



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>



UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY I

- FACULTÉ DE MÉDECINE -

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Ecole doctorale : *Biologie Santé Environnement*

Spécialité : *Biologie cellulaire - Nutrition*

Par

Jean-Marc ALBERTO



**Influence des déterminants nutritionnels de l'homocystéine
sur la stéatose hépatique chez le rongeur**

Thèse soutenue publiquement le 17 Novembre 2006

Directeur de thèse : Pr. Jean-Louis Guéant *Professeur des Universités, Nancy I*

Membres du jury :

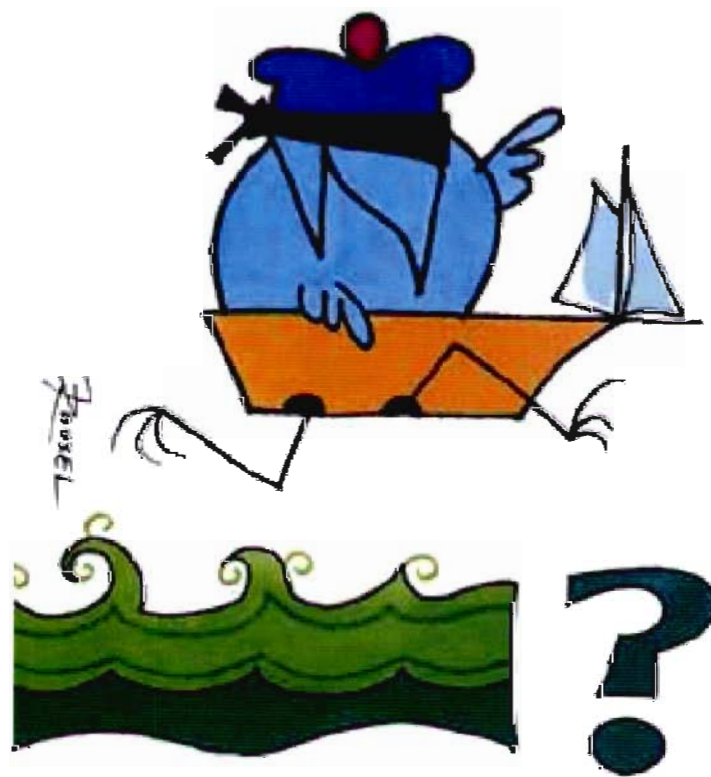
Président : Pr. Olivier Ziegler (Professeur des Universités, Nancy I)

Rapporteurs : Dr. Patrick Brachet (Chargé de Recherches INRA, Clermont - Theix)
Dr. Jean Giudicelli (Maître de Conférences, Nice Sophia - Antipolis)

Examineurs : Dr. Gilbert Briand (Maître de Conférences, Lille II)
Dr. Jean-Luc Daval (Directeur de Recherches, INSERM U724, Nancy)
Pr. Stéphane Desobry (Professeur des Universités, ENSAIA - INPL)



Les devises Shadok



QUAND ON NE SAIT PAS DÙ L'ON VA,
IL FAUT Y ALLER !!...
... ET LE PLUS VITE POSSIBLE.

Remerciements

Je remercie en premier lieu le Pr. Jean-Louis Guéant, Directeur de l'unité Inserm U-724, qui m'a dirigé durant ces années de thèse. Sa vitalité et ses intarissables connaissances forcent le respect. Je le remercie sincèrement pour toutes les responsabilités qu'il m'accorde et j'espère lui faire honneur par la présentation de ce mémoire de thèse

Je tiens à remercier le docteur Jean Giudicelli et le docteur Patrick Brachet pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire. J'espère pouvoir montrer ici le signe de ma reconnaissance la plus sincère.

Pour l'honneur qu'ils me font de participer au jury de ma soutenance de thèse, je remercie le docteur Gilbert Briand, le docteur Jean-Luc Daval, le professeur Stéphane Desobry ainsi que le professeur Olivier Ziegler, qui ont bien voulu évaluer ce travail.

Je remercie, pour leur participation indispensable et le plaisir que j'ai eu à travailler avec eux, les Dr. Sandrine Ortiou, Laurent Brunaud et Ahmet Ayav. J'adresse à Sébastien Blaise toute l'expression de mon amitié. Outre le scientifique passionné et dynamique, j'ai rencontré un ami sincère (malgré tes sarcasmes pas toujours justifiés sur notre bien aimée équipe de l'OM).

Je tiens à remercier Philippe Gérard et Emmanuelle Nédélec pour leur collaboration, et surtout leur immense sympathie. Je remercie également le personnel du laboratoire de biochimie du CHU, en particulier Sylvie Thirion, Marie-Bénédicte Nicolas, Françoise Dubois et Jean-Pierre Huet pour s'être impliqués dans ce travail.

Pour leurs conseils avisés et leur regard pertinent sur la recherche, je remercie chaleureusement Anne-Catherine Helfer, Céline Chery, Shyue Fang Hsu-Battaglia, Nadir M'Rabet et Marc Merten.

Pour les différentes occasions où nous avons pu travailler ensemble, mais surtout pour les instants de franches rigolades, je salue Sandra, Romain, Véronique, Juliette, Marion et Nassila

Je salue également tous les autres membres de notre unité, des plus anciens aux petits derniers, qui rendent notre travail plus joyeux.

Je salue et remercie pour leur soutien sans faille, mes parents, Fred et sa petite famille, belle-maman, Jacky, Crystel et Enzo.

Je dédie ce travail à Daisy, Garance et Nathalie qui m'ont toujours encouragé. Ils sont pour moi une bulle d'oxygène et un moteur pour construire l'avenir...



UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY I

- FACULTÉ DE MÉDECINE -

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Ecole doctorale : *Biologie Santé Environnement*

Spécialité : *Biologie cellulaire - Nutrition*

Par

Jean-Marc ALBERTO

**Influence des déterminants nutritionnels de l'homocystéine
sur la stéatose hépatique chez le rongeur**

Thèse soutenue publiquement le 17 Novembre 2006

Directeur de thèse : Pr. Jean-Louis Guéant *Professeur des Universités, Nancy I*

Membres du jury :

Président : **Pr. Olivier Ziegler** (Professeur des Universités, Nancy I)

Rapporteurs : **Dr. Patrick Brachet** (Chargé de Recherches INRA, Clermont - Theix)
 Dr. Jean Giudicelli (Maître de Conférences, Nice Sophia - Antipolis)

Examineurs : **Dr. Gilbert Briand** (Maître de Conférences, Lille II)
 Dr. Jean-Luc Daval (Directeur de Recherches, INSERM U724, Nancy)
 Pr. Stéphane Desobry (Professeur des Universités, ENSAIA – INPL)

INTRODUCTION	6
ABREVIATIONS	11
GLOSSAIRE	13
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1. Métabolisme de l'homocystéine	16
1.1. Propriétés de l'homocystéine	16
1.1.1. Synthèse de l'homocystéine chez les mammifères	16
1.1.2. Transport, distribution et élimination de l'homocystéine	18
1.2. Homocystéine, précurseur de la méthionine	20
1.2.1. Méthionine synthase et cycle de reméthylation de l'homocystéine	20
1.2.2. Bétaïne-homocystéine méthyltransférase et voie de dégradation de la bétaïne	22
1.2.3. Homocystéine et potentiel de méthylation	24
1.2.3.1. Méthionine adénosyltransférase et synthèse de la S-adénosylméthionine	25
1.2.3.2. Rapport SAM/SAH : point de contrôle du métabolisme de l'homocystéine	27
1.2.3.3. Equilibre homocystéine et SAH : conséquences sur l'activité des méthyltransférases	29
1.3. Catabolisme de l'homocystéine.	30
1.3.1. La voie de transsulfuration	30
1.3.2. Régulation du Glutathion par la synthèse de cystéine	32
1.3.3. Autres dérivés de l'homocystéine (Taurine, H ₂ S)	35
2. Déterminants génétiques et nutritionnels de l'homocystéine	36
2.1. Déterminants génétiques	36
2.1.1. Méthylène tétrahydrofolate réductase	36
2.1.2. Méthionine synthase et Méthionine synthase réductase	37
2.1.3. Cystathionine-β-synthase	37
2.1.4. Transcobalamine II	38
2.2. Déterminants nutritionnels	38
2.2.1. Vitamine B12 (cobalamine)	39
2.2.2. Vitamine B9 (acide folique)	41
2.2.3. Autres vitamines (B6, B2 et choline/bétaïne)	44
3. Effets cellulaires et tissulaires de l'homocystéine	46
3.1. Réactivité des thiols réduits	46
3.2. Homocystéine thiolactone et paraoxonase	47
3.3. Acide homocystéique	48
3.4. Réticulum Endoplasmique et stress lipidique	48
3.5. Homocystéine et régulation de l'expression génique	49
4. Modèles expérimentaux d'étude de l'homocystéine	50
4.1. Modèle de souris CBS <i>knockout</i>	50
4.1.1. Production du modèle de souris CBS <i>knockout</i>	51
4.1.2. Caractéristiques morphologiques et biochimiques des souris CBS <i>knockout</i>	52

4.1.3. Autres modèles de souris transgéniques impliquant le cycle de reméthylation de l'homocystéine, et conduisant à une stéatose hépatique	55
4.2. Régimes déficients entraînant un hyperhomocystéinémie modérée	57
4.2.1. Modèles nutritionnels déficients en précurseurs méthylés	57
4.2.2. Modèle nutritionnel conduisant à une hyperhomocystéinémie	58
4.2.3. Modèle nutritionnel hyperhomocystéinémique conduisant à une stéatose hépatique	59
4.2.4. Modèles combinés <i>cbs</i> +/- et régime hyperhomocystéinémiant	59
5. Implication de l'homocystéine dans les pathologies hépatiques et cérébrales : marqueur biologique ou facteur déterminant ?	60
5.1. stéatose hépatique et homocystéine	61
5.1.1. Stéatose hépatique	61
5.1.2. Déficience en carnitine et stéatose hépatique	62
5.1.3. Fonctions de la carnitine	63
5.1.4. Régulation de la synthèse de la carnitine	64
5.2. Homocystéine et insulino-résistance	64
5.3. Homocystéine, et événements précoces de la vie	67
5.3.1. Trisomie 21	67
5.3.2. <i>spina bifida</i>	68
5.4. Maladies neurodégénératives liées à l'homocystéine	70
5.4.1. Maladie d'Alzheimer	70
5.4.2. Maladie de Parkinson	71
 OBJECTIFS DE LA THESE	 72
 MATERIELS ET METHODES	 74
1. Modèles d'étude	75
1.1. Entretien des animaux	75
1.2. Sacrifice et prélèvements	76
1.3. Etude histopathologique	76
2. Dosages sanguins	77
2.1. Vitamines B12 et B9 (folates)	77
2.2. Homocystéine	78
2.3. Coefficient d'activation de la Glutathion réductase érythrocytaire (EGRAC)	78
2.4. Transaminases (ASAT/ALAT)	79
3. Dosages hépatiques	80
3.1. Marqueurs hépatiques du métabolisme de l'homocystéine	80
3.1.1. Méthionine synthase	80
3.1.2. Méthylène-tétrahydrofolate réductase	82
3.1.3. Bétaïne-homocystéine méthyltransférase	84
3.1.4. Méthionine adénosyltransférase	87

3.1.5. Cystathionine- β -synthase	89
3.1.6. Ratio S-adénosylméthionine / S-adénosylhomocystéine (SAM/SAH)	90
3.1.7. Méthylation d'ADN	91
3.1.8. Cytochrome c N-lysine:SAM méthyltransférase (CLMT)	93
3.2. Marqueurs du stress oxydant	95
3.2.1. Glutathion peroxydase (GPX)	95
3.2.2. Superoxyde dismutase (SOD)	97
3.2.3. Glutathion oxydé et réduit (GSSG/GSH)	98
3.2.4. Glutathion S-réductase (GSR)	99
3.2.5. Malondialdéhyde et hydroxynanolone (MDA/HNE)	100
3.2.6. Carnitines et acylcarnitines	100
3.2.7. <i>Western blotting</i>	101
RESULTATS	104
1. Modèles chirurgicaux	105
1.1. Gastrectomie et déficience en vitamine B12	105
1.2. Thyroïdectomie et homocystéine	107
2. Conséquences d'un régime <i>methyldeficient</i>	111
2.1. Sur la gestation et l'allaitement des rates	111
2.2. Sur la progéniture	113
2.2.1. Développement corporel des ratons	113
2.2.2. Etude histopathologique sur les hépatocytes	114
2.2.3. Dosages sanguins et hépatiques des déterminants nutritionnels de l'homocystéine	117
3. Marqueurs hépatiques du métabolisme de l'homocystéine	118
3.1. Chez le rat <i>methyldeficient</i>	123
3.2. Chez la souris transgénique <i>cbs -/-</i>	123
4. Marqueurs hépatiques du stress oxydant	128
4.1. Chez le rat <i>methyldeficient</i>	128
4.2. Chez la souris transgénique <i>cbs -/-</i>	130
5. Activité Cytochrome c-N-lysine méthyltransférase et métabolisme de la carnitine	131
5.1. Activité CLMT	131
5.2. Concentrations en carnitines	133
6. Effets d'un retour à un régime normal pour le raton issu de mère carencé	136

DISCUSSION	138
1) Les modèles chirurgicaux	139
a) Gastrectomie totale	139
b) Thyroïdectomie totale	140
2) Métabolisme de l'homocystéine chez les rats <i>methyldeficients</i>	140
3) Niveau du stress oxydant chez les rats <i>methyldeficients</i>	146
4) Métabolisme de l'homocystéine chez les souris transgéniques <i>cbs -/-</i>	150
5) Niveau du stress oxydant chez les souris transgéniques <i>cbs -/-</i>	155
6) Conclusions	157
CONCLUSION GENERALE	161
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164
PUBLICATIONS	173

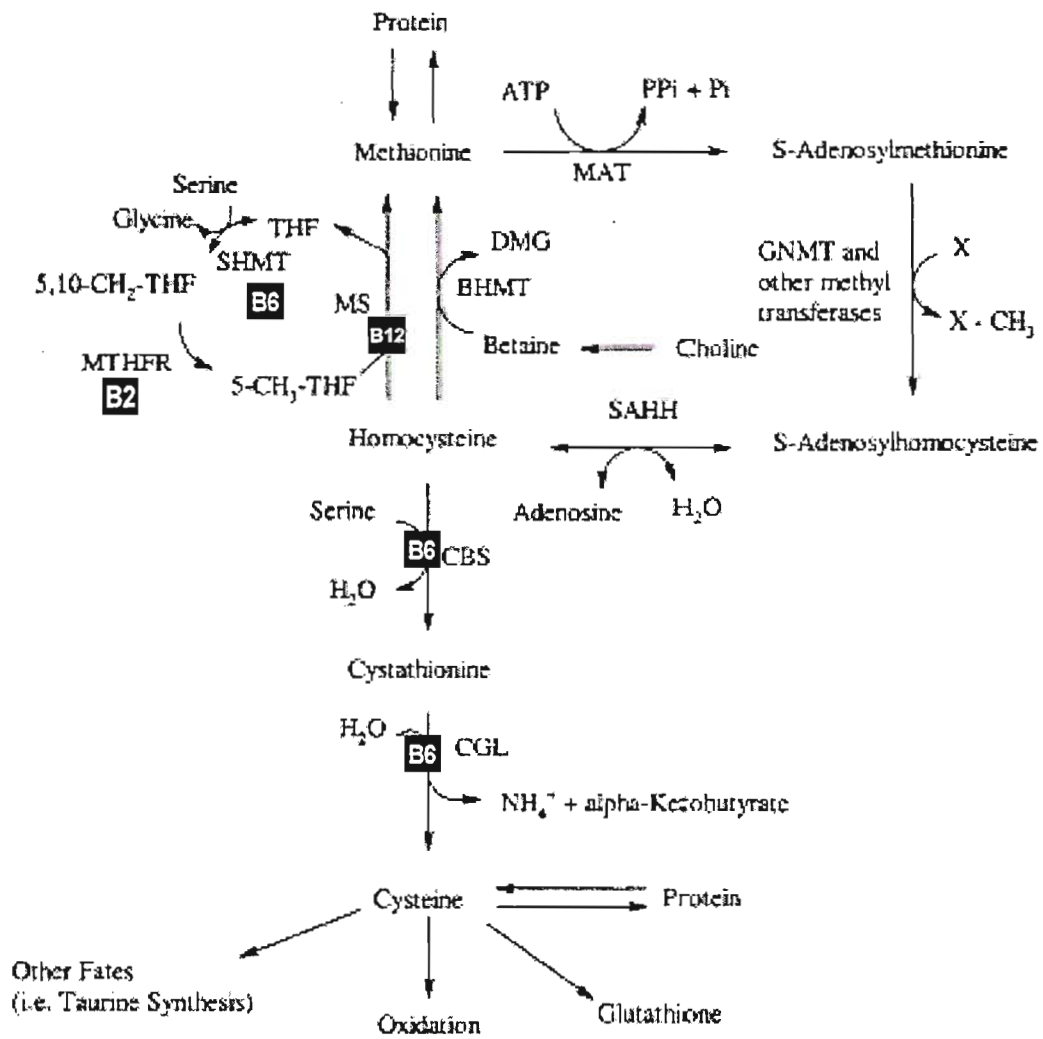
INTRODUCTION

Le laboratoire de Pathologie cellulaire et moléculaire en nutrition, INSERM U-724, étudie depuis plusieurs années les déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme de l'homocystéine.

L'homocystéine est un acide aminé comportant un groupement thiol réducteur. C'est un intermédiaire essentiel dans le métabolisme de la méthionine chez les mammifères. Chaque composé, la méthionine et l'homocystéine, est le précurseur de l'autre. Le cycle de la méthionine est ubiquitaire, et sert de base métabolique à cette relation, alors que le catabolisme de l'homocystéine est restreint à certains tissus.

Les premiers symptômes, liés à la disruption d'une de ces voies métaboliques et entraînant une homocystinurie, ont été observés sur des patients victimes de maladies métaboliques rares et congénitales. Des études plus récentes ont été développées autour de l'hyperhomocystéinémie, qui est associée à l'apparition de stéatose hépatique, aux maladies cardiovasculaires, à des défauts de fermeture du tube neural ou encore à des maladies neurodégénératives.

Les articles publiés en rapport avec ce travail de thèse ont permis de mieux comprendre l'influence des déterminants nutritionnels et génétiques de l'homocystéine sur le métabolisme des monocarbones, et leur importance dans l'apparition de certaines pathologies, telle que la stéatose hépatique.



Métabolisme de l'homocystéine (d'après Wijekoon, 2004)

Publications dans des revues Internationales

- 1: **Alberto* JM**, Blaise* S, Briand G, Nicolas B, Daval JL, Guéant JL, Hepatic steatosis in developing rats from dams subjected to a methyl deficient diet is related to a defective synthesis of carnitine. (en cours de soumission)
- 2: Blaise S, Nédélec E, Schroeder H, **Alberto JM**, Bossenmeyer-Pourie C, Guéant JL, Daval JD. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-induced brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol*, 2006 (accepté)
- 3: Blaise S, **Alberto JM**, Nedelec E, Ayav A, Pourie G, Bronowicki JP, Gueant JL, Daval JL. Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr Res*. 2005 Jun;57(6):777-82.
- 4: Gaume V, Figard H, Mouglin F, Guilland JC, **Alberto JM**, Gueant JL, Alber D, Demougeot C, Berthelot A. Effect of a swim training on homocysteine and cysteine levels in rats. *Amino Acids*. 2005 May;28(3):337-42.
- 5: Ayav A, **Alberto JM**, Barbe F, Brunaud L, Gerard P, Merten M, Gueant JL. Defective remethylation of homocysteine is related to decreased synthesis of coenzymes B2 in thyroidectomized rats. *Amino Acids*. 2005 Feb;28(1):37-43.
- 6: Ortiou S, **Alberto JM**, Gueant JL, Merten M. Homocysteine increases methionine synthase mRNA level in Caco-2 cells. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14(4-6):407-14.
- 7: **Alberto* JM**, Brunaud* L, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L, Braun M, Bronowicki JP, Bresler L, Gueant JL. Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats. *Digestion*. 2003;68(2-3):133-40.
- 8: Namour F, Helfer AC, Quadros EV, **Alberto JM**, Bibi HM, Orning L, Rosenblatt DS, Jean-Louis G. Transcobalamin deficiency due to activation of an intra exonic cryptic splice site. *Br J Haematol*. 2003 Dec;123(5):915-20.
- 9: Brunaud L, **Alberto JM**, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L, Braun M, Bronowicki JP, Bresler L, Gueant JL. Effects of vitamin B12 and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver. *Clin Chem Lab Med*. 2003 Aug;41(8):1012-9. Review.

* les auteurs ont participé d'une manière équivalente à ce travail.

Communications orales dans un congrès

1: **Alberto JM**, Blaise S, Briand G, Nicolas B, Daval JL et Guéant JL. *Métabolisme de l'homocystéine et stress oxydant : comparaison des modèles d'animaux carencés ou transgéniques*. Symposium franco-italien "Vitamines, biofacteurs et vieillissement", 21-24 juin 2006.

2: **Alberto JM**, Robert K, Blaise S, Janel N, Guéant JL. *Métabolisme de l'homocystéine et stéatose hépatique chez la souris cbs -/-*. VIIIe journées nationales Homocystéine (Bordeaux, 24-25 octobre 2003).

Présentation de poster dans un congrès

1: **Alberto JM**, Robert K, Blaise S, Bronowicki JP, Janel N et Guéant JL. *Métabolisme de l'homocystéine et stéatose hépatique chez la souris cystathionine- β -synthase -/-*. Journées francophones de pathologie digestive, 5-6 avril 2004.

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AdoCbl	Adénosylcobalamine
ANC	Apports nutritionnels conseillés
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthydiuim
BHMT	Bétaïne-Homocystéine méthyltransférase
bp	<i>base pair</i> - paire de base
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> - Albumine de sérum bovin
Cbl	Cobalamine ou vitamine B12
Cbl(I), (II), (III)	Cobalamine au degré d'oxydation (I), (II) ou (III)
CBS	Cystathionine- β -synthase
CGL	Cystathionine- γ -lyase
CH ₂ -THF	Méthylènetétrahydrofolate
CH ₃ -THF	Méthyltétrahydrofolate
Ci	Curie
CNCbl	Cyanocobalamine
CoA	Coenzyme-A
cpm	coups par minute
Da	Dalton
DHF	Dihydrofolate
DHFR	Dihydrofolate réductase
DMG	Diméthylglycine
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i> - ADN méthyltransférase
DTT	Dithiotréitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGRAC	<i>Erythrocytic glutathione reductase activating coefficient</i> (Coefficient d'activation de la Glutathion réductase érythrocytaire)
FAD	Flavine adéninedinucléotide oxydé
FADH ₂	Flavine adéninedinucléotide réduit
FI	Facteur intrinsèque
FMN	Flavine mononucléotide oxydé
FMNH ₂	Flavine mononucléotide réduite
GNMT	Glycine-N méthyltransférase
GSH	Glutathion réduit
GSH total	Glutathion total
GSSG	Glutathion oxydé
Hcy	Homocystéine
hHcy	Hyperhomocystéinémie
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> - Chromatographie liquide à haute performance
Kd	Constante de dissociation
K _M	Constante de Michaelis
Ki	Constante d'inhibition
LGRAC	<i>Liver glutathione reductase activating coefficient</i> (coefficient d'activation de la Glutathion réductase érythrocytaire)
MAT	Méthionine adénosyltransférase
MeCbl	Méthylcobalamine
MéthylèneTHF	Méthylènetétrahydrofolate

MéthylTHF	Méthyltétrahydrofolate
MMA	<i>Methylmalonic acid</i> - Acide méthylmalonique
MMCoA	Méthylmalonylcoenzyme A
MTHFR	Méthylènetétrahydrofolate réductase
MTR	Méthionine synthase
MTRR	Méthionine synthase réductase
NAD ⁺	Nicotinamide adéninedinucléotide oxydé
NADH,H ⁺	Nicotinamide adéninedinucléotide réduite
NADP	Nicotinamide adéninedinucléotide phosphate oxydé
NADPH,H ⁺	Nicotinamide adéninedinucléotide phosphate réduite
NMDA	N-Méthyl-D-aspartate
<i>Northern blot</i>	Détection des ARN par hybridation avec une sonde marquée
OHCbl	Hydroxocobalamine
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEMT	Phosphatidylétanolamine méthyltransférase
PLP	Phosphate de pyridoxal (vitamine B6)
PPi	Pyrophosphate
Pi	Phosphate inorganique
RE	Réticulum endoplasmique
RFC	Récepteur cellulaire aux folates
RIA	<i>Radioimmuno assay</i>
RNase	Ribonucléase
RT	<i>Reverse transcription</i> - Transcription inverse
SAH	Sulfonium-adénosyl-L-homocystéine
SAHH	Sulfonium-adénosyl-L-homocystéine hydrolase
SAM	Sulfonium-adénosyl-L-méthionine
SHMT	Sérine hydroxyméthyltransférase
SDS	Sodium dodécylsulfate
SOD	Superoxyde dismutase
<i>Southern blot</i>	Détection des ADN par hybridation avec une sonde marquée
SVF	Sérum de veau foetal
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TC II	Transcobalamine II
THF	Tétrahydrofolate
VLDL	<i>Very Low density lipoprotein</i>
<i>Western blot</i>	Détection des protéines par immuno-empreinte

- **Alzheimer (maladie d') :** Atteinte chronique, d'évolution progressive, d'une partie du cerveau, caractérisée par une altération intellectuelle irréversible aboutissant à un état démentiel. La dégénérescence nerveuse inéluctable, due à la diminution du nombre de neurones avec atrophie du cerveau et présence de "plaques séniles", caractérise biologiquement cette maladie.

- **Anémie mégaloblastique :** Variété d'anémie due à une dysérythropoïèse, au cours de laquelle le volume moyen est supérieur à $100-110 \mu\text{m}^3$, et le myélogramme riche en mégalo blastes (érythroblastes dystrophiques). Les cellules mégalo blastiques se caractérisent par leur très grande taille et par la présence de chromatine très fine. L'anémie de Biermer est appelée également anémie d'Addison, il s'agit d'une anémie par carence en vitamine B12 ou anémie pernicieuse (du fait de la mortalité qu'elle entraînait par le passé). La carence en vitamine B12 dont elle est la conséquence, est due à un manque de sécrétion de facteur intrinsèque.

- **Athérosclérose :** Terme utilisé pour désigner la perte d'élasticité des artères due à la sclérose provoquée par l'accumulation de corps gras (lipides, essentiellement cholestérol LDL) au niveau d'une des trois tuniques constituant la paroi des artères (l'intima) et intéressant avant tous les grosses et les moyennes artères. La variété de lipides concernée porte le nom d'athérome.

- **Cirrhose hépatique :** Perte de l'architecture normale du foie définie par la présence d'une fibrose annulaire mutilante entourant des nodules de régénération, et contenant des canaux biliaires néoformés ou des néoductules. Elle est le plus souvent en rapport avec l'évolution d'une stéato hépatite alcoolique, d'une hépatite virale ou autre.

- **Fibrose :** Lésion non spécifique caractérisée par une hyperplasie (augmentation de la masse) des tissus conjonctifs avec prolifération des fibroblastes élaborant du collagène.

- **Homocystinurie :** Présence d'homocystéine dans les urines. Maladie enzymatique secondaire à un trouble du fonctionnement de la méthionine par

défaut de l'activation cystathionine- β -synthase. L'homocystinurie se caractérise par des anomalies du squelette, une déformation de la colonne vertébrale, une arachnodactylie (longueur exagérée des doigts et des orteils, dont les os sont graciles, on parle de doigts en pattes d'araignée), des problèmes oculaires avec myopie sévère, une atteinte du cristallin (subluxation), un glaucome (augmentation de la pression à l'intérieur du globe oculaire), cataracte, un retard mental (débilité), des convulsions et des troubles vasculaires.

- **Ischémie :** Terme physiopathologique désignant l'arrêt de l'apport sanguin artériel dans un territoire donné de l'organisme.

- **Parkinson (maladie de) :** Maladie neurologique touchant environ 1 à 2 % de la population âgée de plus de 50 ans, due à la dégénérescence des cellules nerveuses d'une zone située à l'intérieur du cerveau : le locus niger et se caractérisant par un tremblement, une lenteur des mouvements et une raideur.

- **Thrombose :** Coagulation du sang *in vivo* dans une cavité vasculaire ou le coeur. Le produit de la coagulation survenue dans ces conditions s'appelle un thrombus.

Sources :

Encyclopédie vulgaris-médical (<http://www.vulgaris-medical.com/>).

Glossaire d'anatomopathologie, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques de l'hôpital Necker-Enfants, Paris

(<http://www.anapath.necker.fr/ENSEIGN/GlossaireAP/GloGes/GloISFRA.html>)

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Métabolisme de l'homocystéine

1.1. Propriétés de l'homocystéine

1.1.1. Synthèse de l'homocystéine chez les mammifères

L'homocystéine (acide 2-amino-4-mercaptobutyrique) est un acide aminé porteur de groupement thiol réducteur (**HS-CH₂-CH₂-CH(NH₂)COOH**). Cet acide aminé n'est pas absorbé par l'alimentation et il n'intervient pas dans la synthèse peptidique.

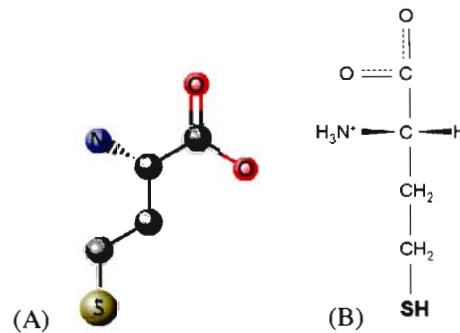


Figure 1 : Formule développée (A) et en représentation de Fisher (B) de l'homocystéine

La seule source d'homocystéine chez les mammifères provient de la S-adenosylhomocystéine hydrolase (SAHH, EC 3.3.1.1), une enzyme ubiquitaire qui libère une molécule d'homocystéine et d'adénosine par molécule de SAH hydrolysée (Figure 2), selon un mécanisme séquentiel ordonné faisant intervenir successivement le NAD⁺ (libérant du NADH,H⁺) et le NADH,H⁺ (libérant le NAD⁺).

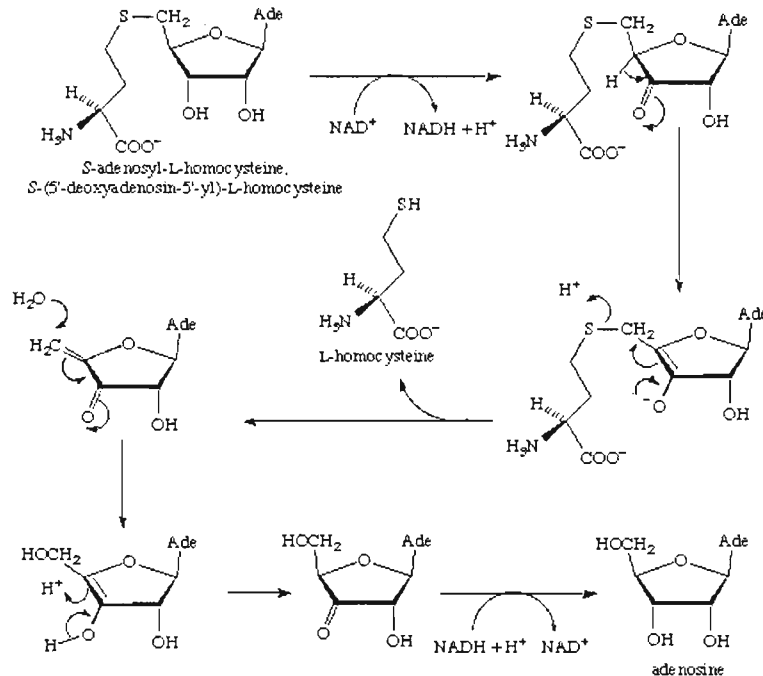


Figure 2 : Mécanisme de synthèse de l'homocystéine par la SAH hydrolase (SAHH). La SAHH oxyde le groupement hydroxyle (position C3') pour former un carbonyl. Les électrons de l'hydrogène en C4' attaquent le carbone en 5', libérant un proton et formant une double liaison C3'=C4' qui aboutit à 2 carbones C3' et C4' sp2 (plans). Les électrons de la liaison C5'-S attaquent le proton pour libérer l'homocystéine. Une molécule d'eau permet ensuite l'hydroxylation du carbone C5' et le retour à un carbone C5' (sp3, tétraédrique) et un carbone C3' carbonylé. Le $NADH, H^+$ transfère 2 protons et 2 électrons sur le C3' pour libérer la molécule d'adénosine (Palmer, 1979).

Au bilan, le $NADH, H^+$ produit est oxydé aussitôt par la SAHH, ce qui rend cette réaction énergétiquement nulle (Palmer, 1979).

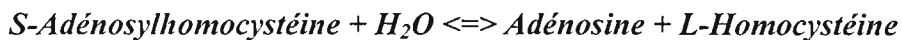


Figure 3 : Equation bilan de l'hydrolyse de la S-adénosylhomocystéine (SAH) par la SAH hydrolase.

Cette réaction est réversible et l'équilibre est déplacé sur la gauche dans les périodes d'hyperhomocystéinémie, favorisant la synthèse de SAH. Cet équilibre entre SAH et homocystéine joue un rôle déterminant pour l'activité des méthyltransférases S-adénosylméthionine dépendantes, ainsi que pour l'activité des enzymes du cycle de reméthylation de l'homocystéine.

1.1.2. Transport, distribution et élimination de l'homocystéine chez les mammifères

Transport : Il n'existe qu'une faible proportion d'homocystéine libre dans le sang (Figure 4). En effet, si la concentration plasmatique moyenne chez l'homme est d'environ 6-12 μM , la forme réduite (-SH) ne représente que 1-2 % (Mudd, 2000) de l'homocystéine totale (tHcy). D'autres homocystéines circulent sous la forme de ponts disulfures libres Hcy-Hcy (homodimère) ou Hcy-Cys (hétérodimère), et de manière assez rare sous la forme Hcy-Cys/gly (20 % de l'homocystéine totale). 75-80 % de l'homocystéine totale circule sous forme de ponts disulfures avec des cystéines d'albumine (Figure 4).

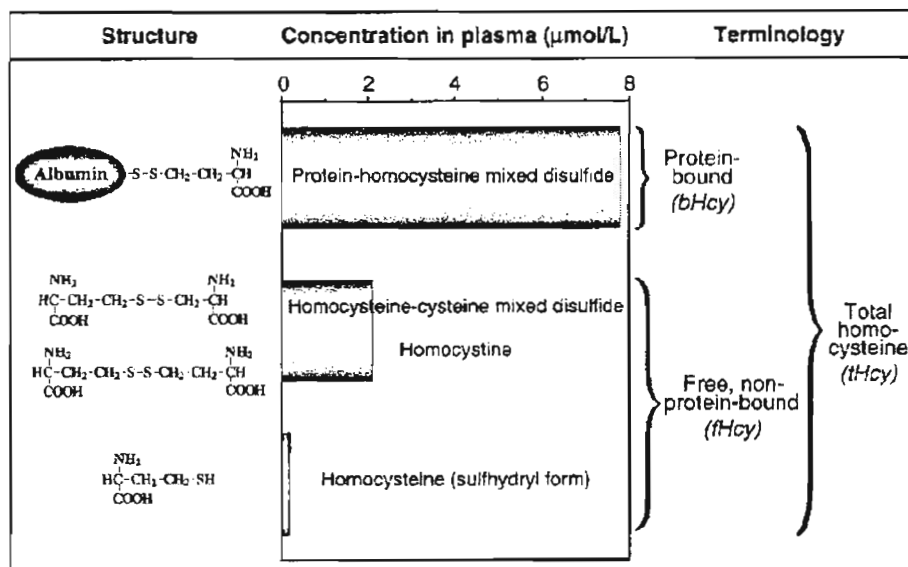


Figure 4 : Différentes formes de transport de l'homocystéine dans le plasma humain. La forme majoritaire étant la sulphydrilation des cystéines de l'albumine (d'après Mudd, 2000).

Il apparaît chez certains patients des variations de concentrations dues à des facteurs génétiques et/ou des déséquilibres alimentaires qui peuvent conduire à des hyperhomocystéinémies modérées (12-30 μM), intermédiaires (30-100 μM), voire sévères (> 100 μM) dans les cas les plus graves (e.g. dans le cas d'homocystinurie, un déficit congénital en Cystathionine- β -synthase, Cf. glossaire). L'hyperhomocystéinémie peut être liée à des déficits nutritionnels en folate et vitamine B12 ou, de façon moins importante, en vitamine B6. Son augmentation est quelquefois secondaire à la prise de certains médicaments tels que les fibrates, le méthotrexate, les corticoïdes, etc.

L'augmentation plasmatique de l'homocystéine accentue les facteurs de risque de survenue d'accident vasculaire atteignant les artères et les veines (Nygard 1999). Diverses études épidémiologiques ont montré qu'une augmentation de l'homocystéinémie entre dans la liste des facteurs de risque cardio-vasculaires mais également cérébrovasculaires et des vaisseaux périphériques. C'est la raison pour laquelle cette élévation de la quantité dans le sang est susceptible d'entraîner des thromboses artérielles et veineuses. Une hyperhomocystéinémie modérée est observée chez les sujets de moins de cinquante ans qui sont atteints d'une insuffisance coronarienne aiguë (circulation coronaire défaillante) et chez les patients présentant une insuffisance de filtration rénale aiguë ou chronique (s'étalant dans le temps) soit sous hémodialyse soit déjà transplantés. L'hyperhomocystéinémie est aussi associée au développement de la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou encore à des défauts de fermeture du tube neural durant la période embryonnaire.

Exportation de l'Hcy dans le sang : L'homocystéine est produite dans toutes les cellules de l'organisme et apparaît comme la conséquence des réactions de méthylation qui libèrent de la S-adénylhomocystéine, conduisant ainsi à l'homocystéine. L'accumulation d'homocystéine peut être évitée par reméthylation en méthionine via la Bétaïne-homocystéine méthyltransférase (la BHMT, au niveau du foie et du rein) ou la Méthionine synthase (MTR, enzyme ubiquitaire). Elle peut être catabolisée en cystathionine par la Cystathionine- β -synthase (principalement le foie, le rein et le cerveau) dans la voie de transsulfuration. On voit donc la nécessité d'exporter et d'éliminer l'homocystéine qui peut s'accumuler de manière dramatique puisque toutes les cellules ne sont pas aptes à la métaboliser. La concentration intracellulaire d'homocystéine doit être régulée de manière stricte par les processus d'exportation car de fortes concentrations augmentent les taux de SAH, conduisant à l'inhibition de méthyltransférases (Hultberg 2003).

Des travaux ont montré que le rein est un organe majeur du métabolisme de l'homocystéine (Dudman, 1996; House 1997, 1998; Bostom 1998; Refsum, 1998; Selhub, 1999), notamment au niveau des cellules épithéliales bordant les segments du tube proximal (House, 1997). La portion proximale du néphron est aussi une cible primaire où les ions mercuriques organiques et inorganiques vont s'accumuler et exercer leur activité toxique. Diverses données bibliographiques ont récemment impliqué la formation de conjugués mercuriques de Cys, N-acétylcystéine, et glutathion dans le transport tubulaire proximal des formes organiques et inorganiques de mercure. Parmi ce groupe de thiols, l'homocystéine apparaît assez peu associée comme un ligand biologiquement important pour la fixation des

ions mercuriques. Dans un environnement aqueux, l'homocystéine (comme la cystéine et le glutathion) fixe les ions mercuriques organiques et inorganiques selon des liaisons de coordination. Après avoir vérifié *in vivo* que l'homocystéine formait des liaisons de coordination avec le Mercure (Hg), Zalups *et al.* (2005) ont montré que les conjugués Hcy-Hg-Hcy étaient absorbés à la fois dans la lumière et dans les membranes basolatérales des cellules épithéliales tubulaires du rein. Des transporteurs d'acides aminés seraient responsables de cette absorption dans la lumière car, *in vitro*, le système hétérodimérique de transport des acides aminés (b⁰,+) a une forte affinité pour Hcy-Hg-Hcy. L'homocystéine n'est pas seulement un thiol plasmatique fixant les ions mercuriques, c'est aussi une molécule produisant un substrat conjugué (Hcy-Hg-Hcy) qui sera spécifiquement actif au niveau de ces transporteurs rénaux.

Au niveau du rein 20% de l'homocystéine plasmatique totale va être catabolisée par transsulfuration via la CBS (House 1997) produisant dans 78% des cas de la cystathionine et de la cystéine, tandis que seulement 2 % de l'homocystéine sera reméthylé en méthionine.

1.2. Homocystéine, précurseur de la méthionine

Du point de vue métabolique, l'homocystéine est le substrat de plusieurs enzymes qui peuvent modifier la balance redox intracellulaire (Glutathion-homocystine oxydoréductase, Paraoxonase), enclencher son catabolisme (Cystathionine- β -synthase) ou au contraire l'utiliser comme précurseur de la méthionine (Bétaïne-homocystéine méthyltransférase et Méthionine synthase)

1.2.1. Méthionine synthase et cycle de reméthylation de l'homocystéine

La reméthylation de l'homocystéine pour former de la méthionine est catalysée par une enzyme cytoplasmique : la ⁵Méthyltétrahydrofolate-homocystéine S-méthyltransférase (EC 2.1.1.13), appelée aussi Méthionine synthase (MTR). Cette enzyme existe dans tous les organismes cellulaires, mais chez les procaryotes, la MTR est cobalamine indépendante. Chez les eucaryotes, en revanche, la MTR requiert pour son activité un cofacteur enzymatique, la méthylcobalamine (MeCbl), forme active de la vitamine B12.

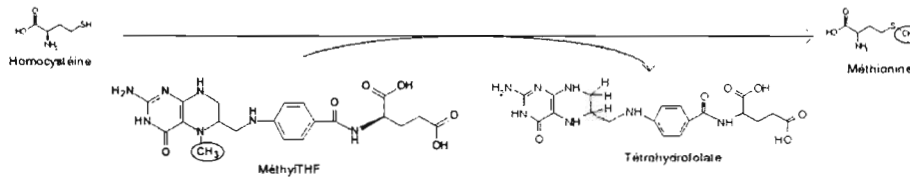


Figure 5 : Réaction de transméthylation du méthyltétrahydrofolate sur l'homocystéine catalysée par la Méthionine synthase vitamine B12 dépendante, pour former de la méthionine et du tétrahydrofolate.

La MTR est une enzyme ubiquitaire chez les mammifères, mais son expression n'est pas égale dans tous les tissus. En effet, des analyses par *Northern blot* (Chen, 1997 ; Li, 1996) ont montré que la MTR est exprimée principalement dans le cœur, le pancréas, le muscle squelettique, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires et le petit intestin. Elle est exprimée moyennement au niveau de la rate, du placenta et du cerveau, et faiblement dans les poumons, le foie, le rein et le colon. Un défaut dans l'activité de la MTR peut conduire selon la gravité à une anémie mégaloblastique, associée à une hyperhomocystéinémie modérée. La MTR joue aussi un rôle dans la tumorigenèse (Chen, 1997). Environ 50% des lignées cellulaires, dérivées de tumeurs, montrent une faible capacité à croître dans un milieu dépourvu de méthionine et enrichi en homocystéine et vitamine B12. Il existe des cellules capables de renverser ce processus de « méthionine dépendance », mais elles perdent alors les propriétés associées aux cellules tumorales. Cela suggère que l'auxotrophie pour la méthionine joue un rôle important dans la tumorigenèse.

La méthionine est un acide aminé essentiel qui provient du catabolisme des protéines. La méthionine est aussi produite par la MTR, et intervient comme substrat dans la réaction catalysée par la Méthionyl-tRNA synthétase (EC 6.1.1.10) :



Figure 6 : Activation de la méthionine par les aminoacid tRNA synthétases pour l'incorporation de la méthionine dans la synthèse peptidique.

La met-tRNA permet l'incorporation de la méthionine dans la synthèse protéique par une modification moléculaire catalysée par la Méthionyl-tRNA formyltransférase (EC 2.1.2.9) :

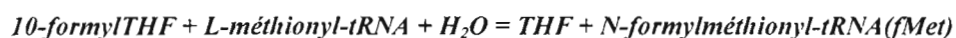


Figure 7 : Activation de la methionyl-tRNA en N-formylméthionyl-tRNA (fMet) par la Méthionyl-tRNA formyltransférase qui permet l'amorçage de la synthèse peptidique sur le codon AUG de l'ARN messenger.

Cette modification de la méthionine est le signal indispensable pour l'amorçage de la synthèse peptidique et on voit ici que la MTR joue un rôle primordial dans la survie cellulaire. Au niveau expérimental, il n'existe d'ailleurs pas de modèle animal transgénique dépourvu de cette enzyme.

Le rôle de la méthionine ne se limite pas à l'activation et l'incorporation dans la synthèse peptidique. C'est aussi le précurseur dans la synthèse de S-adénosylméthionine (SAM), un substrat indispensable à la méthylation de certaines molécules (ADN, ARN, protéines, hormones, neurotransmetteurs...). La consommation de SAM se fait par les méthyltransférases (plus d'une centaine) et conduit au relargage de SAH, précurseur de l'homocystéine. La MTR va palier aux besoins en méthionine pour la synthèse peptidique. Cela lui permet de réguler la balance entre la synthèse peptidique et les processus de méthylation indispensables à d'autres voies de signalisation (méthylation de promoteurs géniques, activation ou inactivation de protéines ou hormones) ou de biosynthèse (phosphatidylcholine, carnitine).

1.2.2. Bétaïne-homocystéine méthyltransférase et voie de dégradation de la bétaïne

La Bétaïne-Homocystéine méthyltransférase (BHMT, EC 2.1.1.5) est une enzyme cytosolique de 45 kDa, zinc dépendante, formant un hexamère de 270 kDa. Cette enzyme est non ubiquitaire car son expression est restreinte au foie et au rein chez l'homme et les autres mammifères. En effet, Sunden et Garrow (1997) ont montré par *Northern blot* et par *Western blot* que la BHMT n'est exprimée chez l'homme qu'au niveau du foie et du rein. Les autres organes testés (cœur, cerveau, placenta, poumon, pancréas et muscle squelettique) ne montrent aucune trace de synthèse de cette enzyme. Des études complémentaires ont aussi montré une absence totale de BHMT dans le thymus, la rate, les ovaires ou les testicules (Sowden, 1999).

Comme la Méthionine synthase (MTR), cette enzyme catalyse la reméthylation de l'homocystéine en méthionine, mais en utilisant la bétaïne, et non le Méthyltétrahydrofolate, comme donneur de méthyle (Sunden 1997).

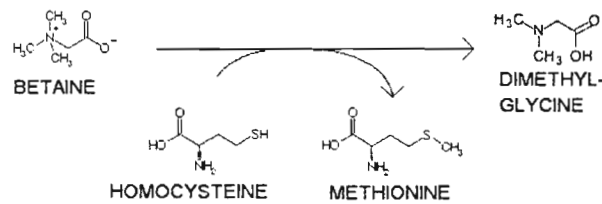


Figure 8 : Réaction de transméthylation de la bétaine sur l'homocystéine catalysée par la Bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT) pour former de la méthionine et de la diméthylglycine.

Il s'agit d'une réaction de transméthylation qui ne fait pas intervenir la SAM, donneur de méthyle le plus répandu, mais qui joue un rôle non négligeable dans le recyclage de l'homocystéine. En effet, des traitements à base de bétaine (voie orale) permettent de diminuer des taux dangereusement élevés d'homocystéine chez des patients souffrant d'homocystinurie (Garrow, 1996). La synthèse de méthionine par la BHMT représente environ 50% des réactions de méthylation de l'homocystéine au niveau du foie. Cette proportion peut être expliquée par les valeurs de K_M mesurées chez le porc qui sont de $48 \mu\text{M}$ pour la BHMT vis-à-vis de la bétaine et de $45 \mu\text{M}$ pour la MTR vis-à-vis du méthyltétrahydrofolate. Ces valeurs indiquent des affinités similaires entre ces deux enzymes, qui entrent donc en compétition au niveau du foie pour la reméthylation de l'homocystéine. La BHMT, à l'inverse de la MTR, serait inhibée par la S-adenosylméthionine (SAM), indiquant que l'activité de la BHMT est contrebalancée par la disponibilité en substrats méthylés (Finkelstein 1984). Ces résultats ont cependant été contredits par Bose *et al.* (2001) qui démontrent que la SAM n'a pas d'effet sur l'activité de la BHMT avec ou sans pré-incubation de l'inhibiteur.

Cette réaction de méthylation connecte le métabolisme des folates avec l'oxydation de la choline en bétaine (Figure 9) sous l'action successive d'une Choline oxydoréductase (EC 1.1.3.17) et d'une Bétaine aldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.8).

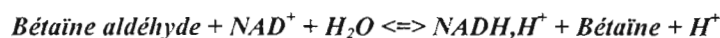


Figure 9 : Oxydation secondaire de la choline (triméthyléthanolamine) en bétaine (triméthylglycine) par l'action successive d'une Choline oxydoréductase et d'une Bétaine aldéhyde déshydrogénase.

La BHMT est aussi la troisième des cinq enzymes intervenant dans le catabolisme de la choline, produit de dégradation de la phosphatidylcholine ou de la l'acétylcholine au niveau de la matrice mitochondriale.

Les 2 dernières réactions du catabolisme de la choline vont conduire à la transméthylation de la diméthylglycine puis de la sarcosine (méthylglycine) sur le tétrahydrofolate. Cela permet de régénérer le cycle des folates en produisant du N⁵,N¹⁰-méthylènetétrahydrofolate et en libérant la glycine comme produit final. Cette dernière réaction est réversible mais la reméthylation de la glycine fait intervenir une Glycine N-méthyltransférase, SAM dépendante, pour former de la sarcosine, et libérer de la SAH. Bien que la sarcosine n'ait pas de rôle physiologique défini, cette GNMT intervient dans l'homéostasie du rapport SAM/SAH. Son activité est régulée par le méthyltétrahydrofolate, un inhibiteur allostérique de cette enzyme. Autrement dit, le cycle de reméthylation de l'homocystéine, dont le produit final est la SAM, est régulé par la GNMT, elle même régulée par le méthyltétrahydrofolate. Une augmentation de la SAM inhibe l'activité MTHFR, réduisant la synthèse de méthyltétrahydrofolate et levant ainsi la répression de la GNMT qui va consommer plus de SAM pour réduire les quantités trop importantes circulantes. A l'inverse, une diminution de la SAM lève l'inhibition de la MTHFR, augmentant la synthèse de méthyltétrahydrofolate qui va inhiber l'activité GNMT et diminuer la consommation de SAM par cette enzyme.

Une carence en choline bloque la voie de reméthylation de l'homocystéine au niveau du foie et du rein provoquant une hyperhomocystéinémie avec une augmentation de 50% des taux de SAH (Zeisel *et al.* 1989).

1.2.3. Homocystéine et potentiel de méthylation

Comme cela a été évoqué précédemment, l'homocystéine est un précurseur des réactions de méthylations qui débutent par la production de méthionine pour aboutir finalement à la synthèse de SAM. L'homocystéine est un facteur limitant dans la synthèse de SAM et peut conditionner directement la production de SAM. C'est donc un déterminant de la disponibilité en substrat méthylé pour les différentes méthyltransférases cellulaires (ADN méthyltransférases, Phosphatidyléthanolamine méthyltransférases, *etc.*)

1.2.3.1. Méthionine adényltransférase et synthèse de la S-adénylméthionine

Une autre voie d'utilisation de la méthionine, hormis la synthèse peptidique, est la synthèse de S-adényl-L-méthionine catalysée par la Méthionine adényltransférase (MAT, EC 2.5.1.6) selon la réaction suivante :

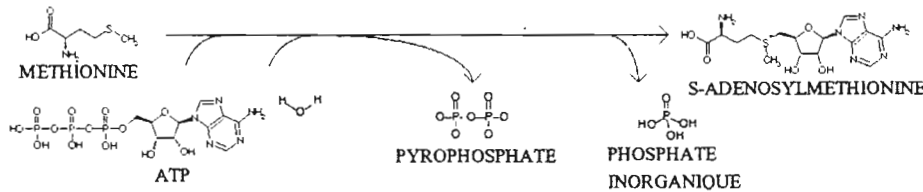


Figure 10 : Réaction d'adénylation de la méthionine par la Méthionine adényltransférase pour former de la S-adénylméthionine. Cette réaction libère un phosphate inorganique et un pyrophosphate. Le pyrophosphate est le substrat de la pyrophosphatase et il permet le recyclage d'une molécule d'ATP à partir d'une molécule d'ADP.

Cette réaction aboutit à la synthèse de SAM, une molécule portant un méthyle à haut potentiel énergétique. Cela permet l'attaque nucléophile de certains groupements et, dans la plupart des cas, conduit au transfert du groupement méthyle sur une grande variété d'accepteurs par des réactions de transméthylations. Ainsi, la SAM joue le rôle de donneur dans la méthylation d'ADN, en méthylant ses résidus en position 5' du noyau pyrimidique. C'est l'une des modifications post-répliquatives les plus importantes de l'ADN des cellules eucaryotes. L'addition covalente d'un groupement méthyle sur les sites CpG des brins d'ADN, nouvellement synthétisés, est médiée par l'ADN méthyltransférase I (DNMT1). Cette enzyme travaille au niveau de la fourche de répllication où elle méthyle l'ADN contenant des CpG hémi-méthylés (*postreplicative maintenance methylation*). Deux autres ADN méthyltransférases ont été clonées (DNMT3A et DNMT3B), et catalysent le transfert de groupements méthyles sur l'ADN nu (*naked DNA*).

Le gène *mat1A* code pour une sous unité α_1 représentée respectivement sous forme de tétramères (MAT-I, $(\alpha_1)_4$) et de dimères (MAT-III, $(\alpha_1)_2$) (Mato, 2002). Ces 2 isoformes de MAT ne contiennent pas de sous-unité régulatrice β , à l'inverse de la forme extra-hépatique MAT II (Mato 2002, Finkelstein 2003). Par conséquent seul le foie peut répondre à une disponibilité croissante de méthionine par une augmentation significative de la synthèse de la SAM. La quantité d'énergie requise pour métaboliser la méthionine est très importante car pour chaque molécule de SAM formée, les 3 liaisons phosphodiester de l'ATP sont

hydrolysées. C'est une des raisons pour lesquelles l'expression de *mat1A* est limitée au foie, un organe à forte capacité de synthèse de l'ATP (Mato, 2002).

La MAT-II est synthétisée à partir du gène *mat2A*, codant une sous-unité catalytique de 396 acides aminés (α_2), dans tous les tissus de l'organisme chez les mammifères (érythrocytes, lymphocytes, testicules, cerveau, rein et foie fœtal et dans une moindre mesure le foie adulte). La MAT II est composée de 2 types de sous-unités, α_2 et β (sous-unité non catalytique de 334 acides aminés). Cette sous-unité β intervient dans la régulation de l'activité de la MAT-II puisqu'elle fixe la SAM (son produit), provoquant une baisse de l'affinité de l'enzyme pour la méthionine et induisant ainsi une diminution de l'activité. Cela suppose que les réactions de transméthylations sont d'ordre secondaire en dehors du foie car la production de SAM sera ralenti dans des périodes de diminution des stocks de méthionine, préférentiellement utilisée pour la synthèse peptidique.

La SAM peut fournir, après décarboxylation, des groupes propylamines dans la biosynthèse des polyamines que sont la putrescine, la spermidine et la spermine (Figure 11).

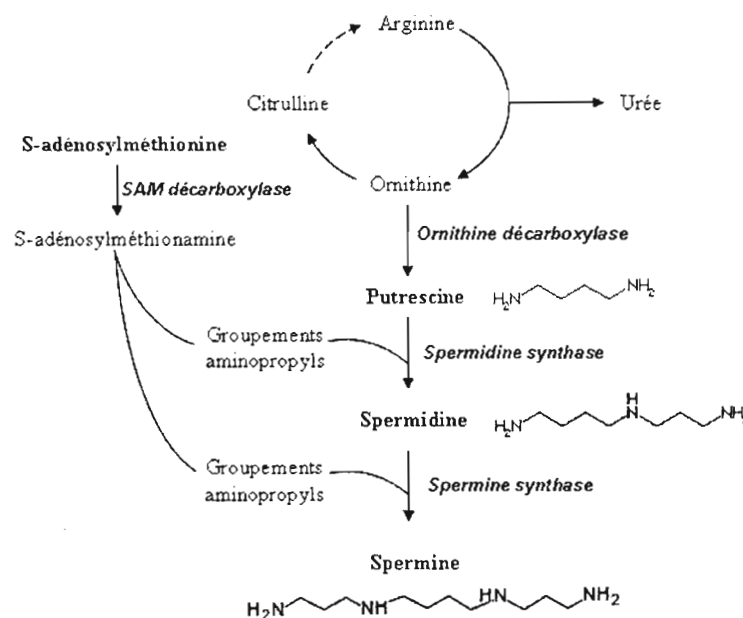


Figure 11 : Synthèse des polyamines : putrescine, spermidine et spermine. Cette biosynthèse connecte le cycle de l'urée au cycle de reméthylation de l'homocystéine dont le produit final est la S-Adénosylméthionine.

Les polyamines sont trouvées de manière ubiquitaire chez les mammifères et elles interviennent dans différents processus biologiques, tels que la régulation de gènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire. Les polyamines peuvent par exemple inhiber

certaines enzymes telles que la Protéine kinase A AMPc dépendante ou à l'inverse activer d'autres enzymes comme la Transglutaminase. Elles sont aussi impliquées dans les processus de transcription et d'apoptose (Pegg, 1988). Parmi les processus de régulation, on trouve l'activation de la Méthionine synthase dont l'efficacité d'activation dépendrait du nombre de charges positives contenues dans la polyamine. Selon Kenyon (1996), la forme la plus positive, la spermine, serait la plus activatrice. Cela expliquerait pourquoi les polyamines sont considérées comme des régulateurs du cycle cellulaire étant donné le rôle central de la Méthionine synthase dans les processus de biosynthèse des protéines et des régulations géniques par méthylation.

Les décarboxylations de SAM conduisant à la méthylthioadénosine ne représentent cependant qu'environ 10% des réactions utilisant la SAM dans le foie (Mato, 2002). La partie la plus importante de la SAM est utilisée pour les réactions de transméthylations. La synthèse et le métabolisme de la SAM se passe principalement dans le foie. C'est dans cet organe qu'ont lieu jusqu'à 85% des réactions de méthylation et ~50% des réactions liées au métabolisme de la méthionine (Mudd & Poole, 1975). Une altération de l'activité de la MAT compromet logiquement la synthèse de la SAM intracellulaire. En fait, il a été démontré que des altérations du métabolisme de l'homocystéine, de la carnitine ou de la phosphatidylcholine, ainsi qu'un défaut de méthylation d'ADN, en rapport avec la synthèse de SAM, sont développés chez des patients avec cirrhose et dans des modèles expérimentaux de souris transgéniques (Avila, 2002).

La MAT I/III peut être inactivée par le monoxyde d'azote (NO[•]), par interaction de ce radical libre avec un résidu cystéine (position 121 parmi les 9 autres cystéines). Il en résulte une S-nitrosylation du groupe thiol, montrant ainsi la sensibilité de l'enzyme au stress oxydant.

1.2.3.2. Rapport SAM/SAH : point de contrôle du métabolisme de l'homocystéine

En plus d'être le substrat des méthyltransférases SAM-dépendantes, la SAM joue aussi un rôle dans la régulation des activités des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine. A l'inverse, la SAH dont la structure est très proche de la SAM, va jouer un rôle antagoniste en empêchant le positionnement correct de la SAM sur sa protéine cible. La SAM est un effecteur allostérique de la CBS, un homotétramère dont la vitesse de catalyse peut être décuplée en présence de SAM. L'augmentation de SAM, et donc du potentiel de

méthylation, va se traduire par un basculement du métabolisme de l'homocystéine vers son catabolisme, *i.e.* l'activation de la voie de transsulfuration (Figure 12). Cette logique est corrélée par le fait que la SAM est aussi un inhibiteur allostérique de la MTHFR, empêchant ainsi la reméthylation de l'homocystéine par une diminution de la synthèse de méthyltétrahydrofolate. Ce dernier est le co-substrat dans la réaction de transméthylation de l'homocystéine par la Méthionine synthase (MTR) et une diminution de la quantité de substrat va aboutir à une baisse de l'activité enzymatique.

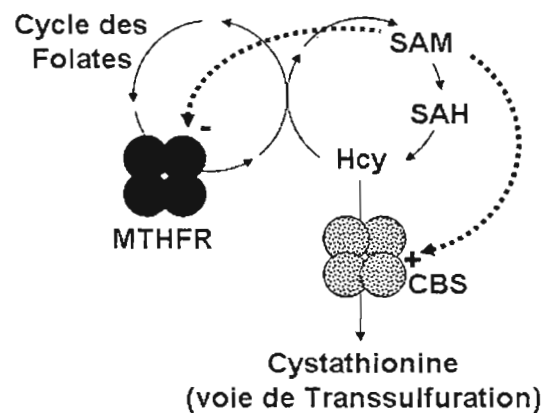


Figure 12 : Régulation allostérique par la SAM des enzymes du métabolisme de l'homocystéine. La SAM inhibe l'activité de la MTHFR (produisant le Méthyltétrahydrofolate, substrat de la MTR) et induit l'activité de la CBS. La SAH étant un substrat compétitif de la SAM, le rapport SAM/SAH permet de réguler finement l'activité des enzymes

D'une manière paradoxale, la SAM est aussi un activateur non allostérique de la MTR. En effet, Bandarian et Banerjee (2002) ont montré que lors de la réaction de reméthylation de l'homocystéine, la cobalamine est à l'état Cob(I) réduit puis subit une méthylation oxydative par le méthyltétrahydrofolate (MéthylTHF) qui la fait passer à l'état méthylCob(III) oxydé (Figure 13). La transméthylation sur l'homocystéine ramène la cobalamine à son état Cob(I) réduit. Les phénomènes externes d'oxydation (O_2 dissous) vont conduire à la production de Cob(II) à partir de Cob(I), état intermédiaire inactif. C'est ici qu'intervient la Méthionine synthase réductase puisque cette flavoprotéine va permettre la réduction de Cob(II) en Cob(I) inactive, elle-même réactivée par la transméthylation de SAM pour former une méthylcobalamine (MeCob(III)) active.

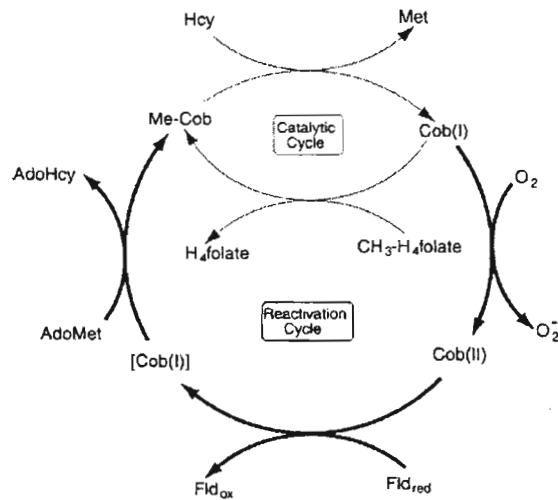


Figure 13 : Cycle de réactivation de la cobalamine-Cob(I) (vitamine B12) oxydée en Cob(II) par le dioxygène. La Méthionine synthase réductase réduit Cob(II) en [Cob(I)] inactif grâce à des cofacteurs flaviniques, puis permet la transméthylation de la SAM sur [Cob(I)] pour former une méthylCob(III) prête pour le transfert du groupement méthyle sur l'homocystéine par la MTR (d'après Bandarian et Banerjee, 2004).

Outre la régulation des enzymes du cycle de reméthylation de l'homocystéine, la SAM permet aussi la régulation de l'expression du TNF α . En effet, Veal et Tsukamoto (2004) ont montré dans les cellules de Kupffer, traitées avec des lipopolysaccharides, que la SAM inhibe la transcription et la sécrétion du TNF α .

1.2.3.3. Equilibre homocystéine et SAH : conséquences sur l'activité des méthyltransférases

Le recyclage de l'homocystéine lors des réactions de transméthylation SAM dépendantes passe par l'hydrolyse de la S-adénylhomocystéine en adénosine et homocystéine, réaction catalysée par la SAH hydrolase. Cette hydrolyse énergétiquement neutre est une réaction réversible et peut être favorisée vers la synthèse de SAH (Figure 14).

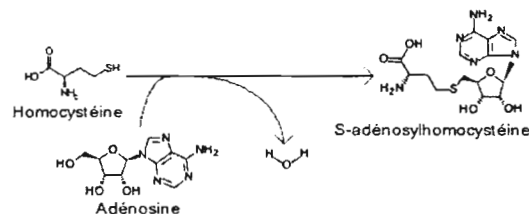


Figure 14 : Réaction de synthèse de la S-adénylhomocystéine à partir d'homocystéine et d'adénosine catalysée par la SAH hydrolase. Le processus se déroule selon la réaction inverse de l'hydrolyse de la SAH par la SAH hydrolase.

Dans des conditions d'augmentation du taux d'homocystéine, l'équilibre de l'équation est déplacé vers la droite, favorisant la synthèse de SAH et provoquant ainsi une baisse du rapport SAM/SAH.

La SAM est à la fois le substrat de la plupart des méthyltransférases, et un effecteur allostérique de la CBS et de la MTHFR. La SAH est un inhibiteur compétitif de la SAM, et son affinité (K_i , constante d'inhibition) pour les méthyltransférases est très proche de celle de la SAM (K_M , constante de Michaelis, inversement proportionnelle à l'affinité). Au niveau enzymologique cela signifie qu'un ratio SAM/SAH inférieure à 1 va entraîner une diminution des activités méthyltransférases SAM dépendantes. L'augmentation de l'homocystéine peut potentiellement entraîner une diminution des réactions de transméthylation SAM dépendantes.

1.3. Catabolisme de l'homocystéine

L'homocystéine est un élément indispensable au recyclage de la méthionine et des folates, mais dans des périodes nutritionnelles particulières (excédant de protéines alimentaires, déficience en folates ou vitamine B12) ce recyclage n'est plus assuré. L'homocystéine est exporté dans le sang mais a tendance à s'accumuler. L'élimination par les urines n'est pas suffisante et il est donc nécessaire de dégrader cet acide aminé. Cela permet dans le même temps de produire de la cystéine et ainsi de pallier aux besoins immédiats éventuels.

1.3.1. La voie de transsulfuration

Il n'existe qu'une seule voie de catabolisme de l'homocystéine chez les mammifères, c'est celle de la transsulfuration qui est amorcée de manière irréversible par la Cystathionine- β -synthase (CBS, EC 4.2.1.22), une enzyme cytosolique, PLP dépendante (Phosphate de pyridoxal, dérivé de vitamine B6), composée d'un homotétramère de 63 kDa formant une structure de ~250 kDa. Cette enzyme catalyse des réactions de β -replacement entre la L-sérine, la L-cystéine, des cystéines-thioéthers, ou d'autres α -L-acides aminés β -substitués, ainsi qu'une variété de mercaptans. Biologiquement, la CBS est principalement impliquée dans les réactions de condensation de sérine sur l'homocystéine :

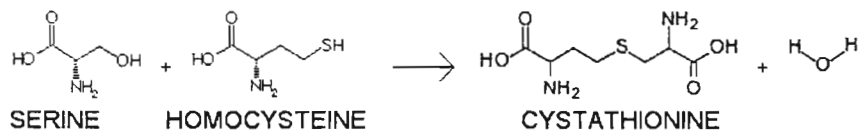


Figure 15 : Réaction irréversible de condensation de la sérine et de l'homocystéine catalysée par la Cystathionine- β -synthase, première enzyme de la voie de transsulfuration de l'homocystéine en cystéine.

Le gène humain de la CBS est régulé transcriptionnellement par 2 régions promotrices appelées -1a et -1b. Le promoteur principal réagit positivement au sérum et aux facteurs de croissance de fibroblastes, et est régulé négativement par l'insuline, aux arrêts de croissance par inhibition de contact, un manque de nutriments ou une induction de la différenciation (Miles 2004). Le promoteur génique -1b de la CBS, est régulé selon un mode sensible à l'état redox de la cellule, et selon des interactions synergiques entre Sp1 et NFY (facteur de transcription liant la boîte CAATT, impliquée dans l'expression de protéines du cycle cellulaire), et entre Sp1 et Sp3.

Les études menées par Bao *et al.* (1998) ont permis de déterminer chez l'homme le niveau d'expression et la distribution des différentes isoformes de la CBS chez l'homme (tableau 1).

Tableau 1 : Taux d'expression relatif des ARN messagers de la CBS chez l'homme. Le pancréas est choisi comme référence (valeur = 1) car c'est le seul organe qui exprime les 5 isoformes d'ARN de la CBS.

Organe	Niveau d'expression relatif	Zone cérébrale	Niveau d'expression relatif
Foie	1.45	Cerveau entier	0.26
Pancréas	1.00	Cervelet	0.50
Rein	0.42	Thalamus	0.18
Foie fœtal	0.38	Cortex cérébral	0.15
Cœur fœtal	0.19	Amygdale	0.15
Utérus	0.15	Putamen	0.14
Trachée	0.14	Noyau subthalamique	0.14
Poumons	0.13	Cordon spinal	0.14
Ovaires	0.13	Substance noire	0.13
Prostate	0.12	Lobe temporal	0.13
Rein fœtal	0.10	Hippocampe	0.12
Estomac	0.08	Lobe frontal	0.12
Autres	0	Autres	< 0.12

A l'inverse de la réponse transcriptionnelle relativement lente, la SAM peut instantanément activer la CBS grâce à une coopérativité positive. De même, une coupure protéolytique de la région C-terminale peut aussi activer la CBS (Zhu, 2003). Ces degrés d'activation (SAM et protéolyse) sont efficaces aussi bien l'un que l'autre. Le rôle de l'hème présent dans la CBS n'est pas encore éclairci, mais il n'est pas essentiel à la catalyse.

La transsulfuration de l'homocystéine est complète après intervention de la Cystathionine- γ -Lyase (EC 4.4.1.1) pour aboutir à la production de cystéine (Figure 16):

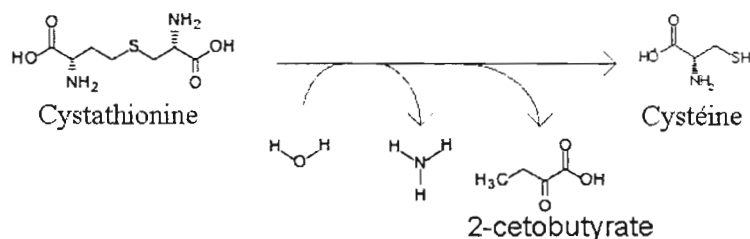


Figure 16 : Réaction d'hydrolyse de la cystathionine en cystéine, 2-cétobutyrate et ion ammonium catalysée par la Cystathionine- γ lyase.

La voie de transsulfuration permet dans le même temps de diminuer les concentrations toxiques d'homocystéine, mais aussi d'alimenter l'organisme en cystéine qui est en concentration limitante pour diverses réactions (synthèse peptidique, de glutathion ou de taurine).

1.3.2. Régulation du Glutathion par la synthèse de cystéine

Le glutathion (GSH) est le thiol à faible poids moléculaire le plus répandu dans l'organisme (0,5-10 mM). La plupart des GSH intracellulaires (85-90 %) sont présents dans le cytosol, avec des reliquats dans d'autres organites (mitochondries, noyaux et peroxyzomes) tandis que les concentrations extracellulaires sont assez faibles (2-20 μ M dans le plasma). Les concentrations cellulaires en GSH peuvent être relativement diminuées à cause d'un manque de protéines, d'un stress oxydant ou d'autres facteurs pathologiques. Le rapport GSH/GSSG, qui est souvent utilisé comme un indicateur de l'état redox cellulaire, est supérieur à 10 dans des conditions physiologiques normales (Griffith 1999). Le couple GSH/GSSG est un déterminant majeur de la capacité cellulaire anti-oxydante mais sa valeur peut être affectée par d'autres couples redox, comme NADPH/NADP et thioredoxinred/thioredoxinox.

La synthèse de GSH se fait à partir de glutamate, de glycine et de cystéine (facteur limitant dans la synthèse) par deux enzymes cytosoliques :

La réaction (1) est catalysée par la Glutamate-cystéine ligase (GCS, EC 6.3.2.2)

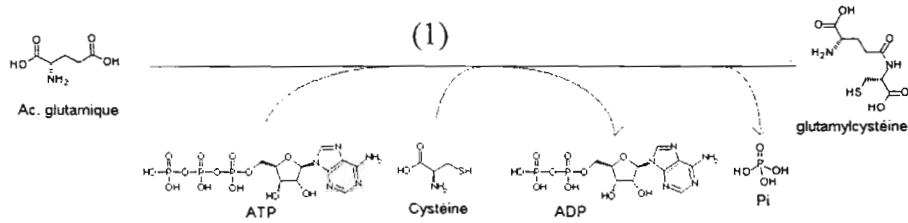


Figure 17 : Synthèse de la γ -glutamylcystéine catalysée par la Glutamate-cystéine ligase, une enzyme ATP dépendante, et première étape dans la synthèse du glutathion.

La réaction (2) est catalysée par la Glutathion synthétase (EC 6.3.2.3)

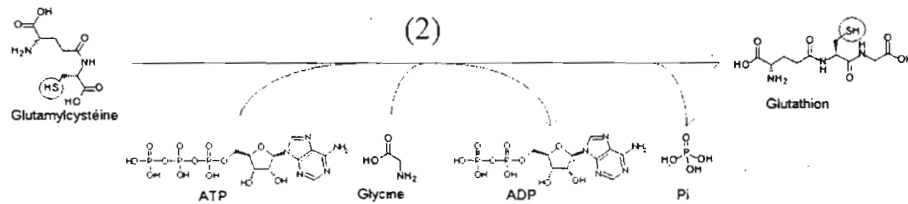


Figure 18 : Synthèse du glutathion par la Glutathion synthétase, enzyme hépatique, à partir de γ -glutamylcystéine, de glycine et d'ATP.

Cette voie métabolique est présente dans tous les types cellulaires et principalement dans le foie qui est l'organe majeur pour la production et l'exportation du GSH. Dans la réaction GCS (réaction (1)), le groupement γ -carboxyl du glutamate réagit avec le groupe amine de la cystéine pour former une liaison peptidique, qui protège le GSH contre l'hydrolyse des peptidases intracellulaires (Wu 2004). Bien que le γ -Glu-Cys puisse servir de substrat pour la glutamylcyclotransférase (pour former de l'oxoproline), c'est la synthèse de GSH qui est favorisée dans les cellules animales grâce à une meilleure affinité et une meilleure activité de la GSH synthétase pour le γ -Glu-Cys.

Les connaissances concernant la synthèse de GSH sont limitées à cause notamment de la compartimentation complexe des substrats et leur métabolisme dans les organes et les niveaux subcellulaires. Par exemple, l'absorption de glutamate pour la GCS diffère entre le petit intestin et le rein. La synthèse hépatique du GSH apparaît prédominante dans les hépatocytes périverneux et, dans une moindre mesure, dans les cellules périportales. Aussi, les changements de concentrations plasmatiques en GSH ne reflètent-ils pas forcément des changements tissu-spécifiques dans la synthèse du GSH. En se basant sur l'absorption en cystéine chez l'individu adulte sain (9 $\mu\text{mol/h/Kg}$), on estime que la plupart des cystéines utilisées pour la synthèse de GSH sont dérivées du catabolisme protéique et/ou de la synthèse endogène. La cystéine est généralement un acide aminé limitant pour la synthèse de GSH chez l'homme, aussi bien que chez le rat, le cochon ou le poulet. Aussi, les facteurs stimulant

l'absorption de cystéine (*e.g.* insuline et facteurs de croissance) induisent la production de GSH intracellulaire. La cystéine provenant de la voie de transsulfuration permet à la méthionine de palier aux carences en cystéine en se comportant comme un précurseur dans la synthèse du γ -Glu-Cys par la GCS. Le fait que les hépatocytes aient une faible capacité d'absorption de la cystéine s'explique alors par l'activité importante de la CBS au niveau du foie qui va produire, via la méthionine et donc l'homocystéine, la cystéine nécessaire.

Le GSH participe à de nombreuses réactions cellulaires (plus d'une soixantaine) parmi lesquelles on trouve principalement :

- 1- Elimination des ROS (*reactive oxygen species*), notamment le radical hydroxyle, les lipides peroxydés, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), via la glutathion peroxydase (GPX).

Exemple de réaction, catalysée par la GPX (EC 1.11.1.9) :

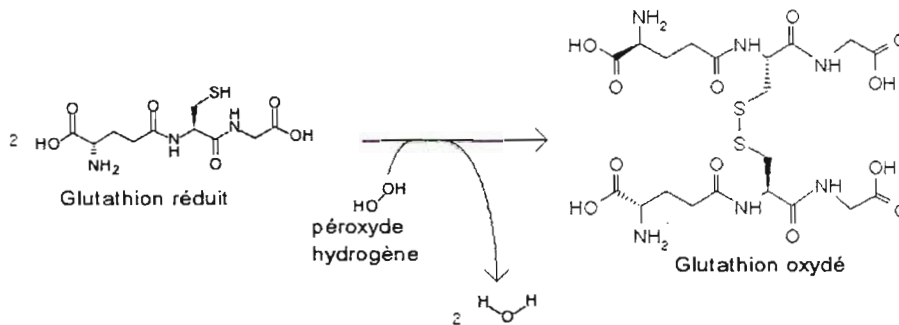


Figure 19 : Réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) catalysée par la Glutathion peroxydase, contrebalancée par l'oxydation du glutathion réduit en glutathion oxydé. Cette réaction suit le métabolisme de l'anion superoxyde (O_2^-) en H_2O_2 par la Superoxyde dismutase.

