



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>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - FACULTE DE MEDECINE

NANCY I

N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY I

Discipline : Biologie Santé et Environnement

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement

Par

Laurent Brunaud

Le 4 juin 2003

Titre :

DETERMINANTS NUTRITIONNELS ET GENETIQUES DE L'HOMOCYSTEINE ET METHYLATION DE L'ADN : MODELES EXPERIMENTAUX ET IMPLICATIONS EN PATHOLOGIE .

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur J.L. Guéant

JURY :

Monsieur le Professeur J.P. Arnaud

Monsieur le Docteur, Directeur de Recherche D. Blache (rapporteur)

Monsieur le Professeur L. Bresler

Monsieur le Docteur, Directeur de Recherche J.N. Freund (rapporteur)

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre Arnaud

Président

Vous avez immédiatement accepté de juger ce travail et nous vous en remercions.

Nous sommes très honorés de votre présence dans ce jury.

Recevez l'expression de notre profond respect.



A Monsieur le Professeur Denis Blache

Rapporteur

Vous avez accepté de juger ce travail et nous en sommes très honorés.

Recevez l'expression de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Laurent Bresler

Juge

Merci de ton aide constante et de ton soutien sans faille. La rigueur de tes analyses et tes idées ont toujours suscité mon admiration.

Trouve ici le témoignage de mon amitié et de mon respect.

A Monsieur le Professeur Jean Noel Freund

Rapporteur

Vous avez accepté de juger ce travail et nous en sommes très honorés.

Recevez l'expression de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean Louis Guéant

Directeur de Thèse

Votre enthousiasme et votre dynamisme sont pour moi un modèle.
Vous avez quasiment réussi à me faire préférer la biologie à la chirurgie. J'espère que ce travail sera à la hauteur de votre attente.
Je vous remercie de votre soutien constant durant ces années de préparation.

A Monsieur le Professeur Patrick Boissel et à Messieurs les Docteurs Ahmet Ayav, Jean Michel Tortuyaux, Jean Marc Alberto, Philippe Gérard, Farès Namour

Merci pour votre aide et votre compréhension durant toute ces années.

A Messieurs les Professeurs Orlo H Clark et Quan-Yan Duh

L'année à San Francisco dans votre groupe a été une opportunité unique d'élargir ma vision de la recherche fondamentale mais a également été d'une grande richesse humaine.

Aux patients et à leur famille

Merci pour votre disponibilité et compréhension

A Claire et les Enfants

Ce travail m'a fait manquer beaucoup de temps à vos cotés.
Avec tout mon amour.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I – METABOLISME DE LA METHIONINE ET METHYLATION DE L'ADN

1- Vue générale.....	8
2- Méthylation de l'ADN	8
3- Status nutritionnel et méthylation de l'ADN	19

CHAPITRE II – ACÉTYLATION / METHYLATION DES HISTONES ET REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

1- Acétylation des histones	28
2- Méthylation des résidus lysine et acétylation des histones.....	30
3- Acétylation des histones, méthylation de l'ADN et agents thérapeutiques	33

CHAPITRE III – METHYLATION DE L'ADN ET CARCINOGENESE

1- Métabolisme et carcinogénèse	36
2- Hypométhylation de l'ADN et carcinogénèse	38

CHAPITRE IV - MODELES DE RATS ET CANCERS DU FOIE

1- Carence alimentaire en groupements méthyles avec utilisation d'agents carcinogènes	48
2- Carence alimentaire en choline et méthionine sans utilisation d'agents carcinogènes	50
3- Carence alimentaire en choline, méthionine et folates sans utilisation d'agents carcinogènes	52
4- Carence alimentaire en choline, méthionine, folates et vitamine B12 sans utilisation d'agents carcinogènes	53

CHAPITRE V – DETERMINANTS GENETIQUES ET NUTRITIONNELS DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE ET DE L'HYPOMETHYLATION DE L'ADN DANS LES PATHOLOGIES DEGENERATIVES

1- Régulation des déterminants du métabolisme de l'homocystéine ..	54
2- S-adénosylhomocystéine et inhibition des méthyl-transférases	57

3- Etudes chez l'animal et chez l'homme	58
4- Hypothèses de mécanismes entre l'hypométhylation de l'ADN médiée par la S- adénosylhomocystéine et les pathologies	60
5- Exemples de la relation entre homocystéine et pathologies cardiovasculaires	62
6- Exemples de la relation entre homocystéine et pathologies neurologiques (La maladie d'Alzheimer, les malformations du tube neural et la trisomie 21).....	66
<u>CHAPITRE VI – OBJECTIFS DE LA THESE</u>	70
<u>CHAPITRE VII – RESULTATS</u>	
1 – Les déterminants nutritionnels de la méthionine synthase et de l'hypométhylation de l'ADN.....	71
2 –Les déterminants nutritionnels de l'hypométhylation de l'ADN et cancérogénèse digestive	80
3- Evaluation de l'effet d'un inhibiteur des histone déacetylases sur l'expression de certains gènes dans des lignées cellulaires de cancers thyroïdiens	90
4– Les déterminants génétiques de l'hyperhomocystéinémie, de l'hypométhylation et maladies neurologiques	96
<u>CHAPITRE VIII – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	99
<u>REFERENCES</u>	114
<u>ANNEXE</u>	131

Chapitre I – METABOLISME DE LA METHIONINE ET METHYLATION DE L'ADN

1- Vue générale

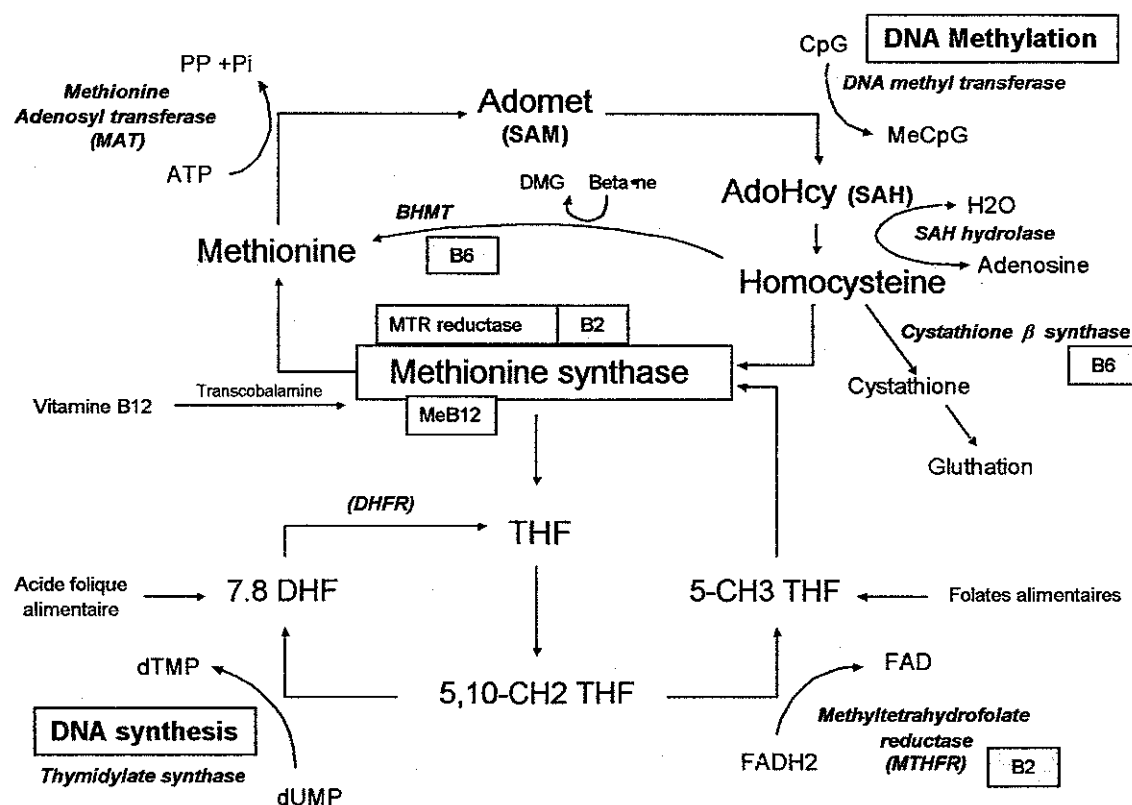
La vitamine B12 et les folates plasmatiques jouent un rôle important dans la méthylation de l'ADN (1). Ces deux coenzymes sont nécessaires à la synthèse de la méthionine et de la S-adénosylméthionine. La S-adénosyl méthionine est le donneur habituel de groupements méthyles nécessaires à la maintenance de la méthylation de l'ADN (2). La méthylation du carbone en position 5' du résidu cytosine est catalysée par les enzymes ADN méthyltransférases qui utilisent un groupement méthyle venant de la S-adénosyl méthionine. La S adénosyl méthionine provient de la méthionine qui est elle même synthétisée par transméthylation de l'homocystéine par la méthionine synthase (MTR) en présence de coenzymes vitaminiques, le méthyltétrahydrofolate et la méthylcobalamine (**Figure 1**) (3).

2- Méthylation de l'ADN

a- Description

La méthylation des résidus cytosines en position 5' du noyau pyrimidique est l'une des modifications post répliquatives les plus importantes de l'ADN des cellules eucaryotes. La méthylation de l'ADN est l'addition covalente d'un groupement méthyle sur le carbone en position 5' de la cytosine (**Figure 2**). Par ailleurs, la méthylation de l'ADN d'une cellule est reproduite après synthèse d'ADN et est transmise à ses cellules filles. La méthylation de l'ADN est donc préservée après la division cellulaire (4). L'addition covalente d'un groupement méthyle sur les sites CpG de la fibre d'ADN nouvellement synthétisée est médiée par l'ADN méthyltransférase I (DNMT1). Cette enzyme travaille au niveau de la fourchette de réplication où elle méthyle l'ADN contenant des CpG hémi-méthylés (postreplicative maintenance methylation). Deux autres DNA méthyltransférases ont été clonées (DNMT3A et DNMT3B) qui catalysent le transfert de groupements méthyles sur l'ADN nu ("naked DNA") (5).

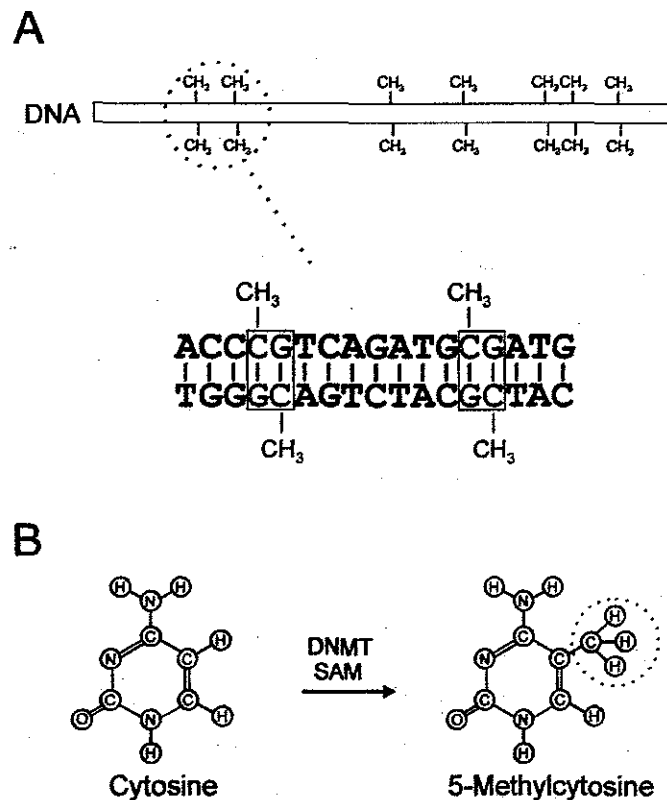
Figure 1



Vue générale de la transméthylation de l'homocystéine en méthionine, la méthylation de l'ADN, et le métabolisme du mono-carbone.

ATP, adenosine triphosphate; PP, pyrophosphate; Pi, phosphate; Adomet, adenosylmethionine; AdoHcy, adenosylhomocysteine; THF, tetrahydrofolate; FAD, flavine adenine dinucleotide; BHMT, bétaine homocystéine méthyl-transférase; DMG, diméthylglycine; DHFR, dihydrofolate réductase.

Figure 2



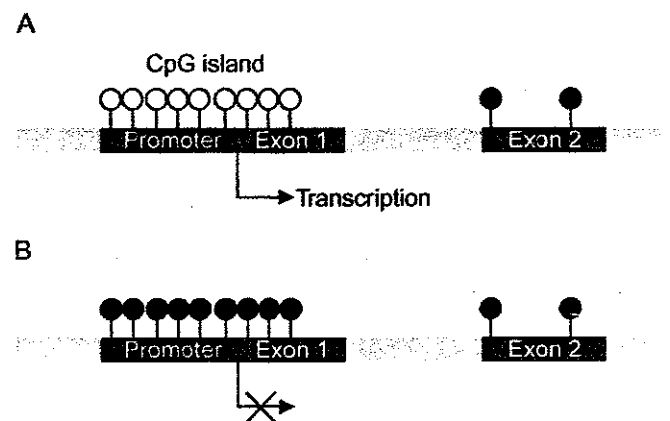
A: Les cytosines méthylées représentent 0,75 à 1% du total des paires de bases de l'ADN du génome et environ 70% de tous les dinucléotides CpG

B: L'addition d'un groupement méthyle sur un résidu cytosine est catalysée par l'enzyme DNA méthyltransférase (DNMT), utilisant la S-adenosylméthionine (SAM) comme substrat.

(Figure tirée de Worm et al. (5))

La plupart des résidus 5-méthyldeoxycytidine sont retrouvés dans la séquence palindromique du dinucléotide cytosine-guanine (CpG). Au cours de l'évolution, les dinucléotides CpG ont été progressivement éliminés du génome des cellules eucaryotes supérieures et sont présents dans une proportion estimée de 5% à 10% de leur prévalence calculée. La méthylation des cytosines semble avoir joué un rôle important dans ce processus d'élimination car la plupart des sites perdus correspondent à la conversion de méthylcytosine en thymine par déamination (6). Dans la situation "normale", 60 à 90% des séquences CpG du génome sont méthylées. Les dinucléotides CpG non méthylés restants sont principalement regroupés (60% à 70%) dans des régions préférentielles riches en séquences CpG, appelées îlots CpG. Ces îlots sont fortement présents dans les régions promotrices ou les exons initiaux des gènes (7). Le génome humain contient environ 29 000 îlots CpG dont la longueur varie entre 0,5 et 5 kb et dont la présence est retrouvée tous les 100 kb environ (6). Normalement, les régions promotrices et le site de début de transcription (start transcription) d'un gène sont inclus dans les îlots CpG. Si les facteurs de transcription du gène correspondant sont disponibles et si l'îlot CpG reste dans un état non méthylé avec une configuration de chromatine ouverte associée à une hyperacétylation des histones, alors la transcription de ce gène va pouvoir être réalisée (8). Un large faisceau d'arguments sur plusieurs années a montré que la méthylation de l'ADN était incompatible avec l'activité transcriptionnelle (6, 9) (**Figure 3**).

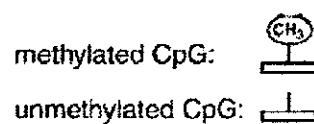
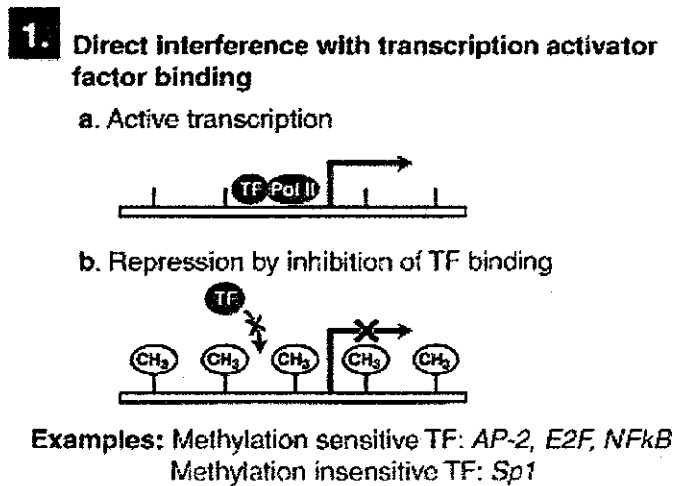
Les relations exactes entre la méthylation de l'ADN et la modulation de l'expression des gènes restent cependant peu connues. Trois principaux mécanismes ont été proposés pour expliquer la répression de la transcription secondaire à la méthylation de l'ADN (6). Le premier constitue une interférence directe des CpG méthylés empêchant la liaison de facteurs de transcription spécifiques sur leurs sites actifs *cis*-de reconnaissance des promoteurs respectifs (**Figure 4**) (6, 10). Plusieurs facteurs de transcription, incluant AP-2, c-Myc/Myn, l'activateur AMP cyclique dépendant CREB, E2F, et NF- κ B, reconnaissent des séquences contenant des résidus CpG. Il a été ainsi montré que la méthylation de l'ADN inhibait la liaison de chacun de ces facteurs de transcription sur le génome. Cependant, cette notion ne semble pas toujours être valable car il a été montré que

Figure 3

Les cytosines non méthylées sont retrouvées avec une forte densité dans les îlots CpG, qui sont habituellement localisés dans les régions promotrices ou les exons initiaux des "housekeeping" genes. A: L'état non méthylé (ronds blancs) d'un îlot CpG (promoteur + exon 1) est associé avec une activité transcriptionnelle. B: la méthylation de cette région (ronds noirs) induit un arrêt de la transcription.

(Figure tirée de Worm et al. (5))

Figure 4



Interférence directe des CpG méthylés avec la liaison de facteurs de transcription

(Figures tirées de Singal et al. (6))

d'autres facteurs de transcription (ex: Sp1 et CTF) ne sont pas sensibles à la méthylation de leurs sites de liaison (ces sites n'ont d'ailleurs pas de dinucléotides CpG) (6). Bien que ce modèle soit attractif, il semble qu'il ne soit pas toujours valable. Ce modèle explique en effet uniquement une minorité de situations où la méthylation induit une diminution stable de la transcription (stable gene silencing) (5).

Un second mécanisme potentiel de l'induction de la diminution de la transcription correspond à la liaison directe de répresseurs spécifiques transcriptionnels sur l'ADN méthylé. Deux facteurs, les methyl cytosine binding proteins 1 et 2 (MeCP-1 et MeCP-2) ont été identifiés et ont comme capacité de se lier aux résidus CpG méthylés dans n'importe quel contexte de séquence (**Figure 5**) (6). La protéine MeCP-1 se lie sur de multiples sites CpG méthylés symétriquement. Il a été proposé que les gènes faiblement méthylés forment un complexe instable avec MeCP-1 qui préviendrait la transcription lorsque le promoteur est faible. Ce complexe pourrait être modifié par un promoteur fort, autorisant alors le gène méthylé à être transcrit. Il a été aussi montré que MeCP-1 intervenait par exemple dans le silencing des gènes embryonnaires de la globine pendant l'érythropoïèse normale (6). La protéine MeCP-2 est plus abondante que MeCP-1 dans la cellule, et est capable de se lier à l'ADN contenant un seul dinucléotide CpG méthylé. MeCP-2, comme les ADN méthyltransférases, est indispensable pour la viabilité des cellules embryonnaires ainsi que pour le développement embryonnaire. MeCP-2 possède deux domaines. Un domaine de liaison méthyl-CpG qui est essentiel pour la localisation chromosomique et un domaine de répression de la transcription. Ce domaine de répression de la transcription peut inhiber la transcription à partir d'un promoteur à distance, suggérant que MeCP-2 puisse interagir avec les mécanismes de transcription (6). Récemment, une région de MeCP-2 localisée dans le domaine de répression de la transcription a été associée avec un complexe corépresseur contenant le répresseur transcriptionnel mSin3A et les histone déacétylases (11). La méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones seraient donc liées à la MeCP-2, pouvant engendrer ainsi une structure de chromatine plus sévèrement répressible vis à vis de la transcription. Cependant, il a aussi été montré que MeCP-2 était capable de diminuer la transcription d'ADN nu ("naked") in vitro suggérant que la structure de la chromatine n'était pas toujours nécessaire pour son action répressive (6).

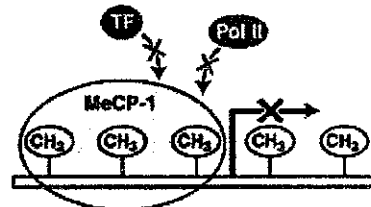
Figure 5

2. Specific transcriptional repressors

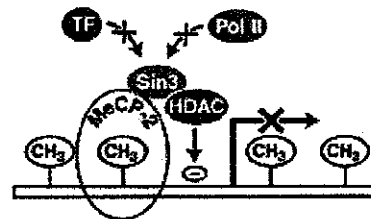
a. Active transcription



b. Repression by MeCP-1



c. Repression by MeCP-2



methylated CpG: 
 unmethylated CpG: 

Induction de la diminution de la transcription correspondant à la liaison directe de répresseurs spécifiques transcriptionnels (MeCP-1 et MeCP-2) sur l'ADN méthylé.

(Figures tirées de Singal et al. (6))

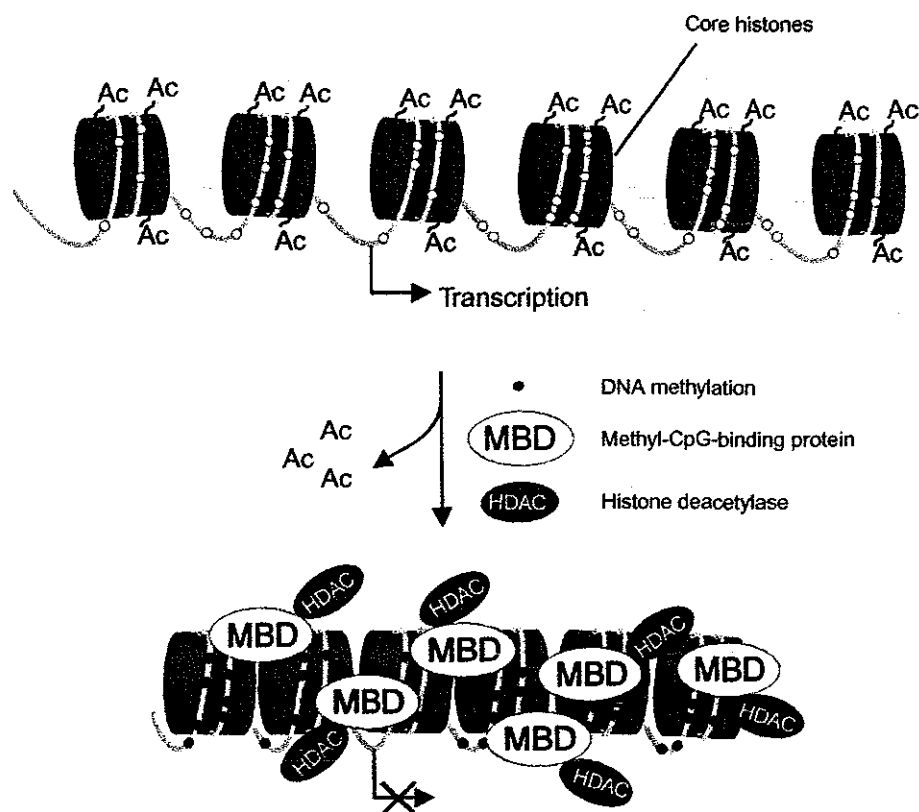
Le troisième mécanisme par lequel la méthylation pourrait diminuer la transcription est l'altération de la structure de la chromatine (**Figure 6**) (6). Ce modèle alternatif met en jeu l'apparition de modifications de l'architecture du nucléosome comme conséquence de la méthylation (12). Ce modèle mettrait en jeu les histones déacétylases associées à MeCP-2, mais aussi d'autres facteurs qui pour l'instant sont inconnus (6). Les histone déacétylases catalysent le retrait des groupements acétyle du noyau des histones, conduisant ainsi à transformer une structure de chromatine ouverte et compétente du point de vue transcriptionnel en une structure fermée ne pouvant pas être accessible à la transcription (5) (cf infra). Les liens entre les protéines méthyl-CpG-binding, les histones déacétylases et les modifications de structures de la chromatine sont donc des éléments importants expliquant comment la méthylation de l'ADN peut modifier la transcription. Par ailleurs, il a aussi été montré que les enzymes DNA méthyltransférases pouvaient aussi recruter les histones déacétylases sur les sites méthylés (13). Le rôle respectif des DNA méthyltransférases et des protéines méthyl-CpG binding dans la diminution de la transcription reste à évaluer (5).

b- Rôle de la méthylation dans la différenciation et le cycle cellulaire

Chez les procaryotes, la méthylation a pour rôle principal l'auto-protection des acides nucléiques de la cellule contre l'action des endonucléases qui sont destinées à dégrader les acides nucléiques étrangers. Chez les mammifères, le rôle de la méthylation de l'ADN semble plus complexe. La méthylation de l'ADN est un mécanisme fondamental pour le contrôle épigénétique de l'expression des gènes et de la maintenance de l'intégrité du génome. Par conséquent, l'évaluation du statut de la méthylation de l'ADN est importante dans toutes les situations faisant intervenir la variabilité de l'expression de gènes et la maintenance de l'intégrité du génome: la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation tissulaire spécifique et la carcinogénèse (7).

Un aspect important du rôle de la régulation liée à la méthylation de l'ADN est le processus de déméthylation lors de l'embryogénèse. Il a été montré que

Figure 6



Modèle de silencing méthylation-dépendant des gènes. L'acétylation des histones induit une structure ouverte de la chromatine qui est associée à une activité transcriptionnelle. Les cytosines méthylées sont reconnues par les protéines methyl-CpG-binding proteins (MBD), qui à leur tour recrutent les histones déacetylases (HDAC) au niveau du site de méthylation. La structure de la chromatine devient alors fermée à l'activité transcriptionnelle.

(Figure tirée de Worm et al. (5))

durant le développement initial de l'embryon (avant implantation), une réduction importante de la méthylation globale était observée. Cet état était ensuite suivi par une vague de méthylation de novo concernant la plupart des résidus CpG mais laissant les îlots CpG non méthylés au moment de l'implantation (6). Après l'implantation, la plupart de l'ADN génomique était méthylé, alors que les gènes spécifiques de tissus subissaient une hypométhylation dans leur tissu d'expression (14). A l'âge adulte, alors que la majorité des îlots CpG restent libres de toute méthylation et sont associés avec des gènes ayant une transcription active (appelés "housekeeping genes"), certains îlots CpG sont normalement méthylés et correspondent aux gènes "imprinted" (gene imprinting) ou à l'inactivation du chromosome X. Enfin, un autre problème important est pour l'instant non résolu. Il s'agit de savoir si la méthylation de l'ADN et le silencing transcriptionnel génomique est un mécanisme primaire ou alors un effet secondaire à l'activité d'un gène pour l'instant inconnu (6).

Des données ont suggéré que la méthylation de l'ADN pourrait aussi être liée à l'auto-immunité. Les études initiales ont ainsi montré que le traitement des lymphocytes T CD4+ avec un inhibiteur de la méthylation (5-azacytidine) pourrait induire une autoréactivité (15). Les cellules traitées par la 5-azacytidine ont ainsi répondu à leurs propres molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II pendant une période d'environ 2 semaines. Cette autoréactivité était corrélée avec l'augmentation de l'expression des fonctions lymphocytaires associées à l'antigène LFA-1 et à la transcription de CD11a (16). L'observation qu'une simple médication inhibitrice de la méthylation puisse induire une autoimmunité dans les lymphocytes normaux suggère qu'un mécanisme similaire puisse exister in vivo. Ceci a été testé en traitant un lymphocyte T de souris avec la 5-azacytidine et en injectant cette cellule autoréactive dans une autre souris syngénique. Les souris recevant les cellules traitées ont développé des anticorps anti-ADN et une auto-immunité qui histologiquement ressemblait au lupus humain. Ces réactions n'ont pas été observées lors de l'injection de cellules non traitées (15). Des lymphocytes T rendus autoréactifs par transfection de LFA-1 ont induit les mêmes résultats, soulignant le rôle de l'hyperexpression de LFA-1 dans le mécanisme d'auto-immunité. Ces données suggèrent que la modification de la méthylation (hypométhylation) des lymphocytes T pourrait contribuer au développement de maladies auto-immunes.

Ceci a été confirmé par l'observation que les lymphocytes T de patients présentant un lupus actif avaient une hypométhylation globale de l'ADN (15).

Le rôle de la méthylation de l'ADN semble aussi important lors du vieillissement cellulaire. Le niveau génomique total de déoxyméthylcytosine décroît progressivement avec l'âge chez la plupart des vertébrés. L'hypométhylation progressive au fur et à mesure de l'âge a été documentée chez le saumon, la souris, le rat, la vache et l'homme dans des tissus aussi variables que le cerveau, le foie, la muqueuse du grêle, le coeur, la rate et les lymphocytes T. Par contre chez le rat, le poumon ne semble pas être hypométhylé avec le vieillissement et le contenu rénal de déoxyméthylcytosine augmente avec l'âge (15). Un groupe de gènes semblent changer leur statut de méthylation avec le vieillissement et de façon spécifique à certains tissus. Par exemple, le gène de la β -actine et le gène c-myc se déméthylent avec l'âge dans la rate de rats et de souris respectivement. Beaucoup d'autres gènes changent leur statut de méthylation au cours du vieillissement (17). D'une manière plus générale, il est considéré que certains loci dans des tissus spécifiques subissent une hypométhylation avec l'âge alors que d'autres subissent une hyperméthylation (15). Ceci pourrait correspondre à des modifications de fonction cellulaire et de l'expression de gènes associées au vieillissement. Les mécanismes contribuant aux modifications cellulaires dépendant de l'âge ne sont cependant pas encore clairement établis (15).

3- Statut nutritionnel et méthylation de l'ADN

Plusieurs études ont suggéré que le statut nutritionnel influençait l'hypométhylation globale de l'ADN. Les facteurs alimentaires intervenant dans le métabolisme de la méthionine et qui sont susceptibles d'avoir un impact sur la méthylation de l'ADN sont principalement la vitamine B12, la vitamine B9 (folates), la méthionine et la choline. D'autres facteurs alimentaires sont la vitamine B6 (pyridoxine), la vitamine B2 (riboflavine), et l'alcool (18). Ces facteurs alimentaires ont une action sur les principales enzymes du métabolisme de la reméthylation de l'homocystéine. La vitamine B12 est ainsi un co-substrat de la MTR. La vitamine B9 est un co-substrat de la MTR et interagit avec la MTHFR. La vitamine B6 est utile

dans le métabolisme de la CBS et de la BHMT. Enfin, la vitamine B2 interagit avec la MTRR (méthionine synthase réductase) et la MTHFR (Figure 1).

a- La vitamine B12

La vitamine B12, ou cobalamine, est une molécule organométallique présentant une liaison carbone-cobalt rarement rencontrée dans la nature. Elle appartient à une classe de composés complexes appelés corrinoïdes. La vitamine B12 est présente dans les aliments dérivés des animaux mais elle n'est synthétisée que par certains micro-organismes. La molécule de corrinoïde est constituée de trois parties: un noyau tétrapyrrolique central appelé noyau corrine et deux chaînes axiales, l'une en position α avec un groupement pseudo-nucléotidique diméthylbenzimidazole et l'autre en position β qui détermine le nom du composé vitaminique (19). Dans l'adocobalamine (AdoCbl), le cobalt se trouve lié à un radical 5'-désoxyadénosyl alors que dans l'autre coenzyme, la méthylcobalamine (MeCbl), le radical lié au cobalt est un groupement méthyle. Les cobalamines sont les coenzymes de deux réactions de transfert. La première consiste en un transfert intra-chaîne d'hydrogène (exemple : conversion du méthylmalonyl-CoA en méthylsuccinyl-CoA). Le deuxième type de réaction mettant en jeu les coenzymes B12 est le transfert inter-moléculaire de groupes méthyles (20). La méthylcobalamine est le coenzyme de la méthionine synthase et permet la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine, en présence d'un cosubstrat, le méthyltétrahydrofolate.

Lorsque la concentration en vitamine B12 et en méthionine est basse, la synthèse de S-adenosyl méthionine est réduite. La méthylation de l'ADN est par conséquent théoriquement réduite. Cependant, les résultats des études de cultures cellulaires in vitro et des études in vivo chez le rat n'ont pas clairement établi de lien entre la carence en vitamine B12 et l'hypométhylation de l'ADN, ni de lien entre la carence en vitamine B12 et l'augmentation de l'instabilité génomique (considérée comme secondaire à l'hypométhylation de l'ADN) (1). Chez l'homme, il a été retrouvé dans une étude portant sur 22 sujets splénectomisés qu'un faible taux plasmatique de vitamine B12 (<200 pg/mL) (avec des taux faibles de folates) était corrélé avec un index élevé de micronucleus (marqueur précoce de lésions chromosomiques considérées comme secondaires à l'hypométhylation de l'ADN) (21). Dans une étude

de 10 patients présentant une anémie pernicieuse, 3 avaient des aberrations chromosomiques et 8 une augmentation de la fréquence des micronuclei dans les cellules hématopoïétiques (22). Fenech et al. ont aussi objectivé, dans une étude de 64 hommes sains âgés de 50 à 70 ans, que l'index de micronucleus était négativement corrélé ($P=0,013$) au taux sérique de vitamine B12 (23). Par contre ces mêmes auteurs n'ont pas retrouvé de lien entre le taux de vitamine B12 et l'hypométhylation de l'ADN (24).

b- La vitamine B9

La vitamine B9 (les folates) constitue une classe de coenzymes jouant un rôle d'intermédiaires métaboliques dans le transfert de noyaux monocarbonés nécessaires à la synthèse des purines, de l'acide désoxythymidylque et de la méthionine. Au cours de la synthèse de la méthionine, acide aminé essentiel, le groupement méthyle transféré sur l'homocystéine provient du méthyltétrahydrofolate (MeTHF), forme circulante prédominante des folates, elle-même produit de la réduction du méthylènetétrahydrofolate (5,10-CH₂ THF) par la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR). Les folates ont donc un rôle central dans le transfert de groupements monocarbonés pour d'une part la méthylation de l'ADN et d'autre part la synthèse de nucléotides (**Figure 1**). Le métabolisme des groupements monocarbonés est constitué par un réseau de réactions biochimiques en interrelation dans lequel une unité carbone (-CH₃) est transférée au tétrahydrofolate (THF) pour réduction ou oxydation et/ou transfert à d'autres composés. Normalement, un carbone est transféré de la sérine ou de la glycine au tétrahydrofolate pour former le 5,10-méthylènetétrahydrofolate. Ce composé est soit utilisé pour la synthèse de thymidine (incorporée ensuite à l'ADN), soit oxydé en formyl-THF pour la synthèse des purines (utilisées pour la synthèse d'ADN ou d'ARN), soit réduit en 5-méthyltétrahydrofolate et utilisé pour méthyler l'homocystéine pour former de la méthionine. La méthionine est convertie en S-adenosylméthionine qui est un donneur universel de groupements méthyles pour méthyler l'ADN, l'ARN, les hormones, les neurotransmetteurs, les membranes lipidiques, les protéines et autres molécules (25). Les trois molécules interagissant avec le THF sont chacune importante pour une voie métabolique: le méthyl-THF est nécessaire à la synthèse de méthionine (méthylation de l'ADN), le 5,10-méthylène THF est important pour la

thymidylate synthase (synthèse d'ADN), et le 10-formyltétrahydrofolate est nécessaire à la synthèse des purines (26) (Figure 1).

Les études de cultures in vitro ont montré que les cassures chromosomiques et l'index de micronucleus des lymphocytes étaient augmentés lorsque le milieu de ces cultures cellulaires était appauvri en acide folique et en thymidine (1). Les résultats des études effectuées sur des rongeurs suggèrent que la carence sévère en folates induit une hypométhylation globale de l'ADN (foie et colon) mais aussi des cassures chromosomiques avec une augmentation de l'incorporation des sites uraciles et apuriques dans l'ADN (1, 26-28). Du point de vue de la carcinogénèse, l'hypométhylation localisée dans un locus précis est probablement un facteur plus important que l'hypométhylation globale de l'ADN. Des observations de rats folate-déficients ont ainsi confirmé que la carence alimentaire en folates était suffisante pour induire une hypométhylation dans une région "hypermutable" du gène p53 (27).

Des données similaires ont été rapportées chez l'homme (26). Une étude de déplétion/réplétion réalisée chez 9 femmes post-ménopausées placées dans une unité métabolique en situation de carence en acide folique a permis de retrouver une hypométhylation globale dans les lymphocytes des patientes (29). Cette hypométhylation était > 100% après 9 semaines de régime alimentaire pauvre en folates (56-11 microg/jour), et diminuait significativement trois semaines après la réintroduction de l'acide folique (286-516 microg/jour). La supplémentation en folates a augmenté l'extension de la méthylation de l'ADN chez des patients présentant un adénome du colon (30). La méthylation de l'ADN était diminuée dans des cellules de colon humain immortalisées en l'absence de folates (31). Fowler et al. (32) et Cravo et al. (33) ont montré en utilisant la méthode Sss1 méthylase assay que l'hypométhylation de l'ADN des cellules épithéliales de cancers cervicaux, gastriques, coliques et rectaux était aussi corrélée significativement au taux sérique et tissulaire de folates. L'induction de l'hypométhylation génomique a été considérée comme étant principalement secondaire à l'augmentation de l'homocystéine, qui à son tour augmente la concentration de S-adénosylhomocystéine et qui est considérée comme étant inhibitrice des réactions de méthylation. Dans une étude de prévalence, d'autres auteurs n'ont cependant pas retrouvé de lien entre le taux de

vitamine B9 et l'hypométhylation de l'ADN (24). L'influence du statut nutritionnel B9 sur la méthylation spécifique a été moins clairement établie (34).

c- La méthionine et la choline

La méthionine est un acide aminé soufré que les mammifères ne peuvent pas synthétiser de novo. Cette synthèse se fait à partir de l'homocystéine en présence de deux coenzymes donneurs de groupement méthyle, le méthyltétrahydrofolate (MeTHF) et la méthylcobalamine (**Figure 1**). Les besoins en méthionine sont physiologiquement couverts par l'alimentation et par la reméthylation méthionine synthase dépendante de l'homocystéine.

L'origine de la choline est alimentaire. Elle est nécessaire à la synthèse des membranes cellulaires (phospholipides, lysophosphatidylcholine, choline plasmalogène et sphingomyéline). Elle est aussi nécessaire à la biosynthèse des neurotransmetteurs cholinergiques (acétylcholine), au transfert transmembranaire des signaux, au transport et métabolisme des lipides (cholestérol) et est aussi une source importante de groupements méthyles (35).

La seule source de choline autre que l'apport alimentaire, est sa synthèse de novo par la phosphatidyléthanolamine-N-méthyltransférase. Les voies métaboliques de la choline et du métabolisme du monocarbonate interagissent au niveau de la synthèse de méthionine à partir de l'homocystéine. La méthionine est aussi régénérée à partir de l'homocystéine dans une réaction catalysée par la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT), dans laquelle la bétaine qui est un métabolite de la choline, sert de donneur de groupement méthyle (**Figure 1**) (36). Les concentrations de bétaine dans le foie de rats carencés en choline sont fortement diminuées, ainsi que les concentrations de folates (35). Le foie et le rein sont les tissus principaux dans lesquels l'enzyme bétaine homocystéine méthyltransférase est exprimée chez l'homme (37). Une perturbation en folates ou dans le métabolisme de la méthionine induit des modifications dans le métabolisme de la choline et vice versa. Lors d'une carence en choline, la concentration hépatique de choline décroît rapidement. Dans le même temps, les concentrations de S- adénosyl méthionine sont diminuées. Il a été suggéré que la disponibilité de la

méthionine puisse limiter la synthèse de S-adénosylméthionine lors d'une carence en choline car la méthionine synthase (MTR) seule pourrait alors ne pas synthétiser suffisamment de méthionine pour compenser la diminution de la synthèse bêtaïne dépendante (36). Il est aussi intéressant de noter que l'ADN n'est pas hypométhylé chez la souris méthionine adénosyltransférase 1A gene knock-out, sauf si l'animal est carencé alimentaires en choline (38).

d- Interrelations des métabolismes de la méthionine, de la choline et des folates

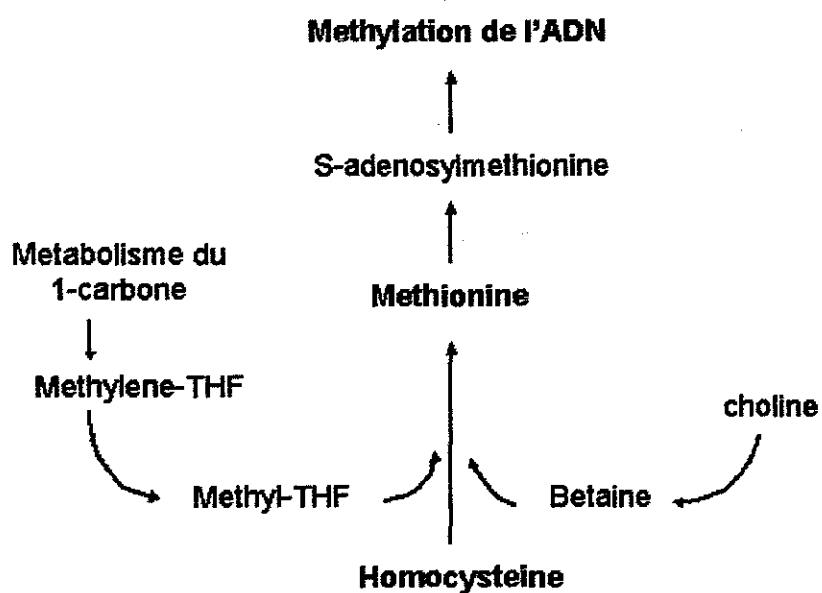
L'alimentation apporte 3 sources principales de groupements méthyles: la méthionine, les folates et la choline (39). Il est bien établi que les voies métaboliques de la méthionine, des folates et de la choline sont interdépendantes. Par exemple, lorsque l'apport exogène de méthionine et de choline est limité dans l'alimentation, la quantité de folates nécessaire à la reméthylation de l'homocystéine pour former de la méthionine est plus importante (40). La carence en tétrahydrofolate secondaire à une alimentation sans folates, induit une diminution de la concentration hépatique de choline et de S-adénosyl méthionine (39). Poirier et al. ont récemment rapporté que la S-adénosylméthionine chez les sujets normaux était négativement corrélée au taux des folates et de la vitamine B6 (41). A l'inverse, la concentration hépatique de folates diminuait de 31-40% après 2 semaines de régime alimentaire carencé en choline chez le rat (42). Cet effet était réversible après re-supplémentation en choline. Les rats carencés en méthionine et choline pendant 5 semaines avaient une concentration hépatique en folates qui était à 50% de la valeur de celle des rats contrôles (43). Lors d'une carence en choline, les concentrations hépatiques de S-adénosylméthionine diminuaient aussi de 50% (44) et les taux d'homocystéine étaient doublés (45). Le métabolisme de la choline, de la méthionine et des folates interagit au niveau où l'homocystéine est convertie en méthionine (35). Cette interrelation étroite dans le métabolisme de ces trois sources alimentaires de groupement méthyles signifie que l'ensemble de ces paramètres doit être évalué lorsque la relation entre carence alimentaire et méthylation de l'ADN est étudiée.

e- Méthionine, choline, folates et méthylation de l'ADN

Chez l'homme, les sources alimentaires majeures de groupements méthyles viennent de la méthionine (environ 10 mmol de méthyle/jour), du métabolisme du monocarbonate via le méthylfolate (environ 5-10 mmol de méthyle/jour), et de la choline (**Figure 7**). Il a été montré que les animaux carencés en choline et en méthionine ont une hypométhylation globale de l'ADN (46-49). L'induction de l'hypométhylation génomique a été considérée comme étant principalement secondaire à l'augmentation de l'homocystéine, qui augmente la concentration de S- adénosylhomocystéine et qui est considérée comme étant inhibitrice des réactions de méthylation (**Figure 8**). C'est pour cette raison que le taux plasmatique de SAH et non les concentrations de SAM a été retrouvé comme facteur le plus prédictif de la méthylation de l'ADN (26).

Il a été aussi montré que cette hypométhylation n'était pas uniquement globale mais aussi spécifique (50). L'augmentation de l'ARNm de c-fos, c-Ha-ras et c-myc a été par exemple corrélée à une hypométhylation de sites spécifiques localisés dans ces gènes, et ce une semaine après le début de la carence alimentaire de méthionine et choline chez le rat (51, 52). Chez la souris, la carence alimentaire en méthionine et choline a aussi été associée à une hypométhylation des oncogènes c-Ha-ras et raf (53). Les effets de la carence alimentaire sur la méthylation de l'ADN semblent intervenir rapidement ($\leq$ une semaine chez le rat Fisher) et avant la formation d'une tumeur dans le foie (46). Cette méthylation semble aussi réversible car une à deux semaines après restauration d'un régime alimentaire adéquat, il a été observé une régression de l'hypométhylation (54).

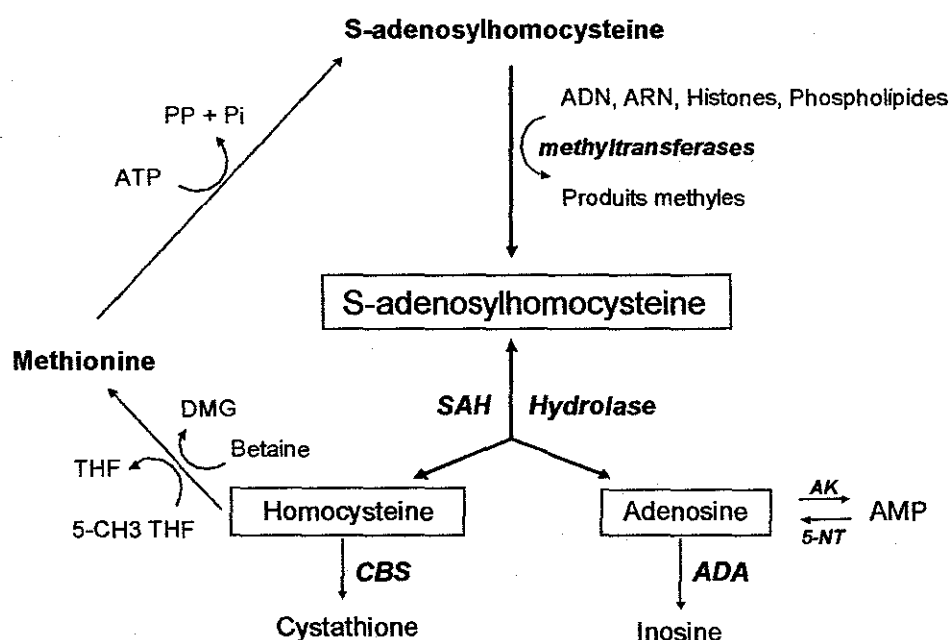
Figure 7



La méthylation de l'ADN dépend de la disponibilité des groupements méthyles venant de S-adenosylméthionine. La voie de transméthylation (homocystéine --> méthionine) s'interconnecte avec les voies de la choline et du tétrahydrofolate. La perturbation d'une des trois voies métaboliques s'accompagne de modifications compensatoires des deux autres.

(Figure tirée de Niculescu et al. (39))

Figure 8



Cycle de la méthionine avec détails sur la réversibilité de la réaction de S-adenosylhomocystéine hydrolase (SAH) et l'inhibition des méthyltransférases SAM-dépendantes par la SAH.

5-NT, 5-nucléotidase; ADA, adenosine deaminase; AK, adenosine kinase; ATP, adenosine triphosphate; DMG, diméthylglycine; Pi, phosphate inorganique; PP, pyrophosphate; THF, tétrahydrofolate; 5-CH₃ THF, 5-méthyl-tétrahydrofolate; CBS, cystathionine β-synthase.

(Figure tirée de James et al. (55))

CHAPITRE II – ACÉTYLATION / METHYLATION DES HISTONES ET REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

1- *Acétylation des histones*

La notion de nucléosome est connue depuis environ 30 ans. Le nucléosome est considéré comme étant l'unité fondamentale de la structure de la chromatine des cellules eucaryotes. Initialement, la compaction de l'ADN associée aux histones en des structures très organisées, appelées chromatine, a été considérée comme permettant de résoudre le problème de limitation d'espace dans le noyau cellulaire. La notion de lien entre le nucléosome et la fonction du génome a aussi été introduite depuis les années 1960 (56). Les nucléosomes sont les unités de la structure fondamentale de la chromatine et correspondent à 146 paires de bases d'ADN enroulées en deux tours autour d'un noyau octamérique de protéines histones: H2A, H2B, H3 et H4. D'autres compactions de l'ADN sont aussi réalisées en association avec la protéine histone H1, correspondant à la superstructure hélicoïdale appelée "la fibre de 30 nm" (57). La structure de la chromatine est la même dans quasiment toutes les cellules eucaryotes. Cependant, *in vivo* cette structure très conservée est sujette à de nombreuses modifications enzymatiques qui induisent une capacité quasiment infinie de variabilité de conformation. Une contribution majeure à cette hétérogénéité est la modification enzymatique post-translationnelle de la queue N-terminale des histones. Ces terminaisons sont exposées à la surface du nucléosome et peuvent être modifiées par acétylation, phosphorylation, méthylation, ubiquitination et ADP-ribosylation d'acides aminés spécifiques. Les terminaisons amino-terminales des histones sont moins structurées que les régions des histones correspondant aux zones d'enroulement de l'ADN et interagissent aussi avec l'ADN chargé négativement (backbone) ou avec les protéines associées aux chromatines (58). De toutes ces modifications, l'acétylation du groupe ϵ -amino du résidu lysine est le plus fréquent et le plus étudié (59). Cette acétylation correspond à un transfert de groupe acétyle à partir de l'acétyl-coenzyme A à un groupe ϵ -amino de résidu lysine présent dans la queue N-terminale des histones. La première observation d'un lien entre activité histone acétyltransferase (HAT) et transcription de gènes n'a été réalisée qu'en 1996 (60). Cependant, le mécanisme précis qui lie l'acétylation et la régulation de la transcription est peu connu. Il est cependant admis que les modifications

induites dans la structure de la chromatine par l'acétylation modulent probablement l'accès des séquences cis de régulation aux protéines non-histones (56). Ainsi, la chromatine comprenant les îlots CpG est généralement largement acétylée, sans histone H1, et présente une région d'ADN sans nucléosome. Cette configuration de chromatine ouverte permettrait une interaction des facteurs de transcription avec les promoteurs des gènes (6).

