localization to Golgi apparatus
5923	66	6	3.6423	0.0059	tight junction
45617	5	2	16.0259	0.0059	negative regulation of keratinocyte differentiation
43709	5	2	16.0259	0.0059	cell adhesion involved in single-species biofilm formation
43708	5	2	16.0259	0.0059	cell adhesion involved in biofilm formation
34204	5	2	16.0259	0.0059	lipid translocation
30913	5	2	16.0259	0.0059	paranodal junction assembly
2001	5	2	16.0259	0.0059	renin secretion into blood stream
70160	67	6	3.5879	0.0064	occluding junction
33036	1356	48	1.4182	0.0070	macromolecule localization
7528	71	6	3.3858	0.0084	neuromuscular junction development
72600	6	2	13.3549	0.0087	establishment of protein localization to Golgi
51807	6	2	13.3549	0.0087	evasion or tolerance of defense response of other organism involved in symbiotic interaction
51805	6	2	13.3549	0.0087	evasion or tolerance of immune response of other organism involved in symbiotic interaction
30682	6	2	13.3549	0.0087	evasion or tolerance of host defense response
20012	6	2	13.3549	0.0087	evasion or tolerance of host immune response
1025	6	2	13.3549	0.0087	RNA polymerase III transcription factor binding
5242	18	3	6.6775	0.0095	inward rectifier potassium channel activity
780	18	3	6.6775	0.0095	condensed nuclear chromosome, centromeric region

« Master genes » communs

Nous avons précédemment défini que les gènes modifiés, à la fois au niveau de l'expression génique et de la méthylation de l'ADN sont les «master genes ». 29 « master genes » sont identifiés comme communs entre les deux modèles dont 15 gènes possédant les mêmes modifications au niveau de leur expression (Tableau 20). Le Tableau 21 présente les annotations fonctionnelles de ces gènes.

Tableau 20. Master genes en commun (29 gènes).

Gene symbol	Gene Name	MDD	MPR
Atp2a2	ATPase, Ca ⁺⁺ Transporting, Cardiac Muscle, Slow Twitch 2	down	down
Fert2	Fert2 fer (fms/fps related) protein kinase, testis specific 2	up	up
Gsn	GELSOLIN; GSN	down	down
Med10	MEDIATOR COMPLEX SUBUNIT 10; MED10	down	down
Optn	OPTINEURIN; OPTN	up	up
Slc26a4	SOLUTE CARRIER FAMILY 26, MEMBER 4; SLC26A4	down	down
Tmem86a	Transmembrane Protein 86A	down	down
Tuba1c	Tubulin, Alpha 1c	down	down
Abp1	AMILORIDE-BINDING PROTEIN 1; ABP1	up	down
Clcn5	CHLORIDE CHANNEL 5; CLCN5	up	down
Emilin1	ELASTIN MICROFIBRIL INTERFACER 1; EMILIN1	down	up
F2r	COAGULATION FACTOR II RECEPTOR; F2R	up	up
Faim	Fas Apoptotic Inhibitory Molecule	up	down
Higd2a	HIG1 Hypoxia Inducible Domain Family, Member 2A	up	down
LOC317456		down	down
Lphn2	LATROPHILIN 2; LPHN2	up	down
Mier1	Mesoderm Induction Early Response 1, Transcriptional Regulator	up	up
Mrm1	Mitochondrial RRNA Methyltransferase 1 Homolog (S. Cerevisiae)	up	up
Nf2	NEUROFIBROMIN 2; NF2	up	up
Nit1	NITRILASE 1; NIT1	down	up
Nmb	NEUROMEDIN B; NMB	down	up
Nmi	NMYC INTERACTOR; NMI	down	up
Odf3l1	Outer Dense Fiber Of Sperm Tails 3-Like 1	up	down
Prkd3	protein kinase d3	down	down
RGD1560065		up	down
Rod1	REGULATOR OF DIFFERENTIATION 1; ROD1	up	down
Rpl21	RIBOSOMAL PROTEIN L21; RPL21	up	down
Sdhb	SUCCINATE DEHYDROGENASE COMPLEX, SUBUNIT B, IRON SULFUR PROTEIN; SDHB	up	up
Xpot	EXPORTIN, tRNA; XPOT	up	down

Tableau 21. Annotations fonctionnelles des « master genes » en commun.

GO ID	Total	Change	Enrichment	P-Value	FDR	Term
48038	9	2	112.05	1.00E-04	0.08	quinone binding
7259	130	4	15.52	1.00E-04	0.12	JAK-STAT cascade
31094	12	2	84.04	2.00E-04	0.16	platelet dense tubular network
7260	62	3	24.40	2.00E-04	0.17	tyrosine phosphorylation of STAT protein
31252	251	4	8.04	0.0014	0.44	cell leading edge
7205	28	2	36.02	0.0014	0.51	protein kinase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway
30027	111	3	13.63	0.0013	0.57	lamellipodium
7249	197	3	7.68	0.0067	0.58	I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
70062	61	2	16.53	0.0064	0.59	extracellular vesicular exosome
32956	190	3	7.96	0.0061	0.60	regulation of actin cytoskeleton organization
31589	210	3	7.20	0.008	0.60	cell-substrate adhesion
65010	67	2	15.05	0.0077	0.60	extracellular membrane-bounded organelle
43230	67	2	15.05	0.0077	0.60	extracellular organelle
7243	922	6	3.28	0.008	0.61	intracellular protein kinase cascade
3779	226	3	6.69	0.0098	0.61	actin binding
32535	226	3	6.69	0.0098	0.61	regulation of cellular component size
15108	59	2	17.09	0.006	0.61	chloride transmembrane transporter activity
42995	1351	7	2.61	0.0136	0.61	cell projection
32153	74	2	13.63	0.0093	0.62	cell division site
22610	737	5	3.42	0.0135	0.62	biological adhesion

2. Comparaison entre MDD J21 et MPR J1

La comparaison du transcriptome entre les rats J21 du modèle MDD et les rats nouveau-nés du modèle MPR a mise en évidence 287 gènes en commun surexprimés et 281 gènes sous-exprimés. Les annotations fonctionnelles des gènes surexprimés sont principalement impliquées dans le métabolisme des acides gras, celles des gènes sous-exprimés sont principalement impliquées dans l'activité des chimiokines / des neurotransmetteurs métaboliques / dans la réponse immunitaire humorale et le cycle cellulaire (Tableau 22).

Tableau 22. Annotations fonctionnelles des gènes en commun chez les rats MDD J21 et MPR J1.

	GO ID	Total	Change	Enrichment	P-Value	FDR	Term
over-expressed	31903	48	8	9.19	0.0000	0.0000	microbody membrane
	5778	48	8	9.19	0.0000	0.0000	peroxisomal membrane
	44438	77	10	7.16	0.0000	0.0000	microbody part
	44439	77	10	7.16	0.0000	0.0000	peroxisomal part
	5743	310	25	4.45	0.0000	0.0000	mitochondrial inner membrane
	46395	219	17	4.28	0.0000	0.0000	carboxylic acid catabolic process
	16054	219	17	4.28	0.0000	0.0000	organic acid catabolic process
	19866	328	25	4.20	0.0000	0.0000	organelle inner membrane
	10876	233	17	4.02	0.0000	0.0000	lipid localization
	44282	285	20	3.87	0.0000	0.0000	small molecule catabolic process
	44712	286	20	3.85	0.0000	0.0000	single-organism catabolic process
	31966	425	29	3.76	0.0000	0.0000	mitochondrial membrane
	5740	463	30	3.57	0.0000	0.0000	mitochondrial envelope
	5759	323	20	3.41	0.0000	0.0000	mitochondrial matrix
	44429	712	44	3.41	0.0000	0.0000	mitochondrial part
	32787	485	29	3.30	0.0000	0.0000	monocarboxylic acid metabolic process
	6820	443	23	2.86	0.0000	0.0000	anion transport
	31967	755	33	2.41	0.0000	0.0000	organelle envelope
	19752	955	41	2.37	0.0000	0.0000	carboxylic acid metabolic process
	31975	773	33	2.35	0.0000	0.0000	envelope
under-expressed	8250	12	4	17.63	1.000E-04	0.0300	oligosaccharyltransferase complex
	31597	9	3	17.63	5.000E-04	0.0356	cytosolic proteasome complex
	10044	11	3	14.42	1.000E-03	0.0431	response to aluminum ion
	42133	28	5	9.44	2.000E-04	0.0235	neurotransmitter metabolic process
	8009	30	5	8.81	2.000E-04	0.0250	chemokine activity
	42379	42	6	7.55	1.000E-04	0.0243	chemokine receptor binding
	42417	36	5	7.34	5.000E-04	0.0356	dopamine metabolic process
	502	60	7	6.17	1.000E-04	0.0248	proteasome complex
	5791	66	7	5.61	2.000E-04	0.0248	rough endoplasmic reticulum
	51437	73	7	5.07	4.000E-04	0.0290	positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle
	51351	85	8	4.98	2.000E-04	0.0232	positive regulation of ligase activity
	51439	80	7	4.63	8.000E-04	0.0382	regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle
	51443	82	7	4.51	9.000E-04	0.0406	positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity
	3697	83	7	4.46	1.000E-03	0.0405	single-stranded DNA binding
	30176	84	7	4.41	1.000E-03	0.0420	integral to endoplasmic reticulum membrane
	51340	102	8	4.15	7.000E-04	0.0355	regulation of ligase activity
	6959	141	11	4.13	1.000E-04	0.0273	humoral immune response
	86	159	12	3.99	0.000E+00	0.0277	G2/M transition of mitotic cell cycle
	51591	107	8	3.95	1.000E-03	0.0405	response to cAMP
	19884	161	11	3.61	2.000E-04	0.0251	antigen processing and presentation of exogenous antigen

3. Comparaison entre MPR J180 et MPR J1

Pour le même modèle à des âges différents, il y a 202 gènes en commun surexprimés et 236 gènes sous-exprimés. Les gènes surexprimés sont principalement impliqués dans le métabolisme des acides aminés et des lipides, tandis que les gènes sous-exprimés sont principalement impliqués dans l'organisation de complexes protéine-ADN, la maintenance de chromatine, le cycle cellulaire, l'expression des gènes et le développement du système cardiovasculaire (Tableau 23).

Tableau 23. Annotations fonctionnelles des gènes en commun chez les rats MPR J180 et MPR J1.

	GO ID	Total	Change	Enrichmnt	P-Value	FDR	Term
over-expressed	44743	27	6	16.90	0.0000	0.0000	intracellular protein transmembrane import
	65002	34	6	13.42	0.0000	0.0000	intracellular protein transmembrane transport
	71806	35	6	13.04	0.0000	0.0000	protein transmembrane transport
	31903	48	7	11.09	0.0000	0.0000	microbody membrane
	5778	48	7	11.09	0.0000	0.0000	peroxisomal membrane
	55114	774	26	2.56	0.0000	0.0000	oxidation-reduction process
	5739	1573	41	1.98	0.0000	0.0000	mitochondrion
	44281	2565	58	1.72	0.0000	0.0000	small molecule metabolic process
	44710	3177	69	1.65	0.0000	0.0000	single-organism metabolic process
	44444	6321	111	1.34	0.0000	0.0000	cytoplasmic part
	5737	7761	128	1.25	0.0000	0.0031	cytoplasm
	44429	712	24	2.56	0.0000	0.0033	mitochondrial part
	16558	13	4	23.41	0.0000	0.0036	protein import into peroxisome matrix
	44438	77	7	6.92	0.0001	0.0048	microbody part
	44439	77	7	6.92	0.0001	0.0048	peroxisomal part
	5743	310	14	3.44	0.0001	0.0052	mitochondrial inner membrane
	72594	270	13	3.66	0.0001	0.0055	establishment of protein localization to organelle
	19752	955	28	2.23	0.0000	0.0057	carboxylic acid metabolic process
	6082	1077	31	2.19	0.0000	0.0057	organic acid metabolic process
	43436	1060	30	2.15	0.0000	0.0060	oxoacid metabolic process
under-expressed	10369	20	5	16.51	0.0000	0.0000	chromocenter
	65004	108	11	6.73	0.0000	0.0000	protein-DNA complex assembly
	71824	134	12	5.91	0.0000	0.0000	protein-DNA complex subunit organization
	6323	114	10	5.79	0.0000	0.0000	DNA packaging
	71103	152	13	5.65	0.0000	0.0000	DNA conformation change
	6325	450	21	3.08	0.0000	0.0000	chromatin organization
	51276	675	27	2.64	0.0000	0.0000	chromosome organization
	34641	4529	98	1.43	0.0000	0.0000	cellular nitrogen compound metabolic process
	6807	4850	104	1.42	0.0000	0.0000	nitrogen compound metabolic process
	6139	4137	90	1.44	0.0000	0.0092	nucleobase-containing compound metabolic process
	779	40	6	9.90	0.0000	0.0100	condensed chromosome, centromeric region
	278	934	31	2.19	0.0000	0.0109	mitotic cell cycle
	90304	3375	77	1.51	0.0000	0.0114	nucleic acid metabolic process
	34622	586	23	2.59	0.0000	0.0120	cellular macromolecular complex assembly
	46483	4325	92	1.40	0.0001	0.0120	heterocycle metabolic process
	44428	2843	67	1.56	0.0001	0.0126	nuclear part
	7275	4739	99	1.38	0.0000	0.0133	multicellular organismal development
	44271	2822	67	1.57	0.0000	0.0141	cellular nitrogen compound biosynthetic process
	16568	402	18	2.96	0.0000	0.0150	chromatin modification
	35459	5	3	39.62	0.0000	0.0160	cargo loading into vesicle

4. Comparaison des trois modèles

Transcriptome

L'expression génétique a été comparée dans les 3 modèles (MDD J21, MPR J1, MPR J180). Cette analyse a révélé un ensemble de 46 gènes en commun qui sont sur-exprimés et de 42 gènes sous-exprimés dans les trois modèles de programmation métabolique par rapport aux animaux témoins. La plupart des gènes sur-exprimés sont impliqués dans la régulation de la fonction mitochondriale alors que les gènes sous-exprimés sont principalement impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire (Figure 37 et Tableau 24).

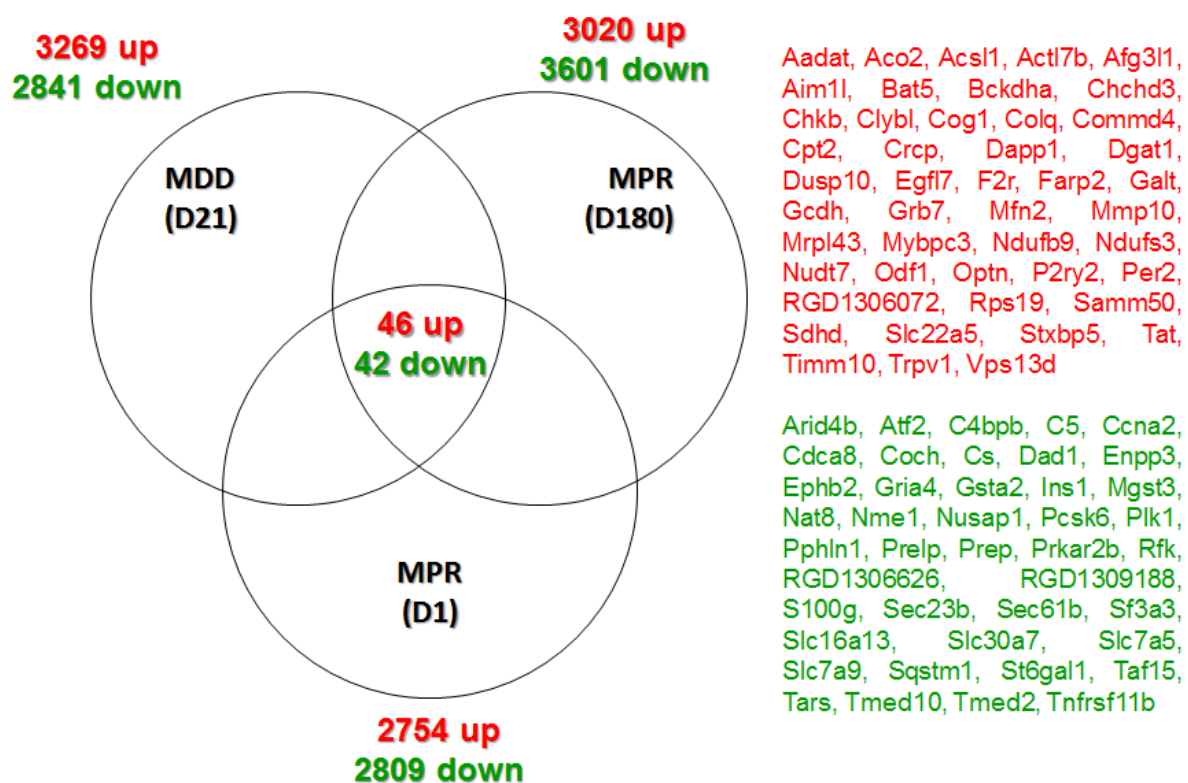


Figure 37. Gènes du transcriptome communs aux 3 modèles.

Tableau 24. Annotations fonctionnelles des gènes du transcriptome communs aux 3 modèles.

	GO ID	Total	Change	Enrichment	P-Value	FDR	Term
over-expressed	7007	14	3	64.82	0.0000	0.0000	inner mitochondrial membrane organization
	8053	17	3	53.38	0.0000	0.0000	mitochondrial fusion
	9068	18	3	50.42	0.0000	0.0000	aspartate family amino acid catabolic process
	7006	72	5	21.01	0.0000	0.0000	mitochondrial membrane organization
	44455	142	6	12.78	0.0000	0.0000	mitochondrial membrane part
	5743	310	8	7.81	0.0000	0.0000	mitochondrial inner membrane
	19866	328	8	7.38	0.0000	0.0000	organelle inner membrane
	31966	425	10	7.12	0.0000	0.0000	mitochondrial membrane
	5740	463	10	6.53	0.0000	0.0000	mitochondrial envelope
	44429	712	15	6.37	0.0000	0.0000	mitochondrial part
	31967	755	11	4.41	0.0000	0.0000	organelle envelope
	31975	773	11	4.30	0.0000	0.0000	envelope
	5739	1573	19	3.65	0.0000	0.0000	mitochondrion
	44444	6321	35	1.68	0.0000	0.0000	cytoplasmic part
	44710	3177	23	2.19	0.0000	0.0022	single-organism metabolic process
	5737	7761	38	1.48	0.0000	0.0024	cytoplasm
	6637	83	4	14.58	0.0002	0.0087	acyl-CoA metabolic process
	35383	83	4	14.58	0.0002	0.0087	thioester metabolic process
	2536	5	2	121.00	0.0001	0.0095	respiratory burst involved in inflammatory response
	35337	25	3	36.30	0.0001	0.0100	fatty-acyl-CoA metabolic process
under-expressed	12505	1193	12	3.35	0.0001	0.1467	endomembrane system
	48208	14	2	47.65	0.0008	0.1629	COPII vesicle coating
	48207	14	2	47.65	0.0008	0.1629	vesicle targeting, rough ER to cis-Golgi
	48194	13	2	51.31	0.0007	0.1667	Golgi vesicle budding
	42589	13	2	51.31	0.0007	0.1667	zymogen granule membrane
	51234	3384	20	1.97	0.0006	0.1680	establishment of localization
	16485	168	4	7.94	0.0016	0.1700	protein processing
	280	289	5	5.77	0.0016	0.1704	nuclear division
	922	103	3	9.71	0.0036	0.1706	spindle pole
	50803	101	3	9.91	0.0034	0.1717	regulation of synapse structure and activity
	30449	29	2	23.00	0.0034	0.1728	regulation of complement activation
	2000257	29	2	23.00	0.0034	0.1728	regulation of protein activation cascade
	44238	7104	30	1.41	0.0033	0.1751	primary metabolic process
	44431	424	6	4.72	0.0015	0.1757	Golgi apparatus part
	31090	1711	12	2.34	0.0033	0.1764	organelle membrane
	30137	20	2	33.35	0.0016	0.1769	COPI-coated vesicle
	10369	20	2	33.35	0.0016	0.1769	chromocenter
	794	95	3	10.53	0.0029	0.1779	condensed nuclear chromosome
	777	30	2	22.24	0.0036	0.1784	condensed chromosome kinetochore
	42277	205	4	6.51	0.0032	0.1786	peptide binding

Partie 4 : Effets transgénérationnels, projet TransG

On dit que trois générations à la fois sont exposées aux mêmes conditions environnementales (Figure 18), parce que les cellules germinales sont déjà développées dans l'embryon et le fœtus de G1. Par rapport aux nos protocoles nutritionnels (modèle MDD et modèle MPR), la phase de la formation des cellules germinales primordiales (PGCs) et ses méthylation *de novo* est aussi exposée à la malnutrition (Figure 38), on suppose donc que la malnutrition pendant la gestation et la lactation chez la G0 (grande-mère) puisse aussi provoquer des perturbations chez la G2 (petit-enfant).

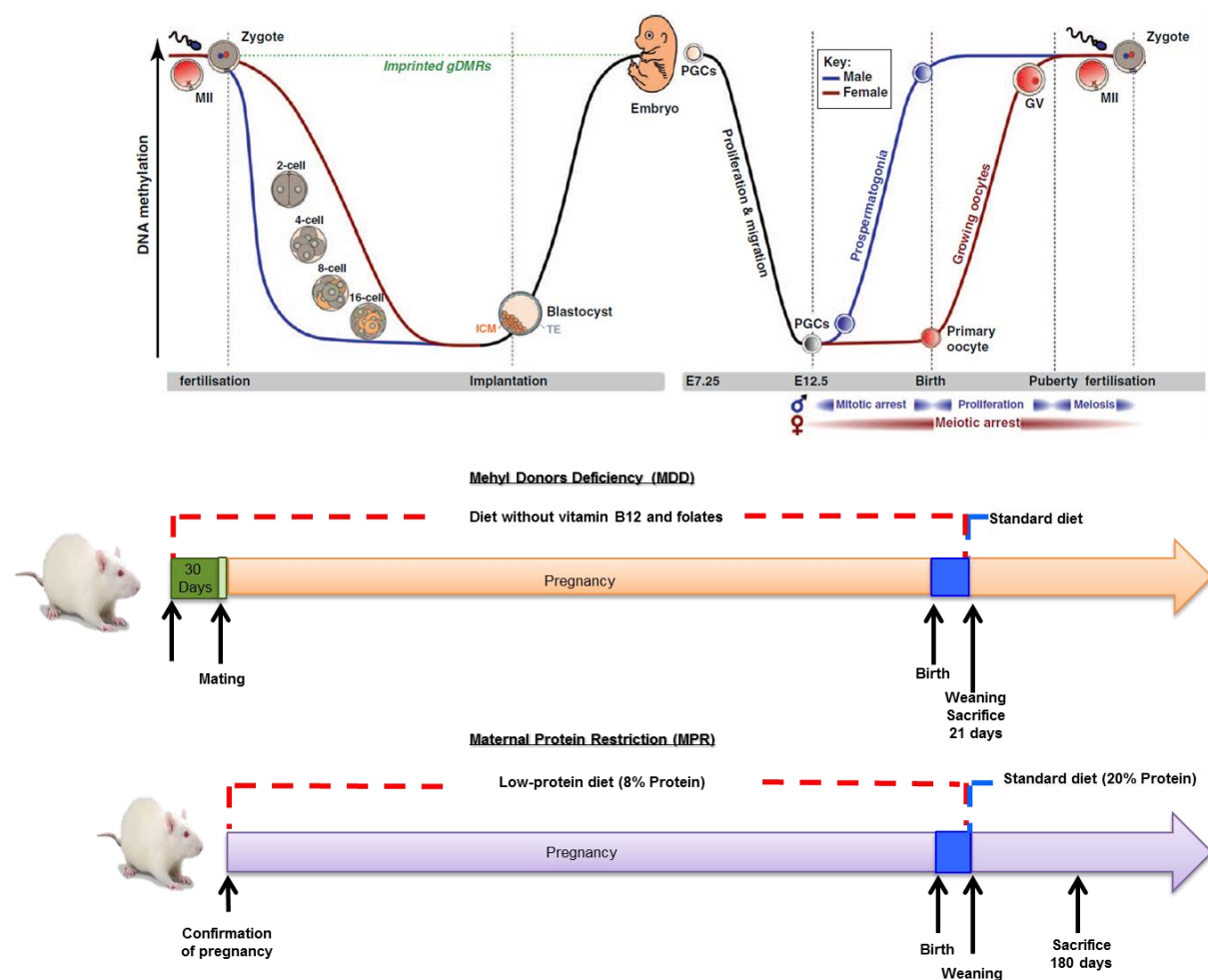


Figure 38. La chronologie de la formation des cellules germinales primordiales (PGCs) chez le rat par rapport au protocole nutritionnel.

Pour regarder si des modifications du transcriptome chez G1 peuvent se transmettre à la G2, nous avons travaillé sur le transcriptome des 2 générations à jour 21: G1 et G2. L'accouplement entre adultes de G2 se passe entre femelles et mâles qui ne sont pas frères et sœurs et tous les rats mâles sont des rats contrôles (Figure 39). Dans ce projet, nous avons concentré notre attention sur deux organes, le cœur et le foie, qui sont deux cibles importantes de la stéatose dans le syndrome métabolique et pour lesquels la recherche de mécanismes communs de

dérégulation a fait l'objet de très nombreux travaux dans la littérature. Notre stratégie expérimentale comportait une première étape de caractérisation des conséquences métaboliques et du transcriptome qui nous a permis d'identifier des troubles causés par la carence en donneurs de méthyles.

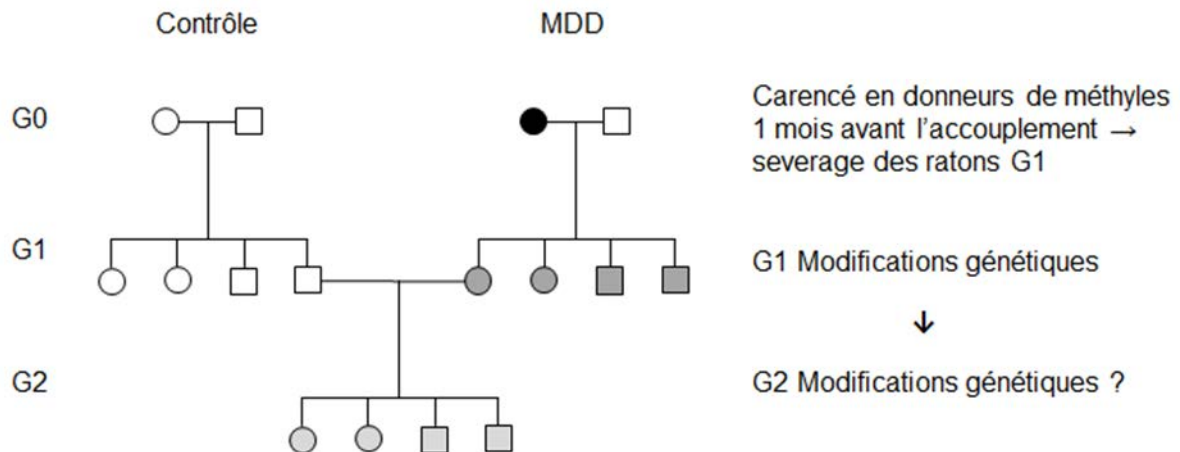


Figure 39. Projet TransG : étude du transcriptome G1 et G2.

Le poids corporel, le poids du foie et du cœur des rats carencés sont bien diminués chez les G1 par rapport aux rats témoins. Les ratios du poids du foie et du cœur sur le poids corporel sont augmentés chez les G1, mais aucune différence significative n'est observée chez les G2. Le groupe carencé avait une augmentation considérable de la concentration en homocystéine. Nous avons également observé une augmentation considérable d'acides gras libres et de triglycérides dans le sang, et une diminution de la concentration en glucose chez les G1, mais pas de changements importants chez les G2 à part une augmentation de la concentration en glucose et une diminution du cholestérol. L'augmentation du glucose chez les G2 est un indicateur intéressant pour le diabète. L'augmentation de la concentration en créatine chez les G1 et les G2 n'est pas significative entre les deux groupes, mais indiquent une diminution de la clérance de la créatine, donc une diminution de la fonction rénale ou hépatique (Tableau 25).

Tableau 25. Paramètres physiologiques et métaboliques des rats MDD et témoins de G1 et G2.

Marqueurs	G1			G2		
	Contrôle	MDD	p-value	Contrôle	MDD	p-value
Poids corporel (g)	60.18±3.64	30.39±1.45	<0.001	53.26±3.39	50.14±2.68	0.4881
Poids du foie (g)	2.62±0.19	1.90±0.21	0.023	2.23±0.16	2.07±0.13	0.4388
Ratio poids du foie/corporel (%)	4.17±0.14	6.17±0.41	<0.001	4.21±0.22	4.11±0.08	0.6787
Poids du cœur (g)	0.30±0.01	0.18±0.01	<0.001	0.25±0.02	0.31±0.06	0.3314
Ratio poids du coeur/corporel (%)	0.48±0.02	0.60±0.02	<0.001	0.47±0.01	0.66±0.17	0.2194
Homocystéine (µmol/L)	7.67±0.61	36.99±6.49	<0.001	8.96±1.11	8.16±0.55	0.518
Glucose (g/L)	1.53±0.05	0.95±0.10	0.001	144±0.05	1.64±0.03	0.005
Cholestérol total (g/L)	1.30±0.04	1.29±0.12	0.971	1.30±0.04	1.11±0.06	0.015
Triglycérides (g/L)	1.10±0.15	1.75±0.16	0.013	1.07±0.11	1.29±0.09	0.141
ALAT (U/L)	63.50±3.00	25.29±5.19	<0.001	54.50±3.72	44.25±2.68	0.044
ASAT (U/L)	299.75±15.58	331.43±43.82	0.485	189.63±13.33	161.13±8.04	0.093
Lactate (U/L)	306.00±25.67	270.14±35.85	0.433	254.88±14.53	253.88±33.09	0.978
HDL (mmol/L)	0.33±0.01	0.35±0.04	0.562	0.36±0.01	0.34±0.01	0.508
LDL (mmol/L)	0.20±0.01	0.18±0.02	0.342	0.23±0.01	0.22±0.01	0.611
Acides gras libres (mmol/L)	196.13±21.72	541.57±95.85	0.002	355.63±102.98	211.38±15.26	0.188
Créatine (µmol/L)	2.44±0.09	9.24±4.77	0.149	6.85±3.25	7.28±4.74	0.942

Les données du transcriptome du foie et du cœur chez les deux générations G1 et G2 sont en cours d'analyse.