- 2- Réaction avec des électrophiles, métabolites physiologiques (oestrogènes, mélanines, prostaglandines et leukotriènes) et xénobiotiques (bromobenzène, acétaminophène) pour former des mercapturates (GS-X). Ces réactions sont initiées par la Glutathion-S-transférase lors de la Phase II de la détoxification cellulaire.

On peut noter que la production d'homocystéine intracellulaire à partir d'homocystine, une des formes de transport de l'homocystéine, est catalysée par la Glutathion:homocystine oxidoréductase (EC 1.8.4.1), une enzyme dont l'activité dépend de la disponibilité en GSH, et donc en Cys et homocystéine pour sa synthèse.

1.3.3. Autres dérivés de l'homocystéine (Taurine, H₂S)

Il existe d'autres dérivés de l'homocystéine qui sont en réalité des dérivés de la cystéine. Citons parmi ceux-là la taurine qui intervient dans le métabolisme des sels biliaires, impliqués dans le stockage du cholestérol et l'absorption des graisses au niveau intestinal. L'absorption d'alcool entraîne une forte augmentation de la concentration en taurine dans le cerveau et le système nerveux central. La transmission de l'influx nerveux est modifiée par la consommation d'alcool, à l'origine d'une usure cellulaire, et provoque la sécrétion de taurine. Cela entraîne une régulation des informations arrivant dans le système nerveux central. Il a été démontré que l'élévation du taux de taurine à l'intérieur du cerveau a un effet régulateur sur la prise d'alcool.

L'ion sulfhydryle (H₂S) est aussi un produit de dégradation de la cystéine, qui est naturellement produit lors du catabolisme de la cystéine en pyruvate. Cette molécule a des propriétés vasodilatatrices par l'ouverture de canaux K_{ATP} des muscles lisses du système sanguin (Li, 2006), et permet ainsi la relaxation de l'artère aorte, dilate les artérioles,...

L'ion H₂S est présent en relativement grandes quantités au niveau du cerveau et agit comme un neuromodulateur. Il est produit en réponse à une excitation neuronale et altère la potentiation à long terme de l'hippocampe (persistante de l'efficacité de la transmission synaptique). L'ion H₂S est produit aussi par la cystathionine-γ-lyase qui serait située dans le muscle lisse, et permet ainsi sa relaxation en synergie avec le NO[•]. Au niveau du cerveau, la CBS catalyse également la condensation de la cystéine avec l'homocystéine pour libérer de la cystathionine et l'ion H₂S.

2. Déterminants génétiques et nutritionnels de l'homocystéine

2.1. Déterminants génétiques

Les polymorphismes ou variants génétiques du génome sont la conséquence de mutations qui sont le plus souvent des mutations uniques (*single nucleotide polymorphism* ou SNP). Il existe plusieurs polymorphismes 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). 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 modérée (TCN2 776 C→G) (Namour *et al.* 2001). L'incidence fonctionnelle d'un polymorphisme donné n'est pas toujours connue. Les polymorphismes des enzymes du cycle des folates (MTHFR et MTR) peuvent affecter le statut en homocystéine des sujets, et conditionnent les besoins nutritionnels relatifs de la population concernée en vitamines du groupe B.

2.1.1. Méthylènetétrahydrofolate réductase

L'altération génétique la plus commune associée à une hyperhomocystéinémie modérée est une mutation par substitution d'une cytosine en une thymidine en position 677 (677 C→T) au niveau du cadre ouvert de lecture du gène de la MTHFR. Cette mutation ponctuelle provoque sur la structure protéique de l'enzyme le remplacement d'un acide aminé valine par un acide aminé alanine (Frosst *et al.* 1995), engendrant une diminution de l'activité enzymatique (Bailey *et al.* 1999). Cette mutation, autosomique récessive, a une fréquence variable suivant la population avec 10-13% d'homozygotes TT et 50% d'hétérozygotes dans les populations caucasienne et asiatique ; il existe une faible incidence dans les populations africaine et américaine (Bailey *et al.* 1999; Brattström *et al.* 1998).

Le second polymorphisme de la MTHFR correspond à la substitution d'une adénine en cytosine en position 1298 (1298 A→C), remplaçant au niveau de l'enzyme un acide aminé glutamate en alanine (Van der put *et al.* 1998). La fréquence allélique du polymorphisme 1298 A→C est similaire au polymorphisme 677 C→T. Cependant, ce polymorphisme ne semble pas être associé à l'élévation plasmatique de l'homocystéine.

2.1.2. Méthionine synthase et Méthionine synthase réductase

L'étude de Chen *et al.* (1997) a mis en évidence l'existence de plusieurs polymorphismes de la Méthionine synthase (MTR). L'un des polymorphismes prédominants est la mutation 2756 A→G. Au niveau de l'enzyme, un acide aminé aspartate est remplacé par une glycine. Cette mutation n'a pas ou peu d'effet sur les maladies cardiovasculaires (Van der Put *et al.* 1997; Bailey *et al.* 1999) et n'est pas un facteur déterminant de l'hyperhomocystéinémie (Bosco *et al.* 2006). Le polymorphisme 2756 A→G est décrit comme étant un facteur de risque d'avoir un enfant à trisomie 21 si la mère est homo- ou hétérozygote pour cette mutation (Bosco *et al.* 2003).

Une mutation de la Méthionine synthase réductase (MTRR) doit être également mentionnée. Ce polymorphisme correspond à la mutation 66 A→G, modifiant l'acide aminé I22 en M22, et sa fréquence allélique est de 0,51. Ce polymorphisme est associé à des maladies coronariennes artérielles (Guéant-rodriguez *et al.* 2005). La présence de cette mutation a pour conséquence une altération du développement du tube neural, lorsqu'elle est associée à un statut insuffisant en vitamine B12 ou à un polymorphisme de la MTHFR (677 C→T). La double hétérozygotie MTR 2756 A→G et MTRR 66A→G chez une mère représente le risque le plus important d'avoir un enfant à trisomie 21 (Bosco *et al.* 2003).

2.1.3. Cystathionine-β-synthase

Les altérations génétiques de la CBS sont associées le plus souvent à une hyperhomocystéinémie sévère et à une homocystinurie. Environ une soixantaine de mutations différentes ont été décrites dont les plus communes sont la 833T→C et la 919G→A (Kraus JP 1998). Le polymorphisme 833T→C est le plus répandu et serait fortement associé aux problèmes de thromboses (Gaustadnes, 2000). La mutation 919G→A apparaît être la plus commune dans les populations d'origine celtique et un phénotype d'hyperhomocystéinémie a été décrit chez des individus hétérozygotes pour cette mutation (Dawson 1996). Un autre polymorphisme, plus « bénin » correspondant à une insertion de 68 paires de bases dans l'exon 8 (Wang *et al.* 1999) est retrouvé chez approximativement 7,5% de la population européenne. Cette insertion pourrait avoir une influence sur la MTHFR par un mécanisme encore inconnu.

2.1.4. Transcobalamine II

La transcobalamine II (TCII) peut également présenter plusieurs polymorphismes à l'origine de modifications de la concentration plasmatique en homocystéine. La mutation la plus commune correspond à la substitution d'une base cytosine en guanine en position 776 (776 C→G) (Namour *et al.* 1998, 2001). La conséquence au niveau protéique est le remplacement d'un acide aminé arginine au profit d'une proline (codon 259). Dans le cas où la mère et le fœtus sont tous deux homozygotes pour cet allèle muté, il existe un risque élevé de *spina bifida* par comparaison avec une homozygotie présente exclusivement chez la mère ou chez l'enfant (Christensen *et al.* 1999). Par ailleurs, l'association de polymorphismes mutés de la MTHFR et de la TC favorise l'apparition d'une hyperhomocystéinémie sévère chez l'embryon et augmente le risque d'avortement spontané (Zetterberg 2004).

2.2. Déterminants nutritionnels

Les déterminants nutritionnels de l'homocystéine les plus couramment cités sont la vitamine B9, la vitamine B12, la vitamine B6, la choline et moins souvent la vitamine B2. Ces molécules sont toutes associées au métabolisme de l'homocystéine, que ce soit dans le cycle de reméthylation (B2, B9, B12 et choline) ou dans la voie de transsulfuration (B6).

Plusieurs études ont montré qu'il existe une hyperhomocystéinémie chez les sujets adultes soumis à une carence en vitamines du groupe B (Mann *et al.* 1999 ; De Bree *et al.* 2001 ; Jacques *et al.* 2001 ; Hustad *et al.* 2000). Il existe 3 types de carences en vitamines du groupe B associées à une accumulation d'homocystéine (Stabler *et al.* 1988) :

- i- l'interruption de la voie de transsulfuration par une déficience en coenzymes dérivés de la vitamine B6 (PLP – phosphate pyridoxal)
- ii- la carence en folates responsable d'un déficit en méthylTHF qui est donneur de méthyle lors de la reméthylation de l'homocystéine
- iii- la carence en vitamine B12, qu'elle soit due à un défaut d'apport, d'absorption ou de transport sanguin (Namour *et al.*, 2003), se répercute au niveau cellulaire et a pour conséquence une baisse de la transméthylation du méthylTHF sur l'homocystéine durant la reméthylation. Cela crée un déséquilibre entre reméthylation et transsulfuration, provoquant une trappe métabolique des folates dans la forme méthylTHF, les rendant ainsi inutilisables pour d'autres réactions métaboliques (Chanarin *et al.* 1989).

Le rôle de la carence en vitamine B12 comme étant responsable d'une hyperhomocystéinémie est encore discuté (McKinley *et al.* 2002). En effet, si certaines études retrouvent une corrélation entre la baisse du taux plasmatique en vitamine B12 et une hyperhomocystéinémie, il est en fait très difficile d'obtenir, du moins chez l'adulte sain, une véritable carence en vitamine B12. Ceci étant, à l'occasion d'une étude de cohorte (Framingham), Jacques *et al.* (2001) ont montré qu'il existait une corrélation significative entre des valeurs basses de vitamine B12 plasmatique et l'homocystéine, ainsi qu'entre les folates et l'homocystéine, et entre la vitamine B6 et l'homocystéine.

Dans une étude transversale hollandaise portant sur 2 435 patients, De Bree *et al.* (2001) ont rapporté que plus les régimes alimentaires sont déficients en vitamines B, plus l'homocystéinémie est élevée. Ces mêmes auteurs ont montré que tous les taux plasmatiques de ces vitamines B (B2, B6, B9, B12) sont corrélés négativement aux taux d'homocystéine, en analyse univariée. Cependant, en analyse de régression multivariée, seuls les folates demeurent corrélés négativement à l'homocystéinémie. Les autres vitamines B étudiées n'étant plus des déterminants de la concentration plasmatique d'homocystéine.

Jacques *et al.* (2001) ont mis en évidence une faible, mais significative, association entre la carence en riboflavine et le taux d'homocystéine dans la cohorte de Framingham portant sur 1 960 sujets. De même, Hustad *et al.* (2000) ont montré que la riboflavine est un déterminant indépendant de l'homocystéinémie dans une étude transversale portant sur 423 adultes sains.

2.2.1. Vitamine B12 (ou cobalamine)

La vitamine B12, ou cobalamine (Cbl), est un cofacteur organométallique requis pour l'activité de seulement 2 enzymes chez les mammifères. Les besoins journaliers en vitamine B12 sont très faibles, de l'ordre de 1 à 2 µg par jour, ce qui est largement assouvi par la consommation de viande, d'oeufs ou de lait. Du fait de cette grande disponibilité en vitamine B12 dans le monde animal, la consommation moyenne dans les pays occidentaux est de l'ordre de 5 à 15 µg par jour (Herbert 1987). De plus, la vitamine B12 est conservée dans l'organisme à travers le cycle entéro-hépatique ; il faut donc plusieurs années pour vider ce stock hépatique (Herbert 1988). Bien que cette vitamine se trouve dans les aliments d'origine animale, seules certaines bactéries sont capables de la synthétiser. La singularité de la vitamine B12 provient de sa liaison covalente carbone-cobalt prisonnière d'un noyau tétrapyrrolique et rarement rencontrée ailleurs dans la nature. Cette vitamine appartient ainsi

au groupe des corrinoïdes. Le métabolisme intracellulaire de la cobalamine est complexe, compartimenté et requiert l'intervention de plusieurs gènes (Gulati, 1996). Les humains sont incapables de synthétiser *de novo* l'adénosylcobalamine (AdoCbl) et la méthylcobalamine (MeCbl) et ils dépendent donc des sources alimentaires en précurseurs de cobalamine (Leal, 2004). Les formes circulantes, la cyanoconbalamine (CNCbl) et l'hydroxocobalamine (OHCbl), sont converties en glutathionylcobalamine (GSCbl), réduite successivement en Cob(II) puis Cob(I), et finalement adénosylée en AdoCbl (Figure 20). Pour la synthèse de MeCbl, associée à la Méthionine synthase (MTR), c'est une méthylation oxydoréductrice catalysée par la MTR réductase (MTRR) qui permet la transméthylation de la S-adénosylméthionine sur la Cbl(I).

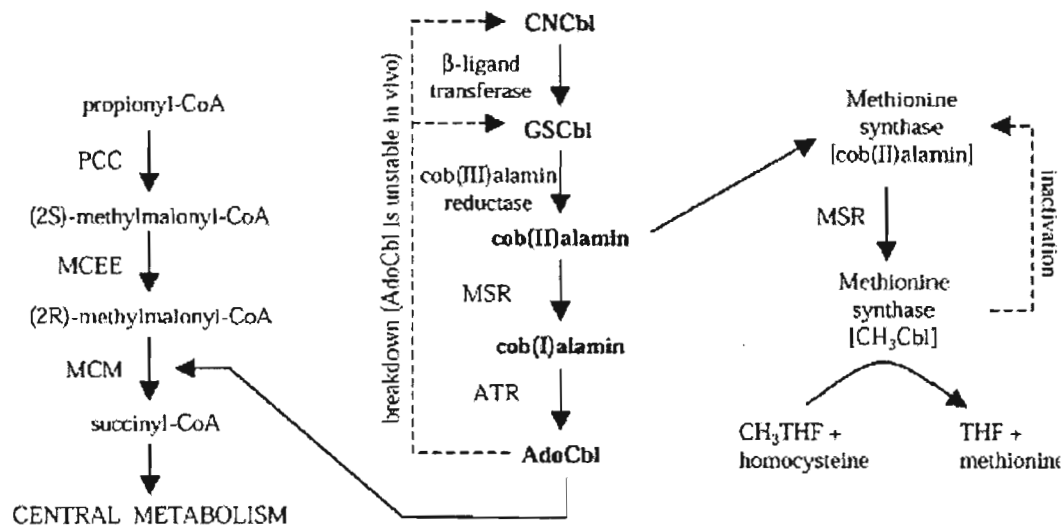


Figure 20 : Métabolisme de la cobalamine intracellulaire, synthèse de la méthionine et métabolisme du propionylcoenzyme-A. Abréviations : PPC, propionyl-CoA carboxylase ; MCEE, Méthylmalonyl-CoA épimérase ; MCM, Méthylmalonyl-CoA mutase AdoCbl-dépendante ; CNCbl, vitamine B12 ; GSCbl, glutathionylcobalamine ; THF, tétrahydrofolate (Leal et al., 2004).

Chez l'homme, les défauts congénitaux dans la structure génique de la Méthylmalonyl-CoA mutase (MCM,) ou de la MTR, conduisent à une acidurie méthylmalonique, homocystinurie ou une combinaison des deux. Ces désordres métaboliques sont souvent fatals dans les premières années de la vie et ils résultent de mutations autosomales récessives réparties en 9 groupes de complémentation (*mut* et *cbl ABCDEFGH*). Des erreurs dans le groupe *cblF*, *cblC* et *cblD* conduisent à des maladies combinées. Des études préliminaires ont montré que la *cblF* conduit à des défauts dans le transport de la Cbl du lysosome vers le cytoplasme tandis que les *CblC* et *CblD* impliquent des défauts de conversion des Cbl complexes en Cob(II). Les groupes de complémentation *cblG* et *cblE* correspondent respectivement aux gènes de la MTR et de la MTRR et des erreurs génétiques

dans ces groupes conduisent dans les deux cas à une homocystinurie. Le groupe *mut* correspond au gène codant la MCM. Le groupe *cblA* est supposé coder une protéine limitant l'inactivation de la MCM (Korotkova, 2004) tandis que le groupe de complémentation *cblB* code une protéine mitochondriale, l'ATP-Cob(I) adénosyltransférase (Dobson, 2002). Enfin, des mutations dans le groupe *cblH* résulte aussi en acidurie méthylmalonique, mais l'origine de ce défaut demeure inconnu.

2.2.2. vitamine B9 (Acide folique)

La vitamine B9 (acide folique, ou folate) se trouve dans l'alimentation, et principalement dans les légumes verts (épinards, concombre, asperges, fenouil, *etc.*), les levures, le foie. Les besoins en folates sont élevés car ils interviennent, outre dans le métabolisme des monocarbones, dans la synthèse des purines, éléments indispensables à la synthèse des acides nucléiques (ARN et ADN). Chez l'enfant de 0 à 12 ans, les ANC (apports nutritionnels conseillés) varient de 70 à 250 µg/jour. Chez l'adolescent de 13 à 19 ans, ainsi que chez les adultes, les ANC sont autour de 300 µg/jour. En revanche, pour la femme enceinte ou allaitante les besoins sont supérieurs à 400 µg/jour. Les folates alimentaires sont sous forme de polyglutamates (~90%) et de monoglutamates. Alors que le monoglutamate est absorbé à plus de 90% par l'intestin (Figure 21), seulement 20 à 30% des polyglutamates sont absorbés à ce niveau là grâce à l'IFC (*Intestinal folate carrier*). La γ -glutamyl hydrolase, présente au niveau de la bordure en brosse de l'intestin grêle et de la lumière intestinale, les transforme en espèces monoglutamates (Galivan *et al.* 2000). L'activité γ -glutamyl hydrolase est principalement trouvée dans le foie et le rein mais également dans la salive et le suc pancréatique.

Le MéthylTHF, sous la forme monoglutamate, est absorbé, grâce à un transporteur récepteur spécifique, appelé *Intestinal Folate Carrier* (IFC) : transporteur intestinal des folates (Nguyen *et al.* 1997). L'IFC est localisé au niveau de la membrane basolatérale et de la bordure en brosse des entérocytes, principalement dans le duodénum et le jéjunum. Au cours de cette absorption, une partie des monoglutamates est réduite et méthylée en MéthylTHF. Le Méthyl-THF est alors directement incorporé dans la circulation sanguine.

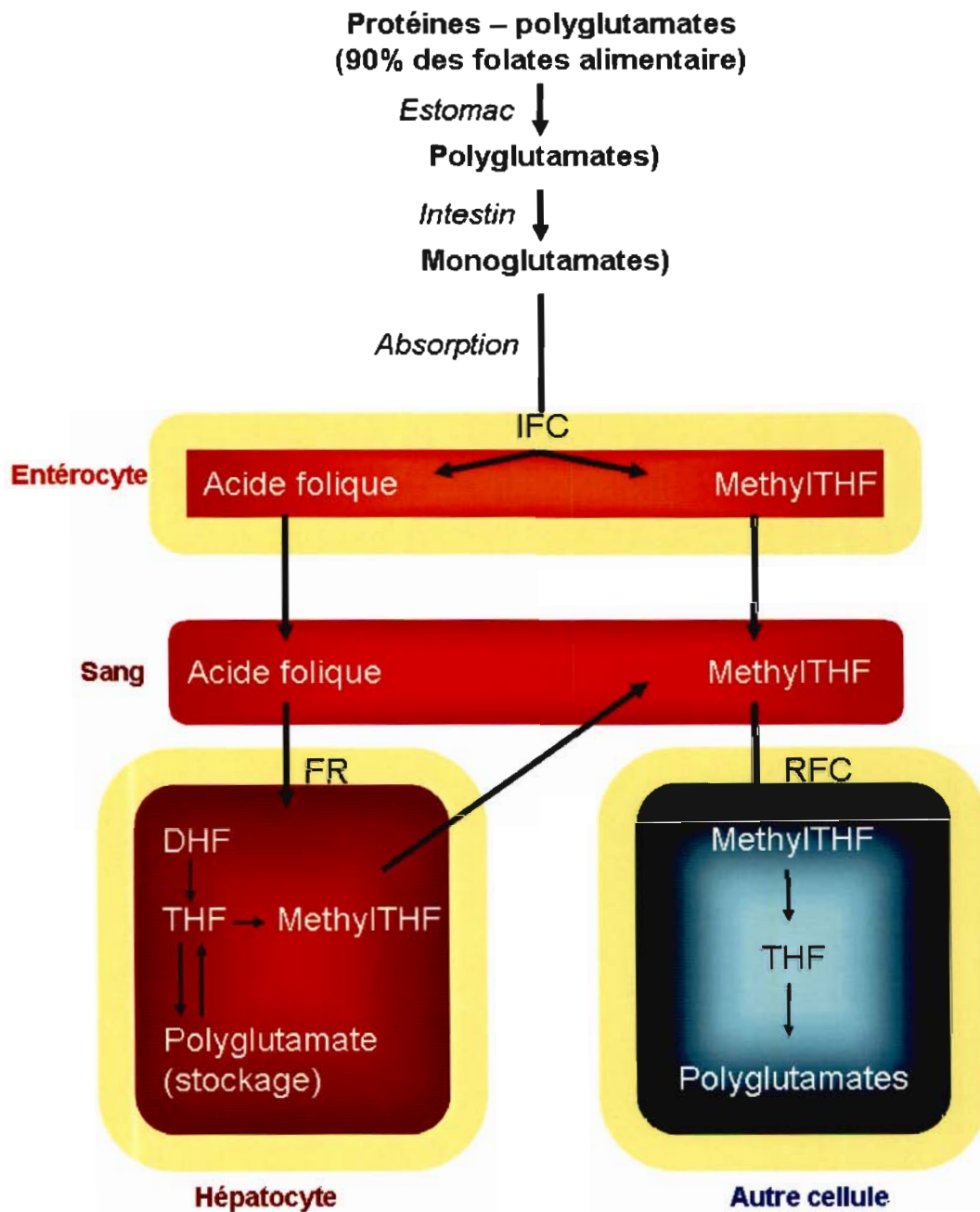


Figure 21 : Absorption des folates dans l'organisme. IFC, Intestinal Folate Carrier protein ; RFC, Reduced Folate Carrier protein ; MethylTHF, méthyltétrahydrofolate ; DHF, dihydrofolate ; THF, tétrahydrofolate.

L'acide folique est une forme biologiquement inactive et c'est la réduction en dihydrofolate et tétrahydrofolate qui le rend métabolisable. Au niveau intracellulaire les diverses isoformes de folates vont converger vers un nombre restreint que l'on retrouvera dans le cycle des folates (figure 22) :

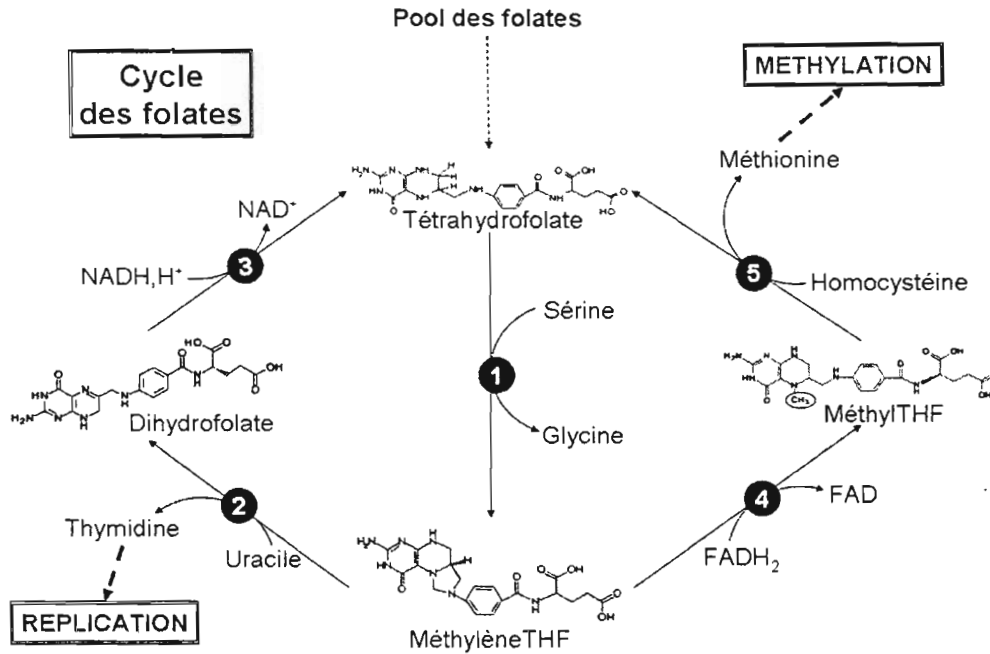


Figure 22 : Représentation schématique du cycle des folates dont le point de départ est le tétrahydrofolate. Ce cycle met en jeu différents états d'oxydoréduction des folates et fait intervenir plusieurs enzymes. ①-Sérine hydroxyméthyltransférase, ②-Thymidilate synthase, ③-Dihydrofolate réductase, ④-Méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR), ⑤-Méthyl-tétrahydrofolate-homocystéine méthyltransférase (Méthionine synthase).

Les folates peuvent entrer dans ce cycle à partir de différentes formes (méthénylTHF, formylTHF, etc.) constituant ainsi un pool intracellulaire, mais toutes vont converger vers le tétrahydrofolate (THF). La sérine hydroxyméthyltransférase (①, EC 2.1.2.1) catalyse la transméthylation de la sérine sur le THF pour former du méthylèneTHF et libérer de la glycine. Ce méthylèneTHF a 2 rôles principaux :

- 1- Il intervient comme co-substrat dans la synthèse de thymidine à partir d'uracile par une réaction catalysée par la thymidilate synthase (②, EC 2.1.1.45). Cette réaction est indispensable au bon déroulement des phénomènes de réplication génomique car une déficience lors de cette phase peut induire une accumulation d'uracile dans la cellule et conduire à des erreurs d'incorporation. Ce type d'erreur provoque des cassures chromosomiques lors des phases de divisions cellulaires et au niveau des cellules germinales peut aboutir à des anomalies chromosomiques chez la descendance comme par exemple une augmentation du risque de trisomie 21 ou un défaut de fermeture du tube neural (*spina bifida*). Le dihydrofolate libéré dans cette réaction est recyclé en THF par la DHF réductase (③, EC 1.5.1.3). Cette enzyme représente une cible dans la lutte contre certaines cellules tumorales

puisque le méthotrexate va inhiber l'activité de cette enzyme et bloquer ainsi les divisions cellulaires des cellules tumorales.

- 2- Le méthylèneTHF intervient aussi comme co-substrat dans la synthèse de méthylTHF par la Méthylène-tetrahydrofolate réductase (MTHFR, ④, EC 1.5.1.20), une flavoprotéine qui va réduire le méthylèneTHF en méthylTHF par oxydation du FADH₂ en FAD. Le MéthylTHF sert de co-substrat dans la réaction de transméthylation sur l'homocystéine par la Méthionine synthase vitamine B12 dépendante (MTR, ⑤, EC 2.1.1.13). L'activité de la MTR est indispensable pour produire de la méthionine, précurseur dans la synthèse de S-adénosylméthionine, substrat de la plupart des méthyltransférases. La MTR permet aussi le recyclage des folates et empêche les phénomènes de trappe métabolique qui ont pour conséquence une accumulation de méthyl-tetrahydrofolate, inhibiteur allostérique de la Glycine N-méthyltransférase, une enzyme régulatrice du rapport SAM/SAH.

Le bon déroulement de ce double cycle des folates va ainsi pérenniser les activités de réplication génomique et de méthylation cellulaire. Un déséquilibre lié à une carence nutritionnelle et/ou un ralentissement des activités enzymatiques provoquées par une mutation génétique (e.g. MTHFR C677T) va donc conduire à des défauts dans les processus de réplication ou de méthylation.

2.2.3. Autres déterminants nutritionnels (B6, B2 et choline/bétaïne)

L'homme obtient la bétaïne à partir de nourriture contenant soit de la bétaïne brute, soit des composés contenant des dérivés de choline (acétylcholine, phosphatidylcholine). La bétaïne est présente dans la nourriture, en quantités variables, dépendantes de la croissance et des conditions de stress osmotique (Craig, 2004). Les farines de son, les germes de blé, les épinards, les blettes, les crevettes, le pain complet et les biscuits apéritifs sont les principales sources alimentaires en bétaïne. L'hyperhomocystéinémie résulte d'un déséquilibre de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Un traitement par la bétaïne est efficace pour prévenir l'augmentation de l'homocystéinémie alors qu'un traitement à la vitamine B9 l'est moins. Pourtant, la reméthylation de l'homocystéine se déroule dans le foie et le rein alors que la reméthylation folate dépendante est ubiquitaire. Il apparaît donc qu'en cas d'hyperhomocystéinémie, un traitement combiné folate/bétaïne est le plus approprié.

Chez l'homme, la vitamine B2 (riboflavine) est métabolisée par une Riboflavine kinase (Flavokinase, EC 2.7.1.26) qui catalyse la phosphorylation ATP dépendante de la riboflavine en flavine mononucléotide (FMN). La FMN peut être métabolisée par une FMN adényltransférase (FAD synthétase) ATP dépendante pour former de la flavine adénine dinucléotide (FAD). Ces 2 dérivés de riboflavine (FAD et FMN) interviennent dans des réactions d'oxydoréduction au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale en étant associés à des flavoprotéines. Ils interviennent aussi dans d'autres réactions d'oxydoréduction liées au métabolisme de l'homocystéine comme la réduction du méthylèneTHF en méthylTHF par la MTHFR ou la réduction de la cobalamine(II) en cobalamine(I) par la Méthionine synthase réductase. Les ANC pour cette vitamine sont de 0,5 à 1,5 mg/jour pour les enfants, 1,5 mg/jour pour les femmes et les adolescentes et 1,8 à 2 mg/jour pour les adolescents, les femmes enceintes ou allaitement, et les hommes. Les sources alimentaires pour cette vitamine sont assez variées puisqu'on la trouve dans le foie, la levure, certains légumes verts, le poisson, le lait, la viande, les champignons, les pâtes, *etc.*

La vitamine B6 (pyridoxine) est active sous forme de phosphate de pyridoxal (PLP) et elle intervient dans plus d'une centaine de réactions en tant que cofacteur. Les enzymes qui l'utilisent comme cofacteur appartiennent parfois à la classe des transférases (classe 2) mais ce sont principalement les enzymes de classe 4, les lyases, qui nécessitent ce cofacteur. Parmi ces enzymes PLP dépendantes, 3 enzymes gravitent directement autour du métabolisme de l'homocystéine : la Cystathionine- β -synthase (EC 4.2.1.22), la Cystathionine- γ -lyase (EC 4.4.1.1) et la Sérine hydroxyméthyltransférase (EC 2.1.2.1). Les ANC pour la vitamine B6 sont de 0,6 à 1,6 mg pour l'enfant, de 2 à 2,2 mg pour les adolescents et les adultes et de 2,5 mg par jour pour les femmes enceintes. Les sources vitaminiques sont la viande, le foie, les rognons, le poisson, la levure, les céréales, les fruits, les oléagineux, les légumes et le lait. Des études épidémiologiques ont montré qu'un statut vitaminique faible est associé à une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires, de thrombose veineuse, d'infarctus et éventuellement d'un cancer du colon. Contrairement à ce qui est observé en cas de déficiences en folates, l'élévation du risque de développer des maladies cardiovasculaires n'est pas associé à une hyperhomocystéinémie (Lima, 2006).

Ces différents travaux montrent l'importance des vitamines B dans le métabolisme de l'homocystéine. Ceci est conforté par le fait qu'en cas de supplémentation vitaminique chez les patients carencés, on observe une tendance à la normalisation de l'homocystéinémie

(Jacques *et al.* 2001; O'Keefe *et al.* 1995). Toutefois cela ne semble pas être vrai pour toutes les vitamines. En effet, McKinley *et al.* (2002) ont montré que la supplémentation en riboflavine (B2) n'engendrait une normalisation de l'homocystéine que si elle était associée à une supplémentation en folate chez des personnes âgées présentant un taux basal diminué de riboflavine.

3. Effets cellulaires et tissulaires de l'homocystéine

Divers pathologies (maladies cardiovasculaires, défaut de fermeture du tube neural,...) sont associées à l'augmentation d'homocystéine plasmatique sans vraiment définir si l'homocystéine est une cause, une conséquence ou simplement un marqueur de la pathologie. Les paragraphes suivants feront le point sur la toxicité intrinsèque de l'homocystéine et les réactions qui conduisent à des effets néfastes conséquents à l'augmentation de sa concentration cellulaire.

3.1. Réactivité des thiols réduits

Comme décrit dans le paragraphe 1.2, l'homocystéine est majoritairement véhiculé dans le plasma sous forme de ponts disulfures liés à des protéines (notamment l'albumine, Figure 23).

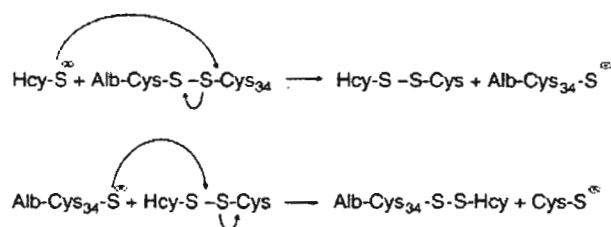


Figure 23: Le groupe sulfhydryle de l'Hcy réduit le pont disulfure du résidu cystéine en position 34 sur l'albumine, formant un hétérodimère Hcy-S-S-Cys et une albumine portant un anion thiolate libre. Cet anion attaque l'hétérodimère sur le soufre de l'Hcy pour former une homocysteinylalbumine et un anion cystéine thiolate (Perna 2003). Cela explique pourquoi la forme d'Hcy liée aux protéines est majoritaire au niveau du transport sanguin. Le thiol réducteur étant réactif c'est cette forme oxydée qui stabilise l'Hcy mais dénature les protéines cibles.

En présence d'oxygène, l'homocystéine comme les autres thiols réducteurs peut s'autooxyder par catalyse des métaux de transition (Figure 24), conduisant ainsi à la production d'espèces radicalaires oxygénées (ROS, reactive oxygen species).

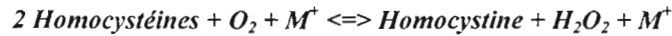


Figure 24: Réaction d'autooxydation de l'homocystéine en homocystine (dimère d'homocystéine lié par un pont disulfure) catalysé par le dioxygène et un métal de transition. La réaction est réversible grâce à la Glutathion-homocystine oxydoréductase qui consomme pour cela une molécule de glutathion réduit (GSH).

L'homocystéine a donc un effet pro-oxydant et l'induction de peroxyde d'hydrogène conduit à une peroxydation lipidique ou initie une réponse inflammatoire. Il s'agit d'un effet paradoxal compte tenu du pouvoir réducteur de l'homocystéine qui aboutira finalement à un stress oxydant, contrebalancé par l'activité de Glutathion peroxydase. La production de glutathion dépend en partie de l'homocystéine qui est un précurseur dans la synthèse de cystéine. Parallèlement la production d'homocystéine à partir d'homocystine nécessite l'action d'une Glutathion-homocystine oxydoréductase (EC 1.8.4.1); Glutathion et homocystéine sont donc intrinsèquement liées.

3.2. Homocystéine thiolactone et paraoxonase

A cause de sa similarité avec la méthionine, l'homocystéine peut s'insérer par erreur dans la synthèse peptidique. Cette erreur est corrigée par la conversion d'homocystéine en homocystéine-thiolactone, une réaction catalysée par la Méthionyl-tRNA synthétase dans tous les organismes étudiés, y compris l'homme (Jakubowski 2004). L'homocystéine est convertie par nitrosylation en analogue de Méthionine, la S-nitro-homocystéine, qui peut remplacer une méthionine dans la synthèse protéique dans différents systèmes biologiques, notamment dans des cellules en culture. Chez l'Homme, l'homocystéine-thiolactone modifie les protéines au niveau posttraductionnel en formant des adduits dans lesquels l'homocystéine est liée par des ponts thioamides avec les groupes amines (en position epsilon) des chaînes latérales de lysines protéiques (Hcy-ε-N-Lys-Protéine). Les niveaux d'homocystéine liée par amide (Hcy-N-Protéine) dans les protéines plasmatiques humaines sont directement proportionnels à la teneur en homocystéine totale. Les formes liées aux hémoglobines (Hcy-N-Hb) et albumines (Hcy-N-albumine) sont les plus courantes et constituent le pool le plus important d'homocystéine, au-delà de l'homocystéine libre. L'homocystéine-Thiolactone et l'enzyme qui l'hydrolyse, la paraoxonase, sont présentes dans le plasma humain. Cette modification des protéines par l'homocystéine-Thiolactone provoque des dommages sur la structure des protéines et induit une réponse immune. Il existe chez l'homme des anticorps qui vont reconnaître spécifiquement les Hcy-ε-N-Lys-épitope sur les protéines modifiées par

l'homocystéine-Thiolactone. La capacité de l'homocystéine à interférer avec la biosynthèse des protéines, causant ainsi des dommages, induit une mort cellulaire et provoque une réponse immune et probablement contribue au développement de certaines pathologies chez l'homme.

3.3. Acide homocystéique

L'acide homocystéique (HA) est un produit d'oxydation de l'homocystéine généré par les cellules du cerveau et libéré en réponse à une stimulation excitatrice (Hasegawa 2005).

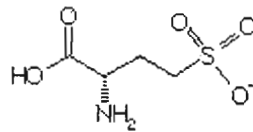


Figure 25 : Structure de l'acide homocystéique. Le groupe sulfhydryle de l'homocystéine est remplacé par un groupement sulfonate

L'HA est un analogue de glutamate qui peut activer les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), un sous-type de récepteur aux glutamates et peut donc agir comme un neurotransmetteur excitateur dans le cerveau. Une activation excessive des récepteurs NMDA par le HA a été associée à la pathogenèse de l'épilepsie (Folbergrova, 2000) et le HA, comme le glutamate, induirait un stress oxydant dans les neurones, prouvant ainsi sa neurotoxicité. L'HA est surtout impliqué dans la neurotoxicité du peptide A β 42 dans la maladie d'Alzheimer, traitée plus loin dans le paragraphe.

3.4. Réticulum Endoplasmique et stress lipidique

Plusieurs études ont montré que l'augmentation du taux intracellulaire d'homocystéine va aboutir à un stress du réticulum endoplasmique par l'activation de protéines spécifiques telles que GRP78 (*glucose regulated protein-78*, une protéine chaperonne), GRP94, Herp (*homocysteine-induced ER stress*), et RTP (Ji, 2004). Austin *et al.* ont montré en 1998 que des cellules endothéliales vasculaires humaines (ECs) exposées à une surdose d'homocystéine ne développent pas de réponse au stress oxydant. En revanche, un traitement avec d'autres agents oxydants induit une réponse au stress oxydant. L'homocystéine cause une diminution du stress par une baisse de l'expression de plusieurs enzymes antioxydantes et par là-même provoquer une dysfonction du réticulum. Etant donné que l'homocystéine diminue l'activité

de la Glutathion peroxydase (Upchurch 1997), cela laisse supposer que l'homocystéine peut aggraver les effets cytotoxiques de certains agents, ou de conditions connues pour générer des espèces réactives oxygénées. La préséniline est indispensable au gamma clivage requis pour la génération de la région C-terminale du peptide β -amyloïde. La protéine Herp, localisée dans le réticulum endoplasmique, possède un domaine *ubiquitine-like* et son expression est augmentée dans des périodes de stress du réticulum (Sai, 2002). Une activation de Herp va augmenter le taux de $A\beta$, sauf dans des cellules déficientes en complexe PS. Herp interagit à la fois avec PS1 et PS2 qui sont des facteurs d'activation du peptide $A\beta$. L'analyse immunohistochimique d'une coupe de cerveau normal avec un anticorps anti-Herp révèle un marquage exclusivement dans les neurones et les cellules des muscles lisses du système vasculaire. Par contre, l'anticorps marque fortement la microglie dans les plaques séniles de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer. Si on regroupe ces résultats, on peut considérer que Herp pourrait être impliqué dans l'accumulation de $A\beta$ provoquant la formation de plaques séniles et des dépôts vasculaires de $A\beta$.

Les anomalies de synthèse et de stockage des lipides dans le foie ont été observées sur des lignées cellulaires d'hépatocarcinome et sur des souris transgéniques ayant subi une altération du métabolisme des monocarbone. Les souris *cbs* +/- nourries avec un régime conduisant à une hyperhomocystéinémie (peu de folates, riche en méthionine) ont des perturbations du réticulum endoplasmique qui se traduisent par une dérégulation de la biosynthèse des lipides par une activation des SREBPs (*sterol regulatory element binding protein*). Les SREBPs appartiennent à une famille de protéines liées au RE et sont des facteurs de transcription induisant l'expression de gènes de la biosynthèse et de l'absorption du cholestérol et des triglycérides. La conséquence de cette anomalie est l'augmentation des triglycérides et du cholestérol hépatique.

3.5. Homocystéine et régulation de l'expression génique

L'homocystéine est connue comme étant le substrat de plusieurs enzymes (Méthionine synthase, BHMT, CBS, ...), comme un agoniste de certains neurotransmetteurs (glutamate) ou encore agent réducteur, mais il existe très peu de données sur la capacité de l'homocystéine à induire ou réprimer la synthèse de certains gènes. Au contraire de la cobalamine, le rôle de l'homocystéine sur la régulation de l'expression du gène de la Méthionine synthase n'a pas été étudié sur des cellules de mammifères. Dans certaines

conditions de culture des cellules Caco-2 (Ortiou, 2004) l'activité de la méthionine synthase peut être augmentée de 1,5 fois pour un milieu enrichi en homocystéine / cobalamine par rapport à un milieu enrichi en méthionine / cobalamine. Le niveau des ARNm de Méthionine synthase est significativement augmenté dès lors que l'on cultive ces cellules en présence d'homocystéine, avec ou sans méthionine correspondant à un effet transcriptionnel de l'homocystéine. D'autres études ont démontré que l'homocystéine est un activateur de l'expression de certains gènes, tels que *c-fos* et *lpl* (*lipoprotein lipase*) via la voie AP1 (Beauchamp, 2002), ainsi que *IL8* et *nos2* via la voie NFκB (Welch, 1998).

4. Modèles expérimentaux d'étude de l'homocystéine

Plusieurs modèles cellulaires et animaux ont été développés pour étudier les causes conduisant à une augmentation de l'homocystéine et, par la suite, les conséquences sur le métabolisme et/ou sur le développement cellulaire et tissulaire. Dans le cadre de ce travail il sera présenté ici le modèle de souris transgéniques *cbs* *-/-* et le modèle nutritionnel de carence en groupements méthyles avec ses conséquences sur le développement hépatocytaire chez le raton âgé de 21 jours.

4.1. Modèle de souris CBS *knockout*

Les cas les plus courants d'homocystinurie sont causés par un déficit congénital en CBS, enzyme limitante dans la voie de transsulfuration et qui permet la condensation irréversible de l'homocystéine et la sérine. Les cas d'homozygotie *cbs* *-/-* représentent une naissance sur 300 000. Les manifestations cliniques des homozygotes comprennent un retard mental, ostéoporose, anomalies du squelette et un foie anormalement gras. Une artériosclérose prématurée et un thromboembolisme sont caractéristiques chez les homocystinuriques et les complications thromboemboliques sont les causes de mort les plus fréquentes chez ces patients. Plusieurs études ont montré que les patients souffrant de maladies artérielles coronariennes ont des homocystéinémies plus élevées que des sujets contrôles. Il fallait donc déterminer si ces augmentations plasmatiques d'homocystéine étaient une cause de maladies cardiovasculaires ou une conséquence de ces maladies. Les modèles animaux existant avant 1995 ne permettaient pas de conclure dans un sens ou dans l'autre, et ce sont les travaux de Watanabe *et al.* (1995) qui ont abouti au développement d'un modèle

de souris transgénique déficiente en Cystathionine- β -synthase (*cbs* $-/-$, ou *CBS KO*). Ce modèle est aujourd'hui couramment utilisé dans les différentes études qui traitent de la toxicité de l'homocystéine. Il ne sera détaillé ici que le modèle CBS KO car les animaux hétérozygotes *cbs* $+/-$ ne présentent pas de différences notables avec le type sauvage dans les conditions normales de nutrition.

4.1.1. Production du modèle de souris CBS *knockout*

Ce paragraphe retrace les différentes étapes menées par l'équipe de Masahiko Watanabe (1995) pour produire des souris CBS KO.

- 1- Amplification par PCR d'un fragment de 142 paires de bases d'une séquence de l'exon 3 du gène de la *cbs*
- 2- Criblage à partir de cet amplicon de la librairie de phages λ contenant le génome complet mais fragmenté de souris
- 3- Récupération à partir de cette banque de 2 clones de phage λ contenant respectivement la région autour de l'exon 2 (1,4 kb) et la région comprenant les exons 5 à 10 (7 kb)
- 4- Ces 2 phages sont clonés dans le même plasmide pMC1neo ρ 1A qui contient en plus de la séquence tronquée de la CBS en amont et dans le même sens de lecture le gène de résistance à la néomycine (*neo*), remplaçant les exons 3 et 4, et en aval et en sens contraire de lecture le gène de la Thymidine kinase (*TK*)

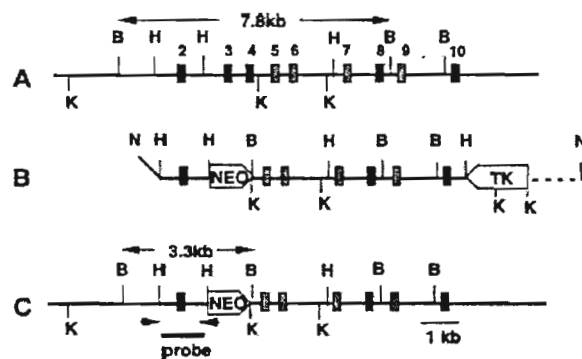


Figure 26 : Disruption ciblée du gène de la *cbs* de souris :

(A) Les exons 2 à 10 sont représentés par des carrés et numérotés. Les exons 2, 3, 4, 8 et 10 (carrés noirs) sont positionnés par hybridation ou par détermination de la séquence nucléotidique. Les autres exons (carrés gris) sont comparés par analogie au gène du rat.

(B) Construction ciblée. Le gène *neo* (*NEO*) remplace les exons 3 et 4 et est dans la même orientation que le gène de la *cbs*. Le gène de la thymidylate kinase (*TK*) est orienté en sens contraire de lecture. Les pointillés indiquent la séquence du vecteur. Un fragment *Hind* III de 1,4 kb et un autre *Kpn* I/*Hind* III de 7 kb sont utilisés comme 2 séquences d'homologie. Le site *Hind* III de 7 kb provient du vecteur de clonage.

(C) Locus correctement remodelé après une recombinaison homologue. Les flèches indiquent les positions des 2 primers utilisés pour l'analyse en PCR. Une sonde pour l'analyse en Southern blot et les tailles des fragments BamHI sont détectés par l'enzyme indiquée. (B, BamHI ; K, Kpn I ; H, Hind III ; N, Not I)

Watanabe, 1995

- 5- Linéarisation du plasmide par l'enzyme de restriction Not-I et transfection par électroporation de cellules embryonnaires BK4, un sous clone de cellules E14TG2a dérivées de la souche de souris 129/Ola.
- 6- Criblage des colonies résistantes au G418 et au ganciclovir pour récupérer les embryons ayant subi une recombinaison homologue entre le gène sauvage de la *cbs* et le mutant.
- 7- Vérification de la mutation par *Southern blot*
- 8- Croisement des animaux chimériques avec une lignée de souris C57BL/6J sauvage

4.1.2. Caractéristiques morphologiques et biochimiques des souris CBS *knockout*

Les premières études menées par l'équipe de Watanabe ont montré qu'au moment du sevrage (J21), le nombre de souris sauvages et d'hétérozygotes était proche du ratio attendu 1:2 (80:151). Cependant, le nombre d'homozygotes était significativement plus faible, 42 obtenues contre 77 attendues ($P < 0,001$) et ce nombre tombait à 18 à 4 semaines et à 15 au bout de 8 semaines. Ces données laissent penser que la disruption du gène de la *cbs* n'affecte pas la survie embryonnaire mais a une forte incidence durant la période postnatale (3^{ème} et 4^{ème} semaine).

La croissance des mutants est correcte jusqu'à ~ J7 puisqu'il n'y a pas de différence notable au niveau du poids. En revanche, les homozygotes montrent un retard de poids vers le J14 qui ne sera pas compensé par la suite. La courbe de survie (Figure 27) montre une chute dramatique entre la 2^{ème} et la 4^{ème} semaine chez les animaux mutants homozygotes.

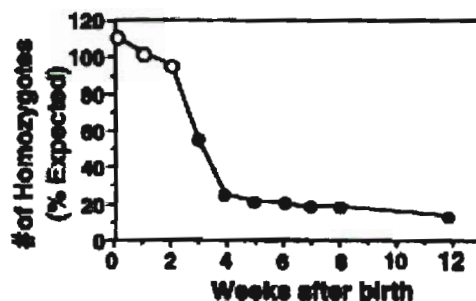


Figure 27 : Courbe de survie des souris transgéniques *cbs* $-/-$ de 0 à 12 semaines Au final moins de 20% des animaux dépasseront les 12 semaines (Watanabe, 1995).

La survie des animaux est donc un facteur limitant pour les études sur les effets à long terme de l'homocystéine. Une autre caractéristique de ces souris transgéniques est l'apparition systématique de stéatose hépatique. Cette pathologie traduit un dysfonctionnement du métabolisme lipidique et c'est un point qui a soulevé de nombreuses interrogations concernant le lien potentiel entre l'homocystéine et l'accumulation de lipides dans les hépatocytes (Figure 28).

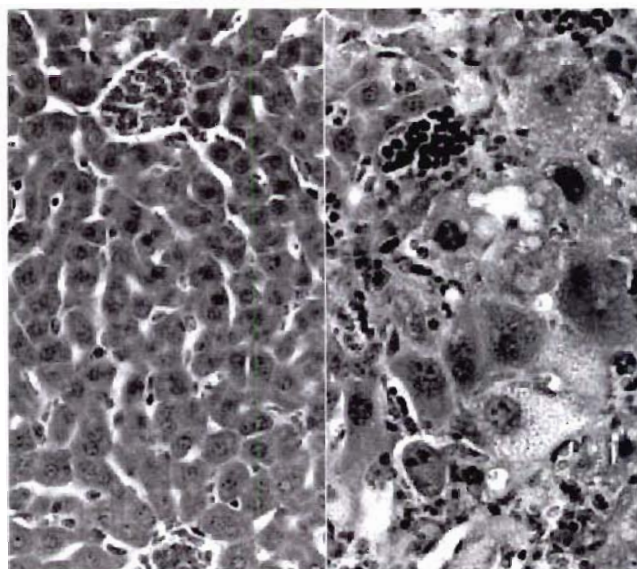


Figure 28 : Morphologie hépatique à 21 jours chez les animaux sauvages et homozygotes. Les hépatocytes normaux sont uniformes avec des noyaux clairs qui contiennent de petits nucléoles. Les homozygotes ont des pléomorphismes hépatocytaires avec de larges et proéminents nucléoles. Les hépatocytes sont souvent binucléés ou multinucléés et leur cytoplasme contient souvent des gouttelettes lipidiques (Watanabe 1995).

Il apparaît clairement que la disruption du gène de la *cbs* entraîne des modifications profondes dans l'équilibre cellulaire puisque la morphologie des animaux transgéniques et leur survie sont profondément affectées. Il en va de même pour les différents métabolites qui

gravitent directement ou non autour du métabolisme de l'homocystéine. La modification la plus attendue et la plus marquante est la modification de l'homocystéinémie car les taux plasmatiques des souris transgéniques augmentent de manière dramatique chez les *cbs* *-/-* (Figure 29).

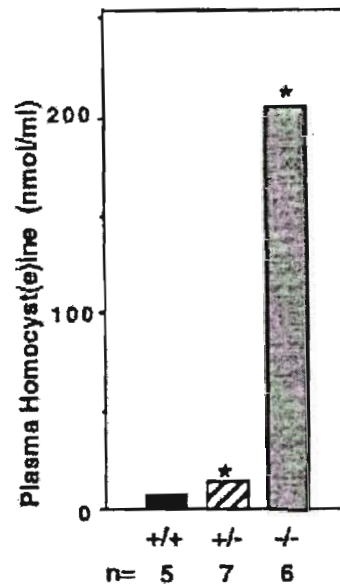


Figure 29 : Niveau d'Hcy plasmatique chez les souris CBS KO âgées de 21 jours. Les mâles et les femelles sont représentés et les valeurs sont de $6,1 \pm 0,8 \mu\text{M}$ pour les sauvages (+/+, n = 5), $13,5 \pm 3,2 \mu\text{M}$ pour les hétérozygotes (+/-, n = 7) et $203,6 \pm 65,3 \mu\text{M}$ pour les homozygotes (-/-, n = 6), * $P < 0,001$ (Watanabe, 1995)

Etant donné que la synthèse du glutathion (GSH) dépend en amont de la synthèse de cystéine, elle-même provenant du catabolisme de l'homocystéine, il est apparu comme primordial de vérifier l'état du statut redox cellulaire. Au niveau du foie, Vitvitsky *et al.* (2004) ont montré qu'il y a une baisse significative de glutathion total alors que la balance GSH/GSSG ne varie pas (Tableau 2). Bien que la rupture de la voie de transsulfuration altère la production de cystéine ($P < 0,02$), les hépatocytes ne semblent pas subir un stress oxydant majeur car il n'y a pas de variation du rapport GSH/GSSG. Cela est retrouvé, mais dans une moindre mesure au niveau du cerveau alors qu'aucune variation notable n'est observée au niveau du rein de la souris transgénique.

Tableau 2 : Concentrations en cystéine, ascorbate, glutathion réduit et rapport GSH/GSSG dans le foie, le rein et le cerveau chez les souris transgéniques *cbs* +/+ et *cbs* -/-. Niveau de significativité $P < 0,05$ (Virvitsky, 2004).

Organe	<i>Cbs</i> +/+	<i>Cbs</i> -/-	P Value
Liver			
[GSH]	5,938 ± 643	3,734 ± 1,363	<0.01
[GSH]/[GSSG]	21.0 ± 3.9	23.9 ± 9.2	>0.4
[Cys]	382 ± 88	235 ± 77	<0.02
Ascorbate	1,373 ± 222	1,419 ± 429	>0.8
Kidney			
[GSH]	1,903 ± 138	1,787 ± 300	>0.4
[GSH]/[GSSG]	36.8 ± 6.3	37.7 ± 2.4	>0.7
[Cys]-male	336 ± 47	217 ± 9	<0.02
[Cys]-female	245 ± 44	236 ± 44	>0.8
Ascorbate	1,300 ± 115	1,177 ± 217	>0.2
Brain			
[GSH]	1,684 ± 42	1,203 ± 134	<10 ⁻⁵
[GSH]/[GSSG]	66.9 ± 7.8	71.3 ± 10.4	>0.4
[Cys]	94 ± 4	76 ± 11	<0.005
Ascorbate	3,668 ± 143	4,233 ± 615	<0.06

Ces souris transgéniques servent aujourd'hui de modèle pour l'étude des conséquences d'une hyperhomocystéinémie sévère sur le métabolisme des monocarbones, sur l'induction d'un stress oxydant, sur les effets proinflammatoires de l'homocystéine, *etc.* Les modèles nutritionnels développés dans notre laboratoire visent à déterminer les conséquences d'un régime déficient en groupements méthylés sur le métabolisme cellulaire, parmi lesquelles figure l'hyperhomocystéinémie modéré. Malgré des approches scientifiques différentes, les méthodologies utilisées sur ces souris sont comparables aux travaux que nous avons conduits dans notre laboratoire. Aussi, les résultats publiés dans ce domaine seront-ils discutés dans la partie « résultats et discussion ».

4.1.3. Autres modèles de souris transgéniques impliquant le cycle de reméthylation de l'homocystéine et conduisant à une stéatose hépatique

D'autres études ont conduit à l'établissement d'animaux transgéniques, notamment sur des protéines impliquées dans le cycle de reméthylation de l'homocystéine.

a) ***mat1A knockout*** : Il s'agit de la forme hépatique post natale de la MAT I/III codant pour la sous unité catalytique $\alpha 1$. Ce modèle a été développé par Lu *et al.* (2001) et a montré une sensibilité à l'apparition de stéatose provoquée par une déficience en choline dès 3 mois, et une apparition spontanée de cette stéatose de type macrovésiculaire dès 8 mois. Les taux de SAM s'effondrent d'un facteur 4 chez les KO tandis que la SAH ne varie pas. On observe

aussi une diminution du glutathion réduit et du glutathion oxydé montrant une faiblesse dans la lutte contre le stress oxydant. Enfin, il y a induction de l'expression de certaines protéines liées au métabolisme de l'homocystéine, notamment la CBS et la BHMT.

b) ***mthfr knockout*** : le modèle *mthfr* KO développé par Chen *et al.* (2001) montre de nombreux retards de développement par rapport aux souris contrôles ainsi que des stéatose macrovésiculaires hépatiques. Les taux d'homocystéine augmentent d'un facteur 10 chez les KO pour atteindre $\sim 30 \mu\text{M}$ vs. $3\text{-}5 \mu\text{M}$ chez les sauvages. Les taux hépatiques et cérébraux de méthyltétrahydrofolate (produit de la MTHFR) sont aussi très largement diminués (~ 8 fois) chez les KO. Les taux de SAM ne varient pas mais on observe une augmentation des taux de SAH sûrement en lien avec l'accumulation d'homocystéine.

c) ***adk knockout*** : l'Adénosine kinase (EC 3.5.4.4) catalyse la phosphorylation de l'adénosine en AMP. Cette réaction est prépondérante dans le métabolisme de l'adénosine car l'ADK possède une forte affinité pour ce substrat ($K_M = 0,2\text{-}2 \mu\text{M}$). Le modèle KO a été développé par Boison *et al.* (2002) et a montré également une stéatose macrovésiculaire qui se développe dès les premiers instants de la période postnatale. Cette modification entraîne un déséquilibre dans le métabolisme énergétique avec une diminution d'ATP hépatique tandis que les taux de SAM et SAH augmentent. La disruption du gène de l'ADK se traduit par une accumulation d'adénosine qui va perturber l'équilibre Hcy/SAH en favorisant la synthèse de SAH. La SAH va rétroinhiber les méthyltransférases SAM dépendantes et ainsi conduire à l'accumulation de SAM.

d) ***pemt knockout*** : La Phosphatidyléthanoline méthyltransférase (EC 2.1.1.17) catalyse la triple méthylation, SAM dépendante, de la phosphatidyléthanoline (PE) en phosphatidylcholine (PC). La PC est le phospholipide le plus répandu chez les mammifères et sa synthèse commence par la condensation en 3 temps de la choline avec le diacylglycérol. Une autre voie de synthèse utilise la triple méthylation de la PE par la PEMT exprimée seulement au niveau du foie. Walkey et Vance (1997) ont montré que la disruption de la PEMT empêche la transméthylation de la méthionine vers la synthèse de la phosphatidylcholine. Zhu et Zeisel (2003) ont observé sur ce modèle, l'apparition de stéatose hépatique chez tous les animaux homozygotes dont les hépatocytes sont en voie apoptotique tandis que les taux hépatiques de triglycérides augmentaient de 2 à 3 fois.

e) **mtr et dnmt knockout** : Les travaux menés sur la disruption du gène de la mtr n'ont pas permis, pour l'instant, de produire de telles lignées car les animaux transgéniques pour la Méthionine synthase ne survivent pas au-delà de quelques jours de vie embryonnaire (Swanson, 2001). De la même manière, les souris déficientes en ADN méthyltransférases ne dépassent pas le stade embryonnaire (Li, 1992)

Ces quelques exemples montrent qu'une déplétion dans l'une des protéines du cycle de l'homocystéine (y compris la CBS) va aboutir à l'apparition de stéatose hépatique en parallèle avec une modification des taux de SAM et/ou de SAH. Il apparaît clairement que le potentiel de méthylation représenté par ce rapport SAM/SAH est déterminant dans l'apparition de la stéatose hépatique chez ces animaux.

4.2. Régimes déficients entraînant un hyperhomocystéinémie modérée

Un certain nombre d'études concernant la production de modèles nutritionnels carencés en différentes vitamines (B2, B6, B9, B12) ou en nutriments comme la méthionine ou la choline ont été réalisés ces dernières années. L'optique pouvait bien sûr différer entre chaque groupe de travail mais dans tous les cas il s'agissait d'une modification plus ou moins profonde des activités des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine.

4.2.1. Modèles nutritionnels déficients en précurseurs méthylés

Le concept de régime *methyldeficient* (déficient en substrats méthylés) est apparu en 1975 avec les travaux de Tsai et Leveille qui maintenaient des rats à température ambiante ou au froid (2°C) en leur administrant un régime complet ou un régime déficient en choline. Dans le même temps, Lyman et Miljanich carenciaient des rats en méthionine et choline pour en mesurer les conséquences sur la teneur en phosphatidylcholine hépatique. Hoffman et Cornatzer développent en 1981 un régime déficient en choline, méthionine, folate et vitamine B12 afin d'observer, *in vitro*, le métabolisme de la choline à travers l'activité PEMT et la Choline kinase. Les résultats obtenus montrent un ralentissement global du métabolisme de la choline ainsi qu'une diminution des phénomènes de méthylation cellulaire. En 1983, Linell et Poirier développent un régime dépourvu de choline, méthionine et vitamine B12 afin d'évaluer la composition et la distribution tissulaire des différentes isoformes de vitamines B12. Ils en déduisent ainsi que la méthylcobalamine, cofacteur indispensable de la

Méthionine synthase, est un métabolite cellulaire protégé. En effet, dans les périodes de carence, les taux de méthylcobalamine semblent stables par rapport aux autres isoformes de cobalamine. En 1988, Chandar et Lombardi développent un autre modèle à long terme de carence en choline et méthionine mais correctement pourvu en vitamine B12 et folates. Les rats soumis à ce régime développent dans 20-50% des cas des hépatocarcinomes en moins de 24 mois. En fait, la majorité des régimes *methyldeficients* reposent sur une carence en choline et méthionine renforcée ou non par une carence en vitamine B12 ou folate. La plupart de ces modèles ont pour objet l'établissement d'un lien entre déficit en substrats méthylés, hypométhylation cellulaire et développement d'hépatocarcinome sans ajout de carcinogène.

4.2.2. Modèle nutritionnel conduisant à une hyperhomocystéinémie

Plusieurs travaux ont été menés dans notre laboratoire au cours de ces dernières années, portant notamment sur les besoins nutritionnels en vitamine B12. Une de ces études visait à démontrer l'importance d'une supplémentation parentérale en vitamine B12 chez des patients déficients en Facteur intrinsèque (transporteur gastrique de la vitamine B12) ou ayant subi une gastrectomie totale ou partielle. Les premiers modèles nutritionnels et chirurgicaux développés par Brunaud *et al.* (2003) sur des rats Fisher F344 comportaient une cohorte de mâles adultes totalement déficients en vitamine B12. Pour obtenir cette déficience, une gastrectomie totale est pratiquée sur l'animal et cela en comparaison avec un modèle nutritionnel de carence (1-18 mois) en groupement méthyle (*Methyldeficient diet - MD diet*). Les rats opérés sont dans l'incapacité d'absorber de la vitamine B12, et leur taux de mortalité est largement supérieur aux autres groupes. Pour autant, on peut observer une augmentation non significative de l'homocystéine plasmatique avec une perte de poids chez les animaux opérés. Les résultats obtenus sont décrits dans la partie *Résultats et discussion*.

Le deuxième modèle développé par Ayav *et al.* (2005) sur des rats Fisher F344 comportait une cohorte de mâles adultes thyroïdectomisés avec ou sans régime *methyldeficient* (durée de l'étude : 2 mois). Le but était de comparer les niveaux d'homocystéine chez des animaux thyroïdectomisés par rapport un régime *methyldeficient*. Les résultats montrent au contraire une diminution du taux plasmatique de l'homocystéine à l'inverse des autres travaux portant sur ce thème (Barbé 2001, Nedrebo 1998). Au niveau nutritionnel, les taux plasmatiques des animaux déficients en vitamines B2, B9, B12 et choline montrent une augmentation de l'homocystéinémie.

4.2.3. Modèle nutritionnel hyperhomocystéinémique conduisant à une stéatose hépatique

Une étude comparative menée par Kirsh et Hall (2003) a montré que les rats, selon leur espèce (*Wistar*, *Sprague-Dawley* et *Long Evans*), ont des prédispositions différentes en ce qui concerne l'apparition de stéatose hépatique, lorsque ces animaux sont soumis à un régime hyperhomocystéinémiant (carence en choline et riche en méthionine). Dans ces conditions, les rats *Wistar* développent plus facilement des stéatoses hépatiques. Les rats *Wistar* semblent donc plus adaptés pour comprendre les liens qu'il existe ou non entre l'élévation de l'homocystéine et l'apparition de stéatose hépatique, comme cela a déjà été observée chez des modèles transgéniques *cbs* *-/-*, *mthfr* *-/-*, *mat1a* *-/-* et *pemt* *-/-*. Les rats *Wistar* développent plus facilement des stéatoses hépatiques avec des taux plasmatiques d'Alanine transaminase plus élevés et une proportion de lipides hépatiques plus élevés que les autres souches de rat, particulièrement chez les mâles. Cette souche a été utilisée récemment par Blaise *et al.* (2005) et ces rats composent une cohorte de femelles adultes soumises ou non au régime *methyldeficient* précédemment décrit. Un mois avant accouplement et jusqu'au sevrage des ratons (~21 jours après la naissance), les rates sont maintenues sous régime *methyldeficient*. A la naissance, un groupe de ratons issu ou non de mère carencée subit une hypoxie modérée (5 minutes sous azote gazeux), et cela dans le but de déterminer si l'hypoxie potentialise, ou au contraire corrige, les effets délétères de l'hyperhomocystéinémie observée chez les animaux carencés. Les analyses histologiques de ces animaux carencés ont montré l'apparition de stéatose hépatique associée à un retard du développement. Cette pathologie a été observée chez tous les ratons nés de mère carencée alors que ces dernières ne développent pas systématiquement de stéatose.

4.2.4. Modèles combinés *cbs* +/- et régime hyperhomocystéinémiant

Les souris transgéniques *cbs* *-/-* présentent un défaut dans la voie de transsulfuration dont les conséquences sont une hyperhomocystéinémie sévère (>100 μM) (Watanabe, 1995) accompagnée de nombreuses complications (artériosclérose, ostéoporose, malformations squelettiques, stéatose hépatique, *etc.*). En revanche, les animaux hétérozygotes *cbs* +/- présentent une hyperhomocystéinémie modérée à la limite des valeurs normales (13,5 \pm 3,2 vs. 6,1 \pm 0,8 μM chez les contrôles) et il n'y a pas d'anomalie morphologique apparente chez ces animaux. Les souris *cbs* +/- nourries avec un régime supplémenté en choline retrouvent des

valeurs normales d'homocystéinémie (Schwan, 2004) montrant la modularité de l'homocystéine dans ce modèle. En 2002, Baumbach et Lentz associaient un régime riche en méthionine à des souris *cbs +/-*, régime qui montre une hyperhomocystéinémie, aussi bien chez les souris *cbs +/+* que les *cbs +/-* (respectivement $17,2 \pm 4,6$ vs. $21,2 \pm 3,9$ μM). Ce régime n'est donc pas suffisant pour induire une hyperhomocystéinémie significativement plus forte chez les hétérozygotes. Depuis longtemps l'augmentation de l'homocystéinémie chez des patients est associée à une déficience en folates et/ou vitamine B12 et c'est en toute logique qu'un modèle nutritionnel riche en méthionine et pauvre en folate a été associé à des souris hétérozygotes. Ainsi, parmi les utilisateurs de ce modèle on peut citer celui de Vitvitsky et Banerjee (2004) dont les animaux *cbs +/-* soumis à ce régime ont des homocystéinémies >60 μM alors que les *cbs +/+* étaient à ~ 20 μM . Dans des conditions normales de nutrition, ces souris ont respectivement des homocystéinémies à ~ 10 μM et ~ 6 μM .

5. Implication de l'homocystéine dans les pathologies hépatiques et cérébrales : marqueur biologique ou facteur déterminant ?

Plusieurs études ont montré que l'élévation des taux plasmatiques de l'homocystéine est associée à l'apparition de pathologies dégénératives telles que les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), les maladies cardiovasculaires et dans certains cas les stéatoses hépatiques (homocystinurie). L'hyperhomocystéinémie perturbe aussi les processus de procréation et peut causer ainsi des défauts du développement (Trisomie 21, spinabifida). Pour autant, il est encore difficile de déterminer si les symptômes observés chez un patient hyperhomocystéinémique sont dus à l'hyperhomocystéinémie elle-même ou si celle-ci est une autre conséquence de la pathologie.

5.1. Stéatose hépatique et homocystéine

5.1.1. stéatose hépatique

Un régime riche en graisses et un manque d'exercice a conduit les populations occidentales à une augmentation de l'obésité avec une augmentation concomitante du nombre de stéatoses hépatiques. La stéatose hépatique est caractérisée par une accumulation de gouttelettes lipidiques principalement dans le cytoplasme hépatocytaire (Pessayre, 2002). Les patients souffrant de forme primaire de stéatose présentent des combinaisons variées d'obésité, diabète et hyperglycémie avec une résistance à l'insuline.

Chez certains patients, cette stéatose hépatique reste isolée (sans autre lésion hépatique) mais chez d'autres, on peut observer des nécroses, une légère infiltration cellulaire inflammatoire et un lent développement de fibrose hépatique, qui peut progresser en cirrhose au bout de quelques années. L'association de la stéatose avec ces autres lésions est appelée stéatohépatite.

En plus de cette forme primaire de stéatose, il existe aussi des formes secondaires qui ont pour causes principales l'abus d'alcool, l'intoxication par certaines molécules (Tétrachlorure de carbone, chloroforme), maladie de Wilson (déficiency congénitale en cuivre), pontage jéjunoléal ou une nutrition totalement parentérale, une malnutrition chronique. Des études cliniques ont montré que la stéatose peut être due à des anomalies génétiques qui conduisent à une déficiency en carnitine. Par exemple, un déficit en transporteur de carnitine (OCTN2), une enzyme impliquée dans la biosynthèse de la carnitine (γ -butyrobétaïne hydroxylase), est associé à la stéatose (Tein, 2003).

Les stéatohépatites non alcooliques (*NASH, non alcoholic steatohepatitis*) décrivent une lésion du foie due à l'accumulation de corps gras dans les hépatocytes. Il a été suggéré que les NASH peuvent être considérées comme un type de stéatose indépendant parmi un large spectre des maladies du foie gras chez les non alcooliques (*NAFLD, Non alcoholic fatty liver disease*). Les patients avec une hyperhomocystéinémie sévère due à une déficiency en CBS développent aussi des stéatoses hépatiques qui sont caractérisées par des gouttelettes lipidiques micro- et macrovésiculaires. De plus, les souris transgéniques *cbs* $-/-$ qui ont une hyperhomocystéinémie sévère développent aussi un foie gras (Gulsen 2005). Plusieurs études cliniques, chez des patients cirrhotiques ou des modèles expérimentaux, ont montré que les taux d'homocystéine étaient corrélés à l'apparition de stéatose hépatique (Look 2000, Ferre 2002, Gigliozzi 1998). Comme cela a été évoqué précédemment, la stéatose hépatique

peut aussi être la conséquence d'une anomalie génétique conduisant à la déplétion de certaines enzymes telles que la CBS, la MTHFR, la MAT... Ces enzymes ont toutes en commun d'intervenir dans le métabolisme de l'homocystéine, ce qui établit clairement un lien entre cycle de reméthylation et la stéatose hépatique.

5.1.2. Déficience en carnitine et stéatose hépatique

Plusieurs études sur des modèles animaux (petits rongeurs) ont montré qu'une déficience en carnitine induite chimiquement par un traitement au THP (Triméthylhydraziniumpropionate, Spaniol 2003) ou génétiquement par une mutation sur le gène *octn2* (*Organic cation transporter*, Tein 2003) conduit à des stéatoses micro- et macrovésiculaires. En cas de défaut du transport de la carnitine, une supplémentation quotidienne en L-carnitine permet d'augmenter les chances de survie chez les souris *OCTN2 knockout*. On retrouve chez les animaux transgéniques non traités des dépôts lipidiques et des mitochondries anormales au niveau du cœur, du foie, du muscle squelettique et du rein avec des concentrations hépatiques en carnitine <5% des valeurs contrôles.

Le THP inhibe la synthèse de carnitine et induit son excrétion rénale, conduisant ainsi à une stéatose hépatique. Le THP est un inhibiteur compétitif de la γ -Butyrobétaine hydroxylase (EC 1.14.11.1), une enzyme vitamine C et Fe^{++} dépendante qui catalyse la réaction suivante :

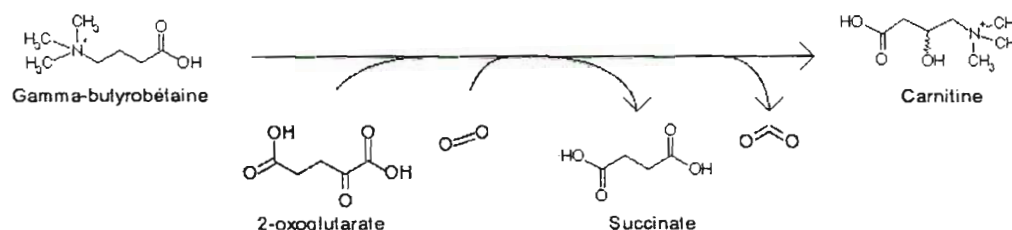


Figure 30 : Réaction d'hydroxylation de la γ -butyrobétaine couplée à une décarboxylation du 2-oxoglutarate, catalysée par la Butyrobétaine hydroxylase pour former de la carnitine.

Cette réaction constitue la dernière étape dans la synthèse de carnitine et l'efficacité de l'inhibiteur est de ~100% à 50 μ M. Cette étude démontre bien que l'apparition de stéatose peut être causée par un déficit en carnitine, élément indispensable à la translocation des acides gras à chaîne moyenne et longue dans la mitochondrie, où a lieu la β -oxydation.

5.1.3. Fonctions de la carnitine

En 1955, Fritz a démontré que la carnitine stimulait l'oxydation des acides gras dans des homogénats de foie, tandis que dans le même temps Friedman et Fraenkel (1955) montraient que cette molécule subissait une acylation réversible avec des acides carboxyliques de longueur variant de C2 à C22. Les acides gras à longue et moyenne chaîne sont activés par thio-estérification, avec le coenzyme A, dans le cytoplasme alors que la β -oxydation (catabolisme des acides gras) a lieu dans la matrice mitochondriale. La membrane mitochondriale est imperméable aux acides gras à longue chaîne mais cette barrière est franchissable grâce à l'intervention de la carnitine et de sa protéine associée, la translocase (Bremer, 1990). Au niveau cytoplasmique, la Carnitine palmitoyltransferase (CPT I, EC 2.3.1.21) transfère l'acide carboxylique sur la carnitine par estérification en même temps qu'elle transfère l'acylcarnitine dans l'espace intermembranaire (Figure 31). La Carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) va permettre le transport d'une acylcarnitine dans la matrice mitochondriale (Vaz, 2002).

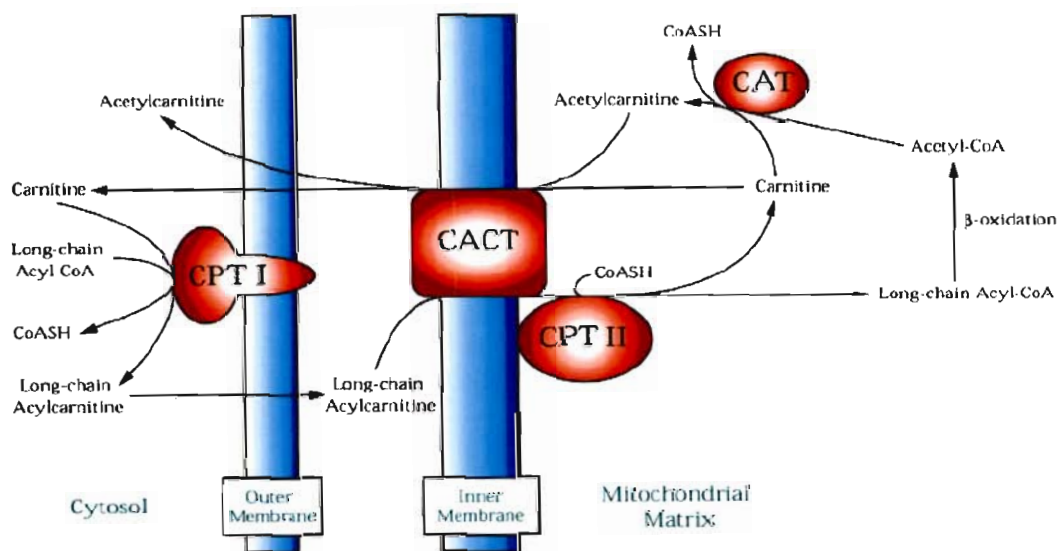


Figure 31 : Modèle de translocation membranaire des acides gras du cytosol vers la matrice mitochondriale. CPT I, Carnitine palmitoyltransférase I. CACT, Carnitine-Acylcarnitine translocase. CPT II, Carnitine palmitoyltransférase II. CAT, Carnitine acetyltransferase (d'après Vaz, 2002).