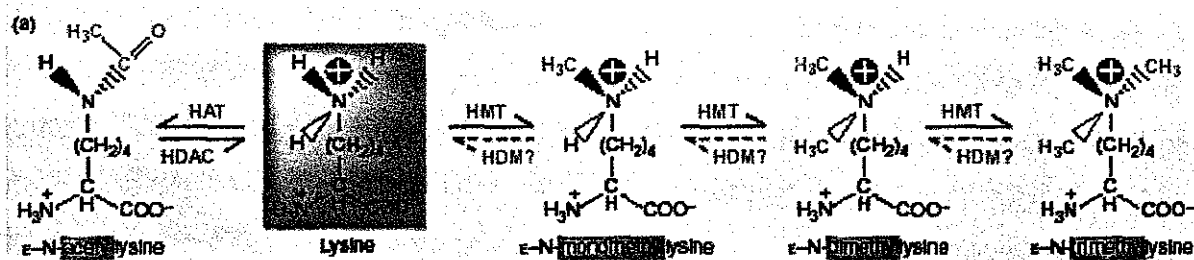
De nombreuses protéines co-activatrices sont maintenant connues pour avoir une activité HAT et peuvent être regroupées en 5 familles (GCN5/PCAF; TAFII250; CBP/p300; SRC et la famille GNAT related). Au moins un activateur spécifique de séquence se liant à l'ADN (ATF-2) possède aussi une activité HAT. Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine utilisant des anticorps spécifiques pour l'isoforme histone acétylée montrent que les HAT remodelent la chromatine préférentiellement dans les régions promotrices, et probablement facilitent la liaison avec d'autres facteurs de la transcription. Les étapes ultérieures de la transcription nécessitent aussi probablement l'acétylation des histones. La répartition de l'acétylation des histones sur différents gènes pourrait correspondre à la combinaison des enzymes recrutées aux différentes étapes de la transcription. L'acétylation des histones est un processus réversible et les déacétylases font aussi partie intégrale des cycles de transcription. L'acétylation est généralement associée à une activation, alors que l'absence d'acétylation tend plutôt à être corrélée avec la répression. Ces deux procédés de régulation travailleraient en harmonie et en équilibre pour obtenir des niveaux appropriés de transcription (61). Les modifications observées sur la partie terminale des histones pourraient aussi correspondre à la complexité du "code des histones" qui a été proposé pour expliquer la régulation de l'expression des gènes. Le code des histones tiendrait compte aussi des autres modifications comme la méthylation et la phosphorylation. Chaque modification pourrait ainsi correspondre à un mot, et l'ensemble des modifications pourrait correspondre à une phrase qui serait lue par les facteurs de la transcription. Autrement dit, il est considéré que les différentes combinaisons d'acétylation ou de méthylation des lysines sur la queue des histones pourraient avoir un effet antagoniste ou coopératif concernant leurs effets biologiques et la transcription (56).

2- Méthylation des résidus lysine et acétylation des histones

L'enroulement de l'ADN des cellules eucaryotes pour former des nucléosomes représente un obstacle majeur à la transcription qui doit être levé pour pouvoir réaliser la transcription du génome. Des données récentes indiquent que l'acétylation du noyau des histones est directement liée à l'activation de la transcription. Cette acétylation est catalysée par les histones acétyltransférases (HAT) et diminuée par les histones déacétylases (HDAC). L'acétylation enzymatique du groupe ϵ -amino des résidus lysines de la terminaison amino-terminale des histones diminue leur charge positive. Comme ces terminaisons sont fortement basiques, il a été postulé que l'acétylation diminuait leur affinité pour l'ADN chargé négativement (par la présence des phosphates PO_4^-) et facilitait la liaison de protéines qui régulent la transcription. De plus, d'autres données récentes suggèrent que l'acétylation des histones pourrait aussi modifier la structure de la queue des histones en augmentant leur contenu en hélice-alpha (58).

En comparaison, la méthylation des queues des histones ne modifie pas la charge globale de ces terminaisons, mais augmente leur caractère basique et leur hydrophobie par l'addition de groupements méthyles (mono, di ou tri) (**Figure 9**). De plus, l'addition de groupements méthyles sur la queue des histones augmente leur affinité pour les molécules anioniques (ex: ADN) ainsi que leur résistance à la digestion par la trypsine. D'une manière générale, ceci montre qu'il existe une association entre la queue méthylée des histones et l'ADN. Plus précisément, de façon similaire à l'acétylation, la méthylation des histones pourrait altérer l'interaction de la queue des histones avec l'ADN et/ou les protéines associées à la chromatine et ainsi modifier la structure des nucléosomes et leurs fonctions (58). La méthylation des histones est catalysée par les histones méthyl-transférases (HMT), qui utilisent la S-adénosylméthionine (SAM) comme cofacteur. Les histones acétyltransférases (HAT) utilisent l'acétyl-coenzyme A comme cofacteur. Contrairement à l'acétylation, la majorité des données disponibles suggère que la méthylation de la queue des histones est irréversible. L'existence d'une histone déméthylase (HDM) semble peu probable car il n'existe pas d'observation de diminution des histones méthylées de la chromatine.

Figure 9



Structure moléculaire de la lysine, acetyllysine et methyllysine. Les résidus lysine présents sur les queues amino-terminales des histones peuvent être modifiés de façon post-transcriptionnelle par acétylation ou méthylation. L'acétylation est catalysée par les histones acétyltransférases (HAT) et la déacétylation se fait par les histones déacetylases (HDAC). La substitution méthyle se fait par les histones méthyl-transférases (HMT) et la réaction inverse pourrait être due à des histone déméthylases (HDM ?) dont l'existence n'est pour l'instant pas prouvée.

(Figure tirée de Rice et al. (58))

Cependant, de façon similaire à l'acétylation, il est probable que la régulation ou le ciblage de la déméthylation des histones se fasse sur des résidus spécifiques (loci spécifiques ou promoteurs), bien que ces activités de déméthylation n'aient pas été encore observées (**Figure 9**).

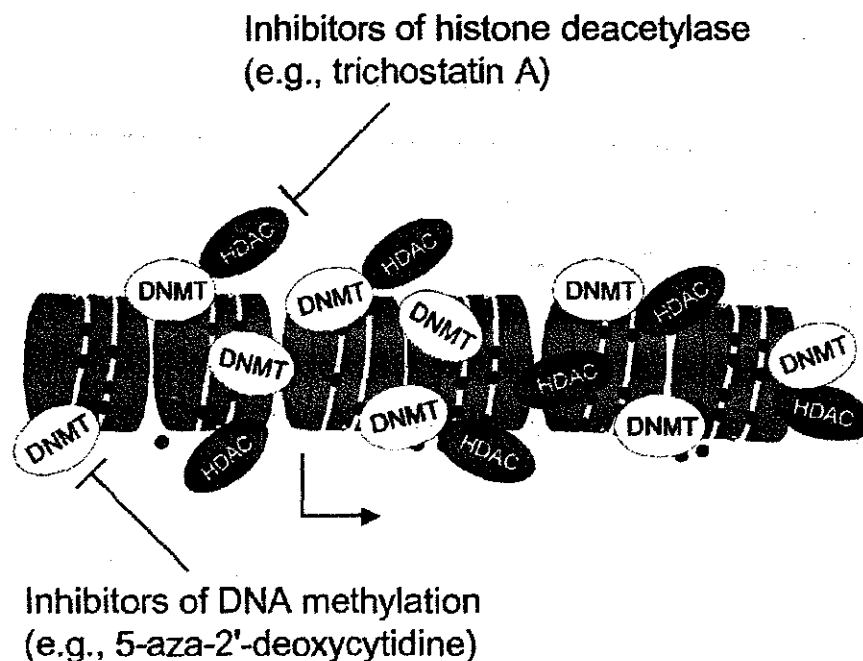
Les cibles principales de l'acétylation sont des résidus lysine localisés dans les queues amino-terminales des histones H3 et H4. Ces modifications sont aussi observées dans les queues des histones H2A et H2B (58, 62). De façon similaire, la méthylation post-traductionnelle des histones est aussi un événement non-aléatoire *in vivo* puisque des lysines (et arginines) spécifiques sont méthylées sélectivement. Il est aussi considéré que, de façon similaire aux HAT, chaque HMT possède probablement ses propres paramètres ainsi qu'une préférence, voire une spécificité, pour des histones et des résidus lysine. La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 joue principalement un rôle négatif sur la transcription. De plus en plus de données suggèrent que la méthylation de K4 de l'histone H3 est au contraire associée à l'activation de la transcription. En effet, les méthyl-transférases capables de méthyliser la lysine 4 de l'histone H3 sont généralement des activateurs transcriptionnels, comme Ash1 ou SET1, ou bien sont physiquement associées à des co-activateurs (63). Par ailleurs, l'histone H3 méthylée sur la lysine 4 est enrichie dans les zones transcriptionnellement actives. La conséquence moléculaire de la méthylation de la lysine 4 n'est pas encore connue. L'hypothèse la plus probable serait que la méthylation de cette lysine favoriserait le recrutement d'un facteur activateur, ou au contraire inhiberait l'interaction d'un complexe répresseur. Il semble aussi que la méthylation soit une modification beaucoup moins dynamique que l'acétylation ou la phosphorylation des histones (63). Des données récentes suggèrent aussi que chaque lysine des queues de H3 ou H4 est soit acétylée soit méthylée (58). Ceci pourrait correspondre à des contextes biologiques différents. La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 joue un rôle majeur dans le silencing (terme qui désigne la répression transcriptionnelle qui s'exerce sur un large domaine chromatinien). Les histones méthyltransférases de la famille Suv39H1, qui sont strictement spécifiques de la K9 de l'histone H3, sont en effet requises chez la drosophile pour le silencing de gènes positionnés au voisinage d'un centromère (hétérochromatine péricentrique) (64). Par ailleurs, il est aussi possible que d'autres lysines habituellement acétylées soient aussi des cibles pour la méthylation, comme il est possible que l'acétylation ou

la méthylation soient exclusives pour une lysine donnée. Par exemple, des préparations de chromatine active sur le plan transcriptionnel ont une histone H4 hyperacétylée et plutôt une méthylation des histones H3. Ceci suggère que ces modifications pourraient agir de façon synergique pour promouvoir la transcription par un moyen pour l'instant encore inconnu (58). Certains auteurs considèrent même que la méthylation de l'ADN pourrait avoir un rôle prépondérant sur la déacétylation des histones dans l'induction de la répression de la transcription (6).

3- Acétylation des histones, méthylation de l'ADN et agents thérapeutiques

Alors que l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur par des mécanismes génétiques (délétion, mutation) et épigénétiques (acétylation, méthylation) sont équivalents du point de vue fonctionnel, il existe entre eux des différences fondamentales importantes concernant le mécanisme et la cible des agents thérapeutiques. Ainsi, un événement génétique constitue une lésion et une altération de la séquence de l'ADN qui est fixe et irréversible; et qui induit une inactivation définitive du gène. A l'inverse, les modifications épigénétiques ne modifient pas la séquence de l'ADN et sont potentiellement réversibles. La suppression des modifications induites par les facteurs épigénétiques pourrait se faire à deux niveaux: l'inhibition de la méthylation de l'ADN et l'inhibition de la déacétylation des histones (**Figure 10**) (5). Des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et des histone déacétylases sont disponibles et peuvent moduler la transcription de gènes in vitro et in vivo à des concentrations non toxiques. Un inhibiteur spécifique de la méthylation de l'ADN, la 5-aza-2'-deoxycytidine, a été largement utilisée comme agent déméthylant in vitro, et est par exemple utilisé cliniquement dans le traitement des leucémies aigües et des myélodysplasies (65). De façon similaire, des expériences de cultures cellulaires ont montré que les inhibiteurs des histones déacétylases (ex: Trichostatine A) pouvaient réactiver un ensemble de gènes qui étaient épigénétiquement dans un état initial non compatible avec leur transcription. Plusieurs de ces inhibiteurs sont actuellement évalués dans des études cliniques de phase III (66). Il a par ailleurs aussi été montré que la répression transcriptionnelle in vivo pourrait être diminuée par un inhibiteur de la déacétylase, suggérant que les deux mécanismes globaux de la régulation des

Figure 10



La diminution de la transcription correspondant à un état de chromatine ayant une méthylation des promoteurs pourrait être améliorée (ré-augmentation de la transcription) par l'utilisation d'inhibiteurs de la méthylation de l'ADN ou de l'acétylation des histones. Le 5-aza-2'-deoxycytidine est un analogue des cytosines qui est incorporé dans l'ADN et qui agit comme un inhibiteur covalent des DNA méthyltransférases (DNMT). L'inhibition des histone déacetylases favorise l'acétylation du noyau des histones.

(Figure tirée de Worm et al. (5))

gènes pourrait être la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones (11). Cependant, l'inconvénient majeur de ces deux types de médicaments (inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et des histone déacétylases) est leur absence de spécificité. Ainsi l'activation concomitante de gènes qui normalement sont silencieux, mais qui contribuent à l'immortalisation cellulaire et à la progression de la cancérogénèse, pourrait significativement compromettre par ailleurs le bénéfice de ces médicaments sur les gènes ciblés initialement. Des recherches ultérieures devraient donc pouvoir permettre de développer des stratégies pour réactiver de façon plus spécifique les gènes d'intérêt (5). Par ailleurs, d'autres molécules comme le suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) sont des inhibiteurs plus spécifiques des histones déacétylases et pourraient avoir une action plus importante. Ces molécules sont en cours d'évaluation (67).

CHAPITRE III – METHYLATION DE L'ADN ET CARCINOGENESE

1- Métabolisme et carcinogénèse

Le lien entre statut vitaminique et apparition de cancers a commencé à être étudié dans les années 1970 lorsqu'il a été fait l'hypothèse que l'exposition à la fumée de cigarette rendait l'épithélium bronchique plus sensible à l'apparition de cancer par l'intermédiaire de la carence tissulaire en vitamine B12 et folates (34). La carence tissulaire pouvait être expliquée par l'inactivation directe des folates secondaire à l'action des hydrocarbures carcinogènes (cyanates, isocyanates) et à l'inactivation de la vitamine B12 par l'oxyde nitrique et les nitrites. L'ensemble de ces molécules est contenu dans la fumée de cigarettes. Plusieurs études épidémiologiques récentes chez l'homme ont montré qu'il existait un lien entre la carence en vitamine B12, en folates et en méthionine et le risque de cancer dans divers organes. Il s'agit principalement du colon, du sein, du col utérin, du poumon, de l'estomac, du pancréas, et du myélome multiple (41, 68-71). Jusqu'à présent le lien le plus évident entre le métabolisme du monocarbonate et le cancer est la relation entre les folates et le cancer colorectal (72). Les folates pourraient avoir potentiellement la possibilité de réduire la carcinogénèse par divers mécanismes incluant la maintenance de la synthèse normale d'ADN et la méthylation de l'ADN. Comme cela est visualisé sur la figure 1, le 5-méthyltetrahydrofolate est essentiel pour la méthylation de l'ADN, et les folates sont nécessaires sous la forme de 5,10-méthylènetetrahydrofolate pour convertir le déoxyuridylate en thymidylate. Cette dernière réaction est nécessaire pour la synthèse et la réparation de l'ADN. Lorsque les niveaux de 5,10-méthylènetetrahydrofolate sont inadéquats, l'incorporation d'uracile (à la place de thymidine) est observée à des taux élevés lors de la synthèse d'ADN (73). La carence en folates est donc liée à l'incorporation massive d'uracile dans l'ADN chez l'homme, induisant une augmentation de fréquence des cassures chromosomiques (74). L'altération de la méthylation (hypométhylation globale et hyperméthylation spécifique) est aussi un mécanisme important de l'apparition de cancers (cf Infra).

La plupart des cancers colorectaux proviennent d'adénomes colorectaux qui sont considérés comme des lésions précancéreuses précédant l'apparition de cancers de plusieurs années. La carence en folates a été clairement liée à l'augmentation de l'incidence des adénomes colorectaux avec des risques relatifs variant de 1,2 à 3,7 (74). Le lien entre carence en folates et risque de cancer colorectal a aussi été largement étudié. Plusieurs études cas-contrôles et de cohortes prospectives ont montré que le risque relatif variait de 1,1 à 3,2 (74). Cependant, au moins une étude ne retrouvait pas de lien entre la carence en folates et le risque de cancer colo-rectal (75). Par ailleurs, certaines études retrouvaient des associations équivalentes voire plus importantes pour le bêta-carotène et l'acide ascorbique, soulignant ainsi la difficulté d'affirmer un effet indépendant des folates (76). L'effet des folates sur le cancer colorectal pourrait aussi être modulé par l'alcool, la méthionine, la vitamine B12, la riboflavine et des polymorphismes de la MTHFR (74). L'apport alimentaire en méthionine pourrait être bénéfique à travers la méthylation de l'ADN (qui n'est pas diminuée) et par l'épargne des folates qui sont nécessaires à d'autres voies métaboliques (synthèse et réparation de l'ADN). Cependant, la plupart des études prospectives sur les adénomes ou les cancers colo-rectaux ont montré soit un lien significatif soit l'absence de lien entre l'apport de méthionine (régime riche en protéines) et la carcinogénèse. Aucune conclusion claire n'est actuellement admise (74). L'alcool pourrait induire une modification des liens entre folates et carcinogénèse car l'acétaldéhyde (métabolite de l'alcool) pourrait inactiver le méthyltétrahydrofolate et inhiber la méthionine synthase (MTR). Ceci pourrait induire un piège pour le 5-méthyltétrahydrofolate, et diminuer les taux de 5,10-méthyltétrahydrofolate (**Figure 1**). Par ailleurs, une déplétion cellulaire en folates est observée car le 5-méthyltétrahydrofolate est un substrat pour le polyglutamation, qui est nécessaire pour retenir les folates dans les cellules. De plus, la prise d'alcool peut diminuer les stocks de folates par malabsorption. Enfin, l'alcool pourrait aussi avoir une action spécifique sur la muqueuse colique qui possède un taux de régénération important (74). Dans une étude animale, la carcinogénicité d'un régime carencé en groupements méthyles était augmentée lors de la prise d'alcool, suggérant ainsi un effet agoniste de l'alcool (77). Cet effet agoniste est aussi considéré comme valide par plusieurs études épidémiologiques chez l'homme (74).

L'activité de la MTHFR est augmentée lorsque le niveau cellulaire de méthionine est bas et lorsque les taux d'homocystéine sont augmentés (78). Deux polymorphismes modulant l'activité de la MTHFR ont été décrits: transition de cytosine à thymine en position 677 (C677T) et cytosine à adénine en position 1298. Le variant C677T est corrélé à une diminution de l'activité de l'enzyme et à une prévalence allélique d'environ 35% chez les caucasiens (74). L'homozygotie pour la mutation C677T et l'hétérozygotie pour ces deux polymorphismes induisent la nécessité d'une augmentation d'apport d'acide folique pour maintenir les concentrations plasmatiques de folates et la reméthylation de l'homocystéine (79). Il a été rapporté que le variant 677TT MTHFR pourrait augmenter le risque de cancer colorectal uniquement lorsque le taux des folates est faible et lorsque les patients sont carencés en groupements méthyles. Parmi des patients ayant le génotype cytosine cytosine ou cytosine thymine, une association modeste a seulement pu être observée entre l'alimentation en groupements donneurs de méthyles et le risque d'adénome ou de cancer colorectal. Les patients ayant le génotype TT semblent aussi être à faible risque de cancer colorectal si leur alimentation n'est pas carencée et sans prise d'alcool (74). Le rôle de la MTHFR dans la modulation du risque de cancer colorectal et d'autres cancers doit être encore clarifié dans l'avenir. Par ailleurs, la diminution de l'activité de la MTHFR a aussi été associée avec l'augmentation du risque d'athérosclérose, de maladies neurologiques, et de pathologies congénitales (72). Enfin, il a aussi été observé que le métabolisme des folates était modifié dans les cellules d'adénocarcinomes du colon, notamment lorsque les cellules sont soumises à une pression métabolique par un analogue structural, le méthotrexate. Il a été observé une amplification du gène de la dihydrofolate réductase et une augmentation de l'expression de la folate binding protéine, notamment dans la lignée HT29 adaptée à des concentrations croissantes en méthotrexate (80, 81).

2- Hypométhylation de l'ADN et carcinogénèse

La méthylation de l'ADN est un phénomène épigénétique qui est médié par le transfert de groupements méthyles. Bien que le tissu cancéreux soit associé à des zones d'hyperméthylation, la présence d'une hypométhylation globale de l'ADN dans

beaucoup de types de tumeurs suggère que l'hypométhylation joue un rôle significatif et fondamental dans la carcinogénèse (34, 82). Les mécanismes les plus probables intervenant entre la méthylation globale de l'ADN et la transformation néoplasique sont l'activation d'oncogènes et l'induction d'une instabilité génomique. Le lien entre l'hypométhylation de l'ADN et l'apparition ou la progression de tumeurs a été suggéré dans plusieurs études animales ou de cultures cellulaires (83). Des cellules humaines ou de souris, faiblement métastatiques ont par exemple été converties en cellules hautement métastatiques après traitement par inhibiteur de la méthylation (84). L'instabilité génomique induit l'apparition de mutations dont la conséquence est l'apparition de chromosomes dont la structure est altérée et anormale (1, 85-87). Les propriétés fondamentales des cellules cancéreuses sont la capacité de se répliquer sans limitation, l'indifférence aux signaux de croissance cellulaire et aux facteurs d'inhibition de croissance cellulaire, l'échappement à l'apoptose, l'angiogénèse accrue, l'agressivité locale et la capacité de former des métastases. Chacune de ces caractéristiques est influencée par un gène ou un groupe de gènes. L'impossibilité d'exprimer un gène correctement ou de produire une protéine fonctionnelle peut ainsi expliquer l'induction d'un comportement cellulaire non contrôlé correspondant à l'apparition progressive d'un néoplasme.

La plupart des recherches en biologie moléculaire se sont concentrées sur le rôle des changements génétiques (altérations directes de la séquence de l'ADN). Mais les mécanismes alternatifs de modulation des gènes (méthylation de l'ADN) affectent l'expression d'un gène sans en modifier sa séquence et interviennent aussi dans la cancérogénèse (4). Deux types de modifications de la méthylation ont été observés durant la progression tumorale: de grandes zones d'hypométhylation globale le long du génome, et des zones localisées d'hyperméthylation sur certains sites spécifiques, les îlots CpG, situés dans les régions promotrices (6, 88). Les origines précises de ces modifications sont inconnues (5). La contribution potentielle de la méthylation de l'ADN dans l'oncogénèse semble être médiée par les mécanismes suivants:

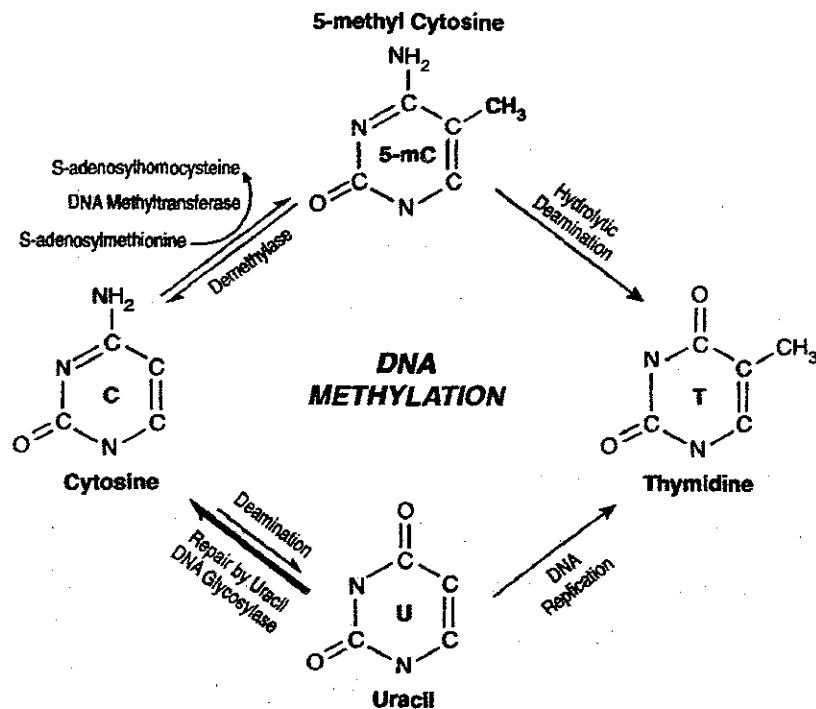
a- Mutation C --> T dans les cellules cancéreuses

Le taux important de mutations des résidus cytosines dans les dinucléotides CpG (qui sont la cible des DNA méthyl-transférases) est principalement dû à un taux important de transitions cytosine --> thymine, qui sont la conséquence de la déamination hydrolytique des 5-méthyl-cytosines (6) (**Figure 11**). Dans l'ADN purifié, la méthylation des cytosines est considérée comme capable d'augmenter le taux de déamination par un facteur 2 à 4 (89). Ce mécanisme de mutation a été initialement observé dans les cellules procaryotes. Les cytosines non méthylées peuvent aussi être déaminées pour former de l'uracile. Par ailleurs l'ADN uracile – glycosylase répare les mésappariements G:U et non les mésappariements G:T mais les DNA méthyltransférases empêcheraient cette réparation, contribuant à la transition C--> U --> T. Les ADN méthyltransférases favoriseraient aussi la transition cytosine méthylée vers la thymidine (5-mC --> T) sur les dinucléotides CpG dans des conditions où l'activité des DNA méthyltransférases est augmentée ou lorsque les niveaux cellulaires de S-adenosylméthionine sont diminués (6). Par exemple, les mutations du gène suppresseur P53 sont observées dans plus de 50% des tumeurs solides humaines. Il est estimé que 24% de ces mutations seraient secondaires à des transitions C --> T sur des dinucléotides CpG, suggérant ainsi que la méthylation de l'ADN contribuerait à ces mutations (90).

Lorsque la méthylation de l'ADN est diminuée, l'inhibition de la MTHFR par la S-adenosylméthionine serait diminuée induisant la conversion irréversible de 5,10 MTHF en 5 MTHF, favorisant ainsi une augmentation du pool d'UMP et de l'incorporation de l'uracile dans l'ADN (**Figure 1**) (1, 40, 91). Plusieurs études ont montré que le niveau d'uracile dans l'ADN était 70 fois plus important chez les sujets ayant un taux de folates < 4 ng/mL que chez les sujets ayant un taux de folates > 4 ng/mL (1, 92). Cette accumulation de dUMP induit une incorporation d'uracile dans l'ADN plutôt que de thymine. Ce mécanisme induit non seulement des mutations ponctuelles mais aussi génère des cassures simple ou double brins d'ADN, des cassures chromosomiques et la formation de micronuclei (92). Des études de cultures cellulaires ont indiqué que des zones de méthylation aberrantes situées dans les régions codantes pourraient servir d'initiation à des mutations et pourraient induire une fragilité de la structure des chromosomes au niveau des sites hypométhylés par augmentation de l'insertion d'uracile (26). L'hypométhylation des régions codantes de gènes critiques pourrait induire une instabilité de ces régions

par deux mécanismes : soit parce que la déamination en uracile est plus probable sur le site hypométhylé, soit aussi parce que ces régions pourraient devenir plus sensibles aux nucléases endogènes (26).

Figure 11



Représentation schématique des voies métaboliques biochimiques de la méthylation de la cytosine, la déméthylation, la mutagnèse de la cytosine et la 5-méthyle cytosine.

(Figure tirée de Singal et al. (6))

Par conséquent, les modifications de la méthylation peuvent affecter indirectement l'activité d'un gène sans modification de la séquence transcription-traduction en augmentant la probabilité d'apparition d'un événement mutationnel, réduisant ainsi la stabilité du chromosome, et entraînant aussi le dysfonctionnement du produit protéique (4).

b- Hypométhylation de l'ADN

La diminution globale de la méthylation est une donnée communément admise dans les mécanismes de carcinogénèse (6, 93). Cette diminution semble commencer tôt dans le processus de carcinogénèse, avant le développement de la tumeur elle-même. A côté de cette hypométhylation globale, des oncogènes spécifiques ont été observés comme étant hypométhylés dans les tumeurs humaines (6). Une corrélation inverse a été par exemple observée entre la méthylation et l'expression de gènes tels le gène bcl-2 (antiapoptose) dans les lymphocytes B des leucémies chroniques (94), et le proto-oncogène k-ras dans les cancers du colon et du poumon (88). La diminution de la méthylation, et par conséquent l'augmentation de l'expression de gènes, pourrait permettre l'expression de proto-oncogènes qui étaient auparavant quiescents et induire des événements de prolifération cellulaire. Par ailleurs, l'hypométhylation est aussi associée à l'instabilité chromosomique, la perte "d'imprinting", et la réactivation de transposons et de rétrovirus qui tous contribuent directement ou indirectement à l'apparition de tumeurs (4, 34, 83, 95, 96).

Des observations provenant de plusieurs groupes ont montré que le contenu en 5-méthylcytosine de l'ADN était diminué durant la carcinogénèse hépatique et colique (4, 46, 83, 97). L'hypométhylation de l'ADN coïncide aussi avec des modifications dans le niveau d'ARNm de plusieurs gènes comme c-myc, c-fos, c-Ha-ras, c-Ki-ras, and p53 (40, 52, 72, 97, 98). De la même manière, des polymorphismes du gène de la méthionine synthase et de la méthyltétrahydrofolate réductase ont été reliés avec l'hypométhylation globale et la carcinogénèse (99-101). Par exemple, les patients porteurs du variant 677CC MTHFR ont été considérés comme ayant un risque augmenté de développer une néoplasie colorectale, si leur alimentation était pauvre en groupements méthyles (102).

c- Hyperméthylation de gènes suppresseurs

En plus de mutations ou de délétions ponctuelles, la répression de la transcription par hyperméthylation de séquences promotrices suggère un moyen alternatif pour l'inactivation de gènes suppresseurs dans la carcinogénèse. Ainsi, en théorie, la présence de sites hyperméthylés dans des régions promotrices, comme celles des gènes suppresseurs, pourrait résulter en une inhibition de la transcription et une incapacité à supprimer la prolifération cellulaire. L'association claire entre la méthylation des promoteurs et l'inactivation de la transcription a induit une révision de l'hypothèse de Knudson (hypothèse des deux allèles) pour l'inactivation des gènes suppresseurs, en ajoutant un nouveau mécanisme d'inactivation des gènes (103). La méthylation de l'ADN est ainsi considérée comme fonctionnellement équivalente aux événements génétiques comme les mutations et les délétions. Les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur pourraient alors être inactivés par une combinaison d'un événement génétique (mutation, délétion) et épigénétique (5). Dans des cancers chez l'homme, il existe en fait un nombre important de gènes suppresseurs de tumeurs inactivés par une méthylation aberrante de l'îlot CpG du promoteur correspondant (95). La méthylation *de novo* de ces gènes pourrait intervenir précocément dans la progression tumorale et agir sur des mécanismes cellulaires comme le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, et les signaux de croissance entre différentes cellules. L'hyperméthylation de l'ADN pourrait aussi avoir comme conséquences l'inactivation de gènes régulant la réponse cellulaire à certaines médications (chimiothérapie) ou l'inactivation des gènes "caretaker" qui interviennent dans la réparation de l'ADN et la protection des cellules contre les agents carcinogènes (5).

Le gène du rétinoblastome (Rb) a été le premier gène suppresseur pour lequel l'hyperméthylation des îlots CpG a été observée (104). La protéine Rb possède un rôle dans la transition entre la phase G1 et la phase S du cycle cellulaire. Elle a ainsi pour effet de garder les cellules en phase G1 par induction du silencing de gènes nécessaires à l'entrée dans la phase S. La répression de l'entrée en phase S est importante pour corriger la prolifération cellulaire et cette répression est perdue lorsque le silencing de Rb est altéré, comme cela est le cas pour les cellules de

nombreux cancers. Récemment, la protéine Rb a aussi été considérée comme responsable d'interactions avec les protéines SUV39H1 et HP1 qui interagissent pour induire la formation de l'hétérochromatine (caractérisée par la répression de l'activité génomique) (105). L'inactivation du gène Von Hippel-Lindau (VHL) par des mutations somatiques acquises sur l'un des allèles, associée à la perte du second allèle a été impliquée dans la cancérogénèse des carcinomes rénaux à cellules claires. Herman et al. ont retrouvé une hyperméthylation sur les îlots CpG du gène VHL chez 5 sur 26 patients ayant une tumeur rénale à cellules claires. De plus le traitement des lignées cellulaires issues des tumeurs rénales par un inhibiteur des ADN méthyltransférases (5-déoxiazacytidine) a conduit à une déméthylation et à l'expression du gène VHL qui était initialement silencieux (106). Un autre exemple est celui de la protéine P16 qui est importante pour la régulation du cycle cellulaire (aussi connue sous les noms de MTS-1, INK4a, et CDKN2a). L'effet biologique majeur de P16 est d'arrêter la progression du cycle cellulaire au niveau de la transition des phases G1 / S. La perte de la fonction de P16 pourrait induire la progression d'une tumeur en permettant la prolifération non régulée des cellules. Une modification cytogénétique fréquente observée dans les cultures de cellules tumorales et de façon moindre dans les tumeurs primitives, est la perte d'hétérozygotie sur la région 9p du chromosome 21 (qui contient les gènes P15 et P16). Parmi toutes les tumeurs solides étudiées, il a été fréquemment observé une méthylation des îlots CpG dans la région de P16, et le traitement des lignées cellulaires par 5-azacytidine a permis la réactivation transcriptionnelle de ce gène (6). Pour le cancer du colon, malgré l'absence de perte allélique sur la région 9p ou de délétion homozygote de P16 ou de mutations du gène Rb, il a été observé que 30 à 40% des allèles correspondant à P16 étaient hyperméthylés. L'inactivation médiée par l'hyperméthylation de P16 a aussi été observée pour les cancers du cerveau, du sein, du colon, de la tête et du cou, du poumon et certains lymphomes (10). Par ailleurs, P15 est un gène inhibiteur des kinases CDK4 et CDK6 cycline-dépendantes et paraît jouer un rôle dans les réponses d'inhibition de croissance médiées par TGF- β (transforming growth factor). Une hyperméthylation de P15 a aussi été montrée dans les syndromes myélodysplasiques et l'hyperméthylation P15 et P16 dans les myélomes multiples (107).

d- Induction d'instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique peut induire des mutations dans les gènes, représentant ainsi une voie indirecte par laquelle les modifications de méthylation peuvent affecter l'expression de gènes (72). Expérimentalement, Lengauer et al. ont introduit des séquences exogènes riches en îlots CpG dans un gène rétroviral contenant le gène de la β -galactosidase, dans des lignées cellulaires de cancer du colon. La moitié des lignées cellulaires n'exprimait pas la β -galactosidase, et ces lignées étaient déficientes pour l'activité de réparation des mésappariements (MMR-). L'autre moitié des lignées cellulaires exprimait le gène β -galactosidase (témoin de l'expression effective du rétrovirus) et était compétente pour l'activité de réparation des mésappariements (MMR+). Lors de l'analyse de la méthylation, les lignées MMR- étaient méthylées alors que les lignées MMR+ étaient hypométhylées (108). Ces auteurs ont considéré que les lignées cellulaires MMR- et méthylées représentaient probablement un état physiologique normal. Ceci était basé sur leurs observations antérieures montrant que l'expression de gènes rétroviraux était souvent diminuée par méthylation au cours du temps. De plus, l'utilisation de 5-azacytidine (agent diminuant la méthylation) permettait d'obtenir des lignées cellulaires exprimant le gène de la β -galactosidase et qui étaient compétentes pour l'activité de réparation des mésappariements (MMR+ et hypométhylation). Il a donc été proposé deux mécanismes principaux pour l'induction d'instabilité chromosomique (pour les cancers colo-rectaux). Le premier est la participation de mutations ponctuelles, de microdélétions, et de microinsertions associées au caractère déficient pour l'activité de réparation des mésappariements (MMR-). Le deuxième est en considération pour les cellules MMR+, et pourrait correspondre au gain ou à la perte de chromosomes secondairement à l'hypométhylation. Ainsi, le gain ou la perte de dinucléotides pourrait entraîner une instabilité nécessaire au développement et à la progression de tumeurs (109). D'autres données expérimentales supportent l'hypothèse d'un lien entre hypométhylation et instabilité génomique. Feinberg et al. ont retrouvé une diminution de 8% à 10% du contenu en 5-méthyl cytosine dans les adénomes et adénocarcinomes coliques, sans différence entre les tumeurs bénignes et malignes (110). De façon intéressante, les 3 patients ayant le contenu le plus important en 5-méthyl cytosine dans les cellules coliques

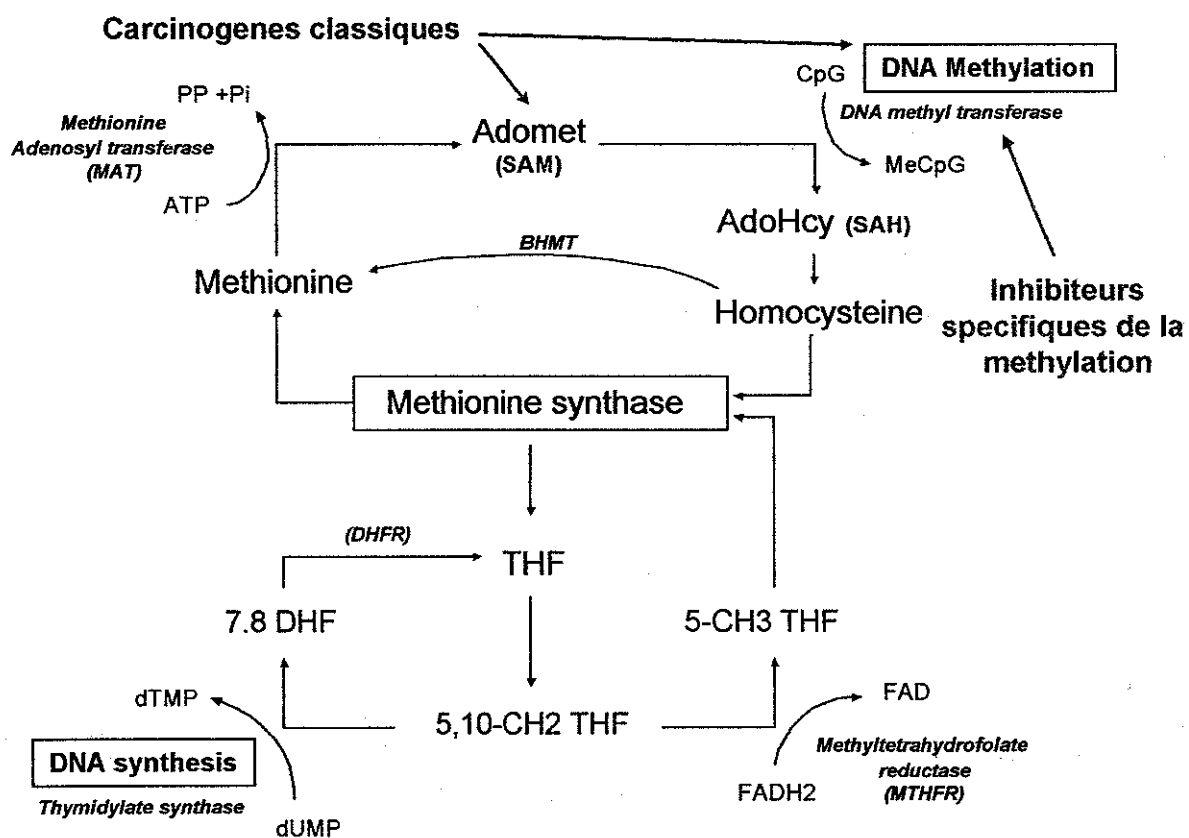
normales avaient un syndrome de Lynch (HNPCC) et un phénotype MMR- (110). L'hypométhylation de l'ADN semble aussi induire une instabilité chromosomique dans des cellules souches embryonnaires qui n'ont pas de gène DNA méthyltransférase 1 et dans des cellules traitées avec un agent déméthylant (5-azadeoxycytidine) (110).

CHAPITRE IV – MODELES DE RATS ET CANCERS DU FOIE

1- Carence alimentaire en groupements méthyles avec utilisation d'agents carcinogènes

En absence d'utilisation d'agents carcinogènes, il a été observé que l'alimentation chronique carencée en méthionine et choline induisait la formation de nodules hépatiques qui avaient tendance à augmenter de volume mais pas à augmenter en nombre. Cette observation allait dans le sens de l'hypothèse que la carence en groupements méthyles n'était pas un stress initiateur mais plutôt un promoteur très efficace du cancer sur des cellules hépatiques préalablement "initrées" (83, 111). L'utilisation de carcinogènes a donc été réalisée dans le but d'initier les hépatocytes pour pouvoir ensuite évaluer les interactions entre la carcinogénèse hépatique et les groupements méthyles. Deux types d'agents chimiques ont ainsi montré leur efficacité. Le premier correspond aux carcinogènes classiques et promoteurs de tumeurs: 2-acétylaminofluore, diéthylnitrosamine, phénobarbital, dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), nickel, arsenic et méthapyrilène (72, 83). Chacun de ces agents modifie le niveau de S-adénosylméthionine ou altère la méthylation de l'ADN (**Figure 12**). L'efficacité de ces agents sur la carcinogénèse hépatique est augmentée par la carence en groupements méthyles et diminuée par la supplémentation de ces groupements méthyles. Il a été observé que ces agents diminuent le contenu hépatique en S-adénosylméthionine (83, 112). Le deuxième groupe correspond aux antimétabolites de la méthylation qui engendrent une modification et un antagonisme direct de la méthylation et qui correspondent principalement à l'éthionine et à l'azacytidine (72). Il est généralement admis que la carence alimentaire en groupements méthyles diminue le seuil à partir duquel les carcinogènes ont une efficacité dans la carcinogénèse hépatique (68, 112). Ainsi, la carence en groupements méthyles semble accélérer l'apparition de modifications moléculaires et morphologiques des cellules cibles et finalement l'apparition de tumeurs, secondairement à l'utilisation de carcinogènes (71). Cependant, l'utilisation de carcinogènes apparaît controversée pour l'étude de la carcinogénèse hépatique car il semble difficile de faire la part des choses entre la responsabilité de la carence en groupements méthyles et celle de l'action directe des carcinogènes.

Figure 12



Mécanismes d'action des principaux carcinogènes.

2- Carence alimentaire en choline et méthionine sans utilisation d'agents carcinogènes

Les rats mâles alimentés par une nourriture carencée en choline et appauvrie en méthionine peuvent développer des hépatocarcinomes en l'absence de l'utilisation de carcinogènes (68, 70). L'alimentation carencée la plus utilisée pour les études à long terme est le régime de Lombardi. Cette alimentation est carencée en choline et pauvre en méthionine mais présente des taux physiologiques de vitamine B12 et de folates (avec 9% d'arachides, 8% de protéine de soja et 1% de caséïne) (113). Les rats alimentés par ce régime développent des hépatocarcinomes dans 20% à 50% des cas dans un délai de 12 à 24 mois (**Tableau 1**) (40, 70, 114). Un autre régime alimentaire utilisé est un régime sans choline et appauvri en méthionine (avec niveau adéquat en vitamine B12 et en folates) mais avec utilisation exclusive de L-amino acides. L'utilisation de cette variante de régime a été motivée par le fait qu'il était impossible de prévoir et d'empêcher la contamination des nutriments cibles par les protéines contenues dans les régimes semi-purifiés (comme le régime de Lombardi) (115). En utilisant ce régime modifié, Nakae et al. ont retrouvé un hépatocarcinome chez 100% des rats après un an (114). L'interprétation de la différence d'incidence de cancers entre les deux régimes était que le régime de Lombardi apportait plus de protéines. Ainsi ces protéines formaient des peptides après digestion qui stimulaient l'absorption d'acides aminés et donc augmentaient l'absorption de méthionine (40, 115). L'activité carcinogène d'un régime carencé en méthionine et choline est considérée comme étant corrélée à la diminution du ratio hépatique de S-adénosylméthionine / S-adénosylhomocystéine induite par ce régime (116). La carence en méthionine et choline semble aussi induire une nouvelle forme d'ADN méthyltransférase. Ceci pourrait être une nouvelle voie pour expliquer les altérations de la méthylation de l'ADN observées avec ce régime (117). L'activité carcinogène des régimes carencés uniquement en choline (adéquats en méthionine et folates) a aussi été évaluée (118). La carence isolée en choline est aussi capable d'induire des cancers du foie chez le rat sans utilisation de carcinogènes (incidence de 13 à 27% après 16 mois de régime carencé en choline) (35, 113). Les mécanismes induisant l'apparition de cancers

Tableau 1 – Incidence des carcinomes hépatocellulaires en fonction de la composition du régime et du délai d'exposition

Auteurs	Année	Composition du régime				n	carcinome hépatocellulaire	Délai (mois)
		choline	méthionine	folate	B12	acide aminés		
Nakae (114)	1992	-	+	+	+	nd	20%	12
Lombardi (113)	1988	-	+	+	+	nd	26%	16
Lombardi (113)	1988	-	+	+	+	nd	73%	12
Yokoyama (69)	1985	-	+	+	+	nd	22%	11
Nakae (114)	1992	-	+	+	+	AA defined	100%	12
Mikol (68)	1983	-	-	+	+	nd	40%	19
Ghoshal (70)	1984	-	-	+	+	nd	51%	13 - 24
Henning (40)	1996	-	low *	-	+	nd	100%	15
Hoover (112)	1984	-	-	-	-	nd	3.4%	12
Mikol (68)	1983	-	-	-	-	nd	0%	19

nd: non défini; AA defined : choline deficient L-amino acid defined diet

*: low methionine (0.23%)

après un régime carencé seulement en choline sont cependant probablement très différents de ceux observés après régime carencé en donneurs de groupements méthyles. En effet, la choline n'est pas un donneur important de groupements méthyles. L'accumulation hépatique de 1,2-sn-diacylglycérol (1,2-DAG) a été observée durant un régime carencé en choline. Cette molécule est un intermédiaire dans la biosynthèse de triacylglycérol et des phospholipides membranaires. Elle peut rester dans les membranes après hydrolyse des phospholipides et peut activer une enzyme de régulation, la protéine kinase C (PKC), en facilitant sa translocation du cytosol vers la membrane plasmique. Il a été suggéré que l'accumulation de 1,2-DAG et l'activation de la protéine kinase C pourraient contribuer au développement de cancers (35).

3- Carence alimentaire en choline, méthionine et folates sans utilisation d'agents carcinogènes

La carence en folates seule a peu d'effets sur le contenu lipidique hépatique et sur la carcinogénèse (71). Par ailleurs, un régime carencé en méthionine et choline est capable d'induire par lui même une relative carence en folates. De façon théorique, un régime carencé en folate, méthionine et choline devrait avoir un effet carcinologique supérieur à un régime carencé seulement en méthionine et choline. Cependant, très peu d'études ont expérimentalement confirmé cette hypothèse (40). Henning et al. ont développé un modèle de rats carencés en folates, méthionine et choline. Ces rats présentaient des modifications correspondant typiquement aux régimes déficients en choline et méthionine avec une stéatose, une diminution de S-adénosylméthionine et une augmentation de S-adénosylhomocystéine hépatique. Ce régime contenait 0,23% de méthionine, 10 microg/Kg de vitamine B12 et pas de choline ni de folates. Avec cette alimentation, 100% des rats ont développé un hépatocarcinome dans un délai de 12 mois (40) (**Tableau 1**). Ces auteurs concluaient que cette alimentation était plus carencée en groupements méthyles que le régime de Lombardi. L'association d'une carence en folates, en plus de la carence méthionine / choline est tenue pour responsable de l'augmentation du contenu hépatique en lipides mais les modifications du ratio S-adénosylméthionine / S-

adénosylhomocystéine, sont les mêmes que celles obtenues avec un régime carencé seulement en méthionine et choline (119, 120).