Discussion/Conclusion

Partie 1 : Effets de la carence en groupement méthyles sur le transcriptome et le méthylome du foie de rats à 21 jours

Les rats MDD ont un poids corporel diminué, une augmentation considérable des acides gras libres, du cholestérol et des triglycérides dans le sang. L'insuline est diminuée mais pas significativement (Tableau 6). Tous ces paramètres métaboliques sont en accord avec des études antérieures comme observé dans des autres modèles de programmation fœtale chez des rats avec une restriction en protéine et/ou la restriction alimentaire (106, 236-238). La teneur significativement élevée en lipides du foie est un indicateur très important du développement de la maladie NAFDL (Tableau 7).

Les effets directs de la MDD sur le métabolisme et les facteurs clés associés à des maladies métaboliques ont été largement décrits dans le passé (2, 277, 278). Cependant, la plupart de ces études ont mis l'accent sur l'analyse de gènes et / ou de protéines individuelles. Nous présentons pour la première fois une analyse des effets combinés induits par une carence en donneurs de méthyle maternelle sur l'épigénome et le transcriptome de la progéniture. Nos données montrent clairement qu'un déficit en donneurs de méthyle de la mère entraîne des modifications importantes dans les méthylation de l'ADN et l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides, le stress du RE, la fonction mitochondriale, la coagulation du sang et des troubles neurologiques (Tableau 8, Figure 23-24).

Nos données montrent également que le MDD induit des changements bien plus importants dans le transcriptome que dans la méthylation de l'ADN, indiquant que la carence en donneurs de méthyle cible un nombre réduit de « master genes » qui ont un impact majeur sur l'expression et la fonction des gènes, car ils agissent sur un programme ou une voie de signalisation clé. L'hypothèse émise est que le même schéma commun de réponses programmées en réponse à divers stress nutritionnels pourrait être des modifications épigénétiques (163). Nos résultats suggèrent que les gènes dont la méthylation de l'ADN et dont l'expression est modifiée de façon concomitante sont les « master genes » de la carence en donneurs de méthyle.

Des résultats contrastés ont été trouvés par Altobelli *et al.* dans un modèle de restriction de la protéine de rat nouveau-né (276). Ils ont trouvé une absence d'intersection entre les modifications d'expression génique et des modifications de méthylation de l'ADN. Ils n'ont trouvé que 3 gènes différentiellement modifiés, avec un de FDR 1%. Nos résultats préliminaires sur un modèle de rats adultes nés de mères carencées en protéines montrent une meilleure intersection.

Il est intéressant de noter que la plupart des « master genes » que nous avons identifiés sont connus pour participer à la maladie NAFLD (Talbeau 12). La NAFLD est une maladie complexe résultant de l'exposition environnementale agissant sur un fond polygénique et comprenant plusieurs modificateurs indépendants. Elle est fortement associée à des caractéristiques du syndrome métabolique, tels que l'obésité abdominale, la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose ou T2MD et la dyslipidémie athérogène (279, 280). Les gènes impliqués dans NAFLD dont les niveaux de la méthylation et d'expression ont été modifiés par la carence de donneurs de méthyle comprennent Rgn et FABP2, qui sont impliqués dans la résistance à l'insuline; ABCA1 et ACAT1, associé au métabolisme du cholestérol; GPAM et Agpat3, liés à la synthèse des triglycérides et Agtr1 et KLF6 qui sont impliquées dans la fibrose. Cette observation suggère que le MDD puisse conduire à la NAFLD. Cette hypothèse est en outre soutenue par le fait que le MDD modifie également l'expression, mais pas la méthylation de l'ADN, d'un autre ensemble de gènes liés à la stéatose hépatique non alcoolique, comme ENPP1, GCKR, PDK4, qui sont associés avec le métabolisme du glucose et la résistance à l'insuline, APOC3, APOE, qui jouent un rôle clé dans l'exportation des lipides et l'oxydation dans le foie, et SOD2 qui est impliqué dans le stress oxydatif. Tous ces résultats mettent en évidence l'influence de la MDD sur pathomécanismes épigénomiques de NAFLD.

L'expression de Dnmt3a est modifiée par l'alimentation MDD maternelle. Dnmt3a est nécessaire pour la méthylation *de novo* du génome et est essentiel pour l'établissement du pattern de méthylation de l'ADN au cours du développement (281). Les faibles niveaux de méthylation et augmentation de l'expression de Dnmt3a peuvent donc expliquer pourquoi le MDD modifie la méthylation de l'ADN, donc l'expression des gènes. L'expression de Dnmt3b et Dnmt1 a également montré une tendance à diminuer, mais pas significative (FC = 0,74 avec P = 0,11 et FC = 0,93 avec P = 0,45, respectivement). En outre, Dnmt3a est nécessaire pour préserver la méthylation des gènes soumis à l'empreinte (282). Bien que nous n'ayons pas trouvé de modification de la méthylation des 6 gènes soumis à l'empreinte chez le rat (Igf2, IGF2R, H19, RASGRF1, Sfbmt2 et Impact), nous avons observé la sous-expression d'Igf2 et la sur-expression d'IGF2R et d'Impact.

Comme prévu, nous avons trouvé une corrélation négative entre l'expression des gènes et la méthylation de l'ADN pour de nombreux gènes, comme Agtr1a, PSEN1 et Dnmt3a (Figure 25). Étonnamment, nous avons observé qu'il n'y a pas de corrélation directe entre la méthylation de l'ADN et l'expression des gènes en général. En fait, quand le MDD induit seulement des changements modestes dans la méthylation de l'ADN, il n'y a pas de changement correspondant

dans l'expression des gènes. Ceci indique que d'autres facteurs jouent des rôles plus importants que la méthylation sur l'expression des gènes. Ceux-ci pourraient être les modifications post-transcriptionnelles des histones et les facteurs de transcription. Un manque de correspondance entre la méthylation de l'ADN et l'expression des gènes a également été rapporté dans une étude récente sur les cellules pancréatiques de patients diabétiques (283). Cela pourrait s'expliquer par le fait que quelques cytosines méthylées peuvent inhiber un promoteur voisin mais que l'organisation d'une structure stable de la chromatine nécessiterait le dépassement d'un seuil de sites modifiés qui conduirait à l'inactivation des gènes (284).

Des études antérieures ont démontré que la carence en vitamine B12 et / ou folates diminue les niveaux de méthylation de l'ADN, mais nous avons trouvé de nombreux gènes avec des niveaux augmentés de méthylation de l'ADN au niveau de leurs régions promotrices après carence en donneurs de méthyle. Cette observation est en accord avec les résultats de Lambrot *et al.*, qui a également constaté que la carence en folates modifie l'épigénome du sperme de la souris, non seulement par la diminution de la méthylation de l'ADN, mais aussi en augmentant les niveaux de méthylation de certains gènes (160). En conclusion, notre étude montre que la carence en donneurs de méthyle affecte la méthylation de l'ADN d'une manière limitée, tandis que le transcriptome semble beaucoup plus affecté. Ceci suggère que les «master genes» modifiés aux deux niveaux peuvent jouer un rôle direct dans les pathologies associées aux MDD, tels que la NAFLD.

Les effets transgénérationnels de MDD pourraient expliquer si ces «master genes» ont une hérédité épigénétique. Lambrot *et al* ont révélé que la carence en folate paternelle pourrait modifier l'épigénome du sperme de la souris (160), et Padmanabhan N *et al* ont trouvé que la mutation dans le métabolisme du folate pourrait provoquer l'instabilité épigénétique et les effets transgénérationnels sur le développement (12). L'étude de l'expression et de l'état de méthylation de ces «master genes» dans la lignée de rats MDD pourrait déterminer si ces gènes sont impliqués dans l'effet transgénérationnel des MDD. Parce que trois générations à la fois sont exposées aux mêmes conditions environnementales, un changement épigénétique doit être observé dans la 4ème génération (190) afin de fournir des arguments convaincants pour l'hérédité épigénétique. D'autres analyses du transcriptome et du méthylome sur la lignée de rats MDD sont nécessaires pour répondre à cette question. Dans cette étude, nous démontrons que les changements d'expression des «master genes» peuvent induire des composantes de la NAFLD dans la génération G2. La démonstration d'une transmission épigénétique de la méthylation de ces gènes, permettrait de mettre en évidence un risque plus élevé de NAFLD

dans la génération G3. Les résultats du projet TransG fourniront peut-être la réponse à la question.

Partie 2 : Effets de la carence en protéines sur le transcriptome et le méthylome du foie de rats à 180 jours

L'objectif principal de cette étude a été d'établir les effets d'une carence en protéine sur la méthylation de l'ADN et sur l'expression des gènes. Nos résultats montrent que l'alimentation carencée en protéines pendant la gestation et l'allaitement ont résulté en un RCIU indiqué par le poids à la naissance significativement diminué mais avec une croissance de rattrapage postnatale, des perturbations métaboliques à l'âge adulte : hypertriglycémie, hypercholestérolémie, et une augmentation de la graisse abdominale (Tableau 13). Toutes ces observations sont cohérentes avec les études précédentes (109, 285-288).

Les changements épigénétiques, en particulier la méthylation de l'ADN, ont été proposés comme l'un des mécanismes sous-jacents de la programmation fœtale (104, 110, 276).

Les résultats de nos analyses de transcriptome et de méthylome montrent des altérations généralisées impliquées dans le métabolisme hépatique, tels que le métabolisme des lipides, montrant une bonne corrélation avec les troubles métaboliques (Figure 30-31, Tableau 14). De même, le processus d'entretien de la chromatine, la régulation du cycle cellulaire, tissulaire et le développement des organes sont altérés (Figure 32-33, Tableau 15). Des études antérieures ont également constaté les troubles de la régulation du métabolisme et du cycle cellulaire causée par le MPR (276, 289, 290).

Les « master genes » sont pour la plupart des kinases, des facteurs de croissance, des facteurs de transcription, et aussi des enzymes impliqués dans la méthylation de l'ADN et des Modifications Post-Transcriptionnelles (PTMs) des histones (Figure 32). Par exemple, High-mobility group box 1 (HMGB1), protéine liant l'ADN, est une cible moléculaire critique dans plusieurs maladies humaines y compris les troubles métaboliques. Elle influence la liaison, la courbature, la réplication, la réparation de l'ADN, la transcription génique, et la stabilité des nucléosomes (291). Un autre exemple est le récepteur aux androgènes (AR), un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes et affecte la prolifération et la différenciation cellulaire dans les tissus cibles. Via AR, les androgènes jouent un rôle essentiel dans la régulation de la distribution de la graisse corporelle chez l'homme (292). Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA), facteur de croissance, actif dans l'angiogenèse, la vasculogenèse et l'évolution de la croissance des cellules endothéliales, est essentiel pour le processus de développement et est liée à diverses maladies. De même la Lysine-Specific Demethylase 2A (KDM2A), l'Histone Deacetylase 1 (HDAC1), responsables de la méthylation et de

l'acétylation des histones, appartiennent aux « master genes » du modèle MPR. Enfin, la modification de certains gènes seulement au niveau du transcriptome peut également entraîner des changements dans d'autres gènes, tels que les modifications de PPARA, PPARG et PGC-1 α qui pourraient induire des modifications des gènes cibles en aval impliqués dans le métabolisme des lipides et d'autres aspects par la voie de signalisation PPAR. Ces gènes expliquent peut-être pourquoi il y a plus de gènes affectés dans le transcriptome que dans le méthylome.

D'autres facteurs que l'épigénomique influencent les programmes de développement (293), comme un retard de croissance de certains organes (131-136) ou l'excès de glucocorticoïdes (121, 137-141, 290). Enfin, certaines méthylations de l'ADN, ayant lieu à grande distance de la région promotrice, peuvent aussi influencer l'expression d'un gène (294).

Il est intéressant de constater qu'un bon nombre de ces « master genes » sont impliqués dans les troubles métaboliques (Figure 34). Par exemple, Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), une molécule d'adhésion transmembranaire impliquée dans la migration des leucocytes aux sites d'inflammation, est surexprimée dans les rats MPR, et plusieurs études antérieures chez l'homme ont identifié que son niveau élevé a été liée à l'adiposité abdominale (295), la résistance de l'insuline (296), le diabète de type II (297), l'athérosclérose coronarienne (298) et la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) (299). Chez la souris, un niveau élevé d'ICAM-1 soluble augmente le niveau d'adiposité (300). Endothelin 1 (ET-1), codé par le gène EDN1, est un vasoconstricteur puissant et agit comme un modulateur de la vasomotricité et le remodelage vasculaire (301), jouant un rôle important dans l'hypertension.

Bien que nécessitant une confirmation par d'autres études, ces découvertes soutiennent fortement l'hypothèse que les phénotypes physiologiques et métaboliques perturbés sont sous le contrôle de la génétique et de l'épigénétique de la programmation fœtale. Ces « master genes » pourraient être considérés comme des gènes prédictifs des pathologies métaboliques.

Partie 3: Programmation fœtale, « Gatekeeper genes » et « Master genes »

Le phénomène de la programmation fœtale par qui le stress intra-utérin est associé à des effets physiologiques et métaboliques à l'âge adulte est maintenant bien établi dans une variété d'espèces incluant l'homme.

L'étude de cohortes humaines a mis en évidence l'importance de l'alimentation du début de la vie (Dutch Famine 1944-1945) (103), la relation entre le poids à la naissance et la mort par maladie coronarienne, la pression artérielle, le diabète de type 2 et le syndrome métabolique (Hertfordshire de Barker 1910 et 1930) (302-305).

Les études expérimentales sur des animaux ont joué un rôle crucial dans la démonstration de la plausibilité biologique de l'hypothèse de la programmation fœtale et sont maintenant utilisées pour analyser ces phénomènes au niveau moléculaire. La fibrose du cœur et du foie sont observées chez les rats exposés à une carence en donneurs de méthyle pendant la phase périnatale (65, 126), l'hypertension artérielle est observée dans la descendance des rongeurs exposés à la restriction alimentaire maternelle (306), une restriction protéique (111), la carence en fer (307), une alimentation riche en graisses (308) et la ligature de l'artère utérine (309). De même dans ces modèles, on observe une altération de l'homéostasie du glucose, des déficiences rénales, une dyslipidémie (131, 310) et des troubles métaboliques.

Tout ceci démontre le phénomène de la programmation fœtale. Toutefois, les mécanismes sous-jacents ne sont pas élucidés. Il y a deux aspects à prendre en compte pour mieux comprendre des mécanismes de la programmation foetale. Tout d'abord il est important de comprendre les changements qui se produisent dans l'embryon, le fœtus ou le nouveau-né au moment du stress initial car ils seront les moteurs primaires du phénotype à l'âge adulte. Ensuite, il existe de nombreux changements secondaires entre les événements initiaux et la pathologie.

C'est dans ce dernier domaine que le plus grand nombre d'études animales sont disponibles. Le phénomène de remodelage tissulaire a surtout été étudié dans les reins (135, 311). Un régime faible en protéines pendant la gestation chez le rat, en particulier pendant les derniers stades de la gestation, se traduit par un rein de taille normale, mais avec une réduction (jusqu'à 30%) du nombre de néphrons. Les effets du stress nutritionnels sur la différenciation et de la prolifération d'organes sont sous la dépendance de facteurs endocrines comme par exemple les glucocorticoïdes (137).

Des modifications épigénétiques sont aussi un mécanisme important sous-jacent qui permet de répondre et s'adapter aux facteurs de stress environnementaux, y compris la modification nutritionnelle (143, 144). La supplémentation ou la limitation de l'alimentation de la mère pour un ensemble de facteurs alimentaires, comme le folate, la méthionine, ou la choline affectent la méthylation de l'ADN dans la progéniture (145, 146). La restriction en protéines pourrait aussi faciliter le développement d'une hypertension artérielle par modifications épigénétiques (110, 152). De la même façon, une méthylation différentielle a été aussi observée dans les gènes soumis à l'empreinte, comme le gène de l'IGF-2 chez l'homme (104, 105).

Les différents modèles de stress métaboliques conduisent à des effets similaires au niveau physiologique, moléculaire et pathologique. Ceci a donné naissance à l'hypothèse des « Gatekeeper genes » (163): quelques gènes essentiels seraient responsables de tous les phénomènes observés dans les différents modèles.

Les résultats que j'ai obtenus dans les modèles que j'ai étudiés durant ma thèse montrent qu'il existe bien un lien entre stress nutritionnel et effets physiologiques, moléculaires et pathologiques, même à la seconde génération. Ces effets sont visibles au niveau du méthylome et du transcriptome. Dans tous les modèles, le transcriptome est plus affecté que le méthylome, ce qui suggère que les effets sur le transcriptome sont majoritairement des effets indirects. Les gènes altérés aux deux niveaux semblent plutôt liés à des effets stables, ce qui nous a conduits à les qualifier de « Master genes ». Ces gènes semblent spécifiques d'un modèle particulier car seuls 29 « master genes » sont communs aux deux modèles (Tableau 20). Ils ne présentent pas d'annotations fonctionnelles significatives (Tableau 21) et leur modification d'expression n'est concordante que pour 14 gènes (Tableau 20). Ces gènes ne ressemblent pas à l'idée qu'on se fait des « gatekeeper genes ».

J'ai aussi montré qu'il existe des modifications similaires dans les différents modèles. La diminution du poids corporel, l'hypertriglycéridémie et l'augmentation des acides gras libres dans le sérum étaient tous observés dans les deux modèles, ce sont des caractères typiques des maladies métaboliques. Au niveau du transcriptome (Tableau 18, 22 et 24) : augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, des acides gras libres et des triglycérides, des fonctions mitochondriales. « KEGG pathway analysis » a montré que la voie de la signalisation de PPAR était influencée dans les deux modèles.

Il existe aussi des résultats différents dans les deux modèles: insuline inchangée dans le modèle MDD mais diminuée 2 fois dans le modèle MPR à la manière de signification marginale,

glucose diminué dans le modèle MDD mais pas dans MPR, cholestérol inchangé dans le modèle MDD mais augmenté dans le modèle MPR.

De même, chaque modèle touche des fonctions biologiques spécifiques: sous-expression du métabolisme du glucose dans le modèle MDD (Tableau 8) et sous-expression des gènes impliqués dans le processus du développement et différenciation des cellules par modifications des activités des kinases, modifications des histones et de l'ADN dans le modèle MPR (Tableau 14, Figure 32). Enfin, les deux modèles semblent conduire à des pathologies différentes: les « master genes » du modèle MDD semblent impliqués dans la NAFLD (Tableau 12), tandis que les « masters genes » du modèle MPR semblent plutôt impliqués dans le syndrome métabolique (Figure 34). Ces résultats indiquent que ces gènes pourraient être directement liés au modèle et à des pathologies spécifiques.

On peut donc imaginer que dans les modèles métaboliques que j'ai étudiés, des modifications similaires peuvent être observées avec augmentation du métabolisme lipidique, des acides gras des triglycérides, et des fonctions mitochondriales. Ces changements pourraient conduire à de l'hypertension, et être sous le contrôle des « gatekeeper genes » comme peut-être PPAR.

La déficience en donneurs de méthyles conduit à la sous-expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et à la stéatose hépatique, tandis qu'une alimentation faible en protéine se traduit par une diminution des modifications post-traductionnelles de l'ADN et des histones, et au syndrome métabolique. Ces événements seraient déterminés par des « master genes » spécifiques.

Le fait que chez l'homme ou dans certains modèles animaux, les différentes pathologies des NAFLD et du syndrome métabolique, sont souvent trouvées associées, reflèterait plus le fait que ces modèles affectent globalement le métabolisme, alors que nos études sont plus ciblées sur un aspect particulier du métabolisme.

Ces gènes seraient ainsi de bonnes cibles thérapeutiques spécifiques. Une analyse plus poussée des fonctions spécifiques à chacun des modèles devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés à chacune des pathologies.

Perspectives

Dans ce travail, j'ai montré qu'il existait des modifications du transcriptome et du méthylome communes aux deux modèles de stress métabolique probablement liées à l'expression de « gatekeeper genes », et aussi des modifications spécifiques lié à l'expression de « master genes ».

Des études complémentaires restent à réaliser pour approfondir ces idées.

Ces gènes (master ou gatekeeper) sont ils modifiés sur plusieurs générations ? Sont-ils soumis à l'empreinte parentale? Une partie de ces réponses sera peut-être obtenue lors de l'analyse des résultats du projet TransG.

Existe t-il des fonctions, des « master genes » et des pathologies spécifiques à d'autres modèles de stress nutritionnels ?

Nos résultats peuvent-ils être observés chez l'homme ?

Peut-on mieux caractériser les évènements communs ou spécifiques entre les deux modèles ? Ceci impliquera de réaliser des méta-analyses des données des deux modèles mais aussi des données publiques sur le sujet. Il faudra pour cela réaliser des analyses spécifiques aux évènements communs et aux évènements spécifiques, car l'existence d'annotations très fortes liées au métabolisme des lipides et au fonctionnement mitochondrial masque probablement des annotations (fonctions) plus subtiles.

Références Bibliographiques

1. Gueant JL, Namour F, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2013;24(6):279-89. doi: 10.1016/j.tem.2013.01.010.
2. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *Journal of inherited metabolic disease* 2011;34(1):75-81. doi: 10.1007/s10545-010-9177-4.
3. Smulders YM, Stehouwer CD. Folate metabolism and cardiovascular disease. *Seminars in vascular medicine* 2005;5(2):87-97. doi: 10.1055/s-2005-872395.
4. Galivan J, Ryan TJ, Chave K, Rhee M, Yao R, Yin D. Glutamyl hydrolase. pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacology & therapeutics* 2000;85(3):207-15.
5. Matherly LH, Goldman DI. Membrane transport of folates. *Vitamins and hormones* 2003;66:403-56.
6. Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular genetics and metabolism* 2000;71(1-2):121-38. doi: 10.1006/mgme.2000.3027.
7. Moat SJ, Doshi SN, Lang D, McDowell IF, Lewis MJ, Goodfellow J. Treatment of coronary heart disease with folic acid: is there a future? *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2004;287(1):H1-7. doi: 10.1152/ajpheart.00952.2003.
8. Bhaskar LV, Murthy J, Venkatesh Babu G. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Archives of oral biology* 2011;56(8):723-37. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.01.007.
9. Scott JM, Weir DG. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *Journal of cardiovascular risk* 1998;5(4):223-7.
10. Matthews RG, Ross J, Baugh CM, Cook JD, Davis L. Interactions of pig liver serine hydroxymethyltransferase with methyltetrahydropteroylpolyglutamate inhibitors and with tetrahydropteroylpolyglutamate substrates. *Biochemistry* 1982;21(6):1230-8.
11. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Human reproduction update* 2007;13(3):225-38. doi: 10.1093/humupd/dml063.
12. Padmanabhan N, Jia D, Geary-Joo C, Wu X, Ferguson-Smith AC, Fung E, Bieda MC, Snyder FF, Gravel RA, Cross JC, et al. Mutation in folate metabolism causes epigenetic instability and transgenerational effects on development. *Cell* 2013;155(1):81-93. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.002.
13. Oh R, Brown DL. Vitamin B12 deficiency. *American family physician* 2003;67(5):979-86.
14. Andres E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, Noblet-Dick M, Maloisel F, Schlienger JL, Blickle JF. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 2004;171(3):251-9.
15. Elia M. Oral or parenteral therapy for B12 deficiency. *Lancet* 1998;352(9142):1721-2. doi: 10.1016/S0140-6736(05)79821-4.
16. Albert MJ, Mathan VI, Baker SJ. Vitamin B12 synthesis by human small intestinal bacteria. *Nature* 1980;283(5749):781-2.
17. M. A. Immerman, Health Unlimited [archive]. 1989:62.
18. Rafnsson SB, Saravanan P, Bhopal RS, Yajnik CS. Is a low blood level of vitamin B12 a cardiovascular and diabetes risk factor? A systematic review of cohort studies. *European journal of nutrition* 2011;50(2):97-106. doi: 10.1007/s00394-010-0119-6.
19. Rosenberg IH. Metabolic programming of offspring by vitamin B12/folate imbalance during pregnancy. *Diabetologia* 2008;51(1):6-7. doi: 10.1007/s00125-007-0869-8.

20. Coelho D, Suormala T, Stucki M, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS, Newbold RF, Baumgartner MR, Fowler B. Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. *The New England journal of medicine* 2008;358(14):1454-64. doi: 10.1056/NEJMoa072200.
21. Allen LH. Folate and vitamin B12 status in the Americas. *Nutrition reviews* 2004;62(6 Pt 2):S29-33; discussion S4.
22. Masalha R, Rudoy I, Volkov I, Yusuf N, Wirguin I, Herishanu YO. Symptomatic dietary vitamin B(12) deficiency in a nonvegetarian population. *The American journal of medicine* 2002;112(5):413-6.
23. Guéant JL, F. Namour. Vitamin B12: Absorption, Metabolism and Deficiency. *Encyclopedia of Gastroenterology Elsevier* 2004.
24. Tanner SM, Li Z, Bisson R, Acar C, Oner C, Oner R, Cetin M, Abdelaal MA, Ismail EA, Lissens W, et al. Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B12: founder effects, consanguinity, and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East. *Human mutation* 2004;23(4):327-33. doi: 10.1002/humu.20014.
25. Andres E, Vogel T, Federici L, Zimmer J, Ciobanu E, Kaltenbach G. Cobalamin deficiency in elderly patients: a personal view. *Current gerontology and geriatrics research* 2008:848267. doi: 10.1155/2008/848267.
26. Andres E, Affenberger S, Vinzio S, Noel E, Kaltenbach G, Schlienger JL. [Cobalamin deficiencies in adults: update of etiologies, clinical manifestations and treatment]. *La Revue de medecine interne / fondee par la Societe nationale francaise de medecine interne* 2005;26(12):938-46. doi: 10.1016/j.revmed.2005.04.036.
27. Bosco C, Favrat B, Cheseaux M. [Vitamin B12 and iron deficiencies: from diagnostic to follow-up]. *Revue medicale suisse* 2012;8(346):1348-51.
28. Butz LW, Vincent du Vigneaud. The formation of a homologue of cystine by the decomposition of methionine with sulfuric acid. *Journal of Biological Chemistry* 1932;99:135-42.
29. Murphy MM, Fernandez-Ballart JD. Homocysteine in pregnancy. *Advances in clinical chemistry* 2011;53:105-37.
30. Nilsson TK, Bottiger AK, Henriquez P, Serra Majem L. MTHFR polymorphisms and serum cobalamin affect plasma homocysteine concentrations differentially in females and males. *Molecular medicine reports* 2014;10(5):2706-12. doi: 10.3892/mmr.2014.2521.
31. MacCoss MJ, Fukagawa NK, Matthews DE. Measurement of intracellular sulfur amino acid metabolism in humans. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2001;280(6):E947-55.
32. Morris MS. The role of B vitamins in preventing and treating cognitive impairment and decline. *Advances in nutrition* 2012;3(6):801-12. doi: 10.3945/an.112.002535.
33. Pajares MA, Perez-Sala D. Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism? *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2006;63(23):2792-803. doi: 10.1007/s00018-006-6249-6.
34. Shinohara M, Ji C, Kaplowitz N. Differences in betaine-homocysteine methyltransferase expression, endoplasmic reticulum stress response, and liver injury between alcohol-fed mice and rats. *Hepatology* 2010;51(3):796-805. doi: 10.1002/hep.23391.
35. Finkelstein JD, Harris BJ, Martin JJ, Kyle WE. Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary methionine. *Biochemical and biophysical research communications* 1982;108(1):344-8.
36. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *European journal of pediatrics* 1998;157 Suppl 2:S40-4.

37. Panayiotidis MI, Stabler SP, Ahmad A, Pappa A, Legros LH, Jr., Hernandez-Saavedra D, Schneider BK, Allen RH, Vasiliou V, McCord JM, et al. Activation of a novel isoform of methionine adenosyl transferase 2A and increased S-adenosylmethionine turnover in lung epithelial cells exposed to hyperoxia. *Free radical biology & medicine* 2006;40(2):348-58. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.004.
38. Cantoni L, Maggi G, Mononi G, Preti G. [Relations between protidopoiesis and biological transmethylations: action of S-adenosylmethionine on protein crisis in chronic hepatopathies]. *Minerva medica* 1975;66(33):1581-9.
39. Chen P, Poddar R, Tipa EV, Dibello PM, Moravec CD, Robinson K, Green R, Kruger WD, Garrow TA, Jacobsen DW. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Advances in enzyme regulation* 1999;39:93-109.
40. Obeid R, Herrmann W. Homocysteine and lipids: S-adenosyl methionine as a key intermediate. *FEBS letters* 2009;583(8):1215-25. doi: 10.1016/j.febslet.2009.03.038.
41. Vogel T, Dali-Youcef N, Kaltenbach G, Andres E. Homocysteine, vitamin B12, folate and cognitive functions: a systematic and critical review of the literature. *International journal of clinical practice* 2009;63(7):1061-7. doi: 10.1111/j.1742-1241.2009.02026.x.
42. Roblin X, Phelip JM, Genevois M, Ducros V, Bonaz B. Hyperhomocysteinemia is associated with osteoporosis in patients with Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2007;25(7):797-804. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03260.x.
43. Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 2005;29(7):1103-12. doi: 10.1016/j.pnpbp.2005.06.021.
44. Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clinical chemistry* 2000;46(8 Pt 1):1065-71.
45. Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *The American journal of clinical nutrition* 2001;73(3):613-21.
46. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, Heng HH, Rommens JM, Scherer SW, Rosenblatt DS, et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(6):3059-64.
47. Alessio AC, Hoehr NF, Siqueira LH, Bydlowski SP, Annichino-Bizzacchi JM. 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. *Thrombosis research* 2007;119(5):571-7. doi: 10.1016/j.thromres.2006.05.009.
48. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends in pharmacological sciences* 2001;22(4):195-201.
49. Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G. Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *Bmj* 2005;331(7524):1053. doi: 10.1136/bmj.38611.658947.55.
50. Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Gueant J. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2001;97(4):1092-8.