Une fois dans la matrice mitochondriale, la Carnitine palmitoyltransférase II (CPT II) transfère l'acide gras sur un coenzyme A libre (CoA-SH) pour permettre la β -oxydation de l'acide carboxylique, libérant ainsi un certain nombre d'acétyl-CoA comme produit final de la β -oxydation. Cet acétyl-CoA rejoint le cycle du citrate (mitochondrial), produisant des

cofacteurs réduits (FADH_2 et NADH,H^+) qui permettent au final la production d'ATP par phosphorylation oxydative. La première étape dans la biosynthèse des acides gras est la carboxylation de l'acétylcoenzyme-A (Ac-coA) en malonylcoenzyme-A par l'Ac-coA carboxylase, enzyme clé de la biosynthèse des acides gras. On peut noter que le malonyl-coA est un inhibiteur de la CPT I et donc que l'amorçage de la biosynthèse des lipides induit un arrêt de la β -oxydation. Au final, c'est quand même le ratio $\text{NAD}^+/\text{NADH,H}^+$ (produit du cycle du citrate, Ac-coA dépendant) qui détermine la vitesse de β -oxydation des acides gras.

5.1.4. Régulation de la synthèse de la carnitine

La carnitine est synthétisée à partir d'une lysine bien précise au niveau de certaines protéines (calmoduline, myosine, actine ou histones) notamment le Cytochrome c. La N-méthylation de ces résidus lysines apparaît comme un événement post-traductionnel catalysé par des méthyltransférases bien spécifiques qui ont toutes en commun d'utiliser la SAM comme donneur de méthyle. L'hydrolyse lysosomale de ces protéines résulte en un relargage de triméthyllysine (TML) qui est la première étape dans la biosynthèse de la carnitine. Ces méthyltransférases impliquées dans la production de TML ont été caractérisées chez la bactérie et la levure mais pas encore chez les mammifères. Aussi, l'association entre le métabolisme des monocarbones et la synthèse de carnitine dans le foie demeure hypothétique. Une modification profonde du statut en SAM et SAH, qui sont les substrats et produits de la réaction de transméthylation, peut donc potentiellement perturber les processus de régulation de la synthèse en carnitine.

5.2. Homocystéine et insulino-résistance

Des patients ayant un diabète de type 2 (Insulino-résistant) développent des maladies coronariennes qui ne sont pas toujours liées à une dyslipidémie (Fonseca *et al.* 2000). L'insulino-résistance et l'hyperinsulinémie sont reconnus comme étant des facteurs de risque impliqués dans l'athérosclérose (Reaven *et al.* 1991, De Fronzo *et al.* 1992). Munshi *et al.* (1996) ont montré, dans une étude comparative entre les diabétiques de type 1 et de type 2, que seul le type 2 est associé à une hyperhomocystéinémie. Dans ce cas, les patients développent plus vite des maladies macrovasculaires. D'autres études ont également montré une augmentation de l'homocystéinémie chez les patients diabétiques qui développent une athérosclérose ou une insuffisance rénale (Wiklund *et al.* 1996, Araki *et al.* 1993). Cependant,

bien qu'il existe une corrélation négative entre insuline et homocystéine chez des patients obèses diabétiques, il n'y en a aucune entre homocystéine et l'indice de masse corporelle (Fonseca *et al.* 2003). Le rôle de ces anomalies métaboliques dans l'étiologie du diabète reste assez flou. Pour comprendre ce lien possible, Poirier *et al.* (2001) ont soumis 33 patients diabétiques (Type 1 et 2 mélangés, sans discrimination apparente entre ces deux groupes) à des analyses biologiques (érythrocytes et lymphocytes) portant sur les déterminants nutritionnels de l'homocystéine. Il en ressort que des patients diabétiques souffrant d'hypertension (néphropathie) et/ou sous traitement d'hémodialyse, ont une hyperhomocystéinémie modérée (~16 μ M) associée à une diminution du ratio SAM/SAH, et une diminution de l'activité MTHFR. Cela indique que des diabètes associés à des néphropathies sont accompagnés de troubles du métabolisme des monocarbones. Dicker-Brown *et al.* (2001) ont aussi montré chez des patients diabétiques de type 2, présentant des risques cardio-vasculaires, une hyperhomocystéinémie modérée. De plus, une hyperinsulinémie conduirait à une chute de l'homocystéinémie chez des sujets sains mais pas chez des patients diabétiques de type 2 (Fonseca *et al.* 1998). Enfin, il a été montré que des rats soumis à un régime gras hyperglycémiant, développant une obésité associée à une hyperinsulinémie, subissent également une insulino-résistance et une hyperhomocystéinémie (Fonseca *et al.* 2000). Un traitement des cellules d'hépatocarcinome (HepG2) avec des doses croissantes d'insuline provoque une diminution des activités MTHFR et de la CBS (Dicker-Brown, 2001). En revanche, bien que des doses croissantes en glucose (100-300%) sur ces cellules conduisent aussi à une diminution de l'activité MTHFR, il y a une augmentation progressive de l'activité CBS. Ces résultats suggèrent donc que des patients atteints de diabète insulino-résistant ont des désordres du métabolisme de l'homocystéine modulés par les concentrations en glucose et insuline.

L'expression de la CBS est importante pour maintenir la balance entre synthèse de méthionine et synthèse de cystéine via l'homocystéine. Il a été montré que le glucagon peut induire la synthèse de CBS (Jacobs *et al.* 2001). A l'inverse, un traitement à l'insuline de rats diabétiques (traités à la streptozotocine) conduit à une diminution de l'activité CBS hépatique, conséquente à une diminution des taux de transcription de la CBS (Ratnam *et al.* 2002). Ces deux hormones antagonistes ont donc des effets contraires sur l'activité de la CBS, mais seule l'insuline peut moduler l'expression de la *cbs*, car le glucagon n'a aucun effet sur les taux de transcription. Une étude récente sur des rats obèses *Zucker* (déficients pour le récepteur à la leptine et développant un diabète de type 2) a montré une diminution d'environ 60% de l'homocystéinémie au bout de 11 semaines d'étude (Wijekoon *et al.* 2005). Dans le même

temps, les taux de glucose augmentent d'un facteur 3, et les taux d'insuline diminuent de 60% pour revenir à la normale chez les rats *Zucker*. Au niveau du métabolisme des monocarbone, on observe une diminution de l'homocystéinémie, avec une augmentation des activités CBS, CGL (Cystathionine- γ -lyase), MAT, BHMT et GNMT, mais aucune variation notable pour la MTHFR et la Méthionine synthase. L'activation du métabolisme de l'homocystéine conduit à une augmentation des taux hépatiques de SAM chez les rats obèses tandis que les taux de SAH ne varient pas. Ce déséquilibre se traduit par une augmentation du ratio SAM/SAH. Wijekoon *et al.* (2005) ont montré également que l'augmentation des activités CBS et BHMT est due à une activation de la transcription de leurs ARN messagers respectifs. La BHMT et la CBS sont des enzymes déterminant l'homocystéinémie, et la diminution de l'homocystéine est corrélée à la diminution de bétaine hépatique (~50%). Ce modèle a permis d'établir que des rats diabétiques (type 2) ne souffrant pas de complications rénales, voient leur taux d'homocystéine diminuer.

Le diabète est caractérisé non seulement par le manque d'insuline, ou la résistance à l'action de l'insuline, mais aussi par une augmentation des hormones contre-régulatrices telles que les glucocorticoïdes et le glucagon (Stubbs *et al.* 1991, Consoli *et al.* 1990). L'activité de la MAT a été corrélée positivement aux glucocorticoïdes. La BHMT est corrélée positivement à l'hydrocortisone et négativement à la thyroxine (Finkelstein *et al.* 1971). Le traitement à l'insuline restaure une activité normale de la CBS, en agissant sur les niveaux de transcription du gène. L'AMP cyclique, messenger intracellulaire du glucagon et des glucocorticoïdes, augmente l'expression de la CBS dans des cellules d'hépatocarcinome de rat.

Des études récentes suggèrent que l'homocystéine pourrait induire une insulino-résistance par sa forme toxique, l'homocystéine thiolactone, qui provoque des altérations dans les structures protéiques, notamment sur les récepteurs à l'insuline (Najib et Sanchez-Margalet, 2005). Le stress oxydant généré par l'homocystéine thiolactone conduit à une inhibition de l'activité Tyrosine kinase des récepteurs à l'insuline, résultant en une diminution de l'activité Phosphatidylinositol 3-kinase, une inhibition de la synthèse de glycogène et aussi d'une inhibition, par l'insuline, de la stimulation d'ADN et de la synthèse peptidique

5.3. Homocystéine, et évènements précoces de la vie

L'hyperhomocystéinémie est la conséquence d'un désordre génétique ou nutritionnel chez un individu. Les effets de cette hyperhomocystéinémie sur la descendance est incertain mais il apparaît aujourd'hui que les facteurs de risque conduisant à des malformations embryonnaires sont en lien étroit avec les différents acteurs du métabolisme de l'homocystéine (MTHFR, MTR, statut vitaminique,...). Parmi les anomalies que l'on peut rencontrer il y a le plus souvent la trisomie 21 et le *spina bifida*.

5.3.1. Trisomie 21

La trisomie 21 (Syndrome de Down) est une pathologie dont le point de départ est un défaut de séparation durant la méiose des deux chromosome 21, le plus souvent maternels (93% des cas), aboutissant à un chromosome surnuméraire.

Quelquefois délicat chez le nouveau né et le prématuré ou encore chez les enfants d'origine africaine ou asiatique, le diagnostic est évident chez le nourrisson et le grand enfant sur la dysmorphie (brachycéphalie, petit bassin, petite bouche, lèvres épaisses, langue souvent grosse, protruse, la main est large, trapue, les doigts courts, le pied est large, petit et plat...). A ce syndrome dysmorphique s'associe toujours un retard mental, d'intensité variable en fonction de différents facteurs (interaction entre le chromosome surnuméraire et le reste du génome, caractère homogène ou non de l'anomalie, qualité de la prise en charge, en particulier familiale). Le QI est en moyenne de 50 avec des extrêmes allant de 38 à 70-80. Le retard porte sur les facultés d'apprentissage et de raisonnement, l'affectivité et la sociabilité étant relativement préservées. Il s'installe dès la petite enfance mais devient évident après l'âge de 4 ans et à l'adolescence. Il porte sur les facultés cognitives, avec des déficits dans la mémoire verbale à court terme, sur le langage (syntaxe et intelligibilité) et sur le comportement adaptatif (anxiété, dépression). Le pronostic vital est conditionné par l'existence de cardiopathies et de malformations digestives, la sensibilité aux infections et le risque accru de leucémies. L'amélioration de la prise en charge permet actuellement à beaucoup de ces enfants d'atteindre l'âge adulte. Avec l'âge, la dysmorphie se modifie, surtout du fait du vieillissement précoce. Une hypothyroïdie peut apparaître. Il existe souvent une cataracte sénile. Surtout, le handicap mental s'aggrave du fait principalement de l'apparition d'une démence proche de celle de la maladie d'Alzheimer.

Au niveau moléculaire, le chromosome 21 contient environ 300 gènes dont la majorité sont connus. La plupart sont situés dans la région 21q22. Bien que le phénotype de l'affection soit surtout en rapport avec le nombre de gènes présents dans cette région, quelques gènes semblent plus spécifiques comme le gène codant pour le précurseur de la protéine amyloïde (APP) en cause dans la maladie d'Alzheimer, celui codant pour la superoxyde dismutase (SOD) qui est impliqué dans le vieillissement, celui codant pour le transporteur des folates (RFC) ou encore celui codant pour la CBS et d'autres également exprimés dans le système nerveux central. Deux variants d'enzymes du métabolisme de l'homocystéine 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 (O'Leary *et al.* 2002). Ces deux enzymes pourraient être importantes dans la physiopathologie de ce syndrome car elles interviennent dans le métabolisme des groupements méthyles et indirectement dans 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 (jusque 5 fois) d'avoir un enfant présentant une trisomie 21 (Hobbs *et al.* 2000 ; Bosco *et al.* 2003). Un des mécanismes potentiels pourrait être une hypométhylation de l'ADN qui favoriserait la non-disjonction observée pendant la méiose associée à la trisomie 21 (James *et al.* 1999).

5.3.2. *spina bifida*

Au cours de la grossesse, une déficience en folates augmente significativement le risque d'une anomalie dans la formation du tube neural chez le fœtus (Smithells *et al.* 1976). Le tube neural se forme à partir de la plaque neurale qui se redresse en gouttière et se referme par fusion des bourrelets neuraux. Les cellules de la crête neurale migrent depuis les bourrelets neuraux pour former les ganglions spinaux. La présence d'une hyperhomocystéinémie chez le fœtus engendre une anomalie dans la prolifération, la différenciation et la mort des cellules néoformées de cette zone aboutissant au *spina bifida*. Le *spina bifida* est une imperfection de la colonne vertébrale dans laquelle une ou plusieurs vertèbres ne se sont pas formées correctement, créant un espace qui laisse passer la moelle épinière et les méninges. La malformation peut apparaître au niveau des vertèbres dorsales ou cervicales (nuque) mais apparaît plus communément au niveau des vertèbres lombaires (bas de la colonne vertébrale). Plusieurs types de *spina bifida* sont identifiés avec des

conséquences plus ou moins importantes. Ainsi le *spina bifida Occulta* (caché) est la forme la moins grave et la plus commune du *spina bifida*, causant rarement des infirmités.

Il est actuellement admis que le statut en folates est l'un des facteurs environnementaux importants dans l'étiologie des anomalies du tube neural (Van der Put et Blom, 2000). Sur des cultures de cellules cérébrales embryonnaires, des études ont montré que la baisse de folates inhibe la prolifération des cellules souches astrocytaires et neuronales (Mattson, 2003). De la même façon, l'utilisation de méthotrexane, inhibiteur du métabolisme du folate, diminue la prolifération et augmente l'apoptose des cellules souches en modifiant la quantité et l'appariement des nucléotides à l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire (Kruman *et al.* 2002; Choi *et al.* 2002).

La déficience en vitamine B12 durant la gestation provoque une élévation de l'homocystéine chez le fœtus et augmente les altérations développementales de son système nerveux (Guerra-Shinohar 2002). Chez l'enfant, la déficience en vitamine B12 peut engendrer divers problèmes comme une hypotonie sévère, une apathie ... qui pourraient être le reflet d'un déficit de la myélinisation (Hall *et al.* 1990; Lovblad *et al.* 1997). Par ailleurs, la déficience héréditaire de la transcobalamine II provoque des anomalies neurologiques caractérisées par un retard intellectuel, une ataxie... (Thomas *et al.* 1982).

L'association des anomalies de fermeture du tube neural avec l'hyperhomocystéinémie a fait l'objet de diverses publications (Steeegers-Theunissen *et al.* 1991, Van Der Put *et al.* 2000; Gueant-Rodriguez *et al.* 2003). La non fermeture du tube neural ne serait pas due à une action directe de l'homocystéine, mais à une anomalie de fonctionnement de la méthionine synthase (Gueant-Rodriguez *et al.* 2003; Wilson *et al.* 1999). L'altération de l'enzyme engendrerait certes une accumulation de l'homocystéine mais aussi un déficit de méthionine nécessaire à la synthèse de la myéline. Il existe donc une association entre les anomalies de fermeture du tube neural et l'hyperhomocystéinémie mais ces pathologies résultent le plus souvent d'un déficit en groupements méthyles.

5.4. Maladies neurodégénératives liées à l'homocystéine

5.4.1. Maladie d'Alzheimer

L'augmentation du taux d'homocystéine plasmatique a été associée à l'apparition de la maladie d'Alzheimer (MA). Alors que l'homocystéine se révèle toxique dans des modèles de cellules en culture tels que les cultures primaires de neurones corticaux, les mécanismes de toxicité de l'homocystéine et son rôle dans la pathogénicité de la MA demeurent assez flous. Hasegawa *et al.* (2005) ont émis l'hypothèse que ce serait l'acide homocystéique (HA), un produit d'oxydation de l'homocystéine, qui jouerait un rôle dans la pathogénèse de la MA par une régulation positive de la production du peptide β -amyloïde ($A\beta_{42}$). Les dépôts extracellulaires d'agrégats font partie des principaux diagnostics pour la MA mais l' $A\beta_{42}$ peut être particulièrement cytotoxique quand il s'accumule à l'intérieur des neurones. L'HA diminue l'apparition des plaques $A\beta_{42}$ à l'extérieur des cellules mais au contraire augmente fortement l' $A\beta_{42}$ intracellulaire. Cette neurotoxicité due à l'HA est atténuée par l'utilisation d'inhibiteurs de γ -secretase, l'activité enzymatique générant de l' $A\beta_{42}$, suggérant ainsi le rôle clé de l'accumulation de $A\beta_{42}$ dans l'action neurotoxique de l'HA.

Bien que les taux d'HA soient identiques entre les patients MA et les contrôles, il a été démontré que l'augmentation de l'homocystéine associée à un polymorphisme MTHFR 677TT était un facteur de risque indépendant dans l'apparition de la maladie (Anello 2004). L'implication de l'homocystéine et ses effets neurotoxiques dans la maladie d'Alzheimer seraient donc dus à son produit d'oxydation, l'HA, lui-même activateur dans la synthèse du peptide $A\beta_{42}$. Néanmoins, cela n'explique pas comment l'HA régule le peptide $A\beta_{42}$. La régulation positive de $A\beta$ pourrait impliquer le stress oxydant car les différentes études menées sur ce sujet montrent justement que des marqueurs du stress oxydant précèdent la période d'accumulation de $A\beta$.

Les travaux *in vitro* de Ho PI (2001) ont montré que l'association homocystéine + peptide $A\beta$ induit un stress oxydant et une mort par apoptose des neurones, alors qu'individuellement, leurs effets seraient moindres. L'action synergique de l'homocystéine et du peptide $A\beta$ stimule l'ouverture de canaux calciques. L'influx de calcium favorise la production des radicaux libres dont la surdose conduit à une mort cellulaire. Par ailleurs, les individus porteurs de l'isoforme $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E présentent un risque élevé de développer une MA. L'apoE est une protéine ubiquitaire, jouant un rôle dans le transport du

cholestérol et des phospholipides. Des études génétiques ont montré que l'apoE intervient dans la MA, en tant que facteur de risque (pour l'allèle E4) ou protecteur (pour l'allèle E2). Cette apoE4 aurait une activité antioxydante réduite par rapport aux autres isoformes. A ce titre, plusieurs études cliniques ont rapporté l'existence d'une corrélation entre les polymorphismes apoE4 et MTHFR dans les cas de MA (Anello *et al.* 2004; Fernandez *et al.* 2005 ; Nishiyama *et al.* 2000).

5.4.2. Maladie de Parkinson

Plusieurs études (Blandini *et al.* 2001; Yasui *et al.* 2000; Heider *et al.* 2004) ont montré une corrélation entre le développement de la maladie de Parkinson (MP) et une augmentation de l'homocystéine plasmatique. Une hyperhomocystéinémie a été observée chez les patients atteints de MP présentant une mutation (C677T) de la MTHFR. La baisse de donneur de méthyle à l'origine d'une hyperhomocystéinémie pourrait accélérer le processus de neurodégénérescence (Liu *et al.* 2000). Duan *et al.* (2002) ont montré sur un modèle de souris MP (MP induit après administration de 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP), qu'une déplétion en folates ou une administration d'homocystéine augmentait la perte des neurones dopaminergiques. Par ailleurs, une étude récente (Muller *et al.* 2004) a montré que le traitement de Lévodopa induit également une élévation de l'homocystéine et augmenterait le processus neurodégénératif.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les articles, qui ont été publiés en rapport avec ce travail de thèse, ont en commun l'étude des perturbations du métabolisme de l'homocystéine provoquées par une carence de ses déterminants nutritionnels. Les objectifs étaient les suivants :

- 1- Définir l'importance relative des déterminants nutritionnels de l'homocystéine sur la modulation des processus de méthylations cellulaires
 - a. Produire des modèles chirurgicaux permettant d'obtenir des carences spécifiques en vitamine B12 (gastrectomie) ou vitamine B2 (Thyroïdectomie)
 - b. Evaluer l'efficacité de ces modèles en les comparant à des modèles nutritionnels dépourvus de substrats méthylés (choline, folate, vitamines B2 et B12)
 - c. Mesurer, au niveau hépatique, les conséquences d'un régime dépourvu de substrats méthylés, sur l'expression de la Méthionine synthase et des autres enzymes du cycle de reméthylation de l'homocystéine, ainsi que sur la modulation du potentiel de méthylation cellulaire et du statut de méthylation de l'ADN
- 2- Observer les effets d'un régime nutritionnel conduisant à une hyperhomocystéinémie chez les rats nés de mères soumises à une carence en vitamines du groupe B.
 - a. Mesurer les déterminants nutritionnels de l'homocystéine chez les rates gestantes et allaitantes
 - b. Observer le développement corporel de la progéniture issue de rates soumises à un régime *methyldeficient*.
 - c. Etudier par des analyses anatomopathologiques les conséquences du régime *methyldeficient* maternel sur les cellules hépatiques de la progéniture
- 3- Evaluer l'influence d'une hyperhomocystéinémie (modérée chez le rat nouveau né *methyldeficient* et sévère chez la souris transgénique *cbs -/-*) sur l'apparition de stéatose hépatique.
 - a. Mesurer et comparer l'expression des enzymes du métabolisme de l'homocystéine entre le rat *methyldeficient* et la souris *cbs -/-*
 - b. Mesurer et comparer les marqueurs du stress oxydant en lien avec l'homocystéine
 - c. Rechercher les mécanismes liant le métabolisme de l'homocystéine à l'apparition de stéatose hépatique.

MATERIELS ET METHODES

1. Modèles d'étude

1.1. Entretien des animaux

Animaux : Les animaux utilisés lors de l'étude préliminaire (Chirurgies) sont des rats FISHER F344, mâles, âgés de 15 semaines (IFFA CREDO ; L'arbresle ; France), répartis chacun dans une cage en plastique et maintenus à une température ambiante de 23°C (+/- 3°C), avec des cycles de 12h de lumière pour 12h d'obscurité, et un libre accès à la boisson.

Régime alimentaire : Un régime déficient en coenzymes et en substrats méthylés (MD), et un régime normal (MA : methyl-adequate) ont été utilisés. Le régime MD décrit par Poirier *et al.* contient un mélange d'acides aminés dépourvu de méthionine, ainsi qu'un mélange de vitamines dépourvu de choline, d'acide folique (vitamine B9) et de cobalamine (vitamine B12). Ce régime MD a été préparé spécialement par la société Pietrement. Le régime MA est un régime standard complet (M20 *diet* ; Pietrement).

Protocole : Tous les rats ont été nourris avec un régime MA une semaine avant le début de l'expérimentation. Les animaux ont été opérés par le Docteur Laurent Brunaud (pour les gastrectomies) et par le Docteur Ahmet Ayav (pour les thyroïdectomies), répartis dans des groupes d'étude définis comme suit :

Les animaux sont pesés à chaque prise de sang qui ont eu lieu au premier jour de l'expérimentation, puis à 1, 4, 6, 9, 12, et 18 mois. Tous les rats ont été suivis jusqu'à leur mort, et aucun sacrifice n'a été réalisé, ce qui a permis d'estimer l'espérance de vie de chaque groupe. Après le décès du rat, le foie a été prélevé, rincé dans un tampon phosphate de potassium salin, plongé dans l'azote liquide pour une conservation optimale, puis stocké à -80°C.

Dans la seconde étude, les animaux utilisés sont des rats Wistar femelles (Charles River[®]), âgées de 15 semaines et acclimatées durant 2 semaines à l'animalerie en étant répartis chacun dans une cage en plastique et maintenus à une température ambiante de 23°C (+/- 3°C), avec des cycles de 12h de lumière pour 12h d'obscurité, et un libre accès à la boisson.

Les rates sont soumises ou non à un régime méthyle déficient (*MD diet*, Special Diet Service, Saint-Gratien[®]) durant un mois, puis mises en accouplement. La carence est maintenue durant toute la gestation et jusqu'au sevrage des ratons (21 jours après mise bas). Une étude

complémentaire a été menée dans le but de comprendre les effets d'un retour à un régime normal (de 21 à 80 jours) pour les rats nés de mères carencées.

1.2. Sacrifice et prélèvements

Les animaux sont anesthésiés sous Halothane (2-Bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroéthane), le sang prélevé par ponction dans la cavité cardiaque et transféré dans des tubes héparinés aussitôt centrifugés à 600.g/4°C/10 min pour séparer le plasma et les globules rouges qui seront conservés à -20°C. L'animal est sacrifié par décapitation puis les organes sont prélevés et rincés dans du PBS avant d'être congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

1.3. Etudes histopathologiques

i- Histologie

Les tissus fixés sont inclus dans des blocs de paraffine. Les coupes de 4 µm d'épaisseur sont marquées à l'hématoxyline-éosine et avec des marqueurs spécifiques de ce tissu pour l'analyse des fibres (coloration du collagène de type I et de la réticuline avec du rouge Sirius), des fibres réticulaires (avec du Gordon Sweet) et pour le fer ferrique (avec du Perls).

ii- Microscopie électronique

Les fragments de tissus fixés ont été inclus et colorés en collaboration avec le laboratoire de microscopie électronique de la faculté de Médecine de Nancy. Les tissus sont ensuite déshydratés par incubations successives dans des bains d'éthanol (50 à 100%), inclus dans une résine (EPON). Les fragments, incubés avec de l'acétate d'uranyl et du « Reynold's lead citrate » sont coupés en tranches ultra-fines. Celles-ci sont observées avec un microscope électronique à transmission (Philips CM12, Hollande).

iii- Extraction lipidique

La technique est adaptée de Folch (Folch *et al.* 1957). Le tissu est homogénéisé dans un mélange de chloroforme / méthanol (2:1) pour un volume final de 20 mL / g de tissu. Le tissu dans le mélange est légèrement broyé afin d'améliorer le rendement d'extraction et est incubé une demi-heure à température ambiante, sous agitation.

Après une minute de centrifugation (2000 rpm), la phase inférieure chloroformée et l'interface sont reprises avec un même volume d'un mélange méthanol / eau / chloroforme (48 / 47 / 3). Après 5 minutes sous agitation, l'échantillon est centrifugé (2000 rpm), la phase aqueuse est à nouveau éliminée et l'interface et la phase inférieure lavées avec le mélange méthanol / eau / chloroforme (48 / 47 / 3). Après trois lavages, seule la phase inférieure chloroformée est conservée et transférée avant évaporation sous une atmosphère d'azote.

iv- Triglycérides et cholestérol

Pour réaliser les dosages de triglycérides et du cholestérol, l'extrait lipidique est suspendu dans du liquide physiologie (Ringer) contenant 3% de BSA (Ono *et al.* 2003). Les mesures sont réalisées avec un automate multiparamétrique (Olympus AU400). Ces dosages ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de biochimie du CHU de Nancy.

2. Dosages sanguins

2.1. Vitamines B12 et B9 (folates)

Les dosages sont effectués sur du plasma obtenu après centrifugation (1000g/4°C/10 min) du sang prélevé sur les rats de l'étude grâce au coffret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals). Il s'agit d'un dosage radio-immunologique de la vitamine B12 et des folates. Ces molécules non marquées entrent en compétition avec leurs homologues marqués (vitamine B12 [⁵⁷Co] et folates [¹²⁵I]) vis à vis d'un nombre restreint et constant de sites de fixation. Par conséquent, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon. Grâce à cette technique, les taux de vitamine et de folates sont déterminés simultanément dans un seul tube, et la radioactivité de rayonnement gamma est comptée avec un compteur COBRA-II™ autogamma (Packard) à double canal. Ce coffret

contient du Facteur Intrinsèque de porc (FI) purifié, disponible pour la liaison avec la vitamine B12, et fixé de manière covalente sur un support solide. Le même principe est appliqué pour les folates, en fixant sur un support un réactif de liaison lacté produit à partir de lait de vache.

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant ; une droite d'étalonnage en 6 points est faite pour la vitamine B12 (0, 74, 148, 296, 740 et 1480 pM) et pour les folates (0, 2,3, 4,5, 9,1, 23, et 45 nM).

2.2. Homocystéine

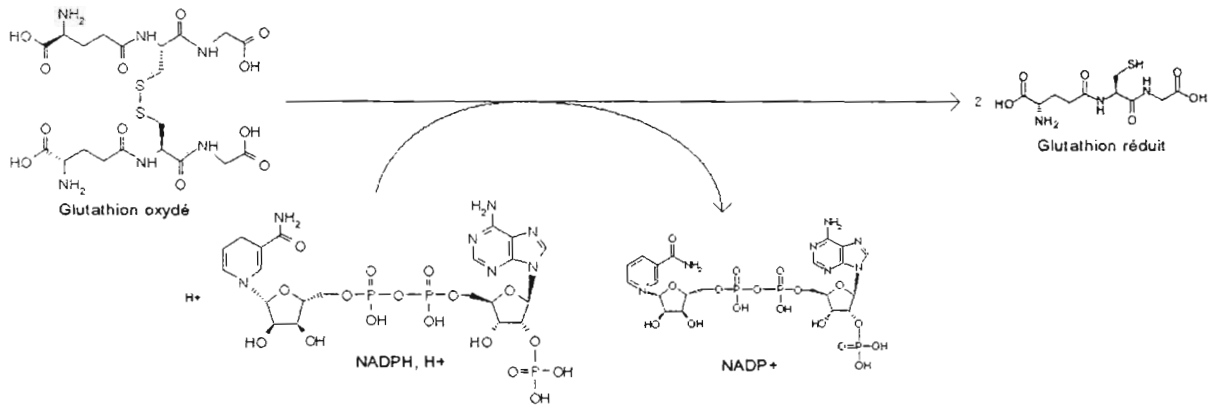
Les taux plasmatiques d'Hcy sont réalisés à l'aide d'un kit (Abbott) par le système automatisé IMx (Abbott).

Principe : Toutes les formes d'Hcy (homocystine, protéines homocystéinylées) sont réduites par le DTT puis une SAH hydrolase bovine transforme en présence d'adénosine l'Hcy en S-adénosylhomocystéine. Un anticorps monoclonal de souris (IgG) dirigé contre cette SAH est ajouté dans la réaction tandis qu'un 2^{ème} anticorps (IgG secondaire couplé à un fluorophore, la fluoréscéine) sera dirigé contre le primaire. On ajoute aussi de la S-adénosylcystéine qui entrera en compétition avec la SAH sur les sites de liaison de l'anticorps. La technologie d'analyse repose sur la polarisation de fluorescence (*FPIA, fluorescence polarization immuno assay*) et les variations de concentration en Hcy se traduiront par des variations du nombre d'anticorps secondaires fixés sur les primaires. Cette modification de l'état physique des IgG secondaires fluorescents est mesurée par le système IMx, et les concentrations seront calculées par l'appareil à partir d'une gamme de standards (0 – 2,5 – 5 – 10 – 20 et 50 µM) et les résultats exprimés en µM.

2.3. EGRAC

Le coefficient d'activation de la Glutathion-S-réductase érythrocytaire permet de mesurer le statut de vitamines B2 (flavines). Cette méthode est basée sur celle décrite par Moat *et al.*

Principe : la Glutathion-S-réductase (EC 1.8.1.7) catalyse la réaction suivante :

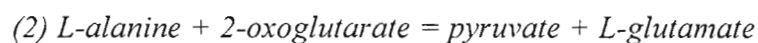
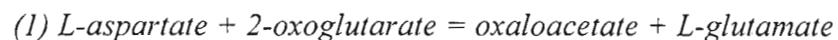


L'activité de la forme érythrocytaire de cette enzyme est utilisée comme base du test fonctionnel pour la détermination du statut fonctionnel des riboflavines. L'activité de cette enzyme est mesurée en présence ou en absence de FAD, les résultats sont exprimés sous forme de coefficient d'activation (EGRAC) et un statut faible en FAD est reflété par une augmentation significative de l'EGRAC sachant qu'un coefficient $> 1,4$ signifie une déficience en FAD. L'activité de l'enzyme est mesurée dans un hémolysat de globules rouges en présence de NADPH, H^+ comme agent réducteur de la réaction et de glutathion oxydé (GSSG) comme substrat. L'oxydation du NADPH, H^+ en NADP^+ est observée par spectrophotométrie à 340 nm.

2.4. ASAT/ALAT

Le dosage ASAT/ALAT (Aspartate aminotransférase, EC 2.6.1.1 et Alanine aminotransférase, EC 2.6.1.2) est couramment utilisé dans le secteur hospitalier car il s'agit d'un dosage sanguin permettant la détection d'anomalies hépatiques.

Principe : l'ASAT catalyse la réaction (1) et l'ALAT la réaction (2).



La destruction de cellules hépatiques entraîne une libération de ces enzymes dans le sang et une augmentation des activités sera donc un signe de lésions du foie. On observe notamment ces augmentations en cas d'hépatite, de cancer du foie ou de stéatose hépatique.

3. Dosages hépatiques

Après sacrifice des animaux, les foies sont disséqués puis rincés dans du PBS 1x (*phosphate buffered saline*, tampon phosphate salin, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM) congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

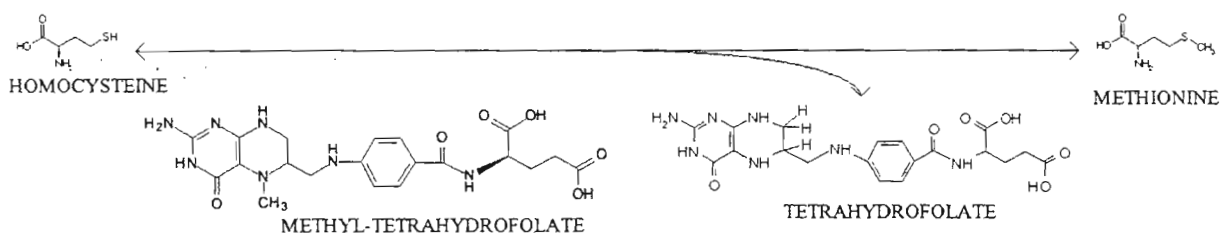
Lors de la préparation des homogénats tissulaires, le foie est broyé sous azote liquide et la masse de tissu est mesurée. Le broyat est suspendu dans 500 μL de tampon hypotonique PBS 0.1x contenant 5% d'inhibiteur de protéase (*protease inhibitor cocktail*, sigma[®]) pour 100 mg de tissu. L'échantillon est maintenu dans la glace et traité par sonication (*cell sonifier disruptor*, Branson[®]) en mode pulsé (*duty cycle* 30%) durant 1 minute. L'homogénat obtenu est centrifugé à $20.000g/4^\circ\text{C}/30$ min et le culot est éliminé.

Les concentrations de protéines totales cytoplasmiques sont mesurées à l'aide du kit *DC protein assay* (Bio-rad[®]) selon la méthode colorimétrique de Lowry (1951).

3.1 Marqueurs hépatiques du métabolisme de l'homocystéine

3.1.1. Méthionine synthase (MTR)

La MTR (EC 2.1.1.13) est une enzyme cytoplasmique de 135 kDa contenant du zinc et qui utilise comme cofacteur de la réaction la vitamine B12 (méthylcobalamine). Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



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

Le dosage est réalisé selon la méthode décrite par Chen et Banerjee (1995) :

La préparation des réactifs se fait avec de l'eau milli-Q désoxygénée (sous flux d'azote gazeux durant 30 minutes) et le mélange réactionnel est maintenu sous un flux d'azote durant toute la préparation. L'incubation est maintenue 1h/37°C dans un bloc chauffant thermostaté et dans

ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme.

Vol réac : 100 μ L	C réaction	C stock	Volume
Protéines	~500 μ g	~20 μ g/ μ L	25 μ L
K ₂ H/KH ₂ (PO ₄) pH 7,2	100 mM	1 M	10 μ L
DTT (H ₂ O)	25 mM	580 mM	4.3 μ L
Na/Ascorbate (H ₂ O)	25 mM	720 mM	3.5 μ L
SAM (H ₂ O)	20 μ M	2 mM	1 μ L
Methyl-B12 (H ₂ O)	50 μ M	5 mM	1 μ L
Homocystéine (HCl 1N)	5 mM	500 mM	1 μ L
MeTHF (DTT 10 mM)	0,225 mM	22,5 mM	1 μ L
[¹⁴ C]MeTHF (DTT 10 mM)	25 μ M	2,5 mM	1 μ L
H ₂ O qsp 100 μ L			52.2 μ L

La réaction est arrêtée en chauffant les échantillons à 95°C/5 min, refroidis dans la glace, centrifugés à 12.000g/4°C/10 min et le culot éliminé.

La [¹⁴C]méthionine formée et le [¹⁴C]méthyl-tétrahydrofolate en excès sont séparés par chromatographie d'échange d'ions. Pour cela une colonne AG1x8 (résine cationique échangeuse d'anions Cl⁻, Bio-Rad) est équilibrée par un lavage de 4x5 mL d'HCl 0,5 N, puis un autre lavage de 5x2 mL d'eau milli-Q. La colonne est chargée avec l'échantillon (100 μ L) puis le gel est rincé avec 3x1mL d'eau milli-Q. La [¹⁴C]méthionine est éluée en premier car elle n'est pas retenue par le gel, contrairement au [¹⁴C]méthyl-tétrahydrofolate. Le gel est régénéré en lavant avec 4x5mL d'acide chlorhydrique 0,5 N (élution du [¹⁴C]méthyl-tétrahydrofolate). La radioactivité est comptée dans des tubes en Poly-Ethylène (Packard) en mélangeant 1 volume d'éluat à 4 volumes de Pico-FluorTM (agent de scintillation, Packard).

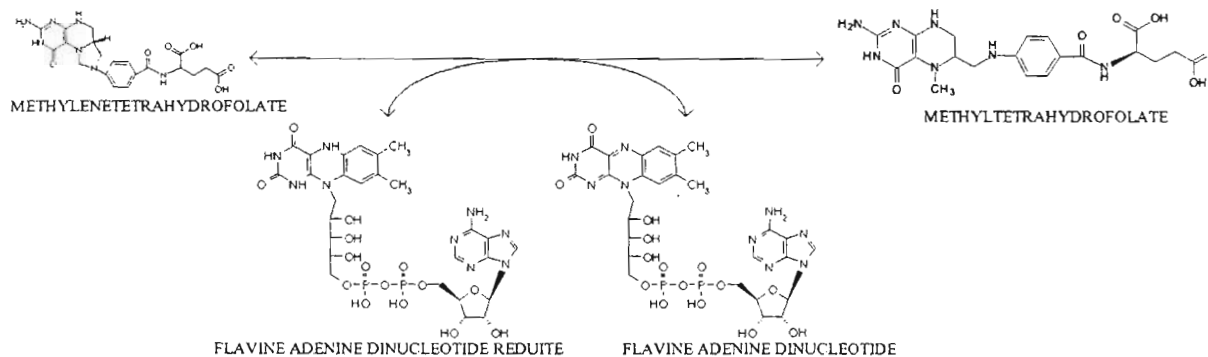
La radioactivité spécifique (Rs) est mesurée par comptage d'un aliquote de [¹⁴C]méthyl-tétrahydrofolate et calculée selon la formule suivante :

$$Rs = \frac{\text{radioactivité totale pour un échantillon (cpm)} \times 10^9}{\text{concentration totale en folate (M)} \times \text{volume réactionnel (L)}}$$

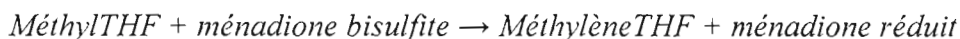
Rs est exprimée en cpm / nmol de groupement méthyl et permet le calcul de l'activité spécifique de l'enzyme qui est exprimée en nmol/h/mg de protéines.

3.1.2. Méthyltétrahydrofolate réductase (MTHFR)

La MTHFR (EC 1.5.1.20) est homotétramère de ~77kDa par sous unité qui peut être inhibée allostériquement par la S-adosylméthionine. Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



Bien que la réduction du Méthylène-tétrahydrofolate (CH₂-THF) en Méthyl-tétrahydrofolate (CH₃-THF) soit irréversible, on utilisera les propriétés de la MTHFR qui est capable *in-vitro*, de catalyser la réaction inverse en présence de Ménadione :



Le dosage est réalisé selon la méthode décrite par Kutzbach et Stokstad (1971) :

L'incubation est maintenue à 37°C/30 min dans un bloc chauffant thermostaté et dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme.

Vol réac : 100 µL	C réaction	C stock	Volume
Protéines	~500 µg	~20 µg/µL	25 µL
K ₂ H/KH ₂ (PO ₄) pH 6,3	180 mM	1 M	10 µL
Ménadione Bisulfite (H ₂ O)	3,6 mM	360 mM	1 µL
EDTA (pH 8)	1,4 mM	140 mM	1 µL
Ascorbate (H ₂ O)	7,2 mM	720 mM	1 µL
FAD (H ₂ O)	178 µM	17,8 mM	1 µL
MeTHF (DTT 10 mM)	0,225 mM	22,5 mM	1 µL
[¹⁴ C]MeTHF (DTT 10 mM)	25 µM	2,5 mM	1 µL
H ₂ O qsp 100 µL			59 µL

- **Ménadione bisulfite** : dissout à 360mM dans de l'eau Milli-Q.
- **EDTA** : pH 8, 140mM
- **Ascorbate** : dissout à 720mM dans de l'eau milli-Q et filtré à 0.45µm
- **FAD** : dissout à 17.8mM dans de l'eau milli-Q
- **[¹⁴C]Methyl-tetrahydrofolate** dissout à 2.5 mM (0.25µCi/µL) dans de l'eau milli-Q contenant du DTT à 10mM (mélange passé sous flux d'azote gazeux durant 30min)

Solutions de condensation, stockées à +4°C :

- **Dimédone** : dissout à 250mM dans de l'éthanol 50%.
- **Formaldéhyde** : dissout dans de l'eau milli-Q et filtré à 0.45µm
- **Acétate de sodium** : pH 5.2, 3M, filtré à 0.45µm

Le mélange 30min/37°C (bain-marie) puis arrêter la réaction en plongeant les tubes dans la glace. Ajouter un mélange contenant :

Formaldéhyde (H ₂ O)	32 mM	1 M	5 µL
Dimédone (Ethanol 50%)	161 mM	0.25 M	100 µL
Acétate de Sodium (pH 5.2)	1 M	3 M	50 µL

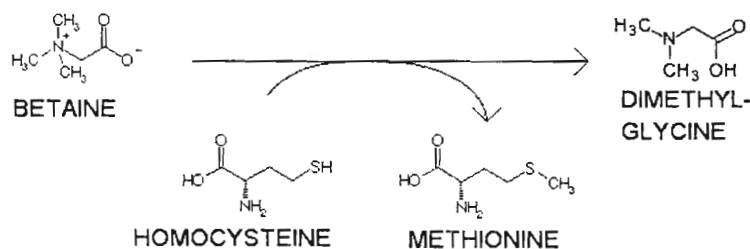
Le mélange est vortexé 10sec puis chauffé à 95°C durant 15min (les tubes sont percés et maintenus sous une hotte aspirante durant la réaction). Les tubes sont refroidis dans la glace et 1mL de toluène est ajouté à chaque tube. Après agitation les tubes sont centrifugés à 1000g/RT/5min. Ajouter chaque phase à 4mL de PicoFluor-40 (PACKARD,) dans des tubes en Polyéthylène (capacité de 6mL) avant de compter la radioactivité du [¹⁴C] contenu dans chaque phase.

Le dimédone va donner des produits de condensation insolubles avec les aldéhydes qui ont été générés à cause de l'instabilité du CH₂-THF à pH acide. La radioactivité contenu dans la phase organique (supérieure) correspond au CH₂-THF produit par la réaction enzymatique. La phase aqueuse contient le CH₃-THF non consommé et la Méthionine formée par une activité Méthionine synthase parasite.

L'AdoMet et l'AdoHcy sont des effecteurs allostériques de la MTHFR qui, respectivement, inhibent ou activent l'activité MTHFR ainsi que l'activité Ménadione réductase de cette enzyme

3.1.3. Bétaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT)

La Bétaïne-Homocystéine Méthyltransférase (BHMT, EC 2.1.1.5) est une enzyme cytosolique de 45 kDa zinc dépendante formant un hexamère de 270 kDa. Cette enzyme est non ubiquitaire et son expression est restreinte au foie et au rein chez l'homme et les autres mammifères. Comme la Méthionine synthase, cette enzyme catalyse la reméthylation de l'Hcy en méthionine mais en utilisant la bétaïne et non le Méthyltétrahydrofolate comme donneur de méthyle (Sunden 1997). La BHMT catalyse la réaction suivante :



La technique de dosage est basée sur celle décrite par Garrow (1996) mais nécessite en premier point de synthétiser la [³H]bétaïne (qui n'existe pas dans le commerce) à partir de [³H]choline.

Préparation de la [³H]bétaïne

La choline oxydase (préparée à 0,1 U/μL dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, KCl 0,1 M, EDTA 0,1 mM, β-mercaptoethanol 10 mM, BSA 0,1 g/L et glycérol 50%) catalyse l'oxydation de la choline en bétaïne, et la technique de préparation de la bétaïne est basée sur la méthode décrite par Mar (1995).

Volume réac : 1000 μL	C réaction	C stock	Volume
K ₂ HPO ₄ pH 7,8	100 mM	1 M	100 μL
Choline oxydase	1 U	0,1 U/μL	10 μL
[³ H-méthyl]-choline	100 μCi	1 μCi/μL	100 μL
H ₂ O qsp 1000 μL			790 μL

Le mélange réactionnel est incubé dans un bloc thermostaté à 37°C/1h. La réaction est arrêtée en ajoutant 400 µL de méthanol puis 200 µL de chloroforme pour extraire le produit. La séparation des phases se fait en ajoutant 100 µL de chloroforme et 100 µL d'eau. La phase aqueuse (supérieure) est récupérée après centrifugation (12000 g/RT/10 min) et concentrée à l'aide d'un appareil concentrateur (Speed vac) jusqu'à obtenir un volume de ~100 µL. Le concentrat est chargé sur une colonne de chromatographie liquide à haute performance en phase normale (CLHP – Lichrosorb Si60 5 µm, 250 x 4 mm). La séparation de la choline et de la bétaine se fait à l'aide d'un gradient de tampons A et B à un débit de 1 mL/min.

Tampon A : NaH₂PO₄ 100 mM à 1%, acétonitrile 80%, Ethanol 6,8%, ac. acétique 0,2%, acétate d'ammonium 0,3% et H₂O 12,7%.

Tampon B : NaH₂PO₄ 100 mM à 1%, acétonitrile 40%, Ethanol 6,8%, ac. acétique 4,4%, acétate d'ammonium 8,8% et H₂O 40%.

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

Les fractions de 1 mL sont collectées à l'aide d'un collecteur de fraction (LKB[®]) et mesurées (100 µL) dans des flacons en polyéthylène (Packard Bioscience[®]) contenant 2 mL de liquide de scintillation (Pico-Fluor, Packard Bioscience[®]) à l'aide d'un compteur Tricarb 1900CA (Packard Bioscience[®]).

Dosage de l'activité BHMT

Le mélange réactionnel suivant est préparé :

Vol réac : 200 μ L	C réaction	C stock	Volume
Protéines	~500 μ g	~20 μ g/ μ L	25 μ L
Tris-HCl pH 8	100 mM	1 M	20 μ L
DTT (H ₂ O)	25 mM	580 mM	μ L
Bétaïne (H ₂ O)	2 mM	200 mM	20 μ L
D,L Homocystéine (HCl 1N)	5 mM	500 mM	20 μ L
[³ H]Bétaïne	15 nM	1,5 μ M	2 μ L
H ₂ O qsp 200 μ L			μ L

Le mélange est incubé dans un bloc thermostaté à 37°C/1h puis la réaction est arrêtée en chauffant à 95°C/5 min puis refroidi à 4°C. L'échantillon est centrifugé à 20.000g/4°C/10 min, le culot éliminé et le surnageant déposé sur une colonne de 0,8 x 4 cm (Bio-Rad[®]) contenant 2 mL de résine AG1x8 (ammonium quaternaire, Bio-Rad[®]) préalablement équilibrée en ions OH⁻ en lavant avec 4 x 5 mL de NaOH 1N et 5 x 2 mL d'H₂O milliQ (Millipore[®]). La [³H]Bétaïne en excès dans l'échantillon est éliminée en lavant le gel avec 1 mL, 3 mL et 3 x 5 mL H₂O milliQ (Millipore[®]). La [³H]Méthionine produite lors de la réaction est éluée en lavant le gel avec 5 x 2 mL de HCl 0,5 N. La radioactivité est mesurée dans des flacons en polyéthylène (20 mL) contenant 1 mL d'éluat (10%) et 8 mL de liquide de scintillation (Hionic-Fluor, Packard Bioscience[®]) à l'aide d'un compteur à scintillation TriCarb 1900CA (Packard Bioscience). Les activités sont exprimées en nmol de produit par heure et par mg de protéines totales.

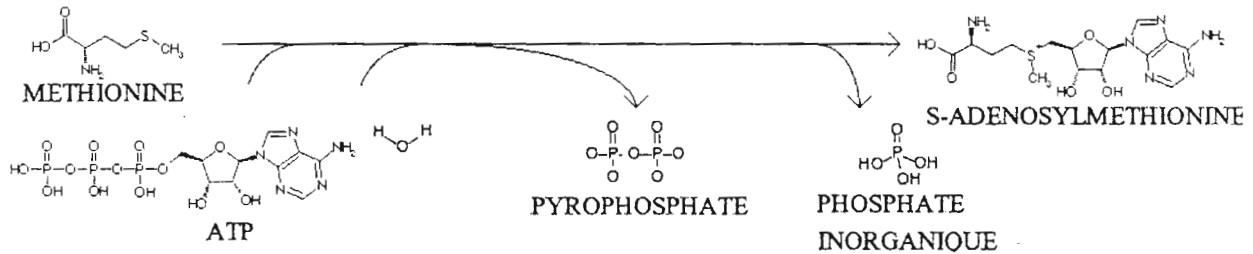
3.1.4. Méthionine adényltransférase (MAT)

Il existe 2 formes de MAT :

La MAT II est la forme extra hépatique qui est composée de sous unités α_2 et β qui est une sous unité non catalytique de 334 acides aminés. Cette sous unité β intervient dans la régulation de l'activité de la MAT puisqu'elle fixe la SAM (son produit) provoquant une baisse du K_M de l'enzyme pour la méthionine et induisant ainsi une diminution de l'activité.

La MAT I se trouve sous forme de tétramères (MAT I - $(\alpha_1)_4$) et de dimères (MAT $(\alpha_1)_2$) respectivement (Mato, 2002). Ces 2 isoformes de MAT ne contiennent pas de sous-unité régulatrice β , à l'inverse de la forme extra-hépatique MAT II (Mato 2002, Finkelstein 2003).

Ces deux isoformes catalysent la même réaction :



La méthode de dosage repose sur celle décrite par Mitsui et Tsukada (1988). Le mélange réactionnel suivant est préparé juste avant le début de la réaction.

Volume réac : 100 μ L	C réaction	C stock	Volume
Protéines	~ 400 μg	var	~20 μ L
Tampon 10x	1.X	10.X	10 μ L
ATP- Na_2 (H_2O)	10 mM	190 mM	5,3 μ L
DTT	25 mM	0,58 M	4,3 μ L
L-Méthionine	0,5 mM	100 mM	0,5 μ L
[^3H -Méthyl]méthionine	1 μCi	1 μ Ci/ μ L	1 μ L
H_2O qsp 100 μ L			58,9 μ L

Tampon 1x = Tris-HCl 100 mM, pH 8,2 - MgCl_2 20 mM - KCl 150 mM

La radioactivité spécifique est de l'ordre de 11.000 cpm/nmol

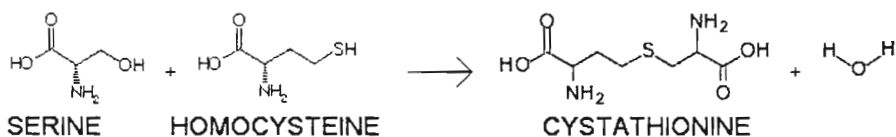
L'incubation est maintenue à 37°C/30 min dans un bloc chauffant thermostaté et dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme.

La réaction est arrêtée en chauffant à 95°C/5min, puis refroidie à 4°C. Les protéines sont précipitées en ajoutant 5 µL d'acide perchlorique (HClO₄, 60%) et les tubes sont centrifugés à 12.000g/4°C/10 min. Le culot est éliminé et 20 µL de surnageant est déposé sur un papier filtre p81 (chargé négativement avec des groupements phosphates) carré de 2 cm de côté.

Les filtres sont immergés dans un bain de tampon phosphate 5 mM (pH 7,5) puis séchés sous hotte aspirante. La S-adénosyl[³H-méthyl]méthionine produite lors de la réaction est retenue sur le filtre (chargé négativement) tandis que la [³H-méthyl]méthionine est éliminée lors des lavages. La radioactivité est mesurée dans des flacons en polyéthylène (20 mL) contenant 10 mL de liquide de scintillation (Filter-count, Packard Bioscience) à l'aide d'un compteur à scintillation TriCarb 1900CA (Packard Bioscience). Les activités sont exprimées en nmol de produit par heure et par mg de protéines totales.

3.1.5. Cystathionine- β -synthase (CBS)

La CBS (EC 4.2.1.22) est une enzyme cytosolique composée de 4 sous unités de 63 kDa et qui est PLP dépendante pour son activité. Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



L'activité de la CBS est mesurée selon une méthode originale développée au laboratoire. Le mélange réactionnel est préparé extemporanément et contient :

Volume réac : 100 μ L	C réaction	C stock	Volume
Protéines	~ 400 μ g	~20 g/L	~20 μ L
Tris-HCl pH 8.6	50 mM	2 M	2,5 μ L
PLP (HCl 1N)	1 mM	100 mM	1 μ L
Sérine (H ₂ O)	5 mM	100 mM	5 μ L
[¹⁴ C]Sérine	0,05 μ Ci	50 μ Ci/mL	1 μ L
D,L Homocystéine (HCl 1N)	15 mM	500 mM	3 μ L
H ₂ O qsp 100 μ L			67,5 μ L

La radioactivité spécifique est de l'ordre de 500 cpm/nmol. L'incubation est maintenue à 37°C/30 min dans un bloc chauffant thermostaté et dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme. La réaction est arrêtée en chauffant à 95°C/5min, puis refroidie à 4°C. Le pH est diminué en ajoutant 50 μ L d'acide formique et 350 μ L de tampons A (Ac. Maléique 25 mM, pH 1,8 et LiCl 200 mM) puis les tubes sont centrifugés à 12.000g/4°C/10 min. Le culot est éliminé et le surnageant déposé sur une colonne de 0,8 x 4 cm (Bio-Rad) contenant 1 mL de résine Dowex 50WX2-200 (Sigma) préalablement équilibrée en ions Li⁺ en lavant avec 4 x 5 mL de tampon A. La [¹⁴C]Sérine en excès dans l'échantillon est éliminée en lavant le gel avec 1 mL, 3 mL et 3 x 5 mL de tampon A. La [¹⁴C]cystathionine produite lors de la réaction est éluée en lavant le gel avec 2 x 3 mL de tampon B (Acétate de sodium 50 mM, pH 5,2, LiCl 800 mM). La radioactivité est mesurée dans des flacons en polyéthylène (20 mL) contenant 3 mL d'éluat et 15 mL de liquide de scintillation (Hionic-Fluor, Packard Bioscience) à l'aide d'un compteur à scintillation TriCarb 1900CA (Packard Bioscience). Les activités sont exprimées en nmol de produit par heure et par mg de protéines totales.

3.1.6. S-adénosylméthionine et S-adénosylhomocystéine hépatiques

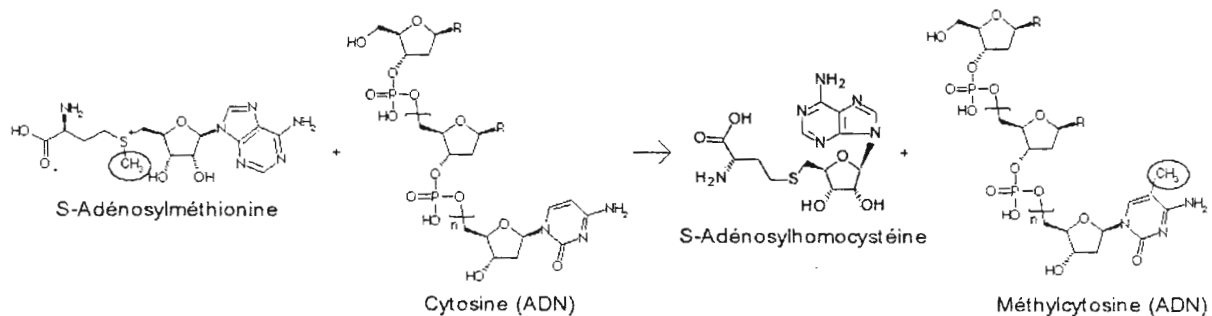
Le foie est prélevé lors du sacrifice de l'animal, rincé dans du PBS, congelé dans l'azote liquide et broyé à l'aide d'un mortier. Le foie ainsi préparé est pesé et traité en ajoutant 10 µL d'une solution d'acide perchlorique à 3% (HClO₄) pour 1 mg de tissu. L'échantillon est maintenu dans la glace et traité par sonication (*cell sonifier disruptor*, Branson®) en mode pulsé (*duty cycle* 30%) durant 1 minute. L'homogénat obtenu est centrifugé à 20.000g/4°C/30 min, le culot éliminé et le surnageant filtré avec un filtre PVDF de 4 mm de diamètre et de porosité 0,45 µm. La séparation est basée sur la procédure décrite par Miller (1994). L'échantillon (50 µL) est injecté dans un système de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) constitué d'une pompe à haute pression (TSP, P1000XR), un injecteur d'échantillon automatisé (TSP, AS100), une colonne contenant une résine de silice greffée en groupements octadécyls (C18, Lichrospher OD2, 5 µm, 250 x 4 mm) maintenu à 30°C à un débit constant de 0,75 mL/min (généralant une pression d'environ 130 bar). Le gradient continu appliqué par la pompe consiste en un mélange de tampon A (phosphate de sodium 50 mM, pH 3,2, Ac. heptanesulfonique 10 mM, acétonitrile 10%) et de tampon B (phosphate de sodium 50 mM, pH 3,2, Ac. heptanesulfonique 10 mM, acétonitrile 50%) selon la procédure suivante :

Temps (min)	Proportion A	Proportion B
0	100%	0%
14	82,5%	17,5%
14,1	0%	100%
17,1	0%	100%
17,5	100%	0%
30	100%	0%

Le signal est mesuré par absorbance des groupements adényls de la SAM et de la SAH à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 254 nm (TSP, UV2000 - ultraviolets). Les quantités de SAM et SAH sont calculées à partir d'une gamme de standards et les résultats sont exprimés en nmol/g tissu.

3.1.7. Méthylation d'ADN

Le niveau de méthylation globale de l'ADN reflète l'activité générale des promoteurs géniques et l'état de répression de ces promoteurs. Il est bien connu qu'un îlot CpG méthylé va physiquement empêcher l'adsorption de facteurs de transcription sur l'ADN et par conséquent diminuer l'activité de transcription du gène. A l'inverse, une diminution de cette méthylation (hypométhylation se traduit par la fixation de facteurs de transcription et une augmentation de l'activité transcriptionnelle qui peut se traduire par un excédant de protéines proapoptotiques (effet dégénératif) ou prooncotiques. Cette méthylation est catalysée enzymatiquement par les ADN méthyltransférases selon la réaction suivante :



Lors du prélèvement, le foie est lavé dans du PBS puis broyé à l'azote liquide avec un mortier.

La lyse des hépatocytes s'effectue en ajoutant 100 µL de tampon de lyse (NaCl 400 mM, Tris-HCl 100 mM (pH 8), EDTA 5 mM, SDS 0.2%, Protéinase K (500 µg/mL)) à 10 mg de tissu broyé à l'azote liquide. Le mélange est incubé au bain marie à 65°C durant une nuit complète ou jusqu'à obtenir une solution limpide.

L'extraction est effectuée en ajoutant 500 µL de mélange Phénol (70%, pH 7,9) : chloroforme à 500 µL de lysat cellulaire. Le mélange est agité à la main 1 min à température ambiante puis centrifugé à 5000g/20°C/10 min. La phase aqueuse (supérieure) est prélevée et la même opération est renouvelée. Une troisième extraction est effectuée en ajoutant seulement du chloroforme. L'ADN est précipité en ajoutant 1/10^e d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 et 2 volumes d'isopropanol froid. Le mélange est incubé 30 min à -20°C, centrifugé à 5000g/4°C/10 min et le surnageant éliminé. Le culot d'ADN est lavé 2 fois avec de l'éthanol 70% froid puis séché sous hotte aspirante. Le culot est repris dans 50-100 µL d'eau MilliQ (Millipore[®]) ou dans un tampon Tris 20 mM – EDTA 1 mM. L'ADN est quantifié par

spectrophotométrie à 260 nm et la pureté est évaluée en calculant le rapport 260/280 nm (le ratio doit être $\geq 1,8$). La taille de l'ADN doit être ≥ 20 kb et est évaluée en déposant 2 μg sur un gel d'agarose 0,5% (migration 1h - 110 V).

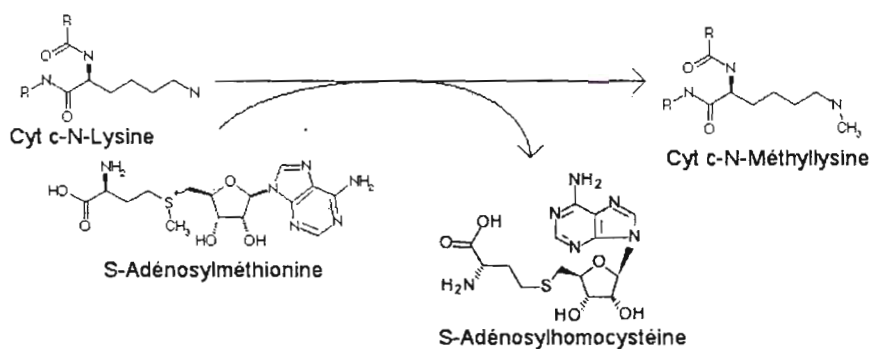
La mesure de l'état global de méthylation de l'ADN génomique s'effectue en préparant le mélange réactionnel suivant :

Volume réac : 50 μL	C réaction	C stock	Volume
ADN	2 μg	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2 μL
Tris-HCl pH 8	10 mM	0,1 M	5 μL
NaCl	50 mM	0,5 M	
MgCl ₂	10 mM	0,1 M	
DTT	1 mM	0,1 M	5 μL
S-Adénosyl-[³ H-méthyl]-méthionine	5 μCi	1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$	5 μL
SssI méthylase	4 U	2U / μL	2 μL
H ₂ O qsp 50 μL			31 μL

Le mélange est incubé dans un bloc thermostaté à 37°C durant 3h puis la réaction est arrêtée en chauffant à 65°C pendant 5 min et refroidi à 4°C. Le mélange réactionnel est déposé sur un filtre DE81 (Whatman[®]), lavé 3 fois avec un tampon phosphate de sodium dihydrogéné (5%, pH 4,5) et séché. La radioactivité incorporée dans l'ADN ([³H]méthyl cytosine) est mesurée avec des flacons en polyéthylène de 20 mL (Packard Bioscience) contenant 10 mL de liquide de scintillation (Filter-count, Packard Bioscience). La radioactivité mesurée reflète l'inverse du taux de méthylation (hypométhylation) de l'ADN.

3.1.8. Cytochrome C N-Lysine méthyltransférase (CLMT)

La CLMT (EC 2.1.1.43) est une enzyme cytoplasmique de 120 kDa qui catalyse la triple méthylation du cytochrome c selon la réaction suivante :



La mesure de l'activité est basée sur la méthode décrite par Durban (1978)

Volume réac : 100µL	C réaction	C stock	Volume
Protéines	~ 400 µg	~20 g/L	~20 µL
NaHCO ₃ 50 mM, pH 9	50 mM	500 mM	10 µL
β-mercaptoethanol	14 mM	14 M	0,1 µL
Cyt c from heart horse	72 µCi	72 µg/µL	1 µL
S-adenosyl-[³ H-méthyl]méthionine	1,5 µCi	50 µCi/mL	1 µL
S-adenosylméthionine	200 µM	20 mM	1 µL
H ₂ O qsp 100 µL			66,9 µL

L'incubation est maintenue à 37°C/30 min dans un bloc chauffant thermostaté et dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme. La réaction est arrêtée en chauffant à 95°C/5min, puis refroidie à 4°C. Les protéines sont précipitées en ajoutant 5 µL d'Ac. perchlorique à 60% et les tubes sont centrifugés à 12.000g/4°C/10 min. Le culot est lavé 2 fois avec de l'acide perchlorique 3% puis dissous avec 500 µL de NaOH 0,6N dans un bloc chauffant (100°C/3 min). La radioactivité contenue dans le Cytochrome c est mesurée dans des flacons en polyéthylène (5 mL) contenant 4 mL de liquide de scintillation (Hionic-Fluor, Packard Bioscience) à l'aide d'un compteur à scintillation TriCarb 1900CA (Packard Bioscience). Les activités sont exprimées en nmol de produit par heure et par mg de protéines totales.

Pour mesurer les effets inhibiteurs de la S-adénylhomocystéine sur l'activité de la CytC-MTase, la procédure expérimentale est identique mais à l'exception de 2 points.

- 1- Une gamme de SAH (0, 8, 40, 80, 120 et 200 μ M) est utilisée dans la réaction pour mesurer la compétition entre SAM et SAH pour le site catalytique de la CytC-MTase.
- 2- Pour chaque point de gamme de SAH, 2 concentrations (220 et 440 μ g) de protéines préparées à partir de foie de rat contrôle sont utilisées pour la réaction.

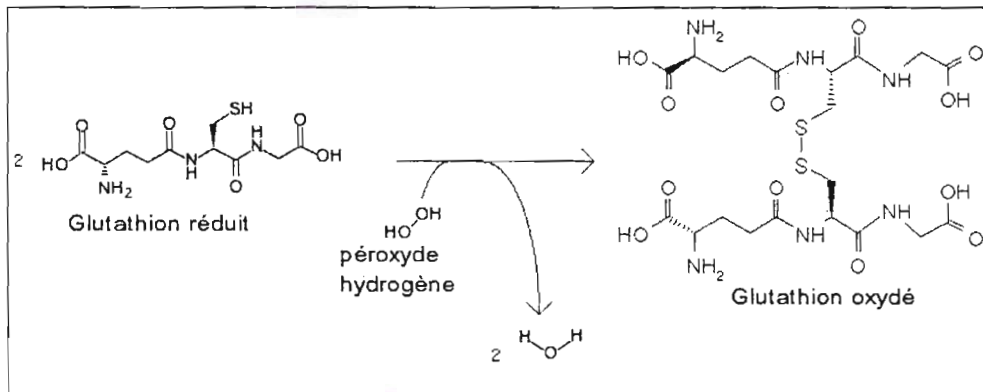
Le contrôle négatif est réalisé dans les mêmes conditions mais l'albumine de sérum bovin (BSA) remplace l'homogénat protéique et sert de bruit de fond pour le calcul de l'activité.

3.2. Marqueurs hépatiques du stress oxydant

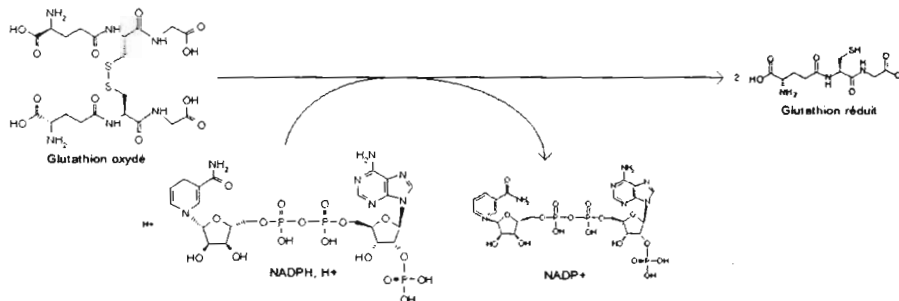
3.2.1. Glutathion peroxydase (GPX)

La GPX est une enzyme cytoplasmique qui intervient dans la lutte contre les espèces radicalaires oxygénées (*ROS, radical oxygen species*), et plus particulièrement les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) qui sont produits par une autre enzyme la Superoxyde dismutase, autre enzyme intervenant dans la lutte contre les ROS.

La GPX catalyse la réaction suivante :



Le dosage de l'activité s'effectue selon la méthode décrite par Paglia (1967) et utilise les propriétés spectrophotométriques du NADPH, co-substrat de la réaction catalysée par la Glutathion S-réductase puisque cette enzyme permet la régénération du glutathion oxydé en glutathion réduit selon la réaction suivante :



La préparation du réactif de Drabkin s'effectue dans les proportions suivantes :

- KCN 0,0104 g
- K₃Fe(CN)₆ 0,0395 g
- NaHCO₃ 0,200 g
- Eau distillée qsp 100 mL

Volume réac : 180µL	C réaction	C stock	Volume
Protéines	~ 400 µg	~20 g/L	50 µL
Réactif de Drabkin			50 µL

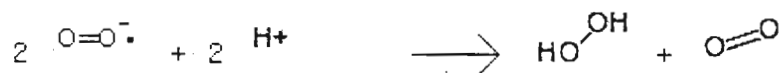
6 µL de ce mélange est repris dans 172 µL du mélange suivant, préparé extemporanément.

NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7			26 mL
NADPH,H ⁺		8,4 mM	1 mL
Glutathion-S-réductase		20 U/mL	0,5 mL
NaN ₃		1,125 M	0,1 mL
Glutathion réduit		150 mM	1 mL

Le mélange est incubé 118 sec à température ambiante puis le peroxyde d'hydrogène est ajouté à la réaction (6 µL d'une solution à 2,2 mM) et le mélange est de nouveau incubé 30 sec à température ambiante. La lecture de la cinétique s'effectue à 340 nm durant une minute. Les résultats sont exprimés en µmol/min/mg de protéines totales cytoplasmiques et le blanc est effectué en remplaçant l'homogénat par de l'eau distillée.

3.2.2. Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme intervenant dans la lutte contre les espèces radicalaires oxygénées (*ROS*, *radical oxygen species*) et plus particulièrement l'anion superoxyde (O_2^-) qui est principalement produit au niveau des membranes mitochondriales lors des transferts d'électron durant la phosphorylation oxydative. Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



Il existe une forme cytoplasmique cuivre et zinc dépendante (SOD ·Cu/Zn) et une forme mitochondriale homotétramérique (4x22 kDa) manganèse dépendante (SOD Mn). Ces deux isoformes de la SOD sont mesurées dans le même temps grâce à un système automatisé Ransod (Randox). Cette méthode utilise la xanthine et la xanthine oxydase (XOD) pour générer des radicaux superoxyde, qui réagissent ensuite avec le chlorure de 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophénol)-5-phényltétrazolium (INT) pour former un colorant rouge, le formazan. L'activité de la SOD est mesurée par le degré d'inhibition de cette réaction.

La procédure de dosage se fait selon les indications données par le fabricant (randox[®]). Le mélange réactionnel contient un mélange de substrats (xanthine et INT), un tampon CAPS-EDTA, la Xanthine oxydase purifiée (80 U/L) et un étalon qui permet de constituer une gamme de dilution du standard (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/24). Le mélange réactionnel est incubé à 37°C puis l'absorbance à 505 nm est mesurée et servira de point initial pour la cinétique enzymatique. L'incubation est maintenue 3 minutes supplémentaires et l'absorbance à 505 nm est de nouveau relevée ($[A_2 - A_1]/3 = \Delta A/\text{min}$ de l'échantillon ou de l'étalon). Le diluant sans solution étalon (S1) est considéré comme le 100% de réaction non inhibée. Tous les taux réactionnels des étalons et des échantillons dilués doivent être convertis en pourcentage du taux réactionnel de la solution de S1 puis soustraits à 100% pour donner un pourcentage d'inhibition.

$$100 - \frac{(\Delta A_{\text{échantillon/min}} \times 100)}{\Delta A_{S1/\text{min}}} = \% \text{ inhibition}$$

On déduit les unités enzymatiques de la SOD à partir de la gamme étalon et les résultats sont exprimés en U/mg de protéine.

3.2.3. Glutathion oxydé et réduit (GSSG/GSH)

Le foie est prélevé lors du sacrifice de l'animal, rincé dans du PBS, congelé dans l'azote liquide et broyé à l'aide d'un mortier. Le mélange est repris dans 10 μL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4 pour 1 mg de tissu. L'échantillon est maintenu dans la glace et traité par sonication (cell sonifier disruptor, Branson[®]) en mode pulsé (duty cycle 30%) durant 1 minute. L'homogénat obtenu est centrifugé à 20.000g/4°C/30 min et le culot est éliminé. La mesure du glutathion est basée sur la méthode décrite par Yasuhara *et al.* (1998) qui repose sur une coloration des groupements thiols réducteurs par le réactif de Ellman.

Préparation du mélange réactionnel :

	C réaction	C stock	Volume
Homogénat tissulaire			100 μL
DTT (pour glutathion total uniquement)	0,2 mM	10 mM	2 μL
DTNB* (Ethanol)	1,8 mM	25 mM	8 μL
Mélanger et laisser 1 min à température ambiante			
Ajouter au mélange :			
HClO ₄ (Ac. perchlorique)	3%	60%	5,5 μL

*DTNB : réactif de Ellman, acide dithionitrobenzoïque.

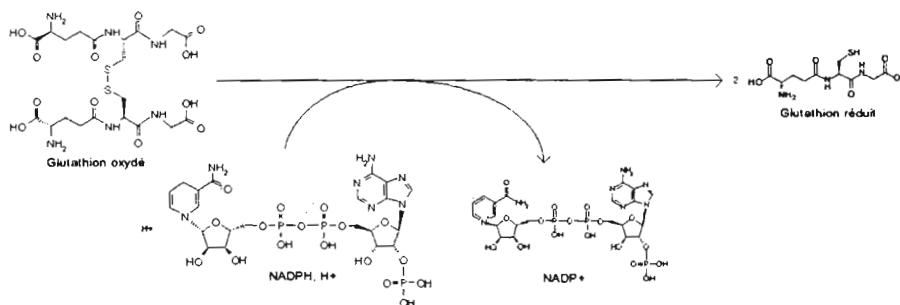
Le mélange est vortexé, laissé 5 min dans la glace, centrifugé à 12000g/4°C/10 min et le culot éliminé. Le surnageant est filtré avec un filtre PVDF de 4 mm de diamètre et de porosité 0,45 μm . L'échantillon (50 μL) est injecté dans un système de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) constitué d'une pompe à haute pression (TSP, P1000XR), un injecteur d'échantillon automatisé (TSP, AS100), une colonne contenant une résine de silice greffée en groupements octadécyls (C18, Resolve spherical, 5 μm , 150 x 3,9 mm) maintenu à 50°C à un débit constant de 0,8 mL/min (générant une pression d'environ 105 bar). Le gradient continu appliqué par la pompe consiste en un mélange de tampon A (phosphate de sodium 50 mM, pH 3,5, tetrabutylammonium bromide 5 mM) et de tampon B (phosphate de sodium 50 mM, pH 3,5, tetrabutylammonium bromide 5 mM, acétonitrile 30%) selon la procédure suivante :

Temps (min)	Proportion A	Proportion B
0	100%	0%
3	100%	0%
18	50%	50%
18.5	0%	100%
23.5	0%	100%
24	100%	0%
30	100%	0%

Le signal est mesuré par absorbance des groupements phényles du thionitrobenzoate à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 280 nm (TSP, UV2000 - ultraviolets). Les quantités de glutathion total et réduit sont calculées à partir d'une gamme de standards et les résultats sont exprimés en nmol/g tissu. Le glutathion total correspond aux valeurs mesurées après traitement de l'échantillon au DTT et le glutathion réduit aux valeurs mesurées sans ce traitement. Par déduction on peut calculer le glutathion oxydé et le rapport GSH / GSSG. Le glutathion total donne une indication sur les processus de synthèse de cette molécule tandis que le rapport GSH / GSSG donne une indication sur le statut redox cellulaire et le stress oxydant éventuel.

3.2.4. Glutathion S-réductase et LGRAC

Le coefficient d'activation de la Glutathion réductase hépatique (*Liver Glutathione reductase activation coefficient – LGRAC*) est directement inspiré de la méthode EGRAC utilisée précédemment. On pourra déterminer le statut en vitamine B2 (flavine adénine dinucléotide – FAD - et flavine adénine mononucléotide – FMN) hépatocytaire ainsi que l'activité de la Glutathion S-réductase, enzyme impliquée dans la lutte contre le stress oxydant puisqu'elle permet la régénération du glutathion oxydé en glutathion réduit, selon la réaction suivante :



3.2.5. Malondialdéhyde et hydroxynanonone (MDA/HNE)

La peroxydation lipidique est un processus qui conduit à des modifications physicochimiques des lipides membranaires, et souvent à leur perte de fonction biologique. Il en résulte aussi une augmentation du stress oxydant cellulaire car ces lipides se comportent comme des espèces réactives oxygénées (*reactive oxygen species* – ROS). Le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxyalkenal (HAE) sont des produits finaux dérivés de la peroxydation des acides gras insaturés. La mesure de ces molécules offre un indice sur la peroxydation lipidique. La technique utilisée est basée sur la méthode décrite par Liu (1997) mais le dosage est effectué à l'aide d'un coffret commercial *lipid peroxidation assay kit* (calbiochem®). Ce coffret contient un agent chromogénique (N-méthyl-2-phénylindole) qui réagit avec le MDA pour former un adduit qui absorbe en spectrophotométrie à 586 nm. Grâce à une gamme de standard (1,1,3,3-tétraméthoxypropane – TMOP) les valeurs de MDA sont calculées tandis que le 4-HNE sera seulement estimé sachant que le MDA est environ 10 fois supérieur au 4-HNE.

3.2.6. Carnitines et acyl-carnitines

Les acylcarnitines ont été déterminées par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) en collaboration et selon la méthode décrite par le Pr. Gilbert Briand, Directeur du laboratoire de biochimie métabolique du CHU de Lille. Les extraits lipidiques sont séchés sous vide et incubés 30 min à 65°C dans du butanol. Les échantillons sont séchés de nouveau, suspendus dans un mélange méthanol/acétonitrile (1:99, v/v) et traités par sonication. Après centrifugation, le surnageant est analysé par LC-MS/MS (API 3000, Applied Biosystems®)

3.2.7. Western-blot (régulation du cycle cellulaire)

La technique de marquage des protéines par immunoempreinte permet de détecter les variations d'expression de certaines protéines à condition qu'il existe un anticorps capable de les complexer. La technique utilisée ici est la plus couramment employée et fait appel à une migration électrophorétique dans des conditions dénaturantes et un transfert sur membrane en milieu liquide.