4- Carence alimentaire en choline, méthionine, folates et vitamine B12 sans utilisation d'agents carcinogènes

Kennedy et al. ont montré que la carence alimentaire seule en vitamine B12 induisait une stéatose chez le mouton (121). L'effet de la carence en vitamine B12 en plus de la carence en méthionine, choline et folates n'a été rapporté que très rarement. Dans les foies de rats carencés en choline, méthionine, folates et vitamine B12, l'hypométhylation globale de l'ADN était aussi accompagnée d'une altération simultanée d'expression de gènes. Ces modifications étaient très semblables à ce qui avait été observé dans les foies de rats exposés à des carcinogènes et qui avaient développé des hépatocarcinomes (52). Cependant, Poirier et al ont rapporté une incidence d'hépatocarcinomes de seulement 3,4 % chez des rats carencés en choline, méthionine, folates et vitamine B12 pendant un an (sans carcinogènes) (Tableau 1) (112). Ces résultats suggèrent que la carence en choline, méthionine, folates et vitamine B12 est probablement moins efficace que les régimes alimentaires précédents pour promouvoir l'apparition d'hépatocarcinomes. Ces résultats sont aussi en contraste avec les régimes carencés en méthionine, choline et folates puisqu'ils induisent au moins 40% d'hépatocarcinomes dans un délai allant de 12 à 24 mois (Tableau 1). Cette différence d'incidence entre ces deux types de régimes alimentaires chez le rat avait déjà été remarquée par certains auteurs (118) qui avaient même remis en question l'effet carcinogène du régime carencé en choline, méthionine, folates et vitamine B12 sur le foie des rats. La carence en vitamine B12 dans un régime alimentaire carencé en groupements méthyles semble donc être un critère important et avoir un effet "protecteur" sur l'effet carcinogène induit par ce régime dans le foie des rats (118).

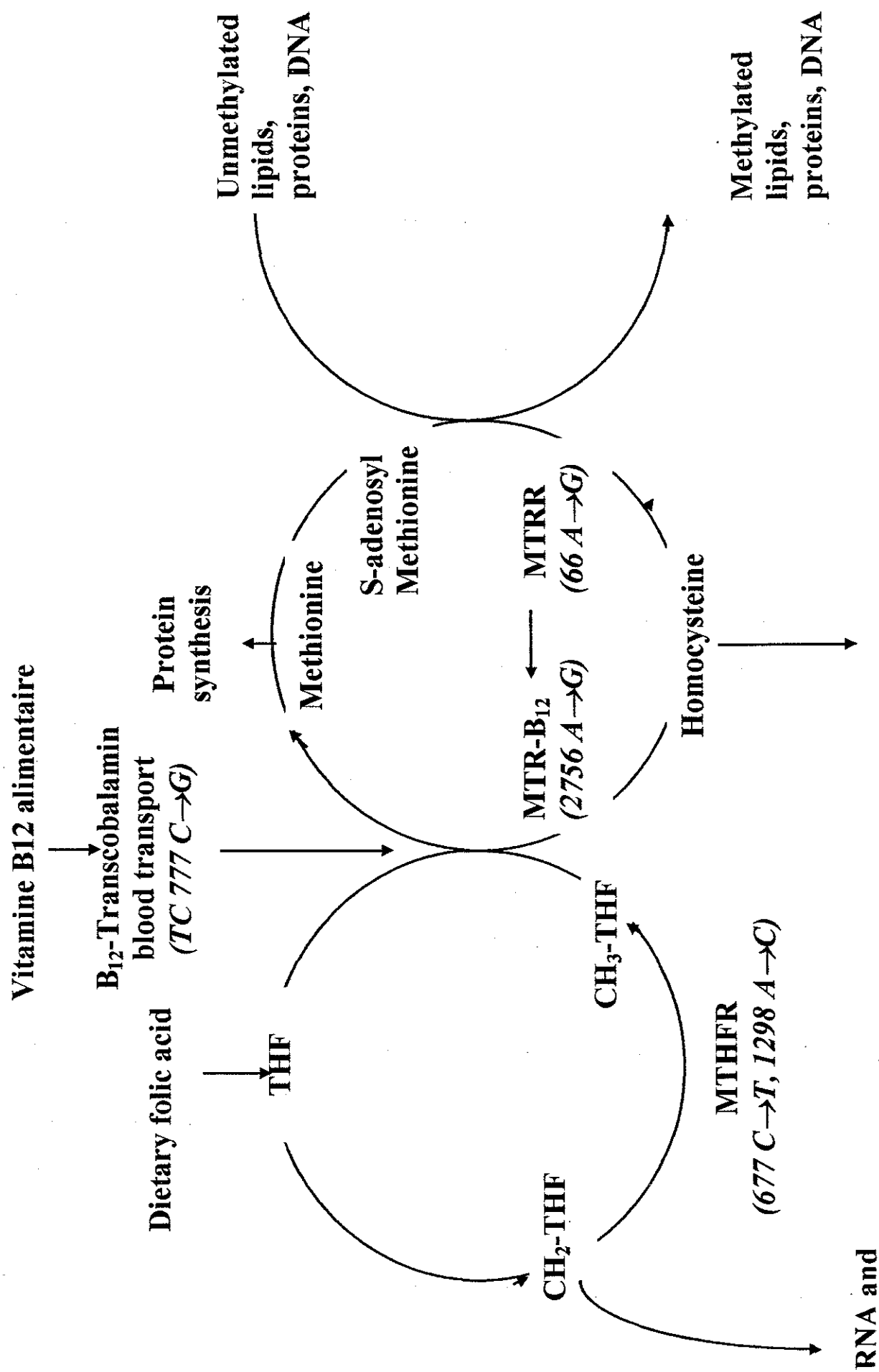
CHAPITRE V – DETERMINANTS GENETIQUES ET NUTRITIONNELS DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE ET DE L'HYPOMETHYLATION DE L'ADN DANS LES PATHOLOGIES DEGENERATIVES

1- Régulation des déterminants du métabolisme de l'homocystéine

La seule source intracellulaire d'homocystéine est l'hydrolyse de la S-adénosylhomocystéine (SAH) par la SAH hydrolase (EC 3.3.1.1). Cette enzyme est la seule réversible parmi les 4 enzymes capables de métaboliser l'homocystéine (122). La méthionine synthase (MTR) (EC 2.1.1.13) et la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT) (EC 2.1.1.5) reméthylent toutes les deux l'homocystéine en méthionine et sont toutes les deux unidirectionnelles. De façon similaire, la sortie permanente de l'homocystéine du cycle de la méthionine par la cystathionine β -synthase (CBS) (EC 4.2.1.22) est aussi une réaction unidirectionnelle (**Figures 1 et 8**). Bien que l'équilibre dynamique de la réaction SAH hydrolase soit plus en faveur de la synthèse de S-adénosylhomocystéine que de la synthèse d'homocystéine, l'élimination métabolique de l'homocystéine et de l'adénosine par les mécanismes indiqués sur la figure 10, induisent finalement la synthèse prédominante de l'homocystéine (122).

Les polymorphismes – ou variants génétiques du génome, correspondant par exemple à un gène, sont secondaires à des mutations qui sont le plus souvent des mutations uniques ("single nucleotide polymorphism" ou SNP). Environ 3 millions de polymorphismes dans l'ensemble du génome humain ont été rapportés (123). Il existe plusieurs polymorphismes génétiques des enzymes intervenant dans le cycle des folates et la reméthylation de l'homocystéine. Il s'agit principalement de variants génétiques des enzymes MTHFR (677 C->T, 1298 A->C), MTR (2756 A->G), MTRR (66 A->G) (**Figure 13**). 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)(124). L'incidence fonctionnelle d'un polymorphisme enzymatique donné n'est pas toujours connu. Cependant, les polymorphismes des enzymes du cycle des folates, la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et la méthionine

Figure 13 - Polymorphismes génétiques des enzymes intervenants dans le cycle des folates et la reméthylation de l'homocystéine.



synthase (MTR) affectent par exemple le statut en homocystéine des sujets et conditionnent les besoins nutritionnels relatifs d'une population donnée en vitamines du groupe B. Le polymorphisme 677-CT de la MTHFR est responsable d'une augmentation très significative de l'homocystéinémie. Il existe de plus une variation importante des fréquences de ces polymorphismes entre différentes populations comme les populations d'Europe, d'Afrique du Nord, de Chine ou d'Amérique du Nord. Ainsi, la fréquence du polymorphisme 677-CT est très faible au Togo et au Bénin, avec un statut nutritionnel en co-enzyme B9 défavorable, et une hyperhomocystéinémie dans 30% de la population. Le Mexique représente un paradoxe dans la mesure où la fréquence du polymorphisme 677-CT est élevée, alors que l'homocystéinémie est inférieure à celle d'autres populations de l'Amérique du Nord et de l'Europe.

La reméthylation de l'homocystéine en méthionine (le cycle de la méthionine) prédomine sur la dégradation catabolique de l'homocystéine (transsulfuration) car il existe une différence d'ordre de magnitude en Km entre la méthionine synthase et la cystathionine β - synthase. Les modifications génétiques ou nutritionnelles qui empêchent l'échappement de l'homocystéine ou de l'adénosine, induisent potentiellement l'inversion de la direction prédominante de la réaction SAH hydrolase pour induire une accumulation intracellulaire de S-adénosylhomocystéine. Ainsi, les carences chroniques en folates, vitamine B12, vitamine B6, méthionine et choline peuvent de façon indépendante interrompre le sens du flux métabolique et augmenter l'homocystéine. L'homocystéine intracellulaire pourrait ensuite traverser la membrane cellulaire mais le mécanisme exact du déplacement entre le milieu intracellulaire et le plasma est inconnu (55). Les interactions gènes-nutriments qui élèvent le taux d'homocystéine ont été associées avec une augmentation du risque cardiovasculaire, des cancers coliques, des pathologies congénitales, des fausses-couches précoces et récidivantes, de la démyélinisation du système nerveux central et des maladies neuropsychiatriques (4, 103, 125-130). D'une manière plus générale, il a été observé que l'augmentation plasmatique de 5 μ M du taux d'homocystéine était associée avec une augmentation de 49% de toutes les causes de mortalité dans une étude portant sur des sujets âgés de 65 à 72 ans (131). De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer le lien entre l'augmentation de l'homocystéine et les mécanismes physiopathologiques de ces pathologies

(athéromatose, démence, fausse-couche) mais aucune n'a véritablement été concluante. La relation entre homocystéine et pathologie est-elle une relation directe ou l'augmentation de l'homocystéine est-elle simplement un indicateur indirect de mécanismes plus complexes pour l'instant non connus ? La question de la relation entre homocystéine et pathologie reste encore ouverte (55).

2- S-adénosylhomocystéine et inhibition des méthyl transférases

La pathogénie de l'accumulation intracellulaire de S-adénosylhomocystéine vient de sa haute affinité à se lier avec la région catalytique de la plupart des méthyltransférases dépendantes de la S-adénosylméthionine (SAM); induisant ainsi une inhibition de la production d'homocystéine (132). Pour cette raison, l'hydrolyse permanente de S-adénosylhomocystéine en homocystéine et en adénosine est essentielle au maintien de la méthylation normale de l'ADN, de l'ARN, des protéines, des phospholipides, des histones et neurotransmetteurs ainsi qu'à une multitude de molécules essentielles pour la fonction et la viabilité de la cellule normale (**figure 8**) (55). L'élévation de l'homocystéine ou de l'adénosine ou de ces deux molécules va induire une augmentation intracellulaire de SAH (133). Cette augmentation de SAH pourrait être responsable d'une augmentation de l'activité de CBS (uprégulation) et d'une diminution de l'activité de la MTHFR, de la MTR et de la BHMT (122). Dans les cellules exprimant la CBS, ces fonctions de régulation agiraient dans le sens de la réduction de la reméthylation de la méthionine et de l'accélération du catabolisme de l'homocystéine par la CBS pour essayer de normaliser la SAH. Une autre réponse adaptative à la toxicité de SAH a été observée dans des cellules de neuroblastomes SAH Hydrolase -inhibited (SAHH -). Il s'agit d'une augmentation de la transcription et de l'activité de la méthionine adénosyltransférase II (MAT II)(EC 2.5.1.6) induisant une augmentation de la synthèse de SAM ce qui contrebalance l'augmentation de SAH et permet ainsi la survie cellulaire (134). Les cellules qui sont sans expression de CBS (CBS -) sont par conséquent particulièrement vulnérables à l'inhibition des méthyltransférases médiée par la SAH. En effet, l'accumulation de l'homocystéine (et aussi d'adénosine) aura pour conséquence une augmentation intracellulaire de SAH et l'interaction avec les méthyltransférases S-adénosylméthionine dépendantes (133). Chez l'homme, seules les cellules du foie, du pancréas, du rein et du tube

digestif semblent exprimer la voie complète de la transsulfuration (cystathionine β synthase +).

Lorsque la régulation ne permet pas de diminuer le taux de SAH, trois mécanismes existent chez les mammifères pour éviter le risque d'accumulation intracellulaire toxique de S-adenosylhomocystéine libre: liaison avec des protéines intracellulaires, hydroxylation par S-adenosylhomocystéine hydroxylase, et à forte concentration intracellulaire, passage plasmatique, sans que ce mécanisme précis ne soit actuellement connu. Le taux de S-adenosylhomocystéine reflète finalement la balance entre les activités des multiples méthyl-transférases, les taux de synthèse et d'hydrolyse par la S-adenosylhomocystéine hydrolase, et le catabolisme de l'homocystéine et de l'adénosine (Figure 8) (55).

3- Etudes chez l'animal et chez l'homme

La SAM et la SAH étant le substrat et le produit des réactions de DNA méthyltransférases, le ratio SAM / SAH est fréquemment utilisé comme indicateur de méthylation cellulaire. Cependant ce rapport ne permet pas, utilisé seul, de définir s'il s'agit d'un déficit de substrat (SAM) ou d'un excès de production (SAH), lorsque la capacité cellulaire de méthylation est altérée. Pour clarifier cette notion, des cohortes de souris CBS hétérozygotes et de souris sauvages ont été nourries avec un régime alimentaire normal ou carencé en groupements méthyles pendant 24 semaines (135). Les résultats ont montré que la décroissance de SAM seule n'était pas suffisante pour affecter la méthylation de l'ADN dans ce modèle, alors que l'augmentation de SAH (soit seule ou en association avec la diminution de SAM) était associée avec l'hypométhylation de l'ADN. Par ailleurs, le taux plasmatique d'homocystéine était positivement corrélé avec le niveau intracellulaire de SAH dans tous les tissus sauf dans le foie. Ces résultats suggèrent que le taux plasmatique d'homocystéine est un marqueur sensible du statut cellulaire de la méthylation globale de l'ADN (55). Weir et al ont aussi montré que la diminution du ratio SAM : SAH dans le cerveau et le liquide céphalorachidien de cochons exposés à l'oxyde nitrique (NO) était plutôt liée à l'élévation du taux de SAH qu'à la diminution de SAM

(136). Ces études suggèrent l'importance du taux de SAH intracellulaire comme médiateur de l'inhibition de la méthylation et de la dysfonction cellulaire.

Chez l'homme, une étude récente a objectivé qu'une élévation modérée du taux plasmatique d'homocystéine était corrélée au taux plasmatique de SAH et non de SAM. De plus, dans cette étude, l'augmentation plasmatique et lymphocytaire de SAH était associée avec une augmentation de l'hypométhylation (137). Ces résultats confirment la possibilité intéressante que l'augmentation de l'homocystéine plasmatique puisse être un indicateur indirect de l'augmentation intracellulaire de SAH et aussi des conditions de méthylation intracellulaire. Les conséquences fonctionnelles de la diminution des capacités de méthylation sont importantes et comprennent la démyélinisation du système nerveux central (138), la diminution de la synthèse de neurotransmetteurs, la diminution du chémotactisme et de la phagocytose des macrophages, l'altération de la composition des membranes phospholipidiques et de la fluidité des membranes, la modification de l'expression de gènes, et la différenciation cellulaire (55). Le K_i de SAH varie entre les différentes méthyltransférases cellulaires et aussi en fonction de la spécificité des tissus et de la distribution subcellulaire des méthyltransférases. Ainsi, la sensibilité à l'hypométhylation est aussi probablement spécifique à chaque tissu cellulaire.

Les cellules endothéliales des vaisseaux n'ont pas de CBS ni de BHMT, et sont ainsi limitées dans leur capacité de métaboliser l'homocystéine. Elles utilisent soit la reméthylation par la méthionine synthase, soit la réaction inverse de la SAH hydrolase (**Figures 1 et 8**) (139). Ces cellules n'ayant pas de CBS sont plus suspectes d'avoir une accumulation de SAH car la transsulfuration est un moyen efficace de diminuer l'excès d'homocystéine. Wang et al. ont montré que des niveaux physiologiques d'homocystéine pouvaient diminuer la méthylation de P21 dans une lignée cellulaire de cellules vasculaires endothéliales (140). Ces données sont convergentes avec l'hypothèse de l'inhibition des méthyltransférases due à la sensibilité à la SAH. Des études cliniques ont par ailleurs retrouvé un lien plus marqué entre l'augmentation plasmatique de SAH et l'incidence de maladies cardiovasculaires, qu'entre le taux plasmatique d'homocystéine et l'incidence de maladies cardiovasculaires (141). Plusieurs autres études récentes ont retrouvé des données confirmant que l'hyperhomocystéinémie était accompagnée d'une

augmentation cellulaire et plasmatique de SAH qui pouvait affecter négativement la méthylation chez l'homme (55).

4- Hypothèses de mécanismes entre l'hypométhylation de l'ADN médiée par la S-adénosylhomocystéine et les pathologies

a- Homocystéine, inhibition des méthyltransférases SAH médiée et altération de l'expression de gènes

La supplémentation en homocystéine et adénosine ou l'administration d'inhibiteurs chimiques de SAH hydrolase dans des cellules ou chez l'animal ont fourni des informations concernant l'interaction entre accumulation de SAH, hypométhylation et dysfonction cellulaire. Plusieurs modifications ont été observées avec l'augmentation intracellulaire de SAH et l'hypométhylation de l'ADN. Il s'agit de l'altération de l'expression de certains gènes, de l'induction d'une différenciation cellulaire, des altérations de la conformation de la chromatine et des modifications du phénotype cellulaire (55). L'augmentation intracellulaire de SAH pourrait réguler l'activité de la CBS pour permettre une protection contre l'accumulation toxique d'homocystéine et de SAH. Cependant, seuls les tissus comme le foie, le pancréas, le rein, le cerveau expriment la CBS et pourraient donc avoir une réponse effective face à l'augmentation de SAH (122). En fait, la majorité des cellules de mammifères n'expriment pas la CBS et seraient donc ainsi particulièrement sensibles à l'accumulation de SAH / homocystéine, à l'inhibition des méthyltransférases de l'ADN, et à l'altération associée de l'expression de gènes. Dans ces cellules, le transport extracellulaire d'homocystéine pourrait être le seul moyen pour contrôler l'accumulation toxique intracellulaire de SAH. Ainsi, il est probable que les cellules qui n'expriment pas la CBS pourraient être la source principale d'homocystéine et de SAH plasmatique. Ces cellules sont aussi probablement les plus sensibles à la toxicité de SAH (55).

b- Interaction du stress oxydatif induit par l'homocystéine et de l'hypométhylation de l'ADN SAH-médiée

Les lésions oxydatives des cellules ont été associées avec l'élévation plasmatique d'homocystéine et sont attribuées à l'auto-oxydation et à la production de dérivés oxygène actifs. L'hyperhomocystéinémie et les lésions oxydatives de l'ADN ont été impliquées dans la pathogénie de plusieurs maladies chroniques au cours du vieillissement, incluant les maladies cardiovasculaires, certains cancers et la maladie d'Alzheimer (55). Une voie intéressante et pour l'instant peu explorée est la possibilité que l'hypométhylation SAH médiée puisse augmenter et accroître la sensibilité et la vulnérabilité de l'ADN aux radicaux libres. Il est actuellement considéré que l'hypométhylation de l'ADN est associée à une chromatine hyperacétylée et décondensée secondairement à la diminution des liaisons des protéines méthyl-CpG (ex: MeCP-2) et des histone déacétylases (58). La conformation ouverte de l'ADN associée à l'hypométhylation de la chromatine paraît être plus vulnérable aux clivages des endonucléases et au stress oxydatif (55). De façon intéressante, l'hyperhomocystéinémie et la carence en folates ont été associées avec plusieurs maladies chroniques du vieillissement, l'hypométhylation de l'ADN et l'augmentation de cassures chromosomiques de l'ADN (28). L'augmentation des cassures chromosomiques de l'ADN et de l'apoptose sont induits par l'homocystéine et la SAH et sont présents dans les cellules prénéoplasiques, dans les maladies alcooliques du foie, dans les lésions d'athérosclérose et dans les cellules cérébrales des patients présentant une maladie d'Alzheimer (55, 142). Cette possibilité d'hypométhylation de l'ADN SAH-médiée associée à l'apoptose et à l'augmentation de la susceptibilité de l'ADN par l'intermédiaire des radicaux libres est une voie actuelle de recherche.

c- Le transport plasmatique de l'homocystéine est-il un moyen de contrôle de l'hypométhylation SAH-médiée ?

Des études récentes chez l'animal et l'homme suggèrent que l'inversion de la réaction de SAH hydrolase intervient à la condition d'avoir une concentration intracellulaire d'homocystéine (55). L'homocystéine et la SAH sont toutes les deux présentes dans le plasma. Cependant, la concentration plasmatique d'homocystéine excède celle de la SAH par presque trois ordre de magnitude. Cette différence reflète

probablement la plus grande facilité de transport de l'homocystéine à travers la membrane plasmique en comparaison à la SAH. Dans une étude récente, il a été observé que la concentration plasmique de SAH augmentait parallèlement avec celle de l'homocystéine dans des taux physiologiques et qu'elle était associée avec une hypométhylation de l'ADN des lymphocytes chez des sujets en bonne santé (137). Une augmentation modérée de l'homocystéine plasmique a aussi été observée chez les sujets homozygotes pour le polymorphisme MTHFR C677T chez environ 10% des caucasiens. Lorsque le statut des folates est bas, ce polymorphisme a été tenu responsable de pathologies reliées à l'homocystéine et a été récemment associé avec une hypométhylation globale de l'ADN (143). La toxicité cellulaire de SAH entraînant une inhibition des méthyl-transférases SAM dépendantes pourrait agir sur la fluidité des membranes et la transduction du signal, la synthèse des protéines, la conformation de la chromatine et l'expression des gènes, la synthèse de neurotransmetteurs (55). Etant donné la toxicité potentielle de SAH intracellulaire, il est possible de spéculer que le transport facile de l'homocystéine en dehors de la cellule pourrait être un moyen supplémentaire pour la cellule d'éviter l'accumulation toxique de SAH. Ceci suggérerait qu'une des fonctions de l'homocystéine soit d'être une forme exportable de SAH (55).

5- Exemple de la relation entre homocystéine et les pathologies cardiovasculaires

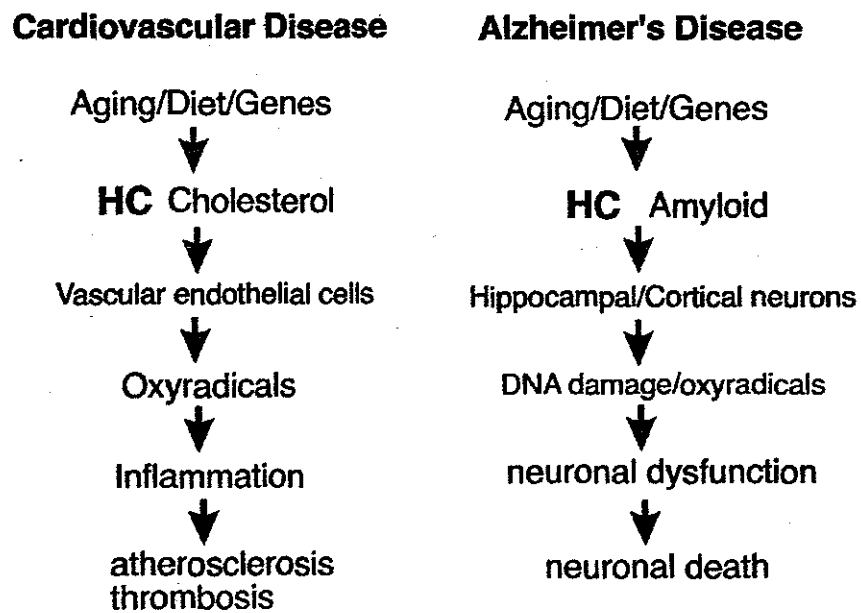
Plusieurs études épidémiologiques ont établi une association forte entre l'augmentation de l'homocystéine et l'augmentation des maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose (144). Cette association a été observée dans différents types de populations avec des styles de vie variés. Les études chez l'animal et sur des modèles in vitro d'athérosclérose et de thrombose ont montré que même des niveaux modérément élevés d'homocystéine pouvaient promouvoir des lésions de l'endothélium vasculaire et aussi activer l'aggrégation plaquettaire (145). Ce double effet secondaire à l'augmentation de l'homocystéine pourrait expliquer la forte association avec les cardiopathies ischémiques. L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque indépendant de la maladie athérombotique mais interagit aussi avec les autres facteurs de risques cardiovasculaires. Par exemple, une personne

ayant un taux élevé de cholestérol et d'homocystéine présente un risque plus important qu'une personne avec uniquement une hyperhomocystéinémie.

Les maladies cardiovasculaires et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) partagent les mêmes facteurs de risque (ex: cholestérol, obésité, hypertension artérielle). Par conséquent, les liens entre les accidents vasculaires cérébraux et le métabolisme de l'homocystéine ont été évalués (**Figure 14**). Des données provenant de 4534 patients ont montré une forte corrélation positive entre les taux d'homocystéine et l'incidence des AVC non fatals (146). La carence alimentaire en folates ainsi que les variations génétiques enzymatiques concernant le métabolisme de l'homocystéine pourraient augmenter l'incidence des AVC. Ainsi, une carence modérée en folates a été associée avec des taux élevés d'homocystéine chez des patients présentant un AVC (145). L'incidence des AVC était plus importante chez les enfants présentant une hyperhomocystéinémie avec une mutation C677T MTHFR (147). Le variant VV de MTHFR a aussi été associé avec une augmentation de l'homocystéine et une augmentation de l'incidence d'AVC (148). Cependant, le variant C677T MTHFR n'a pas toujours été retrouvé comme facteur de risque indépendant comme cela était le cas par exemple, dans une étude réalisée sur des sujets caucasiens âgés (149). Les études animales montrent un lien clair entre l'augmentation de l'homocystéine, les pathologies vasculaires et les AVC (145). Ainsi, des rats carencés pour obtenir une augmentation de l'homocystéine avaient une augmentation de l'incidence des lésions de l'intima de la carotide. Ces lésions étaient améliorées par la supplémentation en folates (150). Lentz et al. ont montré que lorsque des souris CBS knockout étaient carencées en folates, leur concentration plasmatique d'homocystéine était augmentée de 5 fois la normale et leurs artères avaient un déficit de relaxation lors de la stimulation par l'acétylcholine (comme cela est observé au niveau de la fonction des cellules endothéliales lors de la pathogénie de l'athérosclérose) (145, 151).

Par ailleurs, le variant C677T MTHFR ne semble pas être un facteur de risque majeur pour les maladies cardiovasculaires à début tardif. Plusieurs études ont montré que les variants VV MTHFR ou C677T MTHFR n'étaient pas des facteurs de risque indépendants pour les coronaropathies (152). Cependant, une étude récente suggère que les différents allèles de MTHFR pourraient conférer aux

Figure 14



Liens entre les maladies cardiovasculaires, les accidents vasculaires cérébraux, la maladie d'Alzheimer et le métabolisme de l'homocystéine.

HC: homocystéine

(Figure tirée de Mattson et al. (145))

patients différents risques de maladie cardiovasculaires liées à l'athérosclérose (153). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les différentes isoformes de MTHFR varient dans leur utilisation des folates. Ainsi, l'allèle 677C induirait une accumulation de 5-méthyltétrahydrofolate, alors que les sujets étant homozygotes pour l'allèle T accumuleraient des folates non méthylés (145). De plus, les souris knockout MTHFR ont une hyperhomocystéinémie associée à des anomalies du développement cérébral et une augmentation des dépôts lipidiques vasculaires (154). Ces observations suggèrent plutôt un rôle important de la MTHFR dans la suppression du processus d'athérogénèse.

De façon plus précise, l'homocystéine semble induire des lésions oxydatives sur les cellules vasculaires endothéliales. L'exposition des cellules vasculaires endothéliales à l'homocystéine pourrait aussi induire une augmentation de l'expression de facteurs qui stimulent les monocytes. Ces cellules sont considérées comme ayant un rôle important dans la formation de plaques d'athérosclérose (145). Les mesures de la production d'oxyde nitrique et de microréactivité vasculaire chez les patients ayant hyperhomocystéinémie suggèrent que l'homocystéine pourrait modifier la production d'oxyde nitrique par les cellules endothéliales de façon concordante avec la pathogénie des maladies cardiovasculaires (155). La prise orale d'homocystéine peut induire les mêmes modifications de microréactivité vasculaire que chez les patients ayant une hyperhomocystéinémie secondaire à la carence en folates ou en vitamine B12. De plus, la supplémentation en folates et vitamine B12 normalise ces modifications vasculaires (145, 156). D'autres mécanismes sont aussi en jeu. L'hypométhylation de l'ADN secondaire à l'hyperhomocystéinémie pourrait contribuer au dysfonctionnement de cellules intervenant dans les maladies cardiovasculaires ou liées au vieillissement (157). L'oxydation des lipoprotéines LDL jouerait aussi un rôle dans la pathogénie de l'athérosclérose. L'hyperhomocystéinémie pourrait faciliter l'occlusion vasculaire par thrombose (activation de l'aggrégation plaquettaire et formation de caillot) et aussi induire l'apoptose de cellules vasculaires endothéliales en culture. Enfin, l'homocystéine pourrait inhiber la prolifération des cellules endothéliales in vitro et aussi l'angiogénèse in vivo (145).

6- Exemple de la relation entre homocystéine et pathologies neurologiques (La maladie d'Alzheimer, les malformations du tube neural et la trisomie 21)

a- Maladie d'Alzheimer

L'une des hypothèses pour expliquer la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (MA) pourrait se situer au niveau des facteurs nutritionnels (avec l'hypothèse de l'inflammation et de la carence en oestrogènes) (158). Il est considéré que la MA est la conséquence d'un processus protéolytique anormal d'une protéine amyloïde induisant la production et l'accumulation du peptide neurotoxique β -amyloïde (145). Ce peptide induit une dysfonction et une dégénérescence neuronale par l'intermédiaire du stress oxydatif et la modification de l'homéostasie cellulaire du calcium. Les modèles de souris transgéniques ayant une hyperexpression de la protéine amyloïde ou d'une protéine appelée presenilin-1, présentent des modifications cérébrales similaires à celles observées dans la maladie d'Alzheimer (145). Les sujets présentant une maladie d'Alzheimer ont généralement des taux bas de vitamines et particulièrement de vitamine B12 (159). Ikeda et al. ont retrouvé des concentrations plus faibles de vitamine B12 dans le liquide céphalo-rachidien (mais pas dans le plasma) de patients ayant une MA par rapport à des patients ayant d'autres types de démence (160). La nature de la relation entre MA et carence en vitamine B12 est pour l'instant inconnue. Cependant, la carence en vitamine B12 et/ou en folates pourrait réduire la synthèse de méthionine et de S- adénosylméthionine, qui à leur tour pourraient diminuer la disponibilité des groupements méthyles qui sont essentiels au métabolisme de la myéline, des neurotransmetteurs (acétylcholine), et des membranes phospholipidiques. Ces dernières modifications pourraient expliquer l'induction du déficit des fonctions cognitives (158).

Par ailleurs, la carence en vitamine B12, folates ou vitamine B6 a été associée avec l'augmentation plasmatique d'homocystéine (158, 159). Ceci pourrait être expliqué par le fait que la carence en vitamine B12 et/ou en folates diminue la transméthylation de l'homocystéine en méthionine. L'augmentation plasmatique d'homocystéine est actuellement reconnue comme étant un facteur de risque indépendant pour les maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires (161) (**Figure**

14). Comme l'une des origines de la MA pourrait être liée à des modifications vasculaires, il semble logique d'admettre que l'augmentation de l'homocystéine puisse jouer un rôle dans la pathogénie de la MA et des déficits cognitifs liés à l'âge (162). Clarke et al. ont ainsi comparé le taux plasmatique d'homocystéine chez 76 sujets présentant un MA à celui d'un groupe contrôle de 108 sujets sans MA (163). Dans cette étude, les sujets ayant un taux sérique d'homocystéine $> 14 \mu\text{mol/L}$ avaient 4,6 fois plus de chance d'avoir une MA que les sujets ayant des taux d'homocystéine $\leq 11 \mu\text{mol/L}$ (valeurs normales d'homocystéine plasmatique 4-10 $\mu\text{mol/L}$). De plus, il a été observé que l'hyperhomocystéinémie n'était pas seulement un facteur de risque de la MA mais aussi un facteur de risque des perturbations cognitives liées à l'âge (162). Ainsi Riggs et al. ont observé les concentrations plasmatiques en folates, vitamine B12 et homocystéine et ont corrélié ces résultats aux résultats de plusieurs tests cognitifs chez des sujets âgés de 54 à 81 ans (164). Dans cette étude, les taux les plus faibles de folates et de vitamine B12 et les taux les plus importants d'homocystéine étaient corrélés avec les moins bons résultats aux tests cognitifs. Cependant ces études sont des études de prévalence et le lien de cause à effet entre augmentation de l'homocystéine et progression de la maladie est difficile à établir avec certitude. Ainsi une étude prospective évaluant les concentrations d'homocystéine et la progression des déficits cognitifs avec le temps n'a pas permis d'objectiver de lien clair entre les deux (165). D'une manière plus générale, il est considéré que l'hyperhomocystéinémie apparaît, en plus de l'apolipoprotéine (apo) E/4, être un facteur de risque de la MA (158). Les carences en coenzymes et les défauts congénitaux (polymorphismes) des enzymes intervenant dans le métabolisme de la vitamine B12, des folates, et de l'homocystéine sont donc aussi des éléments à prendre en compte dans l'évaluation des mécanismes intervenant dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer.

b- Les malformations du tube neural

Les malformations du tube neural (MTN) correspondent à un développement incomplet du système nerveux central ou des structures associées et ont une incidence de 1:500 naissances. Il est actuellement admis que le statut en folates est

l'un des facteurs environnementaux importants de l'étiologie des MTN (166). L'administration de folates chez la femme enceinte réduit l'incidence et la récurrence de MTN. Cependant, chez les femmes ayant un enfant atteint de MTN, une augmentation de l'homocystéine a été observée (167). Une des fonctions des folates est d'agir comme un substrat pour des enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN (synthèse de novo de purine et de thymidine) (**Figure 1**). Ainsi, un métabolisme déficient des folates pourrait résulter en un défaut de synthèse de l'ADN, affectant le développement de l'embryon et la transcription de gènes impliqués dans le processus de neurulation. L'association entre le dysfonctionnement de la reméthylation de l'homocystéine et le risque de grossesse avec MTN a été observée en étudiant l'homocystéine, les folates et la vitamine B12 (79, 166, 167). Dans ces études, la diminution des folates et/ou de la vitamine B12, était associée à l'augmentation de l'homocystéine et à l'augmentation de l'incidence des MTN.

Différentes études n'ont pas pu établir de lien entre l'activité de la CBS et l'incidence des MTN (166). Par contre, plusieurs études ont suggéré le lien entre l'activité de la méthionine synthase (MTR) et l'incidence des MTN (167, 168). La région codante de la méthionine synthase a été séquencée chez les patients ayant une MTN et une hyperhomocystéinémie modérée, mais aucune mutation n'a été identifiée (169). Bien que le polymorphisme MTR A2756G soit fréquent, ce variant chez l'homme n'est pas associé avec l'hyperhomocystéinémie ou avec l'augmentation de l'incidence des MTN. Le polymorphisme de l'analogue bactérien de la méthionine synthase induit cependant une diminution de 30% de son activité enzymatique. Il est finalement concevable de penser que la combinaison hypovitaminose B12 et variant MTR A2756G puisse induire une diminution de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine (166).

Le variant MTHFR C677T induit une enzyme MTHFR ayant des propriétés thermolabiles avec globalement une diminution de son activité, induisant une augmentation de l'homocystéinémie. Les effets de la mutation C677T peuvent toutefois être annulés en augmentant la prise alimentaire d'acide folique. Il a donc été émis l'hypothèse que cette mutation pourrait intervenir dans l'augmentation de l'homocystéine chez les femmes présentant une grossesse avec MTN, et que ceci pourrait expliquer que les folates aient un rôle protecteur. Le risque de MTN est

augmenté de 2 à 3 fois si l'enfant a le génotype 677TT et de 3 à 4 fois si la mère porte ce génotype (166). Ce risque est de 6 à 7 fois si la mère et l'enfant sont porteur du polymorphisme. Ceci indique que le génotype de la mère mais aussi celui de l'enfant ont une incidence sur le risque de MTN. Le variant MTHFR C677T est donc considéré comme le facteur génétique le plus commun pour l'incidence des MTN, même si cette association n'a pas été retrouvée par certains auteurs (170). La prévalence du génotype 677TT est observée dans 5% à 30% des sujets dans différentes populations et n'est pas toujours associée avec une augmentation du risque de MTN. Ceci est particulièrement vrai dans les pays où les apports alimentaires en folates sont élevés. Un second polymorphisme de la MTHFR a été observé (mutation A1298C) (166) mais ses effets sur l'activité de la MTHFR et les concentrations d'homocystéine semblent être moins importants que ceux induits par le variant MTHFR C677T.

c- La trisomie 21 (Syndrome de Down)

La trisomie 21 (Syndrome de Down) est un complexe malformatif métabolique et génétique dont le point de départ est un défaut de division durant la méiose du chromosome 21. Deux variants d'enzymes du métabolisme des folates ont été liés à la trisomie 21. Le premier est MTHFR C677T induisant une diminution de l'activité de l'enzyme. Le deuxième est MTR 66A-G dont l'effet sur l'activité de l'enzyme est inconnu (171). Ces deux enzymes pourraient être importantes dans la physiopathologie de ce syndrome car elles interviennent dans le métabolisme des groupements méthyles et indirectement de la méthylation de l'ADN. Il a été suggéré que les mères hétérozygotes (CT) ou homozygotes (TT) pour ces deux variants de MTHFR et de MTR, pourraient avoir un risque augmenté (2,9 fois à 3,8 fois) d'avoir un enfant présentant une trisomie 21 (172). Un des mécanismes potentiel pourrait être l'hypométhylation de l'ADN (par l'intermédiaire des variants de MTHFR et de MTR) qui favoriserait la non-disjonction observée pendant la méiose associée à la trisomie 21 (173).

Chapitre VI – OBJECTIFS DE LA THESE

Le point commun aux différents articles de ce travail a été le métabolisme de la méthionine et la méthylation de l'ADN. Le premier objectif a été d'essayer de définir dans un travail expérimental quels étaient les déterminants nutritionnels in vivo de l'activité de la méthionine synthase et de l'hypométhylation globale de l'ADN. Le deuxième objectif a été d'évaluer les liens entre hypométhylation de l'ADN et carcinogénèse digestive. Ce deuxième objectif a été réalisé par un travail in vivo évaluant la carcinogénèse hépatique de rats carencés en méthionine, choline, folates et vitamine B12. Le troisième objectif a été d'évaluer les liens entre histone déacétylases et expression de gènes en étudiant l'impact d'un inhibiteur des histone déacétylases (Trichostatine A) sur l'expression de gènes silencieux dans des cellules de cancers thyroïdiens. Enfin, le dernier objectif était d'évaluer les liens entre les polymorphismes d'enzymes intervenant dans le métabolisme de la méthionine et certaines maladies neurologiques (maladie d'Alzheimer, trisomie 21 et malformations du tube neural). L'ensemble de ces articles correspond donc à l'évaluation du lien entre méthylation, expression de gènes et pathologies avec un modèle animal (articles 1 et 2) et une étude plus appliquée et clinique (article 4). Le lien entre la méthylation de l'ADN et la balance acétylation / méthylation de la partie N-terminale des histones est aussi à mettre en relation avec l'expression de gènes (article 3). Cette dernière relation entre méthylation de l'ADN et acétylation / méthylation des histones a par ailleurs été récemment rapportée dans une étude réalisée chez un champignon filamenteux (*Neurospora Crassa*) (174).

1 – Les déterminants de la méthionine synthase et de l'hypométhylation de l'ADN

2 – Déterminants nutritionnels de l'hypométhylation de l'ADN et cancérogénèse digestive

3- Evaluation de l'effet d'un inhibiteur des histone déacétylases sur l'expression de certains gènes dans des lignées cellulaires de cancers thyroïdiens.

4– Déterminants génétiques de l'hyperhomocystéinémie, de l'hypométhylation et maladies neurologiques

Chapitre VII – RESULTATS

1 – Les déterminants nutritionnels de la méthionine synthase et de l'hypométhylation de l'ADN

(article 1 / soumis) - "La vitamine B12 est un déterminant important d'une activité faible de méthionine synthase et de l'hypométhylation de l'ADN dans le foie de rats"

(Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and liver DNA hypomethylation in rats)

La méthionine synthase joue un rôle important dans le métabolisme de l'homocystéine. La relation entre les déterminants nutritionnels de l'activité de la MTR, la vitamine B12 et les folates, et l'expression et l'activité de cette enzyme n'est pas clairement connue in vivo. Des données expérimentales suggèrent que la vitamine B12 a un effet sur l'activité MTR à un niveau post-traductionnel en protégeant l'enzyme de la protéolyse (175). D'autres auteurs ont utilisé différentes lignées cellulaires et ont montré que la vitamine B12 pouvait augmenter l'activité de MTR par un mécanisme post-traductionnel encore inconnu (176). Cependant, les effets in vivo isolés ou combinés de la carence en vitamine B12 et/ou folates sur l'activité de la MTR et la méthylation globale de l'ADN ne sont pas connus. Contrairement à la carence en folates, la carence alimentaire sévère en vitamine B12 chez le rat est difficilement obtenue par simple régime alimentaire (177). Cette carence sévère est plutôt obtenue après réalisation d'une gastrectomie totale qui élimine la possibilité de production et de liaison avec le facteur intrinsèque, et donc l'absorption iléale du complexe B12-facteur intrinsèque par endocytose récepteur médiée. Nous avons donc évalué l'influence respective de la vitamine B12 et des folates sur la transcription et l'activité de la MTR, et sur la méthylation. Ceci a été réalisé en administrant sur une période de 18 mois, un régime alimentaire carencé en choline, méthionine, vitamine B12 et folates, chez des rats Fischer F344 opérés ou non-opérés. Lorsque les rats étaient opérés, il s'agissait soit d'une gastrectomie totale, soit d'une gastrectomie totale et résection iléale, soit d'une résection iléale seule.

La réalisation d'une gastrectomie totale était efficace pour empêcher l'assimilation de la vitamine B12. En effet, l'excrétion fécale cumulative de [^{57}Co]-cobalamine était plus importante à 72 heures et 144 heures après ingestion de [^{57}Co]-cobalamine chez les rats du groupe 1 (gastrectomie totale + résection iléale (TG+IR)) que chez les rats non opérés ($P = 0.006$) (**figure 15**). Les rats gastrectomisés (groupe 1, 2 et 3) avaient une perte de poids importante observée lors du premier mois postopératoire et avaient ensuite une stabilisation globale de leur poids ($P < 0.001$). Le régime alimentaire adéquat en groupements méthyles (MA diet) ou carencé en vitamines B12, B9, choline et méthionine (MD diet) n'avait pas d'effet sur le poids des rats gastrectomisés alors que les rats du groupe 5 (carence alimentaire par MD diet sans gastrectomie) avaient une perte de poids modérée après le sixième mois postopératoire ($P < 0,01$). Par rapport au groupe contrôle (groupe 6 – rats non opérés sans régime alimentaire (MA diet), les taux plasmatiques de vitamine B12 étaient diminués de façon importante au premier mois postopératoire dans les trois groupes de rats ayant eu une gastrectomie (groupes 1, 2, et 3) ($p < 0,001$). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre ces trois groupes. Aucune diminution des taux plasmatiques de vitamine B12 n'a été retrouvée chez les rats du groupe 4 (résection de grêle et pas de carence alimentaire (MA diet)) (**figure 16**). Au final, une valeur seuil de 200 pmol/L de vitamine B12 a été définie comme étant la limite supérieure incluant seulement les rats qui appartenaient aux groupes 1, 2, et 3 (rats gastrectomisés). De façon inverse à ce qui avait été observé pour la vitamine B12, la gastrectomie totale n'avait pas d'effet important sur le taux des folates sanguins. De plus, les folates étaient significativement diminués seulement dans les groupes carencés alimentaires (groupes 1 et 5). Cette différence était aussi observée entre les rats gastrectomisés avec et sans carence alimentaire ($P < 0,01$) (**figure 16**). De façon similaire à la vitamine B12, nous avons défini une valeur seuil de 20 nmol/L correspondant à la limite supérieure incluant seulement les rats des groupes 1 et 5 (rats carencés alimentaires).

Nous avons aussi déterminé les taux hépatiques de vitamine B12 et avons trouvé des variations similaires aux taux plasmatiques. La moyenne des taux de vitamine B12 hépatique était significativement plus basse chez les rats gastrectomisés que chez les contrôles, avec des valeurs respectives de 93 ± 12 fmol

/ mg et 533 ± 24 fmol / mg ($P=0,001$). Cette diminution était du même ordre de grandeur que pour les taux plasmatiques et une corrélation entre les taux sériques et hépatiques a été observée ($R=0,79$, $P=0,0006$). Les taux sériques d'homocystéine étaient significativement augmentés dans les groupes de rats qui avaient des taux bas de folates (groupe 1 et 5), indépendamment des procédures chirurgicales (**figure 16**). Les taux d'homocystéine étaient corrélés négativement avec les taux plasmatiques de folates en analyse de régression multivariée des paramètres log-transformés ($p < 0,0001$). En fait, cette corrélation négative était significative uniquement chez les rats carencés alimentaires (groupes 1 et 5) ($P = 0,0005$), et pas chez les non carencés alimentaires (groupes 2,3,4, et 6 -MA diet)

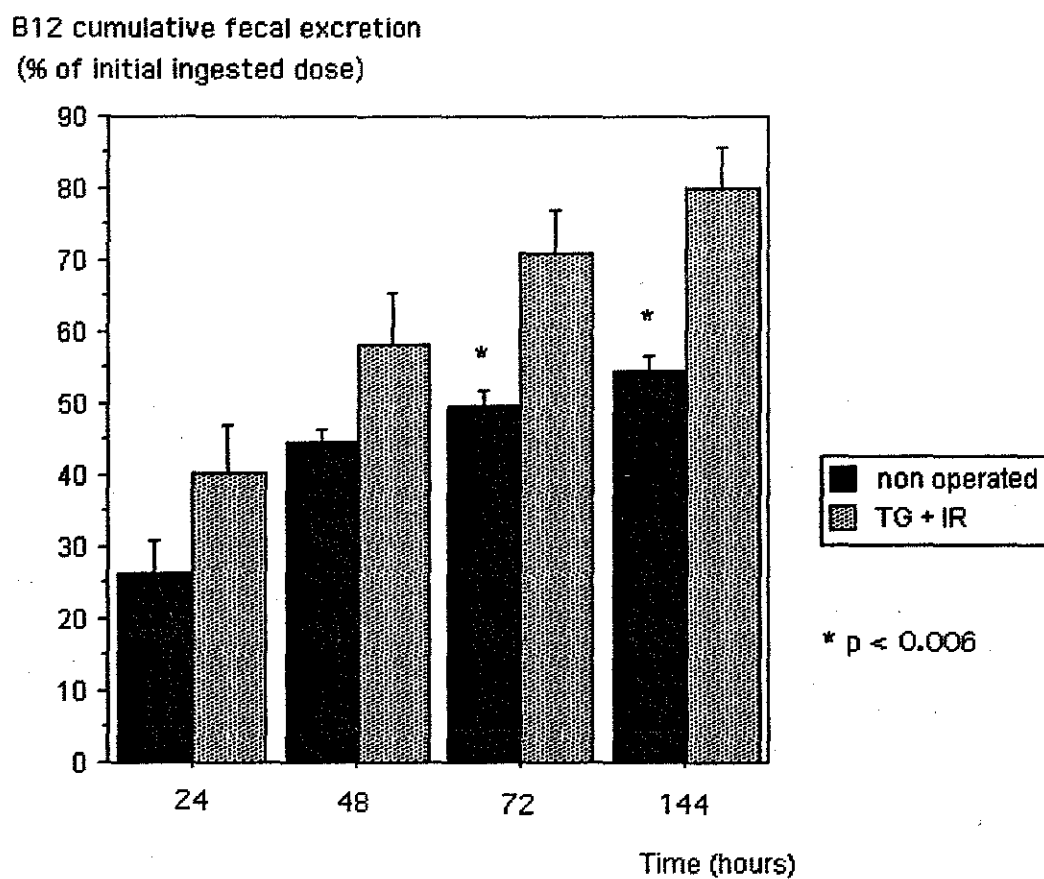
Aucune différence d'activité de MTR n'a été observée chez les rats ayant des taux de folates inférieurs à 20 nmol/L (groupes 1 et 5). Par contre, l'activité MTR était réduite significativement chez les rats ayant des taux plasmatiques de vitamine B12 inférieurs à 200 pmol/L (groupes 1,2, et 3) ($P = 0,002$) (**figure 17**). La transcription du gène MTR estimée par reverse transcriptase-polymerase chain reaction semi-quantitative, n'était pas dépendante des taux plasmatiques de vitamine B12 (**figure 18**). Le ratio d'ADNc amplifié de MTR / ARN de glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase était estimé à $0,73 \pm 0,22$ and $0,80 \pm 0,33$ respectivement dans les extraits de foie de rats ayant des taux de vitamine B12 supérieurs et inférieurs à 200 pmol/L ($p = 0,42$). Un effet post-traductionnel de la vitamine B12 a été suggéré en considérant le "ratio activité totale de MTR / ratio de ADNc" (**figure 18**). Ce ratio était 2,3 fois plus élevé dans les extraits de foie de rats ayant des taux de vitamine B12 > 200 pmol/L, en comparaison avec ceux des rats ayant une carence en vitaine B12, avec des valeurs respectives de $0,28 \pm 0,15$ and $0,12 \pm 0,03$ ($P=0,0013$). Ceci n'était pas dû à un effet protecteur de la liaison MTR-vitamine B12 vis à vis de la protéolyse car aucune différence de saturation de l'enzyme par la vitamine B12 n'a été observée. De plus, le ratio de l'activité de MTR déterminé sans ou avec addition de vitamine B12 était respectivement de $0,52 \pm 0,34$ et de $0,71 \pm 0,25$, chez les rats ayant des taux de vitamine B12 plus bas et plus hauts que 200 pmol/L ($p = 0,385$).