51. Boyles AL, Billups AV, Deak KL, Siegel DG, Mehlretter L, Slifer SH, Bassuk AG, Kessler JA, Reed MC, Nijhout HF, et al. Neural tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions. *Environmental health perspectives* 2006;114(10):1547-52.
52. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1993;270(22):2693-8.
53. Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *European journal of clinical investigation* 1992;22(2):79-87.
54. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto JM, Taylor LM, Jr. 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):873-81.
55. Dekker M. *Principles of Polymer Science and Technology in Cosmetics and Personal Care*. 1992:183.
56. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1989;114(5):473-501.
57. De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacological reviews* 2002;54(4):599-618.
58. Iyer R, Tomar SK. Folate: a functional food constituent. *Journal of food science* 2009;74(9):R114-22. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01359.x.
59. Scalabrino G. The multi-faceted basis of vitamin B12 (cobalamin) neurotrophism in adult central nervous system: Lessons learned from its deficiency. *Progress in neurobiology* 2009;88(3):203-20. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.04.004.
60. Gochard A, Mondon K, De Toffol B, Autret A. [Vitamin B12 deficiency and neurological disorders: a case report and literature review]. *Revue neurologique* 2009;165(12):1095-8. doi: 10.1016/j.neurol.2008.12.004.
61. Ciaccio M, Bellia C. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular risk: effect of vitamin supplementation in risk reduction. *Current clinical pharmacology* 2010;5(1):30-6.
62. Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2005;3(8):1646-54. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01364.x.
63. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacology & therapeutics* 1997;73(3):265-80.
64. Halsted CH, Villanueva J, Chandler CJ, Stabler SP, Allen RH, Muskhelishvili L, James SJ, Poirier L. Ethanol feeding of micropigs alters methionine metabolism and increases hepatocellular apoptosis and proliferation. *Hepatology* 1996;23(3):497-505. doi: 10.1002/hep.510230314.
65. Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, Giudicelli J, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Jeannesson E, Gueguen N, Bressenot A, Nicolas B, et al. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1alpha hypomethylation and decreased ER-alpha, ERR-alpha, and HNF-4alpha in the rat liver. *Journal of hepatology* 2012;57(2):344-51. doi: 10.1016/j.jhep.2012.03.028.
66. Henderson GI, Perez T, Schenker S, Mackins J, Antony AC. Maternal-to-fetal transfer of 5-methyltetrahydrofolate by the perfused human placental cotyledon: evidence for a concentrative role by placental folate receptors in fetal folate delivery. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1995;126(2):184-203.

67. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *The American journal of clinical nutrition* 2000;71(5 Suppl):1295S-303S.
68. Mantovani E, Filippini F, Bortolus R, Franchi M. Folic acid supplementation and preterm birth: results from observational studies. *BioMed research international* 2014;2014:481914. doi: 10.1155/2014/481914.
69. George L, Mills JL, Johansson AL, Nordmark A, Olander B, Granath F, Cnattingius S. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2002;288(15):1867-73.
70. Barkai G, Arbuzova S, Berkenstadt M, Heifetz S, Cuckle H. Frequency of Down's syndrome and neural-tube defects in the same family. *Lancet* 2003;361(9366):1331-5. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13080-2.
71. Hague WM. Homocysteine and pregnancy. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 2003;17(3):459-69.
72. Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *The Journal of nutritional biochemistry* 1999;10(2):66-88.
73. Kim YI, Fawaz K, Knox T, Lee YM, Norton R, Arora S, Paiva L, Mason JB. Colonic mucosal concentrations of folate correlate well with blood measurements of folate status in persons with colorectal polyps. *The American journal of clinical nutrition* 1998;68(4):866-72.
74. Meenan J, O'Hallinan E, Scott J, Weir DG. Epithelial cell folate depletion occurs in neoplastic but not adjacent normal colon mucosa. *Gastroenterology* 1997;112(4):1163-8.
75. Wang TP, Hsu SH, Feng HC, Huang RF. Folate deprivation enhances invasiveness of human colon cancer cells mediated by activation of sonic hedgehog signaling through promoter hypomethylation and cross action with transcription nuclear factor-kappa B pathway. *Carcinogenesis* 2012;33(6):1158-68. doi: 10.1093/carcin/bgs138.
76. Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2007;121(4):856-62. doi: 10.1002/ijc.22717.
77. Lewis SJ, Harbord RM, Harris R, Smith GD. Meta-analyses of observational and genetic association studies of folate intakes or levels and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 2006;98(22):1607-22. doi: 10.1093/jnci/djj440.
78. Schernhammer E, Wolpin B, Rifai N, Cochrane B, Manson JA, Ma J, Giovannucci E, Thomson C, Stampfer MJ, Fuchs C. Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, and homocysteine and pancreatic cancer risk in four large cohorts. *Cancer research* 2007;67(11):5553-60. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4463.
79. Vollset SE, Igland J, Jenab M, Fredriksen A, Meyer K, Eussen S, Gjessing HK, Ueland PM, Pera G, Sala N, et al. The association of gastric cancer risk with plasma folate, cobalamin, and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2007;16(11):2416-24. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0256.
80. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate intake, MTHFR polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2006;131(4):1271-83. doi: 10.1053/j.gastro.2006.08.010.
81. Voorrips LE, Goldbohm RA, Brants HA, van Poppel GA, Sturmans F, Hermus RJ, van den Brandt PA. A prospective cohort study on antioxidant and folate intake and male lung cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2000;9(4):357-65.

82. Ragasudha PN, Thulaseedharan JV, Wesley R, Jayaprakash PG, Lalitha P, Pillai MR. A case-control nutrigenomic study on the synergistic activity of folate and vitamin B12 in cervical cancer progression. *Nutrition and cancer* 2012;64(4):550-8. doi: 10.1080/01635581.2012.675618.
83. Stéphane Lecleire. Digestion et absorption des nutriments. *Cah Nutr Diét* 2008;43:1.
84. Martens EA, Westerterp-Plantenga MS. Protein diets, body weight loss and weight maintenance. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2014;17(1):75-9. doi: 10.1097/MCO.0000000000000006.
85. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of a Food and Agriculture Organization Expert Consultation 2013. Report No. 92.
86. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Speizer FE, Hennekens CH, Willett WC. Dietary protein and risk of ischemic heart disease in women. *The American journal of clinical nutrition* 1999;70(2):221-7.
87. Stolzenberg-Solomon RZ, Miller ER, 3rd, Maguire MG, Selhub J, Appel LJ. Association of dietary protein intake and coffee consumption with serum homocysteine concentrations in an older population. *The American journal of clinical nutrition* 1999;69(3):467-75.
88. Mann NJ, Li D, Sinclair AJ, Dudman NP, Guo XW, Elsworth GR, Wilson AK, Kelly FD. The effect of diet on plasma homocysteine concentrations in healthy male subjects. *European journal of clinical nutrition* 1999;53(11):895-9.
89. Mezzano D, Munoz X, Martinez C, Cuevas A, Panes O, Aranda E, Guasch V, Strobel P, Munoz B, Rodriguez S, et al. Vegetarians and cardiovascular risk factors: hemostasis, inflammatory markers and plasma homocysteine. *Thrombosis and haemostasis* 1999;81(6):913-7.
90. Obarzanek E, Velletri PA, Cutler JA. Dietary protein and blood pressure. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1996;275(20):1598-603.
91. Burke V, Hodgson JM, Beilin LJ, Giangiulioi N, Rogers P, Puddey IB. Dietary protein and soluble fiber reduce ambulatory blood pressure in treated hypertensives. *Hypertension* 2001;38(4):821-6.
92. Klag MJ, Whelton PK. The decline in stroke mortality. An epidemiologic perspective. *Annals of epidemiology* 1993;3(5):571-5.
93. Kinjo Y, Beral V, Akiba S, Key T, Mizuno S, Appleby P, Yamaguchi N, Watanabe S, Doll R. Possible protective effect of milk, meat and fish for cerebrovascular disease mortality in Japan. *Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association* 1999;9(4):268-74.
94. O'Dea K. Marked improvement in carbohydrate and lipid metabolism in diabetic Australian aborigines after temporary reversion to traditional lifestyle. *Diabetes* 1984;33(6):596-603.
95. O'Dea K, Traianedes K, Ireland P, Niall M, Sadler J, Hopper J, De Luise M. The effects of diet differing in fat, carbohydrate, and fiber on carbohydrate and lipid metabolism in type II diabetes. *Journal of the American Dietetic Association* 1989;89(8):1076-86.
96. Wolfe BM, Giovannetti PM. Short-term effects of substituting protein for carbohydrate in the diets of moderately hypercholesterolemic human subjects. *Metabolism: clinical and experimental* 1991;40(4):338-43.
97. Wolfe BM, Giovannetti PM. High protein diet complements resin therapy of familial hypercholesterolemia. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale* 1992;15(4):349-59.
98. Wolfe BM, Piche LA. Replacement of carbohydrate by protein in a conventional-fat diet reduces cholesterol and triglyceride concentrations in healthy normolipidemic subjects. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale* 1999;22(4):140-8.

99. Piatti PM, Monti F, Fermo I, Baruffaldi L, Nasser R, Santambrogio G, Librenti MC, Galli-Kienle M, Pontiroli AE, Pozza G. Hypocaloric high-protein diet improves glucose oxidation and spares lean body mass: comparison to hypocaloric high-carbohydrate diet. *Metabolism: clinical and experimental* 1994;43(12):1481-7.
100. Layman DK. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *The Journal of nutrition* 2003;133(1):261S-7S.
101. Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MP, Nijs I, van Ooijen M, Kovacs EM. High protein intake sustains weight maintenance after body weight loss in humans. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 2004;28(1):57-64. doi: 10.1038/sj.ijo.0802461.
102. Johnston CS, Tjonn SL, Swan PD. High-protein, low-fat diets are effective for weight loss and favorably alter biomarkers in healthy adults. *The Journal of nutrition* 2004;134(3):586-91.
103. Lumey LH, Stein AD, Kahn HS, van der Pal-de Bruin KM, Blauw GJ, Zybert PA, Susser ES. Cohort profile: the Dutch Hunger Winter families study. *International journal of epidemiology* 2007;36(6):1196-204. doi: 10.1093/ije/dym126.
104. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105(44):17046-9. doi: 10.1073/pnas.0806560105.
105. Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD, Slagboom PE, Heijmans BT. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Human molecular genetics* 2009;18(21):4046-53. doi: 10.1093/hmg/ddp353.
106. R O-S. Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. *PloS one* 2010;5(10). doi: 10.1371/journal.pone.0013537.t001.
107. Zambrano E, Bautista CJ, Deas M, Martinez-Samayoa PM, Gonzalez-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *The Journal of physiology* 2006;571(Pt 1):221-30. doi: 10.1113/jphysiol.2005.100313.
108. Carr SK, Chen JH, Cooper WN, Constanica M, Yeo GS, Ozanne SE. Maternal diet amplifies the hepatic aging trajectory of Cidea in male mice and leads to the development of fatty liver. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2014;28(5):2191-201. doi: 10.1096/fj.13-242727.
109. Erhuma A, Salter AM, Sculley DV, Langley-Evans SC, Bennett AJ. Prenatal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2007;292(6):E1702-14. doi: 10.1152/ajpendo.00605.2006.
110. Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJ. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circulation research* 2007;100(4):520-6. doi: 10.1161/01.RES.0000258855.60637.58.
111. McMullen S, Langley-Evans SC. Maternal low-protein diet in rat pregnancy programs blood pressure through sex-specific mechanisms. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2005;288(1):R85-90. doi: 10.1152/ajpregu.00435.2004.
112. Belluscio LM, Berardino BG, Ferroni NM, Ceruti JM, Canepa ET. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes

- anxiety and depressive-like behaviors. *Physiology & behavior* 2014;129:237-54. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.02.051.
113. Keith M Godfrey DJB. <Fetal nutrition and adult disease.pdf>. *The American journal of clinical nutrition* 2000;71(suppl):1344S–52S.
 114. Li Y, Gonzalez P, Zhang L. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: mechanisms and possible interventions. *Progress in neurobiology* 2012;98(2):145-65. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.010.
 115. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993;341(8850):938-41.
 116. Barker DJ, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. *Annals of human biology* 2009;36(5):445-58. doi: 10.1080/03014460902980295.
 117. Cottrell EC, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Frontiers in behavioral neuroscience* 2009;3:19. doi: 10.3389/neuro.08.019.2009.
 118. Dudley KJ, Li X, Kobor MS, Kippin TE, Bredy TW. Epigenetic mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2011;35(7):1544-51. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.12.016.
 119. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004;305(5691):1733-6. doi: 10.1126/science.1095292.
 120. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England journal of medicine* 2008;359(1):61-73. doi: 10.1056/NEJMra0708473.
 121. Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Hormones and behavior* 2011;59(3):279-89. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.06.007.
 122. Bloch J, Scherrer U, Sartori C. [Fetal programming: an underestimated risk factor for cardiovascular and metabolic diseases]. *Revue medicale suisse* 2007;3(131):2483-4, 6-8.
 123. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *International journal of epidemiology* 2002;31(6):1235-9.
 124. Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Levy R. [Developmental origins of health and disease in adults: role of maternal environment]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité* 2012;40(9):517-9. doi: 10.1016/j.gyobfe.2012.07.010.
 125. Chavatte-Palmer P, Al Gubory K, Picone O, Heyman Y. [Maternal nutrition: effects on offspring fertility and importance of the periconceptional period on long-term development]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité* 2008;36(9):920-9. doi: 10.1016/j.gyobfe.2008.06.020.
 126. Garcia MM, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Gueguen N, Marie PY, Lacolley P, et al. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. *The Journal of pathology* 2011;225(3):324-35. doi: 10.1002/path.2881.
 127. Edwards LJ, McMillen IC. Periconceptional nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2002;283(3):R669-79. doi: 10.1152/ajpregu.00736.2001.
 128. Kumarasamy V, Mitchell MD, Bloomfield FH, Oliver MH, Campbell ME, Challis JR, Harding JE. Effects of periconceptional undernutrition on the initiation of parturition in sheep. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2005;288(1):R67-72. doi: 10.1152/ajpregu.00357.2004.

129. Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 2000;127(19):4195-202.
130. McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptual and foetal nutrition. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2008;102(2):82-9. doi: 10.1111/j.1742-7843.2007.00188.x.
131. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological reviews* 2005;85(2):571-633. doi: 10.1152/physrev.00053.2003.
132. Bertin E, Gangnerau MN, Bellon G, Bailbe D, Arbelot De Vacqueur A, Portha B. Development of beta-cell mass in fetuses of rats deprived of protein and/or energy in last trimester of pregnancy. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2002;283(3):R623-30. doi: 10.1152/ajpregu.00037.2002.
133. Bertin E, Gangnerau MN, Bailbe D, Portha B. Glucose metabolism and beta-cell mass in adult offspring of rats protein and/or energy restricted during the last week of pregnancy. *The American journal of physiology* 1999;277(1 Pt 1):E11-7.
134. Garofano A, Czernichow P, Breant B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* 1997;40(10):1231-4. doi: 10.1007/s001250050812.
135. Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life sciences* 1999;64(11):965-74.
136. Sundgren NC, Giraud GD, Schultz JM, Lasarev MR, Stork PJ, Thornburg KL. Extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositol-3 kinase mediate IGF-1 induced proliferation of fetal sheep cardiomyocytes. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2003;285(6):R1481-9. doi: 10.1152/ajpregu.00232.2003.
137. Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* 2001;142(5):1692-702. doi: 10.1210/endo.142.5.8139.
138. Dwyer CM, Stickland NC. The effects of maternal undernutrition on maternal and fetal serum insulin-like growth factors, thyroid hormones and cortisol in the guinea pig. *Journal of developmental physiology* 1992;18(6):303-13.
139. Langley-Evans SC. Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids. *Life sciences* 1997;60(15):1213-21.
140. Gardner DS, Jackson AA, Langley-Evans SC. The effect of prenatal diet and glucocorticoids on growth and systolic blood pressure in the rat. *The Proceedings of the Nutrition Society* 1998;57(2):235-40.
141. Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism* 2007;3(6):479-88. doi: 10.1038/ncpendmet0515.
142. Cederroth CR, Vassalli JD, Nef S. [Of epigenetics and development]. *Revue medicale suisse* 2007;3(100):528, 30-2.
143. Jang H, Serra C. Nutrition, epigenetics, and diseases. *Clinical nutrition research* 2014;3(1):1-8. doi: 10.7762/cnr.2014.3.1.1.
144. Vickers MH. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients* 2014;6(6):2165-78. doi: 10.3390/nu6062165.
145. Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J, Thurston A, Huntley JF, Rees WD, Maloney CA, et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptual B vitamin and

- methionine status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(49):19351-6. doi: 10.1073/pnas.0707258104.
146. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *The Journal of nutrition* 2005;135(6):1382-6.
 147. Wolffe AP. Packaging principle: how DNA methylation and histone acetylation control the transcriptional activity of chromatin. *The Journal of experimental zoology* 1998;282(1-2):239-44.
 148. Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Human molecular genetics* 2006;15 Spec No 1:R95-101. doi: 10.1093/hmg/ddl095.
 149. Gicquel C, El-Osta A, Le Bouc Y. Epigenetic regulation and fetal programming. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2008;22(1):1-16. doi: 10.1016/j.beem.2007.07.009.
 150. MacLennan NK, James SJ, Melnyk S, Piroozzi A, Jernigan S, Hsu JL, Janke SM, Pham TD, Lane RH. Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiological genomics* 2004;18(1):43-50. doi: 10.1152/physiolgenomics.00042.2004.
 151. Vanhees K, Vonhogen IG, van Schooten FJ, Godschalk RW. You are what you eat, and so are your children: the impact of micronutrients on the epigenetic programming of offspring. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2014;71(2):271-85. doi: 10.1007/s00018-013-1427-9.
 152. Nuyt AM, Szyf M. Developmental programming through epigenetic changes. *Circulation research* 2007;100(4):452-5. doi: 10.1161/01.RES.0000260292.95612.ac.
 153. Gong L, Pan YX, Chen H. Gestational low protein diet in the rat mediates Igf2 gene expression in male offspring via altered hepatic DNA methylation. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 2010;5(7):619-26.
 154. Liu HW, Mahmood S, Srinivasan M, Smiraglia DJ, Patel MS. Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. *The Journal of nutritional biochemistry* 2013;24(11):1859-69. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.05.002.
 155. Li CC, Young PE, Maloney CA, Eaton SA, Cowley MJ, Buckland ME, Preiss T, Henstridge DC, Cooney GJ, Febbraio MA, et al. Maternal obesity and diabetes induces latent metabolic defects and widespread epigenetic changes in isogenic mice. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 2013;8(6):602-11. doi: 10.4161/epi.24656.
 156. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007;128(4):669-81. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.033.
 157. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature reviews Genetics* 2007;8(4):253-62. doi: 10.1038/nrg2045.
 158. Aiken CE, Ozanne SE. Transgenerational developmental programming. *Human reproduction update* 2014;20(1):63-75. doi: 10.1093/humupd/dmt043.
 159. Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology* 2011;152(6):2228-36. doi: 10.1210/en.2010-1461.
 160. Lambrot R, Xu C, Saint-Phar S, Chountalos G, Cohen T, Paquet M, Suderman M, Hallett M, Kimmins S. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nature communications* 2013;4:2889. doi: 10.1038/ncomms3889.

161. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience* 2004;7(8):847-54. doi: 10.1038/nn1276.
162. Ozanne SE. Metabolic programming in animals. *British medical bulletin* 2001;60:143-52.
163. McMullen S, Langley-Evans SC, Gambling L, Lang C, Swali A, McArdle HJ. A common cause for a common phenotype: the gatekeeper hypothesis in fetal programming. *Medical hypotheses* 2012;78(1):88-94. doi: 10.1016/j.mehy.2011.09.047.
164. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. J.D. Watson and F.H.C. Crick. Published in *Nature*, number 4356 April 25, 1953. *Nature* 1974;248(5451):765.
165. Nirenberg M, Leder P, Bernfield M, Brimacombe R, Trupin J, Rottman F, O'Neal C. RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1965;53(5):1161-8.
166. Fiers W, Contreras R, De Wachter R, Haegeman G, Merregaert J, Jou WM, Vandenberghe A. Recent progress in the sequence determination of bacteriophage MS2 RNA. *Biochimie* 1971;53(4):495-506.
167. Gerstein MB, Bruce C, Rozowsky JS, Zheng D, Du J, Korbel JO, Emanuelsson O, Zhang ZD, Weissman S, Snyder M. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Res* 2007;17(6):669-81. doi: 10.1101/gr.6339607.
168. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1992;24:104-8.
169. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270(5235):467-70.
170. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* 1975;98(3):503-17.
171. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-11. doi: 10.1038/35000501.
172. Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Loriod B, Bachelart L, Montfort J, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004;23(7):1377-91. doi: 10.1038/sj.onc.1207262.
173. Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, Cheng CL, Wang CH, Terng HJ, Kao SF, et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* 2007;356(1):11-20. doi: 10.1056/NEJMoa060096.
174. Wasserman WW, Sandelin A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nature reviews Genetics* 2004;5(4):276-87. doi: 10.1038/nrg1315.
175. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews Genetics* 2002;3(6):415-28. doi: 10.1038/nrg816.
176. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403(6765):41-5. doi: 10.1038/47412.
177. Bannister AJ, Kouzarides T. Reversing histone methylation. *Nature* 2005;436(7054):1103-6. doi: 10.1038/nature04048.
178. Kouzarides T. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell* 2007;131(4):822. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.005.
179. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* 2002;16(1):6-21. doi: 10.1101/gad.947102.

180. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429(6990):457-63. doi: 10.1038/nature02625.
181. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90(24):11995-9.
182. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 2003;33 Suppl:245-54. doi: 10.1038/ng1089.
183. Lindsey JC, Anderton JA, Lusher ME, Clifford SC. Epigenetic events in medulloblastoma development. *Neurosurgical focus* 2005;19(5):E10.
184. Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends in genetics : TIG* 2012;28(1):33-42. doi: 10.1016/j.tig.2011.09.004.
185. Hatchwell E, Gready JM. The potential role of epigenomic dysregulation in complex human disease. *Trends in genetics : TIG* 2007;23(11):588-95. doi: 10.1016/j.tig.2007.08.010.
186. Gut P, Verdin E. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature* 2013;502(7472):489-98. doi: 10.1038/nature12752.
187. Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deas M, Guillen L, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Larrea F, Nathanielsz PW. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *The Journal of physiology* 2005;566(Pt 1):225-36. doi: 10.1113/jphysiol.2005.086462.
188. Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *European journal of human genetics : EJHG* 2002;10(11):682-8. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200859.
189. Rehan VK, Liu J, Naeem E, Tian J, Sakurai R, Kwong K, Akbari O, Torday JS. Perinatal nicotine exposure induces asthma in second generation offspring. *BMC medicine* 2012;10:129. doi: 10.1186/1741-7015-10-129.
190. Skinner MK. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reproductive toxicology* 2008;25(1):2-6. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.09.001.
191. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature reviews Genetics* 2008;9(6):465-76. doi: 10.1038/nrg2341.
192. Fontaine JF, Mirebeau-Prunier D, Raharijaona M, Franc B, Triaux S, Rodien P, Goeau-Brissonniere O, Karayan-Tapon L, Mello M, Houlgatte R, et al. Increasing the number of thyroid lesions classes in microarray analysis improves the relevance of diagnostic markers. *PloS one* 2009;4(10):e7632. doi: 10.1371/journal.pone.0007632.
193. Baron D, Dubois E, Bihoue A, Teusan R, Steenman M, Jourdon P, Magot A, Pereon Y, Veitia R, Savagner F, et al. Meta-analysis of muscle transcriptome data using the MADMuscle database reveals biologically relevant gene patterns. *BMC genomics* 2011;12:113. doi: 10.1186/1471-2164-12-113.
194. Baron D, Magot A, Ramstein G, Steenman M, Fayet G, Chevalier C, Jourdon P, Houlgatte R, Savagner F, Pereon Y. Immune response and mitochondrial metabolism are commonly deregulated in DMD and aging skeletal muscle. *PloS one* 2011;6(11):e26952. doi: 10.1371/journal.pone.0026952.
195. Shinde K, Phatak M, Johannes FM, Chen J, Li Q, Vineet JK, Hu Z, Ghosh K, Meller J, Medvedovic M. Genomics Portals: integrative web-platform for mining genomics data. *BMC genomics* 2010;11:27. doi: 10.1186/1471-2164-11-27.
196. Jansen RC, Nap JP. Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends in genetics : TIG* 2001;17(7):388-91.
197. Gress TM, Hoheisel JD, Lennon GG, Zehetner G, Lehrach H. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from

- whole tissues. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 1992;3(11):609-19.
198. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nature genetics* 1999;23(1):41-6. doi: 10.1038/12640.
 199. Huang TH, Perry MR, Laux DE. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Human molecular genetics* 1999;8(3):459-70.
 200. Yan PS, Chen CM, Shi H, Rahmatpanah F, Wei SH, Caldwell CW, Huang TH. Dissecting complex epigenetic alterations in breast cancer using CpG island microarrays. *Cancer research* 2001;61(23):8375-80.
 201. Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(13):8695-700. doi: 10.1073/pnas.082249499.
 202. Ren B, Robert F, Wyrick JJ, Aparicio O, Jennings EG, Simon I, Zeitlinger J, Schreiber J, Hannett N, Kanin E, et al. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 2000;290(5500):2306-9. doi: 10.1126/science.290.5500.2306.
 203. Iyer VR, Horak CE, Scafe CS, Botstein D, Snyder M, Brown PO. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* 2001;409(6819):533-8. doi: 10.1038/35054095.
 204. Hurowitz EH, Brown PO. Genome-wide analysis of mRNA lengths in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome biology* 2003;5(1):R2. doi: 10.1186/gb-2003-5-1-r2.
 205. Penn SG, Rank DR, Hanzel DK, Barker DL. Mining the human genome using microarrays of open reading frames. *Nature genetics* 2000;26(3):315-8. doi: 10.1038/81613.
 206. Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, Richman DD, Morris D, Hubbell E, Chee M, et al. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nature medicine* 1996;2(7):753-9.
 207. Lin B, Wang Z, Vora GJ, Thornton JA, Schnur JM, Thach DC, Blaney KM, Ligler AG, Malanoski AP, Santiago J, et al. Broad-spectrum respiratory tract pathogen identification using resequencing DNA microarrays. *Genome Res* 2006;16(4):527-35. doi: 10.1101/gr.4337206.
 208. Nguyen C, Rocha D, Granjeaud S, Baldit M, Bernard K, Naquet P, Jordan BR. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics* 1995;29(1):207-16. doi: 10.1006/geno.1995.1233.
 209. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature genetics* 1998;20(2):207-11. doi: 10.1038/2524.
 210. Ramakrishnan R, Dorris D, Lublinsky A, Nguyen A, Domanus M, Prokhorova A, Gieser L, Touma E, Lockner R, Tata M, et al. An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications. *Nucleic acids research* 2002;30(7):e30.
 211. Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature biotechnology* 2001;19(4):342-7. doi: 10.1038/86730.
 212. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, et al. Expression monitoring by hybridization to high-

- density oligonucleotide arrays. *Nature biotechnology* 1996;14(13):1675-80. doi: 10.1038/nbt1296-1675.
213. Gunderson KL, Kruglyak S, Graige MS, Garcia F, Kermani BG, Zhao C, Che D, Dickinson T, Wickham E, Bierle J, et al. Decoding randomly ordered DNA arrays. *Genome Res* 2004;14(5):870-7. doi: 10.1101/gr.2255804.
 214. Ginsberg SD. RNA amplification strategies for small sample populations. *Methods* 2005;37(3):229-37. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.09.003.
 215. Paris PL. A whole-genome amplification protocol for a wide variety of DNAs, including those from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Methods in molecular biology* 2009;556:89-98. doi: 10.1007/978-1-60327-192-9_7.
 216. Adams MD, Soares MB, Kerlavage AR, Fields C, Venter JC. Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nature genetics* 1993;4(4):373-80. doi: 10.1038/ng0893-373.
 217. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995;270(5235):484-7.
 218. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992;257(5072):967-71.
 219. Frey BJ, Mohammad N, Morris QD, Zhang W, Robinson MD, Mnaimneh S, Chang R, Pan Q, Sat E, Rossant J, et al. Genome-wide analysis of mouse transcripts using exon microarrays and factor graphs. *Nature genetics* 2005;37(9):991-6. doi: 10.1038/ng1630.
 220. Clark TA, Schweitzer AC, Chen TX, Staples MK, Lu G, Wang H, Williams A, Blume JE. Discovery of tissue-specific exons using comprehensive human exon microarrays. *Genome biology* 2007;8(4):R64. doi: 10.1186/gb-2007-8-4-r64.
 221. Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101(26):9740-4. doi: 10.1073/pnas.0403293101.
 222. Yin JQ, Zhao RC, Morris KV. Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends in biotechnology* 2008;26(2):70-6. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.11.007.
 223. Orlando V, Paro R. Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 1993;75(6):1187-98.
 224. Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 2004;303(5662):1378-81. doi: 10.1126/science.1089769.
 225. Antequera F, Bird A. CpG islands. *Exs* 1993;64:169-85.
 226. Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, Gerber GK, Hannett NM, Harbison CT, Thompson CM, Simon I, et al. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 2002;298(5594):799-804. doi: 10.1126/science.1075090.
 227. van Steensel B, Henikoff S. Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase. *Nature biotechnology* 2000;18(4):424-8. doi: 10.1038/74487.
 228. Bulyk ML, Gentalen E, Lockhart DJ, Church GM. Quantifying DNA-protein interactions by double-stranded DNA arrays. *Nature biotechnology* 1999;17(6):573-7. doi: 10.1038/9878.
 229. Ching TT, Maunakea AK, Jun P, Hong C, Zardo G, Pinkel D, Albertson DG, Fridlyand J, Mao JH, Shchors K, et al. Epigenome analyses using BAC microarrays identify evolutionary conservation of tissue-specific methylation of SHANK3. *Nature genetics* 2005;37(6):645-51. doi: 10.1038/ng1563.

230. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schubeler D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature genetics* 2005;37(8):853-62. doi: 10.1038/ng1598.
231. Yang YH, Speed T. Design issues for cDNA microarray experiments. *Nature reviews Genetics* 2002;3(8):579-88. doi: 10.1038/nrg863.
232. Kreil DP, Russell RR. There is no silver bullet--a guide to low-level data transforms and normalisation methods for microarray data. *Briefings in bioinformatics* 2005;6(1):86-97.
233. de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics* 2004;20(9):1453-4. doi: 10.1093/bioinformatics/bth078.
234. Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* 2004;20(17):3246-8. doi: 10.1093/bioinformatics/bth349.
235. Wang J, Zhang Y, Xu K, Mao X, Xue L, Liu X, Yu H, Chen L, Chu X. Genome-wide screen of DNA methylation changes induced by low dose X-ray radiation in mice. *PLoS one* 2014;9(3):e90804. doi: 10.1371/journal.pone.0090804.
236. Tarry-Adkins JL, Chen JH, Jones RH, Smith NH, Ozanne SE. 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 journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010;24(8):2762-71. doi: 10.1096/fj.10-156075.
237. Burdge GC, Lillycrop KA, Phillips ES, Slater-Jefferies JL, Jackson AA, Hanson MA. Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. *The Journal of nutrition* 2009;139(6):1054-60. doi: 10.3945/jn.109.104653.
238. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. *American journal of obstetrics and gynecology* 2007;196(6):555 e1-7. doi: 10.1016/j.ajog.2006.11.036.
239. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, Johnson DS, Trivett MK, Etemadmoghadam D, Locandro B, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14(16):5198-208. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0196.
240. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* 2000;25(1):25-9. doi: 10.1038/75556.
241. Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, Sunshine M, Narasimhan S, Kane DW, Reinhold WC, Lababidi S, et al. GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome biology* 2003;4(4):R28.
242. Okuda S, Yamada T, Hamajima M, Itoh M, Katayama T, Bork P, Goto S, Kanehisa M. KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways. *Nucleic acids research* 2008;36(Web Server issue):W423-6. doi: 10.1093/nar/gkn282.
243. Chen Y, Chen Y, Zhao L, Chen Y, Mei M, Li Q, Huang A, Varghese Z, Moorhead JF, Ruan XZ. Inflammatory stress exacerbates hepatic cholesterol accumulation via disrupting cellular cholesterol export. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2012;27(5):974-84. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06986.x.
244. Liao YJ, Chen TL, Lee TS, Wang HA, Wang CK, Liao LY, Liu RS, Huang SF, Chen YM. Glycine N-methyltransferase deficiency affects Niemann-Pick type C2 protein stability and regulates hepatic cholesterol homeostasis. *Molecular medicine* 2012;18:412-22. doi: 10.2119/molmed.2011.00258.

245. Ueta CB, Fernandes GW, Capelo LP, Fonseca TL, Maculan FD, Gouveia CH, Brum PC, Christoffolete MA, Aoki MS, Lancellotti CL, et al. beta(1) Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. *The Journal of endocrinology* 2012;214(3):359-65. doi: 10.1530/JOE-12-0155.
246. Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, Endo H, Uchiyama T, Mawatari H, Iida H, Kato S, Fujita K, Takahashi H, et al. Association between angiotensin II type 1 receptor polymorphisms and the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2009;29(7):1078-85. doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.01988.x.
247. Zain SM, Mohamed Z, Mahadeva S, Rampal S, Basu RC, Cheah PL, Salim A, Mohamed R. Susceptibility and gene interaction study of the angiotensin II type 1 receptor (AGTR1) gene polymorphisms with non-alcoholic fatty liver disease in a multi-ethnic population. *PloS one* 2013;8(3):e58538. doi: 10.1371/journal.pone.0058538.
248. Guzman C, Benet M, Pisonero-Vaquero S, Moya M, Garcia-Mediavilla MV, Martinez-Chantar ML, Gonzalez-Gallego J, Castell JV, Sanchez-Campos S, Jover R. The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPARalpha; and repressed by C/EBPalpha: Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica et biophysica acta* 2013;1831(4):803-18. doi: 10.1016/j.bbali.2012.12.014.
249. Jin J, Iakova P, Breaux M, Sullivan E, Jawanmardi N, Chen D, Jiang Y, Medrano EM, Timchenko NA. Increased expression of enzymes of triglyceride synthesis is essential for the development of hepatic steatosis. *Cell reports* 2013;3(3):831-43. doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.009.
250. Moya M, Benet M, Guzman C, Tolosa L, Garcia-Monzon C, Pareja E, Castell JV, Jover R. Foxa1 reduces lipid accumulation in human hepatocytes and is down-regulated in nonalcoholic fatty liver. *PloS one* 2012;7(1):e30014. doi: 10.1371/journal.pone.0030014.
251. Adams LA, White SW, Marsh JA, Lye SJ, Connor KL, Maganga R, Ayonrinde OT, Olynyk JK, Mori TA, Beilin LJ, et al. Association between liver-specific gene polymorphisms and their expression levels with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013;57(2):590-600. doi: 10.1002/hep.26184.
252. Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, Dinkova-Kostova AT, Walsh SV, Tsujita T, Dillon JF, Ashford ML, Hayes JD. Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free radical biology & medicine* 2010;48(2):357-71. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.007.
253. Gupte AA, Lyon CJ, Hsueh WA. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like-2 factor (Nrf2), a key regulator of the antioxidant response to protect against atherosclerosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Current diabetes reports* 2013;13(3):362-71. doi: 10.1007/s11892-013-0372-1.
254. Kay HY, Kim WD, Hwang SJ, Choi HS, Gilroy RK, Wan YJ, Kim SG. Nrf2 inhibits LXRalpha-dependent hepatic lipogenesis by competing with FXR for acetylase binding. *Antioxidants & redox signaling* 2011;15(8):2135-46. doi: 10.1089/ars.2010.3834.
255. Hussein O, Zidan J, Abu Jabal K, Shams I, Szvalb S, Grozovski M, Bersudsky I, Karry R, Aviram M. Paraoxonase activity and expression is modulated by therapeutics in experimental rat nonalcoholic Fatty liver disease. *International journal of hepatology* 2012;2012:265305. doi: 10.1155/2012/265305.
256. Yamaguchi M, Murata T. Involvement of regucalcin in lipid metabolism and diabetes. *Metabolism: clinical and experimental* 2013;62(8):1045-51. doi: 10.1016/j.metabol.2013.01.023.

257. Verrijken A, Francque S, Mertens I, Prawitt J, Caron S, Hubens G, Van Marck E, Staels B, Michielsen P, Van Gaal L. Prothrombotic factors in histologically proven nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2014;59(1):121-9. doi: 10.1002/hep.26510.
258. Banasik K, Justesen JM, Hornbak M, Krarup NT, Gjesing AP, Sandholt CH, Jensen TS, Grarup N, Andersson A, Jorgensen T, et al. Bioinformatics-driven identification and examination of candidate genes for non-alcoholic fatty liver disease. *PloS one* 2011;6(1):e16542. doi: 10.1371/journal.pone.0016542.
259. Harano Y, Yasui K, Toyama T, Nakajima T, Mitsuyoshi H, Mimani M, Hirasawa T, Itoh Y, Okanoue T. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver Shionogi mice with hereditary fatty liver. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2006;26(5):613-20. doi: 10.1111/j.1478-3231.2006.01265.x.
260. Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, Yada M, Yada R, Harada N, et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2007;20(3):351-8.
261. Nakamuta M, Fujino T, Yada R, Yada M, Yasutake K, Yoshimoto T, Harada N, Higuchi N, Kato M, Kohjima M, et al. Impact of cholesterol metabolism and the LXRAalpha-SREBP-1c pathway on nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2009;23(5):603-8.
262. Cordero P, Champion J, Milagro FI, Martinez JA. Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis associated to obesity: effect of dietary methyl donor supplementation. *Molecular genetics and metabolism* 2013;110(3):388-95. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.08.022.
263. Imai Y, Boyle S, Varela GM, Caron E, Yin X, Dhir R, Dhir R, Graham MJ, Ahima RS. Effects of perilipin 2 antisense oligonucleotide treatment on hepatic lipid metabolism and gene expression. *Physiological genomics* 2012;44(22):1125-31. doi: 10.1152/physiolgenomics.00045.2012.
264. Bechmann LP, Gastaldelli A, Vetter D, Patman GL, Pascoe L, Hannivoort RA, Lee UE, Fiel I, Munoz U, Ciociaro D, et al. Glucokinase links Kruppel-like factor 6 to the regulation of hepatic insulin sensitivity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012;55(4):1083-93. doi: 10.1002/hep.24793.
265. Bechmann LP, Vetter D, Ishida J, Hannivoort RA, Lang UE, Kocabayoglu P, Fiel MI, Munoz U, Patman GL, Ge F, et al. Post-transcriptional activation of PPAR alpha by KLF6 in hepatic steatosis. *Journal of hepatology* 2013;58(5):1000-6. doi: 10.1016/j.jhep.2013.01.020.
266. Sazci A, Ozel MD, Ergul E, Aygun C. Association of nicotinamide-N-methyltransferase gene rs694539 variant with patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Genetic testing and molecular biomarkers* 2013;17(11):849-53. doi: 10.1089/gtmb.2013.0309.
267. Leroux A, Ferrere G, Godie V, Cailleux F, Renoud ML, Gaudin F, Naveau S, Prevot S, Makhzami S, Perlemuter G, et al. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *Journal of hepatology* 2012;57(1):141-9. doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.028.
268. Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Mizusawa S, Ueno T, Nakao K, Sekine A, Chayama K, et al. Targeted next-generation sequencing and fine linkage disequilibrium mapping reveals association of PNPLA3 and PARVB with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of human genetics* 2014. doi: 10.1038/jhg.2014.17.
269. Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Teranishi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, et al. Genome-wide scan revealed that

- polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. *Human genetics* 2013;132(7):783-92. doi: 10.1007/s00439-013-1294-3.
270. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature reviews Genetics* 2013;14(3):204-20. doi: 10.1038/nrg3354.
 271. Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature reviews Genetics* 2008;9(2):129-40. doi: 10.1038/nrg2295.
 272. Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Archives of disease in childhood* 1994;71(4):288-90.
 273. Kirchner H, Osler ME, Krook A, Zierath JR. Epigenetic flexibility in metabolic regulation: disease cause and prevention? *Trends in cell biology* 2013;23(5):203-9. doi: 10.1016/j.tcb.2012.11.008.
 274. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature reviews Genetics* 2005;6(8):597-610. doi: 10.1038/nrg1655.
 275. Yue P, Melamud E, Moul J. SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies. *BMC bioinformatics* 2006;7:166. doi: 10.1186/1471-2105-7-166.
 276. Altobelli G, Bogdarina IG, Stupka E, Clark AJ, Langley-Evans S. Genome-wide methylation and gene expression changes in newborn rats following maternal protein restriction and reversal by folic acid. *PloS one* 2013;8(12):e82989. doi: 10.1371/journal.pone.0082989.
 277. Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, Ferri R, Romano A, Candito M, Namour B. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2003;41(11):1473-7. doi: 10.1515/CCLM.2003.226.
 278. Weingartner J, Lotz K, Fanghanel J, Gedrange T, Bienengraber V, Proff P. Induction and prevention of cleft lip, alveolus and palate and neural tube defects with special consideration of B vitamins and the methylation cycle. *Journal of orofacial orthopedics = Fortschritte der Kieferorthopädie : Organ/official journal Deutsche Gesellschaft für Kieferorthopädie* 2007;68(4):266-77. doi: 10.1007/s00056-007-0701-6.
 279. Sanyal AJ, American Gastroenterological A. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123(5):1705-25.
 280. Anstee QM, Day CP. The genetics of NAFLD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2013;10(11):645-55. doi: 10.1038/nrgastro.2013.182.
 281. Chen BF, Chan WY. The de novo DNA methyltransferase DNMT3A in development and cancer. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 2014;9(5).
 282. Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 2004;429(6994):900-3. doi: 10.1038/nature02633.
 283. Volkmar M, Dedeurwaerder S, Cunha DA, Ndlovu MN, Defrance M, Deplus R, Calonne E, Volkmar U, Igoillo-Estève M, Naamane N, et al. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *The EMBO journal* 2012;31(6):1405-26. doi: 10.1038/emboj.2011.503.
 284. Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N. Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Molecular and cellular biology* 2002;22(9):3157-73.
 285. Bol VV, Reusens BM, Remacle CA. Postnatal catch-up growth after fetal protein restriction programs proliferation of rat preadipocytes. *Obesity* 2008;16(12):2760-3. doi: 10.1038/oby.2008.417.

286. Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, Remacle C. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity* 2006;14(8):1330-43. doi: 10.1038/oby.2006.151.
287. Desai M, Babu J, Ross MG. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2007;293(6):R2306-14. doi: 10.1152/ajpregu.00783.2006.
288. Berends LM, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Cripps RL, Ozanne SE. Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. *International journal of obesity* 2013;37(8):1051-7. doi: 10.1038/ijo.2012.196.
289. Swali A, McMullen S, Hayes H, Gambling L, McArdle HJ, Langley-Evans SC. Cell cycle regulation and cytoskeletal remodelling are critical processes in the nutritional programming of embryonic development. *PloS one* 2011;6(8):e23189. doi: 10.1371/journal.pone.0023189.
290. Erhuma A, McMullen S, Langley-Evans SC, Bennett AJ. Feeding pregnant rats a low-protein diet alters the hepatic expression of SREBP-1c in their offspring via a glucocorticoid-related mechanism. *Endocrine* 2009;36(2):333-8. doi: 10.1007/s12020-009-9225-8.
291. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan XG, Yan Z, et al. HMGB1 in health and disease. *Molecular aspects of medicine* 2014. doi: 10.1016/j.mam.2014.05.001.
292. O'Reilly MW, House PJ, Tomlinson JW. Understanding androgen action in adipose tissue. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2014;143C:277-84. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.008.
293. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *The American journal of clinical nutrition* 1999;69(2):179-97.
294. Reddington JP, Pennings S, Meehan RR. Non-canonical functions of the DNA methylome in gene regulation. *The Biochemical journal* 2013;451(1):13-23. doi: 10.1042/BJ20121585.
295. Lappas M. Markers of endothelial cell dysfunction are increased in human omental adipose tissue from women with pre-existing maternal obesity and gestational diabetes. *Metabolism: clinical and experimental* 2014;63(6):860-73. doi: 10.1016/j.metabol.2014.03.007.
296. Kent JW, Jr., Comuzzie AG, Mahaney MC, Almasy L, Rainwater DL, VandeBerg JL, MacCluer JW, Blangero J. Intercellular adhesion molecule-1 concentration is genetically correlated with insulin resistance, obesity, and HDL concentration in Mexican Americans. *Diabetes* 2004;53(10):2691-5.
297. Song Y, Manson JE, Tinker L, Rifai N, Cook NR, Hu FB, Hotamisligil GS, Ridker PM, Rodriguez BL, Margolis KL, et al. Circulating levels of endothelial adhesion molecules and risk of diabetes in an ethnically diverse cohort of women. *Diabetes* 2007;56(7):1898-904. doi: 10.2337/db07-0250.
298. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;170(2):191-203.
299. Ito S, Yukawa T, Uetake S, Yamauchi M. Serum intercellular adhesion molecule-1 in patients with nonalcoholic steatohepatitis: comparison with alcoholic hepatitis. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2007;31(1 Suppl):S83-7. doi: 10.1111/j.1530-0277.2006.00292.x.
300. Wang HW, Babic AM, Mitchell HA, Liu K, Wagner DD. Elevated soluble ICAM-1 levels induce immune deficiency and increase adiposity in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2005;19(8):1018-20. doi: 10.1096/fj.04-3094fje.

301. Rankinen T, Church T, Rice T, Markward N, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Blair SN, Bouchard C. Effect of endothelin 1 genotype on blood pressure is dependent on physical activity or fitness levels. *Hypertension* 2007;50(6):1120-5. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.093609.
302. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2(8663):577-80.
303. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *Bmj* 1991;303(6809):1019-22.
304. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993;36(1):62-7.
305. Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *Bmj* 1990;301(6746):259-62.
306. Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman PD. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatric research* 1996;40(3):438-43. doi: 10.1203/00006450-199609000-00012.
307. Gambling L, Dunford S, Wallace DI, Zuur G, Solanky N, Srai SK, McArdle HJ. Iron deficiency during pregnancy affects postnatal blood pressure in the rat. *The Journal of physiology* 2003;552(Pt 2):603-10. doi: 10.1113/jphysiol.2003.051383.
308. Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, Taylor PD. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2005;288(1):R127-33. doi: 10.1152/ajpregu.00354.2004.
309. Jansson T, Lambert GW. Effect of intrauterine growth restriction on blood pressure, glucose tolerance and sympathetic nervous system activity in the rat at 3-4 months of age. *Journal of hypertension* 1999;17(9):1239-48.
310. Meigs JB. Epidemiology of the metabolic syndrome, 2002. *The American journal of managed care* 2002;8(11 Suppl):S283-92; quiz S93-6.
311. Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney international* 2001;59(1):238-45. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00484.x.
312. Jacobs NJ, Vandemark PJ. The purification and properties of the alpha-glycerophosphate-oxidizing enzyme of *Streptococcus faecalis* 10C1. *Archives of biochemistry and biophysics* 1960;88:250-5.
313. Koditschek LK, Umbreit WW. Alpha-glycerophosphate oxidase in *Streptococcus faecium* F 24. *Journal of bacteriology* 1969;98(3):1063-8.
314. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry* 1974;20(4):470-5.
315. Henry RJ, Chiamori N, Golub OJ, Berkman S. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. *American journal of clinical pathology* 1960;34:381-98.
316. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clinical chemistry* 1978;24(1):58-73.
317. Garrow TA. Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 1996;271(37):22831-8.
318. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic acids research* 2002;30(4):e15.
319. Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ, Church GM. Systematic determination of genetic network architecture. *Nature genetics* 1999;22(3):281-5. doi: 10.1038/10343.

Matériel 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). Le numéro d'agrément du comité d'éthique pour le modèle carencé en vitamine B12 et folates est n°54-547-22, délivré par la Direction départementale pour la protection des populations, Meurthe et Moselle, France. La commission d'examen de l'Université de Lorraine a aussi approuvé cette étude. Les rats adultes (Wistar Han IGS, Charles River, Saint Germain sur l'Arbresle, France pour le modèle MDD et les rats Spraguey Dawley, Charles River, France pour modèle MPR) sont maintenus en conditions standard d'élevage, avec un cycle d'alternance jour/nuit de 12 h, à température ambiante (23°C ± 3°C), et avec eau et 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

1.1.1. Modèle carencé en Vitamine B12 et Folates

Un mois avant l'accouplement, les rats ont été alimentés soit avec un régime standard type A04/A03(1) (Rats souris élevage, SAFE, Augy, France) soit avec régime carencé en vitamines B12 et folates (2) (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). Les rats mâles sont 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 est 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 post-natal) au travers de l'allaitement maternel ; au-delà, une alimentation standard a été donnée aux animaux (Figure 40).

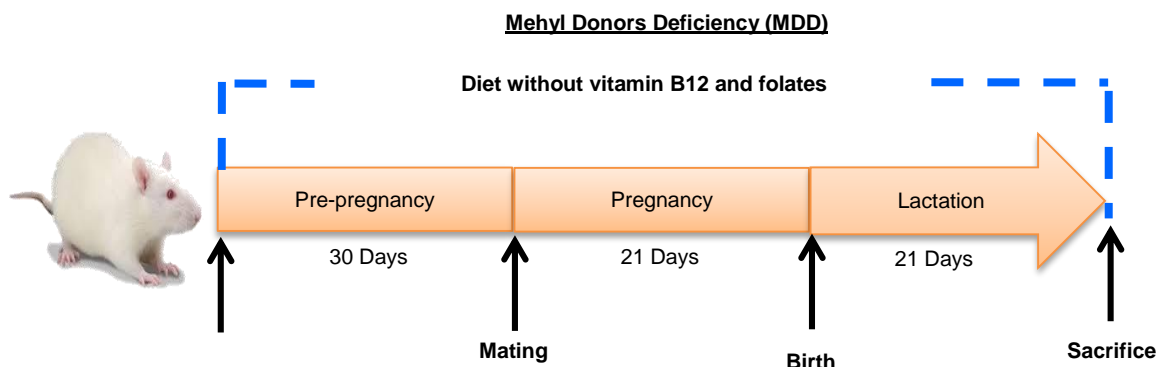


Figure 40. Protocole nutritionnel du modèle de rat carencé en donneurs de méthyles (MDD).

(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
TRYPTOPHA N	%	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
PHENYLALA N	%	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 CYANOCOBALAMIN E	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

1.1.2. Modèle carencé en protéine

Huit rats femelles vierges Spraguey Dawley pesant 200-250 g ont été obtenus auprès de Charles River (France), et placés sous un cycle de 12 h de lumière / obscurité (lumière allumée à 07h00) avec de la nourriture et de l'eau ad libitum pendant au moins dix jours avant toute manipulation expérimentale. Ils ont ensuite été accouplés avec des mâles de 3 mois de la même souche (2 femelles pour 1 mâle). Après avoir confirmé que les rattes étaient gestantes via la détection de spermatozoïdes dans un frottis vaginal, les mères ont été nourries avec une alimentation pauvre en protéines (8g de protéines pour 100g d'aliment) ou avec une alimentation standard (20 g de protéines pour 100 g nourriture) pendant la grossesse et la lactation (Figure 41). Dans les 24 heures après la parturition, la portée est réduite à sept individus pour la standardisation de l'étude.

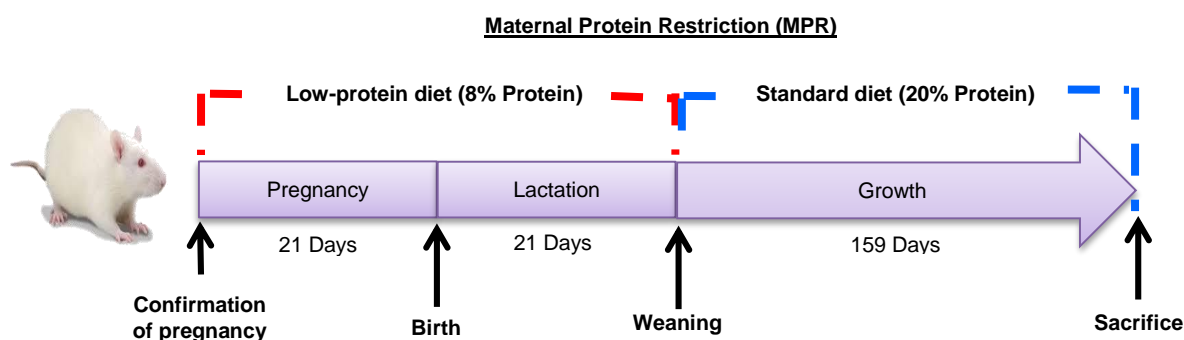


Figure 41. Protocole nutritionnel du modèle de rat carencé en protéines (MPR).

Composition des régimes expérimentaux (g / kg d'aliments)

Macronutrient	Control (20% protein)	MPR (8% protein)	Standard Chow
Protein			
Casein	220	90	180
Carbohydrate			
Cornstarch	631	761	630
Fat			
Vegetable oil	43	43	37
Cellulose	54	52	53
Vitamin Mix	10	10	10
Mineral Mix	40	40	40
Energy density (kcal/g)	3.8	3.8	3.6
% macronutrient kcal/g			
Protein	23	9.5	20.2
Carbohydrate	67	80.3	70.5
Fat	10	10.2	9.3

1.2. Prélèvement et gestion des échantillons

Les portées ont été sacrifiées par excès d'isoflurane à l'âge de 21 jours pour le modèle MDD. 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 de l'Héparin Lithium pour le plasma (Ref 368884) ou dans des tubes contenant du Clot Activator pour le sérum (Ref 368498). Le plasma et le sérum ont été récupérés en centrifugeant le sang à 4°C pendant 20 minutes à 3000g.

Le foie est ensuite prélevé, rincé dans une solution de PBS 1x (phosphate buffered saline) et congelé instantanément dans l'azote liquide. Les organes ainsi préparés sont stockés au froid à -80°C.

Pour le modèle MPR, le sacrifice, le prélèvement du sang et du foie a été fait à Nantes. Le foie a servi pour l'extraction de l'ARN et de l'ADN à mesurer le transcriptome et le méthylome.

Les nombres des échantillons pour mesurer des biomarqueurs plasmatiques/sériques et du foie, du transcriptome et du méthylome sont montrés dans le tableau ci-dessous :

	MDD		MPR	
	Contrôle	Carencé	Contrôle	Carencé
Age	J21	J21	J180	J180
Biomarqueurs plasmatiques/sériques	10 (5 ♂ et 5 ♀)	10 (5 ♂ et 5 ♀)	7 (tous ♂)	7 (tous ♂)
Biomarqueurs du foie	10 (5 ♂ et 5 ♀)	10 (5 ♂ et 5 ♀)	-	-
Transcriptome	4 (2 ♂ et 2 ♀)	4 (1 ♂ et 3 ♀)	4 (tous ♂)	4 (tous ♂)
Méthylome	3 (1 ♂ et 2 ♀)	3 (2 ♂ et 1 ♀)	3 (tous ♂)	3 (tous ♂)

Pour le Projet TransG, tout le projet a été fait à Nancy comme le modèle MDD et on a travaillé sur le foie et le cœur au niveau du biomarqueurs plasmatiques/sériques et du transcriptome dans la génération 1 et la génération 2 (la mère carencée pendant sa gestation est définie comme génération 0) aussi à l'âge J21, les nombres des échantillons sont montrés dans le tableau ci-dessous :

	Foie/Cœur-G1		Foie/Cœur-G2	
	Contrôle	Carencé	Contrôle	Carencé
Age	J 21	J 21	J 21	J 21
Biomarqueurs plasmatiques/sériques	8 (4 ♂ et 4 ♀)	7 (3 ♂ et 4 ♀)	8 (4 ♂ et 4 ♀)	9 (5 ♂ et 4 ♀)
Transcriptome	8 (4 ♂ et 4 ♀)	7 (3 ♂ et 4 ♀)	8 (4 ♂ et 4 ♀)	9 (5 ♂ et 4 ♀)

2. Dosages plasmatiques / sériques et tissulaires

2.1. Métabolisme de l'homocystéine

2.1.1. Folates et vitamine B12

Principe

Les dosages ont été effectués sur des échantillons de plasma à l'aide du coffret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals) et ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de biochimie biologie moléculaire nutrition et métabolisme du CHU de Nancy-Brabois.

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 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.

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant.

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

2.1.2. Dosage de l'homocystéine (HCY)

Principe

La concentration plasmatique de l'homocystéine est mesurée par une technique de chromatographie liquide ultra haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) 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 (Ultra Performance Liquid Chromatography). La quantification est faite grâce à une gamme d'étalonnage en plasma et l'ajustement inter-échantillon est réalisé 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'aliqots de solutions mères standards non deutérées et deutérées à 1 mmol/L.

	Homocystéine (MM 268,4)	Homocystéine d8 (98%)
Poudre (mg)*	13.27	13.8
HCL 0,1N (<i>T° amb, hormones</i>)	50 mL	50 mL
	Vortexer, Soniquer	
NaOH 10M (+ 4°C, hormones)	1 mL	1 mL
DTT	132.7 mg	132.7 mg
HCL 0,1N	qsp 100mL	
	Vortexer, Soniquer	
Concentration sol.mère	1mM d'homocystéine	1mM d'homocystéine d4
Aliquoter par fraction de 0.7 mL Congeler à -20 °C.		

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

- Préparer la gamme d'étalonnage : diluer S8 au $\frac{1}{2}$ jusqu'à obtenir S1 dans le pool de plasma :

Concentration finale (μM)	S8	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1
Homocystéine	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.781

- Préparer le mélange de standards internes :
 - 150 µL de HCY d4 à 1 mmol/L
 - 4,5 ml de DTT 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 jusqu'à dissolution totale. Faire des aliquots de 200 µL à conserver à -20°C.
- Préparation de la solution d'extraction Méthanol/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	Standard S0	Standard S1 à S8	Contrôle (pool, level 1 et 2)	Echantillons
Volume prélevé	50 µL pool	50 µL pool	50 µL	50 µL	50 µL
Standard interne	0	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
DTT 200 mM	50 µL	0	0	0	0
Vortexer et attendre 15 min à température ambiante					
meOH 0,1% ac. formique	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

*NB : Travail possible à partir de 25µL 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 pour utiliser ultérieurement à l'étape LC-MSMS (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry) 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 LC-MSMS 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

2.1.3. Analyse des molécules adényliques (SAM/SAH) par dérivation fluorescente à l'aide du chloroacétaldéhyde

Principe

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (en anglais Liquid chromatography-mass spectrometry ou LC-MS) est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances.

Une unité LC-MS est composée de deux blocs principaux : un chromatographe en phase liquide et un spectromètre de masse.

Préparation des solutions stocks (SAM ; SAH)

- Préparer les solutions stocks de standards (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 les solutions de travail stocks de standards 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).
- Eliminer 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 adényles

- Dans des microtubes noirs de 0.5ml, ajouter successivement:
 - 200 µL d'échantillon ou de standard.
 - 200 µL d'acétate de sodium à 1M.
 - 10 µL de chloroacétaldéhyde à 50%.
- Vortexer et incuber 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), un four à colonne à 30°C, une colonne Resolve n°85711 C18 (150x3.9mm, 5µ), un détecteur à fluorescence Shimadzu RF10AXL (278nm : Ex/418nm : Em) et un intégrateur (logiciel Borwin 3.1).
- Déposer 50 µL de dérivation des adényles dans les inserts pour flacons d'échantillonneur automatisé AS100.
- Injecter 10 µL dans la colonne.
- Solution pour la phase mobile.