Préparation des extraits protéiques

Extraction : Les tissus sont broyés sous azote liquide, puis mis en suspension dans un tampon de lyse (Hepes 20 mM, pH 7,4, KCl 25 mM, Igepal 0.5% et *protease inhibitor cocktail* 5%). Les échantillons sont agités au vortex, centrifugés à 20000g/4°C/30 min et le culot éliminé. Le dosage des protéines totales s'effectue avec le kit *BCA protein assay* (Pierce) qui permet la coloration et la quantification des protéines avec l'acide bicinchoninique. 20-100 µg de protéines sont utilisés par essai pour le western-blot.

Electrophorèse sur gel en polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide est préparé à l'aide d'un mini-protean II (Bio-Rad[®]) à une concentration de 12% en moyenne pour des protéines de 20-40 kDA en moyenne. Deux gels peuvent être utilisés dans la même migration, les proportions correspondent donc à 2 gels préparés extemporanément.

Gel de séparation (12%):

- Mélange acry/bisacry 30%	8 mL
- Tampon Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%	5 mL
- Eau milliQ	7 mL
- Persulfate d'ammonium (APS) 10%	160 µL
- Temed	48 µL

Le mélange est remué à la main puis ~7 mL sont déposés entre les 2 plaques de verre du mini-protean (épaisseur 1,5 mm). Un mL d'isopropanol est déposé à la surface du gel le temps de la polymérisation puis l'isopropanol est éliminé et le gel rincé avec une pissette d'eau distillée et séché à l'aide d'un papier Whatman[®]. Le gel de concentration (4%) permet de concentrer les protéines au début de la migration électrophorétique et il est préparé selon les conditions suivantes :

- Mélange acry/bisacry 30%	1,48 mL
----------------------------	---------

- Tampon Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%	2,5 mL
- Eau milliQ	6,4 mL
- Persulfate d'ammonium (APS) 10%	80 µL
- Temed	24 µL

Le gel est coulé en surface du gel de séparation et le peigne est déposé avant la polymérisation. Une fois la polymérisation terminée, le peigne est retiré et le gel est rincé avec une pissette d'eau distillée. Les plaques sont fixées sur leur support électrophorétique et plongées dans la cuve de migration contenant le tampon de migration (Tris 25 mM, SDS 0,1%, glycine 192 mM). Les échantillons sont déposés dans les puits (~20 µL) et la cuve est fermée et connectée à un générateur PowerPac-3000 (Bio-Rad®). La migration est effectuée à voltage constant de 50 V pendant 30 min (pénétration des échantillons dans le gel) puis maintenue à 120 V au moins 1 h.

Transfert sur membrane PVDF

Le transfert des protéines vers la membrane PVDF est effectué dans une cuve contenant du tampon de transfert (Tris 48 mM, SDS 1,3 mM, glycine 39 mM, méthanol 20%) à un ampérage constant de 350 mA durant 45 min.

Blocage de la membrane

La membrane PVDF contenant les protéines transférées est lavée 2 x 10 min avec un tampon TBST (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%) à température ambiante et sous agitation douce. La membrane est « bloquée » en incubant 1 h sous agitation douce dans un tampon TBST contenant 5% de lait écrémé (NFM - *non fat milk*) puis lavée de nouveau 1 x 15 min et 2x 5 min avec un tampon TBST

Marquage anticorps primaire

Les anticorps primaires sont préparés à différentes dilutions selon leur spécificité mais toujours dans un tampon TBST-NFM. Les membranes sont mises en présence de l'anticorps et incubées toute la nuit à 4°C sous agitation douce.

Cible de l'anticorps	Source	Dilution
Bax	Rabbit	1/2000
Bcl-2	Goat	1/200
Tubuline	Rabbit	1/1000
p53	Rabbit	1/1000
ERK 1/2	Rabbit	1/1000

Marquage anticorps secondaire

La membrane est récupérée et lavée 5x5 min et 1x10 min avec le tampon TBST à température ambiante et sous agitation moyenne. L'anticorps secondaire dirigé contre le primaire est de type Hrp, *i.e.* possédant une activité peroxydase. Cet anticorps est dilué dans le tampon TBST-NFM de 1/10.000ème à 1/3.000ème selon l'intensité optimale. L'anticorps est incubé en présence de la membrane marquée avec l'anticorps primaire durant 1 h à température ambiante et sous agitation douce.

Révélation des protéines immunomarquées

La membrane est lavée 2x10 min à température ambiante et sous agitation moyenne avec un tampon TBST tandis que le réactif de révélation (ECL-plus, Amersham[®]) est laissé à température ambiante. La membrane est égouttée à l'aide de papier absorbant et la préparation du réactif se fait selon les recommandations du fournisseur (à l'abri de la lumière). Le mélange réactionnel est incubé sur la membrane pendant 2 min à température ambiante puis la membrane est égouttée légèrement, placée entre deux films « Saran » et déposée dans une cassette de révélation de film photographique. La révélation se fait en chambre noire à l'aide de liquides de révélation et de fixation photographiques. Le film est lavé à l'eau distillée et mis à égoutter jusqu'à ce qu'il soit complètement sec.

RESULTATS

Les travaux concernant ces études ont été publiés dans la revue *Digestion* (Brunaud et Alberto, 2003) pour la partie « gastrectomie et déficience en vitamine B12 », et dans la revue *Amino Acids* (Ayav *et al.*, 2005) pour la partie « Thyroïdectomie et statut en homocystéine ». Les travaux concernant l'étude des effets à long terme d'une hypoxie modérée chez le rat nouveau né, ont été publiés dans la revue *Pediatric Research* (Blaise *et al.*, 2005).

1. Modèles chirurgicaux

1.1. Gastrectomie et déficience en vitamine B12

Les rats Fisher F344 utilisés pour l'étude ont été répartis en 6 groupes différents (Tableau 3) :

Tableau 3 : répartition des animaux dans les différents groupes d'étude

Groupe	Chirurgie	Régime alimentaire	Effectif
1	Gastrectomie totale + résection iléale TG + IR	Régime déficient en substrats méthylés (MD, methyldeficient diet)	12
2	Gastrectomie totale + résection iléale TG + IR	Régime standard (MA, Methyladequate diet)	8
3	Gastrectomie totale TG	Régime standard (MA, Methyladequate diet)	7
4	Résection iléale IR	Régime standard (MA, Methyladequate diet)	20
5	Non	Régime déficient en substrats méthylés (MD, methyldeficient diet)	7
6	Non	Régime standard (MA, Methyladequate diet)	7

La gastrectomie est destinée à supprimer la sécrétion par l'estomac du Facteur intrinsèque (FI), transporteur gastrique indispensable de la vitamine B12. La résection iléale est destinée à bloquer l'internalisation du complexe FI~B12 au niveau intestinal. Le régime *methyldeficient* (MD diet), fondé sur celui décrit par Linnell et Poirier (1983), est utilisé dans le but de comparer les effets d'une carence en vitamine B12 consécutive à une gastrectomie à celle causée par une carence nutritionnelle.

i- **Morphologie des animaux** : On observe une perte de poids chez les animaux opérés par rapport aux autres ($P < 0,01$), mais cette perte se stabilise au bout d'un mois post-opératoire. Dans le même temps, le taux de survie des rats a été réduit car les animaux ayant subi une gastrectomie totale ont une médiane de survie de 1,6, de 2,7, et de 2,8 mois pour les groupes 1, 2 et 3 respectivement. Les rats du groupe 2 (TG+IR, régime MA) ont une longévité un peu plus importante que les ceux des groupes 1 et 3. Les rats sans chirurgie ou avec résection iléale seule, ont une meilleure survie, avec une médiane de 18,4, de 20,5 et de 21,2 mois pour les groupes 4 (IR), 5 (MD) et 6 (MA) respectivement. Le taux de survie a chuté significativement dans le groupe 4 comparé aux deux autres groupes ($p < 0,001$). La chute de survie est donc une conséquence de la gastrectomie, et n'est pas liée à un traumatisme provoqué par l'intervention chirurgicale sur l'animal, comme le démontre la survie du groupe 4 (IR).

ii- **Taux plasmatique de vitamine B12** : Il y a une diminution du taux de vitamine B12 chez les animaux des groupes 1, 2 et 3 par rapport aux autres groupes ($P < 0,001$) montrant ainsi que chez ces animaux le régime déficient en vitamine B12 n'est pas suffisant à induire une carence. De même, la différence observée entre les groupes 3 et 4 montre que la gastrectomie est nécessaire et suffisante pour obtenir une carence alors que la résection n'a pas d'effet sur le statut en vitamine B12. Des valeurs de vitamine B12 inférieures à 200 pM signifient une carence sévère.

iii- **Statut en folates** : la chirurgie n'a pas d'effet sur le statut en folates plasmatiques quel que soit le type d'opération effectuée (groupe 1-4, gastrectomie ou résection iléale, cumulées ou non) alors que les groupes 1 et 5 soumis à un régime *methyldeficient*, avec ou sans chirurgie, montrent une carence en folates plasmatiques. Cette chute des folates est corrélée à une augmentation significative de l'Hcy dans le groupe 1 (TG/IR MD *diet*) mais pas dans le groupe 5 (MD *diet*). Bien que la carence en vitamine B12 ne soit pas suffisante pour provoquer une hHcy, elle potentialise l'hHcy induite par la carence en vitamine B9.

iv- **Métabolisme des groupements méthyles** : Il n'y a pas de diminution de l'expression du gène de la Méthionine synthase (MTR) chez les animaux ayant subi une gastrectomie (groupes 1, 2 et 3) mais on observe une baisse de l'activité de cette enzyme (Figure 32). Cela corréle les observations déjà faites par Gulati et Banerjee (1999) qui démontrent que la vitamine B12 a un rôle protecteur sur les ARNm de MTR. Le ralentissement du cycle de reméthylation de l'Hcy va induire une hypométhylation globale de l'ADN génomique toujours dans ce même groupe. L'état global de méthylation de l'ADN génomique est mesuré en incorporant enzymatiquement des groupements méthyles radioactifs

sur les cytosines contenues dans les îlots CpG. Une augmentation des valeurs mesurées en radioactivité signifie une diminution du nombre de cytosines méthylées, *i.e.* une hypométhylation de l'ADN.

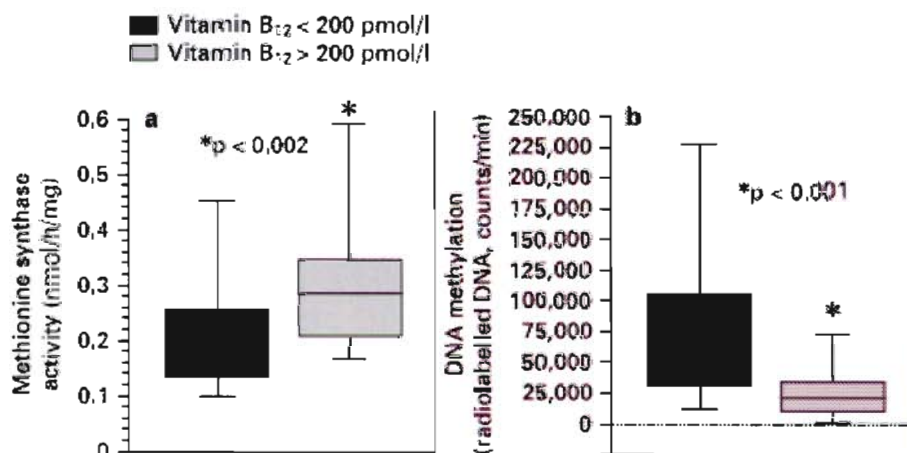


Figure 32 : Modification du métabolisme des méthyles chez les rats soumis ou non à une déficience en vitamine B12. a- Mesure de l'activité Méthionine synthase hépatique représentée par un diagramme en boîte (box plot) et exprimée en fonction des groupes de rats déficients ou non en vitamine B12. b- Mesure de l'état d'hypométhylation des ADN génomiques hépatiques de rats déficients ou non en vitamine B12. n=27 pour les animaux ayant subi une gastrectomie totale et n=34 pour les non opérés.

L'activité de la MTR est corrélée aux taux de vitamine B12 ($P < 0,05$) d'une manière assez logique car cette vitamine active l'expression de la MTR à un niveau post-transcriptionnel en stabilisant les ARN messagers dans des zones 5'UTR (*untranslated region*). La vitamine B12 et les folates sont corrélés au statut de méthylation de l'ADN génomique ($P = 0,0096$ et $P = 0,0104$ respectivement).

1.2. Thyroïdectomie et homocystéine

Ce deuxième travail mené par Ayav *et al.* est fondé sur des études cliniques dont les résultats montrent un lien entre hypothyroïdisme et hyperhomocystéinémie (Nebredo, 1998). L'activité des Flavine kinases est soumise à une régulation thyroïdienne et elle permet la synthèse des cofacteurs FAD et FMN à partir de flavine (vitamine B2). Une thyroïdectomie entraîne une baisse de ces activités dont la conséquence est une déficience en FAD et FMN, cofacteurs impliqués notamment dans le cycle de reméthylation de l'Hcy. L'hypothyroïdisme provoque une diminution de la synthèse des hormones thyroïdiennes impliquées dans la transformation de flavine (vitamine B2) en FAD et FMN, qui sont des cofacteurs de plusieurs flavoprotéines (réactions d'oxydoréduction) dont la MTHFR et la Méthionine synthase réductase (MTRR).

La MTHFR réduit le méthylèneTHF en méthylTHF tandis que la MTRR permet le recyclage de la cobalamine (II) en cobalamine (I) lors des réactions de transméthylation du méthylTHF sur l'homocystéine par la MTR. En effet, la MTR catalyse la transméthylation oxydative du méthylTHF sur la cobalamine (I) pour former la méthylcobalamine (III). La 2^{ème} réaction est la transméthylation de la méthylcobalamine (III) sur l'Hcy pour former de la méthionine et libérer la cobalamine (I) de nouveau réduite. Les phénomènes d'oxydation spontanée vont conduire à des formes non actives de cobalamine (II) qui seront réactivées par la MTRR (Figure 33).

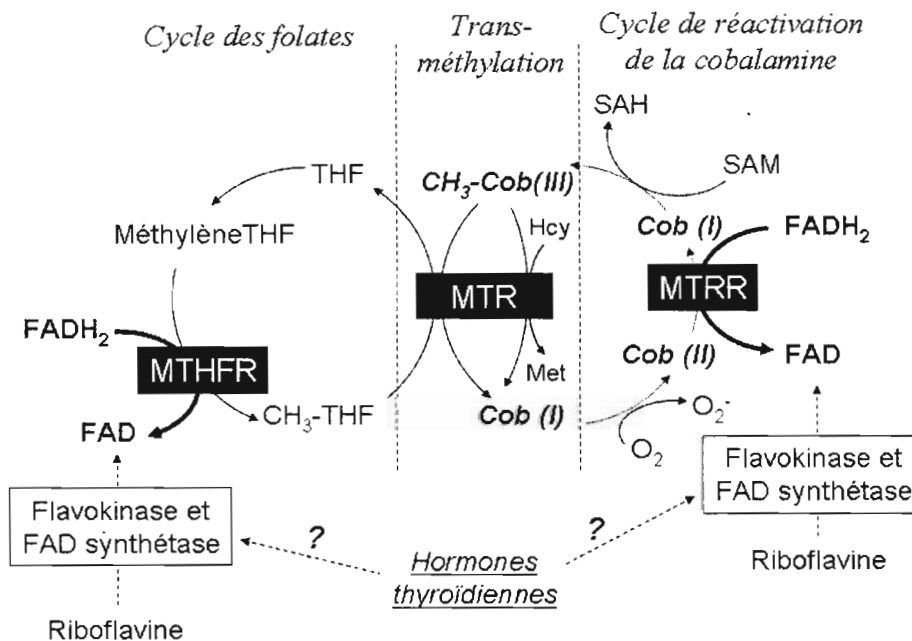


Figure 33 : Interconnexion dans le métabolisme des cofacteurs FAD entre le cycle des folates au niveau de la MTHFR et le cycle de réactivation de la cobalamine par la Méthionine synthase réductase (MTRR). Ces 2 enzymes catalysent l'oxydation du FADH₂ en FAD et une perturbation dans la biosynthèse de ces cofacteurs perturbe par conséquent le métabolisme de l'homocystéine.

Notre objectif consistait donc à vérifier l'hypothèse selon laquelle l'hypothyroïdisme engendre une hyperhomocystéinémie, due notamment à une déficience en FAD et FMN. Pour cela, nous avons produit un modèle chirurgical de rats thyroïdectomisés en comparaison avec des rats non opérés mais soumis à un régime *methyldeficient* hyperhomocystéinémiant fondé sur celui de Linnell et Poirier (1983). Nous avons ajouté à ce modèle nutritionnel une carence supplémentaire en vitamine B2. Les animaux (rats Fisher F344 mâles adultes) ont été répartis en 4 groupes pour l'étude qui a duré 8 semaines (Tableau 4) :

Tableau 4 : répartition des animaux dans les différents groupes d'étude concernant la thyroïdectomie associée ou non à un régime méthyldéficient.

Groupe	Chirurgie	Régime alimentaire	Effectif
1	Non	Régime standard (MA, Methyladequate diet)	7
2	Thyroïdectomie	Régime standard (MA, Methyladequate diet)	6
3	Non	Régime déficient en substrats méthylés (MD, methyldeficient diet)	7
4	Thyroïdectomie	Régime déficient en substrats méthylés (MD, methyldeficient diet)	9

i- **Métabolisme thyroïdien** : les rats opérés ont des taux de TSH (*Thyroid stimulating hormon*) plus élevés que les rats non opérés qu'ils soient carencés ou non (Figure 34). Cela montre que la thyroïdectomie est efficace chez les animaux opérés. De plus, la carence en vitamine B2 est vérifiée par le test EGRAC (Figure 34) dont le coefficient (activé / non activé) est supérieur à 1,4 dans les groupes 2, 3 et 4, démontrant ainsi que les animaux de ces groupes souffrent de carence en vitamine B2 provoquée par un hypothyroïdisme dans les groupes 2 et 4.

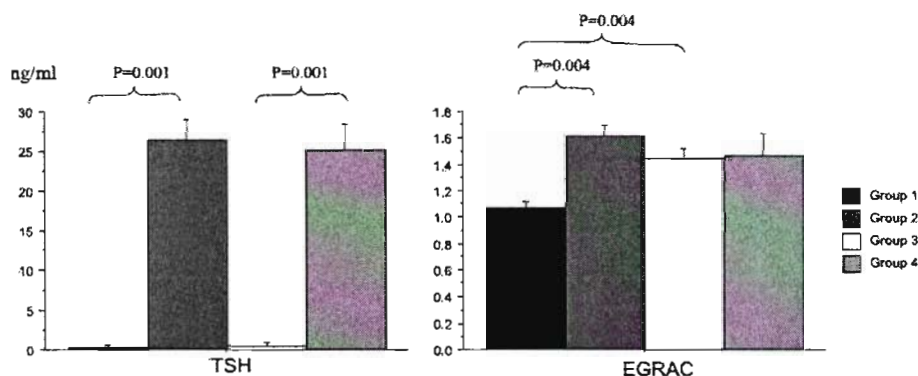


Figure 34 : Dosages de la TSH (*thyroid stimulating hormon*) et de l'EGRAC (*erythrocytic Glutathione reductase activation coefficient*) dans les 4 groupes d'étude.

ii- **Métabolisme de l'homocystéine** : la carence nutritionnelle en folates et vitamine B12 (Figure 35) se traduit chez les animaux soumis à un régime *methyldeficient* par une baisse des taux de folates plasmatiques (respectivement 127 ± 26 vs. 13 ± 9 nM entre les groupes 1 et 3, $P < 0,0001$ et 145 ± 65 vs. 15 ± 10 nM entre les groupes 2 et 4, $P < 0,0001$) et des taux de vitamine B12 plasmatique (respectivement 906 ± 89 vs. 452 ± 59 pM entre les groupes 1 et 3,

$P < 0,0001$ et 736 ± 46 vs. 473 ± 141 pM entre les groupes 2 et 4). Comme attendu, la thyroïdectomie n'influence pas les taux plasmatiques de ces vitamines. La conséquence de cette déficience en vitamines B2, B9 et B12 est une augmentation d'environ 6 fois des taux plasmatiques en Hcy dans le groupe 3 par rapport au groupe 1 ($29,6 \pm 4,5$ vs. $4,0 \pm 1$ μM , $P = 0,001$).

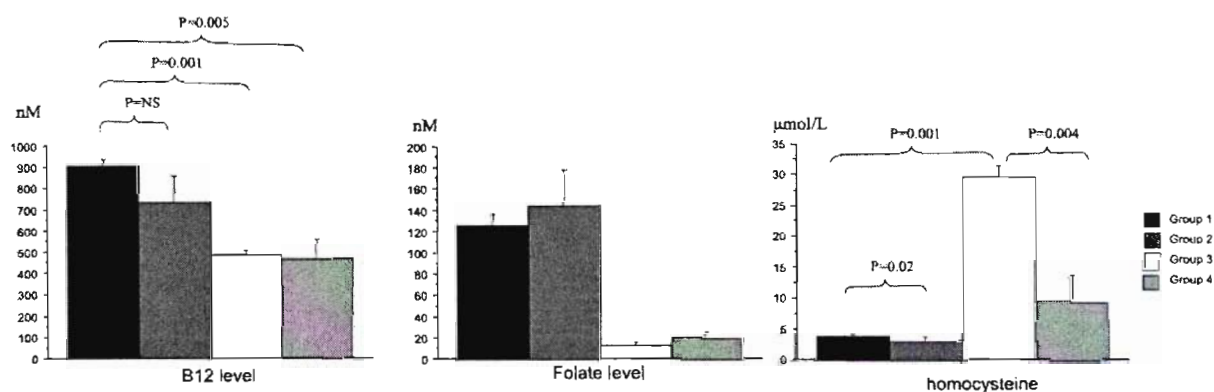


Figure 35 : Dosages plasmatiques des marqueurs nutritionnels de l'homocystéine.

Le régime alimentaire développé ici nous a permis de mettre au point un modèle de rats subissant une hyperhomocystéinémie modérée. La conséquence de cette déficience est une baisse significative d'environ 50% de l'activité MTHFR dans le groupe 3 par rapport au groupe 1 ($P = 0,01$). Cette baisse d'activité s'explique par la diminution des taux plasmatiques de folates et vitamine B2 qui sont les cosubstrats dans la réaction catalysée par la MTHFR. Les autres enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine (MTR, CBS et BHMT) n'ont pas de variation significative de leur activité. Pourtant, il y a bien du baisse du potentiel de méthylation chez les animaux carencés (groupes 3 et 4) puisqu'on observe une diminution significative ($P = 0,02$ et $P = 0,04$) des taux hépatiques de S-adénosylméthionine ($\sim 50\%$) par rapport au groupe 1.

iii- Hypothyroïdisme et homocystéine : contrairement à ce qui était attendu, les homocystéinémies ont diminué significativement chez les animaux opérés ayant un régime normal (respectivement $4,0 \pm 1,0$ vs. $2,6 \pm 1,0$ μM entre les groupes 1 et 2, $P = 0,02$). De même, il y a une diminution de l'homocystéinémie chez les animaux opérés soumis à un régime carencé par rapport aux non opérés (respectivement $29,6 \pm 4,5$ vs. $9,6 \pm 9,0$ μM entre les groupes 3 et 4, $P = 0,004$). Ces résultats démontrent que la thyroïdectomie réduit l'homocystéinémie quel que soit le régime nutritionnel. Bien qu'ils soient étonnants, ces

résultats sont similaires à ceux de Jacobs *et al.* (2000) portant également sur l'étude du lien entre homocystéine et hypothyroïdisme.

Bien qu'il y ait une diminution des activités du cycle de reméthylation par une baisse de la MTHFR (respectivement $5,1 \pm 2,9$ vs. $2,4 \pm 0,3$ nmol/h/mg de protéine, entre les groupes 1 et 2, $P=0,01$) et de la MTR ($3,3 \pm 0,3$ vs. $2,4 \pm 0,6$ nmol/h/mg de protéine, entre les groupes 1 et 2, $P=0,01$), les taux de SAM ne varient pas. En revanche, l'activité de la CBS augmente chez les animaux opérés (respectivement 194 ± 60 vs. 355 ± 95 nmol/h/mg de protéine, entre les groupes 1 et 2, $P=0,01$). L'augmentation de l'activité CBS a pour conséquence une augmentation du catabolisme de l'homocystéine qui se traduit par une baisse des taux plasmatiques dans le groupe des rats thyroïdectomisés.

2. Conséquences d'un régime *methyldeficient*

L'objectif de ce travail était d'étudier les conséquences d'une carence maternelle en choline, folates, vitamines B2 et B12 (principaux donneurs de groupements méthyles et responsables d'une hyperhomocystéinémie) au cours de la gestation puis de l'allaitement. Nous avons aussi observé et analysé les effets de cette carence sur la progéniture.

2.1. Sur la gestation et l'allaitement des rates

- i. **Effet sur la gestation** : Il n'y a aucune différence entre les groupes normaux et carencés en ce qui concerne le nombre de rates ayant développé une gestation. Cela laisse supposer que le régime n'influence pas le taux de fécondité des rates. De même, le nombre de ratons par portée est sensiblement identique quel que soit le régime attribué. Cependant, la prise de poids lors de la gestation est plus faible chez les rates carencées et des différences s'observent dès le 4^{ème} jour de gestation et jusqu'à la mise bas. Au final, la prise de poids dans le groupe normal est d'environ 51 g vs. 21 g dans le groupe carencé ($P < 0,0001$). La durée de gestation est identique dans les 2 groupes (21-22 jours) et la carence n'induit pas de mise bas précoce ou tardive
- ii. **Effet de l'allaitement** : quatre groupes d'animaux ont été pris en compte pour cette étude afin de mesurer les effets conjugués ou non de la carence et de l'allaitement.

Tableau 5: Concentrations plasmatiques en vitamine B12, folates et homocystéine après la période d'allaitement. Moyenne ± déviation standard. Analyse statistique : ANOVA (test de Fischer).

	Rates témoins		Rates carencées	
	Non allaitantes	allaitantes	Non allaitantes	allaitantes
Vitamine B12 (pmol/L)	1163,4±574,0	577,8±421,0	686,9±361,1	524,2±366,2
Folates (nmol/L)	193,3±76,0	186,5±18,8	19,2±5,6	11,4±6,8
Homocystéine (µmol/L)	6,5±1,3	5,1±1,3	24,3±4,1	33,7±1,8

Indépendamment de l'allaitement, la carence induit bien une chute en vitamine B12 et folates (Tableau 5) chez les rates ($P=0,0190$ et $P<0,0001$ respectivement), qui s'accompagne d'une hHcy modérée chez les carencées. L'allaitement n'influence pas les taux de vitamine B12 et de folates chez les rates contrôles et il n'aggrave pas non plus l'effet de la carence. En revanche, l'allaitement va aggraver l'hHcy chez les rates carencées ($P<0,0001$) alors que la diminution de vitamine B12 dans le groupe contrôle allaitant n'induit pas d'hHcy.

- iii. **Analyse histopathologique** : au niveau du foie il n'y a aucune inflammation portale ou septale, aucune nécrose ni dysplasie entre les différents groupes. En revanche, il y a apparition de stéatose microvésiculaire chez les rates carencées et allaitantes avec un degré de gravité plus important que dans les autres groupes (contrôle/allaitante et carencée/non allaitante)

2.2. Effet du régime méthyldéficient sur la progéniture

2.2.1. Développement corporel des ratons

Au niveau de l'anatomie générale des ratons, comme l'illustre la figure 36, le raton issu d'une mère carencée est nettement plus petit à la naissance que le raton né d'une mère non carencée. La différence de taille persiste avec l'âge : au 21^{ème} jour postnatal, le raton carencé présente une taille significativement inférieure à celle du raton témoin ($19,1 \pm 1,2$ vs. $12,8 \pm 1,5$ cm, $p < 0,01$).

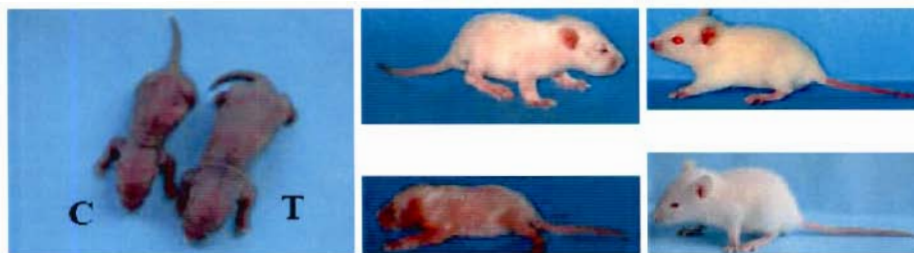


Figure 36 : Effets de la carence sur le développement des jeunes rats ($n=12$). Les images montrent différents stades du développement des ratons à J3, J13 et J21.

Le graphique ci-dessous (Figure 37) montre que cette différence de taille s'accompagne d'une différence de poids entre la naissance et le sevrage. En effet, au premier jour les ratons carencés pèsent en moyenne $5,3 \pm 0,3$ g alors que les ratons témoins pèsent $6,8 \pm 0,7$ g ($p < 0,05$). Cet écart s'accroît avec le temps. A 21 jours postnatal, le raton carencé présente un poids très nettement inférieur à celui du raton témoin ($17,7 \pm 4,3$ vs. $44,7 \pm 3,0$ g, $p < 0,0001$). Enfin, il existe une corrélation entre les paramètres poids et taille ($z = 6.113$, $p < 0,0001$). Ceci signifie que la carence n'entraîne pas de maigreur mais un retard de croissance harmonieux.

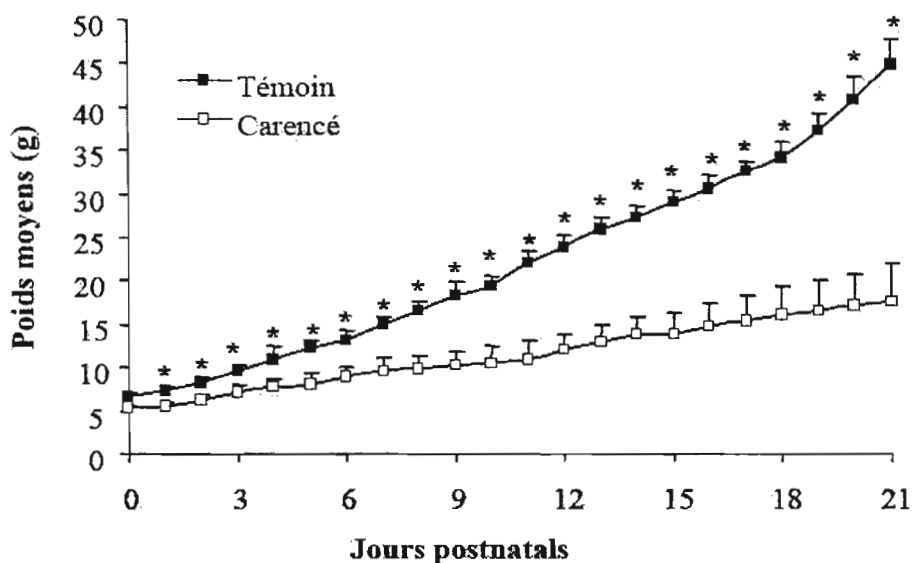


Figure 37 : Représentation de l'évolution de la masse corporelle des ratons entre la naissance et le sevrage (J21). Différence statistiquement significative * $P < 0,05$, ANOVA, test de Fisher.

Par ailleurs, la pilosité des ratons carencés est très peu développée au 13e jour postnatal. Au niveau locomoteur, alors que le raton témoin se déplace normalement sur ses 4 membres, le raton carencé rampe uniquement. Concernant le système sensoriel, l'ouverture des yeux a lieu pour les ratons non carencés entre le 12^{ème} et le 14^{ème} jour, tandis qu'elle apparaît plus tardivement chez les ratons carencés (entre les 15^{ème} et 17^{ème} jours).

Enfin, il y a une mortalité importante des ratons carencés au cours de la première semaine postnatale ; elle atteint 25%. A l'inverse, aucune perte n'a été observée dans le groupe témoin.

2.2.2. Etude histopathologique sur les hépatocytes

L'analyse histologique a permis de semi-quantifier les lésions nécro-inflammatoires, les fibroses et les stéatoses sous la forme de scores de sévérité (Ishak, 2000) et sont rapportés dans le tableau ci-dessous. Cette évaluation a été réalisée en collaboration avec le laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Nancy (Tableau 6).

Tableau 6 : Gradient des lésions nécrotiques, stéatose et dysplasie

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

Les observations macroscopiques (Figure 38) montrent chez les rats âgés de 21 jours des stéatoses hépatiques facilement identifiables. Cette stéatose est de couleur blanchâtre et possède une structure friable. Ces observations sont confirmées par des études microscopiques.



Figure 38 : Foies de rats âgés de 21 jours et nés de mère ayant reçu un régime normal (gauche) ou un régime carencé (droite).

Le score de sévérité de la stéatose est élevé ($1,6 \pm 0,8$ vs $0,2 \pm 0,4$ chez les témoins, $p < 0,0001$) et signifie que la stéatose représente environ 10% du tissu hépatique chez les rats carencés. Cette stéatose ne s'accompagne ni de fibrose, ni d'inflammation portale ou septale, ni de nécrose intra-lobulaire, ni enfin de dysplasie. L'observation de la stéatose en microscopie électronique montre l'accumulation de gouttelettes lipidiques au niveau du cytoplasme (Figures 39).

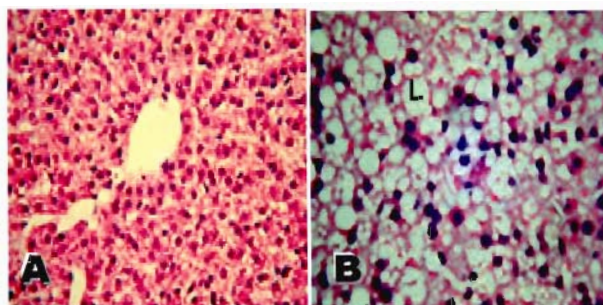


Figure 39 : Analyse microscopique après marquage à l'hématoxyline des hépatocytes de rats âgés de 21 jours nés de mères ayant un reçu un régime normal (A) ou carencé (B).

L'observation des hépatocytes en microscopie électronique révèle la présence de gouttelettes lipidiques (Figure 40) qui ont été quantifiées et estimées à $0,19 \pm 0,08$ gouttelettes / μm^2 . Ces globules lipidiques sont accumulés dans le cytoplasme et les hépatocytes présentent un arrangement hétérogène. Par ailleurs, il a été mis en évidence une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le noyau de certains hépatocytes des rats carencés. La structure du réticulum endoplasmique, similaire entre les deux groupes de rats, est normale et homogène. Cela montre que cet organite ne subit pas de stress particulier.

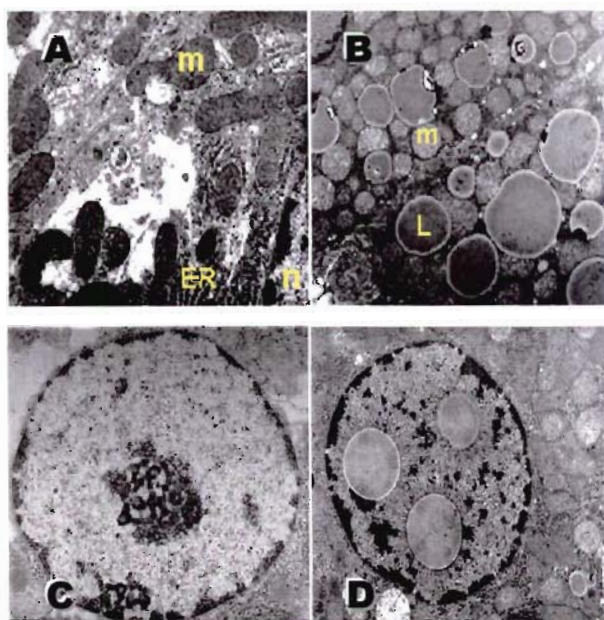


Figure 40 : Observations en microscopie électronique des cytoplasmes (A-B) et des noyaux (C-D) des hépatocytes de rats âgés de 21 jours et nés de mères ayant reçu un régime normal (A-C) ou un régime carencé (B-D).

Des dosages lipidiques ont été effectués sur les foies des animaux selon la procédure décrite par Folch *et al.* (1957). Par rapport au groupe contrôle, on observe chez le groupe

methyldeficient une augmentation significative des lipides totaux hépatiques (respectivement 183 ± 10 vs. 391 ± 66 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu, $P < 0,01$) marquée principalement par une augmentation des triglycérides (respectivement $8,2 \pm 1,2$ vs. $21,3 \pm 3,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu, $P < 0,05$), tandis que le taux de cholestérol ne varie pas (respectivement $0,2 \pm 0,2$ vs. $0,4 \pm 0,3$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu, $P = 0,27$).

2.2.3. Dosages sanguins et hépatiques des déterminants nutritionnels de l'homocystéine

Les dosages sanguins ont été réalisés en collaboration avec le service de Biochimie-Biologie Moléculaire en Nutrition et Métabolisme du CHU Nancy-Brabois.

Tableau 7 : Concentrations en vitamine B12, folate, homocystéine, statut en vitamine B2 (EGRAC et LGRAC) et activités des Alanine- et Aspartate-transaminases chez les rats âgés de 21 jours et nés de mères carencées ou non en substrats méthylés.

Concentrations plasmatiques et érythrocytaires			
	Normal	Carencé	Valeur -P
Vitamine B12 (pmol/L)	$1277,1 \pm 165,8$	$322,3 \pm 56,0$	$<0,0001$
Folate (nmol/L)	$74,8 \pm 18,5$	$35,4 \pm 16,3$	$0,0012$
EGRAC	$1,14 \pm 0,43$	$1,15 \pm 0,35$	$0,9605$
Homocystéine ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	$6,3 \pm 0,9$	$17,4 \pm 5,8$	$0,0003$
ALAT (UI/L)	$34,5 \pm 8,2$	$30,7 \pm 9,7$	$0,3715$
ASAT (UI/L)	$131,9 \pm 18,4$	$185,7 \pm 25,7$	$0,0003$
Concentrations hépatiques			
	Normal	Carencé	Valeur -P
Vitamine B12 (pmol/mg protéine)	$2,30 \pm 0,47$	$2,47 \pm 0,52$	$0,6140$
Folate (nmol/mg protéine)	$1,16 \pm 0,19$	$0,23 \pm 0,05$	$<0,0001$
LGRAC	$1,16 \pm 0,16$	$0,97 \pm 0,42$	$0,3752$

Les activités ASAT augmentent significativement ($P = 0,0003$) chez les animaux nés de mères carencées, laissant supposer qu'il existe des lésions au niveau du foie. En effet ces lésions se traduisent par un relargage d'enzymes hépatiques et donc une augmentation des activités.

Le statut en vitamine B2, évalué par l'EGRAC et le LGRAC, demeure inchangé ($P = 0,9605$ et $P = 0,3752$ respectivement), alors que les résultats obtenus avec Ayav *et al.* montrent une carence en vitamine B2 (augmentation de l'EGRAC $> 1,4$) chez les mâles adultes. Cette

carence n'a pas été validée dans ce modèle mais il apparaît que les animaux nés de mère carencée ne sont pas déficients en vitamine B2. De plus, les réserves hépatiques ne sont pas non plus entamées par la carence.

Comparé au groupe normal, le groupe carencé présente une réduction des taux plasmatiques en vitamine B12 ($P < 0,0001$) et folates ($P = 0,0012$). Cette carence se répercute au niveau du foie pour les folates puisqu'on observe une chute de la réserve hépatique d'environ 80% chez les animaux nés de mères carencées ($P < 0,0001$). Par contre, la carence en vitamine B12 n'entame pas les réserves hépatiques puisqu'il n'y a pas de différence entre les 2 groupes à ce niveau là ($P = 0,6140$).

La conséquence de cette déficience en folates et, dans une moindre mesure, en vitamine B12 se traduit par une hyperhomocystéinémie (hHcy) modérée chez les animaux nés de mères carencées ($P = 0,0003$), avec une augmentation d'environ 3 fois de la concentration en Hcy. Dans ce modèle nutritionnel, la carence en précurseurs de méthyles (folates et vitamine B12) induit une élévation de l'Hcy comparable à celle observée chez des patients malnutris ou ayant des désordres génétiques conduisant à des réductions d'activité enzymatique (MTHFR C677T, CBS T833C, MTR A2756G).

3. Marqueurs hépatiques du métabolisme de l'homocystéine

Les souris CBS KO ont permis la mise au point et la validation du dosage radioenzymatique de la Cystathionine- β -synthase développé dans notre laboratoire. Les premiers essais ont été réalisés selon la méthode décrite par Kraus (1987) dont le principe de séparation des substrats et produits ($[^{14}\text{C}]$ sérine et $[^{14}\text{C}]$ cystathionine) repose sur une chromatographie en couche mince (papier Whatman recouvert d'une couche de silice). Cette méthode s'est révélée longue (migration $> 16\text{h}$), peu précise (le comptage de la radioactivité nécessite un découpage sur toute la longueur du papier filtre) et assez peu reproductible. C'est la méthode séparative de Moore et Stein (1958), permettant l'obtention d'un aminogramme, qui a servi de point de départ à la réflexion puisque la sérine et la cystathionine sont séparées à l'aide d'une chromatographie liquide à basse pression dont la phase stationnaire est une résine polyanionique (résine chargée de radicaux sulfonates).

La concentration de travail optimale en protéines totales a été déterminée en préparant la réaction avec une gamme croissante de la quantité de protéines. Dans le même

temps, pour chaque point de concentration protéique, l'incubation a été maintenue de 15 à 120 min (Figure 41).

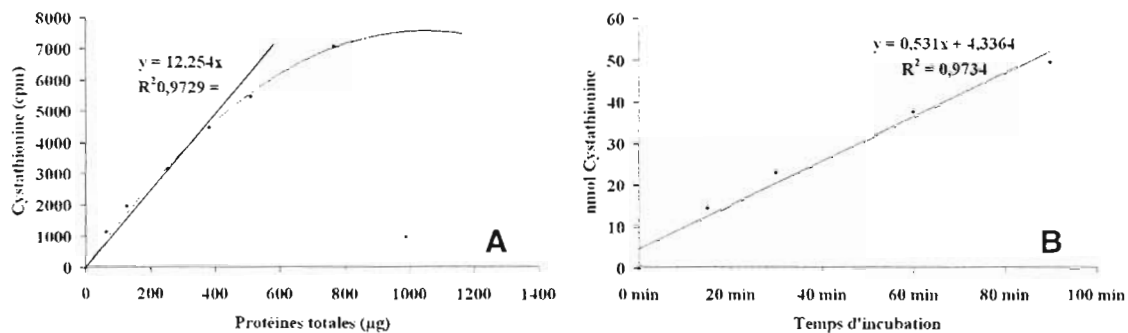


Figure 41 : Courbe de saturation de l'activité CBS en fonction de la quantité de protéines totales (A) dans le milieu réactionnel et de la durée d'incubation de la réaction à 37°C (B).

La figure 41A ($[Cth] = f(\text{protéines})$) montre que la production de cystathionine par la CBS est linéaire jusqu'à environ 400 µg de protéines totales dans le milieu réactionnel. Au-delà l'activité atteint un plateau de saturation qui empêchera de calculer l'activité enzymatique selon la méthode de calcul dite en point final. De même, la figure 41B ($[Cth] = f(\text{tps})$) indique que l'activité est linéaire au-delà de 90 min d'incubation. Pour limiter les phénomènes d'usure du milieu réactionnel (oxydation, dégradations) la durée de l'incubation sera fixée à 30 minutes.

Affinité de la CBS pour ses substrats. A partir de ces conditions fixant la durée d'incubation et la quantité de protéines totales nécessaires et suffisantes pour la réaction enzymatique, nous avons pu mesurer, grâce à une courbe de saturation, l'affinité de la CBS pour ses 2 substrats l'homocystéine et la sérine (Figure 42).

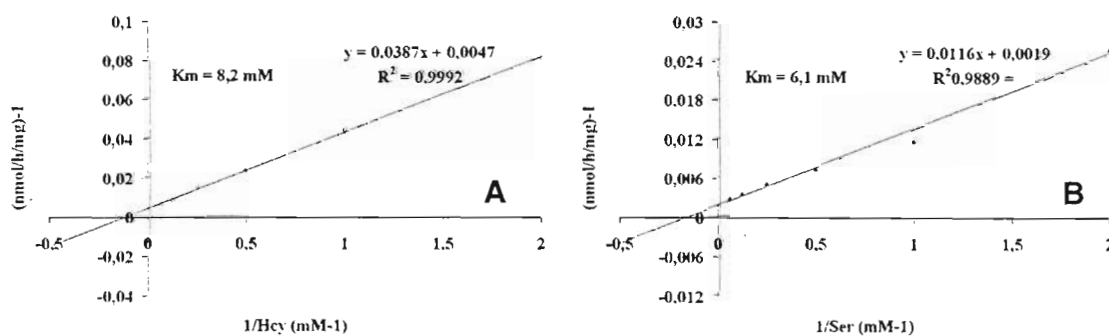


Figure 42 : Détermination du K_M de la CBS de foie de rat pour l'homocystéine (A) et la sérine (B) à partir d'une représentation graphique de Lineweaver et Burk. La valeur de K_M est déterminée en calculant le point d'intersection de la droite de régression avec l'axe des abscisses qui donne alors la valeur $(-1 / K_M)$.

Le K_M (constante de Michaelis) est obtenu à partir de la représentation graphique de Lineweaver et Burk ($1/v = f(1/[S])$) et les valeurs sont de 8,2 mM pour l'Hcy et de 6,1 mM pour la sérine. Ces valeurs sont proches de celles décrites par Bukovska (1994) qui, par la méthode de chromatographie en couche mince avait déterminé à partir d'une CBS humaine recombinante purifiée des K_M de 3,1 et 1,1 mM pour l'Hcy et la sérine respectivement. Cette similitude dans les résultats est un argument convaincant quant à l'efficacité de la méthode de dosage développé dans notre laboratoire. Bien que l'activité de la CBS soit importante dans le foie, l'affinité de l'enzyme pour l'Hcy est faible en comparaison des valeurs obtenues pour la Méthionine synthase ($\sim 40 \mu\text{M}$) qui sont près de 100 fois supérieures pour ce même substrat.

Mesure de l'activation de la CBS par la SAM. Les échantillons sont incubés 5 min dans un bain marie à 37°C en présence de SAM avant de démarrer la réaction avec la [^{14}C sérine] pour permettre la fixation et l'activation de l'effecteur sur l'enzyme (Figure 43).

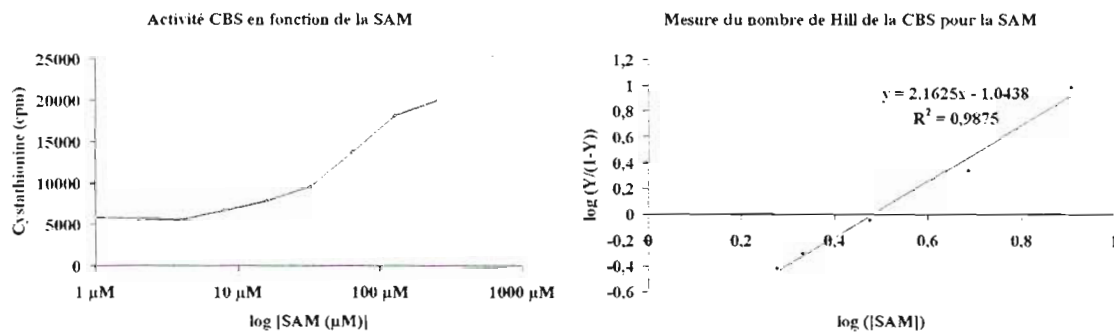


Figure 43 : Effet coopératif de la SAM pour la CBS et calcul du nombre de Hill « n » à partir de la représentation graphique de Hill. Le nombre 2,16 (>1) indique qu'il s'agit bien d'une coopérativité positive de la SAM.

La représentation graphique de Hill permet de calculer le coefficient de coopérativité du substrat pour son enzyme. La CBS est un homotétramère, et comme la plupart des protéines de ce type elle est soumise à une régulation allostérique (coopérativité) par une autre molécule qui rend l'affinité pour le substrat ou l'activité catalytique plus ou moins importante. La courbe de saturation de la CBS par la SAM montre une allure sigmoïde (Figure 43) de l'activité qui correspond à une coopérativité positive (activation allostérique de l'enzyme). Le coefficient « n » est obtenu à partir de la représentation de Hill et selon l'équation :

$$\log [\text{SAM } (\mu\text{M})] = f(\log (Y/(1-Y))) \quad \text{où } Y = (\text{activité mesurée}) / (\text{activité maximale}).$$

La valeur « n » est ici de 2,16 car ce nombre correspond à la pente de la droite de régression de l'équation de Hill. La valeur trouvée ici est inférieure à celle calculée par Bukovska *et al.* (1994) qui avaient déterminé une valeur de 5,2 supposant une activation plus forte que celle observée dans le cas présent.

Phénotypage des organes exprimant la CBS : Ce dernier travail visait à vérifier la répartition et l'expression tissulaire de la CBS décrite dans d'autres travaux. Les dosages ont été réalisés à partir de souris *cbs +/+* et *cbs +/-* selon les conditions établies plus haut dans le texte. La déficience totale en CBS chez les souris *cbs -/-* a été vérifiée sur le foie qui est l'organe exprimant le plus fortement cette enzyme.

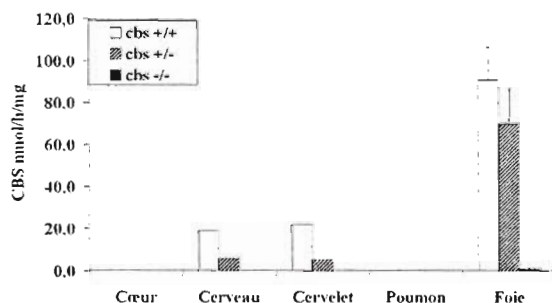


Figure 44 : Distribution tissulaire de l'activité CBS chez les souris *cbs +/+* (barres blanches) et *cbs +/-* (barres grises). L'activité de la CBS chez les souris *cbs -/-* a été déterminée uniquement au niveau du foie, pour valider la disruption du gène.

La figure 44 indique que le foie est un organe majeur pour l'expression de la CBS, puisque l'activité (respectivement 91±16, 70±16 et 0 nmol/h/mg de protéine chez les souris *cbs +/+*, +/- et -/-) y est au moins 10 fois supérieure aux autres tissus comme le cervelet (respectivement 21,6 et 5,2 nmol/h/mg de protéine chez les souris *cbs +/+* et +/-) ou le cerveau (respectivement 18,7 et 5,6 nmol/h/mg de protéine chez les souris *cbs +/+* et +/-). Le cœur et le poumon n'ont aucune activité enzymatique détectable de la CBS, confirmant ainsi les observations faites par Bao *et al.* (1998) à partir de ses travaux sur l'analyse par *Northern blot* de l'expression de la CBS.

Une baisse de cette activité se traduit directement par une augmentation de l'Hcy plasmatique comme cela est le cas chez les souris *cbs +/-* où on observe bien une diminution de l'activité (~25% par rapport aux *cbs +/+*) avec des taux d'Hcy de ~13 μM chez

les souris *cbs +/-* vs. $\sim 6 \mu\text{M}$ chez les *cbs +/+* (Watanabe, 1995). Ce rapport, et plus particulièrement la SAM, comme cela a été montré plus haut, permet l'activation de la CBS. C'est donc la diminution des taux de SAM et du rapport SAM/SAH observés chez les rats *methyldeficient* qui provoque bien une diminution de l'activité CBS.

Une étude menée dans notre laboratoire (Ortiou *et al.* 2004) sur une lignée cellulaire d'adénocarcinome colique (Caco-2) a permis de mettre en évidence l'importance relative de la méthionine, de l'homocystéine et de la vitamine B12 sur l'activité de la Méthionine synthase (Figure 45).

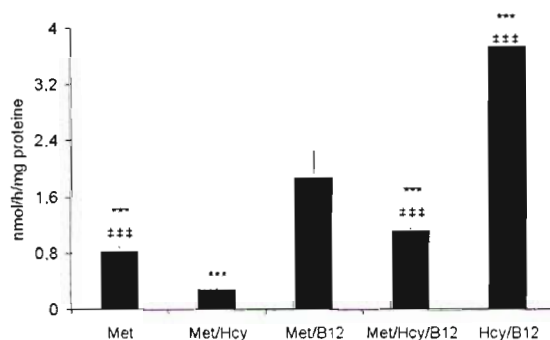


Figure 45: Mesure de l'activité Méthionine synthase sur une lignée cellulaire d'adénocarcinome humain (Caco-2) traitée +/- méthionine, +/- Hcy, +/- vitamine B12. Différence significative vs. le traitement Met/B12 *** $P < 0,01$ et vs. le traitement Met/Hcy ## $P < 0,01$.

Ces résultats montrent qu'en présence de vitamine B12, de méthionine et d'homocystéine, l'activité de la MTR est diminuée par rapport à un traitement Met/B12 sans homocystéine. Le tableau 8 récapitule les valeurs moyennes des activités Méthionine synthase mesurées en réponse au traitement des cellules Caco-2 +/- méthionine, +/- homocystéine, +/- vitamine B12.

Tableau 8 : valeurs moyennes de MTR (nmol/h/mg de protéine) et des déviations standard pour chaque type de traitement des cellules Caco-2 en culture (Met 30 mg/L, +/- B12 0,1 μM , +/- Hcy 100 μM).

Traitement	Activité MTR nmol/h/mg	Déviations standard
Met	0,820	0,070
Met/Hcy	0,283	0,012
Met/B12	1,877	0,368
Met/Hcy/B12	1,113	0,032
Hcy/B12	3,740	0,050

Si on utilise le traitement Met/B12 comme référence, on constate que, combinée au traitement Met/B12, l'homocystéine provoque une baisse significative de l'activité MTR (Met/B12 vs. Met/B12/Hcy, $P=0,0011$). En revanche, si on remplace la méthionine par l'homocystéine, en présence de B12, on observe au contraire une augmentation de l'activité (Met/B12 vs. Hcy/B12, $P<0,0001$). Si on retire la B12 du traitement avec Méthionine, on constate une diminution de l'activité MTR (Met/B12 vs. Met, $P=0,0001$), qui est aggravée par un traitement Met/Hcy (Met/B12 vs. Met/Hcy, $P<0,0001$). Le traitement Met/Hcy induit ainsi une baisse significative de l'activité MTR par rapport au traitement avec de la méthionine seule (Met vs. Met/Hcy, $P=0,0082$). On peut ainsi conclure que dans ce modèle cellulaire la présence de vitamine B12 favorise l'activité de la MTR dont elle le cofacteur indispensable. La présence de méthionine, produit de la réaction, ralentit cette activité en absence de vitamine B12, de même que l'homocystéine. La combinaison de ces 2 facteurs (substrat et produit) se traduit par une activité minimum de la MTR. Cependant, durant les périodes de déficit en méthionine, l'activité de la MTR est fortement augmentée en présence d'homocystéine et de vitamine B12.

3.1. Marqueurs hépatiques du métabolisme de l'homocystéine chez le rat méthyldéficient

Les dosages plasmatiques en vitamine B12 montrent une chute d'environ 75% chez les rats nés de mères carencées ; on observe logiquement, par rapport au groupe contrôle, une baisse de l'activité MTR chez les animaux *methyldeficients* (respectivement $2,5\pm 0,6$ vs. $0,3\pm 0,1$, $*P<0,01$, figure 47A). On observe aussi une baisse significative de l'activité MTHFR chez les rats *methyldeficients* par rapport aux contrôles (respectivement $0,5\pm 0,2$ vs. $3,5\pm 0,9$ nmol/h/mg de protéine, $P<0,01$, figure 47B). En revanche, il n'y a aucune différence significative pour l'activité BHMT entre les groupes de rats (respectivement $7,0 \pm 0,2$ vs. $7,8 \pm 1,4$ nmol/min/mg de protéine, $P=0,69$, figure 47C). Il y a une diminution significative de l'activité Méthionine adénosyltransférase (MAT) chez les rats *methyldeficients* par rapport aux contrôles (respectivement $11,1\pm 4,5$ vs. $17,6\pm 4,0$ nmol/h/mg de protéine, $P=0,0431$, figure 47D). Ces résultats concordent tout à fait avec les autres dosages hépatiques obtenus chez ces animaux car nous avons observé une baisse de la reméthylation de l'Hcy par le ralentissement des activités MTR et MTHFR. De plus, les taux de SAM chutent sensiblement chez les animaux *methyldeficients*, laissant supposer un défaut dans la synthèse de la SAM. Nous observons une baisse significative de l'activité CBS chez

les rats *methyldeficients* par rapport aux contrôles (respectivement $48,6 \pm 2,9$ vs. $83,6 \pm 6,3$ nmol/h/mg protéine, $P < 0,01$, figure 47E). Cette baisse d'activité de moins de 50% chez les carencés explique en partie l'augmentation des taux d'homocystéine puisque la CBS catalyse la dégradation de l'Hcy. Cependant, les rats déficients ne sont pas carencés en vitamine B6, cofacteur de la CBS, et la baisse d'activité ne peut s'expliquer par une anomalie génétique. C'est probablement la diminution du rapport SAM/SAH qui influence l'activité de la CBS. Les techniques de dosage des taux de SAM et SAH sont nombreuses et les technologies auxquelles elles font appel sont aussi très variées (spectrophotométrie, spectrofluorescence, coulométrie,...). Cependant, elles sont toutes basées sur des méthodes de séparation des métabolites utilisant la chromatographie liquide à haute performance en phase inversée. Ci-dessous est représenté un profil type de séparation de la SAM et de la SAH d'hépatocytes de rats âgés 21 jours et soumis ou non à un régime *methyldeficient*.

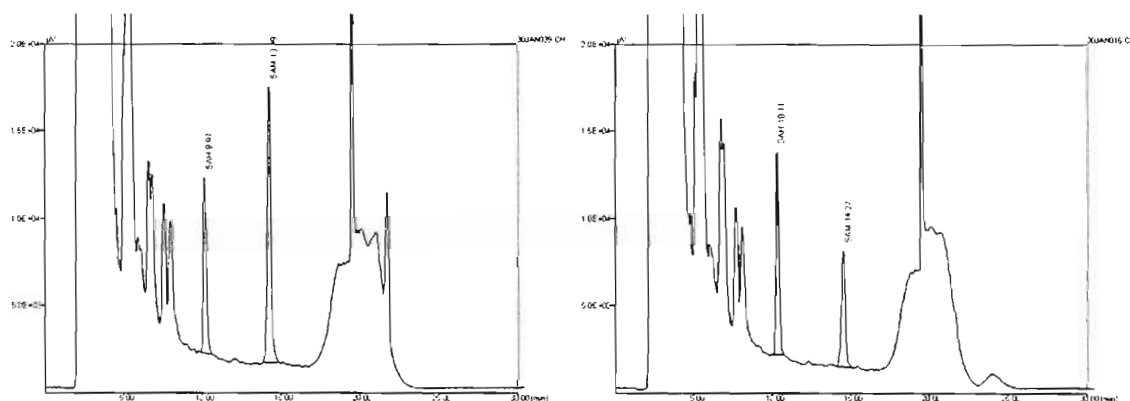


Figure 46 : Chromatogrammes typiques de rats normaux (gauche) ou carencés (droite) obtenus après déprotéinisation (HClO_4 3%) de l'homogénat tissulaire et séparation par HPLC (Lichrospher OD2, granulométrie 5 μ , C18, 250x4 mm, 0,75 mL/min, 135 bar, 30°C, UV-254 nm). La séparation des métabolites se fait selon un gradient d'acétonitrile (10-17%) à pH acide (3,2) et en présence d'un contre ion (acide heptanesulfonique).

Les concentrations hépatiques de SAM et SAH sont calculées grâce aux aires de pic et à partir d'une gamme de standards. Les résultats sont exprimés en nmol/g de tissu et nous avons pu observer une diminution significative ($\sim 65\%$) des taux de SAM chez les animaux déficients par rapport aux contrôles ($13,9 \pm 6,7$ vs. $37,8 \pm 9,3$ respectivement, $P = 0,0016$) alors que les taux de SAH ne varient pas ($11,2 \pm 3,2$ vs. $10,3 \pm 5,3$, $P = 0,77$). Au final, les animaux déficients montrent une diminution du rapport SAM/SAH (Figure 47F).

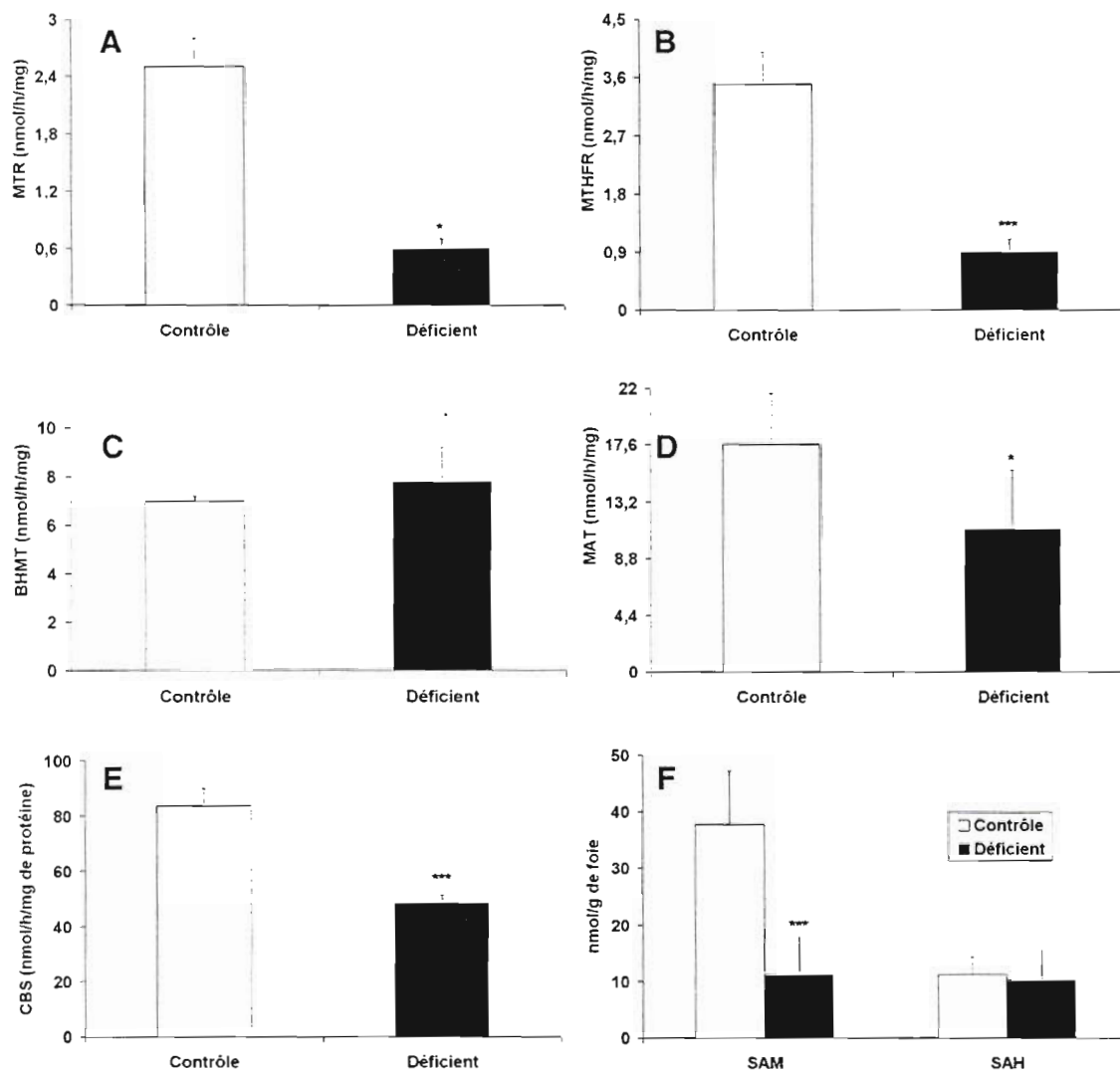


Figure 47 : Dosages hépatiques des activités Méthionine synthase (MTR, A), MTHFR (B), BHMT (C), MAT (D) et CBS (E) chez les rats de 21 jours carencés ou non. Concentrations hépatiques de SAM et SAH (F). Différence significative * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ ($n = 6$ par groupe)

3.2. Marqueurs hépatiques du métabolisme de l'homocystéine chez la souris *cbs* ^{-/-}

Les souris transgéniques *cbs* ^{-/-} testées pour la Méthionine synthase (MTR) montrent aussi par rapport au groupe contrôle une diminution de l'activité (respectivement 1,4±0,4 vs. 0,5±0,3 nmol/h/mg de protéine, P<0,01, figure 48A). Les souris *cbs* ^{-/-} subissent aussi une baisse de l'activité BHMT par rapport aux souris contrôles (2,3±1,8 vs. 11,6±5,7 nmol/h/mg de protéine, P=0,0007, figure 48C). A l'inverse de la MTR ou de la BHMT, l'activité MTHFR est plus importante chez les souris *cbs* ^{-/-} par rapport aux *cbs* ^{+/+} (respectivement 9,4±3,5 vs. 2,9±1,4 nmol/h/mg de protéine, P<0,0001, figure 48B). Les résultats des dosages de SAM et SAH sont exprimés en pmol/mg de protéine pour les souris transgéniques. Contrairement aux rats, le dosage des taux de SAM et SAH (Figure 48D) chez les souris transgéniques a été effectué à partir d'homogénats protéiques de foie et non à partir de tissu brut. Les résultats montrent une augmentation significative chez les souris transgéniques par rapport aux sauvages des taux de SAM (481,4±126,0 vs. 251,9±81,0 pmol/g de protéine respectivement, P=0,002) et de SAH (190,5±38,7 vs. 93,0±20,9 pmol/g de protéine respectivement, P=0,0001) alors que le rapport SAM/SAH ne varie pas (2,5±1,0 vs. 3,0±0,8 respectivement, P=0,3361).

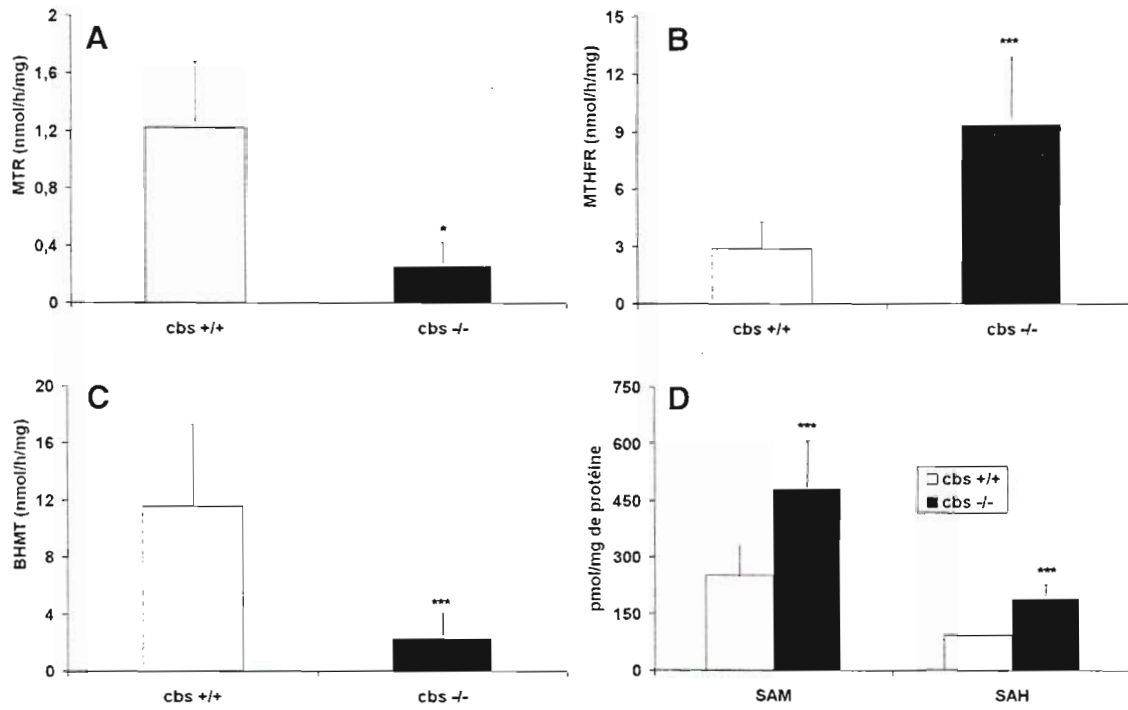


Figure 48 : Dosages hépatiques de la Méthionine synthase (MTR), MTHFR, BHMT et taux de SAM/SAH chez les souris *cbs +/+* ou *cbs -/-* * $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

4. Marqueurs hépatiques du stress oxydant

4.1. Chez le rat méthyldéficient

L'activité SOD, qu'elle soit mitochondriale (Cu/Zn dépendante) ou cytoplasmique (Mn dépendante), ne varie pas chez les *methyldeficients* par rapport au groupe contrôle (respectivement $3,7 \pm 1,1$ vs. $4,3 \pm 1,1$ pour la SOD-Cu/Zn, $P=0,75$ et $0,74 \pm 0,08$ vs. $0,85 \pm 0,06$ pour la SOD-Mn, $P=0,26$, figure 49A et 49B). Cependant, on observe chez les rats carencés une chute significative de l'activité GPX par rapport au groupe contrôle (respectivement 158 ± 33 vs. 381 ± 67 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protéine, $P < 0,0001$, figure 49C). De même, on observe une diminution de l'activité GSR ($50,4 \pm 10,4$ vs. $127,2 \pm 10,3$ U/h/mg de protéine, figure 49D) et une diminution du glutathion réduit (GSH, $3,2 \pm 0,9$ vs. $14,3 \pm 3,6$ nmol/mg de protéine, $P=0,0002$, figure 49E) ou oxydé (GSSG, $2,3 \pm 0,8$ vs. $12 \pm 2,3$ nmol/mg de protéine, $P=0,0005$, figure 49F). En revanche, il y a chez les animaux *methyldeficients*, par rapport au groupe contrôle, une augmentation des marqueurs du stress oxydant tels que le MDA ($89,78 \pm 23,2$ vs. $37,98 \pm 12,91$ $\mu\text{mol}/\text{g}$ de tissu, $P=0,0037$, figure 49G) ou la Cytochrome oxydase (460 ± 13 vs. 419 ± 36 , $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu, $P < 0,05$, figure 49H).

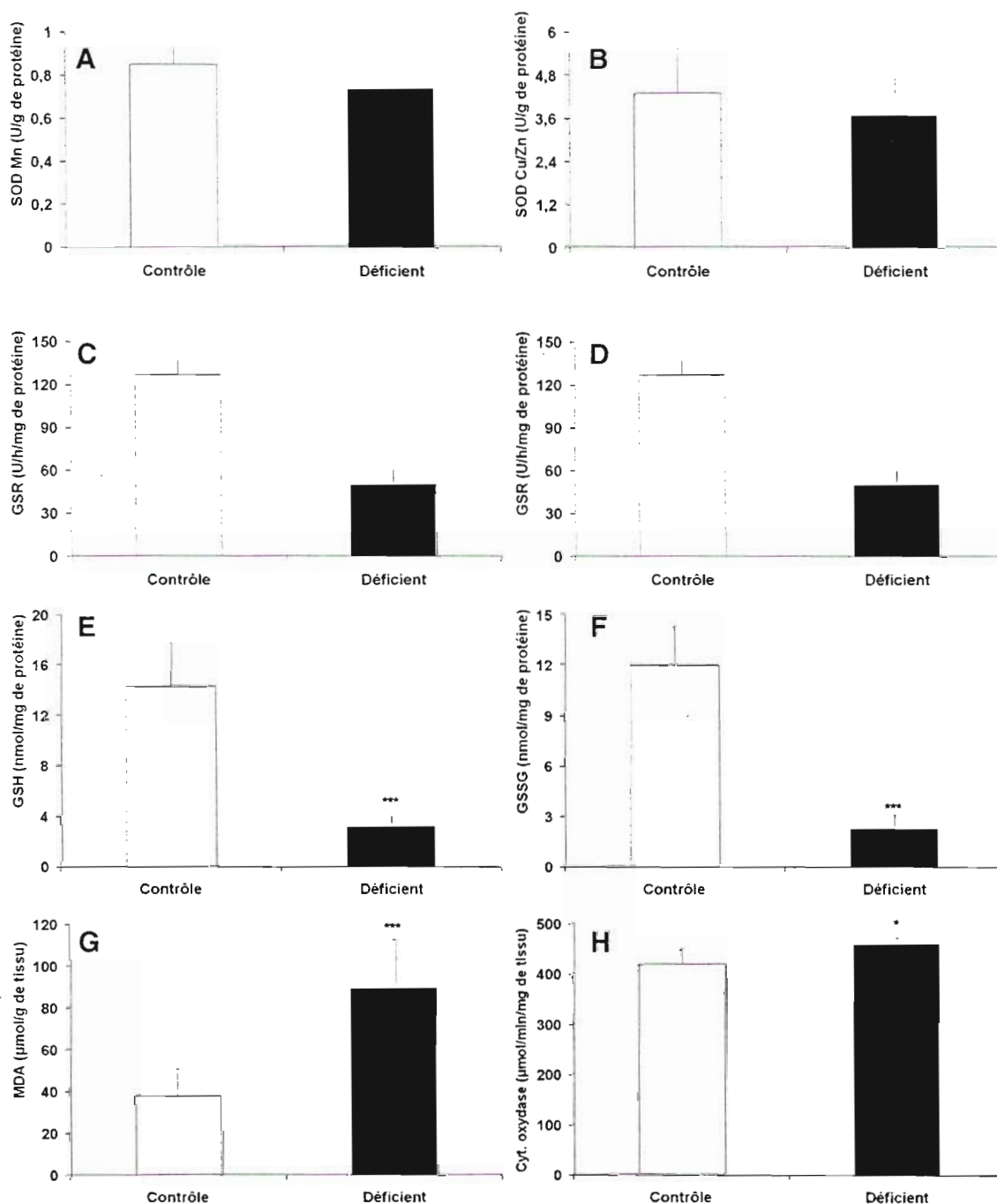


Figure 49 : Activités Superoxyde dismutase (SOD) manganèse dépendante (Mn) ou cuivre et zinc dépendante (Cu/Zn), Glutathion peroxydase (GPX), Glutathion S-réductase (GSR) et Cytochrome oxydase. Taux hépatiques de glutathion réduit (GSH) ou oxydé (GSSG) et de malondialdéhyde (MDA) chez les rats du groupe contrôle et du groupe méthyldéficient. Différence significative *** $P < 0,001$ et * $P < 0,05$.

4.2. Marqueurs hépatiques du stress oxydant chez la souris transgénique *cbs*^{-/-}

On observe une baisse non significative de l'activité Glutathion peroxydase chez les *cbs*^{-/-} par rapport au groupe contrôle (670±405 vs. 305±133 µmol/min/g de protéine, P=0,0762, figure 50C). Cependant, la baisse de l'activité SOD (Mn) cytoplasmique est significative, chez les *cbs*^{-/-} par rapport au groupe contrôle (0,42±0,17 vs. 0,76±0,17 U/g de protéine, P=0,0236, figure 50A). On observe également une diminution significative pour la SOD (Cu/zn) mitochondriale chez les souris *cbs*^{-/-} par rapport au groupe contrôle (9,3±5,4 vs. 15,3±4,7 U/g de protéine, P=0,0283, figure 50B).