La méthylation globale de l'ADN était significativement plus basse chez les rats ayant des taux de vitamine B12 inférieurs à 200 pmo/L ($P = 0,001$) (**figure 17**). De plus, l'activité de MTR était significativement plus faible dans les foies de rats

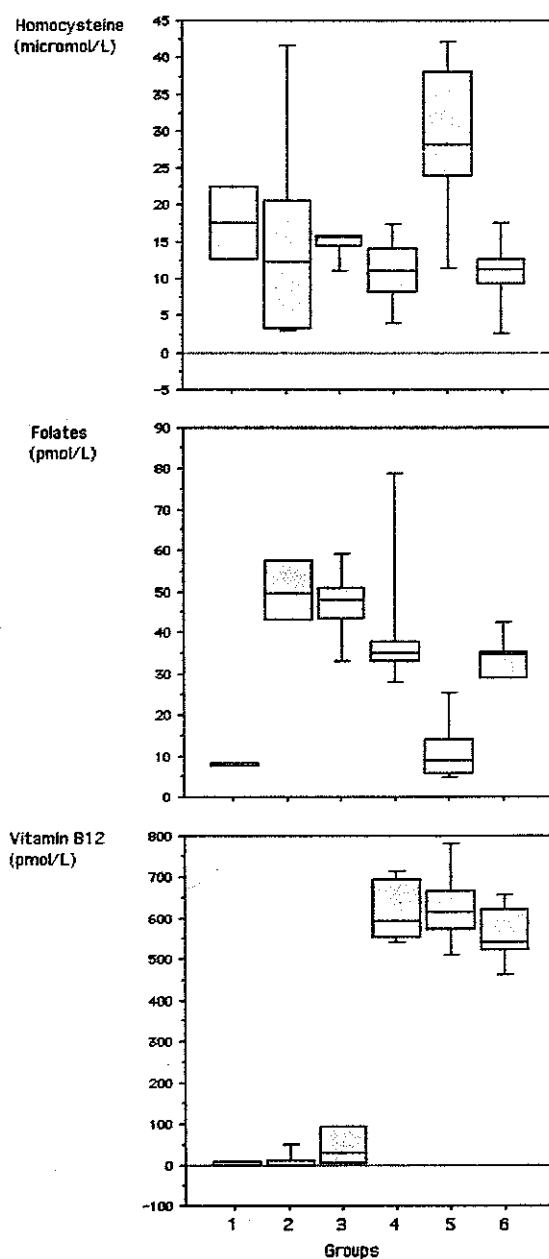
ayant une hypométhylation de l'ADN (quartile inférieur), par rapport aux autres extraits de foies, avec des valeurs respectives de $0,11 \pm 0,06$ and $0,27 \pm 0,19$ ($P = 0,0006$). Il existait une corrélation significative entre la méthylation de l'ADN et l'activité totale de MTR en analyse univariée (univariate Spearman rank-correlation analysis) ($Rho = -0,316$, $P = 0,03$). La méthylation de l'ADN était aussi significativement plus faible chez les rats ayant des folates plasmatiques inférieurs à 20 nmol/L ($P = 0,009$).

Nous avons évalué par analyse en régression multiple les relations entre la méthylation de l'ADN, l'activité MTR et ses coenzymes. La vitamine B12, mais pas les folates, était corrélée avec l'activité MTR ($P = 0,0279$). L'homocystéine était faiblement corrélée avec l'activité MTR ($P = 0,049$) mais pas avec la méthylation. Il existait une corrélation significative entre la méthylation de l'ADN et les taux plasmatiques de vitamine B12 ($P = 0,0096$) et des folates ($P = 0,0104$). Nous avons aussi évalué les déterminants des taux élevés d'homocystéine plasmatique (quartile supérieur), des taux bas de l'activité de la méthionine synthase (quartile inférieur), et de l'hypométhylation de l'ADN par régression logistique en utilisant les valeurs seuils de 200 pmol/L et de 20 nmol/L respectivement pour les valeurs de vitamine B12 et des folates. La diminution des taux plasmatiques en folates était le seul déterminant indépendant de l'hyperhomocystéinémie, avec un Odds ratio de 20,78 (Table 1). Par contre, la vitamine B12 était le seul déterminant indépendant des taux bas d'activité de la MTR. Finalement, les taux bas d'activité de MTR et les taux bas de vitamine B12 étaient les deux déterminants indépendants de l'hypométhylation de l'ADN, avec des Odds ratio respectif de 17,07 et 7,31 (Tableau 2).

Figure 15.



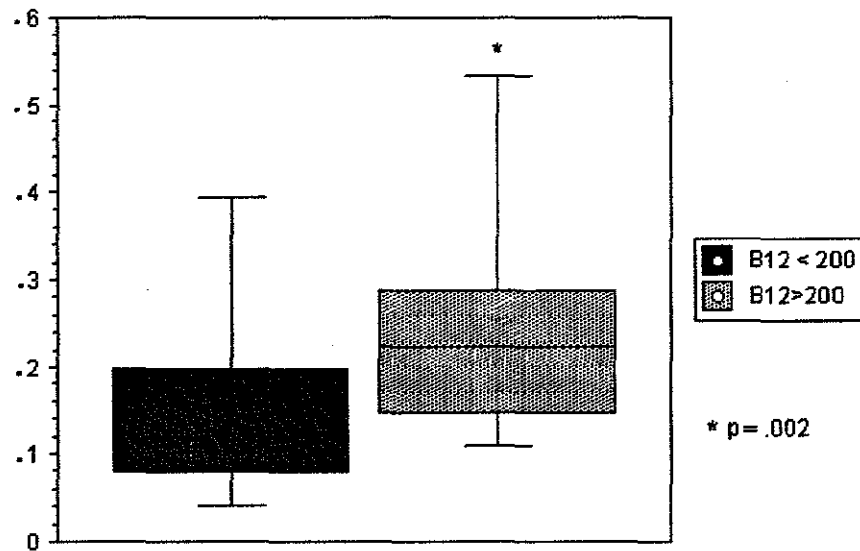
Excrétion fécale cumulée de [^{57}Co]-cobalamine chez 14 rats non opérés et chez 14 rats opérés d'une gastrectomie totale + résection iléale (TG + IR).

Figure 16.

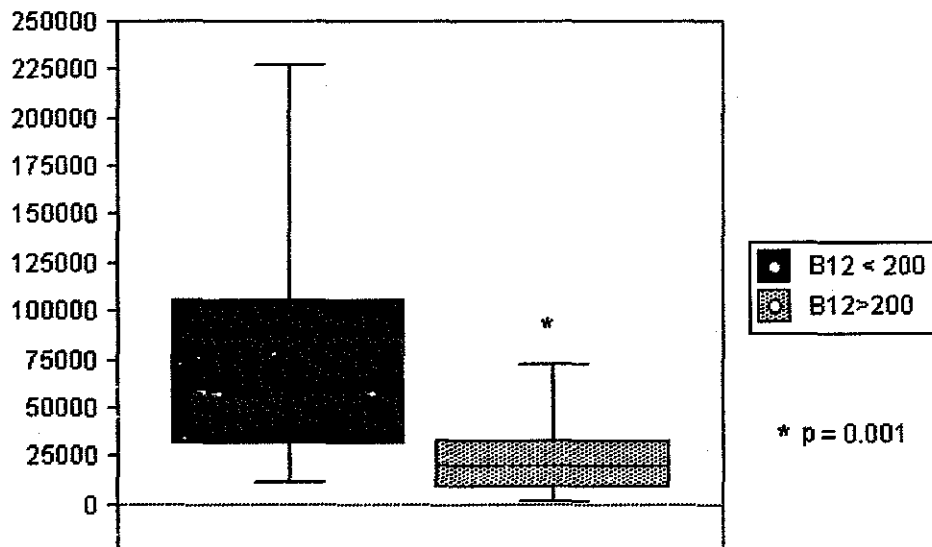
Taux plasmatiques au moment du décès des rats (box plots: mediane, quartiles et valeurs extrêmes) de l'homocystéine, des folates et de la vitamine B12 des rats opérés et non opérés avec ou sans carence alimentaire en groupements méthyles. Groupe 1 : régime carencé, gastrectomie et résection iléale ; groupe 2 : pas de carence, gastrectomie et résection iléale ; groupe 3 : pas de carence et gastrectomie ; groupe 4 : pas de carence et résection iléale ; groupe 5 : régime carencé, rats non opérés ; groupe 6 : pas de carence, rats non opérés. Haut : Box plots de homocystéine ; milieu : Box plots des folates ; bas : Box plots de vitamine B12

Figure 17.

Methionine synthase activity
(nmol/h/mg)



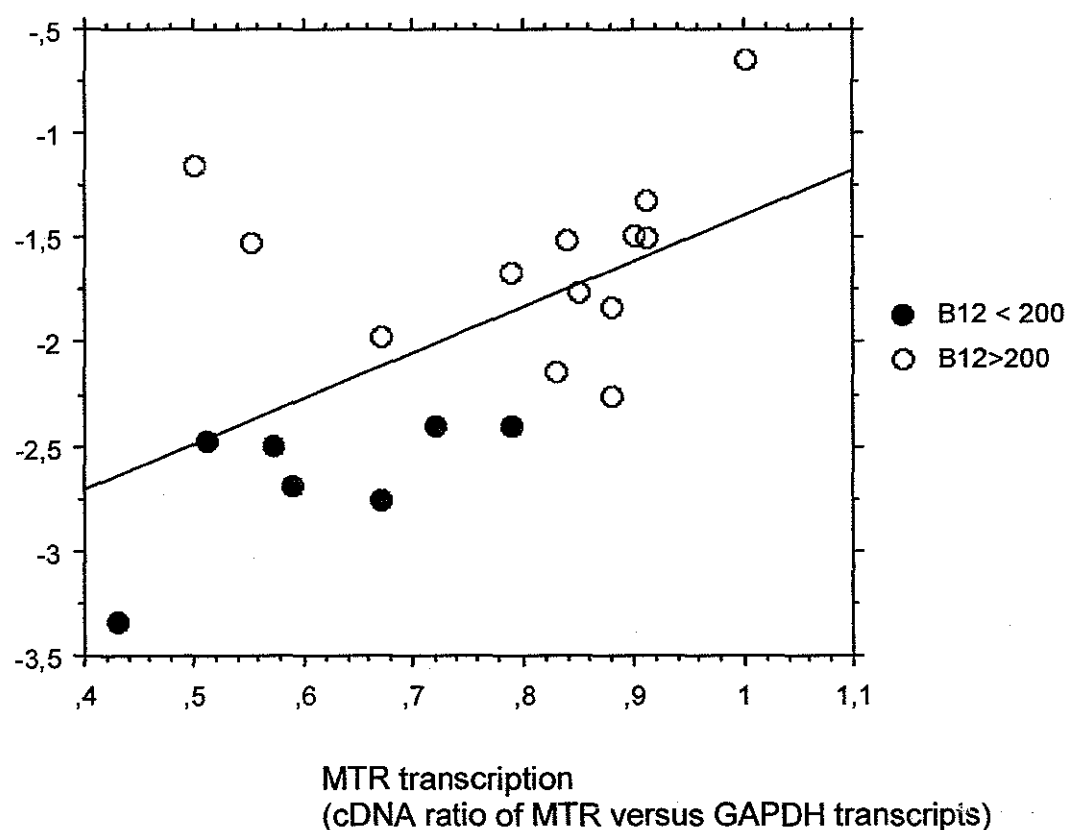
DNA Methylation
(radiolabelled DNA - counts/time)



Effets de la carence en vitamine B12 sur l'activité de la MTR hépatique et la méthylation globale de l'ADN. 3A: Activité de la méthionine synthase chez les rats ayant des taux supérieurs et inférieurs à 200 pmol/L; 3B: Méthylation de l'ADN chez les rats ayant des taux supérieurs et inférieurs à 200 pmol/L.

Figure 18.

Methionine synthase activity
(ln MTR)



Relation entre l'activité de la méthionine synthase (ln MTR) et la transcription de MTR (déterminée par le ratio ADNc des transcripts RT-PCR de MTR vs GAPDH), chez 7 rats gastrectomisés ayant une carence en vitamine B12 et 13 rats non opérés ayant des taux de vitamine B12 supérieurs à 200 pmol/L. L'activité de MTR était significativement plus haute chez les rats non carencés, indépendamment du niveau de transcription de MTR, qui était similaire dans les deux groupes.

Tableau 2 : Déterminants de l'hyperhomocystéinémie (quartile supérieur, > 18.7 micromol/L), diminution de l'activité holoMTR du foie (quartile inférieur < 0.1 UI/mg protéine) et hypométhylation de l'ADN (quartile inférieur) chez les rats ayant une carence en vitamine B12 (< 200 pmol/L) ou en folates (< 20 nmol/L).

Dependent determinants	Excluded determinants	Residual significant determinants	Odds ratio	95 % C.I.*	P-Value
t-Hcys* > 18.7 micromol/l	MTR, B12	Folate < 20	20.78	7.76 – 55.61	<0.0001
	DNA hypomethylation				
MTR* < 0.1 UI/mg	Folate, t-Hcys,	B12<200	15.75	2.81 – 88.14	0.0017
	DNA hypomethylation				
DNA hypomethylation	Folate, t-Hcys, B12	MTR < 0.1	17.07	3.35 – 86.91	0.0006
	Folate,t-Hcys,MTR	B12<200	7.31	1.77 – 30.24	0.006

* Abbreviations : t-Hcys, plasma total homocysteine ; MTR, methionine synthase ; C.I., confidence interval

2 – Les déterminants nutritionnels de l'hypométhylation de l'ADN et cancérogénèse digestive

Article 2 / accepté CCLM 2003 - "Effets de la carence en vitamine B12 et en folates sur la méthylation de l'ADN et la carcinogénèse dans le foie de rat."

(Effects of vitamin B12 and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver.)

La carence alimentaire des principaux groupements donneurs de méthyles induit la formation de cancers hépatiques chez les rongeurs. L'hypothèse la plus largement évoquée a été que la carence alimentaire en groupements méthyles induit une hypométhylation de l'ADN. La vitamine B12 et les folates jouent aussi un rôle important dans la méthylation de l'ADN car ces deux coenzymes sont nécessaires pour la synthèse de méthionine ou de S-adénosylméthionine, qui eux sont les groupements donneurs de méthyles habituels dans la maintenance de la méthylation de l'ADN (**figure 19**). La méthylation de l'ADN est considérée comme étant un mécanisme fondamental du contrôle épigénétique de l'expression des gènes et de la maintenance de l'intégrité du génome (**figure 20**). Nous avons revu dans cette étude les effets de la carence alimentaire en donneurs de groupements méthyles sur la méthylation de l'ADN et la carcinogénèse hépatique chez le rat. Plusieurs études ont montré que cette carence alimentaire pouvait avoir une influence sur la méthylation globale de l'ADN. Cependant, des études *in vivo* chez le rat n'ont pas clairement établi de lien entre vitamine B12 et méthylation de l'ADN. Les carences alimentaires en choline et en méthionine / choline sont considérées comme responsables de la survenue d'hépatocarcinomes chez 20% à 50% des rats après 12 à 24 mois de suivi (cf Chapitre IV) (**tableau 1**).

Cependant, l'ajout de la carence alimentaire en vitamine B12 en plus d'une carence en méthionine, choline et folates semble être responsable d'une incidence d'hépatocarcinome de moins de 5% dans les foies de rats (**tableau 1**). Nous avons confirmé l'incidence faible (<5%) d'hépatocarcinome dans le foie des rats carencés alimentaires en vitamines B12, B9, méthionine et choline. En effet, aucune tumeur hépatique n'a été observée dans un groupe de 7 rats alimenté par ce régime

alimentaire pendant une période de 20 mois (**tableau 3**). Un index histologique d'activité a aussi été utilisé pour évaluer les modifications histologiques dans les foies de rats carencés en vitamines B12, B9, choline et méthionine (Score dérivant du METAVIR et du working party of the world congress of gastroenterology score (178, 179). Aucune différence significative dans le score de dysplasie ($P=0,39$) n'a été observée par rapport aux rats contrôles (régime alimentaire adéquat en B12, B9, méthionine et choline). De plus, les foies de rats récupérés au moment de leur mort naturelle ont toujours été indemnes de tumeurs lors de l'examen anatomopathologique. Ces résultats suggèrent qu'un régime alimentaire carencé en vitamines B12, B9, choline et méthionine n'est probablement pas suffisant pour promouvoir l'incidence de tumeurs hépatiques.

La carence en vitamine B12 de ces rats était alimentaire et peut donc être considérée comme étant une carence modérée par rapport à celle induite par la gastrectomie totale (**figure 21**). Nous avons développé un modèle chirurgical de rats pour évaluer le rôle de la carence sévère en vitamine B12 associée à la carence alimentaire en groupements donneurs de méthyles (folates, méthionine et choline). Nous avons confirmé que les taux plasmatiques de vitamine B12 étaient plus faibles chez les rats gastrectomisés que chez les rats uniquement carencés de façon alimentaire en vitamine B12 (177). L'avantage d'utiliser ce modèle chirurgical est d'obtenir une carence en vitamine B12 beaucoup plus importante que celle obtenue par la carence alimentaire seule. De plus, ce modèle évite l'utilisation de substances comme l'oxyde nitrique ou d'autres drogues habituellement utilisées pour obtenir une carence en vitamine B12 mais pour lesquelles il est impossible d'exclure des interférences avec la carcinogénèse hépatique par effet direct (175, 180).

Il faut cependant noter que le principal inconvénient de ce modèle chirurgical de gastrectomie est que la mortalité opératoire est de l'ordre de 30% à 50% (181-183) dans les quinze premiers jours postopératoires et que lorsque les rats survivent à cette première période, il ne permet pas d'obtenir des rats vivants pour une durée prolongée. La médiane de survie des rats opérés d'une gastrectomie totale seule ou d'une gastrectomie totale associée à une résection de grêle distale (résection d'iléon) dans notre étude était ainsi toujours inférieure à 2,5 mois (**figure 22**). De plus, un amaigrissement des rats survivants après gastrectomie totale était toujours observé

(figure 23). Ceci indique que cette faible survie des rats gastrectomisés est un élément empêchant l'évaluation au long cours des foies de rats carencés sévèrement en vitamine B12. Par ailleurs, tous les rats de cette étude ayant survécu 1 an ont eu une imagerie par résonnance magnétique du foie et du cerveau. Ces examens n'ont jamais objectivé de tumeur hépatique ou de modification cérébrale et ont toujours été considérés comme normaux.

Nous concluons que la vitamine B12 est un paramètre important à prendre en compte pour définir la carcinogénicité d'un régime alimentaire carencé en donneurs de groupements méthyles. La réalisation d'une gastrectomie totale est très efficace pour carencer sévèrement les rats en vitamine B12 et permet d'obtenir des taux plasmatiques de vitamine B12 significativement inférieurs à ceux obtenus par la carence alimentaire seule. Cependant, l'étude de la cancérogénèse hépatique et digestive par l'intermédiaire de ce modèle chirurgical est difficile en raison de la faible médiane de survie des rats opérés.

Figure 19

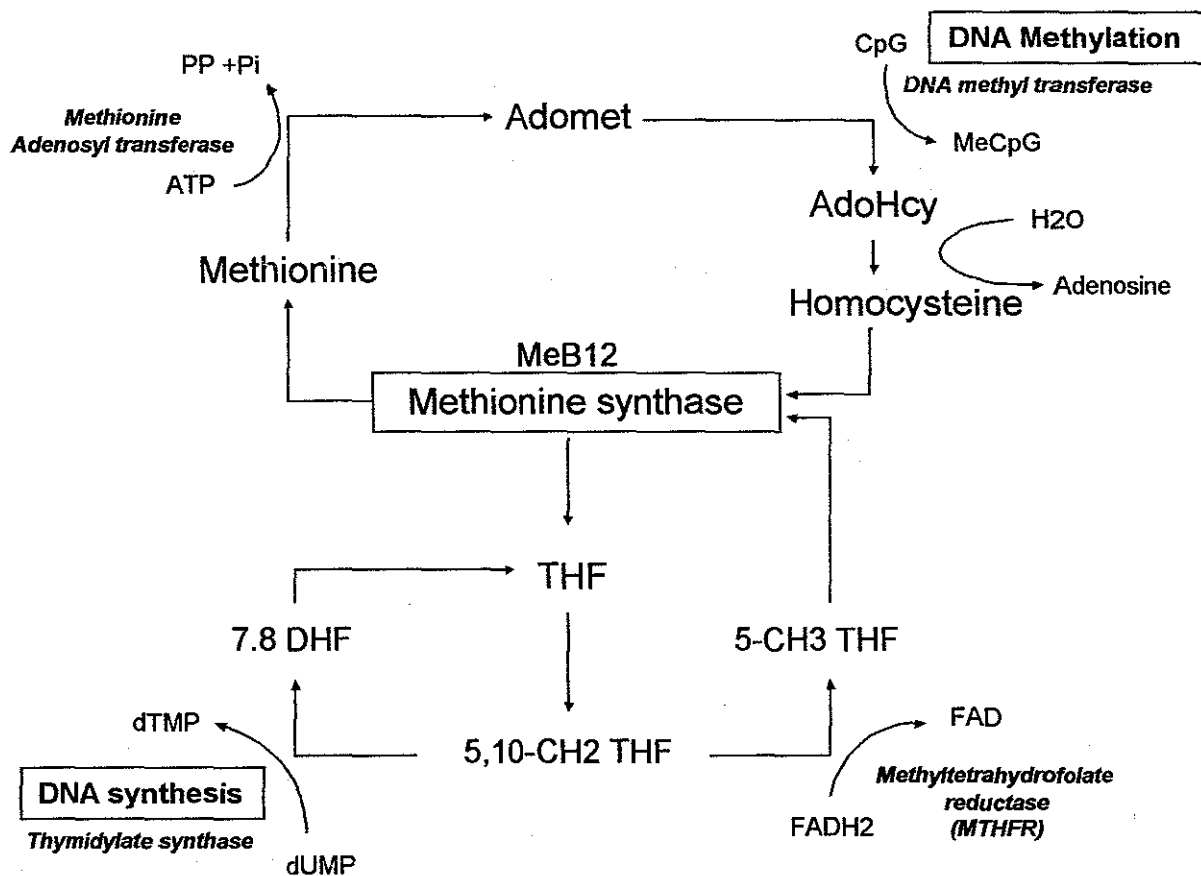
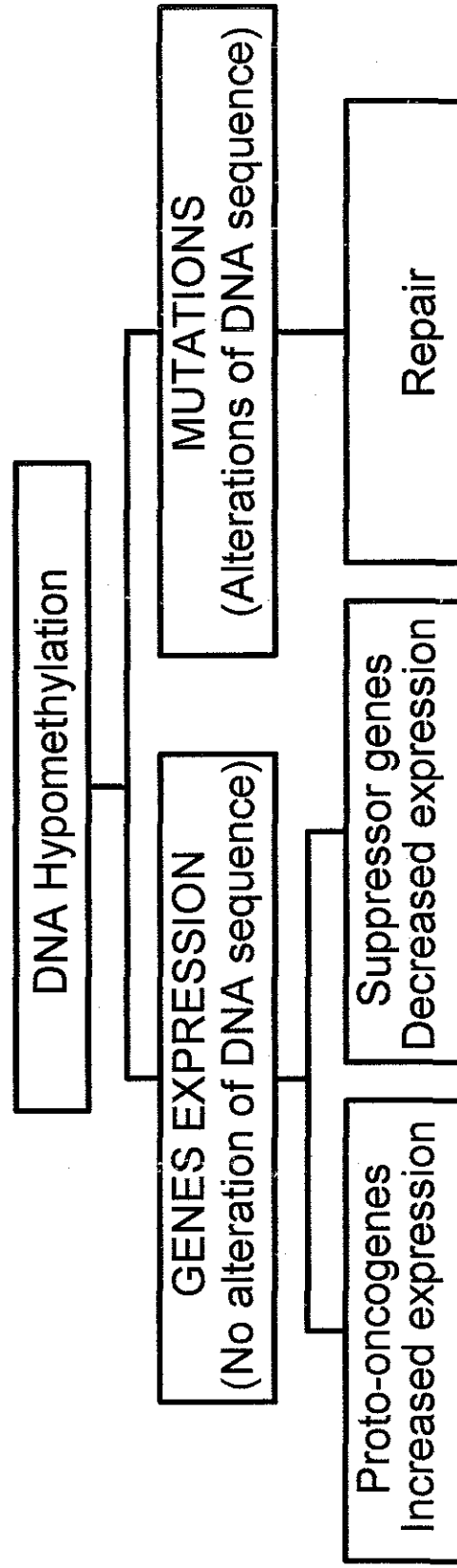


Schéma représentant la transméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase (MTR) en présence de coenzymes vitaminiques, le méthyltétrahydrofolate et la méthylcobalamine.

ATP, adénosine triphosphate; PP, pyrophosphate; Pi, phosphate; Adomet, adénosylméthionine; AdoHcy, adénosylhomocystéine; THF, tétrahydrofolate; FAD, flavine adénine dinucléotide.

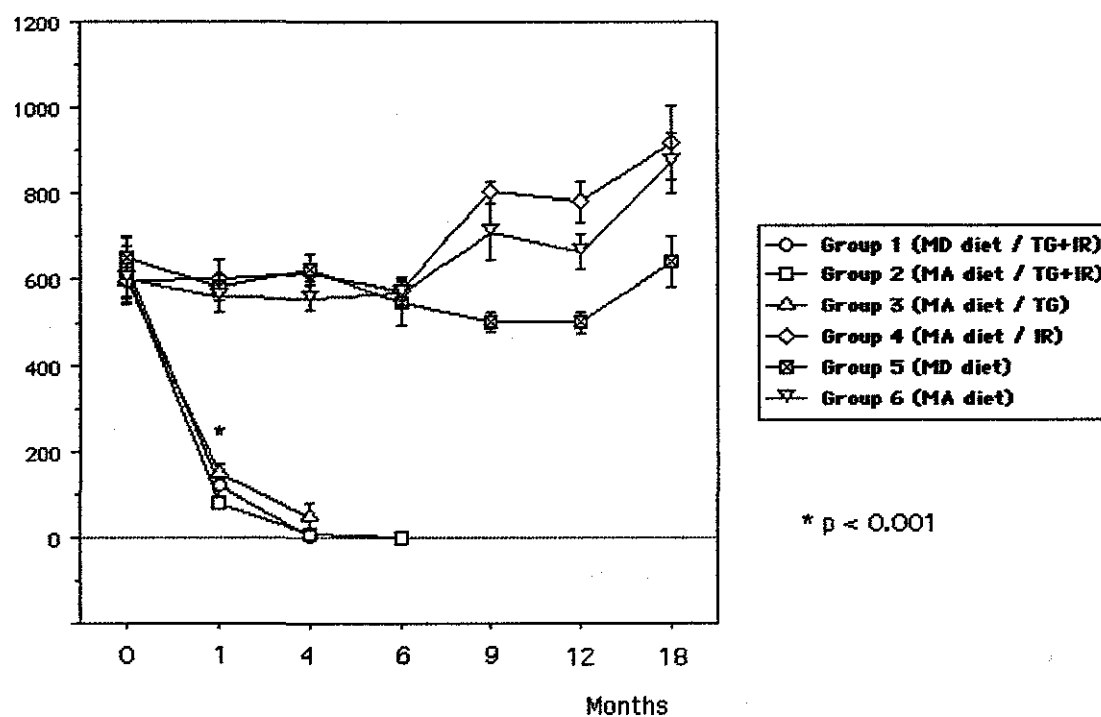
Figure 20



Relations entre la méthylation de l'ADN, le contrôle épigénétique de l'expression des gènes et la maintenance de l'intégrité du génome.

Figure 21

B12 Plasmatic levels (pmol/L)

* $p < 0.001$

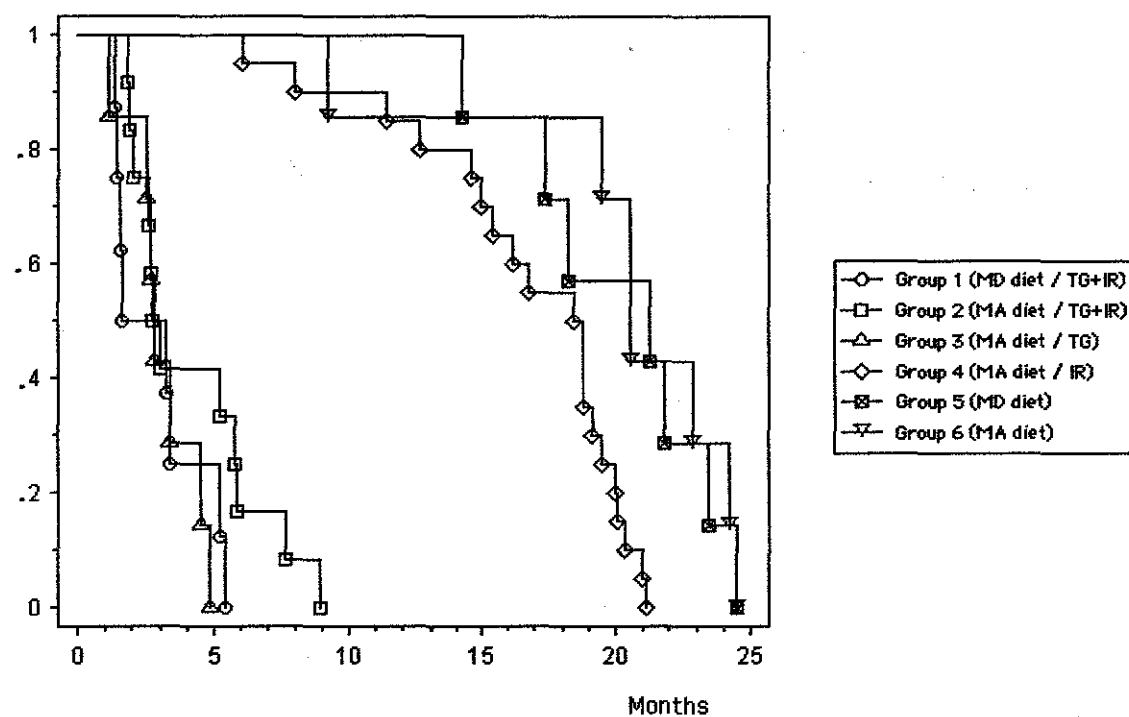
Variations des taux de vitamine B12 au cours du temps chez les rats opérés d'une gastrectomie totale (groupes 1, 2, et 3) et chez les rats carencés alimentaires en vitamine B12 (groupe 5).

MD : methyl-deficient diet

MA : methyl-adequate diet

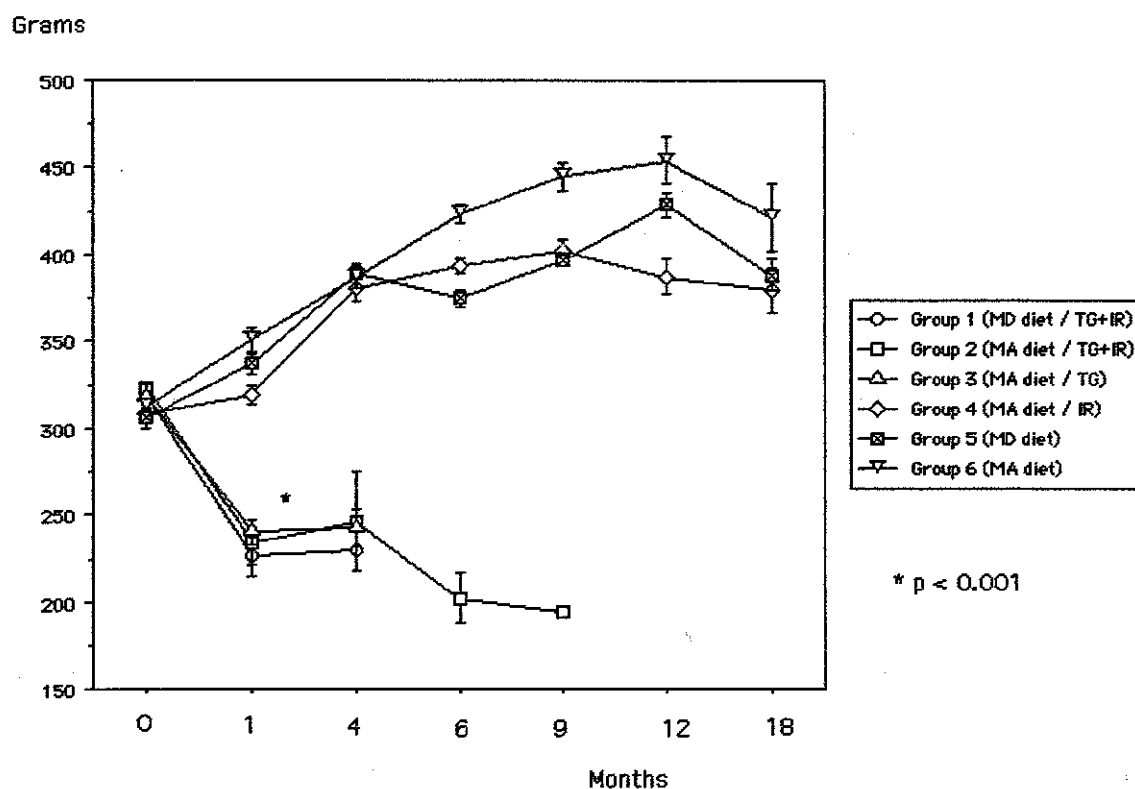
Figure 22

Survival



Survie des différents groupes de rats opérés d'une gastrectomie totale seule (TG) ou associée à une résection de l'intestin grêle (TG + IR) (groupes 1, 2, et 3)

Figure 23



Variations des poids des rats au cours du temps. Les rats opérés d'une gastrectomie totale plus ou moins associée à une résection de grêle correspondent aux groupes 1, 2, et 3.

Tableau 1 – Incidence des carcinomes hépatocellulaires en fonction de la composition du régime et du délai d'exposition.

Auteurs	Année	Composition régime				n	carcinome hépatocellulaire	Suivi (mois)
Nakae (114)	1992	-	+	+	+	10	20%	12
Lombardi (113)	1988	-	+	+	+	19	26%	16
Lombardi (113)	1988	-	+	+	+	15	73%	12
Yokoyama (69)	1985	-	+	+	+	37	22%	11
Nakae (114)	1992	-	+	+	+	10	100%	12
Mikol (68)	1983	-	-	+	+	30	40%	19
Ghoshal (70)	1984	-	-	+	+	45	51%	13 - 24
Henning (40)	1996	-	low *	-	+	10	100%	15
Hoover (112)	1984	-	-	-	-	29	3.4%	12
Mikol (68)	1983	-	-	-	-	30	0%	19

nd: not defined; AA defined : choline deficient L-amino acid defined diet

*: low methionine (0.23%)

Tableau 3 – Anatomopathologie et score de dysplasie des foies de rats carencés alimentaires (choline, methionine, folate) et/ou vitamine B12 (gastrectomie totale ou carence alimentaire en vitamine B12)

Diet deficient in	Total gastrectomy	B12 deficiency	Median survival (quartiles) (months)	Liver MRI (at 1 year)	Mean liver dysplasia score (0 – 3)	Liver tumor pathology
Choline, methionine, folate	yes	severe	1.6 (1.4 - 3.4)	-	0 (± 0)	no tumor
No deficiency	yes	severe	2.8 (2.0 - 5.8)	-	0 (± 0)	no tumor
Choline, methionine, folate	no	mild	20.5 (17.3 - 21.8)	normal	0.6 (± 0.2)	no tumor
No deficiency	no	no deficiency	21.2 (19.5 - 22.8)	normal	0.2 (± 0.2)	no tumor

TG: total gastrectomy, MRI: magnetic resonance imaging

3- Evaluation de l'effet d'un inhibiteur des histone déacetylases sur l'expression de certains gènes dans des lignées cellulaires de cancers thyroïdiens.

Article 3 / Surgery 2002 - " Augmentation de l'efficacité du traitement par l'iode radioactif dans le traitement des cancers thyroïdiens en utilisant la trichostatine A, un inhibiteur des histone déacetylases ".

(Increasing the effectiveness of radioactive iodine therapy in the treatment of thyroid cancer using Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor)

L'iode radioactif est utilisé pour identifier et traiter les cancers thyroïdiens d'origine folliculaire lorsqu'ils sont récidivants et/ou métastatiques. Entre 30% et 40% des cancers thyroïdiens sont d'emblée résistants ou deviennent résistants à l'iode radioactif. L'augmentation du transporteur sodium-iodine (Sodium-iodine symporter NIS) et la diminution de l'activité de la Pendrin (PDS) pourraient être associées avec l'augmentation de l'efficacité du traitement par iode radioactif. Dans cette étude, les effets de la Trichostatin A (TSA), un inhibiteur des histone déacetylases, ont été évalués sur l'expression des gènes thyroïdiens NIS et PDS. Des lignées cellulaires de carcinomes papillaires, carcinomes à cellules de Hürthle, carcinomes folliculaires ont été traitées par la Trichostatin A pendant 72 heures à des concentrations allant jusqu'à 100 ng/mL. L'expression des gènes NIS et PDS était déterminée par RT-polymerase chain réaction quantitative.

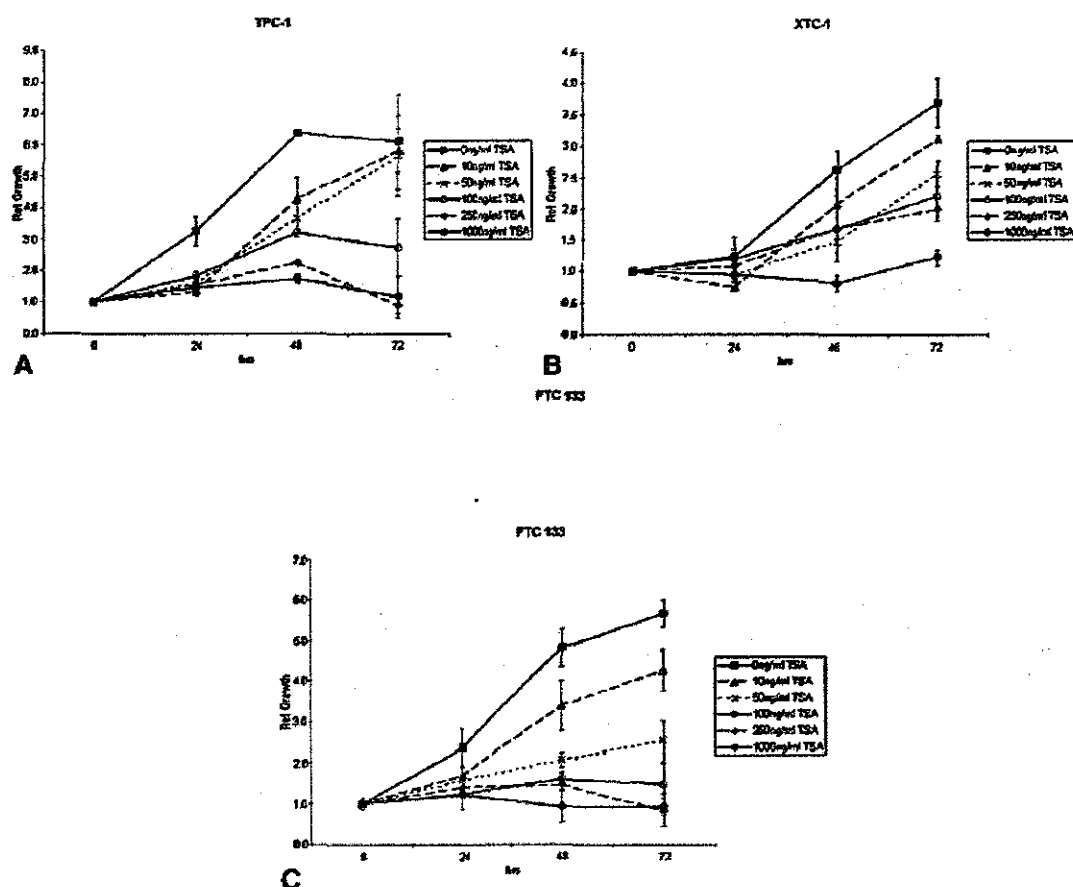
La **figure 24** montre la cytotoxicité observée, en utilisant la méthode MTT prolifération assay, sur les trois lignées de cancers thyroïdiens après traitement par la trichostatine A. Il existait une absence voire une faible cytotoxicité de la trichostatine A jusqu'à des concentrations d'environ 250 ng/mL. Cependant, la trichostatine A réduisait la prolifération cellulaire et induisait un arrêt de croissance. Cet effet était le plus évident aux concentrations les plus importantes. La cytotoxicité apparaissait à des concentrations de trichostatine A de 1000 ng / mL après 72 heures de traitement. La lignée cellulaire FTC-133 était la plus sensible à cette cytotoxicité.

Des modifications importantes ont été observées concernant les deux gènes cibles de cette étude (**figure 25**). L'expression d'ARNm du gène NIS dans les cellules de cancers thyroïdien était augmentée 107 (1,8-307) fois et 217 (5,7-408) fois pour les carcinomes papillaires, 39 (20-63) fois et 58 (37-80) fois pour les carcinomes à cellule de Hürthle, et 459 (178-810) et 781 (412-1229) fois pour les carcinomes folliculaires après traitement par 50 et 100 ng/mL de TSA respectivement. L'expression d'ARNm du gène PDS était diminuée 0,22 (0,05-0,45) fois et 0,27 (0,09-0,47) fois pour les carcinomes papillaires, 0,53 (0,46-0,6) fois et 0,54 (0,44-0,64) fois pour les carcinomes à cellule de Hürthle, et 0,32 (0,26-0,39) fois et 0,56 (0,47-0,64) fois pour les cancers folliculaires avec le même traitement. Le **tableau 4** montre les données concernant les modifications de l'expression des gènes NIS et PDS dans les trois lignées cellulaires de cancers thyroïdiens après 72 heures de traitement par la trichostatine A. Dans la lignée TPC-1 (carcinome papillaire), l'expression du gène NIS augmentait après traitement par la trichostatine A ($P < 0,05$) alors que l'expression du gène PDS diminuait ($P = 0,085$). Dans la lignée cellulaire XTC-1 (carcinome anaplasique), l'expression du gène NIS était aussi observée après traitement par la trichostatine A ($P < 0,05$) avec une diminution de l'expression du gène PDS ($P = 0,066$). La lignée cellulaire FTC-133 (carcinome folliculaire) avait l'augmentation la plus importante de l'expression du gène NIS après traitement par la trichostatine A ($P < 0,05$) avec une diminution similaire aux autres lignées concernant l'expression du gène PDS ($P = 0,190$). Des cellules de cancers coliques (groupe contrôle) n'avaient aucune variation de l'expression des gènes NIS et PDS après traitement par 50 et 100 ng/mL de trichostatine A. Aucune variation dans l'expression de ces gènes n'était observée non plus lors de l'exposition à l'alcool (utilisé pour dissoudre la trichostatine A).

Il existait une corrélation directe entre le traitement et l'expression du gène NIS dans les trois lignées cellulaires ($P 0,0001$). Bien que la corrélation entre le traitement et l'expression du gène PDS n'était pas linéaire, il existait une diminution de l'expression de PDS après traitement par trichostatine A ($P < 0,005$) pour les trois lignées cellulaires. Il existait aussi une corrélation entre le traitement induisant une augmentation de l'expression de NIS et la diminution de PDS ($P < 0,005$). Nous avons conclu que dans des lignées cellulaires de cancers thyroïdiens, la trichostatine A augmentait de façon importante l'expression du gène NIS et réduisait l'expression

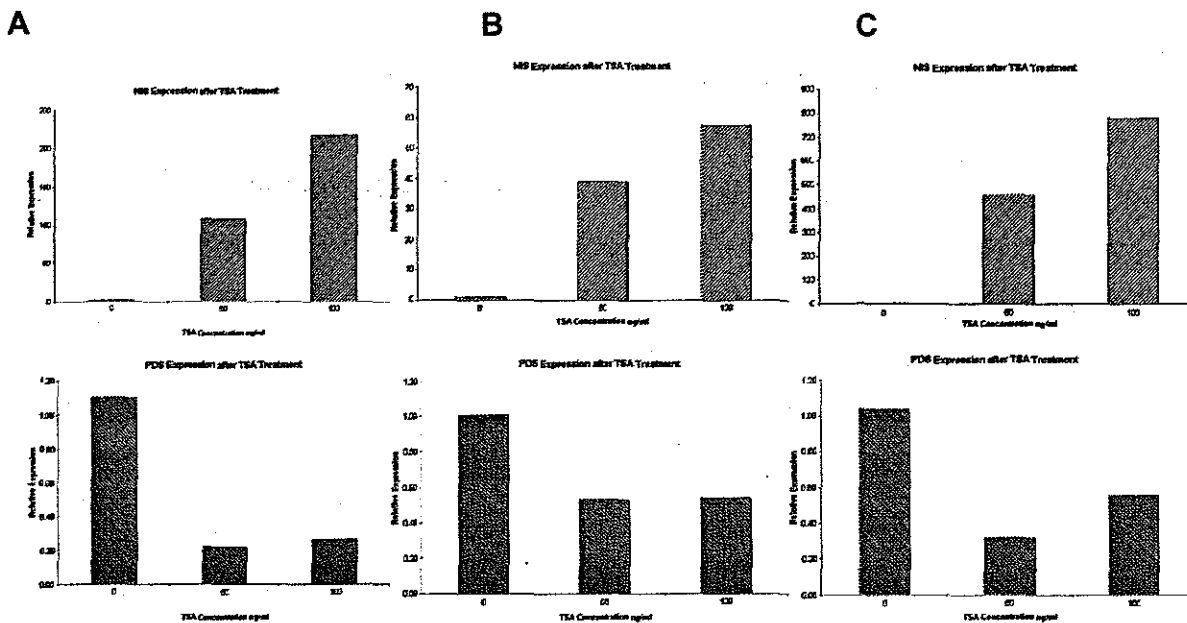
du gène PDS. Ces variations des gènes NIS et PDS pourraient augmenter l'efficacité du traitement par iode radioactif chez les patients ayant un cancer thyroïdien, particulièrement lorsque la tumeur ne fixe pas ou peu l'iode radioactif.

Figure 24



Mesure de la viabilité cellulaire (estimée par méthode colorimétrique / MTT assay) pour les lignées cellulaires TPC-1 (A), XTC-1 (B), et FTC 133 (C) après traitement avec la trichostatine A. Des concentrations de 0, 10, 50, 100, 250 et 1000 ng/mL de trichostatine A ont été utilisées. La prolifération cellulaire est mesurée relativement (Rel) au jour 0 et reorésente une mesure moyenne. Les mesures étaient réalisées à 24, 48 et 72 heures après le début du traitement. A; TPC-1 montre une prolifération cellulaire jusqu'à des concentrations de 100 ng/mL de trichostatine et une inhibition de croissance à des concentrations de 250 et 1000 ng/mL. B; Les cellules XTC-1 prolifèrent en présence de trichostatine jusqu'à des concentrations de 250 ng/mL puis une inhibition de croissance est ensuite observée à la concentration de 1000 ng/mL. C; Les cellules FTC-133 prolifèrent jusqu'à des concentrations de 50 ng/mL et ont une inhibition de croissance pour les concentrations supérieures.

Figure 25



Expression relative des gènes NIS et PDS dans les lignées TPC-1 (A), XTC-1 (B) et FTC-133 (C), après traitement par la trichostatine A pendant 72 heures. Des concentrations de 0, 50 et 100 ng/mL ont été utilisées. L'expression relative est calculée par la méthode C_T relative et correspond à une moyenne de 4 dosages. A; L'expression relative de TPC-1 concernant NIS était augmentée 107- à 217 fois en comparaison avec des cellules non traitées par la trichostatine ($P < .05$), et l'expression de PDS était diminuée de 0.22- à 0.27 fois par rapport aux cellules non traitées ($P = .085$). B; L'expression relative de XTC-1 concernant NIS était augmentée de 39- à 57 fois en comparaison de cellules non traitées ($P < .05$); l'expression de PDS était diminuée de 0.53- à 0.54 fois en comparaison avec les cellules non traitées ($P = .066$). C; L'expression relative de FTC-133 concernant NIS était augmentée de 459- à 781 fois en comparaison de cellules non traitées ($P < .05$); l'expression de PDS était diminuée de 0.32- à 0.56 fois en comparaison avec les cellules non traitées ($P = .190$).