2.1.4. Concentration en méthionine

Principe

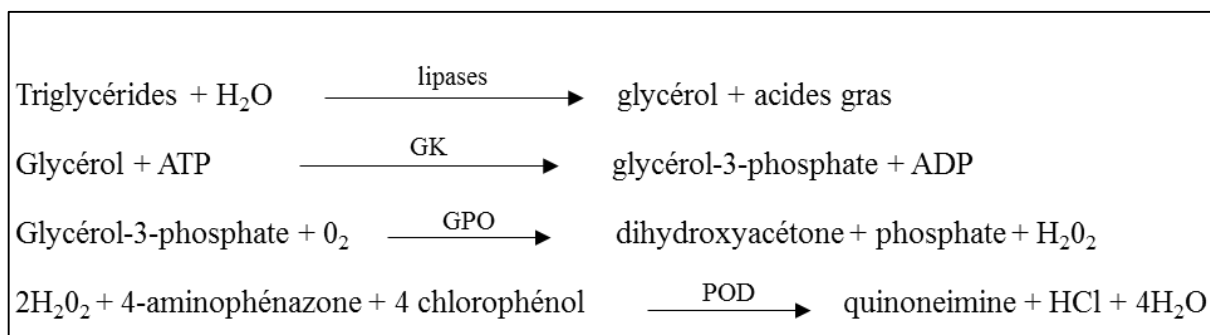
Tous les acides aminés et les peptides avec un groupe α-amino libre produit lors de la réaction à la ninhydrine (hydrate de tricétohydrindène), une substance bleu-violet, sauf de la proline et de l'hydroxyproline seulement avec la réaction à la ninhydrine produit une substance en jaune. La réaction de la formation d'un dérivé coloré entre la ninhydrine et les acides aminés est très sensible, et le maximum d'absorption du composé obtenu se situe à 570 nm. Selon la réaction des tons bleu-violet générés, la concentration d'acides aminés dans un échantillon peut être déterminée par la colorimétrie à 570 nm.

Détermination de la concentration en méthionine avec la méthode colorimétrique à la ninhydrine par *JLC-500/V AminoTac*TM Amino Acid Analyzer®.

2.2. Métabolisme lipidique : Triglycérides, cholestérol et lipides totaux

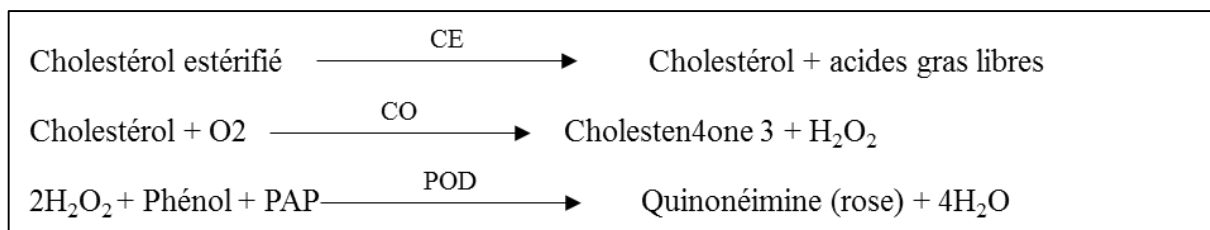
Principe

Les triglycérides sont dosés après hydrolyse enzymatique par des lipases. L'indicateur est une quinone-imine formée à partir de peroxyde d'hydrogène, de 4-aminophénazone et de 4-chlorophénol, la réaction étant catalysée par la peroxydase. Le principe est présenté dans le schéma réactionnel suivant (312, 313) :



* GK, Glucokinase ; GPO, Glycérol phosphate oxydase; POD, Péroxydase.

Le cholestérol est dosé par la méthode enzymatique CHOD-PAP : Méthode enzymatique décrite par Allain et al (314), selon le schéma réactionnel suivant :



* CE, Cholestérol estérase ; CO, Cholestérole oxydase ; POD, Péroxydase.

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.

2.3. Métabolisme énergétique

2.3.1. Marqueurs du stress cellulaire (ALAT/ASAT)

Principe

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 (315). 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-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 ASAT dans l'échantillon, est mesurée à 340 nm.

Le dosage de l'Alanine AminoTransférase (ALAT) a été réalisé selon la méthode de Henry (315) et Bergmeyer (316). 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.

2.3.2. Dosage Radio-Immunologique de l'insuline

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 fin 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 (ImmuChem™ Coated Tube Insulin ¹²⁵I RIA Kit, (MP Biomedicals, LLC)).

Ces dosages ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de biochimie biologie moléculaire nutrition et métabolisme du CHU de Nancy-Brabois.

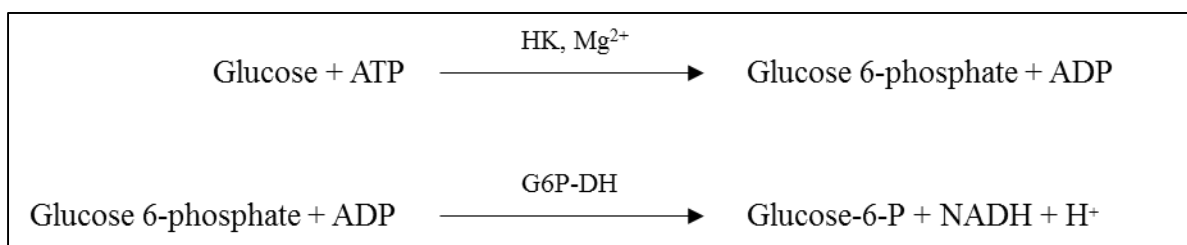
2.3.3. Dosage du glucose

Principe

Il s'agit d'un test enzymatique UV (méthode à l'héxokinase) utilisé dans la détermination quantitative du glucose dans le sérum, le plasma et l'urine.

Le glucose est phosphorylé par l'action de l'hexokinase (HK) en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et d'ions magnésium pour produire du glucose 6-phosphate et de l'adénosine di-phosphate (ADP). Le glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH) oxyde le glucose 6-phosphate de façon spécifique pour produire du gluconate 6-phosphate ; NAD⁺ est simultanément réduit en NADH. L'augmentation de l'absorbance à 340nm est proportionnelle à la concentration en glucose de l'échantillon.

Equation de la réaction :



Le mesure a été 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.

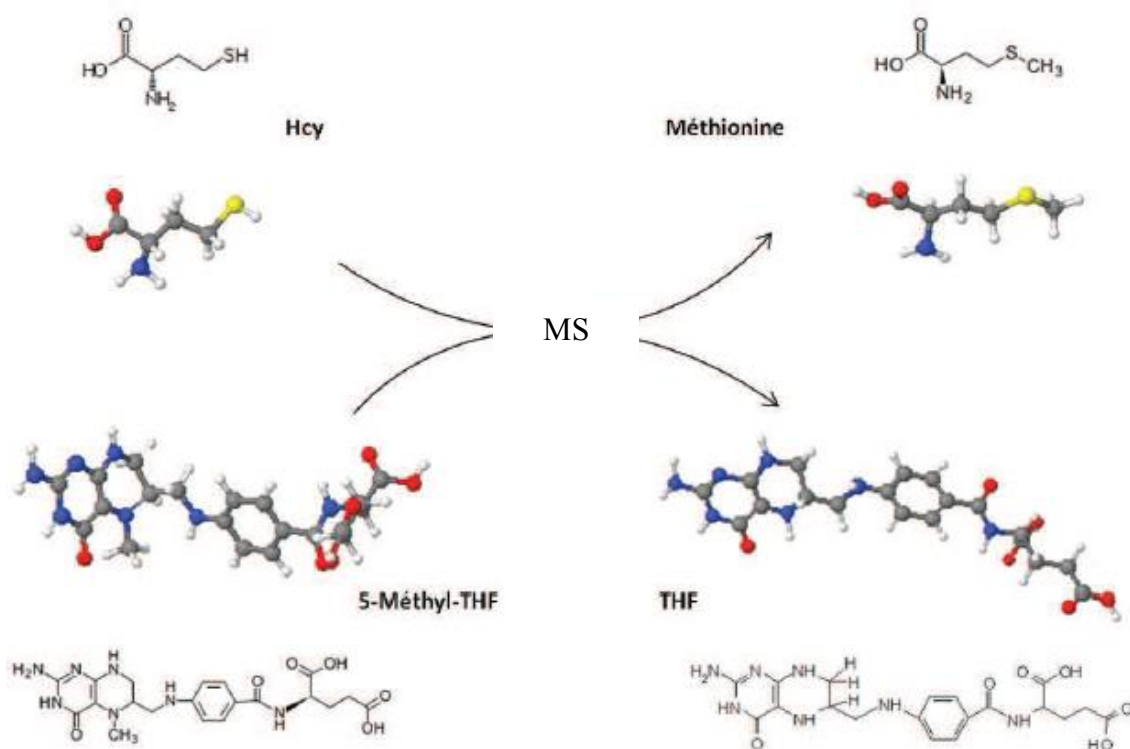
Remarques : Les métabolites des échantillons provenant de Nantes ont été dosés pour l'insuline en utilisant un des kits de dosage de Linco Research Inc. Triglycérides, cholestérol et acides gras libres ont été analysés par des méthodes enzymatiques (Triglycérides enzymatiques PAP 150, BioMérieux; Cholesterol RTU, Biomérieux). Les concentrations sériques de glucose ont été déterminées avec un moniteur de glucose sanguin (Accu-CheckH, Roche Diagnostics).

2.4. Dosages enzymatiques

2.4.1. Mesure de l'activité de la méthionine synthase, MS

Principe

La mesure de l'activité de la MS est faite par la Dosage radio-immunologique (RIA, radio immuno assay en anglais). La MS catalyse la reméthylation de l'Hcy en méthionine en utilisant le 5-méthyltétrahydrofolate selon la réaction suivante :



L'enzyme peut être spontanément inactivée au cours de la réaction à cause d'une oxydation du Cobalt (I) en Cobalt (II). La réactivation par reméthylation réductrice est catalysée par la Méthionine synthase réductase (MTRR, EC 1.16.1.8) et demande l'utilisation de SAM.

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 μL contenant :

Volume réactionnel : 100 μL	Concentration réactionnelle	Concentration stock	Volume
Protéines	500 μg	20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	25 μL
$\text{K}_2\text{H}/\text{KH}_2(\text{PO}_4)$ pH 7,2	100 mM	1 M	10 μL
DTT ⁽¹⁾ (H_2O)	25 mM	580 mM	4.3 μL
Na/Ascorbate ⁽¹⁾ (H_2O)	25 mM	720 mM	3.5 μL
SAM ⁽¹⁾ (H_2O)	20 μM	2 mM	1 μL
Methyl-B12 ⁽²⁾ (H_2O)	50 μM	5 mM	1 μL
Homocystéine ⁽¹⁾ (HCl 1N)	5 mM	500 mM	1 μL
MeTHF ⁽¹⁾ (DTT 10 mM)	0.225 mM	22.5 mM	1 μL
[¹⁴ C] MeTHF ⁽³⁾ (DTT 10 mM)	25 μM	2.5 mM	1 μL
Eau qsp 100 μL			52.2 μL

- 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.

NB:

(1) DTT (H_2O), Na/Ascorbate (H_2O), SAM (H_2O), MeTHF: Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

(2) Methyl-B12 (H_2O): 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 20 mL : 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.

2.4.2. Mesure de l'activité de la bétaine-homocystéine méthyltransférase, BHMT

Principe

L'activité de la BHMT a été estimée selon la technique décrite par Garrow (317). Cette mesure est basée sur le transfert d'un groupement méthyle radiomarké de la bétaine 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.

Préparation du mélange réactionnel :

Volume réactionnel : 100 µL	Concentration réactionnelle	Concentration stock	Volume
Protéines	500 µg	20 µg/µL	25 µL
Tris-HCl ⁽¹⁾ pH 8	50 mM	5 M	20 µL
DTT ⁽¹⁾ (H ₂ O)	25 mM	580 mM	8.6 µL
Bétaine ⁽¹⁾ (H ₂ O)	2 mM	200 mM	20 µL
D, L Homocystéine ⁽¹⁾ (HCl 1N)	5 mM	500 mM	20 µL
[³ H] Bétaine	15 nM	1,5 µM	2 µL
H ₂ O qsp 100 µL			4.4 µL

- Incuber le mélange dans le bloc chauffant à 1 h / 37°C
- Arrêter en chauffant à 95°C/5 min puis refroidir à 4°C.
- Centrifuger à 20 000 g/4°C/10 min.
- Eliminer le culot.

Séparation de la méthionine tritiée synthétisée par chromatographie d'échange d'ions :

- Déposer le surnageant sur une colonne de 0,8 x 4 cm ⁽²⁾ contenant 2 mL de résine AG1x8⁽²⁾ préalablement équilibrée en ions OH⁻ en lavant avec 4 x 5 mL de NaOH 1N et 5 x 2 mL d'eau MilliQ.
- Laver le gel avec 1 mL, 3 mL et 3 x 5 mL eau MilliQ pour éliminer la [³H] Bétaïne en excès dans l'échantillon.
- Eluer la [³H] Méthionine produite lors de la réaction en lavant le gel avec 5 x 2 mL de HCl 0,5 N
- Mesurer la radioactivité dans des flacons en polyéthylène⁽³⁾ (20 mL) contenant 1 volume d'éluat avec 4 volumes de liquide de scintillation⁽³⁾ à l'aide d'un compteur à scintillation Tri-Carb 1900 CA⁽³⁾. Les activités sont exprimées en nmol de produit par heure et par mg de protéines totales.

NB:

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

(2) Colonne de 0,8 x 4 cm, BioRad ; résine AG1x8 ammonium quaternaire, BioRad

(3) Tous les produits sont fournis par Packard Biosciences®.

3. Mesure d'expression des gènes au moyen de puces à ADN

3.1. Extraction et contrôle de qualité de l'ARN

3.1.1. Extraction d'ARN à partir des tissus avec le RNeasy Plus Mini Kit

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

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

- **Avant de commencer :**

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

- **Procédure :**

- ⇒ Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote et la carboglace et garder entre 20 et 30 mg de tissu puis conserver le reste à -80°C.
- ⇒ Ajouter 600 µL de tampon RLT et homogénéiser à l'aide d'une seringue et d'une aiguille (0.9 mm) en faisant passer le lysat au minimum 5 fois dans la seringue.
- ⇒ Centrifuger le lysat à vitesse maximale (12 à 14,000 g) pendant 3 min.
- ⇒ Récupérer le surnageant à l'aide d'une pipette et transférer le tout dans un nouveau tube.
- ⇒ Ajouter 1 volume d'éthanol 70% (préférentiellement 50% pour le foie) et mélanger en pipetant (ne pas centrifuger).

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

- ⇒ Transférer 700 µL de l'échantillon dans une colonne placée sur un tube de 2 mL.
- ⇒ Centrifuger pendant 15s à 8000 g (10 000 rpm) et évacuer l'écoulement.

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

- ⇒ Ajouter 700 µL de tampon RW1 dans la colonne.

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

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

⇒ Ajouter 500 µL de tampon RPE dans la colonne.

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

⇒ Ajouter 500 µL de tampon RPE dans la colonne.

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

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

⇒ Placer la colonne sur un nouveau tube de 2 mL.

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

⇒ Placer la colonne sur un nouveau tube de 1.5 mL.

⇒ Ajouter 30 à 50 µL d'eau Rnase-free directement sur la membrane.

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

⇒ Au cas où la quantité d'ARN prévisible est supérieure à 30 µg, répéter cette étape en ajoutant à nouveau 30 à 50 µL d'eau Rnase-free puis centrifuge 1 min à 8000 g (10 000 rpm).

⇒ Doser les ARN afin d'obtenir la concentration de chaque échantillons.

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

3.1.2. Quantification

3.1.2.1. Dosage avec Spectrophotomètre Biophotometer, Eppendorf

⇒ Diluer l'ADN ou l'ARN dans de l'eau à un 1/60ème dans une cuve en quartz.

⇒ Lire l'absorbance à 260 (absorbance des acides nucléiques) et 280 nm (absorbance des protéines) avec un spectrophotomètre.

La concentration en ARN est calculée selon la formule suivante :

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

$$[\text{ADN}] = 50 \mu\text{g/mL} \times A_{260\text{nm}} \times \text{facteur de dilution}$$

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

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

3.1.2.2. Dosage avec MultiskanGo (Thermo Scientific)

La concentration en ARN et ADN est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{ARN}] = A_{260\text{nm}} \times 40 \times 20 \text{ (ng / } \mu\text{L)}$$

$$[\text{ADN}] = A_{260\text{nm}} \times 50 \times 20 \text{ (ng / } \mu\text{L)}$$

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

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

3.1.3. Vérification de l'intégrité des ARN sur gel d'agarose

- **Préparation du gel d'agarose**

⇒ Dissoudre l'agarose pour une concentration de 1,5 % (poids/volume) dans du tampon TBE 1X (Tris, Borate, EDTA) (80-100 mL), par exemple 1,2 g dans 80 mL du tampon.

⇒ Chauffer le mélange à l'aide d'un four micro-ondes jusqu'à complète dissolution de l'agarose.

⇒ Attendre quelques minutes (15mins) que le mélange refroidisse.

⇒ Ajouter le bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/mL et homogénéiser.

⇒ Couler le mélange dans le support de la cuve d'électrophorèse.

⇒ Ajouter un peigne de 15 ou 20 puits selon le nombre d'échantillons à déposer.

⇒ Laisser polymériser pendant environ 20 min.

⇒ Placer le support dans la cuve remplie de tampon TBE 1X.

- **Préparation et dépôt des échantillons d'ARN**

⇒ Décongeler les aliquots de 500 ng préparés au préalable.

⇒ Ajouter de l'eau MilliQ qsp 10 µL et 2 µL de tampon de dépôt.

⇒ Déposer les 12 µL finaux dans les puits du gel.

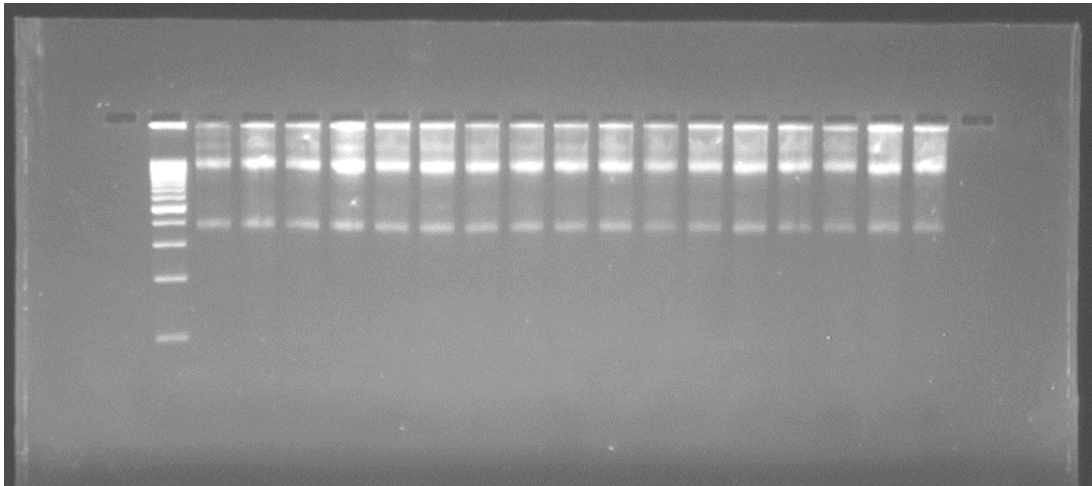
⇒ Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu puis faire migrer pendant 40 min à 110 V.

- **Observation des ARNs sur gel d'agarose**

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

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

Exemple de résultats



3.1.4. Vérification de qualité des ARN avec le Bioanalyseur Agilent

Le Bioanalyzer 2100 (Agilent) est une plateforme qui permet de séparer des échantillons par électrophorèse en vue de leur contrôle-qualité.

Ref Kit: 5065-4476 <http://www.chem.agilent.com>

Réactifs et matériels :

- **Bioanalyseur 2100 Agilent**
- **RNA 6000 Nano Kit**
- **RNA 6000 Nano Chips**
- **Chip priming station**
- **Echantillons à doser (12 échantillons/puce)**
- **RNA 6000 ladder (Stocké à -80 °C, aliquotes de 1.5ul/tube)**

La concentration requise pour les échantillons requise doit être comprise entre 5 et 500ng/μL

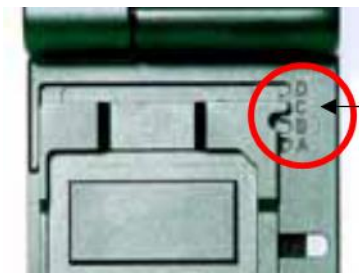
3.1.4.1. Préparation du « ladder »

À réception du kit, le « ladder » peut être conservé à -20 °C jusqu'à sa préparation.

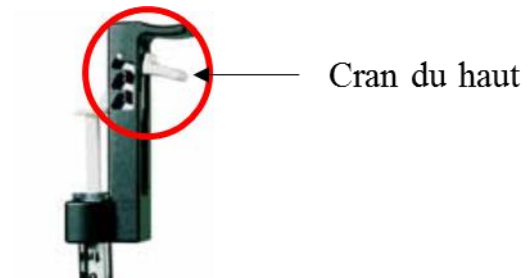
Pour préparer le « ladder », le décongeler et le dénaturer 2 min à 70 °C puis le placer immédiatement sur glace. Faire des aliquots de 1,5 µL dans des tubes eppendorf de 0,5 mL. Les aliquots sont conservés à -80°C.

3.1.4.2. Préparation du matériel

- ⇒ Sortir le *RNA 6000 Nano Assay Kit* à température ambiante, 30 min avant utilisation, à l'abri de la lumière.
- ⇒ Préparer un incubateur (tubes eppendorf de 0.5ml) à 70 °C.
- ⇒ Préparer la station comme indiqué sur les schémas.



Cran « C »



Cran du haut

3.1.4.3. Préparation du Gel-dye Mix

RNA gel matrix filtré

- ⇒ Placer 550 µL de *RNA gel matrix* (bouchon ●) sur la colonne de filtration. Centrifuger 10 min à 4000 rpm (1500 rcf). Conserver un mois à 4 °C.

Gel-dye mix

- ⇒ Mettre 65 µL de *RNA gel matrix* filtré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et rajouter 1 µL de *RNA dye* concentré (bouchon ●) → Vortexer
- Centrifuger 10 min à 12 000rpm (13 000 rcf)
- Gel-dye mix conservation 2 jours à 4 °C, à l'abri de la lumière

3.1.4.4. Préparation des échantillons et du marqueur de taille

- ⇒ Décongeler le *RNA 6000 Ladder* sur glace.

- ⇒ Incubation des échantillons et du ladder (optionnel pour le ladder), 2 min à 70 °C, pour les dénaturer.
- ⇒ Placer immédiatement les tubes sur glace. Les centrifuger (les conserver sur la glace).

3.1.4.5. Couler le gel

- ⇒ Placer la seringue sur « La station ».
- ⇒ Régler la seringue sur 1 mL.
- ⇒ Déposer 9 µL de *Gel-dye mix* dans le puits **G** de la puce (ne pas introduire de bulles d'air !)
- ⇒ Placer la puce dans « La station ».
- ⇒ Fermer « La station » et presser doucement sur la seringue jusqu'au « clip ».
Attendre exactement 30 secondes
- ⇒ Déclipser la seringue. Laisser la position de la seringue remonter doucement (jusqu'à la graduation 0,8 mL environ), remonter doucement le piston de la seringue à 1 mL.
- ⇒ Ouvrir « La station ».

3.1.4.6. Puce

- ⇒ Déposer 9 µL de *Gel-dye mix* dans les deux puits notés **G** de la puce (ne pas introduire de bulles d'air !).
- ⇒ Vortexer le *RNA 6000 Nano marker* (bouchon ●).
- ⇒ Déposer 5 µL de *RNA 6000 Nano marker* dans le puit réservé au ladder **L** et dans les 12 puits réservés aux échantillons.
- ⇒ Déposer 1 µL de ladder (L décongelé) dans son puits **L**.
- ⇒ Déposer 1 µL de chaque échantillon.
- ⇒ Vortexer 1 min la puce à 2400 rpm.
- ⇒ Placer la puce dans l'appareil Agilent 2100 bioanalyzer.

Fermer le couvercle de l'appareil doucement pour ne pas endommager les électrodes

Démarrer l'analyse dans un délai maximum de 5 min

3.1.4.7. Analyse (logiciel version B)

- ⇒ Allumer le périphérique puis l'ordinateur, se connecter grâce au « login » et au « mot de passe » relatif au projet qui ont été fournis par la plateforme.

- ⇒ Dans le menu *Previous Assay*, sélectionner RNA.
- ⇒ Sélectionner *Eucaryote Total RNA Nano* pour le contrôle d'ARN total (ou mRNA).
- ⇒ Appuyer sur **START**.
- ⇒ Lorsque l'analyse commence, penser à nommer les échantillons.

3.1.4.8. Nettoyage des électrodes de l'appareil

- ⇒ Déposer 350 µL de RNase ZAP dans une puce de lavage RNase ZAP. L'introduire dans l'appareil, et la laisser 1 minute (pas plus).
- ⇒ Déposer 350 µL d'eau dans la puce prévue à cet effet. L'introduire dans l'appareil, et la laisser 1 minute.
- ⇒ Laisser le couvercle de l'appareil ouvert durant 1 minute pour sécher les électrodes puis le refermer.

3.1.4.9. Sauvegarde des données et impression

- ⇒ Pour imprimer les données, cliquer sur l'icône d'impression.
Décocher PDF et/ou HTML puis appuyer sur « print »
- ⇒ Pour sauvegarder les données.
Cocher PDF puis « save as » sur le support le plus approprié (clé USB, serveur, mes documents...)

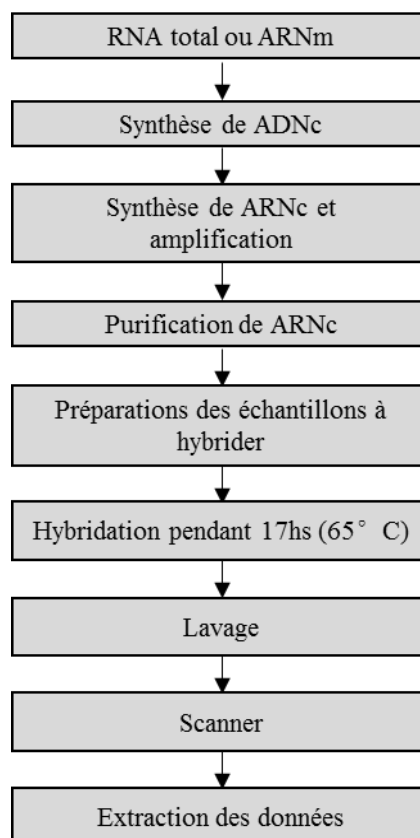
3.2. Puces à ADN pour le transcriptome

Principe

La technologie des puces à ADN (microrrays) consiste à déposer sur des lames de verre des sondes constituées de produits PCR ou d'oligonucléotides longs (50 mer-70 mer) à des densités pouvant atteindre 1.000.000 de dépôts par cm^2 . Ces lames sont ensuite hybridées avec des cibles fluorescentes (ADNc ou ADN génomique). Les molécules fluorescentes les plus couramment utilisées appartiennent à la famille des cyanines, Cy3 et Cy5. Après hybridation, les signaux d'hybridation sont détectés à l'aide d'un scanner de fluorescence. L'utilisation de deux fluorochromes différents permet la détermination des signaux d'hybridation de deux échantillons distincts au cours d'une seule expérience.

Une fois les intensités d'hybridation obtenues, un important travail d'analyse des données est nécessaire pour en extraire les informations biologiques.

3.2.1. Préparation des échantillons



Programme de travail pour préparation des échantillons et hybridation sur des puces

Etape 1. Préparation du mix Spike A et mix Spike B (~ 0.5 h)

- ⇒ Equilibrer les bains d'eau à 37 °C, 65 °C, 80 °C, 40 °C et 70 °C.
- ⇒ Mélanger vigoureusement les solutions stockées avec le vortex.
- ⇒ Chauffer à 37 °C pendant 5 minutes, et mélanger sur le vortex une fois plus.
- ⇒ Centrifuger brièvement dans une centrifugeuse pour entraîner le contenu du tube vers le fond avant l'ouvrir. Des résidus de la solution peuvent se déposer sur les côtés ou le couvercle des tubes pendant le transport et le stockage.

Dilutions du mix Spike A pour cyanine 3 et Spike B pour cyanine 5 marquage.

Quantité d'ARNs au départ	Dilution				Volume de Spike mix utilisé pour chaque réaction marquée (µL)
	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}	
RNA total (ng)	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}	
200	1:20	1:40	1:16		2

Conservation des dilutions de Spike Mix

- ⇒ Conserver le Agilent RNA Spike-In Kit, Two-Color de -70 °C à -80 °C dans un congélateur non-décongelé pendant 1 an depuis la date de réception.
- ⇒ La 1^{ère} dilution de l'Agilent Spike Mix (A ou B) peut être conservée pendant 2 mois dans un congélateur non-décongelé de -70 °C à -80 °C et être décongelé jusqu'à 8 fois.
- ⇒ Après utilisation, jeter les 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} dilutions.

Etape 2. Préparation des marquages (Temps requis : ~5.5 h)

Pour chaque essai, assurez-vous que le volume de l'échantillon d'ARNs totaux plus le volume de l'ARN spike-in control dilué ne dépasse pas 3,5 µL. Parce qu'une réaction 1x implique des volumes inférieurs à 1 µL, préparer des composants dans un mélange et diviser dans des tubes à essais individuels avec des volumes >1 µL. Lors de la préparation de 4 échantillons, utiliser le master mix à 5x. Lors de la préparation de 8 échantillons, utiliser le master mix à 10x.

- 1) Ajouter 10 à 200 ng d'ARNs totaux ou 5 ng d'ARN polyA à un tube de centrifugation de 1,5 ml pour obtenir un volume final de 1,5 uL. Si les échantillons sont concentrés, diluer

avec de l'eau jusqu'à ce que 10 à 200 ng du total ou 5 ng de l'ARN polyA soient ajoutés dans un volume de 1,5 µL. Diluer les ARNs totaux juste avant de les utiliser et conserver les ARNs totaux à une concentration de plus 100 ng / µL.

- 2) Préparer des tubes à la fois de Spike A Mix / cyanine 3-CTP et Spike B Mix / cyanine 5-CTP.
- 3) Ajouter 2 µL de Spike Mix dilué à chaque tube. Chaque tube contient maintenant un volume total de 3,5µL.
- 4) Préparer et ajouter l'amorce du promoteur T7:
 - a) Mélanger l'amorce du promoteur T7 et de l'eau pour préparer le Mix comme indiqué dans le tableau suivant.