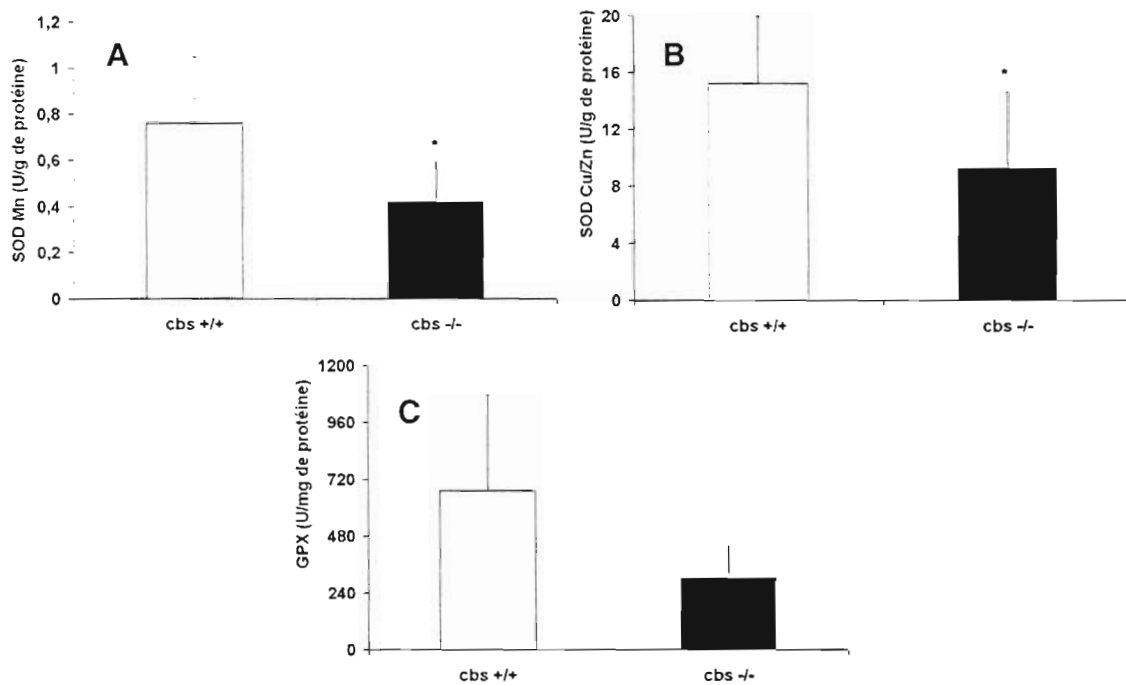


Figure 50 : Activités SOD-Mn cytoplasmique (gauche) et SOD-Cu/Zn mitochondriale (droite) mesurées à partir d'homogénats hépatiques de souris *cbs*^{+/+} et *cbs*^{-/-}. *P<0,05

5. Activité Cytochrome c-N-lysine méthyltransférase et métabolisme de la carnitine

5.1. Activité CLMT

Le niveau de saturation de l'activité Cytochrome c N-lysine méthyltransférase (CLMT) par son substrat, la SAM, est mesuré en maintenant la réaction à 37°C durant 30 min. La courbe brute (Figure 51A) montre qu'il y a une fixation non spécifique de la SAM. En retranchant les valeurs mesurées à la droite théorique parallèle à la pente, et passant par l'origine, on obtient une courbe de saturation de l'enzyme par la SAM. On évalue ainsi une concentration saturante en substrat autour de 300 μM . La figure 51B permet de mesurer expérimentalement le K_M de la CLMT pour la SAM. Il s'agit d'une représentation graphique de l'équation de Lineweaver et Burk ($1/v = 1/[SAM]$). Le K_M de la CLMT pour la SAM est de 29 μM , signifiant une bonne affinité de l'enzyme pour son substrat. L'effet inhibiteur de la SAH sur la CLMT a été ensuite mesuré pour des concentrations fixes et saturantes de SAM (figures 52A et 52B). Pour chaque point de SAH, 2 concentrations d'homogénat protéique ont été utilisées. L'analyse, selon les courbes de Dixon, des constantes d'inhibition (K_i) par la SAH de la CLMT hépatique, montre des valeurs proches entre les homogénats de foie de rats et les foies de souris testés pour l'étude (respectivement 39 μM vs. 34 μM). Ces résultats ne sont pas surprenants si l'on tient compte de la proximité phylogénique de ces 2 espèces.

La figure 53A est une représentation de l'activité CLMT hépatique du rat en fonction du rapport SAM/SAH. Cette représentation permet de visualiser l'effet inhibiteur de la SAH et d'estimer l'activité hépatique *in vivo* de la CLMT. On peut ainsi en déduire une activité proche d'environ 75% du maximum chez les rats contrôles qui ont un ratio SAM/SAH moyen de 3,8 alors que les *methyldeficients* auraient une activité d'environ 40% du maximum pour un ratio de SAM/SAH de 1,2.

Comme le montre la figure 53B, les niveaux d'expression de l'enzyme ne sont pas affectés par cette variation du ratio SAM/SAH car des mesures de l'activité CLMT sur des extraits dialysés (élimination des métabolites) et à saturation de l'enzyme (V_{max}) ne montrent aucune différence entre les deux groupes de rats ($0,08 \pm 0,06$ vs. $0,08 \pm 0,02$ nmol/h/mg de protéine, $P=0,9293$).

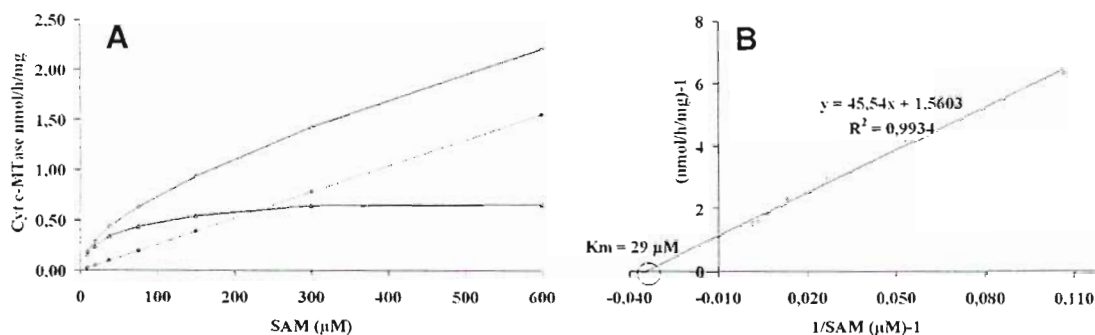


Figure 51 : Saturation de la CLMT par la SAM. (A) vitesse enzymatique en fonction de la concentration en SAM. (B) Représentation de Lineweaver et Burk permettant de calculer le K_M de la CLMT pour la SAM.

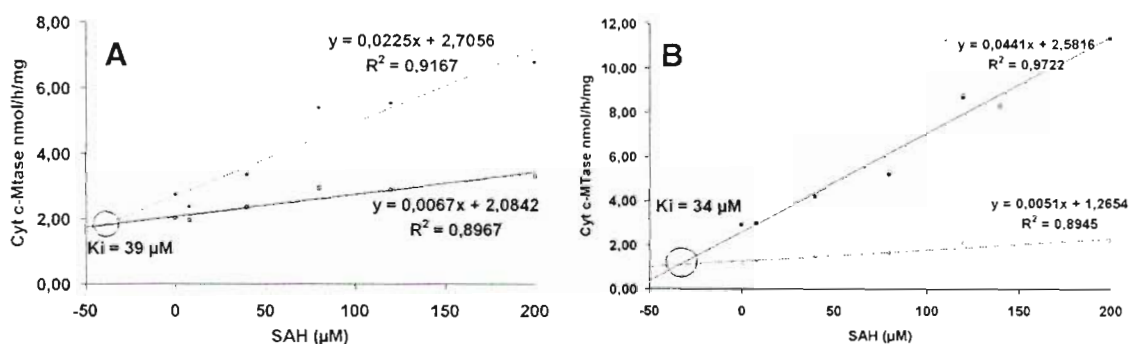


Figure 52 : Représentation de Dixon pour l'activité CLMT hépatique chez le rat (A) et la souris (B). La SAH est utilisée à différentes concentrations (0-200 μM) comme inhibiteur de la réaction. Pour chaque valeur de SAH, 2 concentrations d'homogénats protéiques sont utilisées.

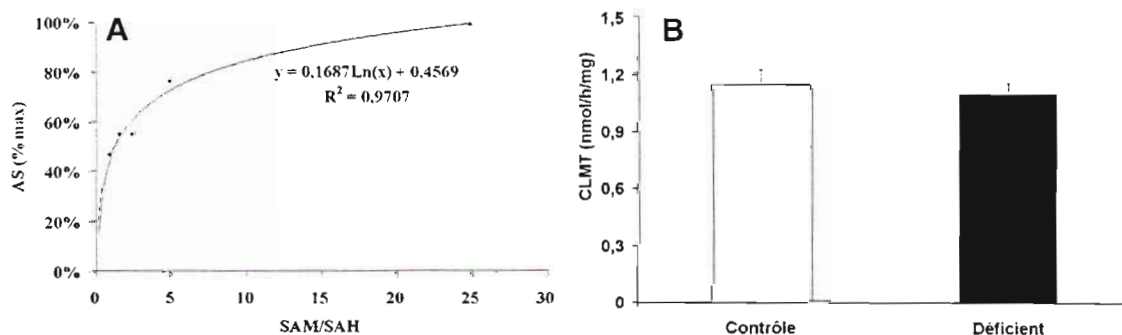


Figure 53 : Courbe de saturation de l'activité CLMT en fonction du rapport SAM/SAH (A). La vitesse est exprimée en pourcentage de l'activité maximale mesurée. La variation du rapport SAM/SAH se fait avec une concentration fixe de SAM (200 μM) et des concentrations variables de SAH (0-200 μM). (B) Mesure de l'activité Cytochrome c Lysine-N méthyltransférase sur des homogénats hépatiques de rats contrôles ou méthyldéficients à des concentrations saturantes de SAM (200 μM). Aucune différence significative n'apparaît entre les 2 groupes d'étude.

5.2. Concentrations en carnitines

Les dosages de carnitine/acylcarnitine ont été réalisés en collaboration avec le CHRU de Lille au laboratoire de Biochimie – Métabolisme dirigé par le Pr. Gilbert Briand, grâce à une analyse par chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (LCMS/MS). Les histogrammes (Figure 54 pour les rats de 21 jours, et figure 55 pour les souris *cbs* *-/-*) représentent les concentrations hépatiques de carnitines libres (C0) ou liées. Le tableau 9 récapitule les concentrations hépatiques obtenues par spectrométrie de masse en tandem, ainsi que le niveau de significativité entre les 2 groupes pour chaque étude.

Tableau 9 : Concentrations hépatiques moyennes (\pm déviation standard) en carnitines libre ou liée exprimées en nmol/g de foie pour l'étude sur les rats ($n=5$ par groupe) et en pmol/g de protéine pour l'étude sur les souris transgéniques ($n=10$ et $n=6$ pour les *cbs* *+/+* et *cbs* *-/-*).

Groupement lié à la carnitine	Contrôle	Méthyldéficient	Niveau de significativité Valeur P
Carnitine libre	0,178 \pm 0,019	0,094 \pm 0,021	0,0002
Acétyl	0,589 \pm 0,088	0,352 \pm 0,122	0,0079
Chaîne courte	0,362 \pm 0,083	0,261 \pm 0,160	0,2476
Chaîne moyenne	0,052 \pm 0,011	0,021 \pm 0,008	0,0010
Chaîne longue	0,395 \pm 0,095	0,143 \pm 0,095	0,0030
Carnitine totale	1,618 \pm 0,139	0,912 \pm 0,385	0,0048

Groupement lié à la carnitine	<i>Cbs</i> <i>+/+</i>	<i>Cbs</i> <i>-/-</i>	Niveau de significativité Valeur P
Carnitine libre	33,6 \pm 10,9	53,2 \pm 30,4	0,0443
Acétyl	108,3 \pm 25,3	169,4 \pm 96,7	0,0360
Chaîne courte	6,7 \pm 2,7	8,7 \pm 4,8	0,2550
Chaîne moyenne	0,7 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3	0,6737
Chaîne longue	1,2 \pm 0,4	1,4 \pm 0,4	0,2413
Carnitine totale	150,6 \pm 33,5	233,6 \pm 127	0,0311

On observe dans le modèle nutritionnel que les animaux *methyldeficients* subissent une baisse significative des concentrations hépatiques en carnitines libres (47%), totales (44%) ou liées (40% pour les acétylcarnitines, 60% pour les acylcarnitines à chaîne moyenne et 64% pour les

acylcarnitines à chaîne longue) par rapport au groupe contrôle. En revanche il n'y a de modification des acylcarnitines à chaîne courte.

L'association entre les dérivés de la carnitine et les déterminants de l'homocystéine a été évaluée en effectuant une analyse univariée (Tableau 10). Cette analyse montre une corrélation positive entre les folates, la SAM, le ratio SAM/SAH et les différentes formes de la carnitine.

Tableau 10 : Association en analyse univariée entre les dérivés de carnitine et les déterminants de la méthionine. Le tableau contient les valeurs de coefficients de corrélation

	Déterminant	Corrélation	Intervalle de confiance 95%	Valeur-P
Carnitines totales	Vitamine B12	-0,159	-0,46 – 0,43	0,9317
	LGRAC	0,183	-0,33 – 0,56	0,5770
	Folate	0,770	0,44 – 0,89	<0,0001
	SAM	0,898	0,38 – 0,88	0,0004
	SAH	-0,029	-0,52 – 0,38	0,7183
	SAM/SAH	0,682	0,25 – 0,84	0,0027
Carnitines libres (C0)	Vitamine B12	-0,291	-0,50 – 0,38	0,7450
	LGRAC	0,178	-0,32 – 0,57	0,5445
	Folate	0,888	0,45 – 0,89	<0,0001
	SAM	0,961	0,36 – 0,88	0,0005
	SAH	-0,019	-0,56 – 0,33	0,5724
	SAM/SAH	0,766	0,30 – 0,86	0,0014
Acétylcarnitines (C2)	Vitamine B12	-0,094	-0,52 – 0,35	0,6574
	LGRAC	0,083	-0,40 – 0,50	0,7906
	Folate	0,771	0,42 – 0,88	0,0001
	SAM	0,922	0,46 – 0,90	<0,0001
	SAH	0,093	-0,44 – 0,47	0,9484
	SAM/SAH	0,570	0,19 – 0,83	0,0062
Acylcarnitines (C3-C5)	Vitamine B12	0,130	-0,544 – -0,702	0,7296
	LGRAC	-0,003	-0,631 – 0,628	0,9942
	Folate	0,447	-0,254 – 0,840	0,2028
	SAM	0,526	-0,155 – 0,868	0,1220
	SAH	-0,158	-0,716 – 0,524	0,6739
	SAM/SAH	0,416	-0,290 – 0,829	0,2413
Acylcarnitines (C6-C8)	Vitamine B12	-0,434	-0,835 – 0,269	0,2188
	LGRAC	0,298	-0,408 – 0,781	0,4165
	Folate	0,771	0,274 – 0,943	0,0068
	SAM	0,688	0,102 – 0,919	0,0257
	SAH	-0,244	-0,757 – 0,455	0,5094
	SAM/SAH	0,802	0,348 – 0,951	0,0035
Acylcarnitines (C10-C18)	Vitamine B12	-0,303	-0,783 – 0,404	0,4082
	LGRAC	0,358	-0,350 – 0,806	0,3211
	Folates	0,725	0,176 – 0,930	0,0150
	SAM	0,851	0,477 – 0,964	0,0009
	SAH	0,001	-0,629 – 0,630	0,9975
	SAM/SAH	0,709	0,143 – 0,925	0,0193

A l'inverse des animaux *methyldeficients*, on observe une augmentation significative (Figure 55) d'environ 50-60% chez les souris *cbs -/-* par rapport aux sauvages pour les concentrations hépatiques en carnitines libres, acétylcarnitines et carnitines totales ($P=0,0443$, $P=0,0360$ et $P=0,0311$ respectivement). Les autres formes d'acylcarnitines (chaînes courtes, moyennes ou longues) ne varient pas d'un groupe à l'autre.

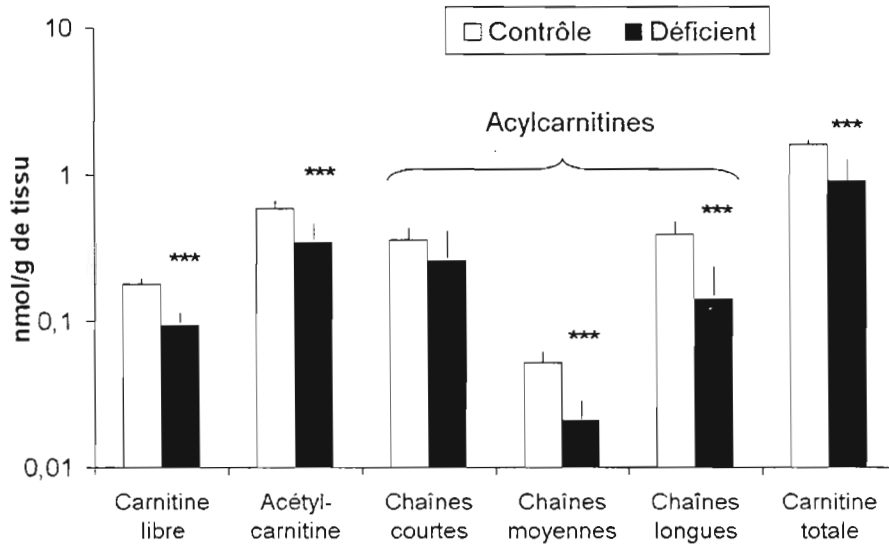


Figure 54 : Concentrations hépatiques en dérivés de carnitine chez des rats contrôlés ou methyldeficients. Les acylcarnitines sont classées en fonction du type de groupement auquel elles sont liées et les valeurs sont calculées en nmol/g de foie. *** $P < 0,001$. $n=5$ dans chaque groupe.

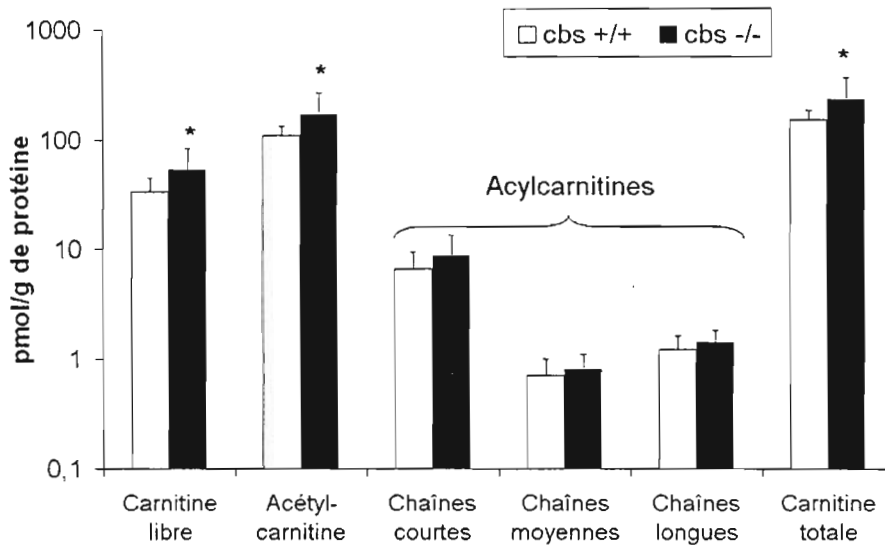


Figure 55 : Concentrations hépatiques en dérivés de carnitine chez des souris transgéniques *cbs +/+* et *cbs -/-*. Les acylcarnitines sont classées en fonction du type de groupement auquel elles sont liées et les valeurs sont calculées en pmol/g de protéine totale. * $P < 0,05$. $n=10$ et $n=6$ respectivement

6. Effets d'un retour à un régime normal pour le raton issu de mère carencé

Après la date de sevrage (21 jours postnatals) un groupe de rats *methyldeficients* a été nourri avec un régime standard jusqu'à 80 jours, en comparaison avec un groupe contrôle issu de mères non carencées. Une série de dosage a été effectuée pour évaluer les effets d'un retour à un régime normal et éventuellement la réversibilité de la stéatose hépatique.

Il n'apparaît plus de différence significative entre les deux groupes de rats *methyldeficients* ou non (tableau 11), que ce soit pour les déterminants nutritionnels de l'homocystéine (vitamine B12 à $31,1 \pm 7,5$ vs. $43,1 \pm 17,7$ pmol/g de foie et folates à $13,6 \pm 2,9$ vs. $10,8 \pm 2,2$ nmol/g de foie, entre contrôles et déficients), au niveau du potentiel de méthylation (SAM à $128,2 \pm 26,0$ vs. $124,0 \pm 19,7$ nmol/g de foie, SAH à $44,3 \pm 10,1$ vs. $40,2 \pm 9,3$ nmol/g de foie et un ratio SAM/SAH de $3,0 \pm 0,9$ vs. $3,1 \pm 0,5$ entre contrôles et déficients) ou dans la biosynthèse de carnitine (carnitine totale à $235,3 \pm 88,9$ vs. $215,9 \pm 92,6$ nmol/g de foie et carnitine libre à $213,5 \pm 68,6$ vs. $179,5 \pm 65,1$ nmol/g de foie entre contrôles et déficients).

Tableau 11 : Concentrations hépatiques des marqueurs du métabolisme de l'homocystéine et des carnitines libres ou acylées chez des rats âgés de 80 jours et ayant reçu une nourriture carencée en substrats méthylés durant les 21 premiers jours de leur vie.

	Contrôle	Déficient	Significativité Valeur-P
Vitamine B12 (pmol/mg foie)	31,1 ± 7,5	43,1 ± 17,7	0,3197
Folate (nmol/mg foie)	13,6 ± 2,9	10,8 ± 2,2	0,1710
SAM (nmol/g foie)	128,2 ± 26,0	124,0 ± 19,7	0,7615
SAH (nmol/g foie)	44,3 ± 10,1	40,2 ± 9,3	0,4831
Ratio SAM/SAH	3,0 ± 0,9	3,1 ± 0,5	0,7548
Carnitine totale (nmol/mg foie)	235,3 ± 88,9	215,9 ± 92,6	0,7815
Carnitine libre (nmol/mg foie)	213,5 ± 68,6	179,5 ± 65,1	0,5080

Les résultats sont exprimés en moyenne ± déviation standard et comparés par un test ANOVA (n=6 par groupe).

DISCUSSION

1) Les modèles chirurgicaux

a) Gastrectomie totale

Le modèle chirurgical de gastrectomie totale a permis de démontrer que le régime déficient en substrats méthylés (*methyldeficient diet*) de Linell et Poirier n'est pas suffisant pour induire ni une carence sévère en vitamine B12, ni une hyperhomocystéinémie. Par contre ces travaux ont montré que la gastrectomie est nécessaire pour provoquer une modification sévère du statut de vitamine B12. Cela se traduit par une diminution de l'activité MTR, enzyme clé du métabolisme des monocarbone. Cette baisse d'activité provoque des phénomènes de trappe métabolique qui empêchent le recyclage du méthyltétrahydrofolate en tétrahydrofolate.

La méthylation globale d'ADN génomique est significativement plus faible chez les rats ayant un niveau de B12 plasmatique inférieur à 200 pM ($p=0,001$), *i.e.* les rats qui ont une faible activité Méthionine synthase. Aucune corrélation n'a été observée chez les rats entre l'activité Méthionine synthase et le niveau plasmatique en folates. Cependant, la méthylation globale d'ADN génomique est significativement plus basse pour les rats ayant une B12 plasmatique inférieure à 200 pM ($p=0,009$). La vitamine B12 apparaît comme le seul déterminant de l'activité Méthionine synthase ($P=0,0017$), tandis que la vitamine B12 et la Méthionine synthase sont les déterminants de l'hypométhylation d'ADN (respectivement $P=0,006$ et $P=0,0006$).

Les conséquences d'une hypométhylation de l'ADN sont difficiles à déterminer. En effet, certains promoteurs géniques sont régulés par des taux de méthylation des îlots CpG et une hypométhylation va vraisemblablement lever la répression de certains gènes. Le facteur de transcription SP1 (*Specific protein 1*) a une affinité pour la séquence consensus GGGGCGGGGC, ou des séquences approchantes, et se fixe sur cette séquence pour activer le promoteur génique cible. Les îlots CpG méthylés empêchent cette fixation et donc diminuent les taux de transcription du gène ainsi régulé. Pour autant, la difficulté réside à savoir quels types de gènes seront activés et quel sera l'impact sur le reste du métabolisme. Ainsi, on peut imaginer que l'expression non contrôlée de facteurs de croissance pourra avoir des effets pro-oncotiques ou à l'inverse des effets pro-apoptotiques. Toutes les hypothèses sont envisageables mais il faudrait faire des études de type *Transcriptome* ou *Proteomic* pour obtenir des informations de ce type.

L'induction de l'expression de la MTR par la vitamine B12 a par ailleurs été observée dans notre laboratoire sur d'autres modèles cellulaires, notamment sur les cellules Caco-2 (adénocarcinome colique). Cette lignée cellulaire a une activité MTR augmentée en présence de vitamine B12 tandis que l'expression des ARNm (mesurés par RT-PCR en temps réel) n'est pas modifiée par le statut en vitamine B12 (Ortiou *et al.*, 2004). Nous avons pu montrer grâce à ce modèle que l'homocystéine induit la transcription du gène *mtr* lorsque les cellules sont traitées avec de la vitamine B12 et dépourvues de méthionine.

b) Thyroïdectomie totale

Les résultats de l'EGRAC montrent que la thyroïdectomie provoque bien une déficience en FAD et FMN, laissant supposer qu'il y a une diminution des activités Flavokinases. Ces cofacteurs sont impliqués dans le cycle de reméthylation de l'homocystéine et interviennent dans l'oxydoréduction du méthylènetétrahydrofolate en méthyltétrahydrofolate par la MTHFR, et dans l'oxydoréduction de la cobalamine (II) en cobalamine (I) par la Méthionine synthase réductase. Bien que l'on ait pu s'attendre à une hyperhomocystéinémie dans le groupe 2 (Thyroïdectomie totale), consécutive à la déficience en cofacteurs flaviniques, nous avons observé une diminution de l'homocystéinémie qui s'expliquerait par l'activation de la voie de transsulfuration. Cependant, le lien entre thyroïde et voie de transsulfuration hépatique n'est pas connu ni étudié et les mécanismes de régulation qui font intervenir les flavines dans cette voie sont encore inconnus. En revanche, la déficience en vitamines B2, B9 et B12 induite par le régime *methyldeficient* se traduit logiquement par une hyperhomocystéinémie modérée. Ce régime ne mime pas les effets d'un hypothyroïdisme, comme le montrent les résultats précédemment décrits, mais il nous a servi pour l'étude des conséquences d'une hyperhomocystéinémie sur le développement du rat nouveau né.

2) Métabolisme de l'homocystéine chez les rats *methyldeficients*

Les résultats obtenus pour le dosage de la **Méthionine synthase** (MTR) hépatique chez les rats *methyldeficients* sont ceux attendus puisqu'une déficience en vitamine B12 entraîne une diminution de l'activité MTR. En effet, les rats nés de mères carencées ont des taux sanguins de vitamine B12 significativement plus faibles de 50% par rapport à ceux du groupe contrôle. De plus, la diminution des taux de SAM hépatiques

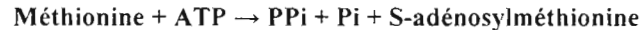
favorise aussi cette inactivation de la MTR en diminuant les processus de recyclage de la cobalamine Cob(I) oxydée en Cob(II). Ces conclusions sont renforcées par les analyses univariées qui montrent une corrélation positive ($r=0,42$) de la vitamine B12 (déterminant indépendant) avec la MTR ($P=0,0179$).

La **BHMT** est une enzyme non ubiquitaire dont l'expression est restreinte au foie chez le rat et la souris. Elle catalyse la transméthylation de la bétaine sur l'homocystéine pour former de la méthionine et libérer de la diméthylglycine. Les résultats obtenus chez les animaux *methyldeficients* laissent supposer que la carence maternelle en choline n'a pas d'effet sur l'expression de la BHMT chez le raton âgé de 21 jours. La carence nutritionnelle en choline est normalement un facteur suffisant pour induire une hyperhomocystéinémie chez les rongeurs, voire une stéatose hépatique. Bien que les dosages de choline et bétaine n'aient pas été effectués, il est possible que ce déficit soit compensé par la voie de synthèse de la choline. En effet, même si la choline est d'origine alimentaire il est possible d'en produire à partir de phosphatidylcholine (PC) grâce à l'action successive de la Phospholipase C (phosphatidylcholine + H₂O → 1,2-diacylglycérol + phosphocholine) et de l'activité inverse de la Choline phosphokinase (phosphocholine + ADP ↔ ATP + choline). La phosphatidylcholine est elle-même le produit des activités combinées de la Phosphatidylsérine synthase (CDP-diacylglycérol + L-sérine → CMP + phosphatidylsérine), de la phosphatidylsérine décarboxylase (phosphatidylsérine → phosphatidyléthanolamine + CO₂) et de la triple méthylation par la Phosphatidyléthanolamine méthyltransférase -PEMT- (phosphatidyléthanolamine + 3 SAM → 3 SAH + phosphatidylcholine). La synthèse *de novo* de la choline est donc réalisable mais elle nécessite énormément d'énergie puisqu'au final cela aura consommé 9 molécules d'ATP (la synthèse de SAM requiert l'hydrolyse de 3 phosphates d'une molécule d'ATP) pour une seule molécule d'ATP produite. Il y a aussi un recyclage important de la choline qui permet de maintenir le pool cellulaire. Si la carence maternelle en choline n'est pas sévère il est probable que cela aura peu d'impact sur le métabolisme de la choline, et donc de la bétaine, chez la progéniture.

La **MTHFR** est une enzyme cytoplasmique composée d'un homotétramère qui catalyse la réduction du méthylènetétrahydrofolate en méthyltétrahydrofolate par l'oxydation du FADH₂ en FAD (dérivé de la vitamine B2). Cette réaction est irréversible *in vivo* mais l'oxydation du méthylTHF en méthylèneTHF peut être réalisé *in vitro* grâce à la réduction de la ménadione bisulfite selon la méthode décrite par Kutzbach et Stokstad (1971). On observe

une baisse significative de l'activité MTHFR chez les rats *methyldeficients* par rapport aux contrôles ($P < 0,01$) alors que les résultats concernant le rapport SAM/SAH montrent une diminution de ce rapport chez les animaux déficients. En effet, Sobti *et al.* (2000) ont montré *in vitro* que l'ajout de SAM provoquait une diminution de l'activité MTHFR tandis que la SAH, dans les mêmes proportions que la SAM, empêchait cette inhibition par la SAM. Or, les animaux *methyldeficients* ont un rapport SAM/SAH proche de 1,8 alors que les normaux ont un rapport de 3,5 laissant supposer qu'un autre facteur perturbe l'activité de la MTHFR. Le test Z de corrélation montre une corrélation positive ($r = 0,49$) entre les concentrations plasmatiques de folates et l'activité MTHFR hépatique ($P = 0,0023$), démontrant ainsi que cette activité est dépendante du statut en folates. Ce statut étant effondré chez les animaux *methyldeficients* la MTHFR subit également une baisse de son activité.

La **Méthionine adénosyltransférase** hépatique est une enzyme cytoplasmique composée de 2 sous-unités α (MAT III) ou de 4 sous-unités α (MAT I) ; contrairement à la forme extra hépatique MAT II ($\alpha_4\beta_2$), ces isoformes ne sont pas rétroinhibées par la SAM. Toutes ces isoformes de MAT catalysent pourtant la même réaction :



La MAT II extrahépatique est rétroinhibée allostériquement par la SAM (son produit), qui augmente le K_M (diminution de l'affinité) de l'enzyme pour la méthionine, ralentissant ainsi la synthèse de SAM. Au niveau hépatique il n'existe pas de régulation allostérique de la MAT I/III par la SAM. Cependant, Garcia-Trevijano et Avila (2000) ont montré sur des lignées primaires d'hépatocytes de rats, qu'un traitement de ces cellules avec de la SAM induisait la synthèse d'ARN messagers du gène *mat1A*. On peut ainsi penser qu'une diminution des taux de SAM chez les rats *methyldeficients* va conduire à une chute de la synthèse et donc de l'activité de la MAT I/III.

Ito et Horikawa (1999) ont montré chez le rat soumis à un processus d'ischémie-reperfusion (respectivement 15 et 120 minutes), que la quantité de glutathion et l'activité de la MAT diminuent à cause de ce phénomène. Un traitement, par voie intra-péritonéale, au buthionine sulfoximine (BSO, inhibiteur de la Glutathion synthétase), induit dans ces conditions et de manière concomitante, une diminution des taux hépatiques de glutathion (~65%) ainsi qu'une diminution de l'activité MAT (~60%). Il apparaît donc que l'induction de la MAT est dépendante de la synthèse de glutathion. Une baisse de la quantité de glutathion, comme cela a été montré chez les rats *methyldeficients*, concourt donc à la baisse de l'activité MAT.

Le rapport **SAM/SAH** considéré comme le potentiel de méthylation diminue chez les rats carencés ($1,2 \pm 1,3$ vs. $3,7 \pm 0,6$, $P=0,0381$). Cette chute du rapport SAM/SAH a une importance considérable au niveau des activités des méthyltransférases SAM dépendantes mais aussi de l'activité de la CBS et de la MTHFR. La SAM est un effecteur allostérique de la CBS (régulateur positif) et cela explique pourquoi l'activité de cette enzyme chute chez les animaux carencés. Une diminution des taux de SAM se traduit par une diminution de l'activité enzymatique de la CBS. La SAM est aussi un effecteur allostérique de la MTHFR (régulateur négatif), mais les résultats obtenus avec les dosages d'activité de cette enzyme montrent au contraire une diminution de l'activité alors qu'en considérant seulement le rapport SAM/SAH on pouvait s'attendre à une augmentation de l'activité.

Au final, le modèle nutritionnel *methyldeficient* montre une chute du rapport SAM/SAH par une diminution de la SAM, mais sans modification des taux de SAH. Cela a pour conséquence une baisse du potentiel de méthylation.

La synthèse de carnitine chez les rats méthyldéficients

La Cytochrome c-N-lysine :SAM méthyltransférase (**CLMT**, EC 2.1.1.43) est une enzyme cytoplasmique qui permet la triple méthylation de l'amine ϵ de certains résidus lysines situés sur le Cytochrome c (Cytc). Le Cytc est décrit comme un acteur important dans les phénomènes d'apoptose et il se situe dans l'espace intermembranaire mitochondrial où il intervient dans la chaîne respiratoire. Durant l'apoptose, le Cytc effectue une translocation dans le cytosol où il se complexe à Apaf-1. Cela provoque l'oligomérisation d'Apaf-1 et a pour conséquence l'activation de la voie des caspases -9 et -3, aboutissant finalement à une cellule apoptotique. Le gène du *cytc* est transcrit au niveau nucléaire, traduit dans le réticulum endoplasmique et l'apo-Cytc est transloqué dans l'espace intermembranaire mitochondrial où il subira une fixation covalente de son hème par une Cytc-hème lyase. Des résidus lysine de l'apo-Cytc sont méthylés co- ou post-traductionnellement, et cette triple méthylation, qui augmente le degré d'hydrophobicité du Cytc, favorise la migration du Cytc vers la membrane mitochondriale (Kluck, 2000). C'est la lysine en position 72, située dans la région peptidique la plus conservée de cette protéine, qui est la cible de la triple méthylation par la CLMT. La lysine 72 est aussi importante dans l'activité pro-apoptotique du Cytc. Kluck et Newmeyer

(2000) ont montré que la triple méthylation de cette lysine inhibait l'activité pro-apoptotique du CytC en maintenant son adsorption à la membrane mitochondriale.

La triple méthylation du CytC est aussi la première étape dans la biosynthèse de la carnitine. Cette étape est suivie de l'hydrolyse par des peptidases cellulaires qui vont libérer la triméthyllysine du CytC et permettre l'amorçage de la biosynthèse de la carnitine. La carnitine (1-3-hydroxy-4-NNN-triméthylaminobutyrate) joue un rôle indispensable dans le métabolisme :

- i- Elle intervient dans le transport des acides gras à longue chaîne du cytosol vers la matrice mitochondriale où a lieu la β -oxydation
- ii- La carnitine est impliquée dans le transfert des produits de la β -oxydation peroxysomale tel que l'acétylcoenzyme-A vers la mitochondrie pour l'oxydation en CO_2 et H_2O dans le cycle de Krebs.
- iii- La carnitine intervient à d'autres niveaux tels que la modulation du ratio acylCoA/coASH, le stockage d'énergie sous forme d'acétylcarnitine et la modulation des effets toxiques de certains groupes acylés faiblement métabolisés et qui sont excrétés sous forme d'ester de carnitine.

La déficience en carnitine est un facteur favorisant l'apparition de stéatose hépatique micro- et macrovésiculaire (Spaniol 2003, Tein 2003). Il a été montré précédemment que le régime *methyldeficient* maternel provoquait chez la progéniture une baisse du potentiel de méthylation SAM/SAH, et plus particulièrement une chute du taux de SAM hépatique. Nous avons mesuré l'activité hépatique de la CLMT pour évaluer l'influence du rapport SAM/SAH sur cette première étape de biosynthèse de la carnitine.

Cet effet du rapport SAM/SAH sur l'activité de la CLMT d'un côté, et la chute de ce ratio au niveau hépatique d'un autre, est compatible chez les rats *methyldeficients* avec une baisse de l'activité CLMT. Cela a pour conséquence une diminution (théorique) des taux de triméthyllysine, première étape de la voie de biosynthèse de la carnitine. L'association entre métabolisme de l'homocystéine et défaut de synthèse de la carnitine chez les rats *methyldeficients* a été confortée par une corrélation positive entre carnitine ou acylcarnitines et les folates, la SAM et le ratio SAM/SAH (Tableau 10).

Les quatre enzymes qui produisent la carnitine à partir de triméthyllysine (TML) sont présentes dans le foie (Vaz, 2002). En revanche, la présence de CLMT n'a pas encore été déterminée malgré la faible capacité du foie à utiliser la TML circulante. La CLMT a été caractérisée chez la bactérie *Neurospora crassa* (Durban, 1978) et la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Polevoda, 2000) mais pas chez les vertébrés. Nous avons pu détecter cette activité dans des homogénats hépatiques de rats et souris et l'affinité qui a été calculée pour l'enzyme était similaire aux autres méthyltransférases SAM dépendantes. L'activité CLMT est influencée par le ratio SAM/SAH hépatique qui s'effondre chez les animaux *methyldeficients*. De plus, l'affinité de la SAH ($K_i = 39 \mu\text{M}$) étant proche de celle de la SAM ($K_M = 29 \mu\text{M}$), on observe une baisse de l'activité CLMT. Ces valeurs de K_M sont proches de celles mesurées par Di Maria et Paik (1979) qui trouvaient dans des extraits de levure une affinité d'environ $40 \mu\text{M}$.

Raubenheimer *et al.* (2006) ont montré qu'un régime déficient en choline pouvait induire une stéatose hépatique mais par une modification de l'expression des protéines du métabolisme des acides gras et de la phosphatidylcholine. Le régime déficient en choline augmente les taux d'ARNm des enzymes impliquées de manière prédominante dans la synthèse des triglycérides, sans pour autant affecter les transcrits des enzymes liées à la synthèse ou à l'oxydation des acides gras libres. Les Acyl(longue chaîne)coA synthétase-1 et -4 (Acsl-1 et -4) sont les isoformes prédominantes dans le foie et ces enzymes favorisent la pénétration des acides gras dans les voies de biosynthèse tandis que l'Acyl(longue chaîne)coA synthétase-5 (Acsl-5) favorise la β -oxydation de ces acides gras. Or, la déficience en choline augmente les ARNm de l'Acsl-1 et -4 mais pas de l'Acsl-5, laissant penser qu'il y a dans ce cas un basculement du métabolisme des acides gras vers le stockage, donc accumulation, plutôt qu'un catabolisme via la β -oxydation. Bien que les rats *methyldeficients* n'aient pas de modification de l'activité BHMT, la carence en choline et/ou bétaïne n'a pas encore été vérifiée dans notre modèle d'étude. Il est possible que les rats carencés soient déficients en choline, auquel cas l'hypothèse de Raubenheimer, pourrait être un autre élément d'explication quant à l'accumulation hépatique des triglycérides.

La stéatose microvésiculaire apparaît comme le résultat d'un défaut de la β -oxydation mitochondriale, qui conduit à l'accumulation d'acides gras sous forme de triglycérides et à la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytosol hépatocytaire

(Natarajan, 2006). L'oxydation des acides gras dans le foie peut être effectuée dans le mitochondries ou les peroxysomes. Cependant, contrairement aux mitochondries, la β -oxydation dans le peroxysome peut générer du peroxyde d'hydrogène, et elle n'est pas couplée à la phosphorylation oxydative. Une modification du métabolisme des acides gras apparaît susceptible d'enclencher un stress oxydant dont la conséquence, à terme, peut être une cellule apoptotique. Il nous est donc apparu important d'estimer l'état redox des cellules hépatiques en mesurant les paramètres les plus couramment impliqués dans la lutte contre les stress oxydant.

3) Niveau du stress oxydant chez les rats *methyldeficients*

Les espèces réactives oxygénées (ROS, *reactive oxygen species*) sont des produits du métabolisme et peuvent causer des dommages conduisant à une mort cellulaire et des lésions tissulaires (Ho, 1998). Chez les mammifères, les cellules sont équipées de mécanismes de défense, enzymatiques ou non, qui minimisent les dégâts cellulaires résultant de l'interaction entre constituants cellulaires et ROS (Figure 56).

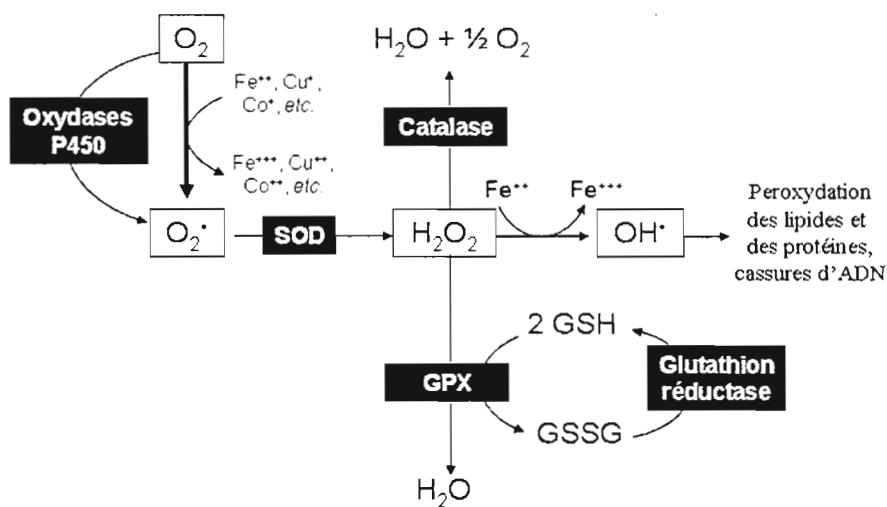


Figure 56: Génération et métabolisme des espèces réactives oxygénées (ROS, *reactive oxygen species*) chez les mammifères.

Les mécanismes enzymatiques comportent les 2 isoformes de la Superoxyde dismutase (SOD Mn et SOD Cu/Zn) et la glutathion peroxydase (GPX) ainsi que des enzymes impliquées dans le recyclage du glutathion oxydé, telles que la Glutathion S-réductase (GSR) et la Glucose-6-phosphate deshydrogénase (une enzyme indispensable de la voie des pentoses-phosphate) qui génère du $NADPH, H^+$. Un déséquilibre de la production des ROS dans certains compartiments cellulaires a été associé au développement de certaines maladies

telles que le syndrome de détresse respiratoire, les lésions d'ischémie-reperfusion, l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives et le cancer (Cf. *glossaire*).

La Superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme catalysant la réduction de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il existe une forme cytoplasmique tétramérique manganèse dépendante ainsi qu'une forme mitochondriale cuivre et zinc dépendante également tétramérique. Les mesures d'activité des différentes SOD n'ont montré aucune différence significative entre les 2 groupes de rats. Malgré la hausse des quantités de MDA (produit de la peroxydation lipidique), et de l'activité Cytochrome oxydase (générateur d'ions superoxydes) chez les rats *methyldeficients*, les hépatocytes ne semblent pas souffrir d'un stress oxydant lié à l'anion superoxyde.

La Glutathion peroxydase (GPX) est une enzyme cytoplasmique qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O par oxydation du GSH en GSSG (glutathion oxydé). Une baisse de l'activité GPX d'environ 41% chez les rats *methyldeficients* par rapport au groupe contrôle peut signifier une diminution de la capacité de répondre aux groupements peroxydés tels que les lipides ou les radicaux libres oxygénés (ROS). Cette baisse d'activité est probablement en lien avec l'augmentation de l'homocystéine qui est elle-même la conséquence d'un ralentissement de la voie de transsulfuration. Les résultats de l'activité GPX obtenus ici sont différents de ceux de Chanson et Brachet (2005) qui montraient sur des foies de rats Wistar mâles adultes hyperhomocystéinémiques ($\sim 22 \mu M$), soumis à un régime dépourvu de folates (4 semaines), que l'activité GPX augmentait d'environ 40% par rapport au groupe contrôle. Cela serait attribué à l'augmentation de la quantité de protéines mesurée par *Western blot* ($\sim 42\%$). En revanche, Huang et Yang (2001) ont montré sur le même type de modèle nutritionnel, que des rats soumis à un régime carencé en folate (de 0 à 8 mg d'acide folique/Kg de nourriture durant 4 semaines), subissait une hausse équivalente de l'homocystéinémie ($\sim 26 \mu M$) tandis que l'activité hépatique de la GPX chutait chez ces animaux. Dans ce modèle-ci, la baisse de l'activité GPX n'est pas causée par une déplétion en glutathion total ou réduit car la déficience en folate ne diminue pas le pool intracellulaire du glutathion. Nishio et Watanabe (1997) ont observé sur des cellules vasculaires de muscle lisse une diminution de l'activité GPX en fonction de doses croissantes d'homocystéine (0-500 μM). Partant de ce résultat, ils ont mesuré l'effet inhibiteur de l'homocystéine (0-500 μM) sur une GPX bovine purifiée. Plus la période de préincubation entre l'enzyme et l'homocystéine est longue (0-6 h), plus l'activité enzymatique est diminuée,

et selon la même logique, plus la concentration en homocystéine est forte, plus l'activité diminue. L'homocystéine a donc un effet dépresseur sur la GPX mais des tests avec un autre thiol comme la cystéine, la N-acétylcystéine ou le dithiotréitol sont nécessaires pour vérifier qu'il s'agit bien d'un effet régulateur spécifique de la protéine et non d'un effet chimique lié notamment au groupement sulfhydrile de l'homocystéine. Néanmoins, Upchurch et Loscalzo (1997) ont montré sur des cultures de cellules aortiques endothéliales de bovin (BAEC), qu'un traitement avec des doses croissantes d'homocystéine (50-250 μM) pouvait conduire à une diminution de 41 à 81% de l'activité GPX dans ces cellules et qu'une dose encore supérieure, mais non physiologique, d'homocystéine (1 mM) aboutissait à une réduction de 91% de l'activité. Enfin, Handy et Locazlo (2005) ont montré par *Western blot* qu'un traitement avec l'homocystéine (100 μM) ou un mélange « hyperhomocystéinémiant » (HAT/met – aminoptérine (inhibiteur de la DHF réductase) 0,8 μM , hypoxanthine 200 μM , thymidine 32 μM et méthionine 1 mM), sur des lignées cellulaires (BAET et COS-7), réduisait l'expression de la GPX de ~20% pour l'homocystéine et de ~50% pour le traitement HAT/met. Cependant, ces deux conditions n'altèrent pas le taux d'expression des ARN messagers de la GPX. Il apparaît donc que la régulation de la GPX par l'homocystéine se fait à un niveau posttranscriptionnel par un mécanisme qui n'a pas encore été élucidé. En outre, la baisse de l'activité GPX, chez les rats *methyldeficients*, va réduire le catabolisme des groupements peroxydés, et peut, par conséquent, favoriser l'accumulation de MDA et d'autres produits nés de cette peroxydation. La SOD ne serait plus alors suffisante pour lutter contre le stress oxydant.

Le glutathion (GSH) est un produit du métabolisme de la cystéine. La voie de transsulfuration de l'homocystéine amorcée de manière irréversible par la CBS aboutit à la synthèse de cystéine, acide aminé essentiel limitant dans la synthèse peptidique. C'est aussi un acide aminé limitant dans la synthèse de glutathion. Les facteurs stimulant l'absorption de cystéine (Insuline, facteurs de croissance) induisent la production de GSH hépatique. La cystéine provenant de la voie de transsulfuration permet à la méthionine de palier les carences en cystéine en se comportant comme un précurseur dans la synthèse de γ -Glu-Cys par la Gamma-glutamylcystéine synthétase (Wu, 2004). La voie de transsulfuration de l'homocystéine est indispensable pour maintenir les réserves de glutathion réduit (GSH) qui est un antioxydant majeur au niveau hépatique. Il y a une baisse de l'activité CBS chez les rats *methyldeficients*, une des causes de l'hyperhomocystéinémie modérée. Le ralentissement de la voie de transsulfuration de l'homocystéine en cystéine se répercute sur la

biosynthèse du glutathion. Cette baisse dans la synthèse de glutathion s'accompagne d'une diminution de l'activité Glutathion réductase, indispensable au recyclage du glutathion oxydé en glutathion réduit.

La peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés qui sont exposés aux radicaux libres oxygénés (ROS) conduit à un rancissement de la nourriture (altération des saveurs et de la texture des corps gras). Au niveau des cellules animales, les membranes peroxydées perdent leur perméabilité, deviennent rigides et non fonctionnelles. La peroxydation lipidique peut produire l'anion superoxyde, les hydroperoxydes (HO_2^\bullet) et les epoxylipides. De plus, de nombreux aldéhydes toxiques (Figure 57) sont formés durant cette peroxydation lipidique et particulièrement le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE). Le MDA est produit essentiellement à partir d'acide arachidonique (20:4) et il est largement utilisé comme marqueur des peroxydations lipidiques membranaires.

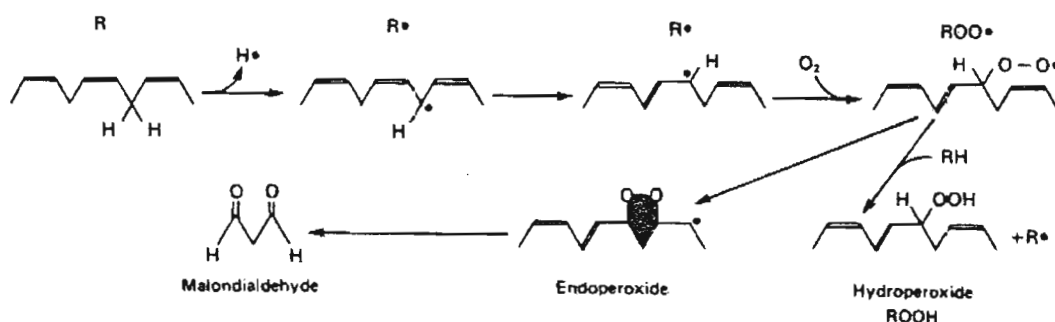


Figure 57: Production de MDA à partir de l'acide arachidonique. L'arrachage d'un électron provoque une réaction en chaîne conduisant à la peroxydation lipidique et à la production de malondialdéhyde.

Le 4-HNE (Figure 58) est aussi issu des acides gras 20:4 et il est reconnu comme étant un produit de dégradation plus toxique encore que le MDA car il est plus réactif avec les autres composants cellulaires.

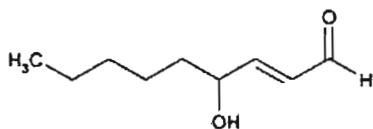


Figure 58 : Structure du 4-hydroxynonanal (4-HNE) qui le rend réactif par sa fonction aldéhyde et amphiphile grâce à sa tête polaire et sa queue hydrophobe. Cela en fait une molécule liposoluble et particulièrement réactive. Le 4-HNE est éliminé par couplage au glutathion grâce à la Glutathion-S-transférase qui intervient dans les phases de détoxication.

La peroxydation apparaît aussi comme la conséquence de l'hyperhomocystéinémie puisque les travaux de Halsted *et al.* (2002) sur le cobaye montrent qu'une déficience en folate qui n'engendre pas d'hyperhomocystéinémie (mais provoque une hypométhylation de l'ADN par une diminution des taux de SAM et une diminution du ratio SAM/SAH) n'a pas d'effet sur la production de MDA. Ces animaux carencés n'ont pas non plus de modification des marqueurs du stress oxydant comme le glutathion, et ne présentent pas de dysfonctionnement lipidique car les analyses histologiques montrent des cellules normales. La méthode que nous avons utilisée ne permet de quantifier que le MDA, et non le 4-HNE. On estime cependant que le 4-HNE représente 10% des MDA mesurés. Grâce à une gamme de concentrations d'un standard, le 1,1,3,3-tetraméthoxypropane (TMOP), nous avons pu mesurer l'impact de l'accumulation des lipides dans les hépatocytes. Le groupe *methyldeficient* présente une augmentation significative ($P=0,0037$) des taux de MDA hépatocytaires par rapport au groupe contrôle issu de mères non carencées.

Les animaux *methyldeficients* nés de mères carencées semblent donc développer un stress oxydant marqué par l'augmentation de MDA, accompagnée d'une baisse de l'activité GPX et des concentrations hépatiques en GSH.

4) Métabolisme de l'homocystéine chez les souris transgéniques *cbs* $-/-$

L'activité Méthionine synthase (MTR) chez les souris *cbs* $-/-$ montrent des résultats paradoxaux (figure 46). La rupture de la voie de transsulfuration devrait être compensée par l'activation de la voie de reméthylation mais on observe ici une diminution de l'activité d'environ 80% chez les souris déficientes ($P=0,0011$). Ces résultats concordent pourtant avec ceux obtenus sur les cellules Caco-2 (figure 45). Les souris *cbs* $-/-$ se trouvent dans une situation Met/Hcy/B12 (activité MTR faible) alors que les souris contrôles *cbs* $+/+$ sont dans une situation Met/B12 (activité MTR plus élevée). Les résultats obtenus sur les cellules Caco-2 sont donc en accord avec les observations faites sur l'activité hépatique de la MTR chez les souris *cbs* $-/-$. La présence cumulée de méthionine et de l'homocystéine chez les souris *cbs* $-/-$ se traduit donc par une baisse de l'activité MTR par rapport à celle des souris *cbs* $+/+$.

Un autre élément d'explication à ces résultats est la possibilité que l'hyperhomocystéinémie sévère observée chez les souris *cbs* $-/-$ va perturber l'équilibre Hcy/SAH et favoriser ainsi la synthèse de SAH par la SAH hydrolase. Ces souris ayant des

taux très élevées de SAH, près de 10 fois supérieurs aux *cbs* +/+ (Choumenkovitch 2002), il est probable que cet inhibiteur compétitif de la SAM limite le recyclage de la cobalamine dans son cycle de réactivation par la Méthionine synthase réductase, réduisant les taux de cobalamine active et diminuant ainsi l'activité de la MTR.

Les souris *cbs* -/- présentent également une forte baisse de l'activité BHMT alors qu'elles sont supplémentées en choline pour permettre leur croissance. Il semble donc que l'oxydation de la choline en bétaïne ne soit pas une priorité au niveau hépatique et qu'au contraire ce soit la voie de biosynthèse des dérivés de la choline (acétylcholine, phosphatidylcholine) qui soit favorisée. L'accumulation de lipides hépatiques est plus importante chez les souris *cbs* -/- que chez les rats *methyldeficients* et le recrutement des PC pour la synthèse des globules lipides apparaît alors prépondérante chez ces souris par rapport à l'oxydation en bétaïne. Schwahn et Rozen (2004) ont montré sur des souris *cbs* +/-, nourries avec un régime riche en bétaïne, qu'il existait une corrélation négative entre l'homocystéinémie et les taux hépatiques de bétaïne. Il existerait également une autre corrélation négative entre la bétaïne hépatique et l'activité de la BHMT. L'hyperhomocystéinémie engendre la consommation de bétaïne par la BHMT et donc plus la BHMT sera active, moins il y aura de bétaïne disponible. Pourtant, dans ce groupe de souris supplémentées en bétaïne, les souris *cbs* +/- présentent une activité BHMT plus faible que les souris *cbs* +/+. Ces résultats sont similaires à ceux que nous observons entre les souris *cbs* +/+ et *cbs* -/- supplémentées en choline. Cette baisse d'activité serait donc indépendante du statut en choline ou bétaïne.

Une série de travaux que nous avons menés sur des biopsies de patients souffrant de cirrhose hépatique ou d'hépatocarcinome (Cf. *glossaire*) ont montré qu'il y avait une baisse de l'activité BHMT dans les zones altérées par ces maladies (Figure 59).

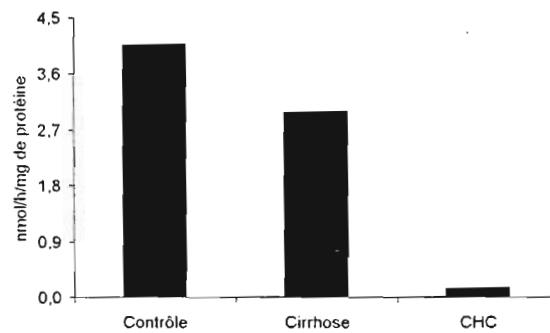
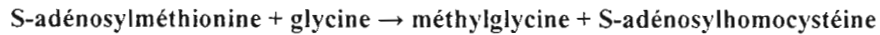


Figure 59 : Dosage de l'activité BHMT sur des homogénats hépatiques de patient souffrant de cirrhose ou d'hépatocarcinome (CHC). Il y a une baisse d'environ 25% chez le patient cirrhotique et de 99% chez le patient à hépatocarcinome par rapport au contrôle.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Avila et Mato (2000) sur des patients souffrant également de ces pathologies. Il était observé une baisse globale dans la biosynthèse des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine, notamment la CBS, la MTR, la GNMT (Glycine-N méthyltransférase) et la BHMT. Les taux d'expression de la MTR et de la BHMT sont réduits, voire indétectables, chez la majorité des patients cirrhotiques. Cela suggère qu'un défaut dans la voie de reméthylation de l'homocystéine pourrait contribuer au développement d'hépatocarcinome chez les patients cirrhotiques. Les souris *cbs*^{-/-} subiraient ainsi les effets de la progression de la fibrose en cirrhose par une baisse de l'activité BHMT, et ce malgré la supplémentation en choline. Il faudrait pour répondre à cette interrogation faire une étude parallèle entre la progression de la fibrose chez les souris *cbs*^{-/-} et l'activité BHMT.

Un défaut dans l'activité de la MTHFR aboutit généralement à une hyperhomocystéinémie, montrant qu'il existe une corrélation négative entre ces 2 éléments (Chen et Rozen, 2001). L'interruption de la voie de transsulfuration devrait orienter le métabolisme de l'homocystéine vers la reméthylation en méthionine, par la MTR ou la BHMT, pour compenser l'accumulation d'homocystéine. Or, la réaction inverse de la SAH hydrolase étant vraisemblablement activée, favorisant la synthèse de SAH, il y a également une augmentation des taux de SAH intracellulaires qui vont rétroinhiber les méthyltransférases et provoquer l'accumulation de SAM. L'augmentation de la SAH va aussi perturber la régulation allostérique de la MTHFR par la SAM et conduire à une activité MTHFR renforcée. Les résultats obtenus pour la MTR et la BHMT montrent à l'inverse un ralentissement de la reméthylation de l'homocystéine. Cet antagonisme dans le métabolisme

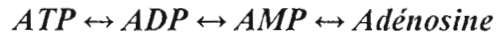
de l'homocystéine peut conduire à une trappe métabolique dans le cycle des folates et provoquer l'accumulation de méthyltétrahydrofolate, substrat de la MTR et inhibiteur de la Glycine-N méthyltransférase (GNMT). La GNMT (EC 2.1.1.20) joue un rôle important dans la régulation du rapport SAM/SAH en modulant les taux de SAM par la réaction suivante :



Bien que la méthylglycine (sarcosine) n'ait pas de rôle physiologique, elle intervient dans la régulation de la balance SAM/SAH. Une augmentation du méthylTHF est le signe d'une activation de la MTHFR et la conséquence d'une diminution des taux de SAM. Le méthylTHF va ralentir l'activité de la GNMT et empêcher la transméthylation de la SAM sur la glycine. Cela permet une accumulation la SAM et une meilleure disponibilité pour les autres méthyltransférases SAM dépendantes.

Le dosage de la MAT hépatique n'a pu être effectué chez les souris *cbs* ^{-/-}, par manque de matériel biologique. Il apparaît pourtant intéressant de mesurer l'activité de cette enzyme car on observe une augmentation des taux de SAM, malgré la baisse des activités de reméthylation. De plus, aucune donnée bibliographique liant les souris transgéniques *cbs* ^{-/-} à l'activité de la MAT n'a été trouvée. L'augmentation de SAH chez les *cbs* ^{-/-} va conduire à l'accumulation de SAM, inhibiteur de l'activité MAT II au niveau extra-hépatique. Au niveau hépatique, la SAM peut induire une diminution de la synthèse des MAT I et III. Bien que cela n'ait pu être vérifié, il est probable que les souris *cbs* ^{-/-} présentent une activité MAT diminuée.

Un défaut de la voie de transsulfuration modifie l'équilibre enzymatique de la SAH hydrolase en le déplaçant en faveur de la synthèse de SAH, permettant ainsi de recycler l'homocystéine en excès. Cependant, cette réaction consommera de manière excessive des molécules d'adénosine destinées à d'autres voies métaboliques (synthèse d'ATP, neurotransmission). Les souris *cbs* ^{-/-} ont des concentrations hépatiques en SAM et SAH qui augmentent selon les mêmes proportions par rapport au groupe contrôle. Ces résultats sont concordants avec les observations faites par Boison et Mohler (2002) qui trouvaient chez des souris déficientes en Adénosine kinase (ADK) une augmentation des taux de SAM et SAH d'environ 2,5 fois par rapport aux souris contrôles. Les nucléotides adénylés peuvent être interconvertis les uns avec les autres, y compris avec l'adénosine et selon l'équilibre suivant :



Dans cette séquence, la déphosphorylation de l'AMP en adénosine et phosphate par la 5'-Nucléotidase et le recyclage de l'adénosine en AMP par l'Adénosine kinase, par la consommation d'ATP, apparaît comme un cycle futile, conduisant à une perte d'énergie. Il est acquis que ce cycle futile est actif dans les mitochondries (Bontemps, 1993), avec une estimation de 20 nmol/min/g de foie. Le rôle physiologique de ce cycle futile serait de rendre les cellules aptes à inhiber leur activité ADK pour réagir rapidement aux conditions de stress (*e.g.* hypoxie) avec un relargage d'adénosine, qui est une molécule importante dans la survie cellulaire. La disruption de l'ADK perturbe donc ce cycle futile, conduisant à l'accumulation d'adénosine (Figure 60).

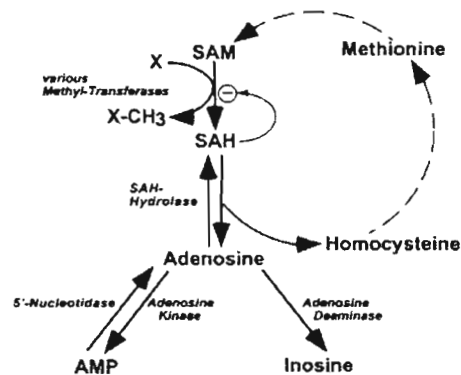
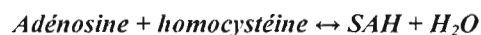


Figure 60 : Voie métabolique de l'adénosine en lien avec le cycle de reméthylation de l'homocystéine. Une disruption de l'ADK conduit à l'accumulation d'adénosine qui perturbe l'équilibre Hcy/SAH, conduisant à l'accumulation de SAH. L'accumulation de SAH agit comme un inhibiteur des méthyltransférases et empêche la consommation de SAM (d'après Boison, 2002).

L'inhibition des méthyltransférases est considérée comme l'une des causes de foie gras, et le foie représente 85% des réactions de transméthylation (Finkelstein, 1986). Chez les souris *adk* *-/-*, l'augmentation des taux de SAH indique qu'il y a un déséquilibre dans la réaction réversible catalysée par la SAH hydrolase :



L'accumulation d'adénosine chez les *adk* *-/-* décale l'équilibre vers la droite, favorisant ainsi la synthèse de SAH, qui est un inhibiteur compétitif de la SAM pour les méthyltransférases SAM dépendantes. Cependant, le rapport SAM/SAH ne varie pas non plus chez ces souris,

indiquant que l'inhibition de l'activité des méthyltransférases par leur produit (la SAH) va conduire à une accumulation de leur substrat (la SAM).

Dans une autre étude portant sur les souris *cbs* *-/-*, Choumenkovitch et Choi (2002) montrent aussi une augmentation de SAM chez les souris déficientes ($35,6 \pm 5,9$ vs. $19,1 \pm 6,1$, $P=0,001$) dans le même ordre de grandeur que notre protocole (~2 fois). En revanche, les taux de SAH sont décuplés en comparaison de nos résultats, puisqu'ils mesurent une concentration 9 fois supérieure chez les déficients par rapport aux normaux, alors que nous mesurons une augmentation de 2 fois chez nos souris *cbs* *-/-* par rapport aux contrôles. Cette forte augmentation de la SAH dans ce groupe de travail se traduit par une chute significative du rapport SAM /SAH (~80%, $P=0,001$) expliquant mieux les phénomènes de rétroinhibition des méthyltransférases par la SAH. Les différences entre nos 2 groupes de travail peuvent aussi être liées aux différences dans le mode d'élevage des animaux. Nos souris sont nourries avec un régime normal enrichi en choline alors qu'il n'y a aucune mention faite à ce sujet dans leur étude. Etant donné le rôle majeur que joue la bêtaïne (produit de l'oxydation de la choline par la Choline oxydase) dans le métabolisme de l'homocystéine au niveau du foie, il est possible que les différences obtenues entre nos 2 groupes soient liées à cette variante nutritionnelle. Le modèle CBS transgénique est donc victime d'une augmentation plus ou moins forte de la SAH par la catalyse de la SAH hydrolase qui va favoriser la synthèse de SAH et non sa dégradation.

5) Niveau du stress oxydant chez les souris transgéniques *cbs* *-/-*

Les mécanismes supposés par lesquels l'hyperhomocystéinémie induit des lésions du foie chez les souris *cbs* *-/-* sont l'activation des facteurs proinflammatoires et profibrogéniques. L'analyse histologique de ces souris nourries avec un régime enrichi en choline montre des lésions hépatiques avec une inflammation périlobulaire et une fibrose (Cf. *glossaire*) dans les 8 premières semaines de vie postnatale tandis que la stéatose apparaît plus tardivement. Les analyses, chez les rats *methyldéficients*, montrent au contraire une stéatose microvésiculaire qui apparaît précocement avec une absence de lésions inflammatoires ou de fibrose.

Le stress du réticulum endoplasmique est une des caractéristiques des individus souffrant d'un stade sévère de stéatose où le tissu tend à former une fibrose. Cela a été montré chez les souris *cbs* *-/-* (Robert, 2005) au niveau histologique mais aussi au niveau biochimique. En effet, ces souris surexpriment la protéine Timp-1 (*Tissue inhibitor of*

metalloproteinase-1) qui empêche la dégradation de collagène et favorise ainsi l'accumulation de collagène de type I autour des hépatocytes. Cette fibrose peut ensuite dégénérer en cirrhose dans les cas les plus graves. Le stress du RE par l'homocystéine, en forte concentration chez les *cbs* *-/-*, se traduit par l'activation de la biosynthèse des triglycérides, qui tendent à s'accumuler dans le cytoplasme.

Un stress oxydant induit par la peroxydation lipidique et l'oxydation de protéines, dans le foie des souris *cbs* *-/-* nourries avec de la choline, a été mis en évidence en mesurant les taux de MDA et 4-HNE, deux produits nés de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés, et la carbonylation de protéines (Robert, 2005).

Nos dosages montrent qu'il y a une baisse non significative ($P=0,0762$) de l'activité Glutathion peroxydase chez les souris transgéniques *cbs* *-/-* malgré l'hyperhomocystéinémie sévère. Ces résultats sont surprenants car Nishio et Watanabe (1997) ont démontré que l'accumulation d'homocystéine réduit l'activité GPX. Cependant, étant donné le niveau de significativité, des études complémentaires pourraient confirmer ces résultats. Vitvitsky et Banerjee (2004) ont montré chez les souris *cbs* *-/-*, que la rupture de la voie de transsulfuration entraîne une baisse de la concentration en GSH par rapport aux *cbs* *+/+* (~40%), mais sans affecter le ratio GSH/GSSG. Cette diminution du GSH s'explique par une chute des taux de cystéine hépatiques chez les *cbs* *-/-*, selon le même ordre de grandeur (~40%). Cela confirme bien l'idée que la cystéine est un acide aminé limitant dans la synthèse du GSH, et que la méthionine est un précurseur de cet acide aminé.

Les souris *cbs* *-/-* ont aussi une diminution significative des activités SOD, mitochondriale et cytoplasmique, en accord avec les observations de Robert *et al.* (2005) concernant l'apparition du stress oxydant chez ces animaux. La baisse de l'activité SOD, par rapport aux souris contrôles, indique que les souris *cbs* *-/-* diminuent leur capacité à répondre correctement à ce stress oxydant. Cela a pour conséquence une augmentation de la peroxydation lipidique et de la carbonylation des protéines. Ce stress oxydant contraste pourtant avec un niveau d'expression normal des SOD Cu/zn observé par des analyses en *Western-blot*.

6) Conclusions

La déficience en folate dans le contexte d'une grossesse est relativement fréquente dans certains pays de l'Afrique subsaharienne qui ont aussi une forte prévalence de malnutrition énergétique et protéique (Amouzou, 2004). Une forte prévalence en carence nutritionnelle en vitamine B12 a aussi été décrite en Amérique latine (Allen 2004). De plus, une augmentation naturelle des niveaux d'homocystéine a été observée chez les mères durant le dernier trimestre d'une grossesse normale (Chery, 2002). En regroupant ces études avec notre modèle nutritionnel de rats carencés, il est apparu important d'étudier l'association potentielle entre les besoins nutritionnels en précurseurs méthylés, stéatose hépatique et carnitine chez les nouveaux nés qui ont une déficience en folates et vitamine B12.

Quel que soit le modèle, nutritionnel ou transgénique, le potentiel de méthylation est perturbé, et cela a pour conséquence une rétroinhibition des méthyltransférases par la SAH. Choumenkovitch et Choi (2002) ont montré que cette modification du rapport SAM/SAH apparaît prépondérante au niveau du foie car elle perturbe le statut de méthylation de l'ADN génomique en provoquant une hypométhylation globale. Par contre, bien que le rapport SAM/SAH diminue aussi dans d'autres organes des souris *cbs* *-/-* (~85% dans le rein et ~99% dans le cerveau), le statut de méthylation d'ADN n'est pas affecté dans ces organes. Cela laisse supposer que le rapport SAM/SAH n'est pas le seul arbitre dans les phénomènes de méthylation SAM dépendante. En fait il semblerait que les concentrations intrinsèques de SAM et SAH intracellulaires soient aussi déterminantes pour l'activité des méthyltransférases. En effet, les observations faites par Choumenkovitch et Choi (2002) révèlent aussi que malgré une diminution (favorable à la SAH) du rapport SAM/SAH dans le cerveau et le rein, ce sont les concentrations en SAM et SAH qui déterminent le statut de méthylation de l'ADN. Les taux de SAH restent inférieurs de ~75% dans le rein et de ~80% dans le cerveau par rapport au foie des souris *cbs* *-/-*. Une concentration trop faible en SAH n'inhibera pas l'activité des méthyltransférases quel que soit le rapport SAM/SAH. A l'inverse, une diminution des taux de SAM ne pourra assurer une activité méthyltransférase suffisante, quelle que soit la concentration de la SAH.

Des travaux menés par Caudill et James (2001) sur des souris *cbs* *+/-* soumises à un régime méthyldeficient (sans folate, méthionine ni choline) ont montré des résultats similaires à ceux obtenus par Choumenkovitch et Choi (2002) malgré des homocystéinémies

plus faibles chez les souris *cbs +/- methyldeficientes* par rapport aux *cbs -/-* (respectivement $24,2 \pm 7,2$ vs. 271 ± 63 μM). Les souris *cbs +/- methyldeficientes* ont une hypométhylation globale de l'ADN au niveau du foie avec une corrélation positive ($P < 0,01$) entre SAH et hypométhylation mais pas entre SAM et hypométhylation. Cela confirme l'idée que la SAH joue un rôle régulateur sur l'activité des méthyltransférases telles que les ADN méthyltransférases.

Le défaut de synthèse de la carnitine n'a jamais été étudié en tant que mécanisme associé à la stéatose hépatique dans les modèles génétiques et nutritionnels d'animaux ayant des perturbations du métabolisme de l'homocystéine. La synthèse de carnitine est une étape clé dans l'oxydation et le stockage des acides gras hépatiques et le foie est le site primaire dans la biosynthèse de carnitine chez le rat tandis qu'il est aussi le seul tissu présentant l'activité Triméthyllysine hydroxylase (Bohmer, 1974). Dans notre modèle de rats carencés, nous observons une chute critique des carnitines totales (~45%) et des acylcarnitines (~45%) chez les *methyldeficients* par rapport aux contrôles.

Les anomalies de synthèse et de stockage des lipides dans le foie ont été étudiées dans des modèles de souris transgéniques ayant une altération du métabolisme des monocarbones ainsi que sur des lignées cellulaires d'hépatocarcinome (Werstuck, 2001). Chez les souris hétérozygotes *cbs +/-* nourries avec un régime hyperhomocystéinémiant, le stress du réticulum endoplasmique induit par l'homocystéine pourrait induire un dérégulation de la biosynthèse des lipides en activant les SREBPs (*Sterol regulatory element binding proteins*), une famille de facteurs de transcription résidant dans le RE et qui sont responsables de l'induction de gènes de la biosynthèse de cholestérol/triglycérides et responsables aussi des processus d'absorption, conduisant à une augmentation des niveaux de cholestérol et de triglycérides hépatiques (Werstuck, 2001). Au contraire, dans le foie des rats nouveau-nés nés de rates soumises à un régime carencé, il a été observé une augmentation des concentrations de triglycérides et des lipides totaux, mais pas de cholestérol. Cela suggère que les effets sur le métabolisme hépatique du régime *methyldeficient* pourraient, du moins en partie, différer de ceux observés dans les modèles de souris transgéniques.

Dans notre étude, nous avons observé aussi un stress oxydant, avec une augmentation de MDA, chez les animaux carencés, associée à une diminution des concentrations hépatiques en GSH et GSSG (glutathion oxydé) ainsi que des activités GPX et

Glutathion S-réductase. Cette chute de GSH a été associée à une baisse de l'activité CBS, donc une baisse de la voie de transsulfuration, qui peut être la conséquence de la diminution de l'activation allostérique de l'enzyme à cause de la déficience en SAM. Cependant, il n'y a pas de variation des activités SOD Cu/Zn et SOD Mn, indiquant que le foie maintient sa capacité à métaboliser les radicaux libres. L'absence de fibrose ou de lésion hépatique irréversible a été confirmée par un retour à un foie normal lorsque l'on soumet des rats carencés à un régime normal à partir de 21 jours et jusqu'à 80 jours. Chez les rats *methyldeficients* une augmentation du nombre de mitochondries a été observée, en accord avec l'augmentation de l'activité Cytochrome oxydase chez ces animaux.

En conclusion, nous avons mis en évidence, chez les rats *methyldeficients*, une association entre déficit en groupements monocarbonés et la biosynthèse de carnitine. L'association met en avant un lien entre le métabolisme de l'homocystéine et la carnitine, qui peut potentiellement être impliquée dans la pathogenèse des stéatoses hépatiques néonatales, dans un contexte de déficience en folate et/ou vitamine B12 au cours de la grossesse.

Dans notre modèle, comme dans la plupart des cas, la stéatose est accompagnée d'un stress oxydant. Le foie se trouve alors dans un contexte inflammatoire, avec apparition des marqueurs tels que le *Tumor necrosis factor α* (TNF α) ou l'*Interleukine 6* (IL-6). On sait que l'expression du TNF α est réprimée par l'augmentation de la SAM (Veal *et al.* 2004), et que le TNF α permet l'induction, par une coupure protéolytique, de l'activité CBS. On sait aussi que la SAM est un activateur allostérique de la CBS. Autrement dit, une diminution du ratio SAM/SAH peut potentiellement augmenter la quantité de TNF α , conduisant le foie à un état inflammatoire. Des analyses complémentaires dans ce domaine sont donc nécessaires pour établir un lien mécanistique entre le métabolisme de l'homocystéine les facteurs pro-inflammatoires.

Pour mieux comprendre ce mécanisme d'induction de la stéatose, il faudrait compléter notre étude en mesurant l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras, comme cela a été décrit par Raubenheimer *et al.* (2006). Pour confirmer notre hypothèse selon laquelle le régime *methyldeficients* induit la stéatose via la voie de synthèse de la carnitine, Il faudra mesurer les concentrations en triméthyllysine, issue de la méthylation

du Cytochrome c. Il faudra, dans la même optique, confirmer l'existence de la CLMT dans le foie des mammifères, notamment par des techniques de purification de protéine.

Il sera aussi intéressant de comparer le retour à un régime normal à un régime *methyldeficient* pourvu en L-carnitine, afin d'évaluer la capacité de la carnitine à restaurer l'intégrité du foie. Pour évaluer les effets à long terme de cette malnutrition, il faudra également maintenir la carence jusqu'à la maturation des organes génitaux. Nous devons aussi vérifier s'il y a ou non, une carence avérée en choline et bétaïne, chez les rates gestantes, et éventuellement chez les ratons nés de ces rates.

Le modèle nutritionnel de carence en vitamine B2, B9, B12 et choline, développé dans notre laboratoire, a permis également l'étude du développement neurologique chez le rat de 21 jours (Blaise *et al.* 2006). Il a été montré, au niveau cérébral, que la carence induit une chute des folates tissulaires, mais pas de la vitamine B12, avec une augmentation de l'homocystéine. La mesure des activités enzymatiques a révélé, comme dans le foie, une diminution de la Méthionine synthase, mais sans variation de la CBS. A l'inverse du foie, les niveaux de SAM ne sont pas modifiés, mais ce sont les taux de SAH qui augmentent, entraînant une diminution du rapport SAM/SAH. L'augmentation de l'homocystéine induit également un stress oxydant, caractérisé, à la différence du foie, par une baisse des activités SOD. Au contraire du foie, nous avons pu mettre en évidence l'activation de protéines proapoptotiques telle que p53, ainsi qu'une fragmentation nucléaire de l'ADN, caractéristique des cellules apoptotiques. Les effets de la carence sur le métabolisme de l'homocystéine, sont différents entre les 2 organes, mais ne sont pas irréversibles si on restaure un régime normal après le sevrage. A l'inverse de la stéatose hépatique, processus pathologique réversible, les lésions cérébrales causées par cette déficience entraînent un retard neurocomportemental irréversible. Les études complémentaires en cours, sur l'estomac, l'intestin, le cœur et les organes génitaux permettront de faire un bilan sur le développement du rat issu de mère carencée en vitamines du groupe B.

CONCLUSION GENERALE

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* grâce au modèle chirurgical de gastrectomie totale. Nous avons pu montrer, chez le rat déficient en substrats méthylés (*methyldeficient*), qu'il existait un mécanisme de régulation posttranscriptionnelle de la Méthionine synthase par son cofacteur la vitamine B12 tandis qu'une autre étude sur des cellules d'adénocarcinome colique humain (Caco-2) montrait une régulation transcriptionnelle de la Méthionine synthase par l'homocystéine. Nous avons aussi montré que contrairement à ce qui était observé chez l'homme, le modèle chirurgical de thyroïdectomie totale entraînait chez le rat une diminution de l'homocystéinémie. Cette baisse des taux plasmatiques de l'homocystéine a été attribuée à l'activation de la voie de transsulfuration, voie catalytique irréversible de l'homocystéine.