Tableau 4

<i>Cell line</i>	<i>Treatment* C₀/NS</i>	<i>C_T NS</i>	<i>C_T PDS</i>	<i>ΔΔCT NS</i>	<i>SD ΔΔCT C_T/NS</i>	<i>Exp NS</i>	<i>Range</i>	<i>ΔΔCT PDS</i>	<i>SD ΔΔCT C_T/PDS</i>	<i>Exp PDS</i>	<i>Range</i>
TTC-1	0	22.4	37.2	0.0	0.7	1.1	0.6-1.6	0.0	0.8	1.1	0.6-1.7
	50	22.2	32.1	-4.6	3.7	107.0	1.8-307	2.7	1.5	0.2	0.05-0.4
	100	21.9	30.8	-5.6	3.1	217.2	5.7-408	2.3	1.2	0.3	0.03-0.5
NTC-1	0	20.9	33.8	0.0	0.4	1.0	0.8-1.3	0.0	0.2	1.0	0.9-1.2
	50	21.4	30.1	-5.1	0.8	39.1	19.6-62.5	0.9	0.2	0.5	0.5-0.6
	100	21.7	28.6	-5.8	0.6	57.5	36.6-79.9	0.9	0.3	0.5	0.4-0.6
FTC-133	0	21.8	40.1	0.0	1.7	1.4	0.3-3.2	0.0	0.5	0.5	0.7-1.4
	50	22.0	31.9	-8.0	1.1	439.3	178-810	1.7	0.3	0.3	0.3-0.4
	100	22.5	32.5	-9.5	0.8	781.5	412-1229	0.9	0.2	0.6	0.5-0.6

Expression des gènes Sodium / iodine (NIS) et pendrin (PDS) dans les lignées cellulaires de cancers thyroïdiens en réponse au traitement par la trichostatine A, en utilisant la RT-PCR quantitative real-time. Les valeurs de C_T des gènes GUS, NIS et PDS sont des moyennes de 3 dosages tripliqués. La différence dans l'expression des gènes ΔΔCT est relative à l'expression de ces gènes observée dans des cellules non traitées. L'expression de gènes (Exp NIS et Exp PDS) est calculée par $2^{(\Delta\Delta CT)}$. Les concentrations de trichostatine A sont en ng/mL.

4- Déterminants génétiques de l'hyperhomocystéinémie, de l'hypométhylation et maladies neurologiques

Article 4 / soumis "Augmentation de l'homocystéine et déterminants génétiques de la vitamine B12 dans les maladies neurologiques".

(Increased homocysteine and genetic determinants of vitamin B12 in neurological disorders.)

Le niveau d'homocystéine cellulaire dépend de déterminants nutritionnels comme les folates et la vitamine B12, ainsi que de polymorphismes de la méthylène tétrahydrofolate réductase (*MTHFR* 677 C $\rightarrow$ T et 1298 A $\rightarrow$ C), de la méthionine synthase (*MTR* 2756 C $\rightarrow$ G), et de la méthionine synthase réductase (*MTRR* 66 A $\rightarrow$ G). Les activités respectives de ces trois enzymes sont la synthèse de méthyltétrahydrofolate, le transfert de groupements méthyles du méthyltétrahydrofolate à l'homocystéine, et le maintien d'un état actif de la MTR.

Le niveau d'homocystéine cellulaire dépend aussi du polymorphisme de la transcobalamine (*TC* 777 C $\rightarrow$ G), qui est une protéine plasmatique permettant l'acheminement de la vitamine B12 aux cellules.

Plusieurs études *in vitro* indiquent l'implication de l'homocystéine dans la pathogénie multifactorielle de la maladie d'Alzheimer (MA) sporadique. L'homocystéine potentialise la neurotoxicité due à la protéine β -amyloïde, empêche la réparation de l'ADN dans les neurones de l'hippocampe et est un promoteur de l'apoptose. Des études cliniques ont confirmé l'association entre la concentration d'homocystéine et le risque de MA. L'hyperhomocystéinémie est associée à l'altération des fonctions cognitives de la MA. Dans une étude récente sur une période de 8 années, l'homocystéine était un facteur de risque important pour le développement de la MA, qui lui n'était pas lié à la vitamine B12 et aux folates. Ceci suggère l'implication de facteurs génétiques. Plusieurs études ont objectivé l'absence d'association des polymorphismes de la *MTHFR* avec la MA. Mais aucune étude n'a évalué l'effet de ce polymorphisme en combinaison avec les autres déterminants génétiques de l'homocystéine. L'implication de la carence en vitamine B12 comme facteur de risque de la MA est encore hypothétique. Dans l'étude OPTIMA

correspondant à des patients ayant une analyse histologique post-mortem, les patients ayant le taux de vitamine B12 le plus bas (1/3 inférieur) avaient un odds ratio de 4,3 pour la prévalence de la MA. Dans une étude récente italienne, nous avons montré que le polymorphisme combiné *TC777 GG / CG – MTHFR 677 CC* et l'homocystéine (quartile supérieur) étaient deux facteurs de risque importants dans l'incidence de la MA, avec des odds ratio respectifs de 10,14 ($P=0,0104$) et 3,43 ($P=0,0098$). Le variant *MTHFR* augmente le risque de MA lié à homocystéine et Apoprotéine E- Allele $\epsilon 4$ par un facteur de 2,4 et 2,8 respectivement.

Le syndrome de Down (Trisomie 21) est secondaire à une altération de la séparation chromosomique durant la méiose qui pourrait être due à une carence en folates et en groupements donneurs de méthyles. Les polymorphismes *MTHFR 677 C → T* et *MTRR 66 A → G* sont respectivement associés avec un risque d'avoir un enfant trisomique de 1,9 et 2,6 chez les mères d'enfants trisomiques 21 en Amérique du Nord. La combinaison de ces deux polymorphismes est associée à un risque de 4,1 et 3,0 (Odds ratio) en Amérique du Nord et en Irlande respectivement. Cependant, des données contradictoires ont été récemment publiées dans d'autres pays européens (Odds ratio < 1 pour *MTHFR* dans notre étude). Dans une étude de notre groupe réalisée en Italie, l'homocystéine et le variant *MTR 2756 AG/GG* étaient deux facteurs de risque significatifs pour avoir un enfant trisomique 21, avec des Odds ratio de 6,7 ($P=0,016$) et 3,5 ($P=0,028$) respectivement. Le génotype *MTR 2756 AG/GG* était aussi un facteur de risque d'être un patient trisomique, avec un Odds ratio de 3,8 ($P=0,009$). De plus, nous avons observé que les variants 677 TT et 677 CT / 1298 AC de *MTHFR* ainsi que l'homocystéine étaient trois facteurs de risque pour la présence d'un retard mental important chez les patients ayant une trisomie 21.

Les mécanismes physiopathologiques du spina bifida ou malformation du tube neural (MTN) restent difficiles à comprendre. La réduction du risque de MTN par supplémentation en folates a été observée chez des femmes qui antérieurement avaient eu une grossesse pathologique (avec enfant ayant une MTN). L'implication du polymorphisme *MTHFR 677 C → T* dans la pathogénèse de MTN peut être mise en question en raison de la présence de données contradictoires. Une méta-analyse

d'études contrôlées a évalué des Odds ratio de 1,8 et 2,0 pour les patients ayant un MTN et pour les mères de ces patients respectivement. Cependant, ce risque n'a pas été retrouvé chez les mères de patients avec MTN dans des études venant d'Italie ou de Grande Bretagne. La combinaison de la mutation 677 C → T et d'un second polymorphisme 1298 A → C de la MTHFR a été considéré comme augmentant le risque de MTN dans une étude Hollandaise. Le polymorphisme 66 A → G de la MTRR combiné avec un bas niveau de vitamine B12 augmente le risque de MTN et d'avoir un enfant ayant une MTN, avec un Odd ratio respectif de 2,5 et de 4,8. En présence de la combinaison de variants MTHFR et MTRR, les enfants et les mères ont une augmentation du risque de 4 fois et de 3 fois respectivement. Récemment, une étude Hollandaise de mères ayant une MTN n'a pas retrouvé d'association entre le génotype MTHFR TC 777 et le risque d'avoir un enfant atteint de MTN. Nous avons étudié le polymorphisme *MTHFR* 677 → CT en comparaison avec les autres polymorphismes associés et des contrôles provenant d'Italie du sud. Les variants MTHFR TC 777 GG and MTRR 66 GG associés à la forme sauvage de MTHFR 677 CC apparaissent aggraver le risque avec un Odds ratio de 2,4 ($P=0,028$) et 4,5 ($P=0,023$), respectivement. Par contraste, l'odds ratio de MTHFR 677 TT a été estimé à 0,1 ($P=0,009$) dans une étude irlandaise. En conclusion, l'homocystéine est un facteur de risque de MA, de survenue de trisomie 21, et de malformations neurologiques comme les MTN. Cependant, des données contradictoires ont été observées concernant les déterminants nutritionnels et génétiques. Ceci pourrait correspondre à des différences d'environnement et de caractéristiques génétiques des populations. Ceci illustre la nécessité d'évaluer les interactions gènes-nutriments et les interactions gène-gène pour mieux comprendre l'incidence du métabolisme monocarboné dans la pathogénie de ces maladies.

Chapitre VIII – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1- Les déterminants de la méthionine synthase et de l'hypométhylation de l'ADN (article 1)

Les modèles animaux de carence en vitamine B12 sont utiles pour évaluer les fonctions physiologiques de la vitamine B12. La disparition du facteur intrinsèque gastrique après gastrectomie totale est considérée comme responsable de l'induction d'une carence en vitamine B12 par diminution de l'absorption (181, 184, 185). Nous avons observé une diminution importante des taux sanguins de vitamine B12 dès le premier mois postopératoire chez les rats gastrectomisés. La résection ileale seule n'avait aucun effet significatif sur le statut en vitamine B12. Ceci suggère que le récepteur du complexe facteur intrinsèque –cobalamine n'était probablement pas localisé uniquement dans l'iléon chez le rat (186). Aucune modification significative n'était aussi observée chez les rats carencés alimentaires en vitamines B12, B9, méthionine, et choline. Ceci souligne que la carence alimentaire en vitamine B12 ne peut pas être considérée comme suffisamment efficace pour induire une carence sévère et permanente en vitamine B12 chez le rat (185, 187). Il est aussi probable que la coprophagie fournisse de la vitamine B12 aux rats même s'ils sont carencés en vitamine B12. Nous avons observé que la diminution de l'absorption en folates était improbable après gastrectomie car nous n'avons pas observé de variations significatives du statut en folates après gastrectomie totale chez le rat. Au total, nous pensons que le modèle chirurgical de gastrectomie totale associé à la carence alimentaire en vitamines B12, B9, choline et méthionine est un moyen pour atteindre une carence combinée en vitamine B12 et en folates, pour pouvoir ensuite évaluer les déterminants métaboliques de la transcription et de l'activité de la MTR, et de la méthylation globale de l'ADN.

Nos résultats ont objectivé une diminution de l'activité totale (apo + holoenzyme) et de l'holoenzyme MTR chez les rats carencés en vitamine B12. La vitamine B12 n'avait aucun effet sur la transcription de la MTR, comme cela avait déjà été observé dans 5 lignées cellulaires incluant HepG2 (une lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain) (176). Nous avons observé une corrélation positive entre

la vitamine B12, mais pas le niveau plasmatique de folates, et l'activité totale de MTR. De plus, des taux bas de vitamine B12 étaient le seul déterminant indépendant d'une activité basse de MTR. La méthionine synthase dans le foie de rats est considérée comme étant stabilisée par la formation d'un complexe avec la méthyle cobalamine, bien que différents résultats aient été obtenus dans des études de cultures cellulaires avec supplémentation en vitamine B12. Selon cette hypothèse, la stabilisation de l'enzyme par la liaison avec son coenzyme serait diminuée lorsque le taux de vitamine B12 est bas (< 200 pmol/L) et induirait une augmentation de la dégradation de l'apoenzyme. Cette hypothèse semble improbable car aucune différence de saturation de la MTR n'a été observée chez les rats ayant des taux supérieurs ou inférieurs à 200 pmol/L. De plus, l'addition de vitamine B12 lors des dosages de l'activité de la MTR augmentait cette activité de façon similaire chez les rats ayant des taux supérieurs ou inférieur à 200 pmol/L. Ces résultats n'étaient pas dus à une surrestimation de l'apo-MTR par artéfact car nous avons réalisé ces mesures dans des conditions anaérobies strictes comme cela avait été recommandé (188). De plus, nous avons observé un ratio similaire de holo MTR vs total MTR comme cela avait été rapporté dans différentes lignées cellulaires par Gulati et al. (176). Par contraste, Yamada et al. n'ont trouvé aucune différence d'activité de MTR après adjonction ou non de vitamine B12 (175). Ces auteurs concluaient que la MTR hépatique était toujours saturée par la vitamine B12, quelque soit le statut en B12 chez le rat carencé alimentaires. En fait, il peut être émis l'hypothèse que l'utilisation d'un agent oxydo-réducteur, le DTT, puisse produire une activité MTR correspondant à l'apo- et l'holo-MTR, même en absence de co-facteur vitamine B12. Au final, nos données suggèrent que l'effet in vivo de la carence en vitamine B12 sur l'expression de MTR est plutôt à mettre en relation avec un mécanisme inconnu à un niveau post-transcriptionnel, comme cela a été décrit in vitro dans des lignées cellulaires supplémentées en vitamine B12 (176). La diminution post-transcriptionnelle de MTR chez les rats carencés en vitamine B12 pourrait dépendre d'un ou plusieurs gènes, régulés par la vitamine B12 elle-même (176) et/ou par hypométhylation de l'ADN, considérant que la carence en vitamine B12 était un déterminant important de cette hypométhylation. Cette hypothèse doit être prise en considération puisque l'hypométhylation de l'ADN était corrélée avec l'activité MTR, en analyse univariée.

Des taux élevés d'homocystéine sont un facteur de risque pour les maladies cardio-vasculaires et les maladies du tube neural. Ceci souligne l'importance de l'évaluation de l'impact respectif des corégulateurs de l'activité des enzymes impliquées dans la transméthylation de l'homocystéine. Nous avons montré que la vitamine B12 était un déterminant plus faible que les folates pour l'augmentation des taux d'homocystéine, comme cela était observé dans des études cliniques (189). Ceci était aussi convergent avec des études cliniques récentes établissant que la supplémentation en acide folique permettait d'induire une diminution de la dépendance de l'homocystéine par rapport aux folates, alors que la vitamine B12 devenait le déterminant principal des concentrations plasmatiques d'homocystéine (190). De façon surprenante, l'activité MTR n'était pas un déterminant de l'homocystéine. L'affinité importante de la vitamine B12 pour MTR pourrait faire en sorte que ceci limite la désaturation de l'enzyme, limitant ainsi les conséquences de la carence vitaminique. Ceci pourrait expliquer que, dans notre étude, l'activité MTR était diminuée uniquement lorsqu'il existait une carence sévère en vitamine B12 i.e chez les rats gastrectomisés. Ceci est souligné par le fait que le variant MTR 2756 GG n'a aucun effet sur le taux d'homocystéine chez l'homme, contrairement au variant MTHFR 677 TT (191, 192).

Les résultats d'études antérieures chez le rat ont suggéré que la carence en folates pouvait induire des cassures chromosomiques et une hypométhylation alors que l'effet de la carence en vitamine B12 est moins clair. Nous avons observé que des taux bas de vitamine B12 et une faible activité de MTR étaient deux déterminants indépendants de l'hypométhylation globale de l'ADN. De plus, la corrélation positive entre activité MTR et méthylation de l'ADN a été observée uniquement dans le groupe de rats ayant des taux plasmatiques de B12 bas. Ceci suggère que MTR est un facteur limitant de la méthylation de l'ADN uniquement lorsque son expression et son activité sont diminuées, i.e lorsqu'il existe une carence sévère en vitamine B12. Finalement, des études antérieures et nos résultats suggèrent que la supplémentation alimentaire utilisée pour prévenir l'hypométhylation de l'ADN doit systématiquement inclure de la vitamine B12, en plus de l'acide folique, même si ses effets sur la diminution de l'homocystéine n'ont pas été mis en évidence (193). De plus, la supplémentation en vitamine B12 pourrait prévenir la carence en

vitamine B12 mais aussi augmenter le niveau d'expression de MTR par l'effet post-transcriptionnel déjà décrit par Gulati et al. (176).

En conclusion, la présence de taux faibles de folates plasmatiques est un déterminant important de l'hyperhomocystéinémie alors que la présence de taux faibles en vitamine B12 est un facteur déterminant de l'activité MTR et de l'hypométhylation globale chez le rat. La vitamine B12 affecte l'expression de MTR par un mécanisme non-transcriptionnel différent d'un effet protecteur sur la protéolyse de MTR.

2 – Déterminants nutritionnels de l'hypométhylation de l'ADN et cancérogénèse digestive (article 2)

Nous avons confirmé l'incidence faible (<5%) d'hépatocarcinomes dans le foie des rats carencés en vitamines B12, B9, méthionine et choline. En effet, aucune tumeur hépatique n'a été observée dans un groupe de 7 rats alimentés par ce régime alimentaire pendant une période de 20 mois. La carence en vitamine B12 de ces rats était alimentaire et doit donc être considérée comme étant une carence modérée par rapport à celle induite par la gastrectomie totale. Il faut cependant noter que le modèle chirurgical de gastrectomie ne permet pas d'obtenir des rats vivants pendant une durée importante et la médiane de survie des rats opérés dans notre étude était toujours inférieure à 2,5 mois. Ceci suggère que cette faible survie des rats gastrectomisés est un élément empêchant l'évaluation au long cours des foies de rats carencés sévèrement en vitamine B12. Par ailleurs, tous les rats de cette étude ayant survécu 1 an ont eu une imagerie par résonnance magnétique du foie et du cerveau. Ces examens ont toujours été considérés comme normaux. De plus, les foies de rats récupérés au moment de leur mort naturelle ont toujours été indemnes de tumeurs lors de l'examen anatomopathologique. Un index histologique d'activité a aussi été évalué dans les foies de rats carencés en vitamines B12, B9, choline et méthionine. Aucune différence significative dans le score de dysplasie ($P=0,39$) n'a été observée en comparaison avec les rats contrôles (régime alimentaire adéquat en B12, B9, méthionine et choline). De plus, aucune différence n'était observée concernant la stéatose hépatique, contrairement au modèle expérimentaux carencés en méthionine et en choline. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'un régime alimentaire carencé en vitamines B12, B9, choline et méthionine n'est probablement pas suffisant pour promouvoir l'incidence de tumeurs hépatiques. Ces résultats sont en accord avec le fait que la carence en choline, méthionine, folates et vitamine B12 a été considérée comme moins efficace dans la promotion de l'incidence d'hépatocarcinomes (**tableau 1**). Certains auteurs (118) ont même remis en question l'effet carcinogène du régime carencé en choline, méthionine, folates et vitamine B12 sur le foie des rats.

Aucune explication n'est actuellement disponible pour expliquer l'effet "protecteur" sur l'incidence d'hépatocarcinomes de l'association d'une carence en

vitamine B12 à un régime déjà carencé en vitamine B9, choline et méthionine. Une hypothèse pourrait être une balance entre la méthylation et la réplication. Ainsi, lorsque les rats sont carencés en méthionine, choline, vitamine B12 et folates, l'hypométhylation de l'ADN est associée à une diminution de la réplication avec blocage du cycle des folates. De façon schématique, méthylation et réplication seraient bloquées et l'incidence des cancers serait faible. Par contre, lorsque la vitamine B12 n'est pas carencée, la méthylation de l'ADN est toujours diminuée mais il existe un maintien plus important de l'activité de la méthionine synthase (MTR) dont le déterminant principal est la vitamine B12. Ceci pourrait induire un blocage relativement "moins" important du cycle des folates que dans la situation précédente et la balance réplication / méthylation serait ainsi modifiée. La réplication et la synthèse de l'ADN pourrait alors traduire les conséquences de l'hypométhylation de l'ADN (mutations ponctuelles et instabilité chromosomique) et engendrer ainsi une incidence plus importante de cancers.

3- Histone déacetylases et cancer

(article 3 Surgery)

Nous avons étudié les effets de la trichostatine A sur l'expression des gènes NIS et PDS dans trois différentes lignées cellulaires de cancers thyroïdiens. Cette médication induit une acétylation des histones et est un inhibiteur des histones déacetylases. La trichostatine A augmentait de façon importante l'expression du gène NIS et diminuait l'expression du gène PDS. Ces gènes ont une importance clinique fondamentale puisqu'ils définissent dans les cellules de cancers thyroïdiens la captation cellulaire ou la non captation d'iode. Par conséquent, ces gènes pourraient moduler la captation d'iode des cellules et permettre ainsi de redifférencier des cellules thyroïdiennes qui initialement ne fixaient pas l'iode radioactif (qui est un moyen thérapeutique majeur des cancers thyroïdiens différenciés). L'utilisation de la Trichostatin A in vitro indique que cette médication pourrait augmenter la captation d'iode ¹³¹I dans plusieurs lignées cellulaires de cancer thyroïdien par augmentation de l'expression de l'ARNm du gène NIS. Ces résultats suggèrent que des nouveaux traitements pourraient être utilisés pour augmenter la captation d'iode ¹³¹I par les cellules de cancers thyroïdiens ayant initialement une faible ou une absence de captation d'iode (cancers récidivants et/ou peu différenciés par exemple). L'expression du gène PDS est aussi modifiée lors de l'utilisation de la Trichostatin A dans ces trois différentes lignées cellulaires. Cependant, l'expression du gène PDS était aussi réduite dans des nodules thyroïdiens hyperfonctionnels qui avaient aussi une augmentation de l'expression du gène NIS (194). L'expression du gène NIS et de PDS pourraient être co-régulées, probablement par un mécanisme on / off du gène PDS lorsque l'expression de NIS est augmentée, induisant ainsi une accumulation d'iode dans les cellules thyroïdiennes. Cette hypothèse est actuellement en cours d'évaluation et demande encore une validation par des données plus objectives.

Les effets d'arrêt de croissance cellulaire secondaires à la trichostatine A doivent aussi être encore évalués. La trichostatine A est considérée comme augmentant l'expression du gène p21. Ce gène p21 régule la progression des cellules à travers le cycle cellulaire. Ce double effet de la trichostatine A, redifférenciation et augmentation de la captation en iode ¹³¹I à de basses concentrations, et arrêt de la croissance cellulaire à des concentrations plus hautes,

pourrait faire en sorte que cette médication devienne un nouveau moyen thérapeutique dans le traitement des cancers thyroïdiens comme dans d'autres types de cancers.

Le traitement actuel des cancers thyroïdiens différenciés (CDT) est la thyroïdectomie, l'iode radioactif ^{131}I , et la suppression de la TSH. Comme 30% à 40% des CDT sont ou deviennent non répondeurs à l'iode radioactif, il est considéré que ceci correspond à une dédifférenciation tumorale. Des traitements qui permettraient une re-différenciation des cellules de cancers thyroïdiens pourraient faire en sorte que ces cellules puissent de nouveau capter l'iode radioactif ^{131}I . Des études antérieures ont utilisé l'acide rétinoïque pour essayer de redifférencier les cellules et d'augmenter l'expression du gène NIS (195). Des études cliniques sont en cours. La combinaison de la trichostatine A avec l'acide rétinoïque pourrait potentialiser les résultats mais ceci est actuellement inconnu. Il est aussi possible que la trichostatine A augmente l'expression de NIS dans les CDT bien différenciés ainsi que chez les patients présentant une maladie de Basedow, si bien que des doses plus faibles d'iode ^{131}I pourraient être utilisées (que les doses utilisées actuellement). La trichostatine A est un inhibiteur des histones déacétylases et favorise donc l'acétylation des histones. Cette médication induit une activation de la transcription en favorisant la présence d'une chromatine accessible, hyperacétylée. Cependant, la signification des modifications observées sur la partie terminale des histones semble un peu plus complexe, et ne dépend pas uniquement d'une méthylation ou d'une acétylation. Il apparaît ainsi que c'est finalement la répartition des lysines acétylées ou des lysines ou arginines méthylées qui pourrait correspondre à un système de "code des histones" et avoir ainsi un message informatif pour la transcription ou pour la répression de cette transcription. Ce code a été proposé pour expliquer la régulation de l'expression des gènes. Le code des histones tiendrait compte aussi des autres modifications comme la phosphorylation.

Bien qu'actuellement aucune étude n'existe sur l'utilisation clinique de la trichostatine A, cette médication a été utilisée de façon extensive *in vitro* et dans des études animales. Parce que la trichostatine A augmente l'expression de NIS et diminue l'expression de PDS, cette médication pourrait devenir dans les années à venir un nouvel agent thérapeutique standard des cancers thyroïdiens en augmentant la

captation d'iode des cellules thyroïdiennes. D'autres médicaments comme le SAHA paraissent avoir une activité HDAC plus spécifique que la trichostatine A et pourraient aussi être utilisées dans de futures études (67). Par ailleurs, le lien entre statut nutritionnel en folates des patients et la méthylation des histones n'est actuellement pas connu et pourrait être évalué à l'avenir. Une autre interaction à évaluer pourrait aussi être le lien entre le statut thyroïdien (hypo / ou hyperthyroïdie) et les modifications de l'homocystéine via la vitamine B2 (MTHFR / MTRR) (196, 197) et la méthylation des histones. Il est en effet considéré qu'il existe une balance méthylation / acétylation des résidus N-terminaux des histones et que l'acétylation de certains résidus des histones semble être conditionnée par la méthylation d'autres résidus proches (ou flanquants).

4- Déterminants génétiques de l'hyperhomocystéinémie, de l'hypométhylation et maladies neurologiques (article 4)

Les effets négatifs de la carence en vitamine B12 / folates et l'augmentation de l'homocystéine sur le système nerveux central sont bien établis (198). Les données actuelles suggèrent plusieurs mécanismes possibles pouvant expliquer les lésions et la toxicité sur le tissu neuronal. L'homocystéine induit des cassures chromosomiques dans des cellules de neurones en culture par l'altération de la méthylation de l'ADN (199). Ces lésions de l'ADN peuvent aussi être en partie responsables de l'induction de l'apoptose des cellules. Ainsi, des cellules neuronales traitées avec de l'homocystéine ont tendance à diminuer leurs réserves d'ATP pour essayer de réparer les lésions de l'ADN induite par l'homocystéine (199). Il est par conséquent considéré que la déplétion cellulaire d'ATP pourrait aussi être un facteur central dans les mécanismes de neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Cette notion associée au stress oxydatif secondaire à l'hyperhomocystéinémie, pourrait faire en sorte qu'une augmentation modérée ou même faible de l'homocystéine pourrait engendrer une diminution importante de l'ATP dans les neurones du cerveau des sujets âgés (dans lesquels l'ATP est déjà diminué secondairement au vieillissement) (198). Les lésions oxydatives résultant de la carence en folates et de l'homocystéine pourraient être causées par l'augmentation du calcium cytosolique et les lésions de l'ADN. La carence en folates et la supplémentation en homocystéine augmentent toutes les deux les taux cytosoliques de calcium dans des neurones en culture. De plus, le traitement par des bloqueurs des canaux calciques de ces neurones atténue l'augmentation de calcium, suggérant que ces variations calciques résultent de flux calciques à travers la membrane plasmatique (200). L'homocystéine potentialise aussi la neurotoxicité du glutamate et la toxicité de l'homocystéine est atténuée par les antagonistes des récepteurs du glutamate (199). La carence en folates et l'augmentation de l'homocystéine altèrent aussi l'activité glutathione peroxydase et réduisent les niveaux cellulaires de vitamines A, C et E (201). Ceci pourrait suggérer que la carence en folates puisse compromettre la réserve anti-oxydative à plusieurs niveaux (198).

L'implication de l'homocystéine comme facteur de risque de la maladie d'Alzheimer (MA) a été clairement rapporté (202). L'implication de la vitamine B12 est par contre plus discutée (163, 202). Des taux bas de folates sont par ailleurs clairement associés avec l'atrophie du cortex cérébral. Les facteurs contribuant au début et au développement de la MA incluent des prédispositions génétiques, l'accumulation de bêta-peptide amyloïde, le stress oxydatif, des altérations du métabolisme cellulaire du calcium et l'excitotoxicité. De plus, certains de ces facteurs interagissent ensemble de façon synergique. Par exemple, l'homocystéine ou la carence en folates peuvent potentialiser la neurotoxicité du peptide bêta-amyloïde (198). L'exposition simultanée de neurones en cultures au peptide bêta-amyloïde et à l'homocystéine induit un stress oxydatif et l'apoptose à des concentrations, qui lorsque ces facteurs sont utilisés isolément, ont des effets très modérés (203). Comme les lésions oxydatives sont responsables de la dégénérescence neuronale dans la MA, l'augmentation du stress oxydatif représente un mécanisme par lequel la carence nutritionnelle ou génétique en folates contribue à la neurodégénérescence (198, 203). Par ailleurs, le tétrahydrofolate est sensible à l'oxydation, comme l'est la cob(I)alamine (forme intermédiaire de vitamine B12). Ceci suggère que la carence en folates et en vitamine B12 pourrait aussi contribuer aux lésions oxydatives des neurones. Un autre lien entre homocystéine et MA vient d'études récentes concernant la protéine homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress (HERP) (204). Cette protéine pourrait interagir avec les presenilines 1 et 2; et l'augmentation de l'expression de HERP dans des cultures cellulaires pourrait augmenter la production de peptide bêta-amyloïde (198). La fonction de cette protéine pourrait être antagoniste à la mort cellulaire induite par le stress du réticulum endoplasmique et le peptide bêta-amyloïde. Enfin, les sujets possédant l'isoforme E4 de l'apolipoprotéine E (ApoE) ont un risque augmenté de développer une MA, probablement par l'activité antioxydante diminuée de l'ApoE4, par rapport aux autres formes d'ApoE (205). Trois variants de gène et de protéine de l'ApoE sont observés chez l'homme et correspondent à un changement d'un seul acide aminé (ApoE- ϵ 2, - ϵ 3, - ϵ 4). Les sujets porteurs d'un allèle ApoE- ϵ 4 ont environ le double de risque de développer une MA durant leur vie (15 % contre 29 %), alors les non-porteurs diminuent leur risque d'environ 40 % (205). Une interaction entre ApoE4, MTHFR et le risque de développer une MA a été aussi récemment rapporté (206). Il est de plus considéré

que la carence en folates possède un effet délétère sur les conséquences neurotoxiques associées à la diminution fonctionnelle de l'ApoE (198).

Nous avons observé que le génotype transcobalamine TC 777 GG / CG était associé à l'incidence et la sévérité de la MA lorsqu'il était associé aux génotypes sauvages ou mutés de MTHFR 677 C → T. Ceci indiquerait que la diminution de la vitamine B12 intracellulaire seule pourrait être liée à l'incidence de la MA, alors que la combinaison associant la baisse de la disponibilité cellulaire en vitamine B12 et l'altération de la MTHFR augmenterait le risque d'avoir une forme sévère de MA. La carence en vitamine B12 est considérée comme étant liée à la démyélinisation et à certaines maladies psychiatriques (207). Inversement, la carence en folates n'est pas associée avec la présence d'une démyélinisation. Le variant muté de TC diminue le niveau transcriptionnel et la concentration cellulaire de TC. Dans le cerveau, la TC est principalement sécrétée par les cellules gliales, et sa concentration ainsi que ses polymorphismes sont similaires à ce qui est observé dans le sérum. Il est probable que le polymorphisme de la transcobalamine TC diminue l'expression et la sécrétion de transcobalamine dans les cellules gliales, réduisant ainsi la quantité de vitamine B12 délivrée aux cellules neuronales. Par conséquent, il est possible que ceci puisse induire la diminution de la transméthylation vitamine B12-dépendante de l'homocystéine et altérer la méthylation de plusieurs substrats essentiels au métabolisme cérébral (198).

De plus, la diminution de l'activité de l'enzyme MTHFR mutée, qui induit une diminution cellulaire de la disponibilité en méthyltétrahydrofolate, était un facteur aggravant pour la pathogénicité de ApoE ε4 chez nos patients présentant une MA. ApoE ε4 est un déterminant de la neurotoxicité due au peptide bêta-amyloïde. Il a aussi été démontré in vitro que l'homocystéine potentialise cette neurotoxicité. La carence alimentaire en folates chez des souris induit une augmentation de l'antioxydant glutathion dans le tissu cérébral et augmente de façon importante les lésions oxydatives dans le cerveau de souris homozygotes knockout ApoE (ApoE -/-) (198, 207). L'observation dans notre étude de la potentialisation du risque de MA secondaire au variant ApoE ε4, par un déterminant génétique de la synthèse de méthyltétrahydrofolate, confirme les observations précédentes. Au final, ces

données expérimentales et nos conclusions suggèrent qu'il existe une influence synergique des facteurs génétiques prédisposant à l'altération de la disponibilité cellulaire en vitamine B12 et en méthyltétrahydrofolate, ainsi que de la neurotoxicité du fragment bêta-amyloïde, induisant finalement une neurodégénérescence.

Dans cette étude, nous avons aussi rapporté que le quartile supérieur d'homocystéine était un facteur de risque d'avoir un enfant trisomique 21, alors que le polymorphisme MTHFR 677 C→T n'avait aucune incidence sur ce risque. Par ailleurs, contrairement à ce qui avait été observé par d'autres auteurs, les folates plasmatiques n'étaient pas un déterminant significatif pour l'homocystéine chez les mères d'enfants trisomiques (171). De plus, l'homocystéine n'était pas influencée par les polymorphismes de MTHFR, MTR ou MTRR. Ceci suggère que d'autres déterminants encore inconnus pourraient influencer les métabolismes du mono-carbone ou de l'homocystéine et ainsi contribuer à l'incidence de la trisomie 21.

Le polymorphisme MTR était un facteur de risque significatif pour avoir un enfant trisomique ainsi que pour être porteur d'une trisomie 21. En fait, il pourrait être fait l'hypothèse que le polymorphisme MTR 2756 AG pourrait altérer le métabolisme des folates en diminuant les taux de transméthylation de l'homocystéine, même si ce polymorphisme n'avait aucun effet apparent sur les taux plasmatiques d'homocystéine dans cette étude. Ce polymorphisme induit la substitution d'un acide aspartique par une glycine, dans une zone proche du domaine de liaison vitamine B12-MTR. On peut donc émettre l'hypothèse que ce variant de MTR pourrait diminuer le taux de synthèse de méthionine et avoir un impact sur la méthylation de l'ADN de façon concomitante avec d'autres facteurs nutritionnels et génétiques qui pourraient altérer le pool cellulaire de méthyltétrahydrofolate. La description du polymorphisme MTR 2756 A → G comme un facteur de risque de la trisomie 21 apporte un argument de plus pour suggérer que les polymorphismes affectant le métabolisme du mono-carbone sont des facteurs de risque contributifs chez les mères d'enfants trisomiques 21.

Le polymorphisme MTRR 66 A→G a été associé avec un risque élevé d'avoir un enfant trisomique (171, 172). Dans notre étude, le génotype MTRR hétérozygote était un facteur de risque lorsqu'il était associé avec le génotype MTR hétérozygote,

alors que le génotype MTRR seul n'avait aucune incidence. Ceci illustre la nécessité de considérer l'ensemble des polymorphismes des enzymes altérant le métabolisme du mono-carbone. Le variant MTHFR 677 C-->T était un facteur de risque dans une étude américaine (173), alors qu'aucun effet n'a été observé dans notre étude (dans laquelle l'allèle T était observé plus fréquemment). Cette même discordance a été observée dans différentes études évaluant les facteurs de risque des coronaropathies et des malformations du tube neural (191). Une autre cause pouvant expliquer les différences observées entre des zones géographiques pourrait être les différences d'interactions gène-nutrition. Ainsi, la nourriture italienne pourrait différer de celle des irlandais, en apportant plus de folates. Ceci pourrait expliquer l'absence d'incidence des polymorphismes observés en Sicile.

Notre étude indique aussi que les déterminants génétiques affectant la reméthylation MTR-dépendante pourraient être des facteurs aggravant la pathogénicité des malformations du tube neural. Ainsi, les polymorphismes de MTR, MTRR, et de la transcobalamine étaient associés avec la présence de MTN. Ceci pourrait correspondre à une diminution de l'activité de la MTR secondairement à la diminution de sa biodisponibilité et à une diminution de la disponibilité de vitamine B12 cellulaire.

5- Conclusion

En conclusion, ce travail a permis d'évaluer les déterminants nutritionnels existants entre le métabolisme de la méthionine et la méthylation globale de l'ADN chez le rat *in vivo*. Le deuxième objectif, qui était d'évaluer la carcinogénèse hépatique de rats carencés en groupements méthyles, a été partiellement atteint car la survie des rats opérés d'une gastrectomie totale n'a pas pu être prolongée. Nous avons par contre souligné l'importance du facteur carence ou non en vitamine B12 dans le régime carencé en groupements méthyles sur l'incidence des cancers du foie. Le troisième objectif de ce travail a permis d'évaluer les liens existants entre acétylation des histones et la variabilité de l'expression de gènes pouvant être utiles en pratique clinique. Enfin, le dernier objectif a permis d'évaluer les liens existants entre le métabolisme de la méthionine avec ses différents polymorphismes et l'incidence et/ou la sévérité de certaines maladies neurologiques. L'ensemble de ces objectifs a donc pu apporter des éléments nouveaux dans l'évaluation du lien entre méthylation, expression de gènes et certaines pathologies.

REFERENCES

1. Fenech M. The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 2001;475:57-67.
2. Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997;18:869-882.
3. Barnerjee RV, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J* 1990;4:1450-1459.
4. Wajed SA, Laird PW, Demeester TR. DNA methylation: An alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001;234:10-20.
5. Worm J, Guldberg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med* 2002;31:443-449.
6. Singal R, Ginder G. DNA methylation. *Blood* 1999;93:4059-4070.
7. Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr* 2002;132:2382S-2387S.
8. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002;196:1-7.
9. Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Op Genet & Dev* 1999;9:158-163.
10. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141-196.
11. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998;19:187-193.
12. Wade PA. Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* 2001;20:3166-3173.
13. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001;20:3156-3165.
14. Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science* 1980;210:604-610.
15. Richardson B. Role of DNA methylation in the regulation of cell function. *J Nutr* 2002;132:2401S-2405S.
16. Kaplan M, Deng C, Yang J, Richardson B. DNA methylation in the regulation of T cell LFA-1 expression. *Immunol Invest* 2000;29:411-425.

17. Ono T, Uehara Y, Kurishita A, Tawa R, Sakurai H. Biological significance of DNA methylation in the ageing process. *Age Ageing* 1993;22:S34-S43.
18. Ross SA, Poirier LA. Proceedings of the trans-HHS workshop: Diet, DNA methylation processes and health. *J Nutr* 2002;132:2329S-2332S.
19. Guéant JL, Namour F. Vitamin B12: Absorption, metabolism and deficiency. In: L.R. Johnson, D.H. Alpers, editors. *Encyclopedia of Gastroenterology*. New York: Academic Press; 2003.
20. Stabler SP. B12 and Nutrition. In: Banerjee R, editor. *Chemistry and Biochemistry of B12*. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1999. p. 343-365.
21. MacGregor JT, Wehr CM, Hiatt RA, et al. Spontaneous genetic damage in man: evaluation of inter-individual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. *Mutat Res* 1997;377:125-135.
22. Jensen MK. Cytogenetic findings in pernicious anaemia. *Mutat Res* 1977;45:249-252.
23. Fenech M, Dreosti IE, Rinaldi JR. Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis* 1997;18:1329-1336.
24. Fenech M, Aitken C, Rinaldi J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young australian adults. *Carcinogenesis* 1998;19:1163-1171.
25. Selhub J. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. *J Nutr Health Aging* 2002;6:39-42.
26. Choi SW, Mason JB. Folate status: Effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002;132:2413S-2418S.
27. Kim Y, Pogribny AG, Basnakian J, et al. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumour. *Am J Clin Nutr* 1997;65:46-52.
28. Pogribny IP, Basnakian A, Miller B, Lopatina N, Poirier L, James S. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl deficient rats. *Cancer Res* 1995;55:1894-1901.
29. Jacob RA, Gretz DM, Taylor P, et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in post-menopausal women. *J Nutr* 1998(1204-1212).

30. Kim Y, Baik H, Fawaz K, et al. Effects of folate supplementation on two provisional molecular markers of colon cancer: a prospective randomized trial. *Am J Gastroenterol* 2001;96:184-195.
31. Duthie S, Narayanan S, Blum S, Pirie L, Brand GM. Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells. *Nutr Cancer* 2000;37:245-251.
32. Fowler BM, Giuliano AR, Piyathilake C, Nour M, Hatch K. Hypomethylation in cervical tissue - is there correlation with folate status ? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:901-906.
33. Cravo M, Fidalgo P, Pereira A, et al. DNA methylation as an intermediate biomarker in colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1994;3:473-479.
34. Piyathilake C, Johanning G. Cellular vitamins, DNA methylation and cancer risk. *J Nutr* 2002;132:2340S-2344S.
35. Zeisel SH. Choline: An important nutrient in brain development, liver function and carcinogenesis. *Am J Clin Nutr* 1992;11:473-481.
36. Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ, Kyle WE. Regulation of the betaine content of rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1982;218:169-173.
37. Sunden S, Renduchintala M, Park E, Miklasz S, Garrow T. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys* 1997;345:171-174.
38. Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, et al. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:5560-5565.
39. Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr* 2002;132:2333S-2335S.
40. Henning SM, Swendseid ME. The role of folate, choline, and methionine in carcinogenesis induced by methyl-deficient diets. *Adv Exp Med Biol* 1996:143-155.
41. Poirier LA, Wise CK, Delongchamp RR, Sinha R. Blood determinations of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and homocysteine: Correlations with diet. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:649-655.

42. Varela G, Selhub J, Da Costa K, Zeisel SH. Effect of chronic choline deficiency in rats on liver folate content and distribution. *J Nutr Biochem* 1992;3:519-522.
43. Horne DW, Cook RJ, C W. Effect of dietary methyl group deficiency on folate metabolism in rats. *J Nutr* 1989;119(618-621).
44. Zeisel SH, Zola T, Da Costa K, Pomfret EA. Effect of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentrations in rat liver. *Biochem J* 1989;259:725-729.
45. Varela-Moreiras G, Ragel C, Perez de Miguel sanz J. Choline deficiency and methotrexate treatment induces marked but reversible changes in hepatic folate concentrations, serum homocysteine and DNA methylation rates in rats. *J Am Coll Nutr* 1995;14:480-485.
46. Wainfan E, Dizik M, Stender M, Xchristman JK. Rapid appearance of hypomethylated DNA in livers of rats fed cancer-promoting, methyl-deficient diets. *Cancer Res* 1989;49:4094-4097.
47. Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Sasaki Y, Takahama M, Konishi Y. Hypomethylation of CpG sites and c-myc gene overexpression in hepatocellular carcinomas, but not hyperplastic nodules, induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:909-913.
48. Locker J, Reddy TV, Lombardi B. DNA methylation and hepatocarcinogenesis in rats fed a choline devoid diet. *Carcinogenesis* 1996;7:1309-1312.
49. Wilson MJ, Shivapurkar N, Poirier LA. Hypomethylation of hepatic nuclear DNA in rats fed with a carcinogenic methyl-deficient diet. *Biochem J* 1984;218:987-990.
50. Bhawe MR, Wilson MJ, Poirier LA. c-H-ras and c-K-ras gene hypomethylation in the livers and hepatomas of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1988;9:343-348.
51. Dizik M, Christman JK, Wainfan E. Alterations in expression and methylation of specific genes in livers of rats fed a cancer promoting methyl-deficient diet. *Carcinogenesis* 1991:1307-1312.
52. Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 1992;52:2071s-2077s.

53. Counts JL, McClain RM, Goodman JI. Comparison of effect of tumor promoter treatments on DNA methylation status and gene expression in B6C3F1 and C57BL/6 mouse liver and B6C3F1 mouse liver tumors. *Mol Carcinog* 1997;18:97-106.
54. Christman JK, Sheikhnejad G, Dizik M, Abileah S, Wainfan E. Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. *Carcinogenesis* 1993;14:551-557.
55. James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: Potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nutr* 2002;132:2361S-2366S.
56. Marmorstein R, Roth SY. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Op Genet & Dev* 2001;11:155-161.
57. Lusser A. Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation. *Curr Op Plant Biol* 2002;5:437-443.
58. Rice JC, D A. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Op Cell Biol* 2001;13:263-273.
59. Turner B. Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* 2000;22:836-845.
60. Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, et al. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 1996;84:843-851.
61. Sterner D, Berger S. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol* 2000;64:435-45£9.
62. Roth S, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferase. *Annu Rev Biochem* 2001;70:81-120.
63. Nicolas E, Vaute O, Vandel L, Trouche D. La méthylation des histones: une marque de domaines chromatiniens ? *Médecine / Science* 2002;18:17-19.
64. Jenuwein T. Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransférases. *Trends Cell Biol* 2001;11:266-273.
65. Lübbert M. DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;249:135-164.
66. Marks PA, Richon VM, Breslow R, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr Op Oncol* 2001;13:477-483.

67. Richon VM, Zhou X, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: Development of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) for the treatment of cancers. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2001;27:260-264.
68. Mikol YB, Hoover KL, Creasia D, Poirier LA. Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1983;4:1619-1629.
69. Yokoyama S, Sells MA, Reddy TV, Lombardi B. Hepatocarcinogenic and promoting action of a choline-devoid diet in the rat. *Cancer Res* 1985;45:2834-2842.
70. Ghoshal AK, Farber E. The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Carcinogenesis* 1984;5:1367-1370.
71. Rogers A. Methyl donors in the diet and responses to chemical carcinogens. *Am J Clin Nutr* 1995;61:659S-665S.
72. Poirier L. The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. *J Nutr* 2002;132:2336S-2339S.
73. Wickramasinghe S, Fida S. Bone marrow cells from vitamin B12 and folate-deficient patients misincorporate uracil into DNA. *Blood* 1994;83:1656-1661.
74. Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr* 2002;132:2350S-2355S.
75. Boutron-Ruault M, Senesse P, Faivre J, Couillaud C, Belghiti C. Folate and alcohol intakes: related or independent roles in the adenoma-carcinoma sequence ? *Nutr Cancer* 1996;26:337-346.
76. Ferraroni M, La Vecchia C, D'Avanzo B, Negri E, Franceschi S, Decarli A. Selected micronutrient intake and the risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1994;70:1150-1155.
77. Porta E, Markell N, Dorado R. Chronic alcoholism enhances hepatocarcinogenicity of diethylnitrosamine in rats fed a marginally methyl-deficient diet. *Hepatology* 1985;5:1120-1125.
78. Kutzbach C, Stokstad EL. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase: partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochem Biophys Acta* 1971;250:459-477.
79. Van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects ? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-1051.

80. Dahiya R, Lesuffleur T, Kwak KS, et al. Expression and characterization of mucins associated with the resistance to methotrexate of human colonic adenocarcinoma cell line HT29. *Cancer Res* 1992;52:4655-4662.
81. Nonancourt M, Gueant JL, Adjalla C, Chery C, Hatier R, Namour F. Overexpression of folate binding protein alpha is one of the mechanism explaining the adaptation of HT29 cells to high concentrations of methotrexate. *Cancer Lett* 2001;171:139-145.
82. Gama-Sosa M, Slagel VA, Trewyn RW, et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 1983;11:6883-6894.
83. Poirier LA. Methyl-group deficiency in hepatocarcinogenesis. *Drug Metab Rev* 1994;185-199.
84. Ormerod E, Everett CA, Hart IR. Enhanced experimental metastatic capacity of a human tumor cell line following treatment with 5-azacytidine. *Cancer Res* 1986;46:884-890.
85. Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics. *Annu Rev Genet* 1996;30:441-464.
86. Weissbach A, Ward C, Bolden A. Eukaryotic DNA methylation and gene expression. *Curr Top Cell Regul* 1989;30:1-21.
87. Lewis J, Bird A. DNA methylation and chromatin structure. *FEBS Lett* 1991;285:155-159.
88. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983;89-92.
89. Lutsenko E, Bhagwat AS. Principal causes of hot spots for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells. *Mutat Res* 1999;437:11-20.
90. Magewu AN, Jones PA. Ubiquitous and tenacious methylation of CpG site in codon 248 of the P53 gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer. *Mol Cell Biol* 1994;14:4225-4229.
91. James S, Cross DR, Miller B. Alterations in nucleotide pools in rats fed diets deficient in choline, methionine and/or folic acid. *Carcinogenesis* 1992;13:2471-2474.
92. Blount BC, Ames BN. DNA damage in folate deficiency. *Bailleres Clin Haematol* 1995;8:461-478.
93. Nebert WD. Transcription factors and cancer: an overview. *Toxicology* 2002;181:131-141.

94. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, JC R. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993;82:1820-1827.
95. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001;20:3139-3155.
96. Bestor TH. Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* 1998;393:311-312.
97. Fang JY, Xiao SD. Alterations of DNA methylation in gastrointestinal carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:960-968.
98. Zapizek WF, Cronin GM, Lyn-Cook BD, Poirier LA. The onset of oncogene hypomethylation in the livers of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1992;13:1869-1872.
99. Avila MA, Berasain C, Torres L, et al. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;33:907-914.
100. Chen J, Giovannucci E, Hankinson SE, et al. A prospective study of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis* 1998;19:2129-2132.
101. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:825-829.
102. Ryan BM, Weir DG. Relevance of folate metabolism in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Lab Clin Med* 2001;138:164-176.
103. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163-167.
104. Greger V, Debus N, Lohmann D, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B. Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Hum Genet* 1994;94:491-499.
105. Ringrose L, Paro R. Cycling silence. *Nature* 2001;412:493-494.
106. Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:9700-9718.

107. Ng MH, Chung YF, Lo KW, Wickham NW, Lee JC, DP H. Frequent hypermethylation of P16 and P15 genes in multiple myeloma. *Blood* 1997;89:2500-2513.
108. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:2545-2549.
109. Jones PA, Gonzalo ML. Altered DNA methylation and genome instability: A new pathway to cancer ? *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:2103-2109.
110. Chen RZ, Petterson U, Beard C, Jackson-Gruby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998;395:89-93.
111. Sawada N, Poirier LA, Moran S, Xu YH, Pitot HC. The effect of choline and methionine deficiencies on the number and volume percentage of altered hepatic foci in the presence or absence of diethylnitrosamine initiation in rat liver. *Carcinogenesis* 1990;273-281.
112. Hoover KL, Lynch PH, Poirier LA. Profound postinitiation enhancement by short-term severe methionine, choline, vitamine B12 and folate deficiency of hepatocarcinogenesis in F344 rats given a single low-dose diethylnitrosamine injection. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:1327-1336.
113. Chandar N, Lombardi B. Liver cell proliferation and incidence of hepatocellular carcinomas in rats fed consecutively a choline-devoid and a choline-supplemented diet. *Carcinogenesis* 1988;2:259-263.
114. Nakae D, Yoshiji H, Mizumoto Y, et al. High incidence of hepatocellular carcinomas induced by a choline deficient L-amino acid defined diet in rats. *Cancer Res* 1992;5042-5045.
115. Nakae D. Endogenous liver carcinogenesis in the rat. *Pathology International* 1999;49:1028-1042.
116. Poirier L. The role of methionine in carcinogenesis in vivo. *Adv Exp Med Biol* 1986;206:269-282.
117. Lopatina N, Vanyushin B, Cronin G, Poirier L. Elevated expression and altered pattern of activity of DNA methyltransferase in liver tumors of rats fed methyl-deficient diets. *Carcinogenesis* 1998;19:1777-1781.
118. Ghoshal AK, Farber E. Choline deficiency, lipotrope deficiency and the development of liver disease including liver cancer: A new perspective. *Lab Invest* 1993;68:255-260.

119. Henning SM, McKee RW, Swendseid ME. Hepatic content of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and glutathione in rats receiving treatments modulating methyl donor availability. *J Nutr* 1989;119:1478-1482.
120. James S, Yin L. Diet-induced DNA damage and altered nucleotide metabolism in lymphocytes from methyl-donor-deficient rats. *Carcinogenesis* 1989;10:1209-1214.
121. Kennedy S, McConnell S, Anderson H, Kennedy DG, Young PB, Blanchflower WJ. Histopathologic and ultrastructural alterations of white liver disease in sheep experimentally depleted of cobalt. *Vet Pathol* 1997;34:575-584.
122. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:219-225.
123. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003;361:598-604.
124. Namour F, Olivier JL, Abdelmouttaleb I, et al. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2000;97:1092-1098.
125. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999;59:5438-5442.
126. Bachman KE, Herman JG, Corn PG, et al. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloprotease-3 gene suggests a suppressor role in kidneys, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 1999;59:798-802.
127. Graff JR, Greenberg VE, Herman JG, et al. Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998;58(2063-2066).
128. Holmes Z, Regan L, Chilcott I, Cohen H. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. *Br J Haematol* 1999;105(98-101).
129. Surtees R. Demyelination and inborn errors of the single carbon transfer pathway. *Eur J Pediatr* 1998;157:S118-S121.
130. Arinami T, Yamada N, Yamakawa K, Hamaguchi H, Toru M. Methyltetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia / depression. *Am J Med Genet* 1997;74:526-528.
131. Vollset SE, Refsum H, Tverdal A, et al. Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2001;74:130-136.

132. Hoffman DR, Marion DW, Cornatzer WE, Duerre JA. S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine metabolism in isolated liver. *J Biol Chem* 1980;22:10822-10827.
133. Duerre JA, Briske-Anderson M. Effect of adenosine metabolites on methyltransferase reactions in isolated rat livers. *Biochim Biophys Acta* 1981;678:275-282.
134. Dwivedi RS. S-adenosylmethionine synthetase is overexpressed in murine neuroblastoma cells resistant to nucleoside analogue inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase: a novel mechanism of drug resistance. *Cancer Res* 1999;59:1852-1856.
135. Caudill MA, Wang JC, Melnik S, et al. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. *J Nutr* 2001;131:2811-2818.
136. Weir DG, Molloy AM, Keating JN. Correlation of the ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine in the brain and cerebrospinal fluid of the pig. *Clin Sci* 1992;82:93-97.
137. Yi P, Melnik S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine R, James S. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000;275:29318-29323.
138. Scott JM, Molloy AM, Kennedy DG, Kennedy S, Weir DG. Effects of the disruption of transmethylation in the central nervous system: an animal model. *Acta Neurol Scand* 1994;154:27-31.
139. Chen P, Poddar R, Tipa E, Jacobsen D. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues. *Adv Enzyme Regul* 1999;39:93-109.
140. Wang H, Yoshizumi M, Lai K, et al. Inhibition of growth and P21 methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem* 1997;272:25380-25385.
141. Kerins D, Koury MJ, Capdevila A, Rana S, Wagner C. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2001;74:723-729.
142. Adamec E, Vonsattel JP, RA N. DNA strand breaks in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1999;849:67-77.
143. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who

are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:849-853.

144. Durand P, Prost M, Loreau N, Cacan S, Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001;81:645-672.

145. Mattson MP, Kruman I, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing Res Rev* 2002;1:95-111.

146. Giles WH, Croft JB, Greenlund KJ, Ford ES, Kittner SJ. Total homocysteine concentration and the likelihood of nonfatal stroke. *Stroke* 1998;29:2473-2477.

147. Cardo E, Monros E, Colome C, et al. Children with stroke: polymorphism of the MTHFR gene, mild hyperhomocysteinemia, and vitamin status. *J Child Neurol* 2000;15:295-298.

148. Morita H, Kurihara H, Tsubaki S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke in Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1465-1469.

149. Lalouschek W, Aull S, Serles W, et al. Genetic and nongenetic factors influencing plasma homocysteine levels in patients with ischemic cerebrovascular disease and in healthy control subjects. *J Lab Clin Med* 1999;133:575-582.

150. Morita H, Kurihara H, Yoshida S, et al. Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates neointima formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Circulation* 2001;103:133-139.

151. Lentz SR, Erger RA, Dayal S, et al. Folate dependence of hyperhomocysteinemia and vascular dysfunction in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H970 - H975.

152. Girelli D, Friso S, Trabetti E, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease. *Blood* 1999;91:4158-4163.

153. Kluijtmans LA, Whitehead A. Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and predisposition to atherothrombotic disease: evidence that all three MTHFR C677T genotypes confer different levels of risk. *Eur Heart J* 2001;22:294-299.

154. Chen Z, Karaplis A, Ackerman S, et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 2001;10:433-443.

155. Holven KB, Holm T, Aukrust P, et al. Effect of folic acid treatment on endothelium-dependent vasodilatation and nitric oxide-derived end products in hyperhomocysteinemic subjects. *Am J Med* 2001;110:536-542.
156. Chambers JC, Ueland PM, Obeid OA, Wrigley J, Refsum H, Kooner JS. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins. *Circulation* 2000;102:2479-2483.
157. Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Hypomethylation as a cause of homocysteine-induced cell damage in human cell lines. *Toxicology* 2000;147:69-75.
158. Nourhashémi F, Gillette S, Andrieu S, et al. Alzheimer disease: protective factors. *Am J Clin Nutr* 2000;71:643S-649S.
159. Joosten E, Lesaffre E, Riezler R. Is metabolic evidence for vitamin B12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease. *J Gerontol A Bio Sci Med Sci* 1997;52:76-79.
160. Ikeda T, Furukawa Y, Mashimoto S, Takahashi K, Yamada M. Vitamin B12 levels in serum and cerebrospinal fluid of people with Alzheimer's disease. *Acta Psychiatr Scand* 1990;82:327-329.
161. Selhub J, Bagley L, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2000;71:614S-620S.
162. Miller JW. Homocysteine, Alzheimer's disease, and cognitive function. *Nutrition* 2000;16:675-677.
163. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998;55:1449-1455.
164. Riggs KM, Spiro A, Tucker K, Rush D. Relations of vitamin B12, vitamin B6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr* 1996;63:306-314.
165. Kalmijn S, Launer LJ, Lindemans J. Total homocysteine and cognitive decline in a community-based sample of elderly subjects: the Rotterdam Study. *Am J Epidemiol* 1999;150:283-287.
166. Van der Put NM, Blom H. Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. *Eur J Obst & Gynecol* 2000;92:57-61.
167. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJM, Eskes TK. Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 1991;324:199-200.

168. Steen MT, Boddie AM, Fischer AJ. Neural-tube defects are associated with low concentrations of cobalamin (vitamin B12) in amniotic fluid. *Prenat Diagn* 1998;18:545-555.
169. Van der Put NM, Van der Molen, Kluijtmans LA. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *Q J Med* 1997;90:511-517.
170. Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B, A E. Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 1998;157:487-492.
171. O'Leary VB, Dermott AP, Molloy AM, et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome ? *Am J Med Genet* 2002;107:151-155.
172. Hobbs CA, Sherman SL, Ping Y, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;67:623-630.
173. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.
174. Tamaru H, Selker EU. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 2001;414:277-283.
175. Yamada K, Kawata T, Wada M, et al. Extremely low activity of methionine synthase in vitamin B12-deficient rats may be related to effects on coenzyme stabilisation rather than to changes in coenzyme induction. *J Nutr* 2000;130:1894-1900.
176. Gulati S, Brody LC, Barnerjee RV. Posttranscriptional regulation of mammalian methionine synthase by B12. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:436-442.
177. Scott JSD, Treston AM, Bowman EPW, Owens JA, Cooksley WGE. The regulatory roles of liver and kidney in cobalamin metabolism in the rat. *Clin Sci* 1984;67:299-306.
178. Bedossa P, Poynard T, and the METAVIR Cooperative Study group. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *hepatology* 1996;24:289-293.
179. Working party of the world congress of gastroenterology. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology* 1994;22:983-993.

180. Horne DW, Briggs WT. Effects of dietary and nitrous oxide-induced vitamin B12 deficiency on uptake of 5-methyltetrahydrofolate by isolated rats hepatocytes. *J Nutr* 1980;110:223-230.
181. Grasbeck R, Paloheimo M, Kouvonen I. The intrinsic factor receptor is present in the ileum of gastrectomized rats. *Scand J Gastroenterol* 1980;15:449-52.
182. Destri GL, Trombatore G, Greca GL, et al. Total gastrectomy: nutritional status after different reconstruction techniques. An experimental study. *J Surg Oncol* 1992;49:98-102.
183. Wojtyczka A, Gorka Z, Bierzynska-Macyszyn G, Rumenapf G, Jonderko K, Schwille PO. Gastrectomy in the rat using two modifications of esophagojejunal anastomosis. General status, local histological changes and relationships to bone density. *Eur J Surg* 1999;31:497-507.
184. Wojtyczka A, Berge B, Rumenapf G, et al. Gastrectomy osteopenia in the rat: the role of vitamin B12 deficiency and the type of reconstruction of the digestive tract. *Clin Sci* 1998;95:735-744.
185. Owens J, Scott JSD, Cooksley WG. The retention of cobalamin by the liver in the cobalamin-deficient rat. *Clin Sci* 1985;68:553-560.
186. Alpers DH, Russell-Jones GJ. Intrinsic factor, haptocorrin, and their receptor. In: Barnerjee RV, editor. *Chemistry and Biochemistry of B12*. New York: John Wiley & Sons Inc; 1999. p. 411-440.
187. Akesson B, Fehling C, Jagerstad M. Effect of vitamin B12 deficiency on phosphatidylethanolamine methylation in rat liver. *Br J Nutr* 1978;40:521-527.
188. Gulati S, Chen Z, Brody LC, Rosenblatt DS, Barnerjee R. Defects in auxiliary redox proteins lead to functional methionine synthase deficiency. *J Biol Chem* 1997;272:19171-19175.
189. Fonseca V, Guba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocrine Reviews* 1999;20:738-759.
190. Quinlivan EP, Partlin JM, Nulty HM, et al. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. *Lancet* 2002;359:227-228.
191. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:195-201.

192. Anwar W, Gueant JL, Abdelmouttaleb I, et al. Hyperhomocysteinemia is related to residual glomerular filtration and folate, but not to methylenetetrahydrofolate-reductase and methionine synthase polymorphisms, in supplemented end-stage renal disease patients undergoing hemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:747-752.
193. Homocysteine lowering trialists' collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 1998;16:894-898.
194. Bidart JM, Main C, Lazar V, Russo D, Filetti S, Caillou B. Expression of pendrin and the pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2028-2033.
195. Schmutzler C, Winzer R, Meissner-Weigl L, Kohrle J. Retinoic acid increases sodium / iodine symporter mRNA levels in human thyroid cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:832-838.
196. Barbé F, Klein M, Chango A, Weryha G, Nicolas JP, Leclère J. Hypothyroidism increases plasma homocysteine concentrations. *J Endocrinol Invest* 1999;22:28-34.
197. Barbé F, Klein M, Chango A, et al. Homocysteine, folate, vitamine B12 and transcobalamins in patients undergoing successive hypo- and hyperthyroid states. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1845-1846.
198. Mattson PM, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003;26:137-146.
199. Kruman I. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 2000;20:6920-6926.
200. Ho PI. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res* 2002;70:694-702.
201. Henning SM. Vitamins C, E and A and heme oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets. *Free Radic Biol Med* 1997;23:936-942.
202. Seshadri S, Beiser A, Selhub J. Plasma homocystéine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346:476-483.

203. Ho PI. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity, role of oxidative stress. *J Neurochem* 2001;78:249-253.
204. Sai X. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. *J Biol Chem* 2002;277:12915-12920.
205. Nussbaum RL, Christopher EE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003;348:1356-1364.
206. Nishiyama M. Apolipoprotein E, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutation and the risk of senile dementia. *J Epidemiol* 2000;10:163-172.
207. Anello G, Gueant JL, Bosco P, et al. Transcobalamin 777 C->G and methylene tetrahydrofolate 677 C->T combined genetic polymorphisms increase the risk of sporadic Alzheimer's disease. *Soumission* 2003.

ANNEXE

Communications orales

- "Modèle de rats carencés en vitamine B12, B9, méthionine et choline"

Brunaud L, Alberto JM, Gérard P, Guéant JL

Faculté de médecine Nancy. Septembre 1999

- "Carence en coenzymes B12 et B9 et méthylation de l'ADN"

Guéant JL, Brunaud L

Cours "Vitamines et oligoéléments"

DU de Diététique et de Nutrition Clinique et Thérapeutique – Université Paris VII /

Faculté de Médecine Xavier Bichat 2001

- "Increased homocysteine and genetic determinants of vitamin B12 in neurological disorders"

Guéant JL, Guéant-Rodriguez RL, Brunaud L, Romano A, Anello G, Bosco P, Romano C, Ferri R, Namour B.

3rd Conference on Hyperhomocysteinemia

Saarland University, Saarbrücken, 11-12 Avril 2003

- "Enhancing NIS expression and iodine symporter redifferentiation in thyroid cancer cell lines with TSA"

Zarnegar R, Brunaud L, Wong M, Duh QY, Clark OH

Grand rounds on Endocrine Surgery. UCSF / Parnassus

San Francisco USA, 19 Decembre 2001

- "Increasing the effectiveness of radioactive iodine therapy in the treatment of thyroid cancer using Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor"

Zarnegar R, Brunaud L, Kanauchi H, Wong M, Fung M, Ginzinger D, Duh QY, Clark OH

American Association of Endocrine Surgeons

Awarded best communication of 2002 AAES meeting

23rd Annual meeting; Banff, Alberta, Canada, 6 – 9 Avril 2002

Articles

1- "Blood vitamin B12 is a determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats"

Laurent Brunaud, Jean-Marc Alberto, Ahmet Ayav, Philippe Gérard, Farès Namour, Laurent Antunes, Marc Braun, Jean-Pierre Bronowicki, Laurent Bresler, Jean-Louis Guéant

Soumission Février 2003

2- "Effects of vitamin B12 and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver."

Laurent Brunaud^{1,2,3}, Jean-Marc Alberto¹, Ahmet Ayav^{1,2,3}, Philippe Gérard¹, Farès Namour¹, Laurent Antunes¹, Marc Braun⁴, Jean-Pierre Bronowicki¹, Laurent Bresler³, Jean-Louis Guéant¹

Clin Chem Lab Med (accepté le 7 mars 2003)

3- "Increasing the effectiveness of radioactive iodine therapy in the treatment of thyroid cancer using Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor"

Zarnegar R, Brunaud L, Kanauchi H, Wong M, Fung M, Ginzinger D, Duh QY, Clark OH

Surgery 2002; 132(6):984-990

4- "Increased homocysteine and genetic determinants of vitamin B12 in neurological disorders"

Guéant JL, Guéant-Rodriguez RL, Brunaud L, Romano A, Anello G, Bosco P, Romano C, Ferri R, Namour B.

Soumission Mars 2003

Article 1 soumis : "Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and liver DNA hypomethylation in rats."

TITLE PAGE: Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and liver DNA hypomethylation in rats.

Running title: Methionine synthase and vitamin B12

Authors: Laurent Brunaud^{1,2,3*}, Jean-Marc Alberto^{1*}, Ahmet Ayav^{1,2,3}, Philippe Gérard¹, Farès Namour¹, Laurent Antunes¹, Marc Braun⁴, Jean-Pierre Bronowicki¹, Laurent Bresler³, Jean-Louis Guéant^{1†}

* The two first authors contributed equally to this work

1. Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, EMI – INSERM 0014 – URM IFREMER 20, Faculté de Médecine BP 184, 54500, Vandoeuvre lès Nancy, France.
2. Department of Experimental Surgery - Faculté de Médecine BP 184, 54500, Vandoeuvre lès Nancy, France
3. Department of Digestive and Visceral Surgery – CHU Nancy-Brabois – Rue du Morvan – 54500 Vandoeuvre lès Nancy, France
4. Department of Radiology – CHU Nancy-Central – 54000 Nancy, France

† To whom correspondence should be sent :

Professor J.L. Guéant - Laboratory of Cell and Molecular Pathology in Nutrition.

INSERM EMI 0014 Medical Faculty - University of Nancy I

54505 Vandoeuvre les Nancy cedex – France / Tel : 03.83.15.44.84

Fax : 03.83.15.35.91 / e.mail : Jean-Louis.Gueant@medecine.uhp-nancy.fr

or jl.gueant@chu-nancy.fr

ABSTRACT

Background / aims: The influence of vitamin B12 deficiency on methionine MTR activity and transcription, and on DNA methylation is not clearly established. The aim of this study was to assess the respective influence of folate and vitamin B12 deficiency on MTR activity and transcription, and on DNA methylation.

Methods: Sixty one rats were administered normal diet or diet deficient in choline, methionine, folate and vitamin B12. Forty seven of them underwent total gastrectomy or ileal resection.

Results: Low vitamin B12 was observed only in gastrectomized rats and low folate in rats under deficient diet. Total MTR activity (holo + apoenzyme) was lowered only with vitamin B12 level below 200 pmol/L ($P=0.0002$), while the ratios of total vs holo MTR activity and of transcripts MTR vs GAPDH (RT-PCR) were unchanged. Vitamin B12 was the single determinant of low MTR (lower quartile, Odds ratio = 15.75, $P = 0.0017$). Low MTR and low vitamin B12 were the two determinants of DNA hypomethylation (lower quartile, Odds ratio = 17.07, $P = 0.0006$ and Odds ratio = 7.31, $P = 0.006$, respectively).

Conclusion: Vitamin B12 influences MTR expression by a non-transcriptional mechanism different from an effect on proteolysis and is a strong determinant of DNA hypomethylation.

Key words: Vitamin B12, methionine synthase, DNA methylation, rats

INTRODUCTION

Methionine synthase (MTR) plays a key role in homocysteine metabolism, as it catalyzes the synthesis of methionine by transmethylation of homocysteine in the presence of methyltetrahydrofolate (coenzyme B9) and methylcobalamin (coenzyme B12) [1-3]. A defect of this enzyme causes hyperhomocysteinemia which is believed to be a risk factor for cardiovascular disease, neural tube defects, neurodegenerative diseases [2, 4, 5], and digestive carcinogenesis [6-11]. Methionine is the precursor of S-adenosyl methionine, the substrate of DNA methyltransferases. DNA methylation is one of the mechanisms involved in the regulation of gene transcription, through the binding of specific proteins to the methylated DNA sequences. This causes changes in the chromatin structure, making the DNA less accessible and preventing active functional transcription [1]. Relation between the nutritional determinants of MTR activity, vitamin B12 and folates, and the expression and activity of this enzyme is not well understood. Some experimental data from vitamin B12 deficient rats suggest that vitamin B12 has an effect on MTR activity at a post-translational level by protecting the enzyme from proteolysis [12] while others, using various cell lines, conclude that vitamin B12 enhances MTR by another, still unknown, post-transcriptional mechanism [13]. However, the respective or combined in vivo effects of vitamin B12 and/or folate deficiency and of DNA hypomethylation on the expression of MTR is not known. In contrast to folate deficiency, severe cobalamin deficiency in rats can be reached by a total gastrectomy rather than by a single deficient diet while it can be obtained by total gastrectomy [14]. Indeed, vitamin assimilation requires its binding to gastric intrinsic factor and the subsequent ileal uptake of vitamin B12-intrinsic factor complex by a receptor mediated endocytosis [15].

In this study, we have evaluated the respective influence of folate and vitamin B12 deficiencies on MTR transcription and activity, and on DNA methylation. This was done by administering over an 18-month period, a deficient diet in choline, methionine, vitamin B12 and folate in non-operated and in gastrectomized F 344 Fischer rats with and without ileal resection.

METHODS

Animals - Fifteen-week-old male Fischer F 344 rats were purchased (Iffa Credo, L'arbresle, France). The rats were housed 1 per cage in plastic cages throughout the study at a room temperature of $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, under a 12-h light / 12-h dark cycle. Free access to water was allowed. Standards for use of laboratory animals established by the Institute of Laboratory Animal Resources, U.S. National Academy of Sciences were followed.

Diet - A methyl group-deficient diet (MD) and a methyl group-adequate diet (MA) were used. MD diet corresponded to that previously described [16] and was specially prepared by Pietrement (Pietrement, Troyes, France). It consisted of a diet with methionine-free amino acid mix and vitamin mix free of choline, folic acid and vitamin B12. MA diet was a complete standard diet (M20 diet, Pietrement, Troyes, France).

Feeding and surgical protocol - All rats were fed MA diet one week before starting the experiment. Animals were then allocated to the study groups defined below. Total gastrectomy (TG) and ileum resection (IR) were performed in 20 rats. Among them 12 rats were fed with MD diet (group 1) and 8 rats with MA diet (group 2). Total gastrectomy alone was performed in group 3 ($n=7$) and all these rats were fed with MA diet. Ileum resection alone was performed in group 4 ($n=20$) and all these rats were fed with MA diet. Non operated rats with MD diet and MA diet defined group 5 ($n=7$) and 6 ($n=7$) respectively.

Surgery was performed under anesthesia by intraperitoneal injection of ketamin 25 mg/kg (Pfizer, USA). After a midline laparotomy, the stomach was excised together with a 1 mm cuff of oesophagus and a 1 mm cuff of duodenum. An end-to-end anastomosis between oesophagus and duodenum was performed with 8/0 surgipro (USSC, USA) under binocular glasses (x 4) (Zeiss, Germany). Distal small bowel resection was performed with mean 7.4 ± 0.4 cm length from the caecum. End-to-end anastomosis was performed with 8/0 surgipro (USSC, USA) under binocular glasses (x 4) (Zeiss, Germany). Body weights and blood samples were checked the first day of the study and at 1, 4, 6, 9, 12 and 18 months. Blood samples were collected from living, anesthetized animals by arteria caudalis mediana puncture. All rats were followed until their death and no sacrifice was performed. Overall survival

was assessed in each group. The autopsy was performed immediately after death. The liver was harvested and stored at -80°C.

Fecal [⁵⁷Co]-cobalamin excretion test - Fourteen rats from group 1 (TG + IR) and all rats from group 4 and 5 (n=14) were selected for a fecal [⁵⁷Co]-cobalamin excretion test. This test was performed 1 month after the onset of the study. [⁵⁷Co]-cobalamin was purchased from ICN Pharmaceuticals, USA (Kit n°90697.3-7). Selected rats were fed with one dose of 20 microL of [⁵⁷Co]-cobalamin (0.7 10⁻⁹ gr at 7.4 kiloBecq). Diets were not modified during the test. After oral ingestion of labeled cobalamin, feces were closely collected and cumulative activity was measured at 24h, 48h, 72h and 144 h.

Assays of vitamin B12, Folate and Homocysteine - Each blood sample was collected on EDTA and then centrifuged for 10 min at 3000 rpm. Aliquots of plasma were stored frozen at -80°C until analysis. Cobalamin and folate plasmatic levels were determined by radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB, ICN Pharmaceuticals, USA). Liver vitamin B12 levels were evaluated using the same method. Homocysteine level was determined by fluorescent polarization immunoassay (IMX system Abbott, Norway).

Methionine synthase activity - Liver cells were homogenized on ice in 9 vol. of potassium phosphate (100 mmol/L) buffer, pH 7.4 and centrifuged for 20 min at 48000 g, 4 °C. MTR activity was determined as described previously [17]. Aliquots of supernatant were incubated in 100 microL of substrate mixture containing Potassium buffer 100 mmol/L, pH 7.4 , 0.5 mmol/L, homocysteine (prepared daily from its thiolactone derivative – Sigma Aldrich, USA) , 0.5 mmol/L S-Adenosyl-Methionine, 0.02mM (Biolabs inc, Canada), 25 mmol/L DTT (dithiotreitol) (Sigma Aldrich, USA), 0.25 microCi [¹⁴ C] -5 Methyl- tetrahydrofolic acid (44 micromol/Ci) (Amersham – Pharmacia, USA), 50 micromol/L Methylcobalamin (Sigma Aldrich, USA). This mixture was incubated during 60 min / 37°C in an anaerobic chamber in which atmosphere had been exchanged for nitrogen. All stock reagent solutions were made anaerobic by bubbling under nitrogen through them for at least 30 min. The assay mixture was cooled on ice and then passed through a column of AG1x8 (chloride form, Bio-rad, USA). The column was washed with 3 mL of water and the eluted

fractions were collected in scintillation vials. A scintillation fluid (picofluor, Packard, USA) (16 mL) was added to the aqueous samples prior β -counting. Enzyme activity (EC 2.1.1.13) was expressed as nanomoles of product formed per hour and per mg of protein. The protein concentration of liver homogenates was estimated by BCA assay (Pierce, Rockford, USA).

Semi-quantification of methionine synthase and glyceraldehyde phosphate deshydrogenase RNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction -

Total RNA was extracted from liver frozen in liquid nitrogen, using Trizol reagent (Gibco BRL, USA), and quantified by UV-spectrophotometry at 260 and 280 nm. The incubation mixture of the reverse transcription (20 microL total volume) contained 2 microg total RNA, 2 microL DTT 0.1 mol/L (purchased with enzyme), 8 microL dTNP 1.25 mmol/L (dTNP mix 10 mmol/L, Sigma Aldrich, USA), 2 microL of a hexanucleotide mix 10 X (Boehringer Mannheim, Meylan, France). Then 200 units M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL, USA) and 0.5 microL RNase inhibitor (RNA guard[®], Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) were added after 3 min heating at 65°C. Reverse transcription was performed at 38° C for 1 hour and stopped at 95° C for 5 min. PCR was carried out with 2 microL of reverse transcription product, 6 microL dNTP 1.25 mmol/L, 1.5 microL primers 12 micromol/L, 1.25 U Taq DNA polymerase (AmpliTaq[®] DNA Polymerase, Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, USA) in 50 microL final volume. The reaction mixture was heated at 94° C for 5 min, then the 30 PCR cycles were performed with denaturation at 94°C for 30 s, hybridation at 50.9°C for 30 s and elongation at 72° C for 20 s. For MTR transcript amplification, sens primer was 5' CAG ATA TAA TTG GCT TGT CAG GAC 3', antisens primer was 5' TTT CAT CTA ACA GCT GAG AAC ACA C 3'. For glyceraldehyde phosphate deshydrogenase transcript amplification (reference transcription level), sens primer was 5' TCA TTG ACC TCA ACT ACA TGG TCT A 3', antisens primer 5' CCA GTA GAC TCC ACG ACA TAC TCA G 3'. Amplifications were made in triplicate on a Gene Amp[®] 2400 thermocycler (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, USA). Amplification products were visualized under ultraviolet light after agarose/ethidium bromide electrophoresis. Quantification of gel bands was performed on a Bio-Rad Multi-AnalystTM/PC version 1.1. Molecular weights marker was ϕ X174/HaeIII DNA ladder (Sigma Aldrich, USA).

Global DNA methylation - Liver cells were mashed on liquid nitrogen. Pellets were added with 1mL TBS (tris buffered saline) mixed with 1mL lysis buffer (Perkin-Elmer, USA). Mixture was incubated with 55000 units RNase A (Sigma Aldrich, USA) during 2 hours at room temperature and then overnight with 40 units proteinase K (Life technologies, USA) at 65 °C. A solution was prepared with phenol (Fluka, USA) 70%, pH 8.0 / chloroform. Two mL of this last solution were added with 2mL of the mixture. Centrifugation 5000 g / 20 min / 4°C. Aqueous phase was precipitated overnight with 3 mol/L sodium acetate, pH 5.5 (10%) / 2 volumes cold isopropanol (-20°C). DNA was resuspended with sterile Tris – EDTA. DNA concentration was evaluated with spectrophotometer (260 nm), with a 260 nm / 280 nm ratio at least > 1.8. DNA length was measured and had to be > 20 kbp. DNA methylation in vitro : Two microg DNA were incubated with [³H]-methyl-S-Adenosyl-Methionine, 5 microCi (Amersham pharmacia, USA), 4 units Sss 1 methylase (Biolabs inc, Canada), 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCL, 10 mmol/L MgCl₂ and 1 mmol/L DTT, pH 8, in a final volume of 50 microL, during 3 hours at 37 °C. Samples were placed on a paper Whatman DE-81 (Fischer scientific, USA). Washed and dried paper disks were placed in polyethylene vials containing 10 mL picofluor scintillation fluid (packard, USA). Beta-counting of radiolabelled DNA corresponded to methyl transfer on CpG islands.

Statistical analyses - Statistical analyses were performed using Statview (Abacus concepts, Berkeley, USA). Mann-Whitney-U test was used to evaluate differences between continuous variables. All values were expressed as either mean $\pm$ standard error or median and quartiles. Correlations were evaluated using univariate Spearman rank-correlation and multivariate regression analysis. Evaluation of odds ratio was performed by logistic regression analysis. Statistical significance was considered for P values < 0.05.

RESULTS

Gastrectomy was efficient in impairing vitamin B12 assimilation as cumulative excretion of fecal [^{57}Co]-cobalamin was more important in group 1 rats (TG+IR) than in non operated rats, at 72 and 144 hours after ingestion ($P = 0.006$) (figure 1).

Gastrectomized rats (group 1, 2 and 3) underwent a weight loss after one month delay but their weight was stabilized later ($P < 0.001$). The MA and MD diets had no effect on the weight of the gastrectomized rats while rats from group 5 (MD diet without gastrectomy) had a mild weight loss ($P < 0.01$) after 6 months. Compared to controls (group 6 - MA diet), vitamin B12 plasmatic levels were dramatically lowered in the 3 groups of gastrectomized rats, after 1 month delay ($P < 0.001$). No statistical differences was found between these 3 groups. No decrease of vitamin B12 plasmatic level was found in group 4 (MA diet / IR) (figure 2). Finally, a 200 pmol/L threshold value of vitamin B12 was defined as the superior limit that included only rats belonging to the group 1, 2 and 3 (gastrectomized rats). In contrast to what observed for vitamin B12, total gastrectomy had no dramatic effect on folate blood level (figure 2). Indeed, folate was significantly lowered only in rats fed with deficient diet (group 1 and 5). In addition, this difference was also noticed between the gastrectomized rats with and without the deficient diet ($P < 0.01$) (figure 2). Similarly to vitamin B12, we defined a threshold value of 20 nmol/L which corresponded to the limit including only rats from the group 1 and 5 (deficient diet).

We also determined liver vitamin B12 levels and found similar variations than those observed with vitamin B12 plasma levels in different groups. Mean liver vitamin B12 was significantly lower in gastrectomized rats than in controls, with mean respective values of 93 ± 12 fmol / mg and 533 ± 24 fmol / mg ($P=0.001$). The decrease was in the same order of magnitude than plasma B12 levels and a significant correlation was found between both markers ($R=0.79$, $P=0.0006$). Homocysteine plasma level was significantly increased in the groups which had a low blood folate level (group 1 and 5), independently of the surgical procedure (figure 2). Homocysteine level was negatively correlated with blood folate using multivariate regression analysis of log-transformed parameters ($P < 0.0001$). In fact, this negative correlation was significant only in MD diet rats (group 1 and 5) ($P = 0.0005$), but not in MA diet rats (groups 2, 3, 4 and 6).

No difference of MTR activity was found in rats with folate plasmatic level lower than 20 nmol/L (group 1 and 5). In contrast, MTR activity was significantly lowered in rats with vitamin B12 plasmatic level below 200 pmol/L (groups 1, 2 and 3) ($P = 0.002$) (figure 3). MTR gene transcription, estimated by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, was not depending on blood vitamin B12 levels (figure 4). The ratio of cDNA amplified from MTR / glyceraldehyde phosphate deshydrogenase RNA was estimated respectively at 0.73 ± 0.22 and 0.80 ± 0.33 in liver extracts from rats with blood vitamin B12 higher and lower than 200 pmol/L, respectively ($P = 0.42$). A post-transcriptional effect of vitamin B12 was evidenced by considering the ratio "total MTR activity vs ratio of cDNA" (figure 4). This ratio was 2.3 –fold higher in liver extracts from rats with vitamin B12 > 200 pmol/L, compared to those of rats with B12 deficiency, with respective values of 0.28 ± 0.15 and 0.12 ± 0.03 ($P=0.0013$). This was not due to a protective effect of MTR binding to vitamin B12 for preventing the proteolysis as we found no difference in saturation of the enzyme by vitamin B12. Indeed, the ratio of MTR activity determined without vs with addition of vitamin B12 in the assay was respectively estimated to 0.52 ± 0.34 and to 0.71 ± 0.25 , in rats with a vitamin B12 level lower and higher than 200 pmol/L ($P=0.385$).

Global DNA methylation was significantly lowered in rats with vitamin B12 plasmatic level lower than 200 pmol/L ($P = 0.001$) (figure 3). These rats were the same than those with low MTR activity (figure 3). In addition, MTR activity was significantly lower in liver extracts with hypomethylated DNA ($<$ lower quartile), compared with other extracts, with respective values of 0.11 ± 0.06 and 0.27 ± 0.19 ($P=0.0006$). There was a significant correlation between DNA methylation and MTR total activity in univariate Spearman rank-correlation analysis ($Rho = - 0.316$, $P=0.03$). DNA methylation was also significantly lowered in rats with folate plasmatic level lower than 20 nmol/L ($P = 0.009$).

We evaluated by multiple regression analysis the relations between DNA methylation, MTR and its coenzymes. Vitamin B12, but not folate, was correlated with MTR activity ($P = 0.0279$). Homocysteine level was weakly correlated with MTR activity ($P = 0.049$) but not with DNA methylation. There was a significant correlation between DNA methylation and either vitamin B12 ($P = 0.0096$) or folate ($P = 0.0104$)

plasmatic levels. We investigated the determinants of homocysteine plasma level (upper quartile), decreased liver methionine synthase activity (lower quartile) and DNA hypomethylation by logistic regression analysis, considering respective threshold values of vitamin B12 and folate at 200 pmol/l and 20 nmol/l. Low blood folate level was the single independent determinant of hyperhomocysteinemia, with an odds ratio as high as 20.78 (Table 1). In contrast, vitamin B12 was the single independent determinant of low liver MTR activity. Finally, low MTR activity and low vitamin B12 were the two determinants of hypomethylation, with respective odds ratio of 17.07 and 7.31 (Table 1).

DISCUSSION

Vitamin B12-deficient living animals are useful for elucidating physiologic functions of vitamin B12 [12]. Disappearance of gastric intrinsic factor after total gastrectomy is known to lead to vitamin B12 deficiency by decreasing vitamin B12 absorption, in the rat [18-21]. We observed a dramatic decrease of blood vitamin B12 in the first postoperative month in gastrectomized rats, while ileal resection alone had no effect on vitamin B12 status. This suggested that IF-cobalamin receptor expression was not restricted to the ileum in rats [22]. No change of vitamin B12 plasma level was observed in MD diet fed rats. This emphasizes that a vitamin B12-free diet cannot be considered efficient enough to provide a severe and permanent vitamin B12 deficiency in rats [19, 23]. It is therefore likely that coprophagy provides enough vitamin B12, even when the vitamin B12 diet is restricted. A reduced folate absorption due to gastrectomy was unlikely in our study since we found no effect of gastrectomy on blood folate (figures 2). Finally, our model combining total gastrectomy and MD diet was efficient to reach a combined vitamin B12 and folate deficiency, in order to evaluate the respective influence of folate and vitamin B12 deficiency on transcription and activity of MTR and on DNA methylation.

Our results showed a decrease of both total (apo + holoenzyme) and holo MTR activity in B12 deficient rats. Vitamin B12 had no effect on MTR transcription, as previously reported in 5 cell lines, including HepG2, a human hepatocarcinoma cell line [13]. We observed a significant positive correlation between vitamin B12, but not folate plasma level, and total MTR activity. In addition, low vitamin B12 was the single independent determinant of the low MTR activity (table 1). MTR in rat liver is thought to be stabilized by forming a complex with methyl-cobalamin [12, 13], although different results were obtained by studying the effect of B12 supplementation in cell culture. According to this hypothesis, stabilization of the enzyme by coenzyme binding would be less prominent when vitamin B12 level is low (<200 pmol/L), leading to an increase of apo-enzyme degradation. Presently, this hypothesis was unlikely as there was no significant difference of saturation of methionine synthase between rats with vitamin B12 lower and higher than 200 pmol/L, respectively. Indeed, the addition of vitamin B12 in the assay of MTR activity increased this activity by the same order of magnitude, in rats either deficient or not

in vitamin B12. These results were not due to an artefactual overestimation of apo-MTR as we performed the assay in strict anaerobic conditions, as previously recommended [17]. In addition, we observed similar ratio of holo MTR vs total MTR than those previously reported in various cell lines by Gulati et al. [13]. In contrast, Yamada et al. found no difference of MTR activity by adding or not vitamin B12 in the assay [12]. They concluded that liver MTR was always saturated by vitamin B12, whatever the status of vitamin B12 in rats submitted to a deficient diet. In fact, it may be hypothesized that the use of a potent oxido-reductive agent, DTT, produces an MTR activity corresponding to apo and holo MTR, even in absence of the co-factor vitamin B12. Our data suggest therefore that the *in vivo* effect of vitamin B12 deficiency on MTR expression is rather related to an unknown mechanism at a post-transcriptional level, as previously described *in vitro*, with cell lines supplemented with vitamin B12 [13]. The post-transcriptional decreased level of MTR in vitamin B12 deficient rats could depend on one or several genes, regulated by vitamin B12 itself [13] and/or by DNA hypomethylation, considering that vitamin B12 deficiency was a potent determinant of this hypomethylation. Such a hypothesis should be considered since DNA hypomethylation was correlated to MTR activity, in univariate analysis.

Elevated levels of homocysteine is a risk for cardiovascular diseases and neural tube defects [5, 24]. This points out the importance of evaluating the respective impact of cofactors regulating the activities of enzymes involved in the transmethylation of homocysteine. We showed that vitamin B12 was a weaker determinant than folate for increased homocysteine level, as found in clinical studies [25]. This was also in agreement with a recent clinical study which established that after folic acid supplementation, the usual dependency of homocysteine on folate diminished, while vitamin B12 became the main determinant of plasma homocysteine concentration [26]. Surprisingly, MTR activity was not a determinant of homocysteine level. High affinity of vitamin B12 for MTR may prevent the desaturation of the enzyme, limiting the consequences of vitamin deficiency [2]. This may explain that, in our study, MTR activity was decreased only in case of severe vitamin B12 deficiency, e.g. in gastrectomized rats. This is emphasized by the fact that MTR 2756 GG mutated genotype has no significant effect on homocysteine level in humans, contrarily to methylene-tetrahydrofolate reductase 677 TT genotype [27-29].

Results from previous studies in rodents suggested that folate deficiency caused DNA strand breaks and hypomethylation while the effect of vitamin B12 deficiency was not clearly evidenced [30]. Presently, we found that low vitamin B12 and low MTR activity were two independent determinants of DNA global hypomethylation. Furthermore, the positive correlation between MTR activity and DNA methylation was found only in the subset of rats with low vitamin B12 plasmatic level. This suggests that MTR is a limiting determinant of DNA methylation only when its expression and activity are decreased, e.g. when a vitamin B12 deficiency occurs. Finally, our and previous results suggest that the diet supplementation used to prevent DNA hypomethylation should systematically include vitamin B12, in addition to folic acid, even if its effect in lowering homocysteinemia has not been evidenced [31]. Indeed, vitamin B12 supplementation would not only prevent vitamin B12 deficiency but also increase the expression level of MTR by the post-transcriptional effect already described by Gulati et al [13].

In conclusion, low blood folate is the main determinant of hyperhomocysteinemia, while low vitamin B12 is the main determinant of MTR activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats. Vitamin B12 affects MTR expression by a non-transcriptional mechanism different from a protective effect on MTR proteolysis.

REFERENCES

1. Bestor TH. Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* 1998;393:311-312.
2. Barnerjee RV, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J* 1990;4:1450-1459.
3. Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science* 1980;210:604-610.
4. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-128.
5. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJM, Eskes TK. Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 1991;324:199-200.
6. Nakayama H, Kajikawa S, Shinozuka J, Su WP, Doi K. Possible involvement of DNA methylation in 5-azacytidine-induced neuronal cell apoptosis. *Histol Histopathol* 1999;14:143-150.
7. Mikol YB, Hoover KL, Creasia D, Poirier LA. Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1983;4:1619-1629.
8. Hoover KL, Lynch PH, Poirier LA. Profound postinitiation enhancement by short-term severe methionine, choline, vitamin B12 and folate deficiency of hepatocarcinogenesis in F344 rats given a single low-dose diethylnitrosamine injection. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:1327-1336.
9. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Ito F, Ohe M, Imai K, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999;59:5438-5442.
10. Zapizek WF, Cronin GM, Lyn-Cook BD, Poirier LA. The onset of oncogene hypomethylation in the livers of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1992;13:1869-1872.
11. Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 1992;52:2071s-2077s.
12. Yamada K, Kawata T, Wada M, Isshiki T, Onoda J, Kawanishi T, et al. Extremely low activity of methionine synthase in vitamin B12-deficient rats may be related to effects on coenzyme stabilisation rather than to changes in coenzyme induction. *J Nutr* 2000;130:1894-1900.

13. Gulati S, Brody LC, Barnerjee RV. Posttranscriptional regulation of mammalian methionine synthase by B12. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:436-442.
14. Scott JDS, Treston AM, Bowman EPW, Owens JA, Cooksley WGE. The regulatory roles of liver and kidney in cobalamin metabolism in the rat. *Clin Sci* 1984;67:299-306.
15. Guéant JL, Namour F. Vitamin B12: Absorption, metabolism and deficiency. In: L.R. Johnson, D.H. Alpers, editors. *Encyclopedia of Gastroenterology*. New York: Academic Press; 2003.
16. Linnel JC, Wilson MJ, Mikol YB, Poirier LA. Tissue distribution of methylcobalamin in rats fed amino acid-defined, methyl-deficient diets. *J Nutr* 1983;113:124-130.
17. Gulati S, Chen Z, Brody LC, Rosenblatt DS, Barnerjee RV. Defects in auxiliary redox proteins lead to functional methionine synthase deficiency. *J Biol Chem* 1997;272:19171-19175.
18. Wojtyczka A, Berge B, Rumenapf G, Schwille PO, Ballanti P, Schreibe M, et al. Gastrectomy osteopenia in the rat: the role of vitamin B12 deficiency and the type of reconstruction of the digestive tract. *Clin Sci* 1998;95:735-744.
19. Owens J, Scott JSD, Cooksley WG. The retention of cobalamin by the liver in the cobalamin-deficient rat. *Clin Sci* 1985;68:553-560.
20. Grasbeck R, Paloheimo M, Kouvonen I. The intrinsic factor receptor is present in the ileum of gastrectomized rats. *Scand J Gastroenterol* 1980;15:449-52.
21. Scalabrino G, Buccellato F, Tredici G, Morabito A, Lorenzini EC, Allen RH, et al. Enhanced levels of biochemical markers for cobalamin deficiency in totally gastrectomized rats: uncoupling of the enhancement from the severity of spongy vacuolation in spinal cord. *Exp Neurol* 1997;144:258-265.
22. Alpers DH, Russell-Jones GJ. Intrinsic factor, haptocorrin, and their receptor. In: R.V. Barnerjee, editor. *Chemistry and Biochemistry of B12*. New York: John Wiley & Sons Inc; 1999. p. 411-440.
23. Akesson B, Fehling C, Jagerstad M. Effect of vitamin B12 deficiency on phosphatidylethanolamine methylation in rat liver. *Br J Nutr* 1978;40:521-527.
24. Durand P, Prost M, Loreau N, Cacan S, Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001;81:645-672.

25. Fonseca V, Guba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocrine Reviews* 1999;20:738-759.
26. Quinlivan EP, Partlin JM, Nulty HM, Ward M, Strain JJ, Weir DG, et al. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. *Lancet* 2002;359:227-228.
27. Anwar W, Gueant JL, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Gerard P, Lemoel G, et al. Hyperhomocysteinemia is related to residual glomerular filtration and folate, but not to methylenetetrahydrofolate-reductase and methionine synthase polymorphisms, in supplemented end-stage renal disease patients undergoing hemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:747-752.
28. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:825-829.
29. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:195-201.
30. Fenech M. The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 2001;475:57-67.
31. Homocysteine lowering trialists' collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 1998;16:894-898.

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Figure 1. Cumulative percentage of fecal excretion of [^{57}Co]-cobalamin in 14 non-operated rats and in 14 rats that underwent total gastrectomy and ileal resection (TG + IR).

Figure 2. Plasma level at death (box plots: median, quartiles and extreme values) of homocysteine, folate and vitamin B12 of operated and non-operated rats fed with either an adequate or a deficient diet. Group 1 : methyldeficient diet, gastrectomy and ileal resection ; group 2 : normal diet, gastrectomy and ileal resection ; group 3 : normal diet and gastrectomy ; group 4 : normal diet and ileal resection ; group 5 : methyl deficient diet ; group 6 : normal diet. Top : Box plot of homocysteine ; middle : Box plot of folate ; bottom : Box plot of vitamin B12

Figure 3. Effect of vitamin B12 deficiency on liver methionine synthase activity and on DNA methylation. 3A: Methionine synthase activity in rats with vitamin B12 plasma levels under and above 200 pmol/L ; 3B: DNA methylation in rats with vitamin B12 plasma levels under and above 200 pmol/L.

Figure 4. Relation between methionine synthase activity (ln MTR) and MTR transcription (determined by cDNA ratio of RT-PCR of MTR vs GAPDH transcripts), in 7 gastrectomized rats with vitamin B12 deficiency and 13 non-operated rats with a vitamin B12 blood level higher than 200 pmol/L. The activity of MTR was significantly higher in non-deficient rats, independently of the MTR transcription level, which was in the same order of magnitude in both groups.

Table 1 : Determinants of hyperhomocysteinemia (upper quartile, > 18.7 micromol/L), decreased liver holo-methionine synthase activity (lower quartile < 0.1 UI/mg protein) and DNA hypomethylation (lower quartile) in rats deficient in vitamin B12 (< 200 pmol/L) or folate (< 20 nmol/L).