Composant	Volume (µL) pour chaque réaction	Volume (µL) pour 5 réactions	Volume (µL) chaque 10 réactions
Amorce promoteur T7	0.8	4	8
Eau sans nucléase	1	5	10
Volume total	1.8	9	18

- b) Ajouter 1,8 µL du Mix de l'amorce du promoteur T7 au tube qui contient 3,5 µL d'ARNs totaux et l'ARN spike-in control dilués. Chaque tube contient maintenant un volume total de 5,3 µL.
 - c) Dénaturer l'amorce et la matrice en incubant les réactifs à 65 °C dans un bain d'eau en circulation pendant 10 minutes.
 - d) Placer les réactifs sur la glace et incuber pendant 5 minutes.
- 5) Préchauffer le tampon de 5X first strand à 80 °C pendant 3 à 4 minutes pour assurer la remise en suspension des composants du tampon. Pour la remise en suspension optimale, mélanger brièvement sur un vortex et centrifuger le tube dans une microcentrifugeuse pour faire tomber les résidus dans la paroi du tube. Conserver à la température ambiante jusqu'à l'utilisation.
- 6) Préparation et l'ajout de d'ADNc Master Mix:
 - a) Immédiatement avant l'utilisation, ajouter les composants d'ADNc Master Mix comme indiqué dans le tableau ci-dessus et utiliser une pipette pour mélanger doucement et garder

à température ambiante. Le mélange AffinityScript RNase Block est un mélange d'enzymes. Gardez le mélange AffinityScript RNase Block sur la glace et ajouter à l'ADNc Master Mix immédiatement avant utilisation.

Composant	Volume (µL) pour chaque réaction	Volume (µL) pour 5 réactions	Volume (µL) pour 10 réactions
5X First Strand Buffer (green cap)	2	10	20
0.1 M DTT (white cap)	1	5	10
10 mM dNTP mix (green cap)	0.5	2.5	5
AffinityScript RNase Block Mix (violet cap)	1.2	6	12
Volume Total	4.7	23.5	47

- b) Centrifuger brièvement chaque tube d'échantillon dans une microcentrifugeuse afin de faire tomber les résidus dans la paroi et le couvercle du tube.
- c) Ajouter 4.7 µL de cDNA Master Mix dans chaque tube d'échantillon et mélanger par pipetage. Chaque tube contient maintenant un volume total de 10 µL.
- d) Incuber les échantillons dans un bain d'eau en circulation à 40 °C pendant 2 heures.
- e) Déplacer les échantillons dans un bain-marie à 70 °C circulant et incuber pendant 15 minutes.

Note : Incubation à 70 °C pour inactiver l'enzyme AffinityScript.

- f) Transférer les échantillons dans la glace, incuber pendant 5 minutes.
- g) Centrifuger brièvement chaque tube d'échantillon dans une microcentrifugeuse afin de faire tomber les résidus dans la paroi et le couvercle du tube.

Stopping Point : Si vous ne passer pas immédiatement à l'étape suivante, conserver les échantillons à -80 °C.

- 7) Préparation et ajout de Transcription Master Mix :

- a) Immédiatement avant utilisation, mélanger doucement les composants comme indiqué dans le tableau ci-dessus et dans l'ordre précisé pour la transcription Master Mix par pipetage à température ambiante. La T7 ARN polymérase mix est un mélange d'enzymes. Gardez la T7 RNA polymérase sur la glace et ajouter au transcription Master Mix juste avant utilisation.

Composant	Volume (µL) pour chaque réaction	Volume (µL) pour 5 réactions	Volume (µL) pour 10 réactions
Nuclease-free water (white cap)	0.75	3.75	7.5
5X Transcription Buffer (blue cap)	3.2	16	32
0.1 M DTT (white cap)	0.6	3	6
NTP mix (blue cap)	1	5	10
T7 RNA Polymerase Blend (red cap)	0.21	1.05	2.1
cyanine 3-CTP or cyanine 5-CTP	0.24	1.2	2.4
Volume Total	6	30	60

- b) Ajouter 6 µL de transcription Master Mix à chaque tube d'échantillon. Mélanger doucement par pipetage. Chaque tube contient maintenant un volume total de 16µL.
- c) Incuber les échantillons dans un bain d'eau en circulation à 40 °C pendant 2 heures.

Stopping Point : Si vous ne passer pas immédiatement à l'étape suivante, conserver les échantillons à -80 °C.

Étape 3. Purification de l'ARN marqué / amplifié (Temps requis : ~0.5h)

- 1) Ajouter 84 µL d'eau sans nucléases à votre échantillon cRNA, pour un volume total de 100 µL.
- 2) Ajouter 350 µL de tampon RLT et bien mélanger par pipetage.
- 3) Ajouter 250 µL d'éthanol (96% à 100% de pureté) et bien mélanger par pipetage. Ne pas centrifuger.
- 4) Transférer 700 µL de l'échantillon sur une colonne ARNc RNeasy dans un tube de collecte de 2 mL. Centrifuger l'échantillon à 4 °C pendant 30 secondes à 13.000 rpm. Jeter le tube de collection et liquide dedans.

- 5) Transférer la colonne RNeasy dans un nouveau tube de collecte et ajouter 500 µL de tampon RPE (contenant de l'éthanol) dans la colonne. Centrifuger l'échantillon à 4 °C pendant 30 secondes à 13,000 rpm. Jeter l'effluent. Réutiliser le tube de collection.
- 6) Ajouter encore 500 µL de tampon RPE dans la colonne. Centrifuger l'échantillon à 4 °C pendant 60 secondes à 13,000 rpm. Jeter l'effluent et le tube de collection.
- 7) Si le tampon RPE reste sur la membrane de la colonne, transférer la colonne RNeasy dans un nouveau tube de collecte de 1,5 mL et centrifuger l'échantillon à 4 °C pendant 30 secondes à 13,000 rpm pour éliminer toutes les traces restantes de RPE tampon. Jeter ce tube de collection et utiliser un nouveau tube pour éluer l'échantillon d'ARNc nettoyé.

Attention : Ne pas jeter l'effluent final à l'étape suivante. Il contient l'échantillon ARNc.

- 8) Éluer l'échantillon d'ARNc nettoyé par transfert de la colonne RNeasy dans un nouveau tube de collecte de 1,5 mL. Ajouter 30 µL d'eau sans RNase directement sur la membrane du filtre. Attendre 60 secondes, puis centrifuger à 4 °C pendant 30 secondes à 13 000 rpm.
- 9) Maintenir l'échantillon d'ARNc sur la glace. Jeter la colonne RNeasy.

Etape 4. Quantification de l'ARNc et détermination de l'activité spécifique de chaque réaction

- 1) Quantifier ARNc en utilisant le NanoDrop ND-1000 Spectrophotomètre UV-VIS version 3.2.1.
- 2) Utiliser la concentration de l'ARNc (ng / µL) pour déterminer le rendement de l'ARNc (µg) comme dans la formule suivante:

$$\frac{\text{Concentration d'ARNc} * 30 \mu\text{L (volume d'élution)}}{1000} = \mu\text{g ARNc}$$

- 3) Utiliser les concentrations de l'ARNc (ng / µl) et cyanine 3 ou de cyanine 5 (pmol / µL) afin de déterminer l'activité spécifique de la manière suivante:

$$\frac{\text{Concentration de Cy3 ou Cy5}}{\text{concentration d'ARNc}} * 1000 = \text{pmol Cy3} / \mu\text{g ARNc}$$

3.2.2. Hybridation

Etape 1. Préparer le 10X Blocking Agent

- 1) Ajouter 500 µL d'eau sans nucléases dans l'ampoule contenant l'agent de blocage lyophilisé 10X fourni avec l'Agilent Gene Expression Hybridization Kit, ou ajouter 1250 µL d'eau sans nucléases dans l'ampoule contenant l'Agent de blocage lyophilisé 10X à grand volume (Agilent p / n 5188 -5281).
- 2) Mélanger au vortex doucement. Si la pastille se dissout pas complètement, chauffer le mélange à 37 °C pendant 4 à 5 minutes.
- 3) Faire descendere tout le matériel adhérent aux parois ou au couvercle des tubes par centrifugation pendant 5 à 10 secondes.

Note: Le 10X Blocking Agent peut être préparé à l'avance et stocké à -20 °C jusqu'à 2 mois. Après décongélation, répéter les procédures de vortex et centrifugation avant utilisation.

Etape 2. Préparation des échantillons à hybrider

- 1) Equilibrer un bain d'eau à 60 °C.
- 2) Pour chaque puce à ADN, ajouter chacun des composants, comme indiqué dans le tableau ci-dessous au tube de centrifugeuse sans nucléases 1,5 mL:

Composant	Volume/1-pack puce	Volume/2-pack puce	Volume/4-pack puce	Volume/8-pack puce
Cy3-marqué, ARNc amplifié	2.5 µg	1.875 µg	825 ng	300 ng
Cy5-marqué, ARNc amplifié	2.5 µg	1.875 µg	825 ng	300 ng
10 X Blocage Agent	50 µL	25 µL	11 µL	5 µL
Eau sans nucléases	A 240 µL	A 120 µL	A 52.8 µL	A 24 µL
Tampon Fragmentation 25 X	10 µL	5 µL	2.2 µL	1 µL
Volume Total	250 µL	125 µL	55 µL	25 µL

- 3) Bien mélanger, mais doucement sur un vortex.
- 4) Incuber à 60 °C pendant exactement 30 minutes pour fragmenter l'ARN.
- 5) Refroidir immédiatement sur de la glace pendant 1 minute.

- 6) Ajouter le tampon d'hybridation HI-RPM 2x GEx pour les formats de puces à ADN 1-pack, 2-pack, 4-pack, et 8-pack au volume approprié pour arrêter la réaction de fragmentation.

Volumes pour chaque hybridation				
Composant	1-pack	2-pack	4-pack	8-pack
ARNc provenant du mélange de fragmentation	250 µL	125 µL	55 µL	25 µL
2x GEx tampon d'hybridation HI-RPM	250 µL	125 µL	55 µL	25 µL

- 7) Bien mélanger à la pipette de manière attentive. Prendre soin d'éviter d'introduire des bulles. Ne pas mélanger dans un mélangeur à vortex car ce type de mélange introduit des bulles.
- 8) Centrifuger pendant 1 minute à température ambiante à 13,000 rpm dans une microcentrifugeuse pour faire tomber l'échantillon sur les parois et le couvercle et pour aider diminuer les bulles. Utiliser immédiatement. Ne pas stocker.
- 9) Placer l'échantillon sur de la glace et charger sur la puce dès que possible.

Etape 3. Préparation de l'hybridation

- 1) Charger une lame de joint propre dans le fond de la chambre Agilent SureHyb avec l'étiquette vers le haut et alignée avec la section rectangulaire de la base de la chambre. S'assurer que le tiroir d'étanchéité est aligné avec le fond de la chambre et n'est pas ouvert.
- 2) Passer lentement le volume de l'échantillon d'hybridation (voir le tableau suivant) sur le joint ainsi à un "glisser-passer" manière.

Volumes pour chaque hybridation				
Composant	1-pack	2-pack	4-pack	8-pack
Volume préparé	500 µL	250 µL	110 µL	50 µL
Volume à hybrider	490 µL	240 µL	100 µL	40 µL

- 3) Placer lentement un tableau "côté actif" vers le bas sur la lame d'étanchéité de SureHyb, de sorte que le code à barres "Agilent" soit orienté vers le bas et le code à barres numérique soit orienté vers le haut. S'assurer que les deux lames sont correctement alignées dos à dos.
- 4) Placer le couvercle de la chambre SureHyb sur les lames en sandwich et faire glisser l'ensemble de serrage sur les deux pièces.

- 5) Serrer la pince sur la chambre.
- 6) Faire pivoter verticalement la chambre assemblée pour mouiller le joint et évaluer la mobilité des bulles. Si nécessaire, appuyer le montage sur une surface dure pour déplacer les bulles stationnaires.
- 7) Placer la chambre de coulissement montée sur la rôtissoire dans une étuve réglée sur 65 °C. Régler la rotation à 10 tours par minute pour l'utilisation du tampon d'hybridation 2x GEx HI-RPM.
- 8) Hybrider à 65 °C pendant 17 heures.

Étape 4. Lavage et lecture de la puce

- 1) Retirer la puce à ADN de la chambre et la placer dans un tube Falcon contenant 50 mL de solution de lavage 1 préchauffée. Attention à la lamelle qui va se détacher. Une fois qu'elle est tombée dans le liquide, retourner la lame pour éviter que la lamelle ne se retrouve en contact avec les spots de la puce.
- 2) Rincer la lame dans les solutions de lavage 2 puis 3 (effectuer 10 retournements du tube pour chaque étape de rinçage).
- 3) Essorer la puce en la plaçant dans un tube Falcon 50 mL contenant un morceau de papier absorbant et centrifuger à 500 g pendant 3 minutes.
- 4) Lire la puce avec le scanner G2505C Agilent.

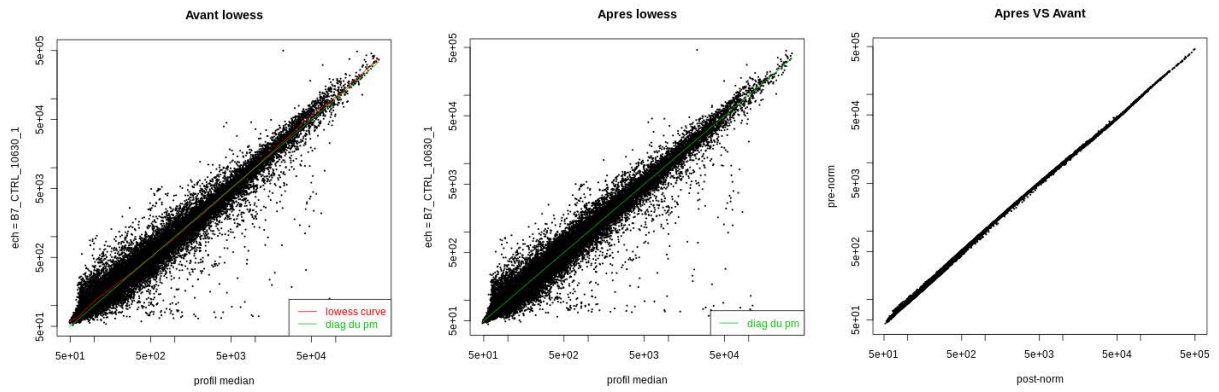
3.3. Analyse des données

3.3.1. Normalisation des données

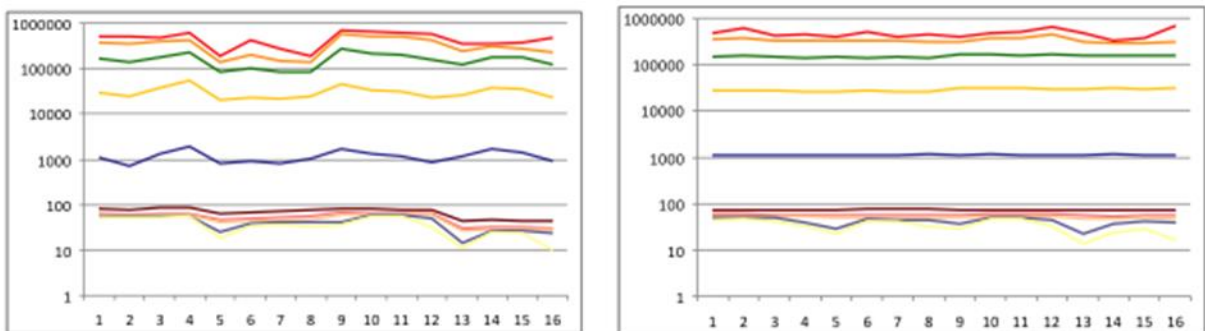
La première étape de l'analyse des données de puces à ADN, suite à la quantification du signal, est une étape de normalisation des données. En effet, plusieurs biais expérimentaux peuvent apparaître au cours des étapes de marquage, d'amplification et d'hybridation des différentes puces à ADN. Il est notamment connu que le taux d'incorporation des 2 fluorochromes utilisés pour les puces à ADN est différent. Il en résulte donc un signal plus important pour un fluorochrome que pour l'autre. De plus, la mesure de l'intensité de l'émission de fluorescence d'une lame à l'autre peut varier indépendamment des échantillons utilisés. Afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux, il est donc indispensable d'éliminer les biais expérimentaux par une étape de normalisation. Ces méthodes reposent sur l'hypothèse qu'une majorité des gènes n'a pas d'expression différentielle entre les conditions étudiées.

Il existe de nombreuses méthodes de normalisation des puces à ADN, plus ou moins spécifiques à la plateforme ou la technologie utilisée. Néanmoins, la méthode de Lowess (193, 318) reste une des méthodes les plus classiques dans ce domaine. Le lowess (locally weighted scatterplot smoothing) est une méthode de régression pondérée locale permettant d'éliminer les biais non linéaires (bruit de fond, saturation). Chaque échantillon va être normalisé par rapport à un profil de référence, comme par exemple le profil médian de tous les échantillons, à l'aide d'une fenêtre glissante. Une fonction de régression est calculée pour chaque fenêtre, ce qui va permettre de construire une courbe d'ajustement global pour normaliser les données. Un exemple est montré dans la Figure 42.

A.



B.



C.

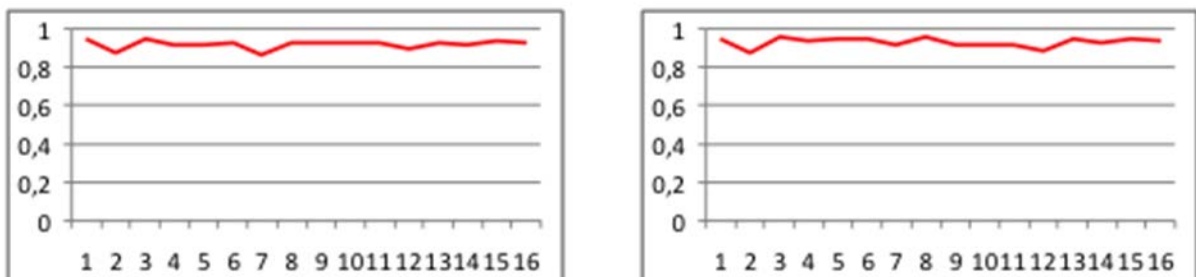


Figure 42. Normalisation des données à haut débit avec Lowess. A. Lowess; **B.** Statistiques descriptives avant et après normalisation; **C.** Corrélation de chaque échantillon par rapport au profil médian avant et après normalisation.

3.3.2. Clustering des données : K-Means

Une fois que les échantillons sont normalisés, on visualise les données grâce à la méthode de classification par k-means qui permet de regrouper entre eux les gènes et les échantillons qui se ressemblent le plus. Le principe de cette méthode est de calculer une distance, ou une corrélation, entre toutes les paires de gènes (ou d'échantillons) possibles afin de regrouper de manière ascendante les gènes (ou les échantillons) les plus similaires entre eux. Les groupes de gènes co-exprimés ont été identifiés par k-means, une méthode itérative ($i = 200$) k-means ($k = 10$) la procédure sur les données normalisées (log-transformées et les gènes centrés-médian) avec la corrélation de Pearson non-centrée comme mesure de similarité (239). Nous avons choisi de regrouper les gènes en 10 clusters. Chaque groupe de gènes a fait l'objet d'une classification hiérarchique à l'aide du logiciel Cluster 3.0 (300) afin de visualiser l'homogénéité des groupes. La visualisation des données a été effectuée à l'aide du logiciel Java Treeview (233, 234).

Dans ces figures, les échantillons (en colonne) et les gènes (en ligne) sont regroupés par leur similarité (Figure 43).

La corrélation de l'expression d'un certain nombre de gènes est sous-tendue par une même fonction biologique, ainsi que par des régulations communes par différents facteurs de transcription (319). L'étape suivante est d'analyser les fonctions biologiques des groupes de gènes par la Gene Ontology (GO).

3.3.3. Annotations fonctionnelles des clusters

Les annotations fonctionnelles permettent d'identifier les fonctions biologiques dans lesquelles sont impliqués les gènes d'un cluster. On utilise pour cela une ontologie (vocabulaire structuré et contrôlé) des gènes, en général GO. Le projet GO a été initié afin d'intégrer et d'uniformiser de manière cohérente les descriptions des gènes et produits de gènes de différentes bases de données (240). Un exemple est présenté sur la Figure 44, modifié d'après Ashburner, M *et al* (240). Plusieurs outils d'annotation ont été développés à partir des termes GO pour identifier des fonctions biologiques enrichies dans un groupe de gènes. Le principe de ces outils est d'identifier des termes GO

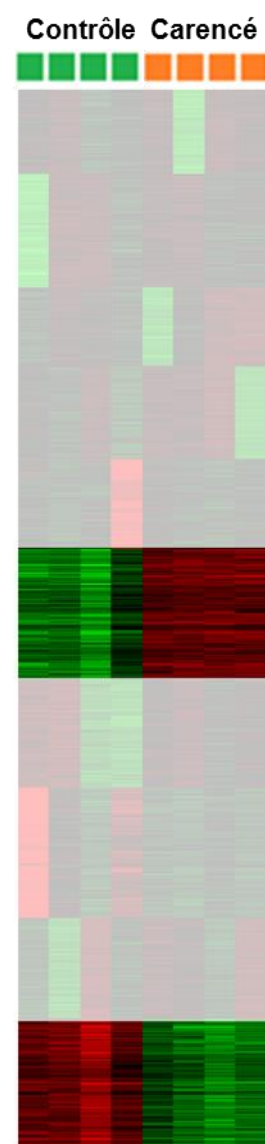
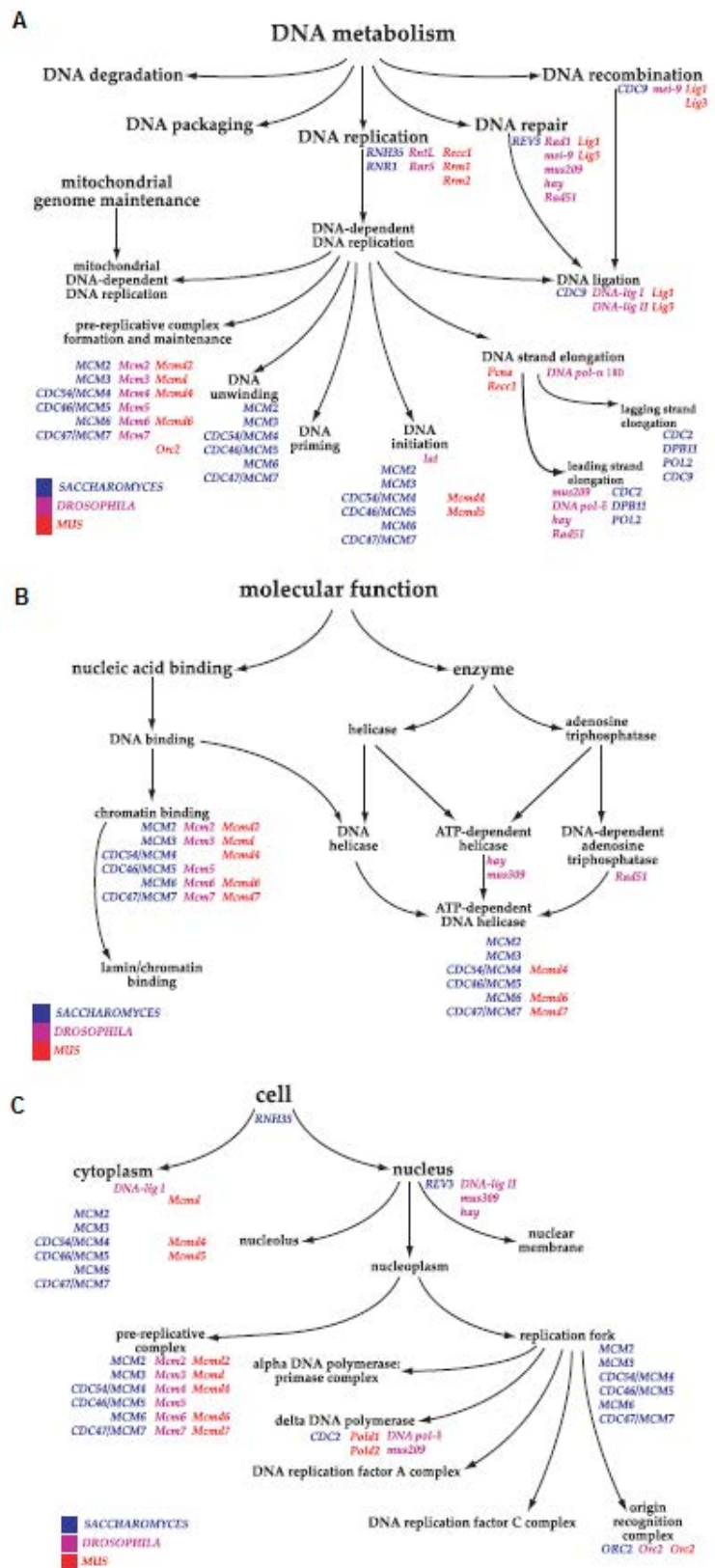


Figure 43. K-means : Première étape d'analyse des données du transcriptome. Rouge : surexprimé Vert : sous-exprimé par rapport à la médiane.

statistiquement sur- ou sous- représentés dans le groupe de gènes étudié par rapport à l'ensemble des gènes considérés dans l'étude.

L'outil que nous utilisons pour les annotations de groupes de gènes est l'outil GoMiner (241). A partir de la liste des gènes d'un groupe, et de la liste complète des gènes de la puce à ADN, cet outil fournit une liste d'annotations fonctionnelles, chacune associée à une p-valeur initiale et un taux de faux-positifs (FDR). En plus de cette p-value, nous effectuons un calcul d'enrichissement, afin de tenir compte du nombre de gènes ayant l'annotation

Figure 44. Exemples d'ontologies des gènes. Trois exemples illustrent la structure et le style utilisé par GO pour représenter les ontologies des gènes et associer des gènes avec des nœuds dans une ontologie. Les ontologies sont construites à partir d'un vocabulaire structuré et contrôlé. **A.** Ontologie du processus biologique. Cette section illustre une partie de l'ontologie du processus biologique décrivant le métabolisme de l'ADN. Notez qu'un nœud peut avoir plus d'un parent; par exemple, 'DNA ligation' a 3 parents 'DNA dependent DNA replication', 'DNA repair' et 'DNA recombination'. **B.** Ontologie de la fonction moléculaire. Cette ontologie n'est pas destinée à représenter une voie de réaction, mais reflète plutôt des catégories conceptuelles de la fonction des produits des gènes. Un produit du gène peut être associé à plus d'un nœud à l'intérieur d'une ontologie, comme cela est illustré pour les protéines MCM. Ces protéines ont été montrées comme pouvant se lier à la chromatine et possédant une activité d'hélicase d'ADN ATP-dépendant, et sont notées dans les deux nœuds. **C.** Ontologie de composants cellulaires. Les ontologies sont conçues pour une cellule eucaryote générique, et sont suffisamment flexibles pour représenter les différences connues entre les divers organismes.



considérée. En effet, selon la fonction, le nombre de gènes concernés peut être très variable, et le calcul de l'enrichissement permet en plus de savoir si l'annotation fonctionnelle est sur- ou sous-représentée dans le cluster, ce que n'indique pas la p-value.

3.4. Validation des résultats du transcriptome par RT-qPCR

Pour valider les résultats du transcriptome, nous avons choisi des gènes qui sont modifiés et des gènes non modifiés définis par l'analyse des puces à ADN pour validation par la technique RT-qPCR. La PCR quantitative (ou PCR en temps réel, qPCR) permet de quantifier avec sensibilité et précision le niveau d'expression des gènes pour les études de transcriptome.

La qPCR a été réalisée avec des TLDA (Taqman Low Density Array) d'Applied Biosystems. Il existe des TLDA pré-conçus (angiogénèse, alzheimer, apoptose, GPCR, inflammation, transporteurs ABC, cellules souches, kinases...), ou des TLDA personnalisés avec les gènes d'intérêts. Les amorces pour ces gènes sont pré-concues par Applied Biosystems. L'équipement de Q-PCR (ABI Prism 7900HT avec chargement robotisé, options microplaques 96, 384 ou cartes microfluidiques) permet de déterminer rapidement le profil d'expression d'un grand nombre de gènes sur plusieurs échantillons. L'utilisation des cartes microfluidiques développées par Applied Biosystems, préchargées en sonde TaqMan, permet de mesurer simultanément l'expression de 16 à 384 gènes (y compris gènes de référence et gènes d'intérêt). Cette technique est très sensible, reproductible et robotisée et permet de réaliser jusqu'à 5000 dosages par jour en utilisant des volumes de 1 à 2 μ L par réaction. Le matériel disponible sur la plateforme permet également de préparer et de contrôler la qualité des échantillons d'ARN.

Tableau 26. Liste des gènes choisis pour validation par RT-qPCR.

Assay ID	Gene Symbol	Gene Name
Hs99999901_s1	18S	Eukaryotic 18S rRNA
Rn00563121_m1	Acadl	acyl-CoA dehydrogenase, long chain
Rn00561094_m1	Ace	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1
Rn01789864_s1	Acot1	acyl-CoA thioesterase 1
Rn01506345_m1	Acs2a	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2A
Rn01759928_g1	Acta2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
Rn00667869_m1	Actb	actin, beta
Rn00593114_m1	Agt	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
Rn02758772_s1	Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1a
Rn01487515_m1	Akr1c2	aldo-keto reductase family 1, member C2
Rn00755277_m1	Aldh1a7	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7
Rn00560747_m1	Ar	androgen receptor

Rn00560747_m1	Ar	androgen receptor
Rn01490844_m1	Atf6	activating transcription factor 6
Rn00560865_m1	B2m	beta-2 microglobulin
Rn01528889_m1	Bmp7	bone morphogenetic protein 7
Rn01526721_m1	Col1a2	collagen, type I, alpha 2
Rn00682395_m1	Cpt1b	carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle
Rn01503161_m1	Dcn	decorin
Rn01027162_g1	Dnmt3a	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha
Rn01469994_g1	Dnmt3a	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha
Rn01469990_g1	Dnmt3a	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha
Rn00563336_m1	Egf	epidermal growth factor
Rn00592815_m1	Elovl6	ELOVL fatty acid elongase 6
Rn00565061_m1	Fabp2	fatty acid binding protein 2, intestinal
Rn04219642_g1	Fgf21	fibroblast growth factor 21
Rn04222952_m1	Gsta2	glutathione S-transferase A2
Rn00566655_m1	Gusb	glucuronidase, beta
Rn00565886_m1	Hmbs	hydroxymethylbilane synthase
Rn01527840_m1	Hprt1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
Rn00565713_m1	Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein 1
Rn00580432_m1	Il1b	interleukin 1 beta
Rn02116660_s1	LOC494499	LOC494499 protein
Rn01538170_m1	Mmp2	matrix metalloproteinase 2
Rn01444705_g1	Mrpl43	mitochondrial ribosomal protein L43
Rn01421756_m1	Nnmt	nicotinamide N-methyltransferase
Rn00585577_m1	Pdk4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4
Rn01482578_m1	Plat	plasminogen activator, tissue
Rn01500926_m1	Pon3	paraoxonase 3
Rn00440945_m1	Pparg	peroxisome proliferator activated receptor gamma
Rn00440940_m1	Pparg	peroxisome proliferator activated receptor gamma
Rn00580241_m1	Ppargc1a	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha
Rn00598552_m1	Ppargc1b	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta
Rn00821477_g1	Slc25a4	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4
Rn00578319_m1	Smad7	SMAD family member 7
Rn00572010_m1	Tgfb1	transforming growth factor, beta 1
Rn00573232_m1	Timp2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
Rn01511604_m1	Vegfa	vascular endothelial growth factor A

La conception de la plaque permet de mesurer simultanément l'expression de 48 gènes y compris 6 gènes de référence : 18s, Actb, B2m, Gusb, Hmbs et Hprt1 (Figure 45).