Nous avons observé chez la rate soumise à un régime *methyldeficient* que la gestation et l'allaitement potentialisaient l'hyperhomocystéinémie. Nous avons aussi confirmé au cours de ce travail que la carence maternelle en groupements méthyles se répercute chez la progéniture. Les dosages plasmatiques et tissulaires des déterminants génétiques et nutritionnels de l'homocystéine ont révélé des troubles du métabolisme des monocarbones chez les ratons âgés de 21 jours. Nos résultats ont permis de mettre à jour le lien mécanistique entre défaut de reméthylation de l'homocystéine, défaut synthèse de carnitine et apparition de stéatose hépatique. Nous avons pu observer également l'existence d'un stress oxydant qui, à 21 jours, ne semble pas induire de fibrose ou de cirrhose comme cela a pu être observé chez les souris transgéniques *cbs*^{-/-}. Le retour à un régime standard pour les animaux *methyldeficients* (à partir de 21 jours et jusqu'à 80 jours) leur permet normaliser les taux sériques de vitamine B12, de folates et d'homocystéine. Cela se traduit par une disparition de la stéatose montrant ainsi la réversibilité du processus dans notre modèle nutritionnel.

Notre modèle s'est avéré intéressant pour étudier l'impact du régime *methyldeficient* maternel sur l'anatomie et le métabolisme hépatique chez la progéniture. Aujourd'hui, d'autres éléments de l'organisme de ces animaux fait l'objet d'études dans notre laboratoire, notamment au niveau du cerveau, du cœur, des intestins, et des organes génitaux.

Enfin, des questions demeurent au niveau des processus du développement. En effet, outre le retard morphologique observé chez les rats *methyldeficients*, nous avons pu observer dans certains cas des malformations squelettiques telles que des queues tordues ou raccourcies

qui ne sont pas sans rappeler les malformations observées chez des sujets ayant un défaut de fermeture du tube neural. Outre l'étude du métabolisme hépatique des monocarbones, ce modèle permettrait également de détecter différents facteurs de risque nutritionnels conduisant à un *spina bifida*. Il permettrait également de valider l'hypothèse selon laquelle il existe un lien entre hypométhylation de l'ADN et déséquilibre dans l'expression des différents récepteurs à l'acide rétinoïque, un facteur de risque bien connu dans l'apparition du *spina bifida*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Allen LH.** Folate and vitamin B12 status in the Americas. *Nutr Rev* 2004;62:S29-33.
2. **Amouzou EK,** Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Gueant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Gueant JL. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C-->T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr* 2004;79:619-24.
3. **Anello G,** Gueant-Rodriguez RM, Bosco P, Gueant JL, Romano A, Namour B, Spada R, Caraci F, Pourie G, Daval JL, Ferri R. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2004 Apr 9;15(5):859-61.
4. **Araki A,** Sako Y, Ito H. Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. *Atherosclerosis*. 1993 Nov;103(2):149-57.
5. **Austin RC,** Sood SK, Dorward AM, Singh G, Shaughnessy SG, Pamidi S, Outinen PA, Weitz JI. Homocysteine-dependent alterations in mitochondrial gene expression, function and structure. Homocysteine and H₂O₂ act synergistically to enhance mitochondrial damage. *J Biol Chem*. 1998 Nov 13;273(46):30808-17.
6. **Avila MA,** Berasain C, Torres L, Martin-Duce A, Corrales FJ, Yang H, Prieto J, Lu SC, Caballeria J, Rodes J, Mato JM. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2000 Dec;33(6):907-14.
7. **Avila MA,** Garcia-Trevijano ER, Martinez-Chantar ML, Latasa MU, Perez-Mato I, Martinez-Cruz LA, del Pino MM, Corrales FJ, Mato JM. S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function. *Alcohol*. 2002 Jul;27(3):163-7. Review.
8. **Ayav A,** Alberto JM, Barbe F, Brunaud L, Gerard P, Merten M, Gueant JL. Defective remethylation of homocysteine is related to decreased synthesis of coenzymes B2 in thyroidectomized rats. *Amino Acids*. 2005 Feb;28(1):37-43.
9. **Bandarian V,** Patridge KA, Lennon BW, Huddler DP, Matthews RG, Ludwig ML. Domain alternation switches B(12)-dependent methionine synthase to the activation conformation. *Nat Struct Biol*. 2002 Jan;9(1):53-6.
10. **Bailey LB,** Gregory JF 3rd. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr*. 1999 May;129(5):919-22. Review.
11. **Bao L,** Vlcek C, Paces V, Kraus JP. Identification and tissue distribution of human cystathionine beta-synthase mRNA isoforms. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Feb 1;350(1):95-103.
12. **Barbé F,** Klein M, Chango A, Fremont S, Gerard P, Weryha G, Gueant JL, Nicolas JP. Homocysteine, folate, vitamin B12, and transcobalamins in patients undergoing successive hypo- and hyperthyroid states. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Apr;86(4):1845-6.
13. **Baumbach GL,** Sigmund CD, Bottiglieri T, Lentz SR. Structure of cerebral arterioles in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ Res*. 2002 Nov 15;91(10):931-7.
14. **Beauchamp MC,** Renier G. Homocysteine induces protein kinase C activation and stimulates c-Fos and lipoprotein lipase expression in macrophages. *Diabetes*. 2002 Apr;51(4):1180-7.
15. **Blaise S,** Alberto JM, Nedelec E, Ayav A, Pourie G, Bronowicki JP, Gueant JL, Daval JL. Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr Res*. 2005 Jun;57(6):777-82.
16. **Blaise S,** Nédélec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourie C, Guéant JL, Daval JD. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-induced brain apoptosis and alters neurobehavioural development in rats. *Am J Pathol*, 2006 (accepted)
17. **Blandini F,** Fancelli R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G. Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clin Chem*. 2001 Jun;47(6):1102-4.
18. **Bohmer T.** Conversion of butyrobaine to carnitine in the rat *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 1974;343:551-557.
19. **Boison D,** Scheurer L, Zumsteg V, Rulicke T, Litynski P, Fowler B, Brandner S, Mohler H. Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):6985-90.
20. **Bontemps F,** Mimouni M, Van den Berghe G. Phosphorylation of adenosine in anoxic hepatocytes by an exchange reaction catalysed by adenosine kinase. *Biochem J*. 1993 Mar 15;290 (Pt 3):679-84.
21. **Bosco P,** Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Gueant JL. Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A*. 2003 Sep 1;121(3):219-24.
22. **Bosco P,** Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Spada R, Romano A, Fajardo A, Caraci F, Ferri R, Gueant JL. Association of homocysteine (but not of MTHFR 677 C>T, MTR 2756 A>G, MTRR 66 A>G and TCN2 776 C>G) with ischaemic cerebrovascular disease in Sicily. *Thromb Haemost*. 2006 Aug;96(2):154-9.
23. **Bose N,** Momany C. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of recombinant human betaine-homocysteine S-methyltransferase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2001 Mar;57(Pt 3):431-3.
24. **Bostom AG,** Shemin D, Gohh RY, Verhoef P, Nadeau MR, Bianchi LA, Hopkins-Garcia BJ, Jacques PF, Selhub J, Dworkin L, Rosenberg IH. Lower fasting total plasma homocysteine levels in stable renal transplant recipients versus maintenance dialysis patients. *Transplant Proc*. 1998 Feb;30(1):160-2.
25. **Brattstrom L,** Zhang Y, Hurtig M, Refsum H, Ostensson S, Fransson L, Jones K, Landgren F, Brudin L, Ueland PM. A common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation and longevity. *Atherosclerosis*. 1998 Dec;141(2):315-9.
26. **Bremer J.** The role of carnitine in intracellular metabolism. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1990 May;28(5):297-301. Review.

27. **Briand G**, Fontaine M, Schubert R. Direct analysis by electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of standard and urinary acylcarnitines. Comparison with fast atom bombardment and gas chromatography chemical ionization mass spectrometry data. *J Mass Spectrom* 1995;30:1731-1741.
28. **Brunaud L**, Alberto JM, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L, Braun M, Bronowicki JP, Bresler L, Gueant JL. Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats. *Digestion*. 2003;68(2-3):133-40.
29. **Budy B**, O'Neill R, DiBello PM, Sengupta S, Jacobsen DW. Homocysteine transport by human aortic endothelial cells: identification and properties of import systems. *Arch Biochem Biophys*. 2006 Feb 15;446(2):119-30.
30. **Bukovska G**, Kery V, Kraus JP. Expression of human cystathionine beta-synthase in *Escherichia coli*: purification and characterization. *Protein Expr Purif*. 1994 Oct;5(5):442-8.
31. **Caudill MA**, Wang JC, Melnyk S, Pogribny IP, Jernigan S, Collins MD, Santos-Guzman J, Swendseid ME, Cogger EA, James SJ. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. *J Nutr*. 2001 Nov;131(11):2811-8.
32. **Chanarin I**, Deacon R, Lumb M, Perry J. Cobalamin-folate interrelations. *Blood Rev*. 1989 Dec;3(4):211-5. Review.
33. **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 Feb;9(2):259-63.
34. **Chanson A**, Sayd T, Rock E, Chambon C, Sante-Lhoutellier V, Potier de Courcy G, Brachet P. Proteomic analysis reveals changes in the liver protein pattern of rats exposed to dietary folate deficiency. *J Nutr*. 2005 Nov;135(11):2524-9.
35. **Chen HP**, Marsh EN. How enzymes control the reactivity of adenosylcobalamin: effect on coenzyme binding and catalysis of mutations in the conserved histidine-aspartate pair of glutamate mutase. *Biochemistry*. 1997 Jun 24;36(25):7884-9.
36. **Chen LH**, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem*. 1997 Feb 7;272(6):3628-34.
37. **Chen Z**, Chakraborty S, Banerjee R. Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *J Biol Chem*. 1995 Aug 18;270(33):19246-9.
38. **Chen Z**, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet*. 2001 Mar 1;10(5):433-43.
39. **Chery C**, Barbe F, Lequere C, Abdelmoutaleb I, Gerard P, Barbarino P, Boutroy JL, Gueant JL. Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 2002;40(11):1105-1108.
40. **Choi HK**, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet*. 2002 Apr 6;359(9313):1173-7.
41. **Choumenkovitch SF**, Selhub J, Bagley PJ, Maeda N, Nadeau MR, Smith DE, Choi SW. In the cystathionine beta-synthase knockout mouse, elevations in total plasma homocysteine increase tissue S-adenosylhomocysteine, but responses of S-adenosylmethionine and DNA methylation are tissue specific. *J Nutr*. 2002 Aug;132(8):2157-60.
42. **Christensen EI**, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, Gilfix BM, Rosenblatt DS, Gravel RA, Forbes P, Rozen R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet*. 1999 May 21;84(2):151-7.
43. **Consoli A**, Nurjhan N, Reilly JJ Jr, Bier DM, Gerich JE. Mechanism of increased gluconeogenesis in noninsulin-dependent diabetes mellitus. Role of alterations in systemic, hepatic, and muscle lactate and alanine metabolism. *J Clin Invest*. 1990 Dec;86(6):2038-45.
44. **Craig SA**. Betaine in human nutrition. *Am J Clin Nutr*. 2004 Sep;80(3):539-49. Review.
45. **Cross CE**, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*. 1987 Oct;107(4):526-45. Review.
46. **Daval JL**, Pourie G, Grojean S, Lievre V, Strazielle C, Blaise S, Vert P. Neonatal hypoxia triggers transient apoptosis followed by neurogenesis in the rat CA1 hippocampus. *Pediatr Res*. 2004 Apr;55(4):561-7.
47. **Dawson PA**, Cochran DA, Emmerson BT, Kraus JP, Dudman NP, Gordon RB. Variable hyperhomocysteinemia phenotype in heterozygotes for the Gly307Ser mutation in cystathionine beta-synthase. *Aust N Z J Med*. 1996 Apr;26(2):180-5.
48. **De Bree A**, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. *Am J Clin Nutr*. 2001 Jun;73(6):1027-33.
49. **DeFronzo RA**. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: a complex metabolic web. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20 Suppl 11:S1-16. Review.
50. **Dicker-Brown A**, Fonseca VA, Fink LM, Kern PA. The effect of glucose and insulin on the activity of methylene tetrahydrofolate reductase and cystathionine-beta-synthase: studies in hepatocytes. *Atherosclerosis*. 2001 Oct;158(2):297-301.
51. **Di Maria**, Polastro E, DeLange RJ, Kim S, Paik WK. Studies on cytochrome c methylation in yeast. *J Biol Chem*. 1979 Jun 10;254(11):4645-52. Methyltransferase *J Biol Chem* 1978
52. **Dobson CM**, Wai T, Leclerc D, Kadir H, Narang M, Lerner-Ellis JP, Hudson TJ, Rosenblatt DS, Gravel RA. Identification of the gene responsible for the cblB complementation group of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Hum Mol Genet*. 2002 Dec 15;11(26):3361-9.
53. **Dudman NP**, Guo XW, Gordon RB, Dawson PA, Wilcken DE. Human homocysteine catabolism: three major pathways and their relevance to development of arterial occlusive disease. *J Nutr*. 1996 Apr;126(4 Suppl):1295S-300S.

54. **Durban E.** Nochumson S, Kim S, Paik WK, Chan SK. Cytochrom c specific protein-lysine Methyltransferase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*1978; 253:1427-1435.
55. **Duan W,** Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2002 Jan;80(1):101-10.
56. **Ferre N,** Gomez F, Camps J, Simo JM, Murphy MM, Fernandez-Ballart J, Joven J. Plasma homocysteine concentrations in patients with liver cirrhosis. *Clin Chem.* 2002 Jan;48(1):183-5.
57. **Fernandez LL,** Scheibe RM. Is MTHFR polymorphism a risk factor for Alzheimer's disease like APOE? *Arq Neuropsiquiatr.* 2005 Mar;63(1):1-6.
58. **Finkelstein JD,** Kyle W, Harris BJ. Methionine metabolism in mammals. Regulation of homocysteine methyltransferases in rat tissue. *Arch Biochem Biophys.* 1971 Sep;146(1):84-92.
59. **Finkelstein JD,** Martin JJ. Inactivation of betaine-homocysteine methyltransferase by adenosylmethionine and adenosylthionine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Jan 13;118(1):14-9.
60. **Finkelstein JD,** Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem.* 1986 Feb 5;261(4):1582-7.
61. **Finkelstein JD.** Methionine metabolism in liver diseases. *Am J Clin Nutr.* 2003 May;77(5):1094-5.
62. **Folbergrova J,** Haugvicova R, Mares P. Behavioral and metabolic changes in immature rats during seizures induced by homocysteic acid: the protective effect of NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Exp Neurol.* 2000 Jan;161(1):336-45.
63. **Folch J,** Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957 May;226(1):497-509.
64. **Fonseca VA,** Mudaliar S, Schmidt B, Fink LM, Kern PA, Henry RR. Plasma homocysteine concentrations are regulated by acute hyperinsulinemia in nondiabetic but not type 2 diabetic subjects. *Metabolism.* 1998 Jun;47(6):686-9.
65. **Fonseca VA,** Risk factors for coronary heart disease in diabetes. *Ann Intern Med.* 2000 Jul 18;133(2):154-6.
66. **Fonseca VA,** Fink LM, Kern PA. Insulin sensitivity and plasma homocysteine concentrations in non-diabetic obese and normal weight subjects. *Atherosclerosis.* 2003 Mar;167(1):105-9
67. **Friedman S,** Fraenkel G. Reversible enzymatic acetylation of carnitine. *Arch Biochem Biophys.* 1955 Dec;59(2):491-501.
68. **Fritz LB,** The effect of muscle extracts on the oxidation of palmitic acid by liver slices and homogenates. *Acta Physiol Scand.* 1955 Oct 12;34(4):367-85.
69. **Frosst P,** Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995 May;10(1):111-3.
70. **Galivan J,** Ryan TJ, Chave K, Rhee M, Yao R, Yin D. Glutaryl hydrolase. pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacol Ther.* 2000 Mar;85(3):207-15. Review.
71. **Garrow TA.** Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem.* 1996 Sep 13;271(37):22831-8.
72. **Gaustadnes M,** Rudiger N, Rasmussen K, Ingerslev J. Familial thrombophilia associated with homozygosity for the cystathionine beta-synthase 833T->C mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 May;20(5):1392-5.
73. **Gigliozzi A,** Romeo R, Fraioli F, Cantafora A, Delle Monache M, Cardilli A, Attili AF, Scafato E, Carli L, Alvaro D. Effect of S-adenosyl-L-methionine and dilinoleoylphosphatidylcholine on liver lipid composition and ethanol hepatotoxicity in isolated perfused rat liver. *Dig Dis Sci.* 1998 Oct;43(10):2211-22.
74. **Griffith OW.** Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med.* 1999 Nov;27(9-10):922-35. Review.
75. **Gueant-Rodriguez RM,** Rendeli C, Namour B, Venuti L, Romano A, Anello G, Bosco P, Debarb R, Gerard P, Viola M, Salvaggio E, Gueant JL. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. *Neurosci Lett.* 2003 Jul 3;344(3):189-92.
76. **Gueant-Rodriguez RM,** Juilliere Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B, Van Obberghen E, Gueant JL. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost.* 2005 Sep;94(3):510-5.
77. **Guerra-Shinohara EM,** Paiva AA, Rondo PH, Yamasaki K, Terzi CA, D'Almeida V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. *BJOG.* 2002 Jul;109(7):784-91.
78. **Gulati S,** Baker P, Li YN, Fowler B, Kruger W, Brody LC, Banerjee R. Defects in human methionine synthase in cblG patients. *Hum Mol Genet.* 1996 Dec;5(12):1859-65.
79. **Gulati S,** Brody LC, Banerjee R. Posttranscriptional regulation of mammalian methionine synthase by B12. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jun 7;259(2):436-42.
80. **Gulsen M,** Yesilova Z, Bagci S, Uygun A, Ozcan A, Ercin CN, Erdil A, Sanisoglu SY, Cakir E, Ates Y, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K. Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Sep;20(9):1448-55.
81. **Hall CA.** Function of vitamin B12 in the central nervous system as revealed by congenital defects. *Am J Hematol.* 1990 Jun;34(2):121-7. Review.
82. **Halsted CH,** Villanueva JA, Devlin AM, Niemela O, Parkkila S, Garrow TA, Wallock LM, Shigenaga MK, Melnyk S, James SJ. Folate deficiency disturbs hepatic methionine metabolism and promotes liver injury in the ethanol-fed micropig. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 23;99(15):10072-7.

83. **Harmon DL**, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JW, Young IS, Peng K, Shane B, Evans AE, Whitehead AS. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol*. 1999 Nov;17(4):298-309.
84. **Hasegawa T**, Ukai W, Jo DG, Xu X, Mattson MP, Nakagawa M, Araki W, Saito T, Yamada T. Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of neurotoxic Abeta42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2005 Jun 15;80(6):869-76.
85. **Heider I**, Lehmensiek V, Lenk T, Muller T, Storch A. Dopaminergic neurotoxicity of homocysteine and its derivatives in primary mesencephalic cultures. *J Neural Transm Suppl*. 2004;(68):1-13.
86. **Herbert V**. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin B-12 in humans. *Am J Clin Nutr*. 1987 Apr;45(4):671-8.
87. **Herbert V**. Vitamin B-12: plant sources, requirements, and assay. *Am J Clin Nutr*. 1988 Sep;48(3 Suppl):852-8. Review.
88. **Ho PI**, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem*. 2001 Jul;78(2):249-53.
89. **Ho YS**, Magnenat JL, Gargano M, Cao J. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ Health Perspect*. 1998 Oct;106 Suppl 5:1219-28. Review.
90. **Hobbs CA**, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet*. 2000 Sep;67(3):623-30.
91. **Hoffman DR**, Haning JA, Cornatzer WE. Effects of a methyl-deficient diet on rat liver phosphatidylcholine biosynthesis. *Can J Biochem*. 1981 Jul;59(7):543-50.
92. **House JD**, Brosnan ME, Brosnan JT. Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney. *Biochem J*. 1997 Nov 15;328 (Pt 1):287-92.
93. **House JD**, Brosnan ME, Brosnan JT. Renal uptake and excretion of homocysteine in rats with acute hyperhomocysteinemia. *Kidney Int*. 1998 Nov;54(5):1601-7.
94. **Huang RF**, Hsu YC, Lin HL, Yang FL. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr*. 2001 Jan;131(1):33-8.
95. **Hultberg B**. Modulation of extracellular homocysteine concentration in human cell lines. *Clin Chim Acta*. 2003 Apr;330(1-2):151-9.
96. **Hustad S**, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem*. 2000 Aug;46(8 Pt 1):1065-71.
97. **Ishak KG**. Pathologic features of chronic hepatitis. A review and update. *Am J Clin Pathol*. 2000 Jan;113(1):40-55. Review.
98. **Ito K**, Miwa N, Hagiwara K, Yano T, Shimizu-Saito K, Goseki N, Iwai T, Horikawa S. Regulation of methionine adenosyltransferase activity by the glutathione level in rat liver during ischemia-reperfusion. *Surg Today*. 1999;29(10):1053-8.
99. **Jacobs RL**, Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT. Plasma homocysteine is decreased in the hypothyroid rat. *Can J Physiol Pharmacol*. 2000 Jul;78(7):565-70.
100. **Jacobs RL**, Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT. Hyperglucagonemia in rats results in decreased plasma homocysteine and increased flux through the transsulfuration pathway in liver. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):43740-7.
101. **Jacques PF**, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr*. 2001 Mar;73(3):613-21.
102. **Jakubowski H**. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Feb;61(4):470-87. Review.
103. **James SJ**, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr*. 1999 Oct;70(4):495-501.
104. **Ji C**, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol*. 2004 Jun 15;10(12):1699-708. Review.
105. **Kenyon SH**, Nicolaou A, Ast T, Gibbons WA. Stimulation in vitro of vitamin B12-dependent methionine synthase by polyamines. *Biochem J*. 1996 Jun 1;316 (Pt 2):661-5.
106. **Kirsch R**, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, Kirsch RE, Hall Pde L. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003 Nov;18(11):1272-82.
107. **Kluck RM**, Ellerby LM, Ellerby HM, Naiem S, Yaffe MP, Margoliash E, Bredesen D, Mauk AG, Sherman F, Newmeyer DD. Determinants of cytochrome c pro-apoptotic activity. The role of lysine 72 trimethylation. *J Biol Chem*. 2000 May 26;275(21):16127-33.
108. **Korotkova N**, Lidstrom ME. MeaB is a component of the methylmalonyl-CoA mutase complex required for protection of the enzyme from inactivation. *J Biol Chem*. 2004 Apr 2;279(14):13652-8.
109. **Kraus JP**. Cystathionine beta-synthase (human). *Methods Enzymol*. 1987;143:388-94.
110. **Kraus JP**, Oliveriusova J, Sokolova J, Kraus E, Vlcek C, de Franchis R, Maclean KN, Bao L, Bukovsk, Patterson D, Paces V, Ansorge W, Kozich V. The human cystathionine beta-synthase (CBS) gene: complete sequence, alternative splicing, and polymorphisms. *Genomics*. 1998 Sep 15;52(3):312-24.
111. **Kutzbach C**, Stokstad EL. Mammalian Methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 1971;250:459-477.

112. **Kruman II.** Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002 Mar 1;22(5):1752-62.
113. **Leal NA,** Olteanu H, Banerjee R, Bobik TA. Human ATP:Cob(1)alamin adenosyltransferase and its interaction with methionine synthase reductase. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):47536-42.
114. **Li E,** Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 1992 Jun 12;69(6):915-26.
115. **Li L,** Bhatia M, Moore PK. Hydrogen sulphide : a novel mediator of inflammation? *Curr Opin Pharmacol.* 2006 Apr;6(2):125-9. Review.
116. **Li YN,** Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet.* 1996 Dec;5(12):1851-8.
117. **Lima CP,** Davis SR, Mackey AD, Scheer JB, Williamson J, Gregory JF 3rd. Vitamin B-6 deficiency suppresses the hepatic transsulfuration pathway but increases glutathione concentration in rats fed AIN-76A or AIN-93G diets. *J Nutr.* 2006 Aug;136(8):2141-7.
118. **Linnell JC,** Wilson MJ, Mikol YB, Poirier LA. Tissue distribution of methylcobalamin in rats fed amino acid-defined, methyl-deficient diets. *J Nutr.* 1983 Jan;113(1):124-30.
119. **Liu J,** Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Anal Biochem.* 1997 Feb 15;245(2):161-6.
120. **Liu XX,** Wilson K, Charlton CG. Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa. *Life Sci.* 2000;66(23):2277-88.
121. **Look MP,** Riezler R, Reichel C, Brensing KA, Rockstroh JK, Stabler SP, Spengler U, Berthold HK, Sauerbruch T. Is the increase in serum cystathionine levels in patients with liver cirrhosis a consequence of impaired homocysteine transsulfuration at the level of gamma-cystathionase? *Scand J Gastroenterol.* 2000 Aug;35(8):866-72.
122. **Lovblad K,** Ramelli G, Remonda L, Nirikko AC, Ozdoba C, Schroth G. Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. *Pediatr Radiol.* 1997 Feb;27(2):155-8.
123. **Lowry OH,** Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 Nov;193(1):265-275.
124. **Lu SC,** Alvarez L, Huang ZZ, Chen L, An W, Corrales FJ, Avila MA, Kanel G, Mato JM. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 May 8;98(10):5560-5.
125. **Lyman RL,** Giotas C, Medwadowski B, Miljanich P. Effect of low methionine, choline deficient diets upon major unsaturated phosphatidyl choline fractions of rat liver and plasma. *Lipids.* 1975 Mar;10(3):157-67.
126. **McKinley MC,** McNulty H, McPartlin J, Strain JJ, Scott JM. Effect of riboflavin supplementation on plasma homocysteine in elderly people with low riboflavin status. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Sep;56(9):850-6.
127. **Mann NJ,** Li D, Sinclair AJ, Dudman NP, Guo XW, Elsworth GR, Wilson AK, Kelly FD. The effect of diet on plasma homocysteine concentrations in healthy male subjects. *Eur J Clin Nutr.* 1999 Nov;53(11):895-9.
128. **Mar MH,** Ridky TW, Garner SC, Zeisel SH. A method for the determination of betaine in tissues using high performance liquid chromatography. *J Nutr Biochem.* 1995 Jul;6(7):392-398.
129. **Mato JM,** Corrales FJ, Lu SC, Avila MA. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB J.* 2002 Jan;16(1):15-26. Review.
130. **Mattson MP,** Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 2003 Mar;26(3):137-46. Review.
131. **Miles EW,** Kraus JP. Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *J Biol Chem.* 2004 Jul 16;279(29):29871-4. Review.
132. **Miller JW,** Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosyl-methionine's coordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem J* (1994) 298, 415-419.
133. **Mitsui K,** Teraoka H, Tsukada K. Complete purification and immunochemical analysis of S-adenosylmethionine synthetase from bovine brain. *J Biol Chem.* 1988 Aug 15;263(23):11211-6.
134. **Moat SJ,** Ashfield-Watt PA, Powers HJ, Newcombe RG, McDowell IF. Effect of riboflavin status on the homocysteine-lowering effect of folate in relation to the MTHFR (C677T) genotype. *Clinical Chemistry* 2003;49(2):295-302.
135. **Moore S,** Spackman DH, Stein WH. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Fed Proc.* 1958 Dec;17(4):1107-15.
136. **Mudd SH,** Poole JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism.* 1975 Jun;24(6):721-35.
137. **Mudd SH,** Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattstrom L, Wilcken B, Wilcken DE, Blom HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH. Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jul;20(7):1704-6. Review.
138. **Muller T,** Renger K, Kuhn W. Levodopa-associated increase of homocysteine levels and sural axonal neurodegeneration. *Arch Neurol.* 2004 May;61(5):657-60.
139. **Munshi ML,** Stone A, Fink L, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism.* 1996 Jan;45(1):133-5. Najib S, Sanchez-Margalet, *J Mol endocrinol* 2005.
140. **Najib S,** Sanchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin-stimulated DNA and protein synthesis: possible role of mitogen-activated protein kinase (MAPK), glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and p70 S6K phosphorylation. *J Mol Endocrinol.* 2005 Feb;34(1):119-26.

141. **Namour F**, Guy M, Aimone-Gastin I, de Nonancourt M, Mrabet N, Gueant JL. Isoelectrofocusing phenotype and relative concentration of transcobalamin II isoproteins related to the codon 259 Arg/Pro polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Oct 29;251(3):769-74.
142. **Namour F**, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Gueant J. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood*. 2001 Feb 15;97(4):1092-8.
143. **Namour F**, Helfer AC, Quadros EV, Alberto JM, Bibi HM, Orning L, Rosenblatt DS, Jean-Louis G. Transcobalamin deficiency due to activation of an intra exonic cryptic splice site. *Br J Haematol*. 2003 Dec;123(5):915-20.
144. **Natarajan SK**, Eapen CE, Pullimood AB, Balasubramanian KA. Oxidative stress in experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Aug;21(8):1240-9.
145. **Nedrebo BG**, Ericsson UB, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Aakvaag A, Aanderud S, Lien EA. Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients. *Metabolism*. 1998 Jan;47(1):89-93.
146. **Nguyen TT**, Dyer DL, Dunning DD, Rubin SA, Grant KE, Said HM. Human intestinal folate transport: cloning, expression, and distribution of complementary RNA. *Gastroenterology*. 1997 Mar;112(3):783-91.
147. **Nishio E**, Watanabe Y. Homocysteine as a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: a possible role for hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol*. 1997 Sep;122(2):269-74.
148. **Nishiyama M**, Kato Y, Hashimoto M, Yukawa S, Omori K. Apolipoprotein E, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutation and the risk of senile dementia--an epidemiological study using the polymerase chain reaction (PCR) method. *J Epidemiol*. 2000 May;10(3):163-72.
149. **Nygaard O**, Vollset SE, Refsum H, Brattstrom L, Ueland PM. Total homocysteine and cardiovascular disease. *J Intern Med*. 1999 Nov;246(5):425-54. Review.
150. **O'Keefe JH Jr**, Lavie CJ Jr, McCallister BD. Insights into the pathogenesis and prevention of coronary artery disease. *Mayo Clin Proc*. 1995 Jan;70(1):69-79. Review.
151. **O'leary VB**, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, Scott JM, Mills JL. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet*. 2002 Jan 15;107(2):151-5.
152. **Ortiou S**, Alberto JM, Gueant JL, Merten M. Homocysteine increases methionine synthase mRNA level in Caco-2 cells. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14(4-6):407-14.
153. **Outinen PA**, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood*. 1999 Aug 1;94(3):959-67.
154. **Paglia DE**, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967 Jul;70(1):158-69.
155. **Palmer JL**, Abeles RH. The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem*. 1979 Feb 25;254(4):1217-26.
156. **Pegg AE**, Secrist JA 3rd, Madhubala R. Properties of L1210 cells resistant to alpha-difluoromethylornithine. *Cancer Res*. 1988 May 15;48(10):2678-82.
157. **Perna AF**, Ingrosso D, Lombardi C, Acanfora F, Satta E, Cesare CM, Violetti E, Romano MM, De Santo NG. Possible mechanisms of homocysteine toxicity. *Kidney Int Suppl*. 2003 May;(84):S137-40. Review.
158. **Pessayre D**, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Feb;282(2):G193-9. Review.
159. **Polevoda B**, Martzen MR, Das B, Phizicky EM, Sherman F. Cytochrome c methyltransferase, Ctm1p, of yeast. *J Biol Chem*. 2000 Jul 7;275(27):20508-13.
160. **Poirier LA**, Brown AT, Fink LM, Wise CK, Randolph CJ, Delongchamp RR, Fonseca VA. Blood S-adenosylmethionine concentrations and lymphocyte methylenetetrahydrofolate reductase activity in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Metabolism*. 2001 Sep;50(9):1014-8.
161. **Ratnam S**, Maclean KN, Jacobs RL, Brosnan ME, Kraus JP, Brosnan JT. Hormonal regulation of cystathionine beta-synthase expression in liver. *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277(45):42912-8.
162. **Raubenheimer PJ**, Nyirenda MJ, Walker BR. A choline-deficient diet exacerbates fatty liver but attenuates insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. *Diabetes*. 2006 Jul;55(7):2015-20.
163. **Reaven GM**. Relationship between insulin resistance and hypertension. *Diabetes Care*. 1991 Nov;14 Suppl 4:33-8. Review.
164. **Refsum H**, Guttormsen AB, Fiskerstrand T, Ueland PM. Hyperhomocysteinemia in terms of steady-state kinetics. *Eur J Pediatr*. 1998 Apr;157 Suppl 2:S45-9. Review.
165. **Robert K**, Nehme J, Bourdon E, Pivert G, Friguet B, Delcayre C, Delabar JM, Janel N. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology*. 2005 May;128(5):1405-15.
166. **Sai X**, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraiishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K, Komano H. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. *J Biol Chem*. 2002 Apr 12;277(15):12915-20.
167. **Schwan BC**, Wendel U, Lussier-Cacan S, Mar MH, Zeisel SH, Leclerc D, Castro C, Garrow TA, Rozen R. Effects of betaine in a murine model of mild cystathionine-beta-synthase deficiency. *Metabolism*. 2004 May;53(5):594-9.
168. **Smithells RW**, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child*. 1976 Dec;51(12):944-50.
169. **Sobti P**, Rothenberg SP, Quadros EV. Radioenzymatic assay for reductive catalysis of N(5),N(10)-methylene tetrahydrofolate by methylenetetrahydrofolate reductase. *J Biochem Biophys Methods*. 2000 Nov 20;46(1-2):11-20.

170. **Sowden MP**, Collins HL, Smith HC, Garrow TA, Sparks JD, Sparks CE. Apolipoprotein B mRNA and lipoprotein secretion are increased in McArdle RH-7777 cells by expression of betaine-homocysteine S-methyltransferase. *Biochem J*. 1999 Aug 1;341 (Pt 3):639-45.
171. **Spaniol M**, Kaufmann P, Beier K, Wuthrich J, Torok M, Scharnagl H, Marz W, Krahenbuhl S. Mechanisms of liver steatosis in rats with systemic carnitine deficiency due to treatment with trimethylhydraziniumpropionate. *J Lipid Res*. 2003 Jan;44(1):144-53.
172. **Stabler SP**, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest*. 1988 Feb;81(2):466-74.
173. **Stegers-Theunissen RP**, Boers GH, Trijbels FJ, Eskes TK. Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med*. 1991 Jan 17;324(3):199-200.
174. **Stubbs M**, York DA. Central glucocorticoid regulation of parasympathetic drive to pancreatic B-cells in the obese fa/fa rat. *Int J Obes*. 1991 Aug;15(8):547-53.
175. **Sunden SL**, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys*. 1997 Sep 1;345(1):171-4.
176. **Swanson DA**, Liu ML, Baker PJ, Garrett L, Stitzel M, Wu J, Harris M, Banerjee R, Shane B, Brody LC. Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb;21(4):1058-65.
177. **Taoka S**, Ohja S, Shan X, Kruger WD, Banerjee R. Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity. *J Biol Chem* 1998;273:25179-25184.
178. **Tein I**. Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects. *J Inher Metab Dis*. 2003;26(2-3):147-69. Review.
179. **Thomas PK**, Hoffbrand AV, Smith IS. Neurological involvement in hereditary transcobalamin II deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1982 Jan;45(1):74-7.
180. **Tsai AC**, Romsos DR, Leveille GA. Determination of carnitine turnover in choline-deficient and cold-exposed rats. *J Nutr*. 1975 Mar;105(3):301-7.
181. **Upchurch GR Jr**, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem*. 1997 Jul 4;272(27):17012-7.
182. **Van der put NM**, van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, Van Oppenraaij-Emmerzaal D, Banerjee R, Blom HJ. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM*. 1997 Aug;90(8):511-7.
183. **Van der Put NM**, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*. 1998 May;62(5):1044-51.
184. **Van Der Put NM**, Blom HJ. Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000 Sep;92(1):57-61. Review.
185. **Vaz FM**, Wanders RJ. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J*. 2002 Feb 1;361(Pt 3):417-29. Review.
186. **Veal N**, Hsieh CL, Xiong S, Mato JM, Lu S, Tsukamoto H. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha promoter activity by S-adenosylmethionine and 5'-methylthioadenosine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Aug;287(2):G352-62.
187. **Vitvitsky V**, Dayal S, Stabler S, Zhou Y, Wang H, Lentz SR, Banerjee R. Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Jul;287(1):R39-46.
188. **Watanabe M**, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, Maeda N. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Feb 28;92(5):1585-9.
189. **Walkey CJ**, Donohue LR, Bronson R, Agellon LB, Vance DE. Disruption of the murine gene encoding phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 25;94(24):12880-5.
190. **Wang XL**, Duarte N, Cai H, Adachi T, Sim AS, Cranney G, Wilcken DE. Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. *Atherosclerosis*. 1999 Sep;146(1):133-40.
191. **Welch GN**, Upchurch GR Jr, Farivar RS, Pigazzi A, Vu K, Brecher P, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos2. *Proc Assoc Am Physicians*. 1998 Jan-Feb;110(1):22-31.
192. **Werstuck GH**, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 2001;107(10):1263-1273.
193. **Wijekoon EP**, Skinner C, Brosnan ME, Brosnan JT. Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: effects of insulin resistance and of type 2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004 Jul;82(7):506-14.
194. **Wiklund O**, Fager G, Andersson A, Lundstam U, Masson P, Hultberg B. N-acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis*. 1996 Jan 5;119(1):99-106.
195. **Wilson A**, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab*. 1999 Aug;67(4):317-23.
196. **Wu G**, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004 Mar;134(3):489-92. Review.

197. **Yasuhara T**, Nokihara K. Quantitative determination of biological sulfhydryl groups by postcolumn derivatization and elucidation of microheterogeneity of serum albumins. *Anal Chem.* 1998 Aug 15;70(16):3505-9.
198. **Yasui K**, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K. Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. *Neurology.* 2000 Aug 8;55(3):437-40.
199. **Zeisel SH**, Zola T, daCosta KA, Pomfret EA. Effect of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentrations in rat liver. *Biochem J.* 1989 May 1;259(3):725-9.
200. **Zetterberg H**, Nexø E, Regland B, Minthon L, Boson R, Palmer M, Rymo L, Blennow K. The transcobalamin (TC) codon 259 genetic polymorphism influences holo-TC concentration in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer disease. *Clin Chem.* 2003 Jul;49(7):1195-8.
201. **Zetterberg H**. Methylene tetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004 Feb 17;2:7. Review.
202. **Zhu X**, Song J, Mar MH, Edwards LJ, Zeisel SH. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) knockout mice have hepatic steatosis and abnormal hepatic choline metabolite concentrations despite ingesting a recommended dietary intake of choline. *Biochem J.* 2003 Mar 15;370(Pt 3):987-93.
203. **Zou CG**, Banerjee R. Tumor necrosis factor-alpha-induced targeted proteolysis of cystathionine beta-synthase modulates redox homeostasis. *J Biol Chem.* 2003 May 9;278(19):16802-8.

PUBLICATIONS

Hepatic steatosis in developing rats from dams subjected to a methyl deficient diet is related to a defective synthesis of carnitine

Sébastien Blaise,^{1,*} Jean-Marc Alberto,^{1,*} Gilbert Briand,² Bénédicte Nicolas,¹ Jean-Luc Daval,¹ Jean-Louis Guéant¹

¹ INSERM U724, Université H. Poincaré, Nancy, France

² Laboratoire de biochimie métabolique, CHU de Lille, Lille, France

* Equal contribution

Author for Correspondence:

Professor Jean-Louis Guéant, MD, DSc

Inserm U-724, Molecular and Cellular Pathology in Nutrition

Faculté de Médecine

9 avenue de la Forêt de Haye

B.P. 184

54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, FRANCE

Phone: (33) 3 83 68 39 92

Fax: (33) 3 83 68 32 79

E-mail: jl.gueant@chu-nancy.fr

The present work was funded by INSERM and the region of Lorraine.

Summary

Background: neonatal hepatic steatosis may be associated with genetic disorders of homocysteine metabolism. In contrast, the neonatal consequences of a methyl deficient diet on fatty acid oxidation are unknown, despite a 6-fold increase of carnitine synthesis during the perinatal period. **Aim:** to investigate these consequences in rat pups with an early nutritional deprivation in methyl precursors. **Methods:** pups were from dams fed during gestation with either a standard diet or a diet deficient in folate, vitamin B2, B12, and choline. Diets were maintained until weaning of the offspring at postnatal day 21. **Results:** a microvesicular steatosis was observed in 21-day-old deprived pups, with a higher liver concentration of total lipids and triglyceride. Plasma homocysteine was substantially increased, vitamin B2 unchanged, and vitamin B12 and folate dramatically decreased. In the liver, there was no change in superoxide dismutase activity, an increased level of malondialdehyde (MDA), a drop in total glutathione and glutathione peroxidase activity, and a decreased level of total and free carnitine. Acylcarnitines were correlated with concentrations of folate, S-adenosylmethionine and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio. Liver cytochrome c N-lysine methyltransferase was characterized by a K_M at 29 μM for S-adenosylmethionine and an inhibition constant for S-adenosylhomocysteine at 34 μM . The S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio in the liver of deprived rats was responsible for a 50% decrease of the enzyme activity. Reintroduction of a normal diet after weaning restored a normal histology and metabolism. **Conclusion:** we have evidenced an association between early deficiency in methyl precursors, carnitine synthesis and neonatal steatosis that could be involved in the pathogenesis of neonatal liver steatosis, in a context of deficiency in folate and vitamin B12 during pregnancy.

Keywords: Steatosis, neonatal, carnitine, homocysteine, folate, vitamin B12, cytochrome c N-lysine methyltransferase

Introduction

The sulphur-containing amino acid homocysteine (Hcy) is a metabolite of the essential amino acid methionine. It can be either remethylated to methionine by methionine synthase (MTR), an enzyme that requires folate (vitamin B9) and cobalamin (vitamin B12), or catabolized by cystathionine- β -synthase (CBS) to generate cysteine.¹ Hcy remethylation can be also catalyzed by betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) in the liver. The metabolic chart of Hcy is summarized in figure 1. Depending upon genetic and dietary factors, Hcy levels may vary considerably among individuals and its elevated plasma concentration have been identified as a risk factor for a wide range of pathological situations that includes liver diseases.²⁻⁷ Intracellular accumulation of Hcy may result from genetic defects of the remethylation and transsulfuration pathways as well as from a diet deficient in methyl precursors such as folate and vitamin B12.

Neonatal hepatic steatosis is associated with defects in the β -oxidation of fatty acids and carnitine-dependent transport of fatty acids.^{8, 9} Hepatic steatosis in newborns may be also associated with genetic disorders in line with Hcy metabolism, and it has been reported in children having severe hyperhomocysteinemia due to deficiency for CBS or to a genetic disruption of the remethylation pathway.^{10, 11} The pathomechanism of liver lesions related to Hcy metabolism remains unclear. Nutritional deficiency in methyltetrahydrofolate, the methyl donor for Hcy remethylation, may influence the pathogenesis of alcohol-related liver diseases.^{6,7} In *cbs* $-/-$ and *cbs* $-/+$ mice, Hcy induces dysregulation of the endogenous sterol response pathway, oxidative stress with enhanced lipid peroxidation, protein oxidation and endoplasmic reticulum (ER) stress.^{7,12,13,14} Liver oxidative stress has been also evidenced in rats subjected to a folate deficient diet.¹⁵

The consequences of a methyl-deficient diet during pregnancy on liver lipid metabolism of neonates and the subsequent occurrence of neonatal hepatic steatosis are not known. In particular, the consequence of a methyl deficient diet on carnitine synthesis, carnitine-dependent transport and mitochondrial oxidation of fatty acids has not been investigated despite the 6-fold increase of carnitine synthesis in the liver during the late gestational and neonatal periods.^{16, 17} Carnitine is synthesized from the amino acid lysine of several proteins such as cytochrome c, calmodulin, myosin, actin, and histones. N-methylation of these lysine residues occurs as a post-translational event catalysed by specific methyltransferases, which use S-adenosylmethionine as a methyl donor.¹⁸ Lysosomal hydrolysis of these proteins results in the release of trimethyllysine (TML), which is the first metabolite of carnitine biosynthesis.¹⁶ The specific methyltransferases involved in the production of TML have been characterized in bacteria and yeast, but not in humans and rodents.^{16,19,20} Therefore, the association between the one carbon metabolism and carnitine synthesis in the liver remains hypothetical.

The aim of our work was to investigate the link between neonatal liver steatosis and Hcy remethylation pathway in rat pups from dams subjected to a methyl deficient diet. We focused our study on the pathomechanisms related with impaired synthesis of carnitine and oxidative stress.

Materials and methods

Animals and diet

Animal treatments were performed according to the APS's *Guiding principles in the Care and Use of Animal*. Wistar rats (Charles River, France) were constantly maintained under standard laboratory conditions on a 12 h:12 h light:dark cycle (lights on at 6:00 a.m.) with food and water available *ad libitum*. One month before pregnancy, adult females were fed with either standard food (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France) or a diet without vitamin B2, B12, folate and choline (Special Diet Service, Saint-Gratien, France), as previously described.²¹ The pups were considered into two groups, namely the control group (born from dams fed with standard diet) and the deficient group (born from dams fed with a deficient diet). Deficient and normal diets were respectively maintained in dams from both groups until weaning of their offsprings occurring 21 days after birth.

Sample collection

Rat pups were sacrificed by excess halothane at two different developmental stages (21 or 80 days). Intracardiac blood samples were drawn for the measurement of plasma concentrations of vitamin B12, folate and Hcy, and the whole liver was rapidly harvested. The liver was washed in Ringer buffered solution (2 mM KCl, 125 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 2 g/l glucose, pH 7.3). Liver tissues intended for histopathological analysis were fixed either in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 12 h for electron microscopy or in 10% formaldehyde buffered at pH 7.4, for 24 h and then embedded in paraffin for histopathological analysis.

Histopathological analysis

Histology: Four μ -sections of paraffin-embedded blocks were stained with haematoxylin-eosin (HE) and with special liver stains for analysis of collagen fibrosis (Sirius red stain), reticulin fibers (Gordon and Sweetsstain) and iron (Perls stain). Histological analysis was performed using semiquantitative items focusing on necroinflammatory lesions, fibrosis and steatosis, as usually done to score chronic hepatitis C activity in human pathology²³ and carried out by a liver pathologist blinded to study (L.A.). The system devised for this study scored steatosis based on the percentage of hepatocytes showing lipid accumulation as follows: 0 (none), 1 (< 10%), 2 (10% to 30%), 3 (> 30%).

Electron microscopy: The samples were dehydrated in a graded series of ethanol, and then embedded in EPON resin. Ultrathin sections, stained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate, were generated with ultracut E (Reichert-Jung, Austria) and finally observed with a transmission electronic microscope (Philips CM12, Netherlands). Density estimations of lipid droplets and mitochondria were determined on 3 counts in 7 areas of 2 sections per animal.

Concentrations of folate, vitamin B12, vitamin B2, homocysteine, SAH and SAM in blood and liver

Levels of vitamin B12 and folate were determined in plasma and liver extracts by radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB, ICN Pharmaceuticals, USA).²⁴ Vitamin B2 status in blood and liver was assessed by measuring the Glutathione reductase activity for determining the erythrocyte glutathione reductase activation coefficient (EGRAC) and the liver glutathione reductase activation coefficient (LGRAC). The method used was the one described by Moat et al.³⁶ The results are expressed as an activation coefficient and a value >1.4 means a riboflavin deficiency. SAM and SAH amounts were determined as previously described²¹ and expressed as nmol/g of tissue.

Activities of enzymes from homocysteine metabolism in liver extracts

Liver was washed with PBS, crushed under liquid nitrogen and homogenized in 5 μ L PBS (containing 5% protease inhibitor cocktail, Sigma, St-Louis MO) for 1 mg of tissue. The mixture was thoroughly mixed and sonicated by pulses for 1 min on ice. The homogenate was then centrifuged to 20.000 g/4°C/30 min and the pellet discarded. Total cytoplasmic protein amount was estimated by the Lowry's colorimetric method.²² All measurements described below were performed with tissue samples corresponding to 400 μ g of total proteins.

CBS²⁷, MTR²⁸, MTHFR²⁹ and BHMT³⁰ were performed as previously described²¹ and enzymes activities are expressed as nmol produced per hour for 1 mg of total cytoplasmic protein. Cystathionine- β -synthase (CBS) activity was monitored by a method adapted from Taoka *et al.*²⁷. Methionine Synthase (MTR) activity by a method adapted from Chen and Banerjee²⁸. Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) activity was measured as described by Garrow²⁹ and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) activity as reported by Kutzbach *et al.*³⁰

Markers of oxidative stress

The malondialdehyde (MDA) assay was performed with the "lipid peroxidation assay kit" (Calbiochem[®]) according to the manufacturer instructions. This assay is based on the Liu *et al.*³⁵ method. The SOD activity assay was carried out with the Ransod kit (Randox, USA) according to the manufacturer's instructions. The Glutathione peroxidase (GPX) activity was carried out on Kone Pro automate (Kone, Evry, France), and the assay is based on the Paglia *et al.* method.³⁷ For Total glutathione determination, the reaction mixture contained 100 μ L of homogenate, 2 μ L dithiotreitol (DTT, 10 mM, Sigma) 15 μ L 5,5'-Dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) (DTNB, 5 mM in PBS/EDTA 0.1 mM, Sigma). The mixture was vortexed briefly, incubated for 5 min at room temperature and 5.5 μ L perchloric acid (60%, Sigma) added. The mixture was vortexed again, incubated on ice for 10 min, centrifuged at 20.000g/4°C/20 min, the supernatant filtered through 0.45 μ m. The separation is based on the Yasuhara method,³⁸ with some modifications, and the HPLC system provided by TSP (Thermo electron, Cergy Pontoise, France), . The sample was injected (50 μ L) in a HPLC system that consisted in a high pressure pump (TSP, P1000XR), an autosampler (TSP, AS100), a C18 column (Resolve[®] C18, 5 μ m, 150x3.9 mm) maintained to 30°C at a flow rate of 0.8 mL/min (105 bar) and the signal measured by UV absorbance (280 nm, TSP, UV2000). The amount of GSH was calculated by using a range of standards and expressed as nmol/mg of total protein.

Characterization of cytochrome c N-Lysine methyltransferase activity (EC: 2.1.1.59) in liver homogenates

β -mercaptoethanol, cytochrom c from heart horse, SAM and SAH S-adenosyl-L-[methyl-³H]methionine was purchased from Amersham Biosciences (Sweden), and scintillation agent, vials and detector from Packard Bioscience (USA). Methylation of horse heart cytochrome c was carried out as previously described in a final volume of 100 μ L containing sodium bicarbonate (50 mM, pH 9.0), β -mercaptoethanol (14 mM), Cytochrome c from horse heart (72 μ g), SAM 200 μ M (1.5 μ Ci) and crude extract.²⁰ For the competition assay, the reaction was produced in the same conditions except 2 points. First, a range of SAH (0, 8, 40, 80, 120, 200 μ M) was added in the mixture to measure la competition between SAM and SAH for catalytic site of the cytochrome c N-Lysine methyltransferase. Secondly, for each point of the SAH range, 2 concentrations of total proteins (220 and 440 μ g) from control rats were used in the reaction. The negative control was run in the same conditions except that bovine serum albumin replaced crude extract, and served as background for the calculation.

Markers of lipid metabolism in liver extracts

Hepatic total lipids were extracted according to the Folch's method³¹ and resuspended in Ringer buffer containing 3% BSA as described by Hiraku Ono.³² ALAT and ASAT activities in blood were determined by UV kinetic method without pyridoxal phosphate at 37° C (Biolabo, Fismes, France) on a multiparametric automate (Olympus AU400, Rungis, France). Triglycerides and cholesterol were measured by enzymatic methods GPO-PAP and CHOD-PAP (Biolabo, Fismes, France), respectively on a multiparametric automate (Olympus AU400, Rungis, France). Total and free carnitines were assayed as described previously on deproteinated samples in a multiparametric automate (Kone Pro, Evry, France).³³ Acylcarnitines were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Lipid extracts were dried under vacuum and subsequently incubated 30 minutes at 65°C with butanol. Then, the samples were dried again and sonicated during 10 minutes within of methanol/acetonitrile (1:99, v/v). After centrifugation, supernatants were analysed in LC-MS/MS (API 3000 Applied Biosystems, Toronto, Canada).³⁴

MTR and CBS mRNA assays. Total RNA were isolated from liver tissues using the RNeasy mini-kit from QIAGEN (Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol, and quantified by spectrophotometry. The mRNA expression levels were evaluated as previously described.²¹

Statistical analysis

Data were prospectively collected and analyzed with Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkley, CA). Continuous variables were reported as means \pm SD, raw data were compared by using one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's test. Univariate correlation analyses were used to evaluate the relationships between acylcarnitines and determinants of methionine metabolism. A *P*-value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Histology of Liver.

Histological analysis of the livers of deprived pups showed a microvesicular steatosis that was not observed in controls (Fig. 2A/B). The deprived group presented a higher Knodel score, compared to controls (1.6 ± 0.8 vs. 0.2 ± 0.4 , $P<0.0001$). The microvesicular steatosis was accompanied neither by fibrosis, portal and septal inflammation, intra-lobular necrosis nor dysplasia. The observation of the steatosis by electron microscopy showed a high density of lipid droplets in the cytoplasm of hepatocytes in the deprived group, compared to the control group (Fig. 2C/D, 0.186 ± 0.08 vs. $0.003\pm 0.002/\mu\text{m}^2$, $P<0.0001$). Electron microscopic examination and analysis DNA fragmentation did not reveal any significant apoptotic feature in the deprived group while a significant increase of the number of mitochondria was recorded, compared to controls ($1,1\pm 0,3$ vs. $0,6 \pm 0,3/\mu\text{m}^2$, $P<0,0001$).

Biochemical markers of homocysteine metabolism in blood and liver

Compared with the control group, the deprived group presented a marked reduction in the blood concentration of vitamin B12 ($P<0.0001$) and folate ($P=0.0012$) (Table 1). The erythrocyte content in vitamin B2, evaluated by EGRAC, remained unchanged ($P=0.9605$). There was also a significant increase in the plasma concentration of Hcy in the deprived group, compared to the control group ($P=0.0003$). Vitamins B12 and B2 (LGRAC) from the liver were not significantly influenced by the exposure to deficient diet ($P=0.6140$ and $P=0.3752$, respectively), in contrast to folate ($P<0.0001$). Compared to the control group, the deprived group exhibited a decreased concentration of SAM in liver tissue ($P=0.0016$), while the concentration in SAH did not differ significantly ($P=0.7699$). Consequently, the index of methylation (SAM/SAH) showed a significant fall ($P= 0.0381$). A 2-fold drop of MTR and CBS activities was reported in the deprived rats, while those of MAT and BHMT remained unchanged, showing an influence of the diet on the remethylation and transsulfuration pathways. RT-PCR showed that these changes were not related to the respective transcript levels (Fig. 3).

Markers of oxidative stress

There was no difference in activities of SOD Cu/Zn and SOD Mn between the two experimental groups. In contrast, a significant increased level of MDA ($P=0.0361$) and a drop in total GSH concentration and GPX activity were recorded in the liver extracts of the pups from the dams receiving the deficient diet ($P=0.0980$ and $P<0.0001$, respectively) (table 2).

Liver concentration of lipids, carnitine and acylcarnitines

The concentration in total lipids was much higher in deprived pups than in controls ($P<0.0001$) (Table 2). This rise was also observed for triglyceride ($P=0.0196$) but not for cholesterol ($P=0.2712$). The concentrations of total and free carnitine were both decreased significantly in the deprived group, compared to the control group ($P=0.0002$ and $P=0.0002$, respectively). Qualitative and quantitative analyses of acylcarnitines in LC MS/MS showed that concentrations in acylcarnitines with C6-C8 medium chains and C10-C18 long chains were significantly decreased, compared to the control group (0.02 ± 0.01 vs. 0.05 ± 0.01 nmol/mg, $P=0.0010$ and 0.14 ± 0.09 vs. 0.39 ± 0.09 nmol/mg, $P=0.0030$, respectively, Fig. 4). The concentration in acetylcarnitine was also decreased in the deprived group (0.35 ± 0.12 vs. 0.59 ± 0.09 nmol/mg of tissue, $P=0.0048$). On the other hand, the concentrations in acylcarnitines with C3-C5 chains and the dicarboxylic acylcarnitines (C4-C12 diCOOH) were not modified ($P=0.2476$ and $P=0.8362$, respectively, Fig. 4).

A correlation was found between free and total carnitines from the one hand and folates, SAM and the SAM/SAH ratio from the other hand, in univariate analysis (Table 3). Acylcarnitines were also correlated with folate, SAM and SAM/SAH ratio (Table 3).

Influence of SAM on the activity of the cytochrome c methyltransferase

The Dixon plot showed an inhibiting effect of SAH on the activity of cytochrome c methyltransferase, with a K_i at 34 μM (Fig. 5). The effect of the SAM/SAH ratio on the V_{max} of the cytochrome c methyltransferase from the one hand and the drop of the ratio in liver tissue of deprived rats from the other hand was compatible with a dramatic decrease of the enzyme activity in the liver, in regard to the ratios reported in the livers of deprived rats. In contrast, the expression level of the enzyme was not affected by the deficient diet. Indeed, the V_{max} of cytochrome c transmethylation in the dialyzed liver extracts of the deprived group was not significantly different from that of the control group (0.08 ± 0.06 vs. 0.08 ± 0.02 nmol/hr/mg, $p=0.9293$) (Fig. 5)

Reversibility of liver steatosis after introduction of a normal diet in deprived rats

At the histopathological level, a normal liver histology was restored when a normal diet was given to the deprived rats from day 21 up to day 80. In particular, the liver tissue did not present any inflammatory, fibrotic or necrotic lesion. The electron microscopic examination confirmed the histology with a very low density of lipid droplets in hepatocytes of both deprived and control animals (0.003 ± 0.002 vs. 0.005 ± 0.002 droplets/ μm^2 , $P=0.5634$) (Fig. 2 E/F). The introduction of a normal diet in the deprived group after weaning restored also normal concentrations of free and total carnitine, vitamin B12, folate and HCY (Table 4). This was also observed regarding concentrations of SAM, SAH and SAM/SAH ratio (Table 4).

Discussion

Our experimental rat model of pups deprived in methyl nutritional precursors during gestation and suckling exhibited a liver microvesicular steatosis, as previously found in humans with congenital homocystinuria and in genetic mice models with invalidation of either *cbs* or *mthfr* genes.^{14,39} In our nutritional model, the diet lacking methyl precursors was effective in producing decreased plasma levels of folate and vitamin B12 and in increasing by 5-fold the plasma concentration of Hcy. This Hcy elevation in plasma was similar to that observed in patients with a nutritional deficiency in folate and /or vitamin B12, and much lower than those reported in genetic disorder of the CBS transsulfuration pathway and in *cbs*^{-/-} mice.^{39,40} As expected from a metabolic point of view, our animal model presented with a decrease of SAM and the SAM/SAH ratio that could produce an inhibition of methyltransferase activities.⁴¹ This impaired remethylation pathway was associated with a decreased activity of MTR, while the activity of BHMT, the enzyme that catalyzes the Hcy remethylation by betaine, was not modified. These abnormalities contrasted with those reported in the liver of CBS-deficient mice, where a dramatic increase in SAH levels and no change in SAM concentration were recorded.⁴²

Possible cellular mechanisms by which elevated Hcy promotes liver injury in mice genetic models are the activation of profibrogenic and pro-inflammatory factors.¹³ Histological examination of *cbs* ^{-/-} mice fed with choline showed hepatic lesions with perilobular inflammation and fibrosis in the first 8 weeks while hepatic macrovesicular steatosis appeared later.¹³ In contrast, we observed an early microvesicular steatosis with the absence of inflammatory lesion and fibrosis. Absence of fibrosis and irreversible liver injury was confirmed by a full normalization of liver histology when the deprived rats were given a normal diet between day 21 and day 80. In addition, electron microscope examination and analysis of DNA fragmentation failed to show apoptosis. In deprived rats, we observed an increased number of mitochondria that was consistent with the raise in activity of cytochrome c oxidase.

Folate depletion and elevated plasma Hcy promote oxidative stress in liver of adult rats.^{15,43} The liver injury of mice with invalidation of *cbs* is associated with oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and increased synthesis of lipids.^{12,13} Hcy accumulation increases oxidative stress by mechanisms that may contribute to liver fibrosis and steatosis.⁴⁴ The transsulfuration pathway of Hcy is also critical in the maintenance of intracellular reserves of reduced glutathione (GSH), that is the major hepatic anti-oxidant.⁴⁵ An oxidative stress, with enhanced lipid peroxidation and protein oxidation in the liver of *cbs* ^{-/-} mice fed with choline has been evidenced by measuring respectively MDA and 4-HNE, two end-products of peroxidation of polyunsaturated fatty acids, and protein-associated carbonyl groups.¹³ This oxidative stress contrasted with a normal expression level of SOD Cu/Zn in western blot analysis. In our study, we observed also an oxidative stress with an increased concentration of MDA in the deprived rat pups that was associated with a decrease in GPX activity and GSH concentration. This drop in GSH was related to a decrease of the CBS activity and the transsulfuration pathway that could be the consequence of a decreased allosteric activation of the enzyme due to the low concentration in SAM. In parallel, there was no change in activities of Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, and GSR, indicating a maintained capacity of liver for metabolizing free radicals.

Abnormalities in lipid synthesis and storage in liver have been reported in genetic mice models of alteration of the one carbon metabolism and in hepatocarcinoma cell lines.¹² In *cbs* ^{-/+} mice fed a hyperhomocysteinemic diet, Hcy-induced ER stress could induce dysregulation of lipid biosynthesis by activating the SREBPs (sterol regulatory element-binding proteins), a family of ER resident transcription factors that are responsible for the induction of genes in the cholesterol/triglyceride biosynthesis and uptake pathways, leading to increased hepatic cholesterol and triglyceride levels.¹² In contrast, in the liver of pups born from deprived dams, it was observed an increased concentration of triglycerides and total lipids, but no change in cholesterol. This suggests that the effects on liver metabolism of a diet deprived in methyl precursors would differ, at least in part, from those documented in genetic models.

The defective synthesis of carnitine has never been investigated as a mechanism associated with steatosis in genetic and nutritional animal models of impaired Hcy metabolism. Carnitine synthesis is a key step of the oxidation and storage of fatty acids in the liver.¹⁶ First, carnitine is required for the transport of activated long-chain fatty acids from the cytosol to the mitochondrial matrix, where β -oxidation takes place.⁴⁶ Secondly, carnitine is involved in the transfer of the products of peroxisomal β -oxidation, including acetyl-CoA, to the mitochondria for oxidation in the Krebs cycle. Third, carnitine acts on lipid storage by modulating the acyl-CoA/CoA ratio and on the storage of energy as acetylcarnitine.¹⁶ The liver is the primary site of carnitine biosynthesis in the rat, since it is the only tissue which contains butyrobetaine deoxygenase activity.⁴⁷ In our model, we found a dramatic decrease of both total carnitine and acylcarnitines, that was evocative of an impaired synthesis. This was confirmed by a restored normal plasma concentration of total carnitine and acylcarnitines after giving a normal diet to the deprived rats. The LC-MSMS distribution of acylcarnitines in the liver of deprived pups was evocative of a carnitine deficiency. The association between the Hcy metabolism and the impaired synthesis of carnitine in deprived rats was ascertained by a significant correlation between carnitine or acylcarnitines and folate, SAM and SAM/SAH (Table 4). The four enzymes that produce carnitine from TML are present in the rat liver.¹⁶ In contrast, the presence of *S*-adenosylmethionine:*N*^ε-methyl transferases is not known, despite the low capacity of the liver to use TML from the circulation.⁴⁸ In particular, the *S*-adenosylmethionine:cytochrome *c*-lysine *N*^ε-methyl transferase has been characterized in *N. crassa* and *S. cerevisiae*, but not in vertebrates.^{19,20} We detected this activity in the liver homogenate from pups. The affinity of *S*-adenosylmethionine for the enzyme was similar to that previously recorded for other methyltransferases (Fig. 5). The activity was influenced by the SAM /SAH ratio, as previously reported for other enzymes that catalyse trans-methylation reactions.⁴¹ This was evidenced by two experiments. The inhibition constant of SAH was close to the K_M of SAM (Fig. 5) and the activity of cytochrome *c* N-Lysine methyltransferase was influenced by the SAM/SAH ratio, with a dramatic effect of the ratio for values lower than 5. We could estimate that the drop of the SAM/SAH ratio in the liver of deprived rats was responsible for a 50% decrease of cytochrome *c* N-Lysine methyltransferase activity, compared to V_{max} (Fig. 5).

The folate deficiency in the context of pregnancy is relatively frequent in some countries from sub-Saharan Africa that have also a high prevalence in protein-energy malnutrition.⁴⁹ A high prevalence of vitamin B12 deficiency has been also reported in Latin America.⁵⁰ In addition, an increase of Hcy level in mothers has been observed during the last trimester of normal pregnancy.²⁴ Taken together, these and our data suggest to investigate the potential association between nutritional methyl precursors, liver steatosis and carnitine in newborns of populations with a high prevalence of deficiency in folate and vitamin B12.

In conclusion, we have evidenced in pups an association between the deficiency in methyl precursors and carnitine synthesis. This association highlights a link between the Hcy metabolism and carnitine that could be potentially involved in the pathogenesis of neonatal liver steatosis, in a context of deficiency in folate and/or vitamin B12 during pregnancy.

References

1. Finkelstein, J.D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157:Suppl 2, S40-S44.
2. Refsum, H., Ueland, P.M., Nygard, O., and Vollset, S.E. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
3. Mattson, M.P., and Shea, T.B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003;26:137-146.
4. Gueant, J.L., Anello, G., Bosco, P., Gueant-Rodriguez, R.M., Romano, A., Barone, C., Gerard, P., and Romano, C. Homocysteine and related genetic polymorphisms in Down's syndrome IQ. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:706-709.
5. Bollander-Gouaille C. Focus on Homocysteine and the Vitamins involved in its metabolism. Paris: Springer-Verlag, 2nd Edition, 2002
6. Halsted CH Folate deficiency, methionine metabolism, and alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002;27(3):169-172.
7. Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol.* 2004;10(12):1699-1708.
8. Satran L, Sharp HL, Schenken JR, Krivit W: Fatal neonatal hepatic steatosis: a new familial disorder. *J Pediatr* 1969;75(1):39-46.
9. Sokol RJ, Treem WR. Mitochondria and childhood liver diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28:4-16.
10. Gaull G, Sturman JA, Schaffner F Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency: enzymatic and ultrastructural studies *J Pediatr* 1974;84(3):381-390.
11. Russo P, Doyon J, Sonsino E, Ogier H, Saudubray JM. A congenital anomaly of vitamin B12 metabolism: a study of three cases. *Human Pathol* 1992;23:504-512.
12. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 2001;107(10):1263-1273.
13. Robert K, Nehme J, Bourdon E, Pivert G, Friguet B, Delcayre C, Delabar JM, Janel N. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology* 2005;128(5):1405-1415.
14. Namekata K, Enokido Y, Ishii I, Nagai Y, Harada T, Kimura H. Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 2004;279:52961-52969.
15. Huang RF, Shue YC, Lin HL, Yang FL. Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. *J Nutr* 2001;131:33-38.
16. Vaz FM, Wanders RJA. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J* 2002;361:417-429.
17. Fernandez Ortega, M. F. Effect of dietary lysine level and protein restriction on the lipids and carnitine levels in the liver of pregnant rats. *Ann Nutr Metab* 1989;33:162-169.
18. Paik, W K, Kim S. Protein methylation. *Science* 1971;174:114-119.
19. Polevoda B, Martzen MR, Das B, Phizicky EM, Sherman F. Cytochrome c Methyltransferase, Ctm1p, of Yeast. *J Biol Chem* 2000;275:20508-20513.
20. Durban E, Nochumson S, Kim S, Paik WK, Chan S K. Cytochrom c specific protein-lysine Methyltransferase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 1978; 253:1427-1435.
21. Blaise S, Alberto JM, Nedelec E, Ayav A, Pourie G, Bronowicki JP, Gueant JL, Daval JL. Mild neonatal hypoxia exacerbates long term effects of hyperhomocysteinemia in the rat pup. *Pediatric Research* 2005;57:777-782.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 Nov;193(1):265-275.
23. Ishac KG. Pathologic features of chronic hepatitis. A review and update. *Am J Clin Pathol* 2000;113(1):40-55.

24. Chery C, Barbe F, Lequere C, Abdelmouttaleb I, Gerard P, Barbarino P, Boutroy JL, Gueant JL. Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 2002;40(11):1105-1108.
25. Glatzle D, Korner WF, Christeller S, Wiss O. Method for the detection of a biochemical riboflavin deficiency. Stimulation of NADPH₂-dependent glutathione reductase from human erythrocytes by FAD in vitro. Investigations on the vitamin B2 status in healthy people and geriatric patients. *Int Z Vitaminforsch* 1970;40(2):166-183.
26. Loehrer F, Tschöpl M, Angst CP, Litynski P, Jäger K, Fowler B, Haefeli WE. Disturbed ratio of erythrocyte and plasma S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 2001;154:147-154.
27. Taoka S, Ohja S, Shan X, Kruger WD, Banerjee R. Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity. *J Biol Chem* 1998;273:25179-25184.
28. Chen Z, Chakraborty S, and Banerjee R. Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *J Biol Chem* 1995;270:19246-19249.
29. Garrow TA. Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem* 1996;271:22831-22838.
30. Kutzbach C, Stokstad EL. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 1971;250:459-477.
31. Folch JM, Lees M, Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
32. Ono H, Shimano H, Katagiri H, Yahagi N, Sakoda H, Onishi Y, Anai M, Ogihara T, Fujishiro M, Viana AY, Fukushima Y, Abe M, Shojima N, Kikuchi M, Yamada N, Oka Y, Asano T. Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly and hypertriglycemia with sterol regulatory element binding protein involvement. *Diabetes* 2003;52(12):2905-2918.
33. Rodriguez-Segade S, de la Pena CA, Paz JM, Del Rio R. Determination of L-carnitine in serum, and implementation on the ABA-100 and CentrifChem 600. *Clin Chem*. 1985;31(5):754-757.
34. Briand G, Fontaine M, Schubert R. Direct analysis by electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of standard and urinary acylcarnitines. Comparison with fast atom bombardment and gas chromatography chemical ionization mass spectrometry data. *J Mass Spectrom* 1995;30:1731-1741.
35. Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN. Assay of Aldehydes from Lipid Peroxidation: Gas Chromatography-Mass Spectrometry Compared to Thiobarbituric Acid. *Anal Biochem* 1997;245:161-166.
36. Moat SJ, Ashfield-Watt PA, Powers HJ, Newcombe RG, McDowell IF. Effect of Riboflavin Status on the Homocysteine-lowering Effect of Folate in Relation to the MTHFR (C677T) Genotype. *Clinical Chemistry* 2003;49(2):295-302.
37. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70(1):158-169.
38. Yasuhara T, Nokihara K. Quantitative determination of biological sulfhydryl groups by postcolumn derivatization and elucidation of microheterogeneity of serum albumins. *Anal Chem* 1998;70(16):3505-3509.
39. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, et al. Mice deficient in cystathionine- β -synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1585-1589.
40. Schwahn BC, Chen Z, Laryea MD, Wendel U, Lussier-Cacan S, Genest J Jr, Mar MH, Zeisel SH, Castro C, Garrow T, Rozen R. Homocysteine-betaine interactions in a murine model of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *FASEB J* 2003;17: 512-514.
41. Caudill MA, Wang JC, Melnyk S, Pogribny IP, Jernigan S, Collins MD, Santos-Guzman J, Swendseid ME, Cogger EA, James SJ. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict

- global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. *J Nutr* 2001;131(11):2811-2818.
42. Choumenkovitch SF, Selhub J, Bagley PJ, Maeda N, Nadeau MR, Smith DE. In the cystathionine- β -synthase knockout mouse, elevations in total plasma homocysteine increase tissue S-adenosylhomocysteine, but responses of S-adenosylmethionine and DNA methylation are tissue specific. *J Nutr* 2002;132:2157-2160.
43. Chanson A, Sayd T, Rock E, Chambon C, Sante-Lhoutellier V, Potier de Courcy G, Brachet P. Proteomic analysis reveals changes in the liver protein pattern of rats exposed to dietary folate deficiency. *J Nutr* 2005;135(11):2524-2529.
44. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986;77(4):1370-1376.
45. Vitvitsky V, Mosharov E, Tritt M, Ataullakhanov F, Banerjee R. Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox Rep* 2003;8(1):57-63.
46. Ramsay, Gandour RD, Van Der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim. Biophys. Acta* 2001;1546:21-43.
47. Bohmer, T. Conversion of butyrobetaine to carnitine in the rat *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 1974;343:551-557.
48. Carter AL, Frenkel R. The role of the kidney in the biosynthesis of carnitine in the rat. *J. Biol. Chem.* 1979;254:10670-10674.
49. Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Gueant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Gueant JL. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C-->T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr* 2004;79:619-24.
50. Allen LH. Folate and vitamin B12 status in the Americas. *Nutr Rev* 2004;62:S29-33.

Figure legends

Figure 1: The metabolic chart of homocysteine and the enzymes involved in the activated methyl cycle, Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR), Methionine Synthase (MTR), Betaine-Homocysteine Methyltransferase (BHMT), Methionine-S-Adenosyltransferase (MAT), S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAH). Homocysteine is either converted into methionine by remethylation or degraded into cystathionine by transsulfuration. Tetrahydrofolate (THF) and methylene-tetrahydrofolate (CH₂-THF) are the substrates of two branch points of the folate cycle. Vitamin B₁₂ and 5-methyl-tetrahydrofolate (CH₃-THF) are the co-factor and the co-substrate of MTR, respectively. The first step of carnitine synthesis is N-methylation of lysyl residues from several proteins, including cytochrome c, that uses S-adenosylmethionine as a methyl donor.

Figure 2: Examination of the liver of 21 days aged pups from dams subjected to either a normal diet (left) or a diet deficient in methyl precursors (right). Histological analysis of the livers of deprived pups showed a microvesicular steatosis that was not observed in controls (A/B). Electron microscopic examination evidenced a high density of lipid droplets in the cytoplasm of the deprived group, compared to the control group (C/D). Giving a normal diet in the deficient pups restored a normal aspect of liver tissue (E/F) and hepatocytes (G/H) examined at 80 days.

Figure 3: Effects of deficient diet on MTR and CBS mRNA levels in the liver of 21-d-old rats. Data are means \pm SE and are expressed as MTR/L27 and CBS/L27 relative densitometric values. For each group, three rats were studied. Statistically significant differences (ANOVA): $P < 0.05$ (deficient regimen vs normal regimen).

Figure 4: top: spectrum of LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) of acylcarnitines and free carnitine in liver extracts of 21 days aged pups from dams subjected to a diet deficient in methyl precursors ; bottom: quantification of acylcarnitines and free carnitine by using data from LC-MS/MS analyses of liver extracts. A decrease of all categories of carnitine derivatives was observed.

Figure 5: top left: Saturation curve of cytochrome c N-Lysine methyltransferase activity in the presence of increasing concentration of S-adenosylmethionine (SAM); top right: the K_M was estimated at 29 μ M by using the Line-Weaver Burk plot; bottom left: the inhibition constant (K_i) was estimated at 34 μ M when testing by Dixon plot the enzyme activity in the presence of increasing concentration of S-adenosylhomocysteine (SAH); bottom right: influence of the SAM/SAH ratio on the enzyme activity.

Table 1: Blood concentrations of vitamin B12, folate, EGRAC, homocysteine (HCY) and activities of transaminases in 21 days aged pups from dams subjected to a diet deficient in methyl precursors.

Data are reported as means \pm SD and compared by ANOVA (n= 6 individuals in each group).

	Control	Deficient	<i>P-value</i>
Vitamin B12 (pmol/L)	1277.11 \pm 165.82	322.35 \pm 56.01	<0.0001
Folate (nmol/L)	74.79 \pm 18.5	35.43 \pm 16.27	0.0012
EGRAC	1.14 \pm 0.43	1.15 \pm 0.35	0.9605
Homocysteine (μ mol/L)	6.28 \pm 0.92	17.36 \pm 5.80	0.0003
ALAT (UI/L)	34.5 \pm 8.2	30.7 \pm 9.7	0.3715
ASAT (UI/L)	131.9 \pm 18.4	185.7 \pm 25.7	0.0003

Table 2: Homocysteine metabolism, carnitine, lipids, oxidative stress and apoptosis in liver of 21 days aged pups from dams subjected to a diet deficient in methyl precursors.

Data are reported as means \pm SD and compared by ANOVA (n= 6 individuals in each group).