Figure 1

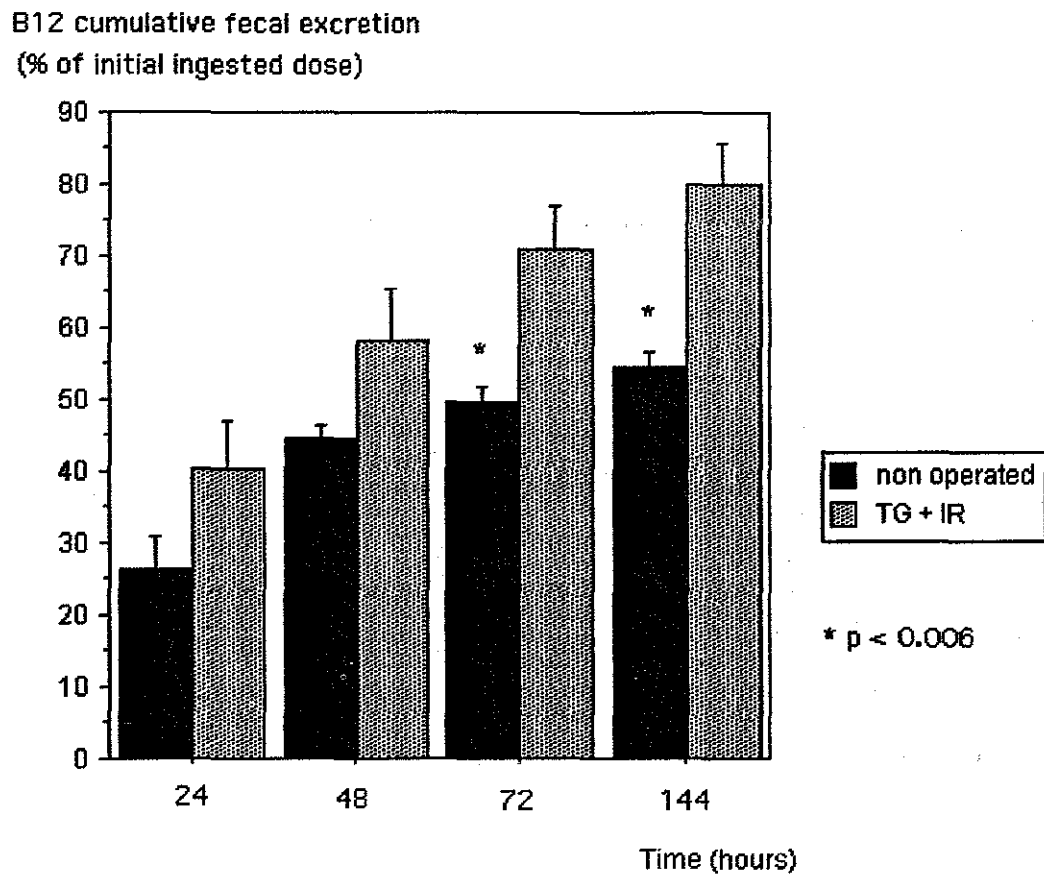


Figure 2

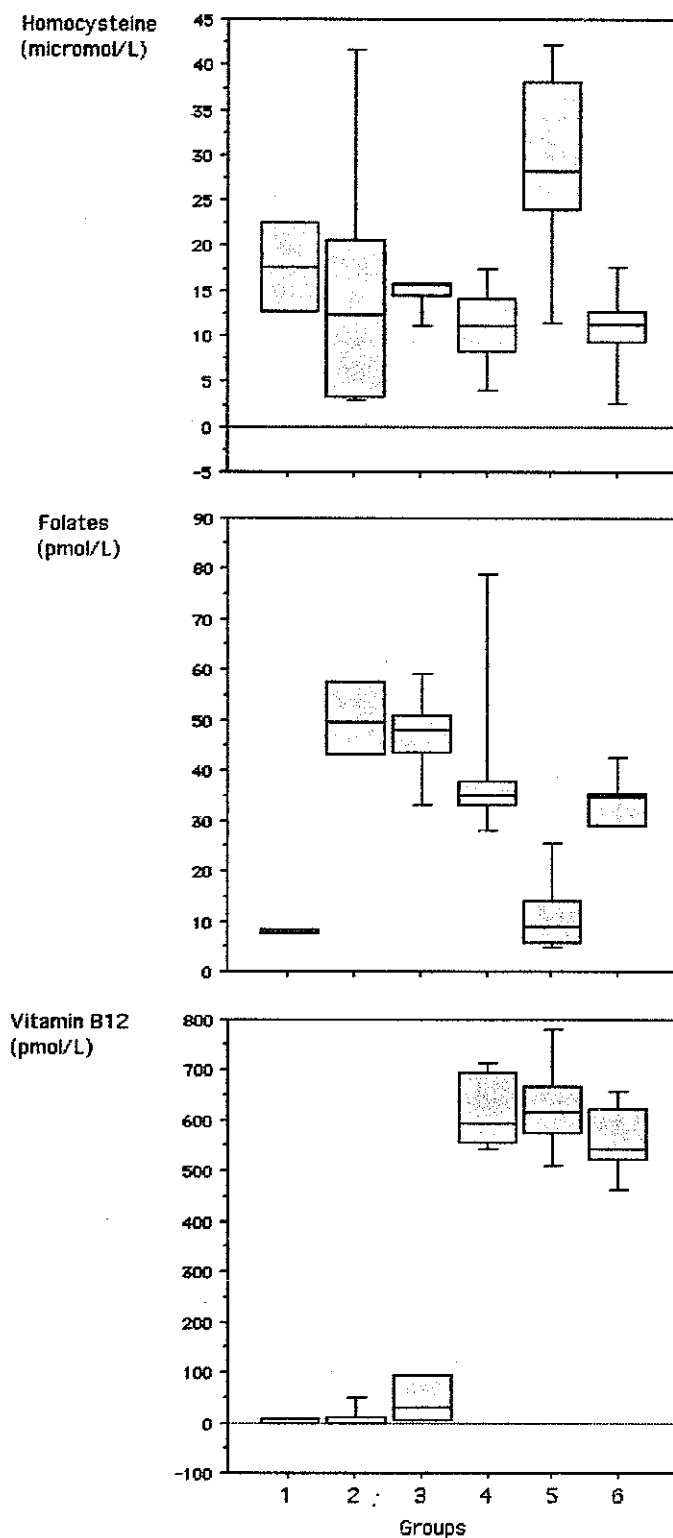
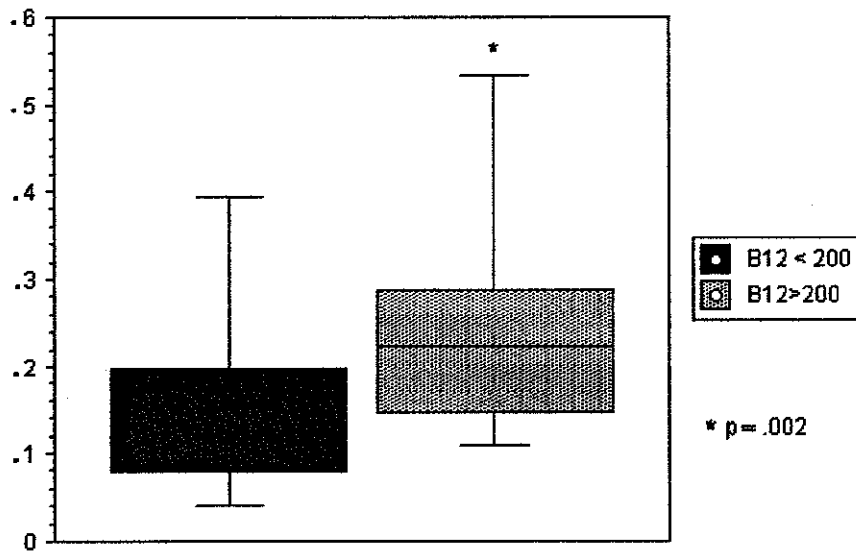


Figure 3 (A and B)

Methionine synthase activity
(nmol/h/mg)



DNA Methylation
(radiolabelled DNA - counts/time)

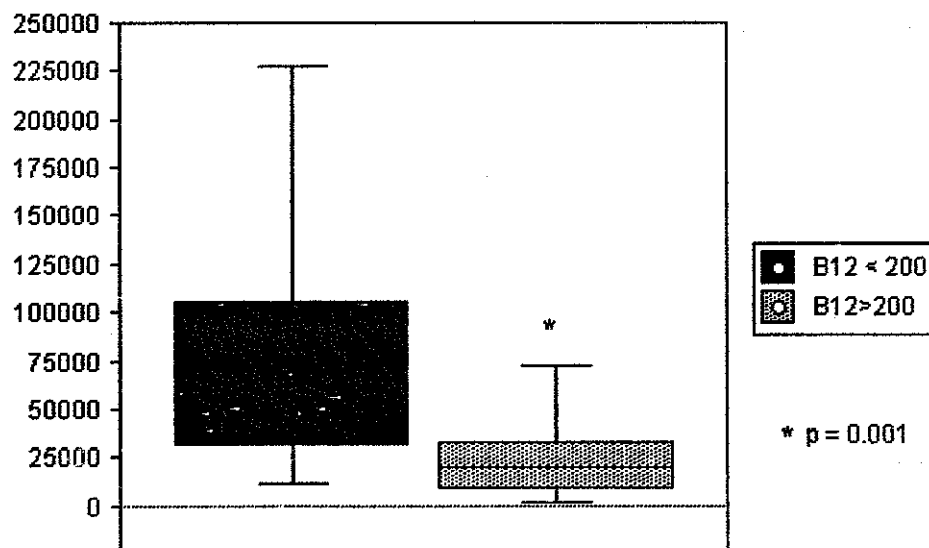


Figure 4

Methionine synthase activity
(ln MTR)

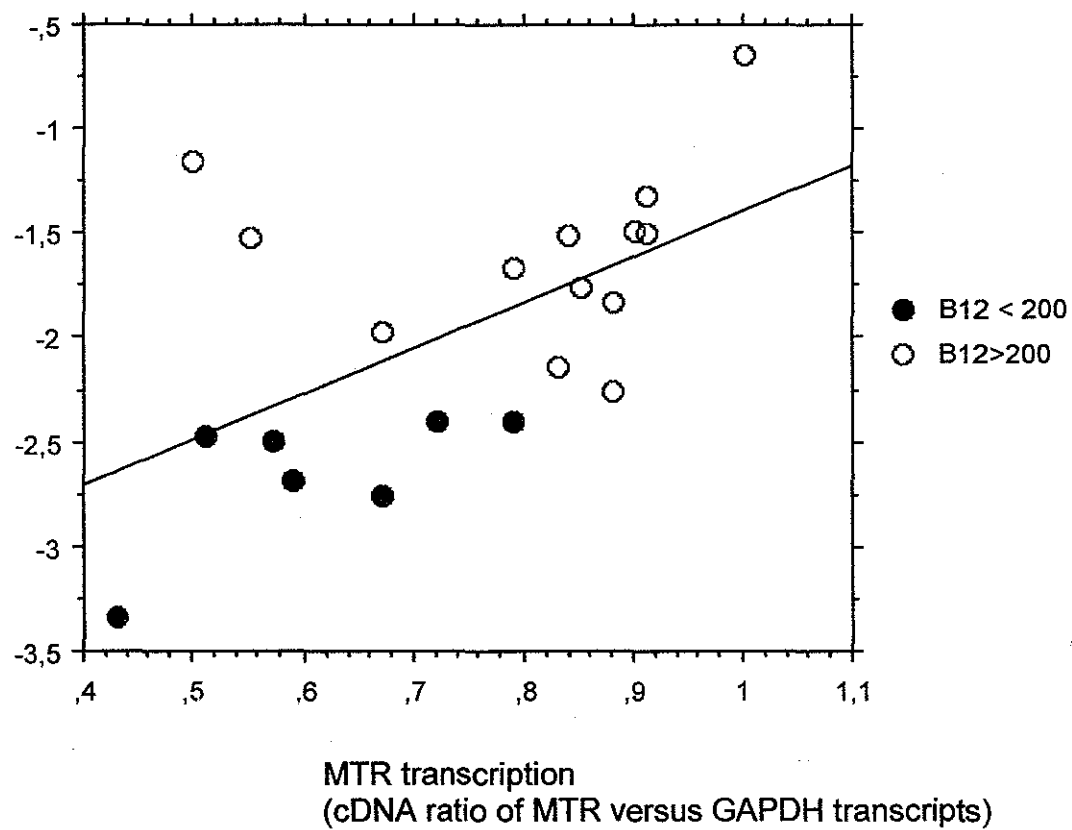


Table 1

Dependent determinants	Excluded determinants	Residual significant determinants	Odds ratio	95 % C.I.*	P-Value
t-Hcys* > 18.7 micromol/l	MTR, B12	Folate < 20	20.78	7.76 – 55.61	<0.0001
	DNA hypomethylation				
MTR* < 0.1 UI/mg	Folate, t-Hcys,	B12 < 200	15.75	2.81 – 88.14	0.0017
	DNA hypomethylation				
DNA hypomethylation	Folate, t-Hcys, B12	MTR < 0.1	17.07	3.35 – 86.91	0.0006
	Folate, t-Hcys, MTR	B12 < 200	7.31	1.77 – 30.24	0.006

* Abbreviations : t-Hcys, plasma total homocysteine ; MTR, methionine synthase ; C.I., confidence interval

Article 2 accepté Clin Chem Lab Med (7 mars 2003): "Effects of vitamin B12 and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver."

TITLE PAGE: Effects of vitamin B12 and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver.

Running title: B12 and folate on liver carcinogenesis

Authors: Laurent Brunaud^{1,2,3}, Jean-Marc Alberto¹, Ahmet Ayav^{1,2,3}, Philippe Gérard¹, Farès Namour¹, Laurent Antunes¹, Marc Braun⁴, Jean-Pierre Bronowicki¹, Laurent Bresler³, Jean-Louis Guéant¹

5. Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, EMI – INSERM 0014 – URM IFREMER 20, Faculté de Médecine, Vandoeuvre lès Nancy, France.
6. Department of Experimental Surgery - Faculté de Médecine, Vandoeuvre lès Nancy, France
7. Department of General and Endocrine Surgery – CHU Nancy-Brabois (HA) – Vandoeuvre lès Nancy, France
8. Department of Radiology – CHU Nancy-Central – Nancy, France

Corresponding author:

Laurent BRUNAUD, MD

Laboratory of Cell and Molecular Pathology in Nutrition.

INSERM EMI 0014 Medical Faculty - University of Nancy I

54505 Vandoeuvre les Nancy cedex – France / Tel : 03.83.15.44.84

Fax : 03.83.15.35.91 e.mail : lbrunaud@planete.net

Word counts : Abstract : 204 / Text : 3557

ABSTRACT

Deficiencies of the major dietary sources of methyl donors, methionine and choline, lead to the formation of liver cancer in rodents. The most widely investigated hypothesis has been that dietary methyl insufficiency results in an abnormal DNA methylation. Vitamine B12 and folate also play an important role in DNA methylation since these two coenzymes are required for the synthesis of methionine and S-adenosyl methionine, the common methyl donor required for the maintenance of methylation patterns in DNA. We reviewed in this article the effects of methyl-deficient diets on DNA methylation and liver carcinogenesis in rats. Several studies have shown that methyl deficient diet influences global DNA methylation. However, evidence from in vivo studies have not clearly established a link between vitamin B12 and DNA methylation. We reported that vitamin B12 and low methionine synthase activity were the two determinants of DNA hypomethylation. Choline or choline / methionine deficient diets have been shown to cause hepatocellular carcinoma in 20-50% of animals after 12-24 months. By contrast, effect of vitamin B12 withdrawal in addition to choline, methionine and folate induced hepatocellular carcinoma in less than 5% of liver rats. We conclude that vitamin B12 is a crucial parameter that defines carcinogenicity of a methyl deficient diet.

KEYWORDS: methyl deficiency; cobalamin; gastrectomy; cancer; liver; rat

ABBREVIATIONS:

MTR: methionine synthase

MTHFR: methyl-tetrahydrofolate reductase

TG: total gastrectomy

INTRODUCTION

Dietary choline and lipotrope deficiencies are among the most studied pathologic processes induced by nutritional modifications in experimental animals (1). Since 1946, the long-term administration of diets deficient in choline is known to cause liver cancer in rats (2). Even though such diets were later found to be contaminated with aflatoxin, the role of methyl-deficient diet in liver carcinogenesis has since then been evaluated (3-6). It is now well established that deficiencies of the major dietary sources of methyl donors, methionine and choline, lead to the formation of liver cancer in rodents (7). Several plausible mechanisms have been proposed to explain the enhancing effect of methyl deprivation on carcinogenesis (4, 6). The most widely investigated hypothesis was that dietary methyl insufficiency results in an abnormal DNA methylation subsequent to the development of cellular methyl insufficiency (7). Different studies have used diets deficient in choline and methionine with or without vitamin B12 (using a deficient diet or total gastrectomy) or folate (deficient diet), in presence or absence of co-carcinogens (8-13) or drugs impairing the one carbon metabolism (14, 15). The use of co-carcinogens and/or specific drugs have been considered as controversial since these substances could be responsible for liver tumor emergence by direct effects and not through abnormal DNA methylation. Thus, we will review in this study the role of methionine metabolism on DNA methylation and the effects of global DNA methylation on carcinogenesis. Lastly, we will focus our review on rat models assessing (a) the effects of the use of co-carcinogens on liver carcinogenesis, (b) the role of diets deficient in choline and methionine with or without vitamin B12 / folate on liver carcinogenesis; (c) effects of total gastrectomy on vitamin B12 levels.

METHIONINE METABOLISM AND DNA METHYLATION

Vitamin B12 and folate play an important role in DNA methylation (16). These two coenzymes are required for the synthesis of methionine and S-adenosyl methionine, the common methyl donor required for the maintenance of methylation patterns in DNA (17). Methylation of the 5-carbon on the cytosine residue is catalyzed by DNA methyltransferase enzymes, which use a methyl group from S-adenyl methionine. S-adenyl methionine derives from methionine which is synthesized by transmethylation of homocysteine by methionine synthase (MTR) in the presence of vitaminic coenzymes, methyltetrahydrofolate and methylcobalamin (18) (**figure 1**). In the "normal" situation, 60% to 90% of all CpG sequences in the genome are methylated, whereas unmethylated CpG dinucleotides are mainly clustered in CpG-rich sequences, termed "CpG islands", and highly represented in gene promoter regions or initial exons of genes (19). DNA methylation is a fundamental mechanism for the epigenetic control of gene expression and the maintenance of genomic integrity (**figure 2**). Therefore, an evaluation of genomic DNA methylation status is important for the study of cell growth regulation, tissue-specific differentiation and carcinogenesis (19).

Several studies suggest that nutritional status influences global DNA hypomethylation. However, the influence of nutrition on gene-specific DNA methylation is less clearly understood (20). Dietary factors that are involved in 1-carbon metabolism that are likely to have an impact on DNA methylation processes mainly include vitamin B12, folate, methionine, and choline (21). When the concentration of vitamin B12 and methionine is low, S-adenosyl methionine synthesis is reduced, and methylation of DNA is theoretically reduced. However, evidence from in vitro cultures and in vivo studies have not clearly established a link between vitamin B12 deficiency, increased genomic instability, and DNA methylation (16). Poirier et al. reported that S-adenosylmethionine in normal subjects was negatively correlated with folate and vitamin B6 levels, but vitamin B12 levels were not assessed in this study (7). In 64 healthy men aged between 50 and 70 years, micronucleus index (chromosome early damage biomarker) was not significantly correlated with folate levels but there was a significant ($P=0.013$) negative correlation with serum vitamin B12 (22). However, level of unmethylated CpG was not significantly related to vitamin B12 status. We recently reported that total MTR activity (holo + apoenzyme) was lowered with vitamin B12 level below 200 pmol/L in

F344 rats, and that vitamin B12 was the single independent determinant of low MTR activity by logistic regression analysis (manuscript submitted). Furthermore, we found that low MTR activity and low vitamin B12 (lower quartile) were the two determinants of DNA hypomethylation. Conclusive further experiments to confirm this issue are yet to be performed.

The major sources of methyl groups in foods come from methionine, from the one-carbon metabolism via methylfolate, and from choline (23). It is well established that the metabolic pathways of methionine, choline and folate are interdependent. For example, when exogenous methionine and choline are limited in the diet, more folate is needed for the remethylation of homocysteine to form methionine (6). Choline, methionine and folate metabolism interact at the point that homocysteine is converted to methionine (24). This tight interrelationship between these three dietary sources of methyl groups makes it important that all three be assessed when studying diet and DNA methylation. Tetrahydrofolate deficiency induced by dietary folate free diet, results in diminished hepatic total choline and decreased S-adenosylmethionine concentrations (23). It has been shown that animals fed diets deficient in choline and methionine have hypomethylated DNA (23, 25). Moreover, results from studies in rodents suggest that severe folate deficiency causes DNA hypomethylation but also DNA strand breaks with increased uracil and apurinic sites in DNA (16, 26, 27). Similar data have been reported in humans. A folic acid depletion study of nine post-menopausal women in a metabolic unit showed an increased DNA hypomethylation in lymphocytes (28). Cervical and gastric / colonic / rectal epithelium DNA methylation was also significantly correlated to serum and tissue folate concentration, respectively (16).

DNA METHYLATION AND CARCINOGENESIS

Several recent human studies have linked deficiencies in vitamin B12, folic acid, and methionine with increased risk of cancer in various organs. These include the colon, the breast, the cervix, the lung, the stomach, the pancreas, and multiple myeloma (7, 8, 10, 29, 30). The question thus arises as to whether such deficiencies exert their activities through diminished availability of S-adenosylmethionine and subsequent abnormal DNA methylation. The fundamental properties required to generate the characteristic malignant attributes associated with cancer cells are the ability to replicate without limitations, indifference to positive growth signals,

disregard for growth inhibitory factors, evasion of programmed cell death, sustained angiogenesis, and the ability to invade and metastasize. Each of these traits is influenced by a gene or set of genes. Failure to express the gene correctly and produce functional regulatory proteins leads to the uncontrolled pattern of cell behavior observed in a typical neoplasm. Much of the focus of molecular biologic research has concentrated on investigating the role of genetic changes (direct alterations of DNA base sequence). Alternative mechanisms of gene modulation (DNA methylation) have been coming under scrutiny that, without disrupting the actual sequence of a gene, affect its expression and remain preserved after cell division (31). The most likely mechanisms through which global DNA hypomethylation may induce neoplastic transformation include activation of oncogenes and induction of genomic instability and increased mutability that result in abnormal chromosomal structures (16, 32).

DNA methylation is a heritable epigenetic event that is mediated by transfer of methyl groups. Despite the frequently observed cancer-associated increases of regional hypermethylation, the near universality of global DNA hypomethylation in many types of human cancer suggests that such hypomethylation plays a significant and fundamental role in tumorigenesis (20). Two patterns of altered methylation have been observed: wide areas of global hypomethylation along the genome, and localized areas of hypermethylation at certain specific sites, the CpG islands, within the gene promoter regions (33). Thus, in theory, decreased methylation, and hence relief of transcriptional silencing, may allow the expression of previously quiescent protooncogenes to become active and induce the cell proliferation events. Alternatively, increased methylation at previously unmethylated sites, such as the promoter regions of a tumor suppressor gene, may result in their silencing through inhibition of transcription and their inability to suppress cell proliferation (4, 20, 31, 34). Some observations from several groups have shown that the total 5-methylcytosine content of DNA is decreased during hepatocarcinogenesis and colonic carcinogenesis (4, 25, 31, 35). The hypomethylation of DNA also coincided with changes in mRNA levels of several genes such as c-myc, c-fos, c-Ha-ras, c-Ki-ras, and p53 (3, 6, 11, 13, 35). In the same way, MTR and methyltetrahydrofolate reductase gene polymorphisms have been related to genomic hypomethylation and carcinogenesis (36-38). For example, carriers of MTHFR C677T variant have been considered as being at increased risk of developing colorectal neoplasia (39).

Moreover, when methylation of DNA is reduced, inhibition by S-adenosylmethionine of methylenetetrahydrofolate reductase is minimised resulting in the irreversible conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, thus favouring an increase in the dUMP pool and uracil incorporation into DNA (6, 16, 40). This dUMP accumulates and as a result uracil is incorporated into DNA instead of thymine. There is good evidence that this mechanism not only leads to point mutation but may also result in the generation of single- and double-stranded DNA breaks, chromosome breakage and micronucleus formation (41). Thus, abnormal methylation patterns can also indirectly affect gene activity with the disruption of the transcription-translation process by increasing the probability for a mutational event to take place and reducing overall chromosomal stability, resulting in the manufacture of a dysfunctional protein product (31). Several studies showed that uracil level in DNA was 70-fold higher in individuals with serum folate <4ng/ml relative to individuals with serum folate >4ng/ml (16, 41). Other studies have evidenced DNA damage by measuring increased amounts of DNA-strand breaks in spleen cells of rats fed a methyl/folate-deficient diet (40).

Lastly, DNA methylation is also considered to have an effect on the cytosine deamination rate. In purified DNA, methylation of cytosines is known to increase their rate of deamination by a factor 2 to 4. Therefore, it seems likely that one of the causes of mutational hot spots may simply be the increased generation of mismatches when the target cytosines are methylated (42).

RAT MODEL AND HEPATOCARCINOMA

1- USE OF DIETS WITH CARCINOGENS

In the absence of carcinogen, the chronic feeding of the amino-acid-defined diet, lacking both methionine and choline, led to the formation of altered hepatic foci which continuously increased in volume but not in number. This observation was consistent with the hypothesis that methyl deprivation is not a continuously initiating stress, but rather is a highly effective promoter of cancer occurrence in preexisting initiated hepatocytes (4, 43). Other investigations have consequently been conducted on the interactions between hepatocarcinogens and liver tumor promoters and labile methyl groups. Two categories of chemical agents provide evidence that chemical carcinogenesis occurs in part through abnormal methylation processes: 1/ classical carcinogens and tumor promoters and 2/ the antimetabolites of methylation reactions

(3). The first includes: 2-acetylaminofluore, diethylnitrosamine, phenobarbital, dichlorodiphenyltrichloroethane, nickel, arsenic, zinc deficiency and methapyrilene; each of these agents alters either S-adenosylmethionine or DNA methylation levels (3, 4). The tumorigenic activities of 2-acetylaminofluore, diethylnitrosamine, phenobarbital, and dichlorodiphenyltrichloroethane have been shown to be enhanced by dietary methyl group deficiency or inhibited by supplemental methyl donors (4, 9). All of the hepatocarcinogenic stressors whose activity was inhibited by methyl donors were also shown to decrease the hepatic content of S-adenosylmethionine in the livers of chronically fed rats. The antimetabolites of methylation, ethionine and azacytidine provide additional evidence for a causative role of abnormal methylation in carcinogenesis (3).

Finally, it is considered that dietary methyl deficiency lowers the apparent threshold for chemical carcinogenesis in the liver (8, 9). Whereas severe deficiency induces marked fatty liver and cirrhosis, the enhancement of carcinogenesis requires only moderate deficiency that may not induce cirrhosis. Hepatocarcinogenesis may even be reduced by severe deficiency (44). Methyl deficiency accelerates and magnifies the appearance of preneoplastic molecular and morphologic changes in the target cells and, ultimately, accelerates the development of tumors (30). However, the use of co-carcinogens have been considered as controversial for studying liver carcinogenesis since it is impossible to know what are the respective effects of these substances and of the restrictive diets in liver tumorigenesis *in vivo*.

2 - DIETS WITHOUT CARCINOGENS

Effects of diets deficient in choline and methionine (without carcinogens)

Male rats fed a diet deficient in choline and low in methionine develop hepatocellular carcinomas in the absence of carcinogens (8, 29). The diet most frequently used for longterm studies with the methyl deficient rat model is the Lombardi diet that is low in methionine and choline deficient but with adequate amounts of vitamin B12 and folate (with 9% peanut meal, 8% soy protein isolate and 1% casein) (45). Rats feeding this diet has been shown to cause hepatocellular carcinomas in 20-50% of animals after 12 – 24 months (**Table 1**) (6, 29, 46). While there is a strong indication that methionine/choline deficient diets can serve as effective promoting agents in multistage hepatocarcinogenesis, it is controversial as to whether such diets may also cause initiation of individual hepatocytes (3, 6, 43).

Another diet used for this methyl-deficient cancer model is an amino acid defined diet (only pure L-amino acids) without choline and low in methionine but with adequate amounts of vitamin B12 and folate. The rationale for this modification is the unavoidable and unpredictable contamination of target nutrients by the protein sources of semi-purified diets (47). In comparison with Lombardi diet, Nakae et al. showed that 100% of the rats fed the amino acid defined diet for 52 weeks developed hepatocellular carcinomas (30, 46). Their interpretation of the different effects on carcinogenesis of the 2 diets was that the diet providing whole proteins requires digestion. Peptides formed during digestion stimulate amino acid absorption and thus increase the methionine intake (6, 47). The tumorigenic activities of the amino acid-defined, methionine and choline-deficient diets were found in rats to be proportional to the corresponding decreases in the hepatic S-adenosylmethionine / S-adenosylhomocysteine ratios produced by the diets (48). These deficient diets generate also the presence of a new form of DNA methyltransferase (Dnmt; EC 2.1.1.73) activity in the liver tumors of rats fed the methionine and choline deficient diet, which could possibly explain in part the alterations in DNA methylation produced by the diet (49). Beside alterations of DNA methylation, genetic susceptibility and/or hormonal status are also important factors in liver tumorigenesis in rodents (3).

Interestingly, the hepatocarcinogenic activity of diets that were solely deficient in choline (diets adequate in methionine and folate content) has also been reported (1, 3). Deficiency alone is sufficient to trigger carcinogenesis with no need for exposure to any known carcinogen (24). It has been suggested that in addition to hypomethylation of DNA, the accumulation of 1,2 diacylglycerol and subsequent activation of protein kinase C within liver during choline deficiency is a critical abnormality which eventually contributes to the development of liver cancers (24)

Effects of diets deficient in choline, methionine, and folate (without carcinogens)

Folate deficiency alone has little effect on hepatic lipid and carcinogenesis (30). A choline/methionine deficiency alone is able to generate a relative folate metabolic deficiency. Theoretically a combined folate, choline and methionine deficient diet would have a stronger carcinogenic effect, compared to a diet only deficient in choline and methionine. However, there are only a few studies supporting this view (6). Henning et al. developed a folate/methyl-deficient diet, which also led to the typical symptoms of a choline deficient diet, such as fatty liver, decreased hepatic S-

adenosylmethionine concentration and increased hepatic S-adenosylhomocysteine levels. This diet was based on 6% casein, 6% gelatin and 15% soyoil. It contained 0.23% methionine, 10 microg vitamin B12 / Kg diet and no added choline or folate. Under this diet, 100% of rats developed hepatocellular carcinomas in a 12 month period (**Table 1**). They concluded that this diet was more severely methyl deficient as compared to the Lombardi diet (6). Removal of folate, in addition to a choline-methionine deficient diet markedly increased the hepatic lipid content (50). Feeding a folate-choline-deficient and methionine-low diet also resulted in a similar decrease of S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio in the liver, compared to a diet deficient only in choline and methionine (51).

Effects of diets deficient in choline, methionine, folate, and vitamin B12 (without carcinogens)

Kennedy et al. showed that dietary deficiency of vitamin B12 alone resulted in fatty liver in sheep (52). Effect of vitamin B12 withdrawal in addition to choline, methionine and folate in deficient diet has also been sparsely evaluated. In livers of rats fed a severely methyl-deficient diet (deficient in choline, methionine, folate, and vitamin B12), decreased overall levels of DNA methylation were accompanied by simultaneous alterations in gene expression, yielding patterns that closely resembled those reported to occur in livers of animals exposed to cancer-promoting chemicals and in hepatomas (13). However, Poirier et al. showed that Fischer rats fed with this diet for 52 weeks without carcinogens had an hepatocarcinoma incidence of only 3.4% (9). We also confirmed this low occurrence since we found no liver tumor occurrence in a group of 7 rats fed the same methyl-deficient diet for a median period of 20 months. All these rats underwent a liver magnetic resonance imaging at one year that were negative. Animal livers harvested at death were free of tumor at pathology examination. However, an histological activity index was assessed in rat livers using a modified semi-quantitative score deriving from Metavir and Working party of the world congress of gastroenterology scores (53, 54). Compared to controls (methyl adequate diet), these methyl deficient diet rats had no significant difference of liver dysplasia score ($p=0.39$). These results suggest that severe methyl deficient diet (deficient in choline, methionine, folate, and vitamin B12) is probably not sufficient to promote tumor occurrence (**Table 2**). These results are in contrast with effects of diets deficient in choline, methionine, and folate (without carcinogens) since

this last diet is able to trigger liver tumors in more than 40% of rats (**Table 1**). However, this discrepancy between effects of choline-devoid and severe methyl deficient diet (deficient in choline, methionine, folate, and vitamin B12 or lipotrope-deficient diet) was already noticed by some authors (1). They considered that choline-devoid diet induced frequent hepatocellular carcinomas ("50% to 70% of male rats by 2 years") and that the role of complete methyl deficient diet (deficient in choline, methionine, folate, and vitamin B12) on liver carcinogenesis was uncertain. Thus, we hypothesized that vitamin B12 status was one of the crucial parameters that define carcinogenicity of a methyl deficient diet in rats.

Surgical model (total gastrectomy)

We have developed a surgical model in rats to assess the role of severe vitamin B12 deficiency combined to a methyl deficient diet on DNA methylation and liver carcinogenesis. We confirmed that vitamin B12 plasma levels were lower in gastrectomized rats than in methyl- and vitamin B12 deficient diet fed animals (55). In fact, in our experience, vitamin B12 deficient diet was not efficient to reach a vitamin B12 deficiency with a dramatic decrease of plasma B12 levels. Disappearance of gastric intrinsic factor after total gastrectomy is thought to lead to vitamin B12 deficiency in rats by diminution or absence of vitamin B12 absorption (56-59). We found that (1) vitamin B12 plasma levels were similar in rats which underwent total gastrectomy and concomitant ileal resection than in those with only total gastrectomy; (2) ileal resection alone was not efficient enough to provide low plasma levels of vitamin B12 (manuscript submitted). This indicated that intrinsic factor was likely produced in gastric wall and not in duodenum or jejunum as proposed by some authors (60). This also indicated that intrinsic factor-vitamin B12 receptor expression was likely not restricted to the ileum in rats (58, 61). An advantage of using a surgical model to reach vitamin B12 deficiency is to obtain a more dramatic decrease of B12 plasma levels, and to avoid substances such as nitrous oxide or other drugs that do produce B12 deficiency (12, 62) but for which it is impossible to exclude interferences with liver tumor carcinogenesis by direct effects.

The main disadvantage of using total gastrectomy is that this operation is a major procedure in rats. Immediate postoperative mortality has been evaluated from 20 to 50% (58, 63, 64). Furthermore, a body weight loss occurred in survivor rats (64, 65). Although survival can be as long as 3 to 10 months after gastrectomy in a single rat

(66, 67), we consider that gastrectomy is not an effective way to get long term B12 deficient survivor rats. Thus, gastrectomized rats do not survived long enough to permit the evaluation of liver tumorigenicity (manuscript submitted) (Table 2).

Deficiencies of choline, as well as methionine to a lesser degree, are the major dietary nutrients governing the severity of methyl deficiency and liver carcinogenesis (hepatocellular carcinoma) in rat models. However, the composition of the methyl deficient diets has been quite variable in different studies with respect to (a) type and amount of protein as the major source of methionine, (b) the levels of methionine and choline in the diets, and (c) the presence and amounts of other important components including vitamin B12 and folic acid (1). Consequently, differences in the magnitude of the effect on carcinogenesis among methyl-deficient diets have been observed and it is difficult to compare the intensities of the methyl deficiencies and liver carcinogenicity in the different studies (30). Dietary vitamin B12 is crucial for carcinogenicity of a methyl deficient diet. Indeed, the carcinogenicity of a methyl-deficient diet is much higher in presence of vitamin B12, compared to a methyl-deficient diet without B12 (47).

REFERENCES

1. Ghoshal AK, Farber E. Choline deficiency, lipotrope deficiency and the development of liver disease including liver cancer: A new perspective. *Lab Invest* 1993;68:255-60.
2. Copeland DH, Salmon WD. The occurrence of neoplasms in the liver, lungs and other tissues of rats as a result of prolonged choline deficiency. *Am J Pathol* 1946:1059-79.
3. Poirier L. The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. *J Nutr* 2002;132:2336S-9S.
4. Poirier LA. Methyl-group deficiency in hepatocarcinogenesis. *Drug Metab Rev* 1994:185-99.
5. Poirier LA, Zapizek W, Lyn-cook B. Physiological methylation in carcinogenesis. *Prog Clin Biol Res* 1990:97-112.
6. Henning SM, Swendseid ME. The role of folate, choline, and methionine in carcinogenesis induced by methyl-deficient diets. *Adv Exp Med Biol* 1996:143-55.
7. Poirier LA, Wise CK, Delongchamp RR, Sinha R. Blood determinations of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and homocysteine: Correlations with diet. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:649-55.
8. Mikol YB, Hoover KL, Creasia D, Poirier LA. Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1983;4:1619-29.
9. Hoover KL, Lynch PH, Poirier LA. Profound postinitiation enhancement by short-term severe methionine, choline, vitamin B12 and folate deficiency of hepatocarcinogenesis in F344 rats given a single low-dose diethylnitrosamine injection. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:1327-36.
10. Yokoyama S, Sells MA, Reddy TV, Lombardi B. Hepatocarcinogenic and promoting action of a choline-devoid diet in the rat. *Cancer Res* 1985;45:2834-42.
11. Zapizek WF, Cronin GM, Lyn-Cook BD, Poirier LA. The onset of oncogene hypomethylation in the livers of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1992;13:1869-72.
12. Yamada K, Kawata T, Wada M, Isshiki T, Onoda J, Kawanishi T, et al. Extremely low activity of methionine synthase in vitamin B12-deficient rats may be related to effects on coenzyme stabilisation rather than to changes in coenzyme induction. *J Nutr* 2000;130:1894-900.

13. Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 1992;52:2071s-7s.
14. Nakayama H, Kajikawa S, Shinozuka J, Su WP, Doi K. Possible involvement of DNA methylation in 5-azacytidine-induced neuronal cell apoptosis. *Histol Histopathol* 1999;14:143-50.
15. Alonso-Aperte E, Ubeda N, Achon M, Perez J, Varela G. Impaired methionine synthesis and hypomethylation in rats exposed to valproate during gestation. *Neurology* 1999;52:750-6.
16. Fenech M. The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 2001;475:57-67.
17. Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997;18:869-82.
18. Barnerjee RV, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J* 1990;4:1450-9.
19. Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr* 2002;132:2382S-7S.
20. Piyathilake C, Johanning G. Cellular vitamins, DNA methylation and cancer risk. *J Nutr* 2002;132:2340S-4S.
21. Ross SA, Poirier LA. Proceedings of the trans-HHS workshop: Diet, DNA methylation processes and health. *J Nutr* 2002;132:2329S-32S.
22. Fenech M, Aitken C, Rinaldi J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young australian adults. *Carcinogenesis* 1998;19:1163-71.
23. Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr* 2002;132:2333S-5S.
24. Zeisel SH. Choline: An important nutrient in brain development, liver function and carcinogenesis. *Am J Clin Nutr* 1992;11:473-81.
25. Wainfan E, Dizik M, Stender M, Xchristman JK. Rapid appearance of hypomethylated DNA in livers of rats fed cancer-promoting, methyl-deficient diets. *Cancer Res* 1989;49:4094-7.
26. Kim Y, Pogribny AG, Basnakian J, Miller JW, Selhub J, James S, et al. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumour. *Am J Clin Nutr* 1997;65:46-52.

27. Pogribny IP, Basnakian A, Miller B, Lopatina N, Poirier L, James S. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl deficient rats. *Cancer Res* 1995;55:1894-901.
28. Jacob RA, Gretz DM, Taylor P, James S, Pogribny AG, Miller B, et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in post-menopausal women. *J Nutr* 1998(1204-1212).
29. Ghoshal AK, Farber E. The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Carcinogenesis* 1984;5:1367-70.
30. Rogers A. Methyl donors in the diet and responses to chemical carcinogens. *Am J Clin Nutr* 1995;61:659S-65S.
31. Wajed SA, Laird PW, Demeester TR. DNA methylation: An alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001;234:10-20.
32. Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics. *Annu Rev Genet* 1996;30:441-64.
33. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983:89-92.
34. Bestor TH. Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* 1998;393:311-2.
35. Fang JY, Xiao SD. Alterations of DNA methylation in gastrointestinal carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:960-8.
36. Avila MA, Berasain C, Torres L, Martin A, Corrales J, Yang H, et al. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;33:907-14.
37. Chen J, Giovannucci E, Hankinson SE, Ma J, Willet WC, Spiegelman D, et al. A prospective study of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis* 1998;19:2129-32.
38. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:825-9.
39. Ryan BM, Weir DG. Relevance of folate metabolism in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Lab Clin Med* 2001;138:164-76.

40. James S, Cross DR, Miller B. Alterations in nucleotide pools in rats fed diets deficient in choline, methionine and/or folic acid. *Carcinogenesis* 1992;13:2471-4.
41. Blount BC, Ames BN. DNA damage in folate deficiency. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8:461-78.
42. Lutsenko E, Bhagwat AS. Principal causes of hot spots for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells. *Mutat Res* 1999;437:11-20.
43. Sawada N, Poirier LA, Moran S, Xu YH, Pitot HC. The effect of choline and methionine deficiencies on the number and volume percentage of altered hepatic foci in the presence or absence of diethylnitrosamine initiation in rat liver. *Carcinogenesis* 1990:273-81.
44. Rogers AE, Newberne P. Aflatoxin b1 carcinogenesis in lipotrope-deficient rats. *Cancer Res* 1969;29:1965-72.
45. Chandar N, Lombardi B. Liver cell proliferation and incidence of hepatocellular carcinomas in rats fed consecutively a choline-devoid and a choline-supplemented diet. *Carcinogenesis* 1988;2:259-63.
46. Nakae D, Yoshiji H, Mizumoto Y, Horiguchi K, Shiraiwa K, Tamura K, et al. High incidence of hepatocellular carcinomas induced by a choline deficient L-amino acid defined diet in rats. *Cancer Res* 1992:5042-5.
47. Nakae D. Endogenous liver carcinogenesis in the rat. *Pathology International* 1999;49:1028-42.
48. Poirier L. The role of methionine in carcinogenesis in vivo. *Adv Exp Med Biol* 1986;206:269-82.
49. Lopatina N, Vanyushin B, Cronin G, Poirier L. Elevated expression and altered pattern of activity of DNA methyltransferase in liver tumors of rats fed methyl-deficient diets. *Carcinogenesis* 1998;19:1777-81.
50. James S, Yin L. Diet-induced DNA damage and altered nucleotide metabolism in lymphocytes from methyl-donor-deficient rats. *Carcinogenesis* 1989;10:1209-14.
51. Henning SM, McKee RW, Swendseid ME. Hepatic content of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and glutathione in rats receiving treatments modulating methyl donor availability. *J Nutr* 1989;119:1478-82.
52. Kennedy S, McConnell S, Anderson H, Kennedy DG, Young PB, Blanchflower WJ. Histopathologic and ultrastructural alterations of white liver disease in sheep experimentally depleted of cobalt. *Vet Pathol* 1997;34:575-84.

53. Bedossa P, Poynard T, and the METAVIR Cooperative Study group. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;24:289-93.
54. Working party of the world congress of gastroenterology. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology* 1994;22:983-93.
55. Scott JSD, Treston AM, Bowman EPW, Owens JA, Cooksley WGE. The regulatory roles of liver and kidney in cobalamin metabolism in the rat. *Clin Sci* 1984;67:299-306.
56. Wojtyczka A, Berge B, Rumenapf G, Schwille PO, Ballanti P, Schreiber M, et al. Gastrectomy osteopenia in the rat: the role of vitamin B12 deficiency and the type of reconstruction of the digestive tract. *Clin Sci* 1998;95:735-44.
57. Owens J, Scott JSD, Cooksley WG. The retention of cobalamin by the liver in the cobalamin-deficient rat. *Clin Sci* 1985;68:553-60.
58. Grasbeck R, Paloheimo M, Kouvonen I. The intrinsic factor receptor is present in the ileum of gastrectomized rats. *Scand J Gastroenterol* 1980;15:449-52.
59. Giorgini GL, Iannuccilli E, Leduc LP, Thayer W. Control of intrinsic factor secretion in rats. *Dig Dis* 1973:332-6.
60. Adachi S, Kawamoto T, Otsuka M, Todoroki T, Fukao K. Enteral vitamin B12 supplements reverse postgastrectomy B12 deficiency. *Ann Surg* 2000;232:199-201.
61. Alpers DH, Russell-Jones GJ. Intrinsic factor, haptocorrin, and their receptors. In: Barnerjee RV, editor. *Chemistry and Biochemistry of B12*. New York: John Wiley & Sons Inc; 1999. p. 411-40.
62. Horne DW, Briggs WT. Effects of dietary and nitrous oxide-induced vitamin B12 deficiency on uptake of 5-methyltetrahydrofolate by isolated rats hepatocytes. *J Nutr* 1980;110:223-30.
63. Destri GL, Trombatore G, Greca GL, Rinzivillo C, Rodolico M, Desiderio C, et al. Total gastrectomy: nutritional status after different reconstruction techniques. An experimental study. *J Surg Oncol* 1992;49:98-102.
64. Wojtyczka A, Gorka Z, Bierzynska-Macyszyn G, Rumenapf G, Jonderko K, Schwille PO. Gastrectomy in the rat using two modifications of esophagojejunal anastomosis. General status, local histological changes and relationships to bone density. *Eur J Surg* 1999;31:497-507.

65. Zittel T, Von Elm B, Teichmann RK, Rabould HE, Becker HD. Cholecystokinin is partly responsible for reduced food intake and body weight loss after total gastrectomy in rats. *Am J Surg* 1995;169:265-70.
66. Tredici G, Buccellato F, Braga M, Cavaletti G, Ciscato P, Moggio A, et al. Polyneuropathy due to cobalamin deficiency in the rat. *J Neurol Sci* 1998;156:18-29.
67. Scalabrino G, Buccellato F, Tredici G, Morabito A, Lorenzini EC, Allen RH, et al. Enhanced levels of biochemical markers for cobalamin deficiency in totally gastrectomized rats: uncoupling of the enhancement from the severity of spongy vacuolation in spinal cord. *Exp Neurol* 1997;144:258-65.

TABLE LEGENDS

Table 1 – Studies reporting liver carcinogenic effects of methyl deficient diets without the use of carcinogens in rats.

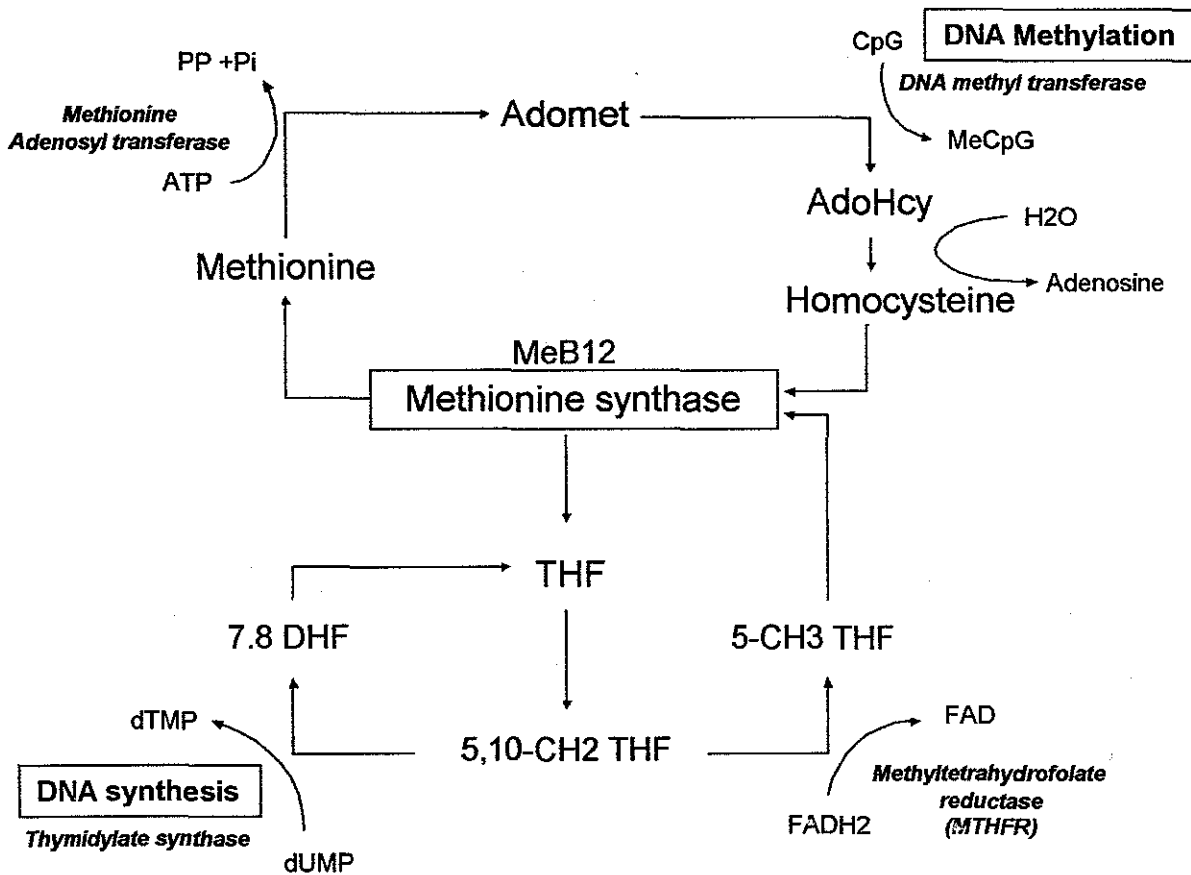
Table 2 – Liver pathology and dysplasia score in rats that underwent methyl deficient diet (choline, methionine, folate) and/or B12 deficiency (total gastrectomy or B12 deficient diet) (personal data).