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	Acatd1	Ace	Acof1	Acs2a	Acta2	Actb	Agtr1a	Akr1c2	Pparg	Aldh1a7	18s	Ar	Ar	Atf6	Bmp7	Col1a2	Cpt1b	Dcn	Dnm3a	Dnm3a	Egf	Elovl6	Fabp2	Egf21
2	Gsta2	LOC49449 s	Igf1p1	Ii1b	Mmp2	Mrp143	Nmna	Pdk4	Pparg1a	Pparg1b	Plat	Pon3	Slc25a4	Pparg	Smad7	Tgfb1	Timp2	Vegfa	Dnm3a	Hprt1	Gusb	B2m	Hmbs	Actb
3	Acatd1	Ace	Acof1	Acs2a	Acta2	Actb	Agtr1a	Akr1c2	Pparg	Aldh1a7	18s	Ar	Ar	Atf6	Bmp7	Col1a2	Cpt1b	Dcn	Dnm3a	Dnm3a	Egf	Elovl6	Fabp2	Egf21
4	Gsta2	LOC49449 s	Igf1p1	Ii1b	Mmp2	Mrp143	Nmna	Pdk4	Pparg1a	Pparg1b	Plat	Pon3	Slc25a4	Pparg	Smad7	Tgfb1	Timp2	Vegfa	Dnm3a	Hprt1	Gusb	B2m	Hmbs	Actb
5	Acatd1	Ace	Acof1	Acs2a	Acta2	Actb	Agtr1a	Akr1c2	Pparg	Aldh1a7	18s	Ar	Ar	Atf6	Bmp7	Col1a2	Cpt1b	Dcn	Dnm3a	Dnm3a	Egf	Elovl6	Fabp2	Egf21
6	Gsta2	LOC49449 s	Igf1p1	Ii1b	Mmp2	Mrp143	Nmna	Pdk4	Pparg1a	Pparg1b	Plat	Pon3	Slc25a4	Pparg	Smad7	Tgfb1	Timp2	Vegfa	Dnm3a	Hprt1	Gusb	B2m	Hmbs	Actb
7	Acatd1	Ace	Acof1	Acs2a	Acta2	Actb	Agtr1a	Akr1c2	Pparg	Aldh1a7	18s	Ar	Ar	Atf6	Bmp7	Col1a2	Cpt1b	Dcn	Dnm3a	Dnm3a	Egf	Elovl6	Fabp2	Egf21
8	Gsta2	LOC49449 s	Igf1p1	Ii1b	Mmp2	Mrp143	Nmna	Pdk4	Pparg1a	Pparg1b	Plat	Pon3	Slc25a4	Pparg	Smad7	Tgfb1	Timp2	Vegfa	Dnm3a	Hprt1	Gusb	B2m	Hmbs	Actb
9	Acatd1	Ace	Acof1	Acs2a	Acta2	Actb	Agtr1a	Akr1c2	Pparg	Aldh1a7	18s	Ar	Ar	Atf6	Bmp7	Col1a2	Cpt1b	Dcn	Dnm3a	Dnm3a	Egf	Elovl6	Fabp2	Egf21
10	Gsta2	LOC49449 s	Igf1p1	Ii1b	Mmp2	Mrp143	Nmna	Pdk4	Pparg1a	Pparg1b	Plat	Pon3	Slc25a4	Pparg	Smad7	Tgfb1	Timp2	Vegfa	Dnm3a	Hprt1	Gusb	B2m	Hmbs	Actb
11	Acatd1	Ace	Acof1	Acs2a	Acta2	Actb	Agtr1a	Akr1c2	Pparg	Aldh1a7	18s	Ar	Ar	Atf6	Bmp7	Col1a2	Cpt1b	Dcn	Dnm3a	Dnm3a	Egf	Elovl6	Fabp2	Egf21
12	Gsta2	LOC49449 s	Igf1p1	Ii1b	Mmp2	Mrp143	Nmna	Pdk4	Pparg1a	Pparg1b	Plat	Pon3	Slc25a4	Pparg	Smad7	Tgfb1	Timp2	Vegfa	Dnm3a	Hprt1	Gusb	B2m	Hmbs	Actb
13	Acatd1	Ace	Acof1	Acs2a	Acta2	Actb	Agtr1a	Akr1c2	Pparg	Aldh1a7	18s	Ar	Ar	Atf6	Bmp7	Col1a2	Cpt1b	Dcn	Dnm3a	Dnm3a	Egf	Elovl6	Fabp2	Egf21
14	Gsta2	LOC49449 s	Igf1p1	Ii1b	Mmp2	Mrp143	Nmna	Pdk4	Pparg1a	Pparg1b	Plat	Pon3	Slc25a4	Pparg	Smad7	Tgfb1	Timp2	Vegfa	Dnm3a	Hprt1	Gusb	B2m	Hmbs	Actb
15	Acatd1	Ace	Acof1	Acs2a	Acta2	Actb	Agtr1a	Akr1c2	Pparg	Aldh1a7	18s	Ar	Ar	Atf6	Bmp7	Col1a2	Cpt1b	Dcn	Dnm3a	Dnm3a	Egf	Elovl6	Fabp2	Egf21
16	Gsta2	LOC49449 s	Igf1p1	Ii1b	Mmp2	Mrp143	Nmna	Pdk4	Pparg1a	Pparg1b	Plat	Pon3	Slc25a4	Pparg	Smad7	Tgfb1	Timp2	Vegfa	Dnm3a	Hprt1	Gusb	B2m	Hmbs	Actb

Figure 45. Design de la plaque de TLDA.

3.4.1. Rétrotranscription des ARNs

Le High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit contient tous les réactifs nécessaires pour la transcription inverse (RT) des ARNs totaux en simple brin d'ADNc dans un volume de réaction de 20 µL. Le protocole est optimisé jusqu'à 2 µg d'ARN. Toutes les étapes doivent être réalisées dans la glace pour éviter la dégradation des ARNs.

Composants :

- Tampon 10× RT
- MultiScribe™ Reverse Transcriptase
- RT Primer Mix
- 25× dNTP Mix (100 mM)

Procédure :

1) Préparation des échantillons à 10 µL

Composants	Volume/Réaction (μL)	33 reactions (μL)
	Kit without RNase Inhibitor	
10 \times RT Buffer	2	66
25 \times dNTP Mix (100 mM)	0.8	26.4
10 \times RT Random Primers	2	66
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1	33
RNase Inhibitor	-	
Nuclease-free H ₂ O	4.2	138.6
Total	10	330

Décongeler les échantillons d'ARN dans la glace, ainsi que le Tampon 10 \times RT, MultiScribe™ Reverse Transcriptase, RT Primer Mix et 25 \times dNTP Mix (100 mM).

Pour chaque échantillon, prendre 1 μg pour faire la RT. Diluer les échantillons pour obtenir un volume final de 10 μL . Préparer 2 RT pour doubler.

2) Préparation de 2x RT Master Mix

Préparer le 2x RT Master Mix en utilisant les composants de la trousse avant de préparer la plaque de réaction. Bien mélanger et centrifuger brièvement pour récupérer le contenu sur les parois et le couvercle.

3) Préparation des réactions

- ⇒ Pipetter 10 μL du 2 \times RT master mix dans les tubes individuels.
- ⇒ Pipetter 10 μL d'échantillon d'ARN dans chaque tube, pipetter de haut en bas deux fois pour mélanger.
- ⇒ Sceller les tubes.
- ⇒ Centrifuger brièvement les tubes pour récupérer le contenu sur les parois et le couvercle et pour éliminer les bulles.
- ⇒ Placer les tubes sur la glace jusqu'au chargement dans le thermocycleur.

Composants	Volume (μL)
2 \times RT master mix	10
ARN	10
Total	20

4) Effectuer la transcription inverse

Important : Ces conditions sont optimisées pour une utilisation avec le High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Régler le volume de réaction à 20 μ L.

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Température (°C)	25	37	85	4
Time	10 min	120 min	5 min	∞

3.4.2. PCR Quantitative

Durée de stockage	Température de stockage (°C)
stockage à court terme (24 heures avant utilisation)	2 à 6
stockage à long terme	-15 à -25

Les amorces sont déjà présentes dans la plaque pour chaque amplicon.

TaqMan® Universal PCR Master Mix:

- AmpliTaq Gold® DNA Polymérase, UP(Ultra Pure)
- Uracyl-N glycosylase (UNG)
- NTPs avec dUTP
- ROX™ Référence passive
- Composants tampons optimisés

1) Préparer un mélange réactionnel en utilisant le tableau suivant :

Composants	Volume (μ L)
TaqMan® Universal PCR Master Mix	50
RNase-Free Water	30
ADNc	20
Total	100

2) Déposer le mélange réactionnel de l'échantillon dans les réservoirs de la plaque TLDA

⇒ Placer la plaque de TaqMan sur un banc de laboratoire, avec le côté de la feuille vers le bas.

⇒ Déposer 100 μ L de mélange de réaction spécifique à la PCR pour l'échantillon désiré dans une micropipette de 100 μ L.

⇒ Maintenir la micropipette dans une position inclinée et placer l'embout dans l'orifice de remplissage.

⇒ Répartir le mélange de la réaction afin qu'elle soit balayée dans et autour du réservoir de remplissage vers l'orifice d'évent.

3) Centrifugation de la plaque TLDA

Paramètres	EASYSset (touchpad)
Taux d'accélération	9
Taux de décélération	9
Vitesse	1,200 rpm (331 × g)
Temps de centrifugation	2 × 1 min

Une fois que les réservoirs de remplissage ont été chargés avec des échantillons d'ADNc, la plaque est centrifugée pour distribuer les échantillons d'ADNc dans les puits de réaction.

3.4.3. Analyse des résultats

La quantité relative des différents gènes normalisés à l'expression de gènes de ménage a été calculée par la formule $2^{-\Delta\Delta C_t}$ où $\Delta\Delta C_t = (C_t \text{ gene} - C_t \text{ reference})_{MDD} - (C_t \text{ gene} - C_t \text{ reference})_{\text{Contrôle}}$. Des tests de Student ont été effectués avec un niveau de significativité de 0,05.

Ensuite les résultats de TLDA sont comparés avec les résultats de la puce à ADN pour voir s'ils sont bien cohérents avec les résultats du transcriptome.

4. Mesure de la méthylation de l'ADN : MeDIP-CHIP (Roche NimbleGen)

4.1. Extraction de l'ADN

4.1.1. Extraction de l'ADN avec phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1)

- **Matériels**

① Acétate ammoniacal 7.5 M (n° 1302 77.08 g/ mol)

57.81 g /100 ml Réalisé par filtrage et conservé à 4 °C ou TA

② Tris 0.5 M PH 8.0 (121.14g/mol)

6.057 g/100 ml Ajuster à PH 8.0 avec de l'Hcl

③ EDTA 0.5 M PH 8.0 (372.26g/mol)

18.613g/100ml Ajuster à PH 8.0 avec du bicarbonate/de la soude

④ TE PH 8.0

10 ml de Tris	0.5 M	PH 8.0	} 50 ml TE
1 ml d'EDTA	0.5 M	PH 8.0	
39 ml eau			

⑤ Tampon de digestion

100 ml Nacl	1M	10 ml	} avec de l'eau jusqu'à 50 ml
10 ml Tris	0.5M PH 8.0	1 ml	
25 ml EDTA	0.5M PH 8.0	2.5 ml	
0.5% SDS	2.5 g	0.25 g	

→10 ml Tampon + 50 µl protéine K (0.1ug/ml)

⑥ Nacl 1M (58.44g/mol) 5.844 g/100 ml

②, ③, ④ et ⑥ exigent un passage à l'autoclave.

- **Préparation des cellules**

Tissus : 25-30mg

Tampon de digestion : 1.2ml/100mg tissus (on met à peu près 300 µL)

⇒ Dès que possible après l'excision, hacher rapidement les tissus et les congeler dans l'azote liquide.

⇒ Broyer les tissus avec un mortier et un pilon préalablement refroidi, ou écraser avec un marteau en une fine poudre.

⇒ Suspender le tissu en poudre dans 1,2 ml de tampon de digestion par 100 mg de tissu sans grumeaux.

- **Lyse des cellules**

⇒ Incuber les échantillons à 50 °C pendant 12-15h dans des tubes bien fermés.

- ❖ Les échantillons seront visqueux. Le tissu sera peut-être presque indiscernable après 12h d'incubation, une boue devrait être observée à partir des échantillons d'organes et les cellules en culture devront être relativement claires.

- **Extraction des Acides Nucléiques**

⇒ Extraire complètement les échantillons avec un volume égal de phénol / chloroforme / alcool isoamylique.

- ❖ Attention : Le phénol est extrêmement caustique.

⇒ Centrifuger 10 minutes à 1700 x g dans un rotor.

- ❖ Si les phases ne séparent pas bien, ajouter un autre volume de tampon de digestion, sans protéinase K, et répéter la centrifugation.
- ❖ S'il existe une couche épaisse de matériau blanc à l'interface entre les phases, répéter l'extraction organique.

- **Purification de l'ADN**

⇒ Transférer la phase aqueuse (supérieure) dans un nouveau tube et ajouter 1/2 volume de 7,5 M d'ammonium acétate et 2 volumes (d'un montant initial de la couche supérieure) d'éthanol à 100%. L'ADN devrait former immédiatement un précipité filandreux. Récupérer l'ADN par centrifugation à 1700 x g pendant 2 minutes.

⇒ Rincer le culot avec de l'éthanol 70%. Décanter l'éthanol et sécher le culot à l'air libre.

- ❖ Il est important de bien rincer pour enlever les résidus de sel et de phénol.

⇒ Remettre en suspension l'ADN à ~1 mg/ml dans du tampon TE jusqu'à dissolution. Agiter doucement à température ambiante ou à 65 °C pendant plusieurs heures pour faciliter la solubilisation. Conserver à 4 °C.

- ❖ A partir de 1 g de cellules de mammifère, ~2mg de l'ADN peuvent être attendus.

- ❖ Si nécessaire, le résiduel de l'ARN peut être éliminé à cette étape par ajouter du sodium de dodécylsulfate à 0,1% (SDS) et 1µg/ml de DNase-free RNase (UNIT 3.13) et les incuber à 37°C pendant 1h, suivie par une extraction organique et précipitation à l'éthanol, comme ci-dessus.

4.1.2. Quantification de l'ADN

Voir plus haut (3.1.2.1)

4.2. MeDIP-Chip

4.2.1. MeDIP (Methylated DNA immunoprecipitation)

- **Mise au point de la sonication**

- ⇒ Prendre 4µg d'ADN dans 200 µL.
- ⇒ Ajouter 0.6 µL de RNase A (concentration finale de 30 µg/mL).
- ⇒ Incuber 2h à 37°C.
- ⇒ Déposer sur glace.
- ⇒ Sonication 30sec ON/30 sec OFF en position High.
- ⇒ Prélever 10 µL d'ADN à T0 puis après chaque pulse de sonication.
- ⇒ Déposer sur gel d'agarose 1.5%.
- ⇒ On veut des fragments entre 200 et 1000 pb avec une majorité des fragments autour de 500 pb.

- **Préparation de l'ADN génomique : traitement à la RNase**

- ⇒ Prendre 4 µg d'ADN dans 200 µL.
- ⇒ Ajouter 0.6 µL de RNase A (concentration finale de 30µg/mL).
- ⇒ Incuber 2h à 37°C.

- **Sonication de l'ADN génomique**

- ⇒ Soniquer l'ADN : 30sec ON / 30 sec OFF, sonicateur en position high (temps de sonication déterminé après mises au point).
- ⇒ Prélever 10 µL d'ADN soniqué pour le contrôle sur gel d'agarose 1%.
- ⇒ Précipiter l'ADN soniqué : ajouter 1µL Glycogène, 20 µL NaCl 5M (0.1 volume), 400 µL d'éthanol 100% (2 volumes).

- ⇒ Placer 1h à -80°C (ou une nuit).
- ⇒ Centrifuger 15min à 4°C à 13000 rpm.
- ⇒ Eliminer le surnageant.
- ⇒ Rincer le culot avec 120 µL d'EtOH 70% (0,3 volumes).
- ⇒ Centrifuger 15min à 4°C à 13000 rpm.
- ⇒ Eliminer le surnageant.
- ⇒ Laisser sécher les culots.
- ⇒ Reprendre le culot dans 30 µL de l'eau.
- ⇒ Doser au NanoDrop.

- **Immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP)**

- ⇒ Mettre 2 µg d'ADN dans un tube de 1.5 mL et compléter à 450 µL avec H₂O.
- ⇒ Prélever 45µL (input) et conserver au réfrigérateur jusqu'à l'étape d'élution.
 - ❖ L'Input n'est pas nécessaire si l'on compare directement le contrôle et le carencé.
- ⇒ Dénaturer 10 minutes à 95°C et placer immédiatement sur glace. Laisser 10 min.
- ⇒ Ajouter 51 µL de 10x IP buffer.
- ⇒ Ajouter 5 µL d'anticorps anti-5méthyl-C.
- ⇒ Incuber sur la nuit à 4°C sous agitation.
- ⇒ Resuspendre 40 µL de Dynabeads avec 800 µL PBS-BSA 0.1%, Agiter 5 minutes à température ambiante, Eliminer le surnageant.
- ⇒ Resuspendre à nouveau les billes avec 800 µL PBS-BSA 0.1%, Agiter 5 minutes à température ambiante, puis éliminer le surnageant.
- ⇒ Resuspendre dans 40 µL de 1x IP buffer.
- ⇒ Ajouter les billes au mélange Anticorps-ADN.
- ⇒ Incuber 2h à 4°C sous agitation.
- ⇒ Enlever le surnageant.
- ⇒ Laver avec 700 µL 1x IP buffer, agiter 10 minutes à température ambiante, éliminer le surnageant.
- ⇒ Laver avec 700 µL 1x IP buffer, agiter 10 minutes à température ambiante, éliminer le surnageant.
- ⇒ Laver avec 700 µL 1X IP buffer, changer de tube, agiter 10 min à température ambiante, éliminer le surnageant.

- **Elution**

- ⇒ Resuspendre les billes dans 250 μ L Proteinase K digestion buffer.
- ⇒ Ajouter 205 μ L de Proteinase K digestion buffer à l'input.
- ⇒ Ajouter 3.5 μ L proteinase K (20 mg/ml stock).
- ⇒ Incuber 3 heures à 50°C sous agitation en thermomixer à 800 rpm.
- ⇒ Récupérer le surnageant dans un nouveau tube.

- **Purification de l'ADN**

Extraction d'ADN par phénol-chloroforme

- ⇒ Préparer des tubes phase lock (2 ml).
- ⇒ Centrifuger la phase lock 30 sec, 13000 rpm.
- ⇒ Y mettre les IP et les inputs et ajouter 500 μ L de Phénol-SEVAG (=Phénol : chloroforme : alcool isoamylique).
- ⇒ Mélanger 10 s par agitation puis centrifuger 3 min, 13000 rpm.
- ⇒ Ajouter 300 μ L de Phénol-SEVAG.
- ⇒ Mélanger 10 s par agitation puis centrifuger 3 min, 13000rpm.
- ⇒ Ajouter 300 μ L de SEVAG.
- ⇒ Mélanger 10 s par retournements puis centrifuger 3 min, 13000 rpm.
- ⇒ Mettre la phase supérieure dans un nouveau tube 1,5 ml (env 200 μ L).
- ⇒ Ajouter 20 μ l de NaCl 5M (0,1 vol),
 1 μ l glycogène (20 μ g/ μ L)
 400 μ l d'EtOH 95% glacé (2 vol)
- ⇒ Incuber 1h à -80°C.
- ⇒ Centrifuger 15min à 13000 rpm à 4°C.
- ⇒ Enlever le surnageant.
- ⇒ Laver les culots avec 120 μ L EtOH 70%.
- ⇒ Centrifuger 15min à 13000 rpm à 4°C.
- ⇒ Sécher les culots.
- ⇒ Reprendre dans 30 μ L de l'eau.

Dosage au nanodrop module ssDNA-30 et contrôle par qPCR

Réactifs

[PBS-BSA 0.1%](#) 9 ml PBS
 1 ml BSA 10 mg/ml stock

[10x IP buffer](#) 100 mM Na-Phosphate pH 7.0
 1.4 M NaCl
 0.5 % Triton X-100

(10x and 1x IP buffer peuvent être conservés à température ambiante pendant plusieurs semaines.

[1 M Na-Phosphate pH 7.0](#) 39 ml 2 M monobasic sodium phosphate (NaH₂PO₄) (276g/L)
 61 ml 2 M dibasic sodium phosphate (Na₂HPO₄)(284 g/L)
 100 ml H₂O

[Proteinase K digestion buffer](#) 50 mM Tris pH 8.0
 10 mM EDTA
 0.5 % SDS

4.2.2. Contrôle-qualité du MeDIP par qPCR

Les oligonucléotides méthylés et non-méthylés (TSH2B et GAPDH), fournis par Diagenode et ajoutés dans le mix de préparation de l'échantillon, servent à contrôler l'efficacité du MeDIP par qPCR (avec le SYBR Green, sur le Rotor-Gene) sur ces séquences, avec des amorces fournies dans le kit.

Matériel et réactifs

- **Power SYBR Green 2x**
- **BSA 10X ultra pure**
- **Primer Up/Low 10 μM (GAPDH et TSH2B)**
- **Echantillons IP**
- **Plaque 96 puits**

- **Préparation des échantillons**

⇒ Préparation des primers à 10 μM : Mélanger 1 μL de chaque primer 1 mM avec 98 μL d'eau.

⇒ Préparation du mix de PCR (volumes pour un puits)

BSA 10X	1 μL
Primers 10 μM	0,5 μL
SYBR Green	7,5 μL

⇒ Déposer 9 μL de mix par puits.

⇒ Préparation des échantillons.

Les échantillons sont déposés en duplicat sur la plaque.

⇒ Déposer 6 μL d'échantillon et de l'input dans les puits contenant le mix de PCR.

⇒ Filmer la plaque en prenant soin de ne pas toucher le film.

⇒ Centrifuger 2 min, 2000 rpm.

Remarque : la plaque peut être conservée quelques heures à 4 °C.

- **Préparation du run**

Assay: Standard Curve (AQ)

Container: 96 wells clear plate

Template: Blank template

Add detector → cliquer sur sybr SYBR

Sample volume : 15 μL

- **Lancer le run de la plaque**

- **Analyser**

Avant d'effectuer les calculs, vérifier que le Ct du blanc est indéterminé, et que l'ADNg s'est bien amplifié (vérification des courbes et des Ct).

Pour les échantillons qui ont un Ct indéterminé, nous leur donnerons la valeur de 40 afin de calculer le rendement et l'enrichissement.

Calculs :

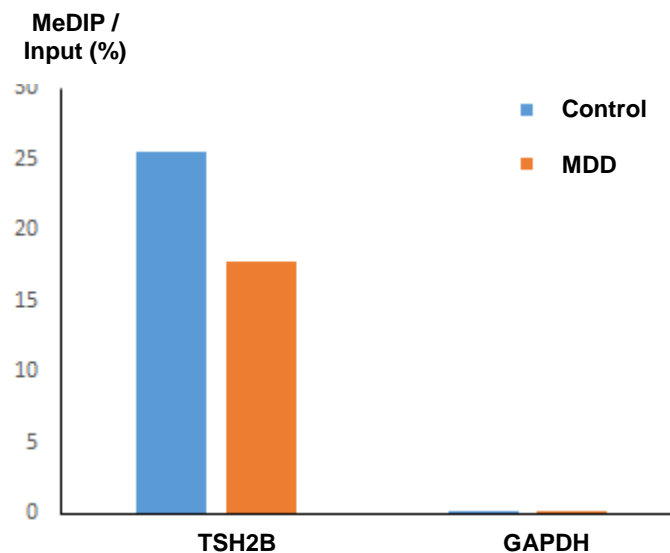
Le taux de récupération est, pour une séquence étudiée, son pourcentage dans l'IP par rapport à sa quantité dans l'Input. Il est idéalement de 100% si tous les fragments méthylés sont immunoprécipités et se calcule à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Taux de récupération } \frac{\text{MeDIP}}{\text{Input}} (\%) = 2^{(\text{Ct Input} - \text{Ct MeDIP})} \times \text{Fd} \times 100\%$$

Fd : Facteur de dilution de l'Input. Par exemple, si 100 μL de l'échantillon soniqué ont été utilisés pour faire le MeDIP et 20 μL de l'échantillon soniqué ont été utilisés comme Input, Le Fd=1/5. Si le facteur de dilution est de 10, le taux de récupération = $2^{[(\text{Ct Input} - 3,32) - \text{Ct IP}]} \times 100$, où Ct Input et Ct IP sont les cycles de seuil (cycle threshold) de l'input et de l'échantillon immunoprécipité respectivement. Le facteur de correction 3,32 est appliqué puisque seulement 10% de l'échantillon est utilisé comme input ($2^{3,32} = 10$).

En comparant les résultats obtenus entre les oligonucléotides contrôles méthylés et non-méthylés, on déduit l'enrichissement en séquences méthylées avec la formule suivante :

$$\text{facteur d'enrichissement} = \frac{\text{taux de récupération de l'ADN méthylé}}{\text{taux de récupération de l'ADN non - méthylé}}$$



4.2.3. Amplification de l'ADN après ChIP

Réactifs et matériels

WGA2 Kit à -20 °C; Thermocycleur; Speed vacuum préchauffé pendant 30 min; Glace; QIAquick PCR cleanup.

ATTENTION ! Ceci n'est pas le protocole d'origine. Sur de l'ADN génomique, il est nécessaire de faire une phase de fragmentation ! Après un ChIP, l'ADN est déjà fragmenté

- **Préparation des échantillons**

- ⇒ Préparation des Inputs : mettre 10 ng d'ADN dans un volume de 10 µL de l'eau.
- ⇒ Préparation des IP : lyophiliser les 30 µL d'ADN au speed-vac et les reprendre dans 10 µL de l'eau.
- ⇒ Transférer chaque échantillon dans un tube de 0.2 ml pour PCR.

- **Préparation de la bibliothèque**

- ⇒ Mettre 2 µL de Library Preparation Buffer 1X → vortex ou aller-retour, centrifugation rapide.
- ⇒ Ajouter 1 µL de Library Stabilization Solution → vortex ou aller-retour, centrifugation rapide.
Mettre les tubes 2 min à 95° C → dans la glace directement et centrifugation rapide.
- ⇒ Ajouter 1 µL de Library Preparation Enzyme → vortex ou aller-retour, centrifugation rapide.
- ⇒ Incuber : 20 min, 16°C
20 min, 24°C
20 min, 37°C
5 min, 75°C
Inf, 4°C

Centrifugation rapide, amplification *Conservation possible à -20°C jusqu'à 3 jours.*

- **Amplification (Round 1)**

- ⇒ Préparer le Master Mix (pour un tube)

Amplification Master Mix 10X 7.5 μ L

H2O nuclease-free 47.5 μ L

WGA DNA Polymerase 5 μ L

⇒ Incuber : 3 min, 95 °C

15 sec, 94 °C

5 min, 65 °C

4 °C

}
} 14 cycles

⇒ Purification QIAquick PCR cleanup columns.

Dosage des ADNs au NanoDrop : 1 à 4 μ g attendu(s)

Conservation à -20 °C

Une seconde phase d'amplification est possible à partir de **15 ng de produit dans 10 μ L**

- **Amplification (Round)**

⇒ Préparer les échantillons: mettre 15 ng de chaque échantillon dans un volume final de 10 μ l

⇒ Préparer le Master Mix (pour un tube)

Amplification Master Mix 10X 7.5 μ L

H2O nuclease-free 47.5 μ L

WGA DNA Polymerase 5 μ L

⇒ Incuber : 3 min, 95°C

15 sec, 94°C

5 min, 65°C

4°C

}
} 14 cycles

⇒ Purification sur QIAquick PCR cleanup columns

Dosage des ADNs au NanoDrop : 1 à 4 μ g attendu(s)

Conservation à -20 °C

4.2.4. Marquage des échantillons (NimbleGen Dual-Color Labeling Kit)

Avant de commencer

- Aliquoter les dNTPs et les amorces marquées aux cyanines en quantité suffisante pour un usage unique.
- Aliquoter une solution de NaCl 5M pour précipiter. Le vortexer ou chauffer si nécessaire.

1) Préparation des solutions dans un tube de centrifugeuse à 1.5ml

Random Primer Buffer	All Array Formats	Notes
Random Primer Buffer (vial2)	998.25 µL	Préparer un tampon frais chaque fois que les amorces sont remises en suspension.
β-Mercaptoethanol*	1.75 µL	
Total	1ml	

*Ne pas utiliser de β-Mercaptoéthanol provenant d'une bouteille ouverte depuis plus de 8 mois.

2) Centrifuger les Cy3-Random et Cy5-Random Nonamers. Diluer chaque amorce dans 462 µL de tampon Random Primer avec du β-mercaptoéthanol. Aliquoter en volume de 40 µL pour une réaction individuelle dans des tubes PCR de 0,2 ml et conserver à -20 ° C.

❖ Ne pas utiliser des amorces diluées depuis plus de 4 mois.