	Control	Deficient	<i>P-value</i>
Vitamin B12 (pmol/mg protein)	2.30 \pm 0.47	2.47 \pm 0.52	0.6140
Folate (nmol/mg protein)	1.16 \pm 0.19	0.23 \pm 0.05	<0.0001
LGRAC	1.16 \pm 0.16	0.97 \pm 0.42	0.3752
SAM (nmol/g tissue)	37.78 \pm 9.34	13.90 \pm 6.58	0.0016
SAH (nmol/g tissue)	11.18 \pm 3.23	10.34 \pm 5.30	0.7699
SAM / SAH Ratio	3.44 \pm 0.61	1.84 \pm 1.30	0.0381
MTHFR (nmol/h/mg protein)	3.5 \pm 0.5	0.9 \pm 0.2	<0.01
MTR (nmol/h/mg protein)	2.5 \pm 0.3	0.6 \pm 0.1	<0.01
CBS (nmol/h/mg protein)	83.6 \pm 6.3	48.6 \pm 2.9	<0.01
MAT (nmol/h/mg protein)	7.82 \pm 0.197	9.81 \pm 0.136	0.8783
BHMT (nmol/h/mg protein)	7.02 \pm 0.26	7.82 \pm 1.4	0.6907
Total carnitine (nmol/mg tissue)	1.62 \pm 0.14	0.91 \pm 0.38	0.0079
Free carnitine (nmol/mg tissue)	0.18 \pm 0.02	0.09 \pm 0.02	0.0002
Total lipids (μ g/mg tissue)	65.9 \pm 10.5	391.1 \pm 183.4	<0.0001
Cholesterol (μ g/mg tissue)	0.3 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2	0.2712
Triglycerides (μ g/mg tissue)	3.5 \pm 1.2	21.3 \pm 8.2	0.0196
GPX (nmol/min/mg protein)	381 \pm 67	158 \pm 33	<0.0001
SOD Cu/Zn (nmol/min/mg protein)	4.3 \pm 1.3	3.7 \pm 1.1	0.7524
SOD Mn (nmol/min/mg protein)	0.85 \pm 0.08	0.74 \pm 0.06	0.2618
GSH red (nmol/mg protein)	3.0 \pm 1.6	1.3 \pm 0.5	0.0980
MDA (μ mol/g tissue)	39.9 \pm 12.9	78.0 \pm 33.2	0.0361
Cytochrome c oxidase	419.9 \pm 36.7	460.8 \pm 13.8	0.0183
DNA fragmentation (%)	40.6 \pm 5.8	41.2 \pm 11.3	0.8617

Table 3: Univariate association between carnitine derivatives and determinants of methionine metabolism.

	Determinant	Correlation	95% confidence Interval	<i>P</i> -value
Total carnitines	Vitamin B12	-0.159	-0.46 – 0.43	0.9317
	LGRAC	0.183	-0.33 – 0.56	0.5770
	Folate	0.770	0.44 – 0.89	<0.0001
	SAM	0.898	0.38 – 0.88	0.0004
	SAH	-0.029	-0.52 – 0.38	0.7183
	SAM/SAH	0.682	0.25 – 0.84	0.0027
Free carnitines (C0)	Vitamin B12	-0.291	-0.50 – 0.38	0.7450
	LGRAC	0.178	-0.32 – 0.57	0.5445
	Folate	0.888	0.45 – 0.89	<0.0001
	SAM	0.961	0.36 – 0.88	0.0005
	SAH	-0.019	-0.56 – 0.33	0.5724
	SAM/SAH	0.766	0.30 – 0.86	0.0014
Acetylcarnitines (C2)	Vitamin B12	-0.094	-0.52 – 0.35	0.6574
	LGRAC	0.083	-0.40 – 0.50	0.7906
	Folate	0.771	0.42 – 0.88	0.0001
	SAM	0.922	0.46 – 0.90	<0.0001
	SAH	0.093	-0.44 – 0.47	0.9484
	SAM/SAH	0.570	0.19 – 0.83	0.0062
Acylcarnitines (C3-C5)	Vitamin B12	0.130	-0.544 – -0.702	0.7296
	LGRAC	-0.003	-0.631 – 0.628	0.9942
	Folate	0.447	-0.254 – 0.840	0.2028
	SAM	0.526	-0.155 – 0.868	0.1220
	SAH	-0.158	-0.716 – 0.524	0.6739
	SAM/SAH	0.416	-0.290 – 0.829	0.2413
Acylcarnitines (C6-C8)	Vitamin B12	-0.434	-0.835 – 0.269	0.2188
	LGRAC	0.298	-0.408 – 0.781	0.4165
	Folate	0.771	0.274 – 0.943	0.0068
	SAM	0.688	0.102 – 0.919	0.0257
	SAH	-0.244	-0.757 – 0.455	0.5094
	SAM/SAH	0.802	0.348 – 0.951	0.0035
Acylcarnitines (C10-C18)	Vitamin B12	-0.303	-0.783 – 0.404	0.4082
	LGRAC	0.358	-0.350 – 0.806	0.3211
	Folate	0.725	0.176 – 0.930	0.0150
	SAM	0.851	0.477 – 0.964	0.0009
	SAH	0.001	-0.629 – 0.630	0.9975
	SAM/SAH	0.709	0.143 – 0.925	0.0193

Correlation analyses were from data obtained in 10 individuals from control and deprived groups, respectively.

Table 4 : Hepatic concentration of markers of homocysteine metabolism and total and free carnitine in liver of 80 days aged rats that were subjected to a deprived diet during the 21 first days of life and subsequently to a normal diet.

	Control	Deficient	<i>P-value</i>
Vitamin B12 (pmol/mg tissue)	31.1 ± 7.5	43.1 ± 17.7	0.3197
Folate (nmol/mg protein)	13.6 ± 2.9	10.8 ± 2.2	0.1710
SAM (nmol/g tissue)	128.2 ± 26.0	124.0 ± 19.7	0.7615
SAH (nmol/g tissue)	44.3 ± 10.1	40.2 ± 9.3	0.4831
SAM / SAH Ratio	3.0 ± 0.9	3.1 ± 0.5	0.7548
Total carnitine (nmol/mg tissue)	235.3 ± 88.9	215.9 ± 92.6	0.7815
Free carnitine (nmol/mg tissue)	213.5 ± 68.6	179.5 ± 65.1	0.5080

Data are presented as means ± SD and compared by ANOVA (n= 6 individuals in each group).

Figure 1

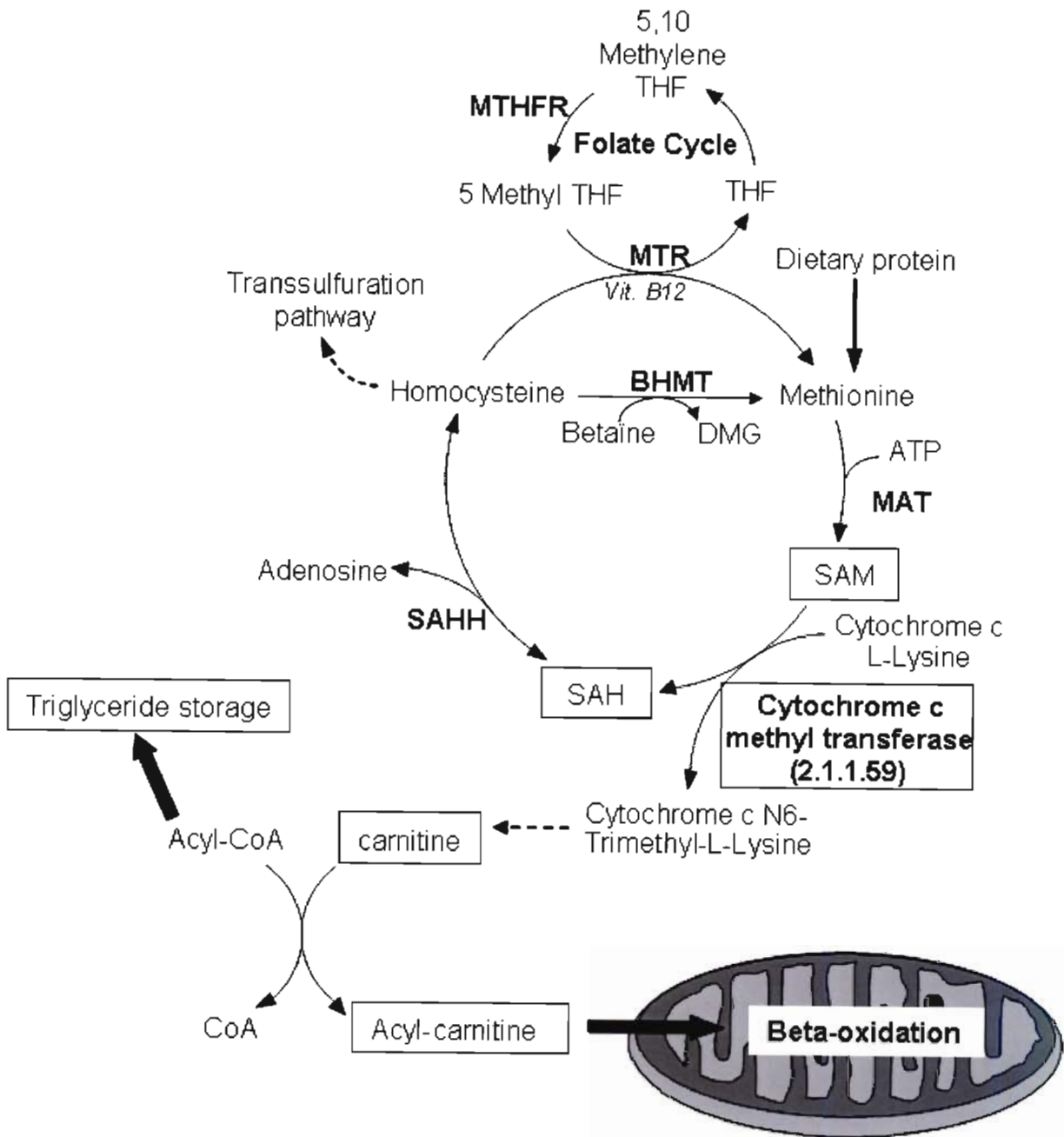


Figure 2

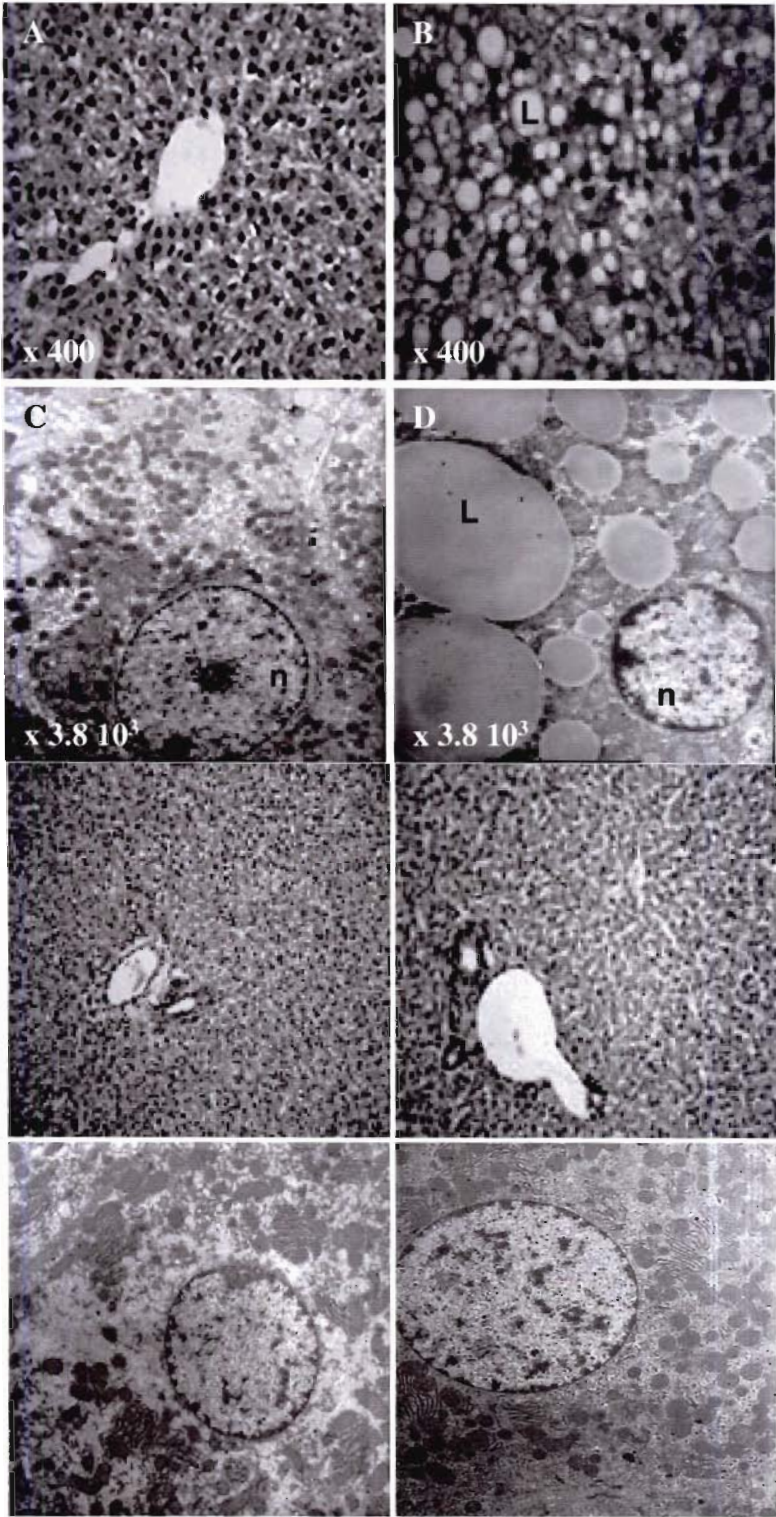


Figure 3

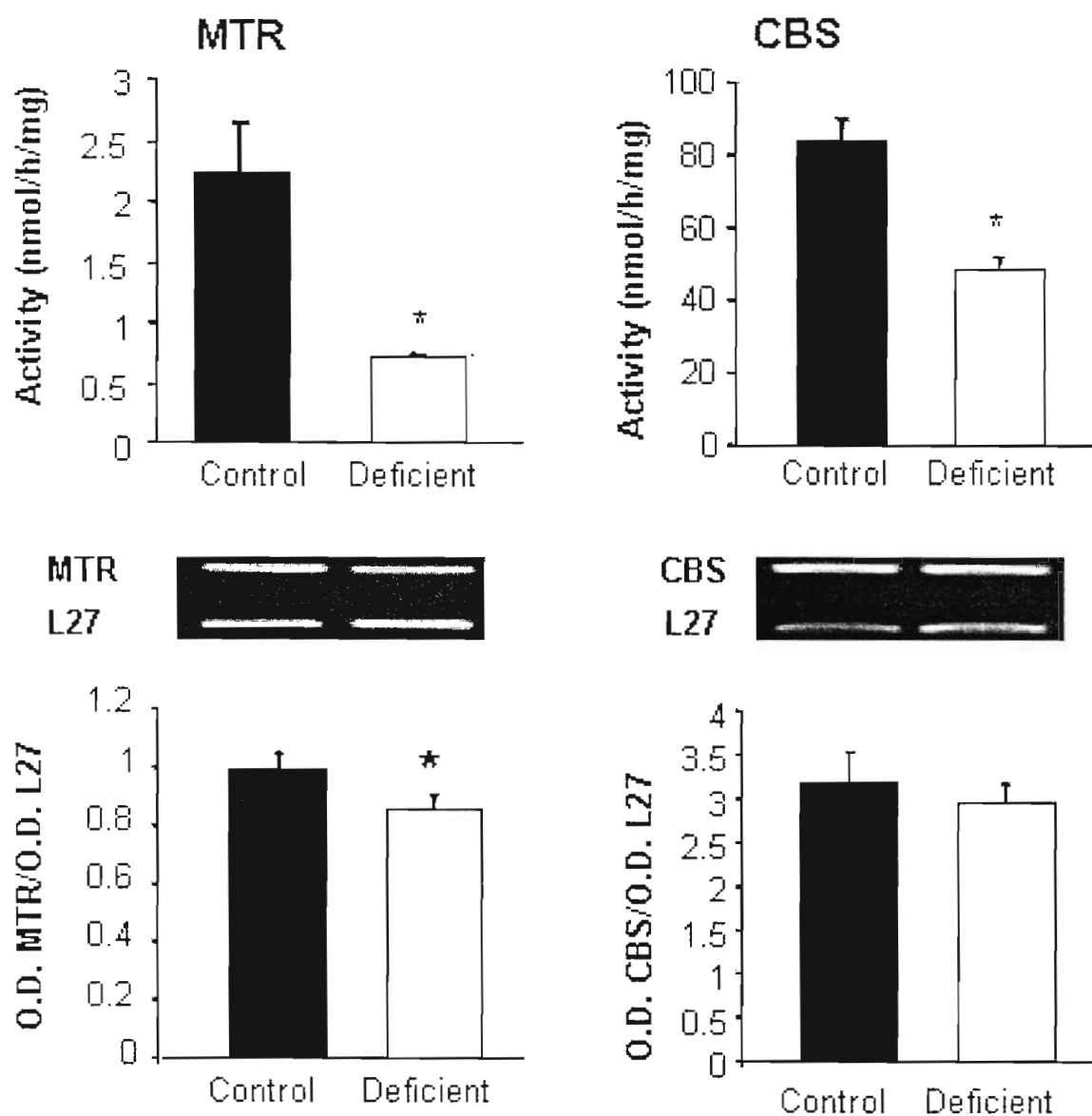


Figure 4

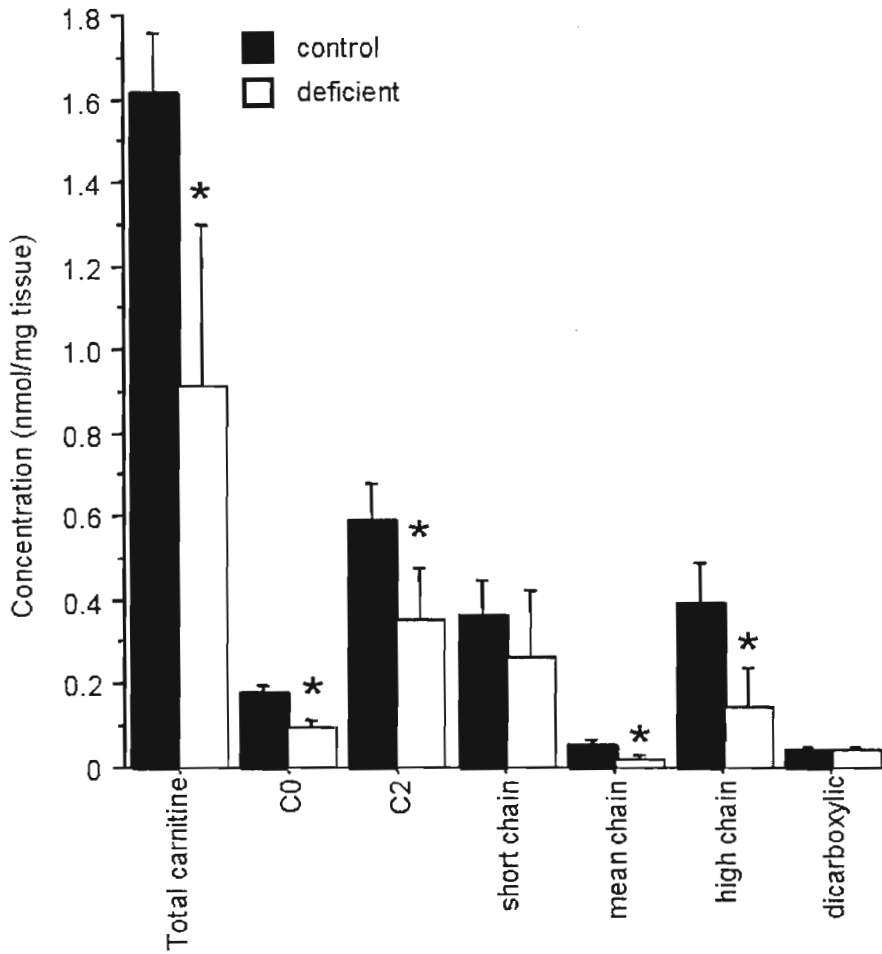
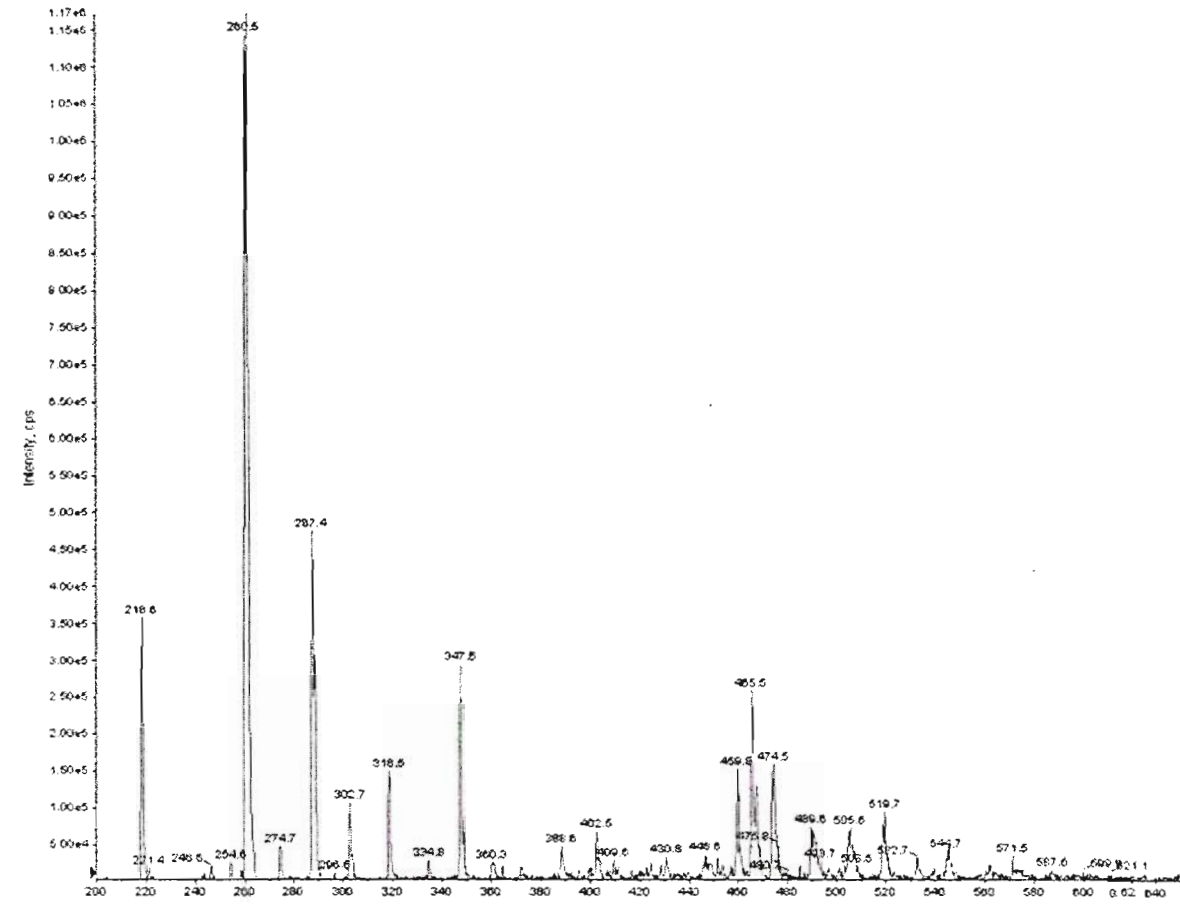
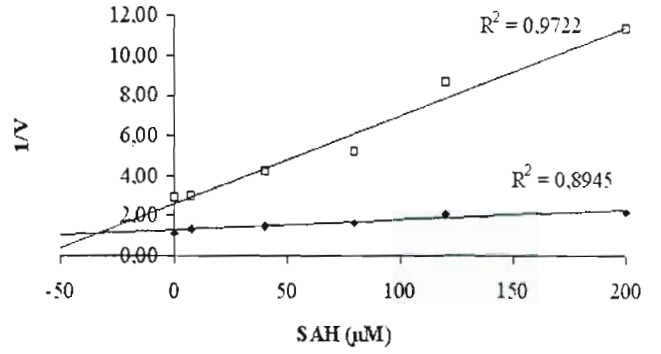
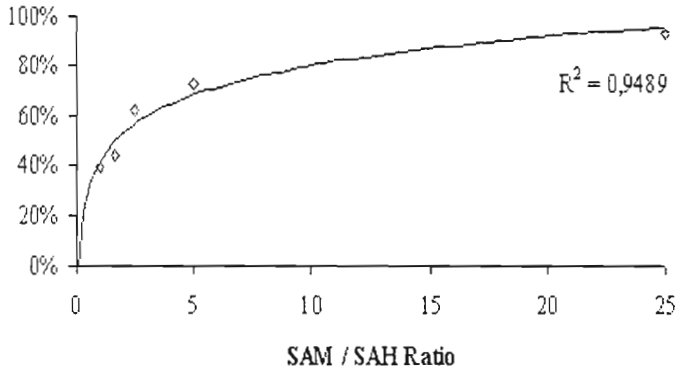
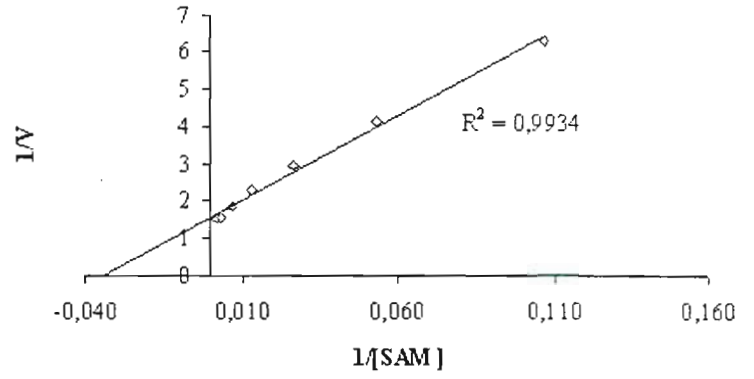
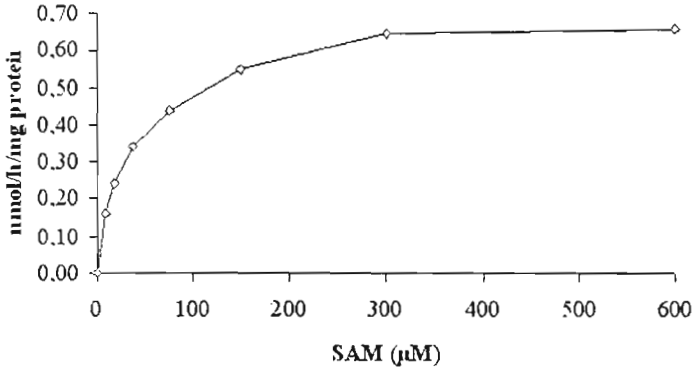


Figure 5



Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioural development in rats

Sébastien Blaise¹, Emmanuelle Nédélec¹, Henri Schroeder², Jean-Marc Alberto¹, Carine Bossenmeyer-Pourie¹, Jean-Louis Guéant¹, and Jean-Luc Daval¹

¹ Inserm U.724, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, and ² Neurosciences Comportementales, URAFPA, INRA UC12340, Faculté des Sciences, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Text pages: 16 ; Tables: 3 ; Figures: 7

Running head: Brain development in vitamin B-deficient rats

Author for correspondence:

Jean-Luc DAVAL, PhD
Inserm U.724, Faculté de Médecine
9 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 184
54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, FRANCE
Phone: (33) 3 83 68 32 82
Fax: (33) 3 83 68 32 79
E-mail: Jean-Luc.Daval@nancy.inserm.fr

This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). The assistance of Sandra Audonnet-Blaise was greatly appreciated. S.B. is indebted to the 'Région Lorraine' for financial support.

ABSTRACT

Hyperhomocysteinemia was identified as a risk factor for neurological disorders. To study the influence of early deficiency in nutritional determinants of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain, dams were fed a standard diet or a diet lacking methyl groups during gestation and lactation. Homocysteinemia progressively increased in the offspring of the deficient group to reach, at 21 days, 13.3 ± 3.7 versus 6.8 ± 0.3 $\mu\text{mol/L}$ in controls. Homocysteine accumulated in both neurons and astrocytes of selective brain structures including the hippocampus, the cerebellum, the striatum, and the neurogenic subventricular zone. Most homocysteine-positive cells expressed p53 and displayed fragmented DNA indicative of apoptosis. Righting reflex and negative geotaxis revealed a delay in the onset of integration capacities in the deficient group. Between 19 and 21 days, a poorer success score was recorded in deficient animals in a locomotor coordination test. A switch to normal food after weaning allowed restoring normal homocysteinemia. Nevertheless, at 80 days of age, the exploratory behaviour in the elevated-plus maze and the learning and memory behaviour in the eight-arm maze revealed that early vitamin B deprivation is associated with persistent functional disabilities, possibly resulting from the ensuing neurotoxic effects of homocysteine.

Key words: Pregnancy; nutritional deficiency; folate; vitamin B12; homocysteine; brain apoptosis, neurobehavioural development

Introduction

The sulphur-containing amino acid homocysteine (Hcy) is a metabolite of the essential amino acid methionine. It can be either remethylated to methionine by enzymes that require folate (vitamin B9) or cobalamin (vitamin B12) or catabolized by cystathionine β -synthase (CBS) to generate cysteine (1). Depending upon genetic, dietary and environmental factors, Hcy levels may vary considerably among individuals, and elevated plasma concentrations have been identified as a risk factor for a wide range of pathological situations, such as cardiovascular diseases, stroke, and neurodegenerative diseases (2-5). Clinically, it is usually considered that in adults the normal range of Hcy concentration in plasma is 5-10 μ M, and plasma levels of 12-15 μ M Hcy have been associated with an elevated risk of cardiovascular and neurodegenerative diseases (3,6). During pregnancy, severe complications have been associated with hyperhomocysteinemia, and the disturbance of maternal and fetal Hcy metabolism due to folate or vitamin B12 shortage has been shown to play a role in the etiology of recurrent early pregnancy loss, placental abruption, preeclampsia, as well as intrauterine growth retardation and neural tube defects (7-9). In addition, the prevalence of folate and vitamin B12 deficiency in the context of pregnancy is relatively high, especially in some countries from sub-Saharan Africa and North Europe (10-12), and an elevated Hcy level in the mother is usually recorded during the last trimester of pregnancy (13). Taken together, these observations foster studies on long term consequences of a dietary regimen that can influence homocysteinemia during the early period of life. Particularly, little is known about the effects of increased homocysteinemia in fetuses and neonates on their subsequent brain development, especially at the functional level. Kruman *et al.* (14) have reported that exposure to low concentrations of Hcy can trigger apoptosis in cultured hippocampal neurons from the embryonic rat brain, suggesting that the amino acid may directly exert adverse effects on neuronal cells. Similarly, cytotoxic effects of Hcy have been reported on rat astrocytes *in vitro* (15). We have recently set up a new, clinically relevant model for studying the consequences of a vitamin B-deficient diet during gestation on Hcy metabolism in the newborn rat (16). In the present study, we have used this model to investigate *in vivo* the long term neurophysiological effects of an early deficiency in nutritional determinants of hyperhomocysteinemia in the developing rat.

Materials and Methods

Animal treatments

Animal experiments were performed on Wistar rats (Charles River, l'Arbresle, France) and were conducted in accordance with the *N.I.H. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Adult female rats were maintained under standard laboratory conditions, on a 12 h/12 h light/dark cycle, with food and water available *ad libitum*. One month before pregnancy, they were fed with either standard food (n = 8) (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France) or with a diet lacking methyl donors, i.e. vitamins B12, B2, folate, and choline (n = 8) (Special Diet Service, Saint-Gratien, France), according to Blaise *et al.* (16). Choline was eliminated from the diet because the alternative pathway for the methylation of Hcy to form methionine is catalyzed by betainehomocysteine methyltransferase (BHMT, EC 2.1.1.5) that uses betaine, a metabolite of choline, as the methyl group donor. The assigned diet was constantly maintained until weaning of the offsprings (i.e. postnatal day 21); thereafter, all pups were fed with standard food until 80 days of age.

Sample collection

In some experiments, blood samples were collected from the tail in living animals. Otherwise, rat pups were killed by excess halothane at various developmental stages (2, 5, 21 or 80 days). Intracardiac blood samples were drawn for the measurement of plasma concentrations of vitamin B12, folate and Hcy, and the whole brain, including cerebellum, was rapidly harvested. For immunohistochemical analyses, brains were immediately frozen in methylbutane previously chilled to -30°C, and stored at -80°C. For metabolic studies, brain tissues were frozen in liquid nitrogen. They were then lysed at 4°C in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.3) containing protease inhibitors (Proteases inhibitor cocktail, Sigma Chemicals, St Louis, MO), and proteins samples were quantified according to Bradford (17).

Measurements of vitamin B12, folate and homocysteine concentrations

Plasma and cerebral concentrations of vitamin B12 and folate were determined by radiodilution isotope assay (simulTRAC-SNB, ICN Pharmaceuticals) (13). Hcy concentrations were assessed by fluorescent polarization immunoassay (IMX system Abbott, Norway) (12). Additionally, vitamin B2 status has been assessed by measuring the Erythrocyte Glutathione Reductase Activation Coefficient (EGRAC) which corresponds to the ratio between enzyme activities determined with and without the addition of the cofactor FAD (18).

Activities of cystathionine β -synthase and methionine synthase

Each enzymatic activity was measured on tissue samples corresponding to 400 μ g of total proteins. CBS activity was monitored by a method adapted from Taoka *et al.* (19), and methionine synthase (MS) activity by a method adapted from Chen *et al.* (20), as previously described by Blaise *et al.* (16). In addition, in an attempt to evaluate the methylation status of brain cells, the concentrations of S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocysteine (SAH) were monitored in brain tissue homogenates. For this purpose, the technique using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography was adapted from Delabar *et al.* (21). Proteins were precipitated with 0.2 N HClO₄, before injection on the column (Lichrospher®, 100 RP-C18, 5 μ m, 250x4 mm I.D). The mobile phase was applied at a flow rate of 0.75 mL/min and consisted in 50 mM sodium phosphate (pH 3.2), 10 mM heptan sulfonate and acetonitrile (10 to 20% from 0 to 20 minutes). Amounts of SAM and SAH were quantified by using an UV detector at 254 nm.

Methionine synthase and cystathionine β -synthase mRNA assays

MS and CBS transcripts were analyzed as previously described by Blaise *et al.* (16). Total RNAs were isolated from brain tissues using the Rneasy mini-kit from Qiagen (Courtaboeuf, France), and quantified by

spectrophotometry. Following control of RNA integrity, total RNA (2 µg) was reverse-transcribed using hexamer random primers and Omniscript (Qiagen) in a 20 µl volume reaction of a buffered mixture containing 0.5 mM dNTP. The cDNA products were two-fold diluted, and 2 µl were used as a template for each amplification in PCR. Reactions were performed with Taq DNA polymerase (Gibco Invitrogen Corporation, Cergy Pontoise, France) in 50 µl of a buffered solution containing 0.5 mM dNTP, and 0.5 µM of each primer. Separate PCR for MS, CBS and L-27 (internal standard) amplification were undertaken with the following oligonucleotides primers:

MS (NM 030864, 228 bp product):

Sense 5'CAGATATAATTGGCTTGTCAGGACT3'

antisense 5'TTTCATCTAACAGCTGAGAACACAC3'

CBS (NM 012522, 350 bp product):

sense 5'TTCCCCACATTACCACACAG3'

antisense 5'AGCACATCCACCTTCTCCAT3'

L- 27 (NM 022514, 364 bp product):

sense 5'GCTGTGCGAAATGGGCAAGTT3'

antisense 5'CAAACCTTGACCTTGGCCTCC3'.

Conditions of PCR allowing to be in the exponential phase of PCR were for MS: number of cycles (n)=31, annealing temperature (AT)=61 °C; for CBS, n =30, AT=56 °C; for L-27, n =27, AT=62 °C. Amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining and quantified by densitometry with ImageMaster 1D Primer software and ImageMaster apparatus (Amersham Pharmacia Biotech, Quebec, Canada). Amplicons were selective in amplifying the desired target mRNA. Results were expressed relatively to the mRNA levels of the housekeeping gene *L27* for ribosomal protein.

Immunohistochemical detection of homocysteine and apoptotic cells

Immunohistochemical analyses were performed on cryostat-generated 20-µm sagittal brain sections mounted onto glass slides, as described by Daval. *et al.* (22). For Hcy immunostaining, tissue sections were incubated in 2 N HCl for 45 min at room temperature followed by a 10 min wash in 0.1 M sodium borate at pH 8.5. Slides were dipped in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min, then in PBS containing 10% bovine serum for 1 h, and were incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal antibody against Hcy diluted at 1/100 (Chemicon International, Temecula, CA). Brain slices were then incubated for 1 h at room temperature in the presence of a secondary antibody (anti-rabbit IgG conjugated to AlexaFluor, 1/100, Molecular Probes, Cergy Pontoise, France). To identify the phenotype of Hcy-positive cells, tissue sections were also processed for the immunological detection of NeuN (a neuronal marker) or glial fibrillary acid protein (GFAP, a marker for astrocytes). The experimental protocol was as described above by using a mouse monoclonal antibody against NeuN (1/100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or a mouse monoclonal antibody against GFAP (1/200, Chemicon International) followed by the second-step antibody (anti-mouse IgG conjugated to AlexaFluor, (1/1000 Molecular Probes). For the specific detection of apoptosis, the method initially described by Frankfurt and Krishan (23) was used. Tissue sections previously fixed in 5% paraformaldehyde (4°C for 24 hours) were incubated in 50% formamide at 56°C for 30 min. After washing with phosphate buffer (PBS), tissue was blocked in PBS containing 10% bovine serum for 1 h, and then incubated overnight at 4°C with of Apostain F7-26 monoclonal antibody (AbCys SA, Paris, France) specific to single-stranded DNA. Brain sections were then rinsed with PBS and incubated for 1 hour with AlexaFluor-conjugated anti-mouse IgM (1/1000, Molecular Probes). According to the manufacturer, F7-26 monoclonal antibody can be

used in combination with another antibody, and co-labelling experiments were conducted with Hcy antibody. A test with bovine serum albumin and Hcy antibody was previously done to ensure the specificity of Hcy antibody after tissue incubation in formamide at 56°C. In addition, expression of the apoptosis-related protein p53 was analyzed in brain sections by means of a rabbit monoclonal antibody against p53 diluted at 1/100 (Santa Cruz) and its corresponding secondary antibody (anti-rabbit IgG conjugated to AlexaFluor, Molecular Probes). In all cases, control experiments were conducted by processing adjacent sections in the same way except that the primary antibody was omitted. For quantification of specifically labelled cells, total cell density in definite brain areas was calculated after staining cell nuclei by the fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 0.5 µg/mL in PBS, Sigma), according to Wolvetang *et al.* (24). The number of cell nuclei was scored at 365 nm under fluorescence microscopy (Axioscop, Zeiss, Strasbourg, France) at a 40x magnification in at least 6 separate experiments by counting cells with their nuclei present in the focal plane in 3 distinct section areas delineated by an ocular grid of 1/400 mm², and the amounts of cells exhibiting any of the selective markers were calculated as a percentage of total cells. DAPI staining was also used at higher magnification for chromatin observation and detection of apoptosis hallmarks.

Assessment of neurobehavioural development

Righting reflex: The static righting reflex was studied as described by Schroeder *et al.* (25). The time needed by the pup to right itself in a supine position was recorded for three consecutive days (postnatal days 3-5).

Negative geotaxis: This reflex was tested at postnatal days 8, 9 and 10. The rat was positioned with the head downward on an inclined plane with a 20% slope. The time needed for the pup to turn completely and reach a position with the head upward on the plane was measured. The duration of the test was limited to 120 sec (25).

Suspension time: The test was performed at postnatal day 10. The rat pup was suspended by its front paws grasping a metal rod (1 mm diameter) which was stretched between the two poles of a frame at about 20 cm above the table. A plexiglas sheet was placed in front of the rat to prevent it from turning around the rod. The time the animal remained on the bar was recorded. This test was performed before eyelid opening in order to control muscle strength by itself and eliminate the participation of emotivity (25).

Locomotor coordination: This test adapted by Schroeder *et al.* (25) was performed at postnatal days 19, 20, and 21. It is divided into three phases and its total duration is limited to 300 sec. During the first phase of the test, the rat is forced to swim in a round container (15 cm diameter and 23 cm height) half full of water. The animal is able to come out of the water by climbing along a metal rod (8 mm diameter) which is deep enough inside the water so that the rat necessarily encounters it during the swimming phase. The second phase represents the climbing period along the rod (35 cm). During the third phase, the animal reaches a platform on which it can restore a normal quadruped position after the climbing task. The time necessary for the rat to succeed, i.e. to reach the platform with the four paws after being put inside the water, was recorded. Respective times necessary to complete each of the three different phases of the test were also measured.

Elevated-plus maze: The elevated-plus maze is a validated test that evaluates anxiety in rodents (26). The apparatus was made of transparent Plexiglas. It comprises two open arms (50 10 cm), two enclosed arms (10 40 50 cm), and a central platform (10 10 cm). The configuration has the shape of a plus sign, and the apparatus is elevated 80 cm above the floor level. Grip on the open arms is facilitated by inclusion of a small edge (0.5 cm high) around their perimeter. Rats were tested at 80 days. They were brought to the room 2 h before the test and were tested individually. Before each trial, the maze was cleaned thoroughly with a 30% ethanol solution. At the beginning of the test, rats were placed on the central platform always facing the same open arm. The test lasted 5 min in standard laboratory conditions under red light. The testing device was video-recorded, and the experimenter supervised the test in an adjacent room. Videotapes were scored by a naive trained observer by using a software developed in our laboratory. Behaviours were encoded afterward directly on a PC keyboard. Data were then transferred for statistical analysis.

Activity and anxiety-related behaviours were assessed. Standard measures comprised: the total number of arm entries (arm entry defined as all four paws entering an arm), the number of open- and closed-arm entries, and the time spent in different sections of the maze (open and closed arms and central platform). In addition to conventional measures, two specific behavioural measures were recorded: rearing frequency and duration, and head dipping frequency (exploratory movement of head/shoulders over the sides of the maze). *Eight-arm maze*: Rats were tested at 80 days of age for spatial orientation, learning and memory capacities in the eight-arm radial maze according to the procedure originally described by Olton and Samuelson (27). Animals were food deprived to 85% of their body weight before testing and maintained at that weight during the 5 days of testing. The apparatus was a wooden gray, enclosed eight-arm radial maze with walls and entirely covered with a transparent top. Each of the arms (60 x 12 x 17 cm) projected from one side of an octagonal central platform measuring 50 cm in diameter. One food pellet (45 mg) was positioned at the far end of each arm. Before each trial, every arm of the maze was baited with a food pellet. Reinforcement was not replaced during the test. The whole apparatus was video-recorded from above under red light. At the beginning of the test, a white plastic cylinder (45 cm in diameter) was used to place the rats in the central platform. The cylinder was taken back, and animals were left in the maze until they had either entered all eight arms or until 15 min had elapsed, whichever occurred first. Placing all four paws inside an arm was recorded as an arm entrance. Times of arm entrances, the identity of each arm entered, and the serial order were recorded. All rats were tested for 5 consecutive days (one test per day).

Statistical analyses

Data were prospectively collected and analyzed with Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkeley, CA). Reported as means \pm standard deviation, raw data were compared by using one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's test. Regarding behavioural studies, the distribution of the data deviated quite strongly from normality and variances were not equal. Therefore, non-parametric statistics were used (28), and data were analyzed by χ^2 -test and Mann-Whitney *U*-test. Univariate z-correlation analyses were used to evaluate the relationships between plasma concentrations of vitamin B12, folate, Hcy, and the time to goal in negative geotaxis (day 8) and locomotor coordination (day 21) tests. For all analyses, a *p* value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Vitamin and homocysteine concentrations

In control rats, plasma concentrations of vitamin B12 and folate significantly decreased during development, while homocysteinemia progressively increased (Table 1). When pups were fed by dams receiving the deficient diet, plasma levels of vitamin B12 and folate were persistently reduced as compared to controls, and these observations were associated with increasing homocysteinemia. In contrast, the EGRAC value in rats subjected to the deficient diet (1.1 ± 0.4) was similar to that recorded in rats subjected to a normal diet (1.1 ± 0.3), suggesting the absence of vitamin B2 deprivation. In tissue homogenates issued from the whole brain, the deficient diet was associated with a significant reduction of folate concentration at 21 days of age, without concomitant alteration of vitamin B12 concentration. Correlatively, brain concentration of Hcy was significantly augmented in deficient rats. Though not shown in the Table, regional investigations showed a substantial increase in the cerebellum ($p < 0.01$), while changes in the hippocampus remained not significant ($p = 0.069$). Finally, cerebral concentration of SAM was unaffected by the dietary conditions, whereas SAH concentration was significantly enhanced by the early exposure to deficient diet. As a consequence, the brain SAM/SAH ratio was found to be markedly reduced in the deficient group (Table 1).

In parallel, substantial growth retardation was recorded in rats early exposed to the deficient diet, as previously documented (16). At postnatal day 21, body weight was reduced from 44.66 ± 3.13 g in controls to 17.72 ± 4.30 g in deficient animals ($n = 12$, $p < 0.0001$), while brain weight varied from 1.53 ± 0.08 g to 1.08 ± 0.03 g ($n = 12$, $p < 0.0001$).

Brain accumulation of homocysteine

As illustrated by Figure 1, Hcy immunoreactivity in deficient pups was dramatically increased in specific brain regions corresponding to the cerebellum, the hippocampus, the striatum (caudate nucleus and putamen), and the subventricular zone lining the lateral ventricle. In the cerebellum, strongest staining was detected in the granular cell layer. In the hippocampus, the CA1 pyramidal layer exhibited particularly high amounts of Hcy-reactive cells. In this structure, the percentage of total cells that were Hcy-positive was found to increase from 3.5 ± 1.5 in controls to 32.7 ± 9.1 ($p < 0.0001$) at 21 days of age. The density of Hcy-positive cells was lower in other hippocampal sub-regions, whereas the presence of Hcy was hardly detectable in the dentate gyrus and hilus. Such observations certainly account for the lack of significant changes in Hcy concentration in the total hippocampus. High magnification revealed that Hcy accumulated in the cytosol and is present in cell processes (Figure 2A-B). Further immunohistochemical experiments performed with specific cell markers in combination with Hcy antibody revealed that Hcy was present in both neurons and astrocytes, as illustrated by Figure 2B showing the localization of Hcy in CA1 hippocampal cells expressing either the neuronal protein NeuN or the glial marker GFAP.

Induction of apoptosis

At 21 days of age, immunological labelling of cells exhibiting single-stranded DNA (Apostain, a specific marker for apoptotic cells) showed a substantial increase (5-fold) of cells undergoing apoptosis in the CA1 hippocampal layer of rats exposed to the deficient diet as compared to controls (Figure 2C). In parallel, the number of cells expressing the well-known apoptosis-related protein p53 increased in the same proportion (Figure 2D-E). Co-labelling studies allowed to show that a high number of cells containing Hcy were positive for the specific antibody against single-stranded DNA as well as for p53, suggesting the occurrence of Hcy-associated apoptotic cell death in the hippocampus of deficient rats. The presence of apoptosis was further documented after DAPI staining by the identification of condensed chromatin and apoptotic bodies (Figure 2F). This procedure also showed that both neurons and astrocytes underwent apoptosis, but neurons appeared more prone to cell death (not shown). Finally, histological staining by thionin confirmed cell loss in

rats subjected to the deficient regimen, as shown by an obvious reduction of the thickness of the CA1 pyramidal layer that reached 48.2% (Figure 2G).

Methionine synthase and cystathionine β -synthase analyses

Since cellular Hcy can be eliminated by either MS (remethylation pathway) or CBS (transsulfuration pathway), these two enzymes were analyzed at postnatal day 21 in brain regions where Hcy was shown to accumulate as a consequence of the deficient diet. Results are only illustrated by studies performed in the cerebellum (Figure 3), and similar profiles were obtained in the other brain areas examined (not shown). Enzymatic activity of MS was dramatically altered by the nutritional conditions, and varied in the cerebellar tissue from 18.9 ± 4.3 nmol/h/mg in controls to 3.3 ± 0.4 nmol/h/mg in deficient animals ($n = 8$, $p < 0.0001$). By contrast, CBS activity remained unaffected, corresponding to 10.9 ± 1.8 nmol/h/mg in the deficient group *versus* 11.2 ± 1.9 nmol/h/mg in the control group ($n = 8$, $p = 0.8376$) (Figure 3, left panel). In an attempt to test whether alterations of gene transcription might account for the above observations, mRNA levels were also quantified. As shown by Figure 3 (right panel), neither the amounts of MS mRNAs nor the amounts of CBS mRNAs in the rat cerebellum appeared to be modified by the early exposure to the deficient diet. Indeed, no significant differences could be found in *MS/L27* ratio values between the two experimental groups, and the same conclusion can be drawn about *CBS/L27* ratios.

Neurobehavioural development

Righting reflex, negative geotaxis, and suspension time: No statistically significant difference was found between the two experimental groups (i.e. normal diet and deficient diet) in the percentage of animals that were able to achieve the tests evaluating righting reflex (postnatal days 3-5) and negative geotaxis (postnatal days 8-10) (Figure 4A-B). However, it is noticeable that in the former test, the time necessary to come back to a quadruped position was transiently but significantly increased in the deficient group compared to the control group on the second day of testing (12.8 ± 2.7 *versus* 5.8 ± 0.9 sec, $p < 0.05$). In the second test, the same observations were made for the time needed to turn up completely in the slope on both the first and second days of testing ($p < 0.05$). Regarding suspension time at postnatal day 10, the median time during which rat pups were able to grasp the metal rod before falling was similar in the two experimental groups (Figure 4C).

Locomotor coordination: As a whole, there was a statistically significant difference between the two animal groups in the global rates of success for the full test of locomotor coordination over the 3 days during which the experiment was repeated (Figure 5, top panel). On the third day, all control animals were successful in achieving the task, while 37% of rats early exposed to the deficient diet were unable to perform the test. In addition, the time necessary to perform the whole part of the test was persistently longer in deficient rats. According to our data, the swimming phase mainly accounted for the globally poorer performances recorded in deficient pups (Figure 5). Indeed, the success score was substantially reduced in deficient rats, and the time spent to swim and to find the pole inside the water was systematically longer for deficient animals than for their control congeners. In all cases, differences between controls and deficient pups remained significant after correction of the data for body weight.

Correlation studies

Plasma concentrations of Hcy were significantly correlated to concentrations of folate ($p < 0.0001$) and vitamin B12 ($p < 0.0001$) in 21-day-old rats. At this stage, brain weight was significantly correlated to plasma concentrations of folate ($p < 0.0001$), vitamin B12 ($p < 0.0001$), and homocysteine ($p < 0.0001$). At the functional level, the time to goal in negative geotaxis at postnatal day 8 was significantly correlated to plasma concentrations of folate ($p = 0.0455$), vitamin B12 ($p = 0.0078$) and Hcy ($p = 0.0002$), whereas the

time to achieve the full test of locomotor coordination at postnatal day 21 was correlated to plasma concentrations of vitamin B12 ($p = 0.0097$) and Hcy ($p < 0.0001$).

Consequences of dietary reversal at weaning

After weaning, rat pups which received the deficient regimen *in utero* and then through their mothers' milk were then fed with standard food until postnatal day 80. In order to evaluate the long term effects of the dietary reversal and to compare with control rats which received standard diet during the whole period, various parameters which are in line with Hcy metabolism were monitored again at 80 days of age. Table 2 shows that all factors studied appeared to return to basal values within two months after the switch of dietary regimen to normal food. Particularly, plasma and brain concentrations of Hcy were similar in the two experimental groups. Only plasma levels of folate were slightly more elevated in the previously deficient group compared with controls ($p = 0.0413$). It is noteworthy, however, that body weight and brain weight remained significantly altered at postnatal day 80. Indeed, the recorded mean body weight was 306.60 ± 13.52 g versus 373.80 ± 22.08 g in controls ($n = 12$, $p = 0.0004$), and mean brain weight was found to be 1.81 ± 0.93 g versus 2.07 ± 0.13 g ($n = 12$, $p = 0.0076$). Moreover, thionin staining depicted long lasting histological deficits in the CA1 hippocampus (Figure 6), whereas no patent morphological alterations could be seen in other brain regions, at least with the methods used.

Exploratory behaviour in the elevated-plus maze: The number of total arm entries as well as the percentage of entries in open arms were similar in the two experimental groups (Table 3). Also, the time spent in open arms and in "protected areas" (which include closed arms and the central platform) did not differ between previously deficient rats and controls. The number of rearings and rearing duration were significantly lower in the deficient group ($p = 0.043$ and $p = 0.012$, respectively). More specifically, rearing duration was reduced both on open arms ($p = 0.039$) and in protected areas ($p = 0.022$), and it is noteworthy that rearings occurred more frequently in protected areas ($p = 0.009$) and less frequently in open arms ($p = 0.009$). Finally, head dipping over the sides of the maze, another aspect of vertical exploratory behaviour, was also altered in the deficient group, its frequency being significantly reduced in open arms ($p = 0.018$) and augmented in closed arms ($p = 0.018$) (Table 3).

Learning and memory behaviour (the eight-arm maze): In the control group, the total time necessary to enter all eight arms of the maze progressively decreased over the 5 days of testing ($p = 0.001$ between day 1 and day 5, Wilcoxon's test) (Figure 7A). In parallel, the total number of arms visited per session and the total number of errors per session fell starting from the 4th day of testing (Figure 7B-C). As the deficient group needed approximately the same time to complete the task during the five consecutive sessions, the total number of arms visited per session and the corresponding number of errors markedly decreased between the first and the second days of testing to finally remain stable (Figure 7B-C). For the latter two parameters, the score was significantly different between the two experimental groups during sessions 2 and 3, inasmuch as the total number of arms visited and the number of errors during these two sessions were inferior in deficient animals. Finally, the total number of arms entered per min was lower in the deficient group than in the control group during sessions 2, 4 and 5, suggesting a reduced locomotor activity (Figure 7D).

Discussion

In line with elevated homocysteinemia, reduced intake of vitamins B, mainly folate and vitamin B12, has been implicated in several neurological and psychological disorders. Hcy has been associated with cognitive dysfunctions in Down syndrome and in the elderly, and it has been identified as a predictor of Alzheimer's disease (3,5,29-32). Our study showed that gestational vitamin B deficiency leads to accumulation of Hcy with concomitant apoptosis in selective brain areas, and persistently alters neurobehavioural capacities in developing rats. Physiologically, a progressive increase in Hcy plasma concentration was documented between birth and weaning in control animals. As previously reported, this observation can be attributed to developmental changes in the activities of hepatic enzymes involved in Hcy metabolism (33). At each developmental stage studied, the deficient diet resulted in a significant reduction of plasma concentrations in vitamin B12 and folate, with no biological evidence of vitamin B2 depletion, considering the EGRAC values. As a consequence, homocysteinemia was markedly augmented to reach values corresponding to clinically recognized "moderate" hyperhomocysteinemia in humans (16). In the brain tissue, early exposure to the deprived regimen was associated at 21 days of age with a lower folate concentration without concomitant alteration of vitamin B12 concentration, probably reflecting a sparing process. As expected, deficient rats displayed a noticeable brain accumulation of Hcy. In parallel, brain concentration of SAH was substantially elevated, whereas SAM concentration remained unaffected. This may be due to the reversed activity of the bi-directional enzyme SAH hydrolase in response to increased Hcy levels. Since SAH is itself a potent competitive inhibitor of SAM-mediated methylation reactions, the resulting fall of the SAM/SAH ratio can therefore affect DNA methylation and thus alter gene expression, as previously shown in rat hepatocytes (34). Immunohistochemical analyses revealed that Hcy was not distributed uniformly in the brain but accumulated in specific regions, including the cerebellum (predominantly in the granular cell layer), the hippocampus (mostly in the CA1 pyramidal layer), the striatum (in the caudate-putamen), and the subventricular zone lining the lateral ventricle. These observations are in good accordance with a pioneering study by Chung *et al.* (35) in transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation that reported high amounts of Hcy in the hippocampal CA1 layer, and in cerebellar nuclei. Similarly, Hcy was found to accumulate in the same brain areas in CBS^{-/-} mice, another model of hyperhomocysteinemia, where the authors also reported the presence of Hcy in Purkinje cells and basket cells in cerebellum (36). In addition, we showed the presence of Hcy in the subventricular zone which is known as a neurogenic site in the adult mammalian brain (37). This observation is of interest regarding the brain capacity to generate new cells inasmuch as it was recently reported that folate deficiency can inhibit proliferation of progenitors in the adult mouse brain (38). Regional examination of two key enzymes involved in Hcy metabolism, i.e. MS and CBS, revealed that the transsulfuration pathway – reflected by CBS activity – was not affected in the brain of deficient rats, by contrast to the severe alteration previously observed in the liver (16). Conversely, MS activity was dramatically reduced in deficient pups as compared to controls (e.g., it was ~ 6 fold less active in the cerebellar tissue of deficient rats than in controls), suggesting that the remethylation pathway may play a critical role in brain accumulation of Hcy in our model. According to our data, alteration of MS activities observed in the deficient group cannot be explained by changes in gene transcription. Reduced availability of folate, a cosubstrate for MS, and possibly of circulating vitamin B12 probably accounts for the decrease in enzyme activity. Furthermore, it has been reported that MS activity is mainly regulated at the posttranscriptional level (39,40).

Co-labelling studies showed that Hcy was present in both neuronal cells and astrocytes of deficient rats. Indeed, Hcy-positive cells expressed either NeuN or GFAP that are specific markers for neurons and astrocytes, respectively. Both types of neural cells have been reported to potentially accumulate Hcy (15,41,42). Until very recently, it was considered that only neurons, but not astrocytes, possessed sufficient amounts of the enzyme CBS to catabolize Hcy (43), and it was suggested that astrocytes need to export Hcy to neurons to keep low levels of the amino acid, whereas they take up cysteine (44). According to Benz *et al.*

(45), such a process could influence the functional crosstalk between neurons and astrocytes. It must be noticed, however, that it has been newly demonstrated that CBS is significantly expressed in astrocytes throughout the mouse brain (46). In the hippocampus of deficient rats, apoptosis was found in cells containing Hcy, in line with an increased expression of p53, one major step through which Hcy has been shown to promote apoptotic cell death (3). Hcy-induced neurotoxicity is known to also include DNA damage and altered DNA repair due to disturbance in the DNA methylation cycle, glutamate excitotoxicity via stimulation of NMDA receptors, endoplasmic reticulum stress, calcium overload, and oxidative stress (3,47). Clinically, it is known that elevated levels of Hcy are linked to neurological impairments and cognitive decline (3,6,48). Accordingly, the present study reports that neurobehavioural development was altered in hyperhomocysteinemic rats. Data recorded in early tests (i.e. righting reflex and negative geotaxis) certainly reflect delayed brain maturation (49), whereas the lack of difference in the suspension time between the two experimental groups is in favour of the absence of muscular weakness in deficient rats, in agreement with their harmonious growth retardation, as previously documented (16). At 19-21 days of age, global scores for achieving the test of locomotor coordination were significantly reduced following early exposure to the deficient regimen. Both the success scores and the time necessary to perform the tasks were affected in deficient rats, indicating poorer locomotor capacities. This cannot be attributed to global growth retardation, since differences persisted after correcting for body weight. It can be hypothesized that the accumulation of Hcy recorded in motor areas such as the cerebellum and the striatum may account, at least partly, for these observations. It has been recently shown that experimentally-induced increase of Hcy amounts in striatal regions decreased dopamine concentrations and reduced locomotor activity in mice and rats (50). To our knowledge, no study has investigated the potential reversibility of hyperhomocysteinemia effects in a nutritional animal model. When deficient pups were fed with standard food after weaning, homocysteinemia returned to normal values. Brain levels of folate, Hcy as well as MS enzymatic activity were no longer different from controls. In the elevated plus-maze, global exploration of open- and closed arms was similar in the two experimental groups. Nevertheless, detailed analysis revealed that the previously deficient group exhibited a reduced vertical exploratory behaviour as compared to controls. This was reflected by significant decreases in the total number and duration of rearings. Also, both rearing and head-dipping frequencies were significantly reduced in open arms and augmented in secure areas. According to several authors (51-53), such postural elements in the elevated plus-maze would be indicative of "risk assessment", and our observations may reflect lower propensity to take risks rather than anxiety itself. This is in good agreement with behavioural scores recorded in the eight-arm maze where previously deficient rats, by contrast to controls, needed a rather constant time over the 5 sessions to visit all arms, suggesting impaired spatial memory. Nonetheless, such a slowness was associated with a lower number of errors compared with controls as soon as the 2nd day of testing. It can therefore be speculated that rats of the deficient group are more circumspect before entering an arm, need more time for risk assessment and decision making, to finally commit less errors than controls. The hippocampus has been reported to be prominently involved in spatial working memory, and the integrity of CA1 and CA3 pyramidal neurons – including their inter-connections – is known to be of critical importance in learning and retrieval of spatial memory (54), suggesting that the observed Hcy-associated cell apoptosis may have directly – and durably – affected the capacities of deficient rats. Also, Hcy is known to act on glutamatergic NMDA and metabotropic receptors which are crucial for spatial learning and neuronal plasticity (55). In conclusion, the present study provides new insights to the brain response to early deprivation in methyl-donors and thus to the resulting shortage of homocysteine metabolism. The data suggest the occurrence of long term functional disabilities, even in case of subsequent dietary normalization. Although a direct effect of folate and vitamin B12 deficiency cannot be excluded, for example via SAM depletion which can result in decreased DNA methylation and enhanced DNA damage or via increased synthesis of TNF- α related to vitamin B12 deprivation (3,56,57), our observations may be the reflection of Hcy-mediated apoptotic cell death in sensitive brain areas involved in motor functions (striatum,

cerebellum) or in learning and memory (hippocampus), whereas the generation of new neural cells might additionally be compromised by the dietary conditions. Therefore, authorities should be aware of the potential risk incurred by infants from women exposed during their pregnancies to a dietary regimen deprived in methyl donors, especially folate and vitamin B12.

References

1. Finkelstein JD: The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998, 157 Suppl 2:S40-S44
2. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE: Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998, 49:31-62
3. Mattson MP, Shea TB: Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003, 26:137-146
4. Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Romano A, Namour B, Spada RS, Caraci F, Tringali G, Ferri R, Guéant JL: Association of IL-1 RN*2 allele and methionine synthase 2756 AA genotype with dementia severity of sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004, 75:1036-1038
5. Guéant JL, Anello G, Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Romano A, Barone C, Gérard P, Romano C: Homocysteine and related genetic polymorphisms in Down's syndrome IQ. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005, 76:706-709
6. Herrmann W: The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview. *Clin Chem Lab Med* 2001, 39:666-674
7. Hague WM: Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003, 17: 459-469
8. Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, Ferri R, Romano A, Candito M, Namour B: Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clin Chem Lab Med* 2003, 41:1473-1477
9. Botto LD, Lisi A, Robert-Gnansia E, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Botting B, Cochi G, de Vigan C, de Walle H, Feijoo M, Irgens LM, McDonnell B, Merlob P, Ritvanen A, Scarano G, Siffel C, Metneki J, Stoll C, Smithells R, Goujard J: International retrospective cohort study of neural tube defects in relation to folic Acid recommendations: are the recommendations working? *Obstet Gynecol Surv* 2005, 60:563-565
10. 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
11. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, Lopez MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martinez-Frias ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD: Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003, 40:619-625
12. Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Guéant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Guéant JL: High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677 C → T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr* 2004, 79:619-624
13. Chery C, Barbe F, Lequere C, Abdelmoutaleb I, Gérard P, Barbarino P, Boutroy JL, Guéant JL: Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 2002, 40:1105-1108
14. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Fruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP: Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 2000, 20:6920-6926
15. Maler JM, Seifert W, Huther G, Wiltfang J, Ruther E, Kornhuber J, Bleich S: Homocysteine induces cell death of rat astrocytes in vitro. *Neurosci Lett* 2003, 347:85-88
16. Blaise S, Alberto JM, Nédélec E, Ayav A, Pourié G, Bronowicki JP, Guéant JL, Daval JL: Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr Res* 2005, 57:777-782

17. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72:248-254
18. Ayav A, Alberto JM, Barbe F, Brunaud L, Gérard P, Merten M, Guéant JL: Defective remethylation of homocysteine is related to decreased synthesis of coenzymes B2 in thyroidectomized rats. *Amino Acids* 2005, 28:37-43
19. Taoka S, Ohja S, Shan X, Kruger WD, Banerjee R: Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity. *J Biol Chem* 1998, 273:25179-25184
20. Chen Z, Chakraborty S, Banerjee R: Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *J Biol Chem* 1995, 270:19246-19249
21. Delabar U, Kloor D, Luippold G, Muhlbauer B: Simultaneous determination of adenosine, S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in biological samples using solidphase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999, 724:231-238
22. Daval JL, Pourié G, Grojean S, Lièvre V, Strazielle C, Blaise S, Vert P: Neonatal hypoxia triggers transient apoptosis followed by neurogenesis in the rat CA1 hippocampus. *Pediatr Res* 2004, 55:561-567
23. Frankfort OS, Krishan A: Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem* 2001, 49:369-378
24. Wolvetang EJ, Johnson KL, Krauer K, Ralph SJ, Linnane AW: Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett* 1994, 339:40-44
25. Schroeder H, Humbert AC, Koziel V, Desor D, Nehlig A: Behavioural and metabolic consequences of neonatal exposure to diazepam in developing rats. *Exp Neurol* 1995, 131:53-63
26. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M: Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 1985, 14:149-67
27. Olton DS, Samuelson RJ: Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *J Exp Psychol Anim Behav Proc* 1976, 2:97-116
28. Winer RI: *Statistical Principles in Experimental Design*. New York, McGraw-Hill, 1971
29. Riggs KM, Spiro A 3rd, Tucker K, Rush D: Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr* 1996, 63:306-314
30. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA: Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002, 346:476-483
31. Miller JW: Homocysteine, Alzheimer's disease, and cognitive function. *Nutrition* 2000, 16:675-677
32. McCaddon A, Regland B: Homocysteine and cognition – No longer a hypothesis? *Med. Hypotheses* 2006, 66:682-683
33. Okada G, Watanabe Y, Tsukada K: Changes in patterns of S-adenosylmethionine synthetases in fetal and postnatal rat liver. *Cancer Res* 1980, 40:2895-2897
34. Garcia-Trevijano ER, Martinez-Chantar ML, Latasa MU, Mato JM, Avila MA: NO sensitizes rat hepatocytes to proliferation by modifying S-adenosylmethionine levels. *Gastroenterology* 2002, 122:1355-1363
35. Chung YH, Hong JJ, Shin CM, Joo KM, Kim MJ, Cha CI: Immunohistochemical study on the distribution of homocysteine in the central nervous system of transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation. *Brain Res* 2003, 967:226-234
36. Robert K, Santiard-Baron D, Chasse JF, Paly E, Aupetit J, Kamoun P, London J, Janel N: The neuronal SAPK/JNK pathway is altered in a murine model of hyperhomocysteinemia. *J Neurochem* 2004, 89:33-43
37. Kokaia Z, Lindvall O: Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol* 2003, 13:127-132
38. Kruman II, Mouton PR, Emokpae R Jr, Cutler RG, Mattson MP: Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *Neuropharmacol Neurotoxicol* 2005, 16:1055-1059

39. Yamada K, Kawata T, Wada M, Isshiki T, Onoda J, Kawanishi T, Kunou A, Tadokoro T, Tobimatsu T, Maekawa A, Toraya T: Extremely low activity of methionine synthase in vitamin B-12-deficient rats may be related to effects on coenzyme stabilization rather than to changes in coenzyme induction. *J Nutr* 2000, 130:1894-1900
40. Oltean S, Banerjee R: Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. *J Biol Chem* 2003, 278:20778-20784
41. Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP: Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002, 80:101-110
42. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, Rogers E: Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 2003, 14:32-42
43. Robert K, Vialard F, Thiery E, Toyama K, Sinet PM, Janel N, London J: Expression of the cystathionine beta synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain. *J Histochem Cytochem* 2003, 51:363-371
44. Huang G, Dragan M, Freeman D, Wilson JX: Activation of catechol-O-methyltransferase in astrocytes stimulates homocysteine synthesis and export to neurons. *Glia* 2005, 51:47-55
45. Benz B, Grima G, Do KQ: Glutamate-induced homocysteic acid release from astrocytes: possible implication in glia-neuron signaling. *Neuroscience* 2004, 124:377-386
46. Enokido Y, Suzuki E, Iwasawa K, Namekata K, Okazawa H, Kimura H: Cystathionine β synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. *FASEB J* 2005, 19:1854-1856
47. Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB: Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res* 2002, 70:694-702
48. Bottiglieri T, Hyland K: S-adenosylmethionine levels in psychiatric and neurological disorders: a review. *Acta Neurol Scand* 1994, Suppl 154:19-26
49. Grojean S, Schroeder H, Pourié G, Charriaut-Marlangue C, Koziel V, Desor D, Vert P, Daval JL: Histopathological alterations and functional brain deficits after transient hypoxia in the newborn rat pup: a long term follow-up. *Neurobiol Dis* 2003, 14:265-278
50. Lee ES, Chen H, Soliman KF, Charlton CG: Effects of homocysteine on the dopaminergic system and behaviour in rodents. *Neurotoxicology* 2005, 26:361-371
51. Cruz APM, Frei F, Graeff FG: Ethopharmacological analysis of rat behaviour on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1994, 49:171-176
52. Rodgers RJ, Johnson NJT: Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1995, 52:297-303
53. Weiss SM, Wadsworth G, Fletcher A, Dourish CT: Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 1998, 23:265-271
54. Stublely-Weatherly L, Harding JW, Wright JW: Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Res* 1996, 716:29-38
55. Riedel G, Platt B, Micheau J: Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 2003, 140:1-47
56. Wainfan E, Poirier LA: Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 1992, 52:2071s-2077s
57. Scalabrino G, Peracchi M: New insights into the pathophysiology of cobalamin deficiency. *Trends Mol Med* 2006, 12:247-254

Table 1: Effects of the dietary regimen on concentrations of homocysteine and homocysteine determinants in developing rats.

Age	Normal diet			Deficient diet		
	day 2	day 5	day 21	day 2	day 5	day 21
Plasma Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	2.4 \pm 0.4	2.3 \pm 0.3	6.8 \pm 0.3 ^{a,b}	5.1 \pm 2.1	11.4 \pm 0.7 ^{a*}	13.3 \pm 3.7 ^{a,b*}
Plasma vit B12 (pmol/L)	5579.0 \pm 1348.3	2344.5 \pm 429.6 ^a	1202.6 \pm 161.5 ^{a,b}	2276.0 \pm 118.2 [*]	1036.6 \pm 525.5 ^{a*}	333.6 \pm 61.4 ^{a,b*}
Plasma folate (nmol/L)	203.0 \pm 44.6	145.3 \pm 21.7 ^a	86.9 \pm 15.5 ^{a,b}	180.2 \pm 38.8	76.2 \pm 21.8 ^{a*}	33.1 \pm 10.7 ^{a,b*}
Brain Hcy (pmol/mg prot)	n.d.	n.d.	99.7 \pm 9.8	n.d.	n.d.	133.8 \pm 14.2 [*]
Brain vit B12 (pmol/mg tissue)	n.d.	n.d.	451.6 \pm 169.8	n.d.	n.d.	416.6 \pm 72.1
Brain folate (nmol/mg tissue)	n.d.	n.d.	70.4 \pm 12.3	n.d.	n.d.	33.9 \pm 8.4 [*]
Brain SAM (nmol/g)	n.d.	n.d.	20.3 \pm 5.5	n.d.	n.d.	22.0 \pm 14.4
Brain SAH (nmol/g)	n.d.	n.d.	0.9 \pm 0.4	n.d.	n.d.	2.0 \pm 1.2 [*]
SAM/SAH ratio	n.d.	n.d.	32.9 \pm 6.9	n.d.	n.d.	11.8 \pm 1.8 [*]

Data are means \pm SD and were obtained from 6 individuals at each developmental stage. Statistically significant differences ($p < 0.05$, ANOVA): ^{*} between deficient diet and normal diet; ^a versus day 2; ^b versus day 5. Hcy = homocysteine; SAM = S-adenosylmethionine; SAH = S-adenosylhomocysteine; n.d. = not determined.

Table 2: Effect of dietary reversal to normal food at weaning on concentrations of homocysteine and its determinants in 80-day-old rats

	Control group (n = 5)	Deficient group (n = 5)
Plasma Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	10.0 \pm 0.6	8.4 \pm 1.7
Plasma vitamin B12 (pmol/L)	727.4 \pm 95.5	837.2 \pm 55.6
Plasma folate (nmol/L)	144.2 \pm 59.8	232.2 \pm 54.7*
Brain Hcy (nmol/mg prot)	431.3 \pm 72.6	357.7 \pm 97.3
Brain vitamin B12 (pmol/mg)	363.4 \pm 51.9	341.6 \pm 27.5
Brain folate (nmol/mg)	73.2 \pm 22.6	80.8 \pm 9.3
Brain MS activity (nmol/h/mg)	6.0 \pm 2.6	5.0 \pm 2.6
Brain CBS activity (nmol/h/mg)	3.8 \pm 0.4	3.6 \pm 0.7

Data are means \pm SD. Statistically significant difference between the two experimental groups: * $p < 0.05$ (ANOVA). Hcy = homocysteine; MS = methionine synthase; CBS = cystathionine β -synthase.

Table 3: Effect of early exposure to the deficient diet followed by dietary reversal to normal food at weaning on specific behaviours in the elevated-plus maze in 80-day-old rats.

Behavioural Items	Control group	Deficient group
	(n=14)	(n=22)
Total number of arm entries	27.5 (8)	26 (8)
Percent entries on open arms	20 (5.2)	22 (9.1)
Percent entries in protected areas	80 (4.0)	79.6 (8.7)
Time spent on open arms (s)	159.1 (54.6)	135.7 (85.8)
Time spent in protected areas (s)	140.9 (54.6)	164.3 (87.7)
Total number of rearings	16.5 (10)	12 (10)*
Percent rearings on open arms	17.2 (20.7)	5.3 (13.5)**
Percent rearings in protected areas	82.8 (20.7)	94.7 (13.5)**
Total rearing duration	26.4 (15.5)	18.3 (11.2)*
Rearing duration on open arms (s)	3.1 (2.7)	0.7 (4)*
Rearing duration in protected areas (s)	23.2 (20)	16.0 (11.5)*
Total number of head dips	17.0 (4.5)	16.0 (8.0)
Percent head dips on open arms	79.9 (20.8)	71.3 (20.1)*
Percent head dips in protected areas	20.1 (15.5)	28.7 (20.1)*

Values correspond to medians with interquartiles in parentheses; s = seconds. Statistically significant difference between the two experimental groups: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (two-tailed Mann Withney U-test). Protected areas include closed arms and the central platform.

Legends to Figures

Figure 1: Brain distribution of homocysteine at postnatal day 21 in control rats and those early exposed to the deficient diet. Immunostaining of homocysteine-positive cells was performed on sagittal brain sections by means of a specific antibody (n = 6 per group). In the deficient group, sustained accumulation of homocysteine was observed in the brain structures shown, i.e. the cerebellum (granular layer), the CA1 area of the hippocampus (pyramidal cell layer), the caudate nucleus, and the subventricular zone lining the lateral ventricle; V: ventricle, Pyr: pyramidal cell layer, M: molecular layer of the cerebellum, G: granular layer, W: white matter (magnification x 20).

Figure 2: Immunohistochemical identification of homocysteine-containing cells and associated apoptosis in the CA1 hippocampus of 21-day-old rats exposed to the deficient regimen. *Panel A:* Localization of Hcy in pyramidal cells counterstained with Dapi (magnification x 100). *Panel B:* Tissue sections were colabelled with either a neuronal marker (NeuN) or a glial marker (GFAP) (magnification x 40). *Panel C:* Apoptosis was analyzed by means of the Apostain F7-26 specific monoclonal antibody against single-stranded DNA. *Panel D:* Immunohistochemical detection of Hcy and p53 in cells counterstained by Dapi (magnification x 40). *Panel E:* Amounts of cells positive to Hcy, apostain and p53 in the CA1 pyramidal cell layer. Cell counts were performed in brain sections from 7 different animals for both experimental groups. Data were calculated as a percentage from total cells (stained by Dapi) and reported as means \pm S.D. Statistically significant difference between the two experimental groups: ** $p < 0.0001$ (ANOVA, Fischer test). *Panel F:* Arrows = apoptosis hallmarks as depicted by nuclear staining with Dapi (magnification x 100). *Panel G:* Thionin coloration of the CA1 hippocampus in control and deficient rats (magnification x 40).