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Diagram showing that methionine is synthesized by transmethylation of homocysteine by methionine synthase in the presence of vitaminic coenzymes, methyltetrahydrofolate and methylcobalamin.

Figure 2 – Relations between DNA methylation and epigenetic control of gene expression and maintenance of genomic integrity.

Figure 1



ATP, adenosine triphosphate; PP, pyrophosphate; Pi, phosphate; Adomet, adenosylmethionine; AdoHcy, adenosylhomocysteine; THF, tetrahydrofolate; FAD, flavine adenine dinucleotide.

Figure 2

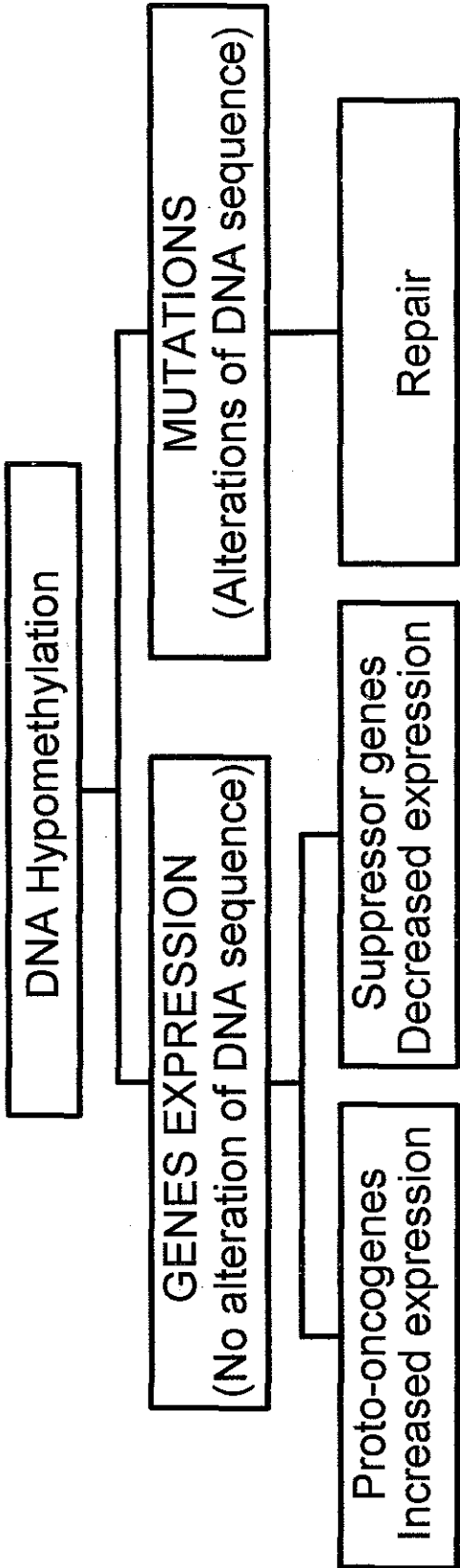


Table 1

Authors	Year	Diet composition				n	Hepatocellular carcinoma	Delay (months)
		choline	methionine	folate	B12	amino acid		
Nakae (46)	1992	-	+	+	+	nd	20%	12
Lombardi (45)	1988	-	+	+	+	nd	26%	16
Lombardi (45)	1988	-	+	+	+	nd	73%	12
Yokoyama (10)	1985	-	+	+	+	nd	22%	11
Nakae (46)	1992	-	+	+	+	AA defined	100%	12
Mikol (8)	1983	-	-	+	+	nd	40%	19
Ghoshal (29)	1984	-	-	+	+	nd	51%	13 - 24
Henning (6)	1996	-	low *	-	+	nd	100%	15
Hoover (9)	1984	-	-	-	-	nd	3.4%	12
Mikol (8)	1983	-	-	-	-	nd	0%	19

nd: not defined; AA defined : choline deficient L-amino acid defined diet

*: low methionine (0.23%)

Table 2

Diet deficient in	Total gastrectomy	B12 deficiency	Median survival (quartiles) (months)	Liver MRI (at 1 year)	Mean liver dysplasia score (0 – 3)	Liver tumor pathology
Choline, methionine, folate	yes	severe	1.6 (1.4 - 3.4)	-	0 ($\pm$ 0)	no tumor
No deficiency	yes	severe	2.8 (2.0 - 5.8)	-	0 ($\pm$ 0)	no tumor
Choline, methionine, folate	no	mild	20.5 (17.3 - 21.8)	normal	0.6 ($\pm$ 0.2)	no tumor
No deficiency	no	no deficiency	21.2 (19.5 - 22.8)	normal	0.2 ($\pm$ 0.2)	no tumor

TG: total gastrectomy, MRI: magnetic resonance imaging

Article 3 publié – Surgery 2002

"Increasing the effectiveness of radioactive iodine therapy in the treatment of thyroid cancer using Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor".

Increasing the effectiveness of radioactive iodine therapy in the treatment of thyroid cancer using Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor

Rasa Zarnegar, MD, Laurent Brunaud, MD, Hajima Kanauchi, MD, Mariwil Wong, MS, Mami Fung, MS, David Ginzinger, PhD, Quan-Yang Duh, MD, and Orlo H. Clark, MD, San Francisco, Calif

Background. Radioactive iodine is used to identify and treat recurrent and metastatic thyroid cancer of follicular cell origin. Between 30% and 40% of thyroid cancers are either resistant or become resistant to radioactive iodine. Increased sodium-iodide symporter (NIS) and decreased Pendrin (PDS) activity may be associated with increased radioactive iodine effectiveness. In this investigation the effects of Trichostatin A (TSA), a histone deacetylating inhibitor, on human thyroid NIS and PDS gene expression was investigated.

Method. Cell lines from papillary, Hürthle, and follicular cell carcinomas were treated with TSA for 72 hours at concentrations up to 100 ng/mL. NIS and PDS gene expression was determined using quantitative RT-polymerase chain reaction.

Results. NIS messenger RNA expression in cell carcinomas was increased 107- (1.8-307) and 217- (5.7-408) fold in papillary, 39- (20-63) and 58- (37-80) fold in Hürthle, and 459- (178-810) and 781- (412-1229) fold in follicular after treatment with 50 and 100 ng/mL of TSA, respectively. PDS messenger RNA expression in cell carcinomas was decreased 0.22- (0.05-0.45) and 0.27- (0.09-0.47) fold in papillary, 0.53- (0.46-0.60) and 0.54- (0.44-0.64) fold in Hürthle, and 0.32- (0.26-0.39) and 0.56- (0.47-0.64) fold in follicular, after the same treatment.

Conclusions. In thyroid cancer cell lines, TSA dramatically increased NIS gene expression and reduced PDS expression. The increased NIS expression and reduced PDS expression may make radioiodine therapy more effective in patients with thyroid cancer, especially when the tumors have no or low uptake of radioiodine. (Surgery 2002;132:984-90.)

From the Department of Surgery, Division of General Surgery, and Cancer Center, University of California San Francisco/Mount Zion Medical Center, and Surgical Services, Veterans Affairs Hospital, San Francisco, Calif

THE TREATMENT OF PATIENTS with well-differentiated thyroid cancer (WDTC) includes 3 modalities: total thyroidectomy, radioiodine (^{131}I) ablation, and thyrotropin (TSH) suppression.¹ Unfortunately about 25% of WDTCs are initially resistant, and about 50% of recurrent thyroid cancers are resistant to

^{131}I treatment. These patients have a worse prognosis and many studies have attempted to enhance ^{131}I uptake in thyroid cancer cells in such patients.²⁻⁵

The sodium-iodide symporter (NIS), located on the basolateral membrane of thyroid follicular cells, is responsible for iodine uptake into thyroid cells.⁶⁻⁸ When thyroid cells dedifferentiate into cancer cells, they decrease their ability for iodine uptake.⁹ This is true for both papillary (TPC-1) and follicular thyroid (FTC-133) carcinomas. Most Hürthle cell carcinomas (XTC-1) fail to take up enough ^{131}I for treatment to be effective.

Three mechanisms have been proposed for poor iodide uptake in thyroid carcinoma: (1) NIS gene mutations,¹⁰ (2) suppression of the NIS gene expression,^{9,11-16} and (3) posttranscriptional modifications of the NIS protein.¹⁷⁻¹⁸ Kosugi et al¹⁰ determined that a T354P NIS gene mutation was

Supported in part by the Friends of Endocrine Surgery, Mount Zion Health Systems, The Jerold Heller Family Foundation

Department of Surgery, Finch University of Health Sciences/The Chicago Medical School, Mount Sinai Medical Center, Chicago, Illinois.

Presented at the 23rd Annual Meeting of the American Association of Endocrine Surgeons, Banff, Alberta, Canada, April 7-9, 2002.

Reprint requests: Orlo H. Clark, MD, UCSF/Mount Zion Medical Center, 1600 Divisadero St, Box 1674, San Francisco, CA 94115-3010

© 2002, by Mosby, Inc. All rights reserved.

0039-6060/2002/\$35.00 + 0 11/6/128690

doi:10.1067/msy.2002.128690

found in 7 Japanese patients from 5 unrelated families. Saito et al¹⁷ showed 7 of 17 TPC-1 to overexpress the NIS gene, but the NIS protein was found cytoplasmically, not on the cell membrane. Riedel et al¹⁸ reported that the NIS is regulated posttranscriptionally by TSH. Suppression of the NIS gene at the transcriptional level, however, appears to be the most common mechanism for poor iodide uptake in thyroid cancer cells. Schmutzler et al² confirmed this by showing that increasing NIS messenger RNA (mRNA) levels with retinoic acid leads to increased ¹³¹I uptake.

The Pendrin (PDS) gene was first identified in Pendred's syndrome. Pendred's syndrome is an autosomal recessive disorder seen approximately in 1 of every 15,000 births. It represents a defect in the peroxidase-generating system with resultant hypothyroidism; goiter commonly results. Deafness is also seen in these patients.¹ A study done by Bidart et al¹⁹ showed that the PDS gene is weakly expressed in thyroid carcinoma. Arturi et al²⁰ showed similar results in thyroid carcinoma but also noted that in some thyroid carcinomas with poor NIS expression the PDS gene was upregulated. From this they proposed that PDS gene expression compensated for NIS gene suppression. The exact interaction between NIS and PDS gene remains unclear.

This investigation focuses on enhancing the expression of the NIS gene using a novel group of chemicals: histone-deacetylating (HDAC) inhibitors. Although the exact mechanism of action of these compounds has not been fully elucidated, it has been shown that histone acetylation affects the interaction of histones with DNA. Acetylation at the lysine residue on the amino terminal tail of histones decreases their affinity for DNA.²¹ Acetylation plays a key role in the activity of RNA polymerase II. HDAC inhibitors have resulted in tumor redifferentiation in vitro. HDAC inhibitors are known to have minimal side effects, making them appealing for clinical use.

A prior study showed that depsipeptide (FR901228),²² a HDAC inhibitor, enhanced NIS gene expression and ¹³¹I uptake in FTC-133 and anaplastic cancer cell lines. In the current investigation we studied the effects of Trichostatin A (TSA), a different HDAC inhibitor, on 3 thyroid cancer cell lines: TPC-1, XTC-1, and FTC-133 cell lines. These human thyroid cancer cell lines were selected to determine the effectiveness of TSA in various types of thyroid cancers of follicular cell origin. Our aim was to determine if NIS gene expression and PDS gene expression could be effected by TSA.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines and culture conditions. Three human thyroid cell lines derived from papillary TPC-1, XTC-1, FTC-133, and a colon carcinoma cell line were used. The colon carcinoma cell line was used as a negative control for NIS and PDS expression. All cell lines were grown and maintained in Dulbecco's modified eagle/Hams F-12 (1:1) medium supplemented with 10% fetal calf serum, 10 U/mL TSH, insulin 10 µg/mL, penicillin/streptomycin 5000 U/mL each, and fungizone 250 µg/mL. Media was changed every 2 days. Cells were treated in H5-defined media. All results are on the basis of treatment in this defined medium. All results were repeated 3 times.

Reagents. TSA (4,6-Dimethyl-7- (p-dimethylaminophenyl)-7-oxohepta-2, 4-dienohydroxamic acid) (Sigma, St Louis, Mo) was dissolved in ethanol and brought to stock concentration using serial dilutions with phosphate-buffered saline.

Cell viability and growth inhibition. Cells were plated at a density of 200,000 per flask. Drug sensitivity was measured by exposing the cells to graded concentration of TSA in a final volume of 5 mL. Cells were treated for up to 72 hours. All cells were stained with trypan blue after resuspension to determine viability.

Cells were also plated at a density of 1500 per well in 96-well plates in 180 µL medium in triplicate. Cells were treated with TSA for up to 72 hours. Viable cells were estimated in a colorimetric assay that measures the formazan reduction product of MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), which is produced by the mitochondrial activity of viable cells. The reduction product was dissolved in dimethyl sulfoxide, and the absorbance was quantitated using a plate reader spectrophotometer.

RNA extraction and complementary DNA preparation. Total RNA was extracted from the treated cells using the trizol/chloroform method (GibcoBRL, Gaithersburg, Md). Concentration and purity was determined using a Beckman spectrophotometer (Fullerton, Calif). Total RNA (500 µg) was reverse transcribed in a 100-µL volume reaction using 250 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GibcoBRL), 40 U ribonuclease inhibitor (Roche, Indianapolis, Ind), 25 mmol/L dA/T/C/G (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Arlington Heights, Ill), 7.5 mM MgCl₂, 5 mmol/L random hexamer (Invitrogen, Carlsbad, Calif), and 1X polymerase chain reaction (PCR) Buffer II (Applied Biosystems, Foster City, Calif), and brought to final concentration in nuclease-free H₂O. Complementary DNA was synthesized using a

Table. Sodium/iodide and Pendrin gene expression in thyroid cancer cell lines in response to TSA using quantitative real time RT-PCR

Cell line	Treatment*	C_T GUS	C_T NIS	C_T PDS	$\delta\delta C_T$ NIS	SD $\delta\delta C_T$ NIS	Exp NIS	Range	$\delta\delta C_T$ PDS	SD $\delta\delta C_T$ PDS	Exp PDS	Range
TPC-1	0	22.4	37.2	29.6	0.0	0.7	1.1	0.6-1.6	0.0	0.8	1.1	0.6-1.7
	50	22.2	32.1	31.9	-4.6	3.7	107.0	1.8-307	2.7	1.5	0.2	0.05-0.4
	100	21.9	30.8	31.2	-5.6	3.1	217.2	5.7-408	2.3	1.2	0.3	0.09-0.5
XTC-1	0	20.9	33.8	27.4	0.0	0.4	1.0	0.8-1.3	0.0	0.2	1.0	0.9-1.2
	50	21.4	30.1	28.8	-5.1	0.8	39.1	19.6-62.5	0.9	0.2	0.5	0.5-0.6
	100	21.7	28.6	29.0	-5.8	0.6	57.5	36.6-79.9	0.9	0.3	0.5	0.4-0.6
FTC 133	0	21.8	40.1	27.6	0.0	1.7	1.4	0.3-3.2	0.0	0.5	0.5	0.7-1.4
	50	22.0	31.9	29.8	-8.6	1.1	459.3	178-810	1.7	0.3	0.3	0.3-0.4
	100	22.5	32.5	29.6	-9.5	0.8	781.5	412-1229	0.9	0.2	0.6	0.5-0.6

The C_T values of the GUS, NIS and PDS genes are averages of 3 triplicate runs. The difference in gene expression $\delta\delta C_T$ is relative to untreated cells with its associated SD $\delta\delta C_T$. Gene expression (Exp NIS or Exp PDS and the range of expression are calculated as $2^{(\delta\delta C_T)}$. *TSA treatment in ng/mL.

thermal cycler (Amplifon II; Thermolyne, Bovenkamp, Netherlands) by incubating at 25°C for 10 minutes, 48°C for 40 minutes, and 95°C for 5 minutes.

Real-time quantitative PCR. Oligonucleotide primers and Taqman probes were designed to be intron spanning as previously described.¹⁹ They were purchased from Biosearch Technology (Novato, Calif) and probes were all designed with TAMRA moieties: NIS forward primer, 5'-CCATCCTGGATGACAACCTTGG-3'; NIS reverse primer, 5'-AAAAACAGACGATCCTCATTTGGT-3'; NIS probe, 5'-AGAACTCCCCACTGGAAACAAGAAGCCC-3'; PDS forward primer, 5'-CATCAAGACATATCTCA GTTGGACCT-3'; PDS reverse primer, 5'-ACAGTTCATTGCTGCTGGAT-3'; and PDS probe, 5'-TCTGAGCATGGCCCCCGACG-3'. All probes and primers were resuspended per manufacturers' recommendation.

Real-time quantitative PCR was performed in 96-well sample plates using complementary DNA equivalent of 50 ng/total RNA/50 μ mol/L reaction tube with the Taqman PCR core reagents optimized for reaction: 1X Taqman Buffer A (Applied Biosystems), 5.5 mmol/L $MgCl_2$, 200 μ mol/L dA/T/C/G, 1.25 U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). PCR was developed on the ABI Prism 7700 Sequence Detector (Perkin-Elmer Corp/PE Applied Biosystems). PCR product analysis was setup at 95°C for 12 minutes, then 45 cycles of 95°C for 15 seconds followed by 60°C for 1 minute. Samples were run as triplicates.

To normalize for the different concentrations of total RNA added to the reaction, human GUS gene was used as an endogenous control. The GUS gene is expressed in all human tissue at the same concentration and is only minimally affected by treatments. Primers and probes for the GUS gene were purchased from Biosearch Technology: GUS for-

ward primer, 5'-CTCATTTGGAATTTTGCCGATT-3'; GUS reverse primer, 5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA-3'; and GUS probe, 5'-TGAACAGTCA CCGACGAGAGTGCTGG-3'.

The mRNA content of each target gene was simultaneously determined in the 96 wells in a 1-run assay. Subsequent plates were compared using the same sample control. Final quantitation was done using the comparative C_T method (see below) and is reported as relative transcription or the n-fold difference relative to control (ie, untreated samples).

The comparative C_T method. The comparative C_T method was used as a result of its ease and speed of setup. For relative quantitation by the comparative C_T method, values are expressed relative to untreated samples. First, the C_T for the target amplicon and the C_T for the endogenous control were determined for each sample. Differences in the C_T for the target and the C_T for the endogenous control, called ΔC_T , were calculated to normalize for the differences in the RNA extractions and the efficiency of the RT step. The ΔC_T for each experimental sample was subtracted from the ΔC_T of the untreated sample. This difference is called the $\Delta\Delta C_T$ value. Finally, the amount of target normalized to the endogenous control and relative to untreated samples was calculated by $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Thus, all samples were expressed as an n-fold difference relative to untreated samples (Table).

Statistical methods. MRNA of the target genes was expressed relative to the GUS gene and relative to baseline. Cycle numbers were compared. MRNA expression patterns were compared using the *t* test, and the correlation between their expression profiles was studied using the Spearman rank order correlation coefficient for each histologic type. The level of significance chosen was fixed at 5%.

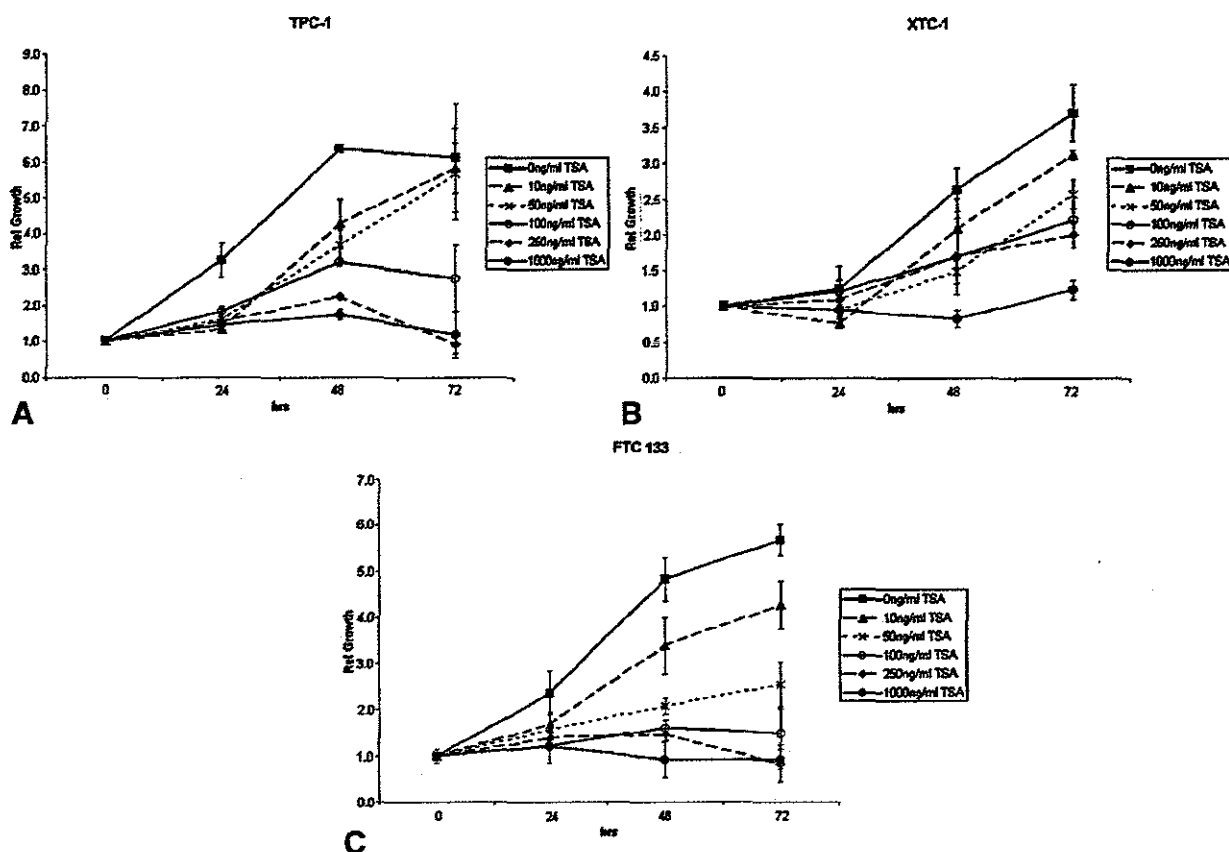


Fig 1. MTT assay for TPC-1 (A), XTC-1 (B), and FTC-133 (C), after treatment with TSA, $n = 3$. Concentrations of 0, 10, 50, 100, 250, and 1000 ng/mL TSA were used in all cell lines. Cell proliferation is measured relative (*Rel*) to day 0 and represents an average measurement. The measurements were taken at 24, 48, and 72 hours. A, TPC-1 shows cell proliferation with TSA treatment at concentrations up to 100 ng/mL and growth inhibition at concentrations of 250 and 1000 ng/mL. B, XTC-1 cells proliferate in the presence of TSA up to concentrations of 250 ng/mL, but exhibit a pattern of growth inhibition at 1000 ng/mL. C, FTC-133 cell proliferation in the presence of TSA at concentrations up to 50 ng/mL, growth inhibition at 100, 250, and 1000 ng/mL.

RESULTS

Viability. Figure 1 demonstrates the cytotoxicity curve for TSA in 3 different thyroid cancer cell lines using the MTT proliferation assay. As seen, there is minimal to no cytotoxicity to TSA at concentrations up to 250 ng/mL. However, TSA reduces cellular proliferation and induces growth arrest. This effect is more evident at higher concentrations. Cytotoxicity occurred at 1000 ng/mL after 72 hours treatment. FTC-133 was most susceptible to cytotoxicity.

NIS and PDS gene expression. Profound alterations were detected in the expression of the 2 target genes (Fig 2). The data shown in the Table summarize changes NIS and PDS gene expression in the 3 different thyroid cancer cell lines after 72 hours of treatment with TSA. In TPC-1 NIS gene expression increased after treatment with TSA

($P < .05$) whereas PDS gene expression decreased ($P = .085$). XTC-1 also had increased NIS gene expression after TSA treatment ($P < .05$) with decreased PDS gene expression ($P = .066$). FTC-133 showed a more dramatic increase in NIS gene expression level when treated with TSA ($P < .05$) with similar decreases in PDS gene expression ($P = .190$).

Colon carcinoma cell exhibited no change in expression of the NIS or PDS gene after treatment at concentrations of 50 and 100 ng/mL TSA. Changes in NIS and PDS expression was not seen on exposure to ethanol (used to dissolve TSA) (data not shown).

There was a direct correlation between treatment and NIS gene expression in the 3 thyroid cancer cell lines ($P < .0001$). Although the correlation between treatment and PDS gene expression is not linear, there is a decrease in PDS expression after TSA treatment in the 3 thyroid cancer cell lines

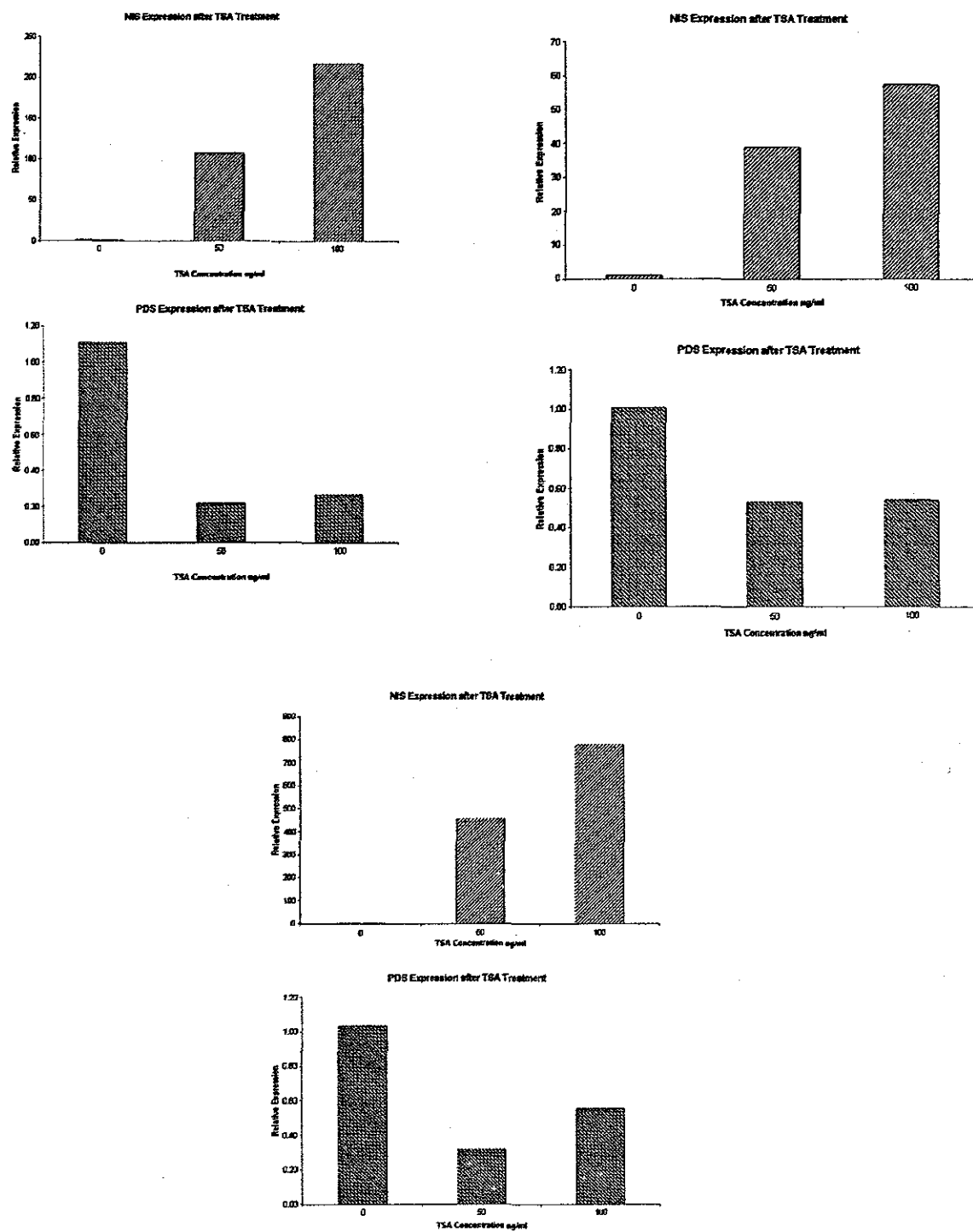


Fig 2. Relative expression of NIS and PDS in TPC-1 (A), XTC-1 (B), and FTC 133 (C), after treatment with TSA for 72 hours. Concentrations of 0, 50, and 100 ng/mL TSA were used in all 3 cell lines. Relative expression is calculated by the relative C_T method and is represented as an average $n = 4$. A, TPC-1 relative expression of NIS increased 107- and 217-fold versus untreated cells ($P < .05$); PDS expression decreased 0.22- and 0.27-fold versus untreated ($P = .085$). B, XTC-1 relative expression of NIS increased 39- and 57-fold versus untreated ($P < .05$); PDS expression decreased 0.53- and 0.54-fold versus untreated ($P = .066$). C, FTC-133 relative expression of NIS increased 459- and 781-fold versus untreated ($P < .05$); PDS expression decreased 0.32- and 0.56-fold versus untreated ($P = .190$).

($P < .005$). There is also a correlation between treatment leading to an increase in NIS gene expression and a decrease in PDS expression ($P < .005$).

DISCUSSION

We studied the effects of TSA on the expression of the NIS and the PDS gene in 3 different human thyroid cancer cell lines. TSA dramatically increased NIS gene expression and reduced PDS expression. The use of TSA *in vitro* indicates that this drug may increase ^{131}I uptake in a variety of human thyroid cancer cell lines that have poor baseline radioactive iodine uptake by increasing NIS mRNA expression. These results suggest that a new treatment may be available to increase radioactive iodine uptake in thyroid cancers with low or no ^{131}I uptake. PDS gene expression is also changed with TSA treatment in all the cell lines. Previous studies showed reduced PDS gene expression in thyroid carcinomas. However, PDS gene expression was also reduced in hyperfunctioning nodules that had increased NIS expression.¹⁹ The expression of the NIS gene and the PDS may be coregulated; possibly by shutting off the PDS gene when NIS gene expression is increased, leading to iodine accumulation in the thyroid cells. Proof of this hypothesis will require further investigation.

The growth inhibition effects of TSA also need further investigation. TSA has been shown to upregulate the p21 gene.²³ p21 regulates the progression of cells through the cell cycle. This dual effect of TSA, redifferentiation and enhanced ^{131}I uptake at low concentrations, and growth arrest at higher concentrations makes it a possible new therapeutic modality for many different types of cancer.

The current therapy for WDTC is thyroidectomy, ^{131}I therapy, and TSH suppression. As many as 30% to 40% of WDTC are or become unresponsive to ^{131}I therapy. This resistance is probably associated with dedifferentiation of these cells. Treatments that redifferentiate thyroid cancer cells may lead these cells to regain their ability to trap ^{131}I . Previous studies have used retinoic acid to redifferentiate cells and increase NIS gene expression,² leading to its use in clinical trials. Whether using combined treatment with TSA and retinoic acid or other agents will further increase the uptake of ^{131}I is unknown. It is also possible that TSA increases the expression of the NIS in well-differentiated thyroid neoplasms and in Graves' thyroid tissue so that smaller doses of ^{131}I can be used effectively.

TSA promotes histone acetylation. Selective acetylation of H4 leads to gene activation.²⁴

Although, to date, TSA has not been used in human beings, it has been used extensively *in vitro* and in animal studies with no significant toxicity. Because TSA increases NIS and decreases PDS mRNA expression it can, therefore, be inferred that TSA may become a new therapeutic agent to enhance radioactive iodine uptake in patients with thyroid cancer.

REFERENCES

1. Clark OH, Duh Q-Y. Papillary thyroid carcinoma: rational for total thyroidectomy. In: Textbook of endocrine surgery. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 90-3.
2. Schmutzler C, Winzer R, Meissner-Weigl, Kohrle J. Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:832-8.
3. Lawrence JE, Emerson CH, Sullaway SL, Braverman LE. The effects of recombinant human TSH on the thyroid ^{123}I uptake in iodide treated normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:437-40.
4. Eng PHK, Cardona GR, Previti MC, Chin WW, Braverman LE. Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. *Eur J Endocrinol* 2001;144:139-44.
5. Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T. Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 1997;138:2227-32.
6. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996;379:458-60.
7. Dohan O, Vicja A, Carrasco N. Molecular study of the sodium-iodide symporter (NIS): a new field in thyroidology. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:99-105.
8. Vicja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: Impact on thyroid and extrathyroidal pathophysiology. *Physiol Rev* 2000;80:1083-105.
9. Min JJ, Chung J-K, Lee YJ, Jeong JM, Lee DS, Jang JJ, et al. Relationship between expression of the sodium/iodide symporter and ^{131}I uptake in recurrent lesions of differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med* 2001;28:639-45.
10. Kosugi S, Sato Y, Matsuda A, Ohyama Y, Fujieda K, Inomata H, et al. High prevalence of T354P sodium/iodide symporter gene mutation in Japanese patients with iodide transport defect who have heterogeneous clinical pictures. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4123-9.
11. Liou M-J, Lin J-D, Chan E-C, Liu F-H, Chao T-C, Weng H-F. Detection of mRNA of the sodium iodide symporter in benign and malignant human thyroid tissues. *Cancer Lett* 2000;160:75-80.
12. Arturi F, Russo D, Giuffrida D, Schlumberger M, Filetti S. Sodium-iodide symporter (NIS) gene expression in lymph-node metastases of papillary thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol* 2000;143:623-7.
13. Ringel MD, Anderson J, Souza SL, Burch HB, Tambascia M, Shriver CD, et al. Expression of the sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer. *Mod Pathol* 2001;14:289-96.
14. Lin J-D, Chan E-C, Chao T-C, Chen KT, Hsueh C, Ho YS, et al. Expression of sodium iodide symporter in metastatic and follicular human thyroid tissues. *Ann Oncol* 2000;11:625-9.
15. Ryu K-Y, Senokozlicoff ME, Smanik PA, Wong MG, Siperstein AE, Duh Q-Y, et al. Development of reverse transcription-competitive polymerase chain reaction method to quantifi-

- tated the expression levels of human sodium iodide symporter. *Thyroid* 1999;9:405-9.
16. Lazar V, Bidart J-M, Caillou B, Mahe C, Lacroix L, Filetti S, et al. Expression of the Na/I symporter gene in human thyroid tumors: A comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3228-34.
 17. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, et al. Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1998;101:1296-300.
 18. Riedel G, Levy O, Carrasco N. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem* 2001;276:21458-63.
 19. Bidart J-M, Main C, Lazar V, Russo D, Filetti S, Caillou B, et al. Expression of pendrin and the pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2028-33.
 20. Arturi F, Russo D, Bidart J-M, Scarpelli D, Schlumberger M, Filetti S. Expression pattern of the pendrin and sodium/iodide symporter genes in human thyroid carcinoma cell lines and human thyroid tumors. *Eur J Endocrinol* 2001;145:129-35.
 21. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanism. *Genes Dev* 1998;12:599-606.
 22. Kitazono M, Robey R, Zhan Z, Sarlis NJ, Skarulis MC, Aikou T, et al. Low concentration of the histone deacetylase inhibitor, Depsipeptide (FR901228), increase expression of the Na/I symporter and iodine accumulation in poorly differentiated thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3430-5.
 23. Sowa Y, Orita T, Minamikawa S, Nakano K, Mizuno T, Nomura H, et al. Histone deacetylase inhibitor activates the *WAF1/Cip1* gene promoter through the Sp1 sites. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:142-50.
 24. Minucci S, Horn V, Bhattacharyya N, Russanova V, Orgyzo VV, Gabriele L, et al. A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11295-300.

DISCUSSION

Dr Barbara K. Kinder (New Haven, Connecticut). The HDAC inhibitors are very important regulators of gene expression that are coming into clinical use. There are several different ones, as you know, involved in clinical trials at the present time. The effect of these on gene expression appears to be related primarily to the intrinsic characteristics of the individual transformed cell and not really to the different inhibitors. So, it is important to look at all of these in specific cells.

The effects of them are many, from increasing apoptosis to decreasing angiogenesis. Interestingly, in thyroid follicular cells they appear to increase expression of the NIS, so obviously they are very attractive as potential tools in treating thyroid cancer. I was pleased to see that you measured iodine uptake because that was not mentioned in the article, and I wanted to know about that.

It is interesting that the NIS of the basolateral membrane and the PDS iodine transporter at the apical membrane tend to be oppositely regulated by TSA. I guess one of my questions to you is that in the clinical data from Schlumberger's group, where they looked at iodine uptake and sodium-iodide expression and PDS expression in metastases from patients with thyroid cancer, the iodine uptake was seen only in the patients who expressed both NIS and PDS, suggesting that both iodine transporters are

necessary to get optimal therapeutic effect. I wonder if you would comment on that in light of your hypothesis, which is very attractive, that if you have NIS but are missing PDS, the iodine remains localized in the cell.

Dr Zarnegar. That is a great question. I am in the process of actually doing my own study with the NIS and PDS gene in different tumors that are from tissues. Some studies present that NIS expression increases and PDS expression also increases. But other studies are conflicting. I am not sure if it is maybe the subset of patients they chose or if it is a global concept. So, I am not sure that the real role of the 2 genes has been completely elucidated. I think it just needs a lot of further study and, hopefully, we can figure it out in the next couple of years.

Dr Martha A. Zeiger (Baltimore, Maryland). I wonder if you might enlighten me, vis-à-vis the mechanism of increasing gene expression, in that others have shown that methylation is necessary to decrease gene expression of the NIS gene. Specifically, others have not shown re-expression of this gene with inhibition of HDAC alone and without associated demethylation. I wondered if you might comment on the fact that your work does not corroborate this.

Dr Zarnegar. Well, the interesting thing is that on a theoretical level the acetylation of histones and the methylation of DNA are intrinsically related.

Fundamentally, by inhibiting the HDAC, you open up the DNA to stop the methylation of the same DNA. This study has been confirmed by another study in which, by using depsipeptide, they showed increased histone expression causing increased NIS expression. But I think the 2 mechanisms are very intricately related, and I believe that these chemicals work on a lot of different levels and not just on the histone level.

Dr Andreas Zielke (Marburg, Germany). Because, obviously, not all of the cells went into apoptosis, did you have a chance to observe the cultures after discontinuation of the drug? Do the cells regain the same proliferative potential that they had before being treated? Secondly, if you repeatedly treat cultures, do you end up with resistant cells? Third, could you speculate on what the mechanisms are that make these cells go into apoptosis.

Dr Zarnegar. Excellent points. The exact mechanism of apoptosis is what I am actually working on, now. There are theories that different cell lines, oral and gastric carcinoma cell lines, treated with TSA are associated with p-21 upregulation, which is another gene that effects how you go through the cell cycle, and we have seen different changes in the back Bax gene, which is another apoptosis gene.

So, I am actually working on figuring the mechanism of what occurs in FTC-133 cell lines, because the G-2 arrest that we see with FTC-133 cell lines is not something that has been shown before with HDAC inhibitors. Usually, all previous studies have shown that HDAC inhibitors cause G-1 arrest or G-1 check-point arrest and not G-2 arrest. So, I think it is an interesting thing to analyze and figure out. As far as resistance to the drug after a period of time, I don't know those studies. I haven't done those studies. And it may be something that we need to figure out.

Article 4 – soumis "Increased homocysteine and genetic determinants of vitamin B12 in neurological disorders."

Increased homocysteine and genetic determinants of vitamin B12 in neurological disorders.

JL Guéant¹, RM Guéant-Rodriguez¹, L Brunaud¹, A Romano², G Anello², P Bosco², C Romano², R Ferri², B Namour¹. INSERM 00-14, Nancy, France¹, and IRCCS Oasi Maria S.S., Troina, Italy²

Cellular homocysteine depends on nutritional determinants such as folates and vitamin B12, and on genetic polymorphisms of methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR* 677 C → T and 1298 A → C), which catalyses the synthesis of methyl-tetrahydrofolate, of methionine synthase (*MTR* 2756 C → G), which catalyses the methyl transfer from methyl-tetrahydrofolate to homocysteine and of methionine synthase reductase (*MTRR* 66 A → G), which maintains *MTR* in active state. It also depends on a polymorphism of transcobalamin (*TC* 777 C → G), a plasma protein which delivers vitamin B12 (the co-factor of *MTR*) to cells.

Several in vitro data support the involvement of homocysteine in the multi-factorial pathogenesis of sporadic Alzheimer disease (AD). Homocysteine potentiates β -amyloid neurotoxicity, impairs DNA repair in hippocampal neurons and promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. Clinical studies confirmed the association of plasma homocysteine (t-Hcys) with AD risk. Hyperhomocysteinemia is associated with cognitive function impairment of AD. In a recent 8-year follow-up study, t-Hcys was a strong independent risk factor for the development of AD which was not related to vitamin B12 and folates. This suggested the implication of genetic factors. Several studies failed to find any association of *MTHFR* polymorphism with AD, but none of them evaluated this polymorphism in combination with the other genetic determinants of t-Hcys. The implication of B12 deficiency as a risk of AD remains hypothetical. In the OPTIMA study of patients with post-mortem histological diagnosis, the lower third of vitamin B12 distribution generated an odds ratio of 4.3. In a recent study from Sicily, we found that *TC*777 GG / CG – *MTHFR* 677 CC combined genotypes and homocysteine (upper quartile) were two potent risk factors for occurrence of AD, with respective odds ratio of 10.14 (P = 0.0104) and 3.43 (P =

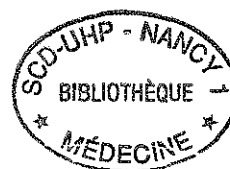
0.0098). *MTHFR* mutated genotype increased the AD risk related to homocysteine and Apoprotein E – Allele $\epsilon 4$ by 2.4 and 2.8, respectively.

Down syndrome (DS), or trisomy 21, is due to a failure of normal chromosomal segregation during meiosis. A deficiency in folates and methyl-donors may be associated with defective chromosome recombination and abnormal chromosome segregation. The *MTHFR* 677 C $\rightarrow$ T and *MTRR* 66 A $\rightarrow$ G polymorphisms are respectively associated with a risk of having a DS child of 1.9 – 2.6 and 2.6 in mothers of DS patients from North America. The combined *MTHFR* and *MTRR* polymorphisms are associated with a greater risk with an OR of 4.1 and 3.0, respectively in North America and Ireland. However, contradictory findings have been recently published in other European countries. In a recent case control study performed by our group in South Italy, homocysteine and *MTR* 2756 AG/GG genotype were significant risk factors for having a DS child, with OR of 6.7 ($P = 0.016$) and of 3.5 ($P = 0.028$), respectively. *MTR* 2756 AG/GG genotype increased also significantly the risk of being a DS case, with an OR of 3.8 ($P = 0.009$). In addition, we found that 677 TT and 677 CT/1298 AC genotypes of *MTHFR* and t-Hcys were 3 potent risk factors for advanced mental retardation of DS patients.

The pathogenic mechanism of spina bifida (neural tube defect, NTD), one of the most common congenital malformation remains poorly understood. A reduction of the risk of NTD by folate supplementation was reported for women who had previously had an affected pregnancy. The implication of *MTHFR* 677 C $\rightarrow$ T polymorphism in the pathogenesis of NTD can be questioned, because of contradictory findings. A meta-analysis of case control studies in various western countries calculated odds ratios of 1.8 and 2.0 for NTD patients and NTD mothers, respectively. However, such a risk was not found for NTD mothers, in South Italy and in Great Britain. A combined heterozygosity for the 677 C $\rightarrow$ T mutation and for a second polymorphism, 1298 A $\rightarrow$ C of *MTHFR*, was found also to increase the relative risk of NTD in The Netherlands. The 66 A $\rightarrow$ G polymorphism of *MTRR*, combined with a low level of vitamin B12, increases the risk of NTD and having a NTD child, with a respective OR of 2.5 and 4.8. In the presence of combined homozygous mutant genotypes of *MTHFR* and *MTRR*, children and mothers had a 4-fold and 3-fold increase in risk respectively. More recently, a case control study from The Netherlands on NTD mothers failed to find an association of TC 777

mutated genotype with an increased risk to have a child with NTD. We studied the *MTHFR* 677 → CT in comparison with related polymorphisms in NTD cases and controls from Southern Italy. *TC* 777 GG and *MTRR* 66 GG mutated genotypes associated with *MTHFR* 677 CC wild type aggravated the risk with odds ratio of 2.4 ($P = 0.028$) and 4.5 ($P = 0.023$), respectively. In contrast, the odds ratio of *MTHFR* 677 TT was estimated at 0.1 ($P = 0.009$) and, considering data from Ireland, the Netherlands, Great Britain and Italy, it was negatively correlated with 677 TT frequency in the control populations

In conclusion, t-Hcys is a risk factor of AD and DS dementia and of neurological malformations such as NTD. However, contradictory data have been produced, concerning its nutritional and genetic determinants, which may correspond to differences in the environment and genetic characteristics of the populations. This illustrates the need for evaluating all the gene- nutrients and gene-gene interactions to better understand the involvement of the one carbone metabolism in the pathogenesis of these diseases.



Nom : Mr BRUNAUD
Prénom : Laurent

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

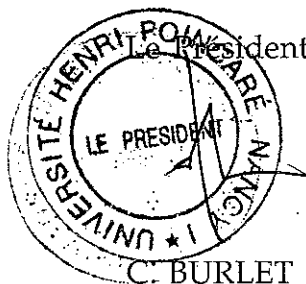
en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

Spécialité : BIOLOGIE CELLULAIRE

n° 821 VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 10 ju 2003

Le Président de l'Université



RESUME : La méthylation de l'ADN est considérée comme étant un mécanisme fondamental du contrôle épigénétique de l'expression des gènes et de la maintenance de l'intégrité du génome. Les déterminants de la méthionine synthase et de l'hypométhylation de l'ADN sont peu connus. La présence de taux faibles de folates plasmatiques est un déterminant de l'hyperhomocystéinémie alors que la présence de taux faibles en vitamine B12 est un facteur déterminant de l'activité méthionine synthase et de l'hypométhylation globale chez le rat F344. La vitamine B12 affecte l'expression de méthionine synthase par un mécanisme non-transcriptionnel différent d'un effet protecteur sur la protéolyse de méthionine synthase. Les déterminants nutritionnels de l'hypométhylation de l'ADN ont aussi un effet variable sur la carcinogénèse hépatique. Les carences alimentaires en choline / méthionine et/ou folates sont responsables de l'incidence de 20 % à 50 % d'hépatocarcinomes après 12 à 24 mois de survie chez le rat. L'ajout à ce régime d'une carence en vitamine B12 diminue l'incidence des hépatocarcinomes à < 5%. L'acétylation des histones induit une activation transcriptionnelle. L'utilisation d'un inhibiteur des histones déacetylases (Trichostatine A) permet d'induire l'augmentation de l'ARNm de gènes intervenant dans la captation d'iode par les cellules de cancers thyroïdiens. Cette modification de l'expression de gènes pourrait être utilisée en pratique clinique. Les déterminants génétiques (polymorphismes) de l'hyperhomocystéinémie et de l'hypométhylation sont impliqués dans l'incidence et la sévérité de la maladie d'Alzheimer, dans la physiopathologie de la trisomie 21 et des malformations du tube neural.

NUTRITIONAL AND GENETIC DETERMINANTS OF HOMOCYSTEINE AND DNA METHYLATION: EXPERIMENTAL MODELS AND IMPLICATIONS IN PHYSIOPATHOLOGY

SUMMARY: DNA methylation is an essential mechanism for epigenetic control of genes expression and for maintenance of genome integrity. Determinants of methionine synthase and DNA hypomethylation are not clear. Low blood folate is the main determinant of hyperhomocysteinemia, while low vitamin B12 is the main determinant of methionine synthase activity and DNA hypomethylation. Vitamin B12 affects methionine synthase expression by a non-transcriptional mechanism different from a protective effect on MTR proteolysis. Nutritional determinants of DNA hypomethylation also have a variable effect on liver carcinogenesis. Choline / methionine and/or folate deficient diets are responsible for an incidence of 20 % to 50 % of hepatocarcinoma after 12 to 24 months survival in rats. When vitamin B12 is withdrawn from this deficient diet, incidence of hepatocarcinoma decreases and is estimated to < 5%. The use of histone deacetylase inhibitors (Trichostatin A) induces an increase of mRNA of genes that are involved in iodine captation by thyroid cancer cells. This could be used in clinical trials. Genetic determinants of hyperhomocysteinemia and hypomethylation are involved in Alzheimer's disease severity and in the pathophysiology of Down syndrome and neural tube defects.

DISCIPLINE: Biologie, Santé et Environnement.

MOTS CLES : rats, vitamine B12, folates, méthylation de l'ADN, acétylation des histones, foie, cancer, expression des gènes, thyroïde

ADRESSE : Laboratoire de pathologie cellulaire et moléculaire en nutrition, EMI-INSERM 0014, Faculté de Médecine de Nancy – Université Henri Poincaré
9, Avenue de la Forêt de Haye – 54505 Vandoeuvre lès Nancy Cedex France.