3) Assembler des échantillons expérimentaux et de contrôles dans tubes PCR 0,2 ml séparément.

Composant	3 x 720k Arrays	
	Echantillon expérimental	Echantillon contrôle
Echantillons préparées 4.2.3	1 µg	1 µg
Cy3-Random Nonamers dilué dans l'étape 2)	/	40 µL
Cy5-Random Nonamers dilué dans l'étape 2)	40 µL	/
Eau sans nucléase	A volume 80 µL	A volume 80 µL
Total	80 µL	80 µL

4) Chauffer et dénaturer les échantillons dans un thermocycleur à 98 °C pendant 10 minutes. Refroidir rapidement dans un bain d'eau glacée pendant 2 minutes.

❖ Le refroidissement rapide après la dénaturation est essentiel pour l'hybridation à haut rendement.

5) Préparer le mix de dNTP/Klenow pour chaque échantillon de l'étape précédente.

- ❖ Conservez tous les réactifs et le mix de dNTP / Klenow sur la glace. Ne pas vortexer après l'addition de Klenow.

dNTP/Klenow Master Mix :Recipe per Sample	All Arrays Formats	
	Echantillon expérimental	Echantillon contrôle
10 mM Dntp Mix (vial 6)	10 µL	
Eau sans nucléase (vial 1)	8 µL	
Klenow Fragment (3'→5' exo-) 50µ/µl (vial 5)	2 µL	
Total	20 µL	

- 6) Ajouter 20 µL du mix dNTP / Klenow déjà préparé à l'étape 5 à chacun des échantillons dénaturés. Conserver sur la glace.

Composant	All Arrays Formats	
	Echantillon expérimental	Echantillon contrôle
Volume de réaction à l'étape 4)	80 µL	80 µL
dNTP/Klenow Master Mix à l'étape 5)	20 µL	20 µL
Total	100 µL	100 µL

- 7) Bien mélanger par aspiration et refoulement 10 fois avec la pipette.
- ❖ Ne pas vortexer après l'addition de Klenow.
- 8) Centrifuger rapidement pour recueillir le contenu dans le fond du tube.
- 9) Incuber pendant 3 heures dans un thermocycleur à 37 °C avec le couvercle bien fermé, protéger de la lumière.
- 10) Arrêter la réaction par ajouter de « Stop Solution » (0.5 M EDTA).

Composant	All Arrays Formats	
	Echantillon expérimental	Echantillon contrôle
Volume de réaction à l'étape 6)	100 µL	100 µL
Stop Solution (0.5M EDTA) (vial7)	10 µL	10 µL
Total	110 µL	110 µL

- 11) Ajouter du NaCl à 5M à chaque tube.

Composant	All Arrays Formats	
	Echantillon expérimental	Echantillon contrôle
Volume de réaction à l'étape 10)	110 μL	110 μL
5M NaCl (vial8)	11.5 μL	11.5 μL
Total	121.5 μL	121.5 μL

12) Vortexer brièvement, centrifuger, et transférer tout le contenu dans un tube de 1,5 ml contenant de l'isopropanol.

Composant	All Arrays Formats	
	Echantillon expérimental	Echantillon contrôle
Volume de réaction à l'étape 11)	121.5 μL	121.5 μL
Isopropanol	110 μL	110 μL
Total	231.5 μL	231.5 μL

13) Bien vortexer bien. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière.

14) Centrifuger à 12,000 x g pendant 10 minutes. Retirer le surnageant avec une pipette. le culot doit être rose (Cy3) ou bleu (Cy5).

15) Rincer le culot avec 500 μL de 80% d'éthanol déjà refroidi dans la glace. Déloger le culot de la paroi du tube par aspiration à plusieurs reprises.

16) Centrifuger à 12,000 x g pendant 2 minutes. Retirer le surnageant avec une pipette.

17) Sécher les produits dans un ADN-vacuum avec concentrateur sur feu doux jusqu'à ce qu'ils soient secs (environ 5 minutes), à l'abri de la lumière.

18) **STOP POINT** : Passer à l'étape 19, ou conserver les échantillons marqués à -20°C (jusqu'à un mois), à l'abri de la lumière.

19) Centrifuger les tubes brièvement avant l'ouverture. Réhydrater chaque culot dans 25 μL d'eau sans nucléases (vial 1) par réaction.

20) Vortexer pendant 30 secondes et centrifuger rapidement pour recueillir le contenu dans le fond du tube. Continuer à vortexer ou laisser reposer à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant environ 5 minutes ou jusqu'à ce que la pastille soit complètement réhydratée, puis de vortexer de nouveau rapidement et centrifuger.

21) Quantifier chaque échantillon par la formule suivante :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{Facteur Dilution}$$

Ou directement avec le spectrophotomètre NanoDrop

22) Sur la base de la concentration, calculer le volume de l'échantillon expérimental et contrôle requis pour chaque échantillon pour l'hybridation indiquée dans le tableau ci-dessous et combiner les deux échantillons dans un tube de 1,5 ml:

Echantillons	385K Array	4x72k Array	2.1M Array	3x720K Array
Expérimental	6 μg	4 μg	34 μg^*	15 μg
Contrôle	6 μg	4 μg	34 μg^*	15 μg

23) Sécher les produits dans un ADN vacuum avec concentrateur sur feu doux à l'abri de la lumière.

24) STOP POINT : Passer à l'étape de l'hybridation, ou conserver les échantillons marqués à -20°C (jusqu'à un mois), à l'abri de la lumière.

4.2.5. Hybridation & lavage

- **Préparation des échantillons**

1) Régler le système d'hybridation à 42 °C. Avec le couvercle fermé, il faudra au moins 3 heures pour que la température se stabilise.

❖ Faire attention à la température du système d'hybridation qui pourrait fluctuer pendant la stabilisation.

2) Reprendre le culot de l'échantillon séché dans l'échantillon de contrôle selon le tableau suivant. Utilisez un STC (Sample Tracking Control) unique pour remettre chaque échantillon à hybrider en suspension. Notez quel STC est utilisé pour chaque échantillon.

Component	3x720K Array
Reagent for resuspension	Sample Tracking Control
Volume to add to Cy-labeled Sample from step 23 in 4.2.4.	5.6 μL

- 3) Bien vortexer et centrifuger pour recueillir les produits au fond du tube.
- 4) Préparer le mix d'hybridation selon le tableau suivant, prévu pour une puce au format 3x720K. Pour hybrider plusieurs puces, modifier la quantité.

Mix d'hybridation pour une puce	3x720 K Puce
2X Hybridization Buffer (vial1)	35 µL
Hybridization Component A (vial2)	14 µL
Alignment Oligo (vial3)	1.4 µL
Total	50.4 µL

- 5) Ajouter la quantité appropriée de solution d'hybridation à chaque paire d'échantillons selon le tableau suivant:

Component	Each Sample Pair for a 3x720K Array
Resuspended sample from step 2	5.6 µL
Hybridization solution from step 4	14.4 µL
Total	20 µL

- 6) Bien vortexer (environ 15 secondes) et centrifuger pour recueillir les produits au fond du tube. Incubez à 95°C pendant 5 minutes, à l'abri de la lumière.
- 7) Mettre les tubes à 42°C (dans le bloc d'échantillon du système d'hybridation ou d'un bloc thermique) pour au moins 5 minutes. Vortexer et centrifuger avant le chargement.

- **Hybridation**

Charger les échantillons dans les 30 minutes suivant l'ouverture du robinet à vide-emballés pour empêcher la formation de bulles pendant le chargement et / ou hybridation.

Hybrider des échantillons à 42 °C pendant 16-20 heures.

- **Lavage et scan de la puce**

- 1) Retirer la puce de la chambre et la placer dans un tube Falcon contenant 50 ml de la solution de lavage I préchauffée. Attention à la lamelle qui va se détacher. Une fois

qu'elle est tombée dans le liquide, retourner la lame pour éviter que la lamelle ne se retrouve en contact avec les spots de la puce.

- 2) Laver encore une fois pendant 2 minutes dans la solution de lavage I avec une agitation vigoureuse et constante.
- 3) Transférer la lame dans la solution de lavage II et laver pendant 1 minute avec une agitation vigoureuse et constante.
 - ❖ Ne pas laisser les lames sécher entre les étapes de lavage.
- 4) Transférer la lame dans la solution de lavage III et laver pendant 15 secondes avec une agitation vigoureuse et constante.
- 5) Retirer la lame à partir de lavage III. Essorer dans un séchoir à microréseau NimbleGen ou autre sèche-puces à ADN suivant la recommandation du fabricant.
- 6) Scanner la puce avec le MS 200 biopuces scanner et le logiciel MS 200 pour collection des données.

4.3. Analyse des données

4.3.1. Normalisation des données

Comme décrit dans la partie concernant le transcriptome (voir paragraphe 3.3.1).

4.3.2. Sélection des sondes positives et des gènes positifs en ChIP

Toutes les sondes ont été annotées par rapport au site d'initiation de transcription (en anglais, *transcription start site*, TSS) le plus proche. Les distances entre la position de la sonde et le TSS vont de 0 à 14.1 kb avec une moyenne de 1.67 kb. Les changements dans les niveaux de méthylation entre les groupes témoins et expérimentaux sont déterminés à l'aide du test de Student. Nous avons utilisé le critère de sélection des gènes positifs avec au moins deux sondes avec une p-value <0,01 comme décrit par d'autres auteurs (235). Nous avons également déterminé les gènes positifs avec au moins une sonde avec une p-value <0,001. Ces critères ont sélectionné les 5% de valeurs extrêmes de la distribution.

4.3.3. Faire les figures « BedGraph Track Format » sur UCSC

Les diagrammes de profils de méthylation du promoteur de gène ont été générés avec le navigateur UCSC (données BedGraph utilisant la fonction Custom Tracks).

Procédure : UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) → UCSC Genome Browser on Rat → «manage custom tracks » → coller les données sur le site UCSC → Submit

Cet exemple spécifie 48 points de données distincts du gène Ace sur chr10 dans la région de 95.357.473 à 95.362.353. Pour voir cet exemple comme une piste de coutume dans le Genome Browser, copiez le texte et collez-le dans la zone de texte piste navigateur annotation. Comme les informations sur la chip est fait avec la version Rn4, donc on fait la figure sur UCSC avec la version Rn4.

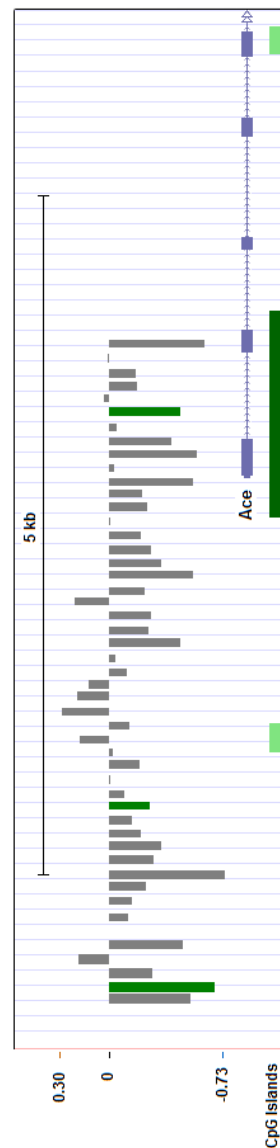
Résultats de BedGraph sur UCSC :

Ace

```

browser position chr10:95357473-95362353
browser hide all
browser pack refGene encodeRegions
browser full altGraph
# 300 base wide bar graph, autoScale is on by default == graphing
# limits will dynamically change to always show full range of data
# in viewing window, priority = 20 positions this as the second graph
# Note, zero-relative, half-open coordinate system in use for bedGraph format
track type=bedGraph name="BedGraph Format" description="BedGraph format" visibility=full
color=200,100,0 altColor=0,100,200 priority=20
chr10 95357473 95357539 -0.521694739
chr10 95357558 95357620 -0.670386241
chr10 95357663 95357727 -0.275606526
chr10 95357768 95357826 0.193718469
chr10 95357878 95357934 -0.473525203
chr10 95358083 95358133 -0.121909921
chr10 95358203 95358254 -0.149130712
chr10 95358303 95358360 -0.23904378
chr10 95358386 95358444 -0.733264908
chr10 95358498 95358556 -0.286076543
chr10 95358604 95358663 -0.337377889
chr10 95358698 95358748 -0.201275602
chr10 95358794 95358844 -0.149435669
chr10 95358904 95358954 -0.262141915
chr10 95358989 95359039 -0.098047457
chr10 95359093 95359143 -0.002874869
chr10 95359205 95359255 -0.19996739
chr10 95359293 95359347 -0.030102706
chr10 95359388 95359438 0.181924139
chr10 95359488 95359538 -0.130189324
chr10 95359593 95359643 0.299302586
chr10 95359703 95359761 0.20226361
chr10 95359793 95359843 0.126943925
chr10 95359883 95359933 -0.112147797
chr10 95359983 95360033 -0.04275832
chr10 95360103 95360153 -0.456109764
chr10 95360193 95360243 -0.254240315
chr10 95360303 95360353 -0.272716259
chr10 95360403 95360453 0.215237031
chr10 95360483 95360533 -0.232172794
chr10 95360603 95360653 -0.536369735
chr10 95360688 95360738 -0.333298628
chr10 95360783 95360833 -0.271780375
chr10 95360893 95360943 -0.204359786
chr10 95360993 95361043 -0.005573183
chr10 95361103 95361153 -0.246003652
chr10 95361198 95361248 -0.211526398
chr10 95361283 95361333 -0.535667835
chr10 95361385 95361435 -0.036694358
chr10 95361490 95361540 -0.560982375
chr10 95361583 95361633 -0.402121966
chr10 95361688 95361738 -0.051747055
chr10 95361803 95361853 -0.457502856
chr10 95361898 95361948 0.032745005
chr10 95361988 95362038 -0.178052587
chr10 95362083 95362133 -0.173743081
chr10 95362193 95362243 0.006265983
chr10 95362303 95362353 -0.605002235

```



4.3.4. Annotations fonctionnelles des gènes positifs en ChIP

Méthodes comme présenté dans l'analyse du transcriptome. (3.3.3)

4.4. Validation des résultats du méthylome par MeDIP-qPCR

Pour valider les résultats de MeDIP-Chip, nous avons choisi des sondes modifiées significativement dans le MeDIP-CHIP pour contrôler en MeDIP-qPCR. Le dessin des amorces a été conçu avec Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) et la spécificité vérifiée par Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Les gènes GAPDH (Diagnode, #pp-1046-050) et TSH2B (Diagnode, #pp-1043-050) ont été choisis comme gènes négatif et positif respectivement.

Tableau 27. Amorces désignées contre les sondes des gènes significatifs.

Oligo name	Sequence
F-acat1	AAG-GTC-CAA-TGC-CTT-TTG-AA
R-acat1	AGA-AGC-TAT-CAA-AAT-AGT-CCT-GAC-ACT
F-Agr1a	TTT-TAG-CTG-TGA-CCT-GAA-TTT-AAC-C
R-Agr1a	GTC-ATT-GGC-AAA-CAA-AGA-GGT-G
F-Dnmt3a	TAA-ACT-CCG-CGT-TTC-CCT-GA
R-dnmt3a	CGG-GAG-AAA-GTT-GCA-GAA-AG

F, Amorce en amont ; R, Amorce en aval.

4.4.1. Test des amorces

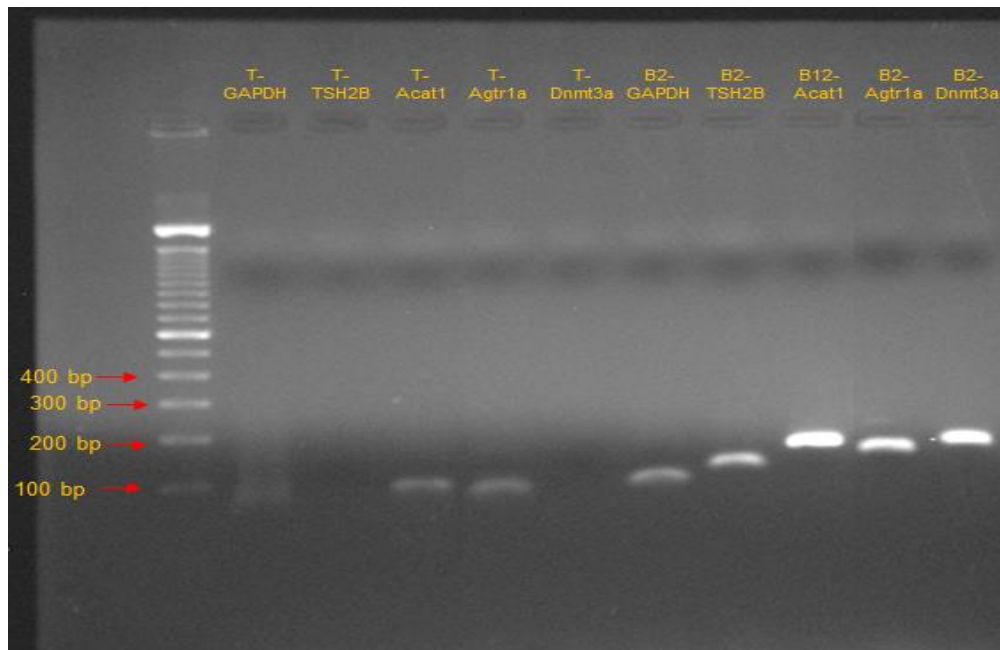
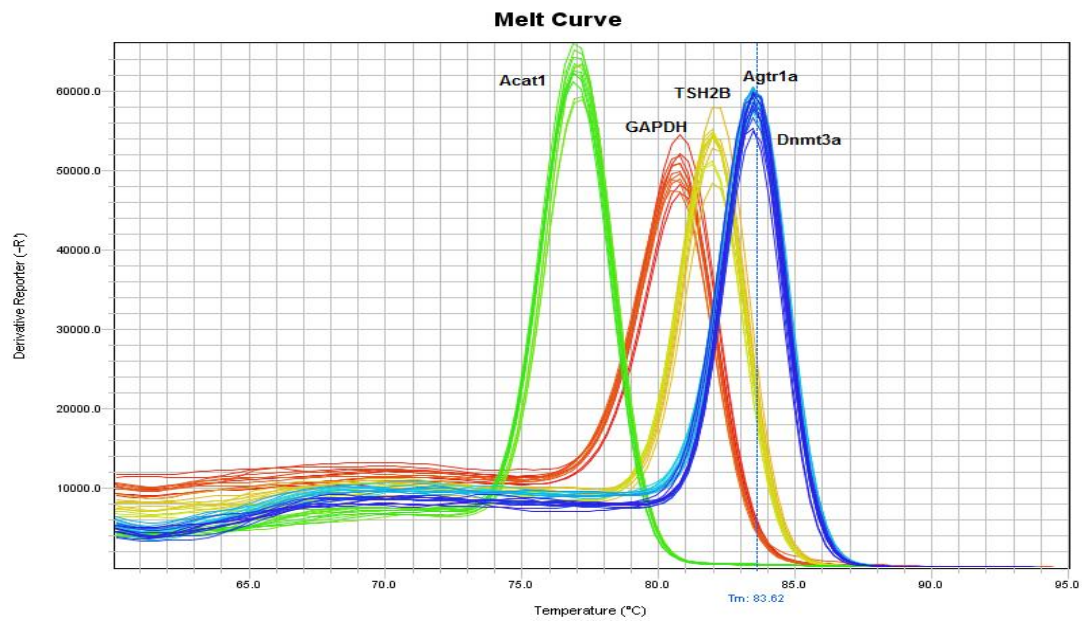
On fait la qPCR avec l'ADN génomique pour vérifier la spécificité des amorces.

Préparation de la réaction qPCR TAKARA Ozyme (RR420A) :

Volume de réaction 20	[réaction μL]	[stock μL]	Volume (μL)
SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)	1	2	10
ROX Ref Dye	1	50	0.4
Amorce F _	0.3 μM	10 μM	0.6
Amorce R _	0.3 μM	10 μM	0.6
Eau jusqu'à 18 μL			6.4
Répartir 18 μL de mix dans chaque puit, puis ajouter les ADNc			
ADNc	-	-	2
Total			20

Préparer la reactions comme indiqué dans le tableau ci-dessus, et ensuite déposer sur la plaque 96 puits et analyser avec l'Appareil StepOne Plus Applied Biosystems dans les conditions suivantes :

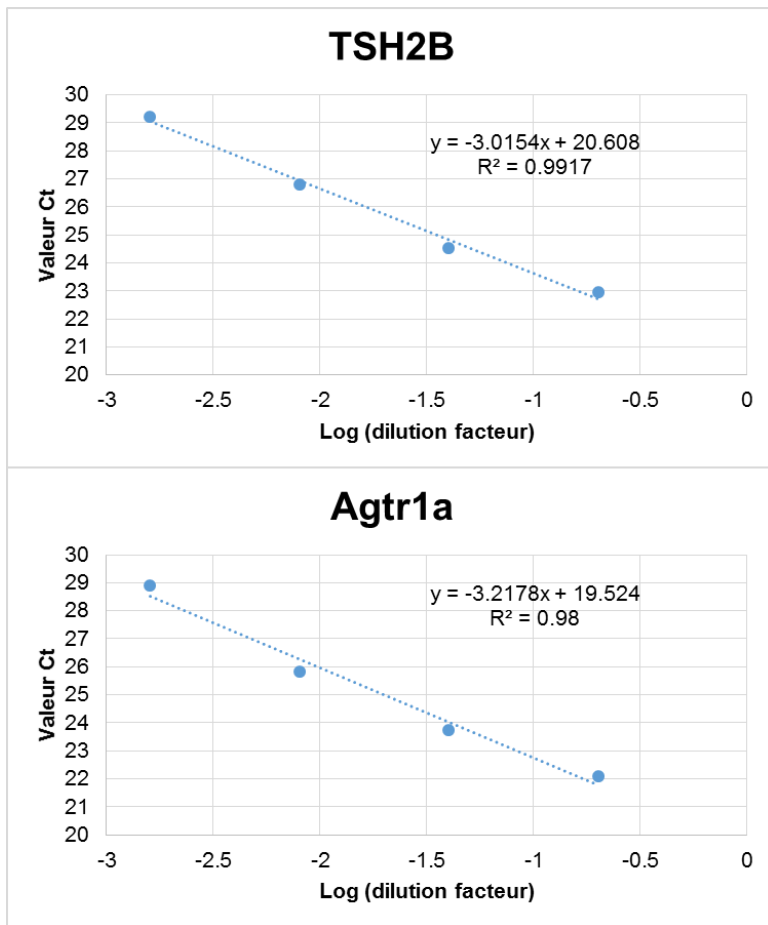
- Dénaturation initiale et activation de l'enzyme : 95°C/30sec.
- 40 cycles de dénaturation et hybridation/élongation : 95°C/5sec + 60°C/30sec.
- Courbe de Fusion et gel d'agarose.



La courbe de fusion et le gel d'agarose montrent que les amorces que nous avons dessinées sont bien spécifiques pour les gènes choisis.

4.4.2. Calibrateur

On prend tous les échantillons IPs à mélanger et à diluer en 1, 1/5, 1/25, 1/125 et 1/625 pour faire le calibrage qui permet de contrôler et de normaliser l'efficacité de la PCR.



Calculer la pente comme indiqué dans la figure à gauche et l'efficacité de la PCR est calculé comme suit :

$$\text{Efficacité} = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{pente}}\right)} - 1 \right) \times 100$$

Exemples :

TSH2B = 114.6

Agtr1a = 104.53

4.4.3. Test des échantillons et analyse

Préparer le mix de réaction comme dans la partie du test des amorces (4.4.1) et faire la dilution des échantillons d'IPs au 50^{ème}.

Calculer le ratio de quantité par la formule suivante :

$$\text{Ratio} = \frac{(1 + E_{\text{gène intérêt}})^{\text{Ct gène intérêt (cal-éch)}}}{(1 + E_{\text{gène réf}})^{\text{Ct gène géf (cal-éch)}}$$

Réf : référence ; cal : calibrateur ; éch : échantillons.

Résumé : Une des caractéristiques les plus connues de la programmation métabolique est qu'un événement commun physiopathologique à l'âge adulte obtenu indépendamment du stress nutritionnel au début de la vie. Cela a conduit à penser que les altérations métaboliques dues au stress nutritionnel précoce pouvaient résulter de la programmation seulement d'un petit nombre de gènes qui agissent comme gardiens d'un réseau de gènes ou d'une voie de signalisation. Ici nous avons l'intention de tester cette hypothèse par l'analyse combinée du transcriptome et méthylome avec des échantillons de foie des rats nés de mères nourries avec une alimentation restreinte en protéines (MPR) ou carencée en donneur de méthyles (MDD) pendant la gestation et la lactation et comparer entre les 2 modèles. Au moment du sevrage, la progéniture MDD a été sacrifiée, tandis que la progéniture du groupe MPR a reçu une nourriture standard jusqu'à l'âge de 6 mois. Les rats à jours 21 nés de mères nourries avec un régime MDD ont 3.269 gènes surexprimés ($P < 0,0009$) et 2.841 gènes sous-exprimés ($P < 0,0004$) par rapport aux témoins. Les modifications de méthylation de l'ADN ont été trouvées dans les régions promotrices de 1.032 gènes. Les analyses fonctionnelles ont révélé que ces gènes sont principalement impliqués dans le métabolisme des lipides et du glucose, du système nerveux, la coagulation, le stress du réticulum endoplasmique et la fonction mitochondriale. Les master genes présentant des changements à la fois dans l'expression et la méthylation d'ADN sont limités à 266 gènes et ils sont principalement impliqués dans le système rénine-angiotensine, le métabolisme de la mitochondrie et de l'homéostasie phospholipide. La plupart de ces master genes participent à la Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). La restriction protéique maternelle (MPR) a entraîné une augmentation de la masse grasse abdominale, de l'hypertriglycéridémie, de l'hypercholestérolémie et un taux élevé d'acides gras par rapport aux témoins. 3.020 gènes sont surexprimés ($P < 0,0003$) et 3.601 sous-exprimés ($P < 0,002$) au niveau du transcriptome et 3.968 gènes modifiés au niveau du méthylome par rapport aux témoins. L'analyse fonctionnelle a indiqué que les gènes surexprimés sont principalement impliqués dans les voies métaboliques et les gènes sous-exprimés et différemment méthylés sont principalement impliqués dans des processus du développement. 998 master genes ont été trouvés, et l'analyse fonctionnelle de ces gènes a indiqué un effet significatif sur le développement des tissus, la régulation de la transcription et le métabolisme, et beaucoup d'entre eux sont associés à des maladies chroniques comme l'hypertension, l'obésité centrale et le diabète. L'expression des gènes et la méthylation de l'ADN du génome obtenus en utilisant ces modèles ont été comparés aux données de méthylome et de transcriptome précédemment obtenus à partir de foie des rats restreints en protéines et sacrifiés à la naissance. Cette analyse a révélé un ensemble commun de 46 gènes qui sont sur-exprimés et 42 gènes sous-exprimés dans les trois modèles de programmation métabolique par rapport aux animaux témoins. La plupart des gènes surexprimés sont impliqués dans la régulation de la fonction mitochondriale alors que les gènes sous-exprimés sont principalement impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'expression des gènes. Nous avons identifié également un ensemble de 122 gènes dont les niveaux de méthylation ont été modifiés à la fois par une carence en donneurs de méthyle et une restriction protéique. Ces observations soutiennent l'hypothèse qu'un petit nombre de gènes essentiels sont à la base de la programmation de troubles métaboliques, indépendamment du stress nutritionnel.

Mots-clés : Programmation métabolique, Programmation fœtale, Epigénétique, méthylation de l'ADN, Restriction protéique maternelle, Carence en donneurs de méthyle, Méthylome

Abstract: One of the most striking features of metabolic programming is that a common physiopathological output at adulthood is obtained irrespective to the nutritional insult during early life. This has suggested that the metabolic alterations due to early nutritional stress might result from the programming of only a small number of genes which act as gatekeepers of a fundamental gene network or signalling pathway. Here we aimed to test this hypothesis through the combined analysis of the transcriptome and methylome in rat liver samples derived from animals born to dams fed either a protein-restricted diet (MPR) or a methyl donor deficient (MDD) diet through gestation and lactation. At weaning, the offspring born to MDD dams were sacrificed whereas the pups from the MPR group were fed standard chow until the age of 6 months. 21-day-old rats born to mothers fed a MDD diet during gestation and lactation have 3,269 over-expressed ($P < 0.0009$) and 2,841 under-expressed ($P < 0.0004$) genes compared to controls. Modifications of DNA methylation were found in the promoter regions of 1,032 genes. Functional analyses revealed that these genes are mainly involved in glucose and lipid metabolism, nervous system, coagulation, endoplasmic reticulum stress and mitochondrial function. Master genes exhibiting changes in both gene expression and DNA methylation are limited to 266 genes and are mainly involved in the renin-angiotensin system, mitochondrion metabolism and phospholipid homeostasis. Most of these master genes participate in Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Maternal protein restriction (MPR) resulted in increased fat mass, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and high fatty acids compared to control. 3,020 genes were up-regulated ($p < 0.0003$) and 3,601 ($p < 0.002$) down-regulated by MPR compared to controls. Modifications of DNA methylation was found in 3,968 genes. The functional analysis indicated that the overexpressed genes were mainly involved in metabolic pathways and the under-expressed and differentially methylated genes were mainly involved in physiological process. 998 master genes were found, functional analysis of these genes indicated a significant effect on tissue development, regulation of transcription and metabolism, and many of them are associated with chronic diseases such as hypertension, central obesity and diabetes. The genome-wide expression and DNA methylation results obtained using these models, were compared to previous methylome and transcriptome data obtained using liver from MPR pups sacrificed at birth. This analysis revealed a common set of 46 genes that were up regulated and 42 genes down regulated in the three models of metabolic programming compared to control animals. Most of the up regulated genes are involved in the regulation of mitochondrial function whereas the down-regulated genes are mainly involved in the regulation of cell proliferation and gene expression. We identified also a set of 122 genes whose methylation levels were changed both by methyl donor deficiency and protein-restriction. These observations sustain the hypothesis that a small set of core genes underlies the programming of metabolic disorders irrespective of the nutritional insult.

Key words: Metabolic programming, Fetal programming, Epigenetics, DNA methylation, Maternal protein restriction, Methyl donor deficiency, Methylome