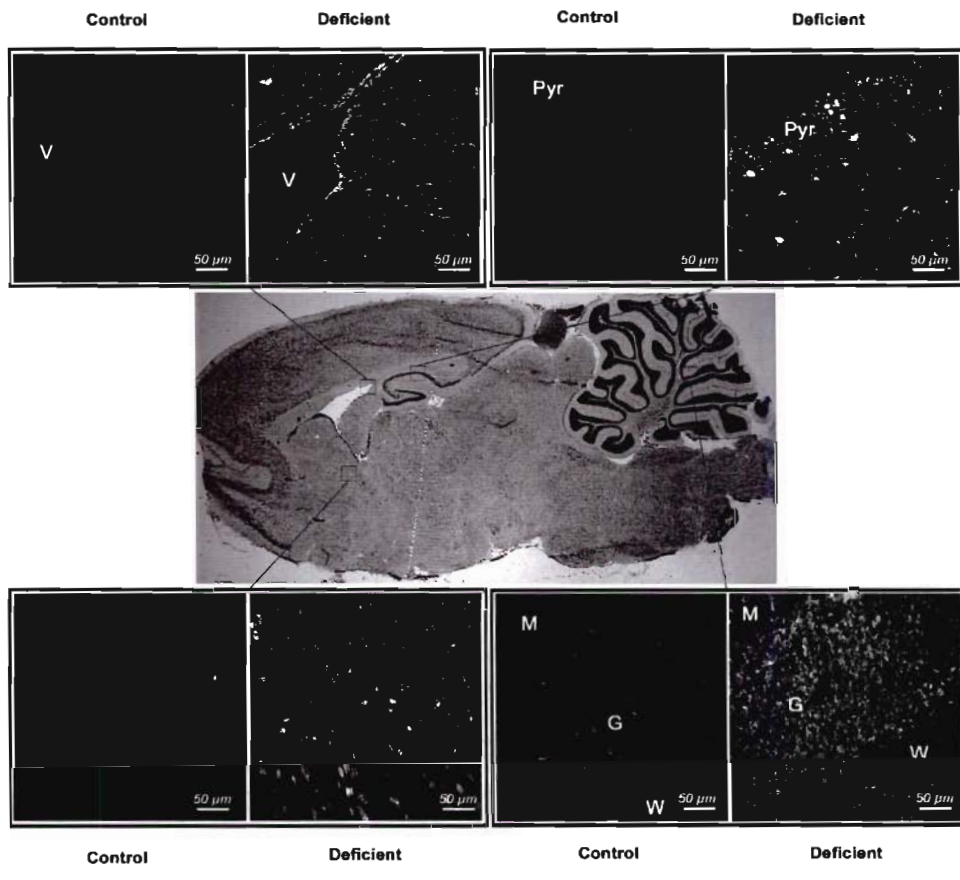
Figure 3: Effect of the deficient diet on methionine synthase (MS) and cystathionine β synthase (CBS) activities (n = 8, left panel) and their mRNA levels (n = 8, right panel) in the cerebellum of 21-day-old rats. Values are means \pm SD. C = control, D = deficient. Statistically significant difference between the two experimental groups: ** $p < 0.0001$ (ANOVA)

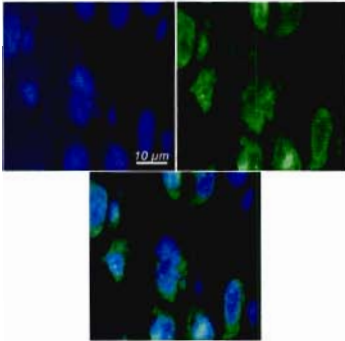
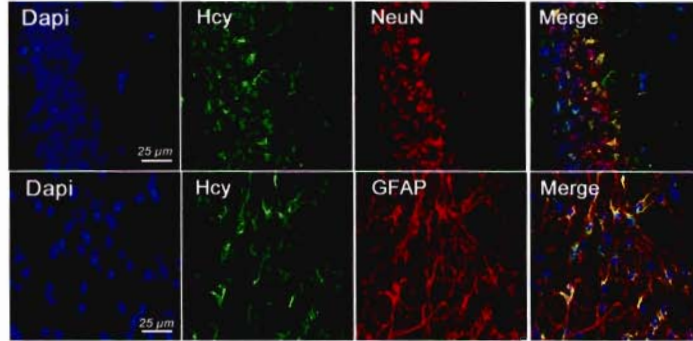
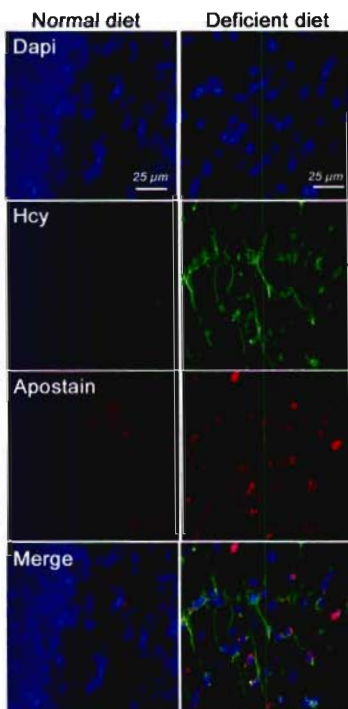
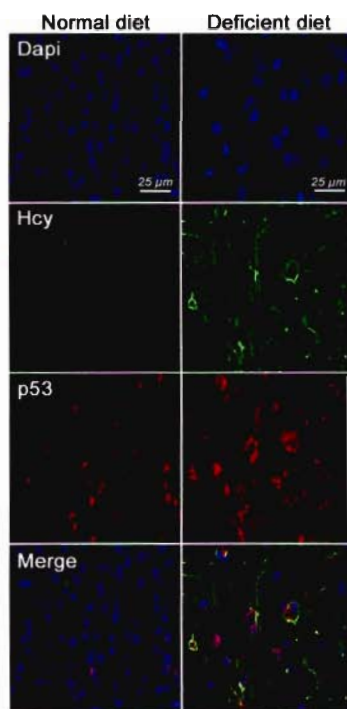
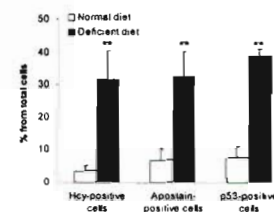
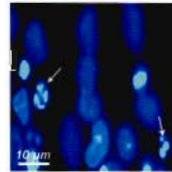
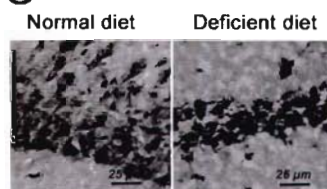
Figure 4: Effects of the dietary regimen on neurobehavioural development of rat pups (n=30 per group). For righting reflex and negative geotaxis, score values represent percentages of successful animals (*left panels*) and median times (in seconds) for performing the test (*right panels*). Suspension times are given as medians and quartiles. Statistically significant differences between the two experimental groups: * $p < 0.05$ (two tailed Mann Withney Utest).

Figure 5: Effects of the dietary regimen on locomotor coordination evaluated at 19-21 days of age (n=35 per group). Score values represent percentages of successful animals (*left panels*) and median times (in seconds) for performing the whole test and to achieve the various phases of the test (*right panels*). Statistically significant difference between the two experimental groups: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.0001$ (two-tailed Mann Withney U-test).

Figure 6: Thionin coloration of the CA1 hippocampus in control and previously deficient rats at 80 days of age (40 x magnification).

Figure 7: Effect of early exposure to the deficient diet followed by dietary reversal to normal food at weaning on the rat behaviour in the eight-arm maze at postnatal day 80. Data represent median values from 14 control rats and 22 rats previously exposed to deficient diet. Statistically significant difference between the two experimental groups: * $p < 0.05$ (Mann-Whitney U-test).



A**B****C****D****E****F****G**

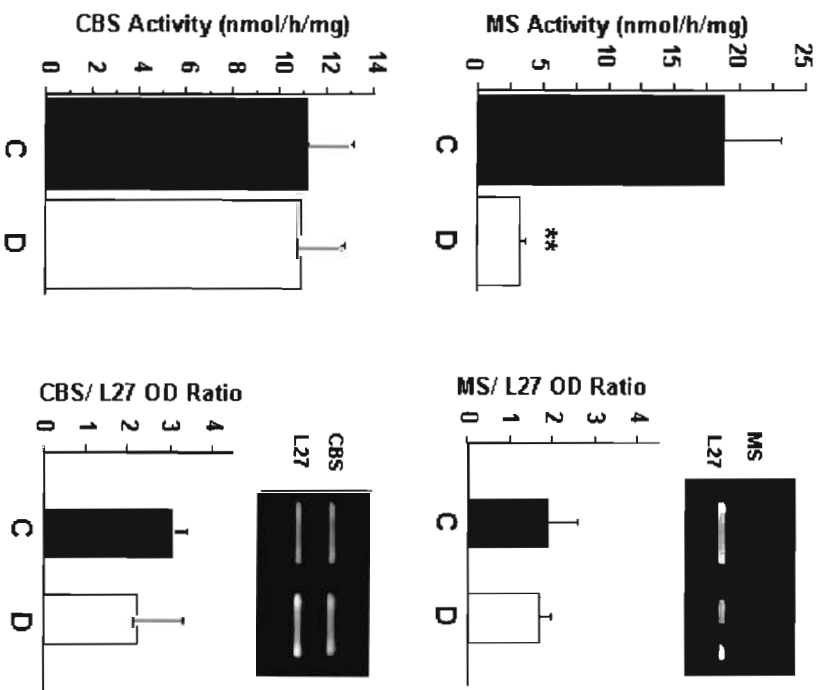
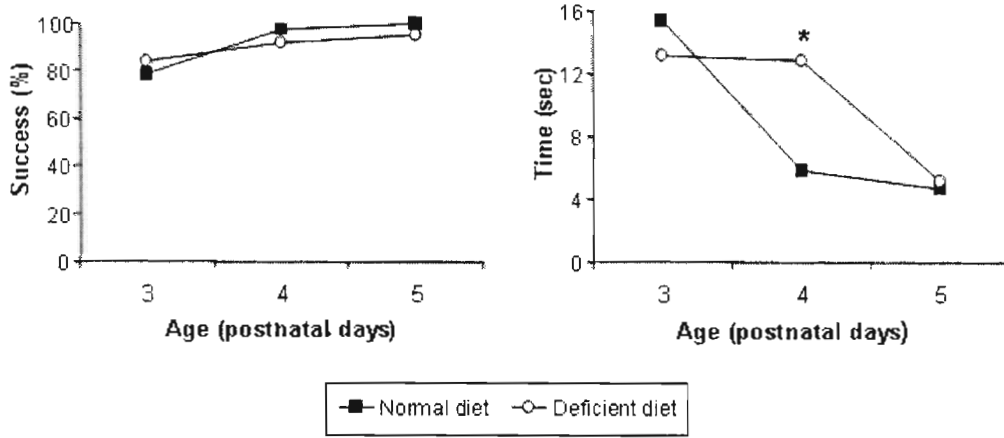
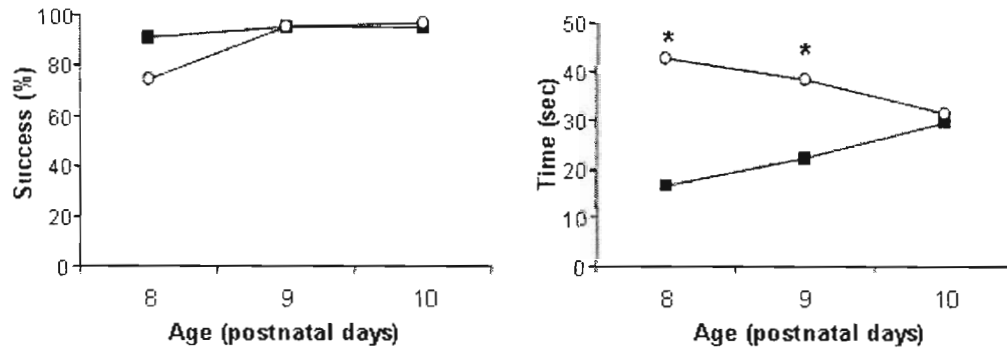


Fig 3

A- Righting reflex

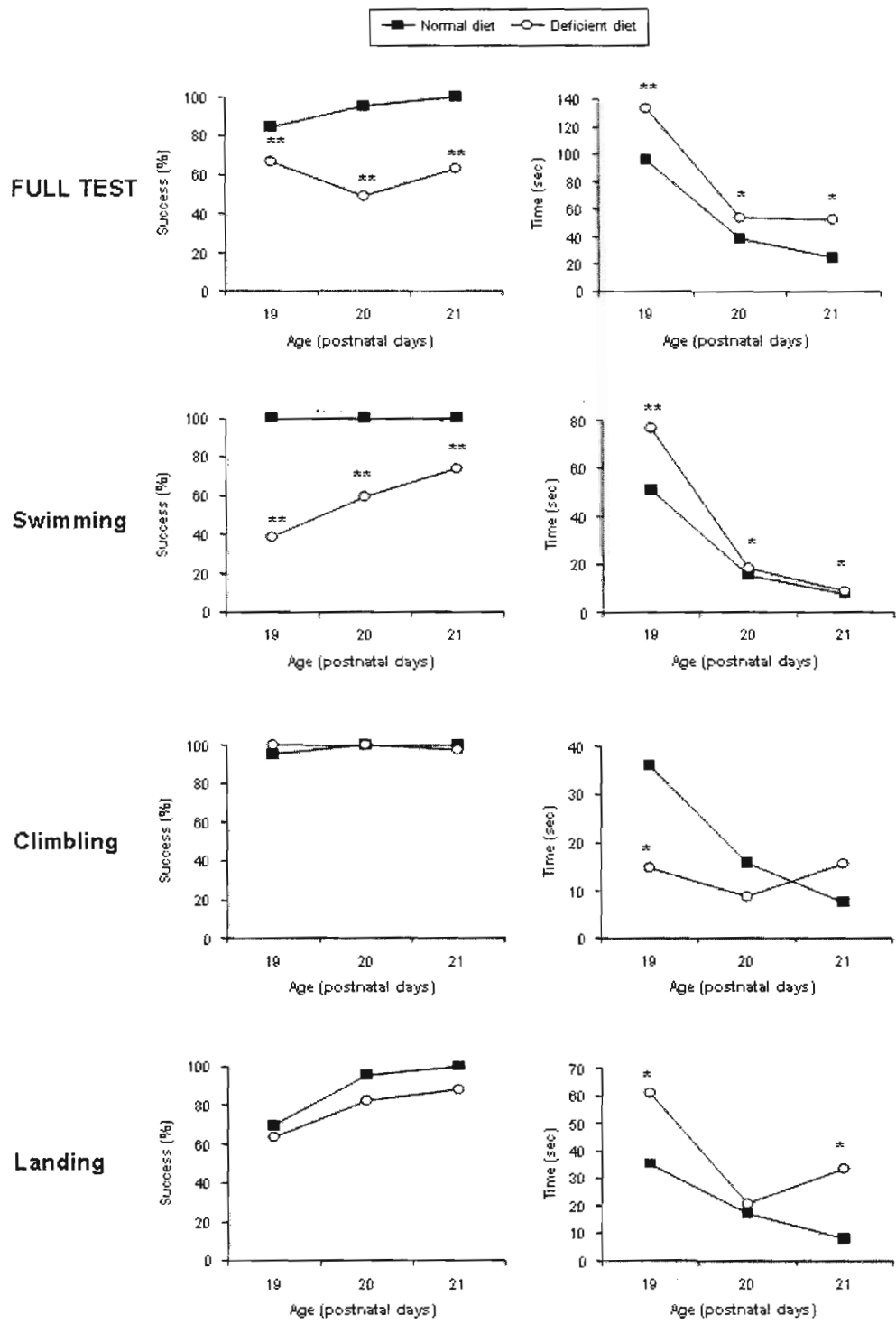


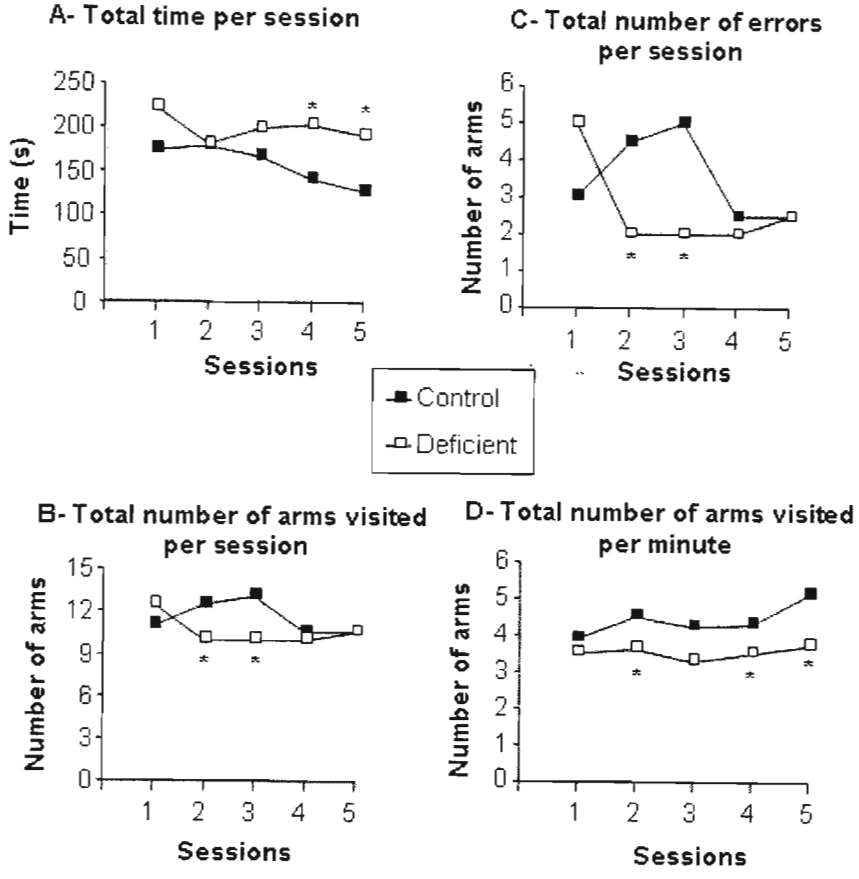
B- Negative geotaxis

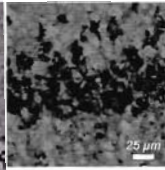


C- Suspension

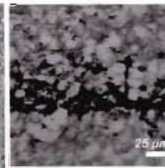
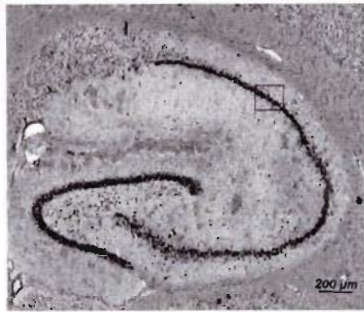








Control



Deficient

Mild Neonatal Hypoxia Exacerbates the Effects of Vitamin-Deficient Diet on Homocysteine Metabolism in Rats

SÉBASTIEN BLAISE, JEAN-MARC ALBERTO, EMMANUELLE NÉDÉLEC, AHMET AYAV,
GRÉGORY POURIÉ, JEAN-PIERRE BRONOWICKI, JEAN-LOUIS GUÉANT, AND
JEAN-LUC DAVAL

INSERM U 724, Université H. Poincaré, Faculté de Médecine, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy
Cedex, France

ABSTRACT

Elevated plasma homocysteine has been linked to pregnancy complications and developmental diseases. Whereas hyperhomocysteinemia is frequently observed in populations at risk of malnutrition, hypoxia may alter the remethylation of homocysteine in hepatocytes. We aimed to investigate the combined influences of early deficiency in nutritional determinants of hyperhomocysteinemia and of neonatal hypoxia on homocysteine metabolic pathways in developing rats. Dams were fed a standard diet or a diet deficient in vitamins B12, B2, folate, methionine, and choline from 1 mo before pregnancy until weaning of the offspring. The pups were divided into four treatment groups corresponding to "no hypoxia/standard diet," "hypoxia (100% N₂ for 5 min at postnatal d 1)/standard diet," "no hypoxia/deficiency," and "hypoxia/deficiency," and homocysteine metabolism was analyzed in their liver at postnatal d 21. Hypoxia increased plasma homocysteine in deficient pups (21.2 ± 1.6 versus 13.3 ± 1.2 μ M, $p < 0.05$). Whereas mRNA levels of cystathionine β -synthase remained unaltered, deficiency reduced the enzyme activity (48.7 ± 2.9 versus 83.6 ± 6.3 nmol/h/mg, $p < 0.01$), an effect potentiated by hypoxia (29.4 ± 4.7 nmol/h/mg, $p < 0.05$). The decrease in methylene-tetrahydrofolate reductase activity measured in deficient pups was attenuated by hypoxia (p

< 0.05), and methionine-adenosyltransferase activity was slightly reduced only in the "hypoxia/deficiency" group ($p < 0.05$). Finally, hypoxia enhanced the deficiency-induced drop of the S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio, which is known to influence DNA methylation and gene expression. In conclusion, neonatal hypoxia may increase homocysteinemia mainly by decreasing homocysteine transsulfuration in developing rats under methyl-deficient regimen. It could therefore potentiate the well-known adverse effects of hyperhomocysteinemia. (*Pediatr Res* 57: 777–782, 2005)

Abbreviations

BHMT, betaine-homocysteine-methyltransferase
CBS, cystathionine β -synthase
HCY, homocysteine
hHCY, hyperhomocysteinemia
MAT, methionine-adenosyltransferase
MS, methionine synthase
MTHFR, methylene-tetrahydrofolate reductase
NO, nitric oxide
SAH, S-adenosylhomocysteine
SAM, S-adenosylmethionine

Plasma accumulation of HCY is known to be linked to cardiovascular diseases and ageing-associated disabilities (1–3). Moderate hHCY can arise from genetic determinants (4,5) but is also frequently related to dietary deficiency in vitamins B12, B2, and folate. In newborns, the risk of hHCY is closely related to elevated maternal HCY concentrations during pregnancy, which is determined by the status of B vitamins (6–8).

A strong relationship has been documented between HCY accumulation and pregnancy complications, including recurrent miscarriages, preeclampsia, and placenta abruption (see Ref. 9 for review). In the progeny, hHCY has been associated with fetal death (10), premature birth (11), intrauterine growth retardation (12), neural tube defects (13), craniofacial anomalies (14), cardiac malformation (15), and hepatic steatosis (16).

HCY production involves the demethylation of methionine, and, under normal conditions, is essentially regulated in the liver. As summarized in Figure 1, it originates from the hydrolysis of SAH, a product of transmethylation reactions through SAM, and is metabolized *via* two pathways of remethylation and one pathway of transsulfuration. HCY metabolism strongly depends on the nutritional intake of B vitamins,

Received July 14, 2004; accepted October 13, 2004.

Correspondence: Jean-Luc Daval, Ph.D., INSERM U 724, Faculté de Médecine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France; e-mail: Jean-Luc.Daval@nancy.inserm.fr

The present work was funded by INSERM. S.B. is indebted to the "Région Lorraine" for financial support.

DOI: 10.1203/01.PDR.0000161406.19231.98

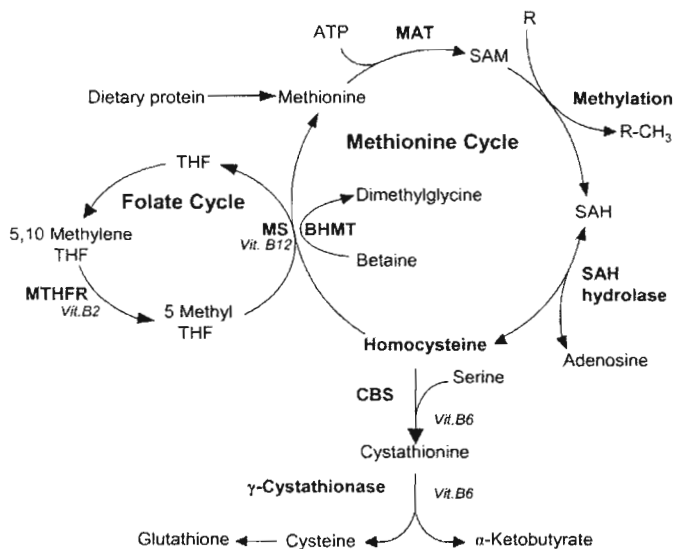


Figure 1. Homocysteine metabolism. R, radical; Vit., vitamin.

inasmuch as remethylation of HCY into methionine is catalyzed by a vitamin B12- and folate-dependent enzyme, namely the MS, and, in the liver, by BHMT. MTHFR is a flavoprotein dependent on vitamin B2, which reduces methylene-tetrahydrofolate into methyl-tetrahydrofolate, the co-substrate of MS. The second part of the methionine cycle successively involves the synthesis of SAM from methionine by MAT and the transmethylation of SAM, producing SAH. Transsulfuration involves a condensation of HCY with serine by CBS to generate cystathionine, a cysteine precursor (17).

Several reports have outlined that hypoxia and/or ischemia may alter the remethylation pathway of HCY and, more particularly, the adenosylation of HCY (18–21). Decreased concentration of SAM and reduced expression of MAT have been reported in adult rats as well as in isolated rat hepatocytes under moderate chronic hypoxia (18–21). In the adult rat, a significant SAM deficit was recorded after 10 d of hypoxia, and this was associated with DNA hypomethylation. The authors suggested that hypoxia would result in a decreased methylation similar to that produced by a methyl-deficient diet (19). However, no data are currently available on the effects of transient hypoxia on the liver activity of the key enzymes involved in the remethylation pathway (*i.e.* MTHFR, MS, and BHMT) and in the transsulfuration pathway (*i.e.* CBS). Considering that both hHCY and acute hypoxia may simultaneously occur in neonates, particularly in some populations at risk of malnutrition (22–25), we aimed to evaluate the effects of transient neonatal hypoxia on liver HCY metabolism in a rat model of nutritionally induced hHCY during pregnancy.

METHODS

Animals and exposure to hypoxia. Animal treatments were performed according to the *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Female Wistar rats (Charles River, Les Oncins, France) were constantly maintained under standard laboratory conditions, with food and water available *ad libitum*. One month before pregnancy, they were fed either with standard food ($n = 8$) (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemaison-sur-Orge, France) containing vitamins B12 (0.04 mg/kg), B2 (13 mg/kg), folate (0.9 mg/kg), methionine (4800

mg/kg) and choline (2100 mg/kg), according to the manufacturer, or with a diet deprived of vitamins B12, B2, folate, and choline ($n = 8$) (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). Before mating, blood samples were drawn from caudal vessels under halothane anesthesia for the measurement of plasma vitamin B12 and folate concentrations.

Within 24 h after delivery, the litter size was reduced to 10 pups for subsequent standardization of the study. Half of the neonates were placed for 5 min in a Plexiglas chamber thermostated at 36°C and flushed with 100% N₂, whereas the remaining pups were used as controls and exposed to 21% O₂/79% N₂ (normoxic conditions) for the same time. Pups were then allowed to recover for 20 min in normoxia before being returned to their dams. Preliminary studies showed that such a short hypoxia did not induce detectable brain lesions (26). When used, deficient diet was given to dams until weaning of their offspring, *i.e.* 21 d after birth.

A total of 48 pups was divided into four experimental groups: C (*control*) = rats not subjected to hypoxia and fed by a dam with standard diet; H (*hypoxia*) = rats exposed to hypoxia and fed by a dam receiving standard diet; D (*deficient*) = nonhypoxic rats fed by a dam with a deficient diet; and HD (*hypoxia-deficient*) = rats exposed to hypoxia and fed by a dam with a deficient diet.

Sample collection. For subsequent studies, pups were killed at 21 d of age by exposure to excess halothane. Intracardiac blood samples were drawn for the measurement of vitamin B12, folate, and HCY plasma concentrations. The liver was rapidly collected, washed in Ringer buffered solution (2 mM KCl, 125 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 2 g/L glucose, pH 7.3) and frozen in liquid nitrogen. Liver cells were lysed at 4°C in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.3) containing protease inhibitors (Proteases inhibitor cocktail, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Proteins samples were quantified according to Bradford (27).

Plasma metabolite concentrations. Plasma vitamin B12 and folate concentrations were determined by radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) (6). HCY concentration was assessed by fluorescent polarization immunoassay (IMX system, Abbott Norge AS, Billingstad, Norway) (28).

Activities of enzymes involved in homocysteine metabolism and hepatic metabolites. All measurements described below were performed with tissue samples corresponding to 400 µg of total proteins. CBS was measured by a method adapted from Taoka *et al.* (29). Proteins were incubated for 30 min at 37°C in a reactive solution [0.1 M Tris (pH 8.5), 1 mM cystathionine, 5 mM D,L-serine (Sigma Chemical Co.), 1 mM pyridoxal 5'-phosphate, 0.25 µCi [¹⁴C]serine (Amersham Biosciences, Saclay, France), and 15 mM HCY (Sigma Chemical Co.)]. After washing with 20 mM maleic acid (pH 1.9) and 0.2 M LiCl, radiolabeled cystathionine was eluted with 50 mM acetic acid (pH 4.8), 0.8 M LiCl into Dowex 50WX2–200 gel (Sigma Chemical Co.), and quantified by means of a liquid scintillation analyzer (Packard Biosciences, Meriden, CT.). MS activity was monitored by a method adapted from Chen and Banerjee (30). Proteins were incubated in a buffered solution [100 mM KH₂PO₄ (pH 7.2), 25 mM DTT, 25 mM ascorbate, 0.5 mM SAM, 50 µM OH-cobalamin, 5 mM D,L-HCY, and 250 µM [¹⁴CH₃]methyl-tetrahydrofolate]. Eluted on a cationic gel (quaternary ammonium, AG1x8, Cl⁻ form, Bio-Rad), [¹⁴CH₃]methionine was measured with PicoFluor-40 (Packard Biosciences). Enzymatic activity of BHMT was measured as previously described by Garrow (31). MAT activity was measured according to Chamberlin *et al.* (32). The activity of MTHFR was measured as reported by Kutzbach and Stokstad (33).

For the measurement of SAM and SAH concentrations, the technique was adapted from Delabar *et al.* (34). Proteins were precipitated with 0.2 N HClO₄, before injection on the column (Lichrospher, 100 RP-C18, 5 µm, 250 × 4 mm ID). The mobile phase was applied at a flow rate of 0.75 mL/min and consisted in 50 mM sodium phosphate (pH 3.2), 10 mM heptan sulfonate, and acetonitrile (10–20% from 0 to 20 min). Amounts of SAM and SAH were quantified by using an UV detector at 254 nm.

MS and CBS mRNA assays. Total RNA were isolated from liver tissues using the Rneasy mini-kit from QIAGEN (Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol, and quantified by spectrophotometry. RNA integrity was assessed by subjecting 1 µg of total RNA to electrophoresis through a 1% (wt/vol) agarose gel. Total RNA (2 µg) was reverse-transcribed using hexamer random primers and Omniscript (QIAGEN) in a 20-µL volume reaction of a buffered mixture containing 0.5 mM dNTP. The cDNA products were 2-fold diluted, and 2 µL was used as a template for each amplification in PCR. Reactions were performed with TaqDNA polymerase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in 50 µL of a buffered solution containing 0.5 mM dNTP, and 0.5 µM of each primer. Separate PCR for MS, CBS, and L-27 (internal standard) amplification were undertaken with the following oligonucleotides primers: MS (NM 030864, 228 bp product), sense 5'CAGATATAATTGGCT-TGTCAAGACT3', antisense 5'TTTCATCTAACAGCTGAGAACACAC3'; CBS (NM 012522, 350 bp product), sense 5'TTCCCCACATTACCACACAG3', antisense 5'AGCACATCCACCTTCCAT3'; and L-27 (NIO

022514, 364 bp product), sense 5'GCTGTCGAAATGGGCAAGTT3', anti-sense 5'CAAACCTTGACCTTGGCCTCC3'. Conditions of PCR allowing to be in the exponential phase of PCR were as follows: for MS, number of cycles (n) = 31, annealing temperature (AT) = 61°C; for CBS, n = 30, AT = 56°C; for L-27, n = 27, AT = 62°C. Amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining, and quantified by densitometry with ImageMaster 1D Primer software and ImageMaster apparatus (Amersham Pharmacia Biotech, Quebec, Canada). Amplicons selectively amplified the desired target mRNA, and results were expressed relatively to the mRNA levels of the housekeeping gene *L-27*.

Statistical analyses. Data were prospectively collected and analyzed with Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkley, CA). Reported as mean \pm SD, raw data were compared by using one-way ANOVA with Fisher's test. Multiple regression and univariate z-correlation analyses were used to evaluate the relationships between enzymatic activities, plasmatic or intracellular metabolites, and animal weight and size. A p value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

RESULTS

General observations. In some experiments, evidence of hypoxia in neonates was detected by the measurement of blood gases (pH, P_{O_2} , and P_{CO_2}), as previously described (35). At the end of exposure to hypoxia (or to normoxia for controls), mixed blood samples were rapidly collected following decapitation, sheltered from ambient air, and injected into a gas analyzer (Corning Medical and Scientific, Halstead, UK). Immediately after hypoxia, a significant hypoxemia was recorded ($P_{O_2} = 40.6 \pm 5.3$ versus 62.5 ± 6.1 mm Hg, $n = 5$, $p < 0.01$), along with mild hypercapnia ($P_{CO_2} = 49.2 \pm 6.1$ versus 33.7 ± 5.8 mm Hg, $p < 0.05$) and acidosis (pH = 7.23 ± 0.04 versus 7.38 ± 0.02 , $p < 0.01$). The hypoxic episode did not affect pups' survival and had no apparent consequences on their subsequent growth (Fig. 1).

Whereas the deficient diet was without lethal effects in pregnant females, it led to 25% perinatal mortality in offspring. In addition, this regimen induced a significant growth retardation that was observable until the end of the suckling period. Starting from the first day after birth, the body weight was significantly lower in animals belonging to groups D and HD when compared with those from groups C and H, and the difference increased with time until d 21 (Fig. 2, Table 1). The

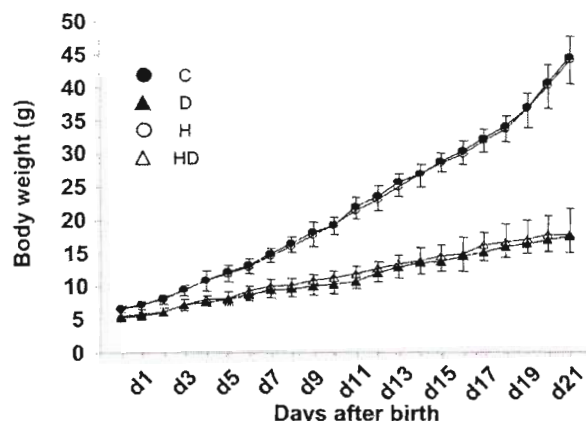


Figure 2. Influence of deficient regimen and hypoxia on the evolution of rat body weight during postnatal development. Data are mean \pm SD. For each experimental group, 12 rats from four different litters were studied. Statistically significant differences at all points (ANOVA): $p < 0.01$ (deficient regimen vs normal regimen in nonhypoxic animals), $p < 0.01$ (deficient regimen vs normal regimen in hypoxic animals).

decrease in weight gain was accompanied by a reduced size in rat pups. The close correlation ($z = 6.113$, $p < 0.0001$) between the two parameters (size and body weight) confirmed a global growth retardation in response to the deficient diet rather than a malnutrition-related thinness.

Vitamin status. Concentrations of vitamin B12 and folate were measured in blood samples of adult female rats to evaluate the influence of diet (Table 1). At the time of mating (*i.e.* 30 d after the beginning of exposure to specific dietary regimens), the deficient diet significantly decreased plasma concentrations of vitamin B12 ($p < 0.01$) and folate ($p < 0.01$).

The maternal regimen clearly influenced vitamin concentrations in offspring (Table 1). At 21 d of age, rats belonging to groups D and HD displayed a 72% decrease of plasma vitamin B12 concentration compared with the two groups fed normally ($p < 0.01$). In parallel, plasma folate concentration was reduced by 61% ($p < 0.01$). Irrespectively of the nutritional diet, hypoxia had no influence on vitamin B12 plasma concentration, but it appeared to decrease folate concentration in H group compared with controls ($p < 0.05$).

Homocysteine and metabolic alterations. As expected, homocysteinemia rose in dams fed with the deficient diet ($p < 0.01$) (Table 1). Similarly, the decline of vitamin B12 and folate concentrations in offspring fed by a deprived mother was associated with substantial increases in HCY plasma levels. At 21 d of age, these young rats exhibited HCY concentrations two times higher than those found in their normally fed counterparts (Table 1). Whereas hypoxia did not influence homocysteinemia in normally fed rat pups, it was shown to potentiate the diet effects by significantly increasing hHCY in the HD group compared with group D (Table 1).

As illustrated by Figure 3, a global reduction of HCY catabolism seemed to account for the observed increased homocysteinemia in young rats exposed early to an unbalanced regimen. Indeed, rats from group D showed a substantial decrease of CBS activity when compared with controls (48.6 ± 2.9 versus 83.6 ± 6.3 nmol/h/mg, $p < 0.01$). This drop was more pronounced when deficient neonates were transiently exposed to hypoxia (29.4 ± 4.7 nmol/h/mg in HD group), whereas hypoxia alone did not alter CBS activity.

The MS enzyme was also dramatically affected by the nutritional conditions, its activity varying from 2.5 ± 0.3 nmol/h/mg in group C to 0.6 ± 0.1 nmol/h/mg in group D ($p < 0.01$). Hypoxia had no significant influence on this enzyme, whatever the nutritional status. In contrast to the two other pathways of HCY degradation, the remethylation pathway involving BHMT was found to be unchanged among the four animal groups, BHMT activity remaining stable around 7.5 nmol/h/mg.

Neither the deficient diet nor hypoxia alone significantly affected MAT activity, but combined treatments decreased it (Fig. 3). SAM concentration was significantly reduced in rats exposed to the deficient diet (from 102.9 ± 13.5 μ g/mg protein in group C to 64.6 ± 9.6 μ g/mg protein in group D, $p < 0.01$). Although hypoxia by itself did not affect SAM concentrations in rats with normal regimen, it appeared to potentiate the consequences of the deficient diet, with SAM concentration reaching 29.8 ± 5.0 μ g/mg protein in these conditions. By contrast, SAH concentrations did not vary throughout the

Table 1. Effects of the nutritional regimen on weight, size, and plasma vitamin B12, folate, and HCY concentrations in adult female rats and their offspring

	Adult females (d 0)		Adult females (d 30)		Progeny (postnatal d 21)			
	Normal diet	Deficient diet	Normal diet	Deficient diet	C	H	D	HD
Weight (g)	227.2 ± 1.6	234.3 ± 15.1	268.2 ± 15.3*	259.3 ± 15.0*	44.7 ± 3.0	44.2 ± 3.5	17.7 ± 4.3†	18.0 ± 2.7†
Size (cm)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19.1 ± 1.2	19.3 ± 1.3	12.8 ± 1.5†	12.1 ± 0.7†
Vitamin B12 (pmol/L)	1078.8 ± 107.0	989.2 ± 91.7	1057.5 ± 177.8	555.8 ± 99.3†	1202.5 ± 161.4	1207.9 ± 112.6	333.6 ± 61.0†	322.8 ± 68.9†
Folate (nmol/L)	130.8 ± 3.8	141.7 ± 11.2	172.7 ± 27.2	35.5 ± 11.8*†	86.9 ± 15.5	69.0 ± 13.8‡	33.6 ± 10.7†	27.6 ± 14.9†
HCY (μmol/L)	5.6 ± 2.2	6.2 ± 0.7	6.1 ± 0.5	20.4 ± 2.3*†	6.8 ± 0.3	6.5 ± 0.3	13.3 ± 1.2†	21.2 ± 1.6‡

Data are mean ± SD and were obtained from 8 individuals for adult females and 12 individuals issued from four different litters for 21-d-old progeny. Adult females were tested before receiving their experimental (normal or deficient) diet (d 0) and then 30 d later. The progeny was tested at 21 d of age. C, H, D, and HD refer to the various experimental groups as defined in "Methods." Statistically significant differences: Mann-Whitney: * $p < 0.02$ (d 30 vs d 0); † $p < 0.01$ (deficient diet vs normal diet); ANOVA: ‡ $p < 0.05$ (hypoxia vs no hypoxia). n.d., not determined.

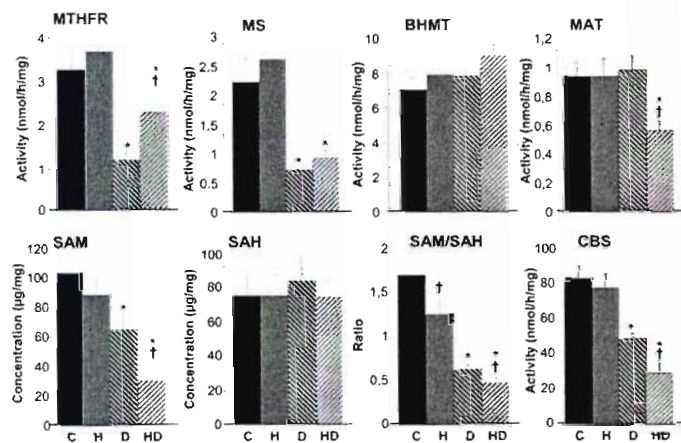


Figure 3. Effects of deficient diet and hypoxia on the various pathways involved in the monocarbon metabolism in 21-d-old rats. Data are mean ± SD. For each group, 12 rats from four different litters were studied. Statistically significant differences (ANOVA): * $p < 0.01$ (deficient regimen vs normal regimen), † $p < 0.05$ (hypoxia vs no hypoxia).

various experimental groups, and remained around 80 μg/mg protein. From these data, an index of global cell methylation can be estimated in the different groups by the calculation of the SAM/SAH ratio (10,27). This ratio decreased from 1.62 ± 0.30 in C group to 0.61 ± 0.06 in D group ($p < 0.01$). Consistently, a significant decline was also recorded between H and HD groups (1.26 ± 0.20 versus 0.46 ± 0.06, $p < 0.05$). An important feature was that a significant difference was detected between C and H groups as well as between D and HD groups, indicating that hypoxia seemed to exacerbate the effects of nutritional deficiency (Fig. 3).

In addition, a fall of MTHFR activity was recorded in rats exposed to the deficient diet (0.9 ± 0.2 nmol/h/mg in group D versus 3.5 ± 0.5 nmol/h/mg in group C, $p < 0.01$). Hypoxia had no influence on individuals normally fed, whereas it appeared to significantly attenuate the decrease in MTHFR activity recorded in response to the deficient diet (Fig. 3).

As a complement to these studies, mRNA levels of MS and CBS were analyzed. The rat group fed with a deficient diet (D) showed a significant decrease of the MS/L27 mRNA ratio ($p < 0.05$) compared with the control group (Fig. 4A), whereas the hypoxic treatment did not influence this ratio. Regarding CBS mRNA transcripts, no significant differences were found between CBS/L27 ratio values issued from the various experimental groups (Fig. 4B).

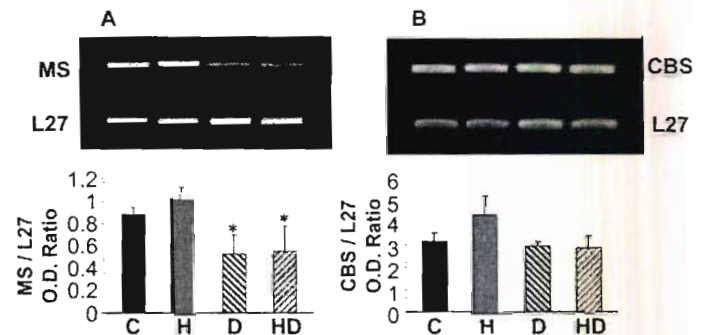


Figure 4. Effects of deficient diet and hypoxia on MS and CBS mRNA levels in the liver of 21-d-old rats. Data are mean ± SE and are expressed as MS/L27 and CBS/L27 relative densitometric values. For each group, three rats were studied. Statistically significant differences (ANOVA): * $p < 0.05$ (deficient regimen vs normal regimen).

Correlation studies. According to multiple regression and univariate z-correlation analyses, vitamin B12 was found to be a determinant of MS activity ($p = 0.0179$), folate a determinant of MTHFR activity ($p = 0.0023$), and the SAM/SAH ratio a determinant of CBS activity ($p = 0.0016$).

Plasma concentration of HCY was significantly correlated to concentrations of SAM ($p < 0.0002$), folate ($p < 0.0001$), and vitamin B12 ($p < 0.0001$) as well as to MTHFR ($p = 0.0061$) and MS ($p = 0.0320$) activities.

Finally, both animal size and body weight were significantly correlated ($p < 0.0001$) to plasma concentrations of vitamin B12, folate, and HCY in 21-d-old rat pups.

DISCUSSION

When they were exposed to a vitamin-deficient diet *in utero* and then through their mothers' milk, rat pups exhibited a high score of perinatal mortality and sustained growth retardation. The present study also showed that such a diet produced a significant hHCY, in line with long-lasting metabolic disturbances. Mild neonatal hypoxia appeared to potentiate the long-term effects of the diet on HCY metabolism, indicating that it may potentially aggravate the adverse consequences of hHCY on the overall health status.

Methyl-deficient diets have previously been used in adult rats to induce hHCY at levels that are similar to those recorded in vitamin B-deficient humans (15–100 μM HCY) (10). Such diets impair HCY remethylation as they usually combine deficiency in vitamin B12 and folate, absence of choline, and low

concentrations of methionine (36). In the present study, vitamin B2 was additionally omitted in the deficient diet since i) this compound is another key determinant of HCY remethylation, acting as a coenzyme for MTHFR and MS reductase (37), and ii) because the synthesis of coenzyme B2 is defective in malnourished children (28). Vitamin B6, the cofactor of CBS in HCY catabolism, was not removed from the deficient diet since it is not directly involved in the remethylation pathway.

Under these conditions, rat pups developed hHCY at a level comparable to that reported in other studies on adult rats (36). The effect of the deficient diet on the plasma vitamin B12 concentration was more dramatic in the offspring than in their mothers. It has been well documented that vitamin B12 deficiency may have long-lasting adverse effects in children (38). Consistent with our data, lower birth weight was recorded in rats in cases of marginal vitamin B12 intake during gestation (39). Growth retardation was shown to persist throughout the first year of life even when pups received adequate dietary vitamin B12. Additionally, offspring from deficient dams showed more liability to various types of infections.

In offspring subjected to the deficient diet, liver activities of CBS and MS were reduced. Decrease in CBS activity was not directly dependent on the vitamin deficiency, since the cofactor of this enzyme is vitamin B6, a compound that was not omitted from the diet. Instead, it could be related to the reduced concentrations of SAM in the deficient pups, considering the activating effect of this metabolite on CBS. On the other hand, the vitamin deficiency did not modify the transcription of the *CBS* gene. MS activity is strongly dependent upon the availability of vitamin B12, and this certainly explains its substantial decrease after exposure to the deficient diet. Several studies support a role of vitamin B12 at the MS protein level. Yamada and colleagues (40) have suggested that low MS activity in vitamin B12-deficient rats can be explained by a reduced stabilization of the enzyme by its co-enzyme. In a previous study from our laboratory, it was observed that gastrectomized adult rats subjected to a methyl-deficient diet exhibited a reduced liver MS activity without any change of MS transcript level (36), and it has been recently reported that vitamin B12 may induce translational up-regulation of MS in cell culture by shifting the mRNA from the ribonucleoprotein to the polysome pool (41). In the present study, however, a modest but significant decrease in the amount of MS mRNA was detected under the conditions of deficient diet. Specific characteristics of our model, in particular the early and long-lasting exposure of rat fetuses to the vitamin B2-deprived deficient diet, may explain, at least in part, this apparent discrepancy with previous reports. In this respect, the absence of vitamin B2 in the diet used in the present study may also account for the reduction of MTHFR activity recorded in deficient rat pups, inasmuch as vitamin B2 is a co-factor for this enzyme.

The decline of SAM concentration might reflect a decreased remethylation of HCY rather than a decreased adenosylation of methionine, inasmuch as MS activity, but not that of MAT, was lowered in newborns subjected to the deficient diet.

We and others have shown that severe hypoxia in the newborn rat can induce tissue damage through apoptosis and alter normal development (35,42). Conversely, mild hypoxia

may exert beneficial effects by inducing tolerance to subsequent oxygen deprivation and by stimulating tissue repair and cell proliferation, as demonstrated both *in vitro* in cultured neurons (23) and *in vivo* in the newborn rat (26). We hypothesized that the same phenomenon may occur in the liver, and therefore submitted newborn rats to mild, nonlesioning hypoxia. The remethylation pathway of HCY may be a target for hypoxia (18–21). For instance, expression of the *MAT* gene has been shown to decrease in response to sustained hypoxia in isolated rat hepatocytes (18,19). Such a down-regulation may be related to the stimulation of the inducible isoform of nitric oxide (NO) synthase and/or to a reduction of glutathione levels (20). The resulting decreases of mRNA abundance and of the corresponding enzyme activity, along with the reduction of SAM concentration in cells, could in turn trigger DNA hypomethylation, as previously documented, after methyl-deficient diet (43). Our results appear to be consistent with these findings. In addition, to our knowledge, they are the first to report a long-term influence of short hypoxia on HCY plasma concentration and CBS activity, an effect that was specifically evidenced in animals with vitamin-deficient diet.

Because CBS is the key enzyme of HCY catabolism, it may be speculated that its reduced activity accounts for the enhanced hHCY observed in deficient pups exposed to hypoxia. This may be due, at least partly, to the decreased concentration of SAM in hepatic cells. This product of MAT activity is a known activator of CBS. Under these conditions, it is therefore likely that a link exists between decreased MAT activity and subsequent decreases in SAM concentration and CBS activity in deficient pups exposed to neonatal hypoxia. This could also explain the relationship between HCY and SAM, which was depicted in these pups by univariate analysis.

A salient feature of our study is the long-term effects of hypoxia on activities of CBS, MTHFR, and MAT. Mechanisms accounting for such delayed changes remain to be elucidated and may possibly involve alteration of transcriptional activities, as previously shown for chronic hypoxia (18,19,44). It has been recently shown that the effect of hypoxia on the expression of the *MAT* gene is under the influence of NO production (45). Whether or not the deficient diet modifies NO production should therefore be further investigated. It is known that cysteine—a product of the transsulfuration pathway of HCY metabolism—is the substrate for glutathione synthesis (46). The reduction of oxygen delivery has been shown to decrease glutathione production, leading to the inhibition of MAT transcription and activity (18,19).

In conclusion, our results suggest that short episodes of hypoxia around birth may have a long-term aggravating effect on hHCY resulting from an inadequate vitamin status during pregnancy, mainly by decreasing HCY transsulfuration.

REFERENCES

1. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE 1998 Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 49:31–62
2. Mattson MP, Shea TB 2003 Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26:137–146
3. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM 1998 Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 55:1449–1455

4. Brilakis ES, Berger PB, Ballman KV, Rozen R 2003 Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C → T and methionine synthase reductase (MTRR) 66A → G polymorphisms: association with serum homocysteine and angiographic coronary artery disease in the era of flour products fortified with folic acid. *Atherosclerosis* 168:315–322
5. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, Maeda N 1995 Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)linemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1585–1589
6. Chery C, Barbe F, Lequere C, Abdelmoutaleb I, Gerard P, Barbarino P, Boutroy JL, Gueant JL 2002 Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 40:1105–1108
7. Pagan K, Hou J, Goldenberg RL, Cliver SP, Tamura T 2002 Mid-pregnancy serum homocysteine and B-vitamin concentrations and fetal growth. *Nutr Res* 22:1133–1141
8. Murphy MM, Scott JM, Arija V, Molloy AM, Fernandez-Ballart JD 2004 Maternal homocysteine before conception and throughout pregnancy predicts fetal homocysteine and birth weight. *Clin Chem* 50:1406–1412
9. Hague WM 2003 Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17:459–469
10. Burke G, Robinson K, Refsum H, Stuart B, Drumm J, Graham I 1992 Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels. *N Engl J Med* 326:69–70
11. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, Mosen AL, Ueland PM 2000 Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 71:962–968
12. de Vries JL, Dekker GA, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BM, van Geijn HP 1997 Hyperhomocysteinemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 104:1248–1254
13. Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM 1995 Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. *Lancet* 345:149–151
14. Knott L, Hartridge T, Brown NL, Mansell JP, Sandy JR 2003 Homocysteine oxidation and apoptosis: a potential cause of cleft palate. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39:98–105
15. Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J 1996 Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:15227–15232
16. Boison D, Scheurer L, Zumsteg V, Rulicke T, Litynski P, Fowler B, Brandner S, Mohler H 2002 Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6985–6990
17. Finkelstein JD 1998 The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 157(suppl 2):S40–S44
18. Avila MA, Carretero MV, Rodriguez EN, Mato JM 1998 Regulation by hypoxia of methionine adenosyltransferase activity and gene expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 114:364–371
19. Chawla RK, Watson WH, Jones DP 1996 Effect of hypoxia on hepatic DNA methylation and tRNA methyltransferase in rat: similarities to effects of methyl-deficient diets. *J Cell Biochem* 61:72–80
20. Ito K, Miwa N, Hagiwara K, Yano T, Shimizu-Saito K, Goseki N, Iwai T, Horikawa S 1999 Regulation of methionine adenosyltransferase activity by the glutathione level in rat liver during ischemia-reperfusion. *Surg Today* 29:1053–1058
21. Chawla RK, Jones DP 1994 Abnormal metabolism of S-adenosyl-L-methionine in hypoxic rat liver. Similarities to its abnormal metabolism in alcoholic cirrhosis. *Biochim Biophys Acta* 1199:45–51
22. Capo-Chichi CD, Feillet F, Gueant JL, Amouzou K, Zanon N, Sanni A, Lefebvre E, Assimadi K, Vidailhet M 2000 Concentrations of riboflavin and related organic acids in children with protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr* 71:978–986
23. Bossenmeyer-Pourie C, Lièvre V, Grojean S, Koziel V, Pillot T, Daval JL 2002 Sequential expression patterns of apoptosis- and cell cycle-related proteins in neuronal response to severe or mild transient hypoxia. *Neuroscience* 114:869–882
24. Carter AM 1989 Factors affecting gas transfer across the placenta and the oxygen supply to the fetus. *J Dev Physiol* 12:305–322
25. Chase PH, Volpe JJ, Laster L 1968 Transsulfuration in mammals: fetal and early development of methionine-activating enzyme and its relation to hormonal influences. *J Clin Invest* 47:2099–2108
26. Pourié G, Blaise S, Lièvre V, Vert P, Daval JL 2004 Non-lesioning neonatal hypoxia can induce long-term neurogenesis in the rat brain. *Pediatr Res* 55:25A
27. Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
28. Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Gueant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Gueant JL 2004 High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677 C → T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr* 79:619–624
29. Taoka S, Ohja S, Shan X, Kruger WD, Banerjee R 1998 Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity. *J Biol Chem* 273:25179–25184
30. Chen Z, Chakraborty S, Banerjee R 1995 Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *J Biol Chem* 270:19246–19249
31. Garrow TA 1996 Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem* 271:22831–22838
32. Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Wilson WG, Leonard JV, Chou JY 1996 Demethylation of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *J Clin Invest* 98:1021–1027
33. Kutzbach C, Stokstad EL 1971 Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 250:459–477
34. Delabar U, Kloor D, Luippold G, Muhlbauer B 1999 Simultaneous determination of adenosine, S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in biological samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 724:231–238
35. Grojean S, Schroeder H, Pourié G, Charriaud-Marlangue C, Koziel V, Desor D, Vert P, Daval JL 2003 Histopathological alterations and functional brain deficits after transient hypoxia in the newborn rat pup: a long term follow-up. *Neurobiol Dis* 14:265–278
36. Brunaud L, Alberto JM, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L, Braun M, Bronowicki JP, Bresler L, Gueant JL 2003 Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats. *Digestion* 68:133–140
37. Poirier LA 2002 The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. *J Nutr* 132:2336S–2339S
38. Black MM 2003 Micronutrient deficiencies and cognitive functioning. *J Nutr* 133:3927S–3931S
39. Newberne PM, Young VR 1973 Marginal vitamin B 12 intake during gestation in the rat has long term effects on the offspring. *Nature* 242:263–265
40. Yamada K, Kawata T, Wada M, Isshiki T, Onoda J, Kawanishi T, Kunou A, Tadokoro T, Tobimatsu T, Maekawa A, Toraya T 2000 Extremely low activity of methionine synthase in vitamin B-12-deficient rats may be related to effects on coenzyme stabilization rather than to changes in coenzyme induction. *J Nutr* 2000 130:1894–1900
41. Oltean S, Banerjee R 2003 Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. *J Biol Chem* 278:20778–20784
42. Daval JL, Pourié G, Grojean S, Lièvre V, Strazielle C, Blaise S, Vert P 2004 Neonatal hypoxia triggers transient apoptosis followed by neurogenesis in the rat CA1 hippocampus. *Pediatr Res* 55:561–567
43. Garcia-Trevijano ER, Martinez-Chantar ML, Latasa MU, Mato JM, Avila MA 2002 NO sensitizes rat hepatocytes to proliferation by modifying S-adenosylmethionine levels. *Gastroenterology* 122:1355–1363
44. Sonna LA, Cullivan ML, Sheldon HK, Pratt RE, Lilly CM 2003 Effect of hypoxia on gene expression by human hepatocytes (HepG2). *Physiol Genomics* 12:195–207
45. Ruiz F, Corrales FJ, Miqueo C, Mato JM 1998 Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase *in vivo* by S-nitrosylation. *Hepatology* 28:1051–1057
46. Hargreaves JP, Lee PJ, Briddon A 2002 Homocysteine and cysteine-albumin binding in homocystinuria: assessment of cysteine status and implications for glutathione synthesis? *Amino Acids* 22:109–118

Effect of a swim training on homocysteine and cysteine levels in rats

V. Gaume^{1,5}, H. Figard^{1,5}, F. Mougin^{1,5}, J. C. Guillard², J. M. Alberto³,
J. L. Gueant³, D. Alber⁴, C. Demougeot⁵, and A. Berthelot⁵

¹ UFR STAPS, EA 479, Besançon, France

² Laboratoire de Physiologie, Faculté de Médecine, Dijon, France

³ Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, INSERM 0014, Faculté de Médecine, Vandoeuvre Nancy, France

⁴ Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, Besançon, France

⁵ Laboratoire de Physiologie et de Pharmacologie-Nutrition Préventive et Expérimentale, EA 479, Faculté de Médecine, Besançon, France

Received August 31, 2004

Accepted November 4, 2004

Published online February 17, 2005; © Springer-Verlag 2005

Summary. The purpose of this study was to investigate the effects of a 8-week of swim training on total plasma homocysteine and cysteine levels in 16 male Sprague-Dawley rats aged 17 weeks. We also evaluated the activity of hepatic cystathionine β -synthase (CBS), an enzyme involved in the metabolism of Hcy, the concentration of plasma glutathione, taurine, and a fraction of vitamin B6: the pyridoxal 5-phosphate (PLP). After one week of acclimatization, rats were randomly divided into two groups: 8 non-trained (NTR) and 8 trained rats (TR). Following the training period, body weight gain was lower in TR than in NTR. Plasma homocysteine did not differ among groups while significantly lower plasma cysteine and taurine levels were found in TR ($157.83 \pm 8.6 \mu\text{mol/L}$; $133.01 \pm 9.32 \mu\text{mol/L}$; $P < 0.05$) compared with data of NTR ($176.19 \pm 4.9 \mu\text{mol/L}$; $162.57 \pm 8.16 \mu\text{mol/L}$; $P < 0.05$). No significant changes in hepatic CBS activity were observed in TR compared with NTR. Moreover, values for plasma glutathione and PLP concentrations were not affected by training.

These results indicate that training reduces plasma cysteine and taurine levels whereas it does not modify other studied parameters. Thus, physical training may regulate cysteine metabolism.

Keywords: Cystathionine β synthase – Cysteine – Glutathione – Homocysteine – Pyridoxal 5' phosphate taurine – Swim training

Introduction

Homocysteine is a naturally occurring sulfur containing non protein amino-acid. It is either remethylated to methionine, or converted to cysteine in what is known as the transsulfuration pathway. The metabolism of homocysteine to cysteine is catalyzed by two vitamin B6 dependent enzymes, i.e. cystathionine β -synthase (CBS) which catalyses the condensation of homocysteine with serine to form cystathionine, and cystathionase, which catalyses

the hydrolysis of cystathionine to cysteine (Banerjee et al., 2003).

Cysteine is another amino-acid containing sulfhydryl group. Its chemical structure and physicochemical properties are similar to those observed with homocysteine. Cysteine is irreversibly metabolized in liver to yield either glutathione, either taurine, or inorganic sulfate in urine.

Moderately increased concentrations of total homocysteine (tHcy) have been shown to be a strong independent risk factor for cardiovascular disease (Hankey and Eikelboom, 1999), as well as increased concentration of total cysteine (tCys) (Araki et al., 1989; Mansoor et al., 1995; Verhoef et al., 1996).

Physical exercise is reported to lower the incidence of cardiac events (Erikssen et al., 1998). On the contrary, sedentary life is considered to be a risk for cardiovascular diseases (Blair et al., 1995; De Backer, 1998; Hardman, 1996).

To our knowledge, the effects of exercising on plasma homocysteine and cysteine concentrations in rats have not been extensively studied. In addition, few data are available with regard to any metabolic derivatives of homocysteine having a potential vascular toxicity. Therefore, we investigated the effects of a 8-week swim training (1 hour/day, 5 days/week) in rats on plasma homocysteine, cysteine, glutathione, taurine and CBS, an enzyme which is involved in the metabolism of homocysteine. Moreover, since vitamin B6 is an important cofactor of the transsulfuration

that is frequently responsible for change tHcy and tCys levels, we also measured the pyridoxal 5'-phosphate (PLP; the principal active form of vitamin B6).

Materials and methods

Animals

Sixteen Sprague-Dawley male rats aged 17 weeks and weighing 160–180 g at the beginning of the experiment were used. Rats were fed a standard diet (AO4-SAFE, Villemoisson-Epinay-Sur-Orge, FRANCE), and provided with water *ad libitum* for an acclimatization period of one week. They were housed in groups of four in stainless steel cages in a well-ventilated room under controlled environmental conditions temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), relative humidity (50–60%), and photoperiod (12 h light/dark schedule). After this acclimatization period, rats were randomly divided into two groups: non-trained rats (NTR, $n = 8$) and trained rats (TR, $n = 8$). All rats were inspected daily and weighed once per week.

The research was conducted under the guidelines of the French Ministry of Agriculture for experiments on animals.

Training program

Exercised animals were subjected to a swimming program which had been validated by Guillard et al. (1988). After one week adaptation period, exercise consisted in swimming up to 1 h/d, 5 d/wk, for a total of 8 wks. Animals swam (4 per group) in a plastic container (diameter: 50 cm; depth: 50 cm) filled with water maintained at a temperature of $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Rats could not touch the bottom or hang on the sides and were supervised during the entire swimming time.

During training, exercise duration was held constant while exercise intensity was increased every week: each rat was loaded with increasing weight (1% of body weight in the first week to 5% in the last week).

Body weight

Body weight of each rat was measured every week. At the end of training, each rat was housed alone in a polyethylene cage for 2 days in order to measure the consumed amount of food and drink.

Collection of blood and tissue

At the end of the experimental protocol, food was withheld overnight. The next morning, 24 hours after the last exercise training period, rats were anaesthetised with pentobarbital (60 mg/kg). Following a midline abdominal incision, blood samples were collected *via* abdominal aorta using 10-ml plastic syringes fitted with 23-gauge needles. Blood samples were immediately centrifuged at $4000 \times g$ for 10 min at 4°C . Plasma was removed and stored at -80°C until analysis. Then, livers were rapidly removed, washed in physiological saline buffer, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Biochemical analysis

Plasma homocysteine, cysteine and glutathione analysis

Total plasma homocysteine, cysteine and glutathione concentrations were measured by HPLC (ESA 580 Kontron instruments 400; Kontron; Strasbourg, France) with fluorometric determination (Bio-Tek, SFM 25; Kontron) after derivation of thiols with 7-fluoro-2,1,3-benzodiazole-4-sulfonamide according to the method described by Durand et al. (1996).

Samples (20 μL) were analysed by HPLC equipped with a fluorescence detector set at λ_{ex} 385 nm and λ_{em} 515 nm. The eluent phase consisted of 0.1 M- KH_2PO_4 buffer (pH 3.25) containing acetonitrile (100 ml/L), and the rate was fixed at 1.2 ml/min. Separation was carried out on a 250×4.6 mm, 5 μm diameter Nucleosil C18 analytical column (Interchim Montluçon France) maintained at 35°C .

Twenty μL of 1.55 M NaOH, 250 μL of 0.125 M borate buffer (pH 8) and 30 μL of 4.6 mM-7-fluoro-2,1,3-benzodiazole-4-sulfonamide solution (in borate buffer) were added to 100 μL filtered supernatant fraction. After derivation at 50°C for 20 min, the samples were rapidly cooled and 40 μL 1 M-HCL were added. After standard calibration of thiols, Hcy, Cys and glutathione concentrations were determined by the area quotient of N-acetylcysteine.

Plasma taurine

Plasma taurine was determined with an amino acid analyser (L-8800, Hitachi, Japon).

Cystathionine beta synthase activity in liver

The enzyme activity was measured by a modified method as described by Shinichi et al. (1998). The assay mixture contained 100 mM Tris HCL, pH 8.6, 1 mM PLP, 1 mM cystathionine (Cth), 5 mM [^{14}C] serine (~ 500 cpm/nmol), 15 mM Homocysteine (Hcy) and 20 μL (~ 400 μg of total proteins) of homogenate in a final volume of 100 μL . The reaction was incubated for 30 min in a 37°C bath, and stopped by the addition of 25 μL of formic acid. The volume was adjusted to 1 mL with Buffer A (25 mM maleic acid pH 1.8, LiCl 0.2 M). The mixture was centrifuged at 10,000 g for 10 min at RT, and the supernatant loaded onto a 0.8×4 cm column (Bio-Rad Poly-Prep) containing 1 mL of Dowex 50WX2-200 resin from Sigma (equilibrated with 4×5 mL of buffer A). The column was washed with 1 mL, 3 mL and 3×5 mL of buffer A to eliminate the [^{14}C]ser. The [^{14}C]Cth was eluted with 2×3 mL of buffer B (Acetic acid 50 mM, pH 4.8, LiCl 0.8 M) and 3 mL of product was collected in a scintillation vial. The radioactivity was counted by adding 15 mL of Hionic-Fluor (Packard) as scintillation fluid. Negative control was obtained by replacing the homogenate by bovine serum albumin.

Vitamin B6 analysis

Plasma pyridoxal 5'-phosphate (PLP) concentration in plasma extracts was measured using a reverse-phase HPLC method as described by Edwards et al. (1989).

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm SEM. The significance of differences between groups was calculated by an one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey-Kramer unpairwise post-hoc test.

The level of significance was set at $p < 0.05$. All analyses were performed using Sigma Stat 2.03.

Results

During the test period, all animals gained weight than the beginning. Moreover, as shown on Fig. 1, from week 7, body weight of TR was significantly lower than the one of NTR. This decrease occurred despite the fact that TR consumed more daily food intake than NTR (25.1 ± 0.7 g/day vs. 20.1 ± 1.6 g/day; $P < 0.05$).

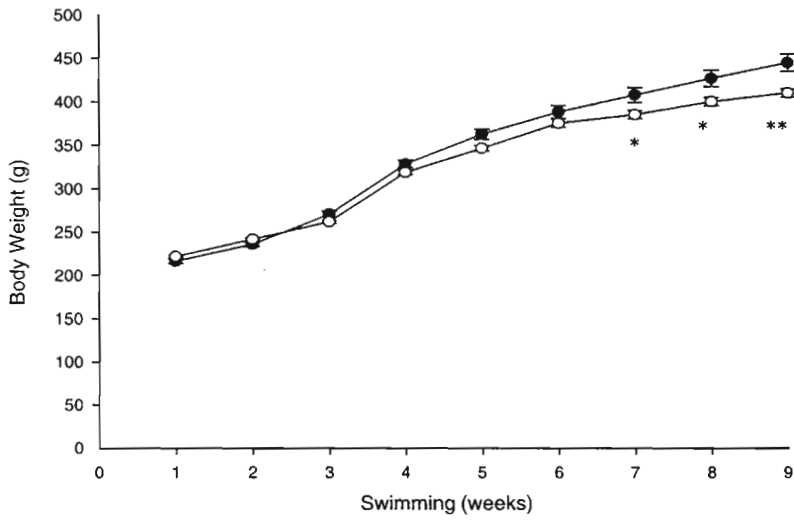


Fig. 1. Effect of exercising on the evolution of the body weight (g) in non-trained (●) and trained rats; n = 8; (○). Values are means ± SEM. Weight for trained group was significantly different from the weight of non-trained group from the 7th week of swimming: *P < 0.05; **P < 0.01

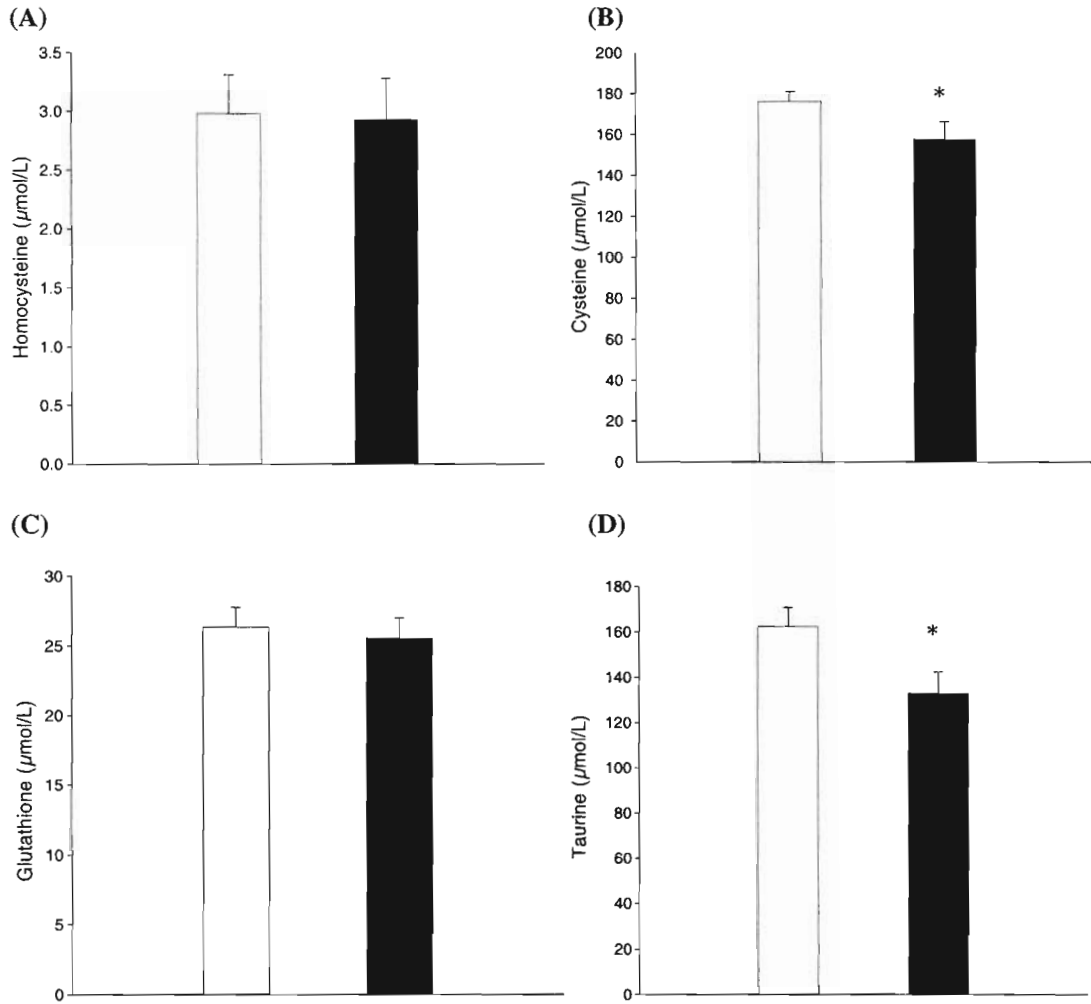


Fig. 2. Total plasma homocysteine (A), cysteine (B), glutathione (C) and taurine (D) levels in non-trained and trained rats. Hatched columns represent the values of non-trained rats and dark columns represent the values of trained rats. *P < 0.05

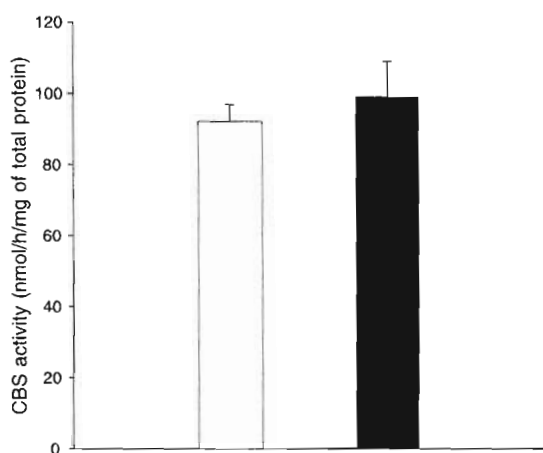


Fig. 3. Cystathionine beta synthase activity liver in non-trained (□) and trained rats (■). Hatched columns represent the values of non-trained rats and dark columns represent the values of trained rats

Following the training period, plasma homocysteine concentrations did not differ among groups ($2.93 \pm 0.35 \mu\text{mol/L}$ in TR vs. 2.98 ± 0.33 in NTR $\mu\text{mol/L}$). Conversely, significantly lower cysteinemia was found in TR group ($157.83 \pm 8.6 \mu\text{mol/L}$) compared with data of NTR ($176.19 \pm 4.9 \mu\text{mol/L}$; $P < 0.05$).

Mean values for plasma glutathione were not significantly different between both groups.

Plasma taurine concentrations appeared to be lower in TR ($133.01 \pm 9.32 \mu\text{mol/L}$) than NTR ($162.57 \pm 8.16 \mu\text{mol/L}$; $P < 0.05$) (Fig. 2).

As shown on Fig. 3, no significant change in hepatic cystathionine β -synthase activity was observed in TR ($99.16 \pm 9.7 \text{ nmol/h/mg}$ of total protein) compared to the values of NTR ($92.83 \pm 4.89 \text{ nmol/h/mg}$ of total protein).

Post-training values for pyridoxal-5 phosphate were not different in TR compared to those of NTR ($292.50 \pm 24.65 \text{ mmol/L}$ vs. $318.87 \pm 36.43 \text{ mmol/L}$ respectively).

Discussion

The main results of the present study indicated that a 8-week swim training did not change the baseline plasma homocysteine levels in Sprague-Dawley rats despite a significant decrease in cysteine levels. This induced exercise decrease in cysteinemia was associated with a decrease in plasma taurine concentrations. Moreover, trained rats showed identical values in hepatic cystathionine β -synthase (CBS) activity and glutathione levels to those measured in non-trained rats. In addition, swim training did not modify the plasma pyridoxal-5' phosphate concentrations.

To our knowledge, there are few literature data available on the effects of physical exercise on plasma homocysteine and especially on cysteine levels in rats.

Our observations are in accordance with the results of De Cree et al. (2000) and Wright et al. (1998) who also found in humans no effect of acute, submaximal exercise of relatively short duration on the plasma homocysteine levels.

Other studies reported a decrease in homocysteine levels in healthy men following a resistance training for 8 weeks (Steenge et al., 2001) or in cardiac rehabilitation patients submitted to 12 weeks of aerobic exercise (30–40 min/d) at 70–80% of maximal heart rate (Ali et al., 1998). Furthermore, reduced homocysteine level was observed after a high and low-intensity resistance exercise training in older healthy adults (Vincent et al., 2003). In contrast, Hermann et al. (2003) showed that a high intensity interval training lasting 3 weeks induced an increase (by about 10%) in homocysteine. In the same way, Bailey et al. (2000) reported a 10% increase in resting homocysteine after 4 weeks of cyclo-ergometer training in healthy men.

These discrepancies in data may be caused by different methodologies. In these last findings, the authors investigated either young, or older healthy subjects, who can not be compared with our experimental animals. Moreover, the differences could be explained by the divergent method used in the measurement of plasma tHcy between our study and those described by other laboratories. Indeed, the standardized pre-analytical conditions are necessary for reliable measurement of this plasma thiol. As pointed out by Zighetti et al. (2004), blood samples must be maintained on crushed ice until separation of plasma from blood cells to minimize the artifactual changes.

In addition, gender, age, intensity, duration and amount of training represent as many factors which may explain different values in tHcy. In our study, the training imposed could be insufficient in intensity and duration to induce a decrease in homocysteine.

It is quite well documented that vitamin B6 (pyridoxal 5'-phosphate; PLP) is a cofactor of cystathionine β -synthase (CBS) involved in Hcy metabolism. Homocysteine is converted to cystathionine to form cysteine via the transsulfuration pathway, which is facilitated by two pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes, cystathionine β -synthase and γ -cystathionase (Cooper, 1983). So, the intake of vitamin B6 in particular plays a central role (Selhub et al., 1993). A vitamin B6 supplementation is responsible for moderate or intermediate basal hypohomocysteinemia and hypercysteinemia (Smolin et al.,

1982). Here, rats were not supplemented with vitamin B6, and no change neither in plasma pyridoxal 5'-phosphate nor in hepatic activity CBS were observed after training. So, this might explain the lack of change in homocysteine levels in trained group.

Studies investigating Hcy in rats after a physical exercise lasting several weeks are inexistant and more data is needed to understand the behavior of Hcy after training.

While effort has been directed to study homocysteine as an important indicator of cardiovascular disease, little attention has been given to cysteine, one the most abundant thiols in plasma which is structurally similar and metabolically linked to homocysteine. Recently, the association of high plasma levels of total cysteine with the risk of thrombosis has been reported (Jacob et al., 1999; Marcucci et al., 2001). On the contrary, no research investigated the effects of exercise program on tCys. In a previous investigation, we reported for the first time that a chronic physical activity induced a decrease in basal plasma tCys concentration in middle-age subjects (Gaume et al., publication in progress). These results are confirmed in this present study in which exercise training was effective in decreasing tCys levels. It is noteworthy to mention that this reduction was found in Sprague Dawley rats with "normal" restings values of cysteine. The mechanism by which exercise reduces plasma cysteine levels is currently unknown. Exercise has been shown to affect amino-acid and protein metabolism (Felig and Wahren, 1971; Henriksson, 1991). Although, cysteine metabolism during exercise has not been examined extensively, it is possible that its uptake or production may be influenced by physical activity. The increased metabolic demands of exercise could decrease cysteine and then taurine levels, the taurine being synthesised endogenously from cysteine. Taurine is also a sulfur amino acid with high levels in skeletal muscle (Jacobsen et al., 1968). We may suppose that during exercise, the taurine was more used by skeletal muscle, decreasing its plasma concentration. However, it is not possible to distinguish between increased production or decreased utilisation during exercise. Few articles have referred to the effects of taurine with exercise (Pitkanen et al., 2002; Takekura et al., 1986; Watanabe et al., 1987). Only Matsuzaki et al. (2002) have shown that the taurine concentration in rats skeletal muscles was decreased with exercise. Our paper makes no mention of changes in muscular taurine concentration because it has not been assessed.

The metabolism of cysteine itself is of a large complexity, taking part in various biochemical pathways, therefore, further investigation is needed.

To conclude, this study indicates that training could reduce plasma cysteine and taurine levels whereas it does not modify other studies parameters. Thus, this study suggests that physical training could regulate cysteine metabolism. Nevertheless, the effects of physical exercise in lowering cysteine concentrations require further investigation. These results stress on the importance of studying homocysteine and cysteine levels simultaneously to distinguish their respective roles in prevention of CVD and their relation with physical exercise.

Acknowledgments

We thank Professor Frederic Roussey for helpful English reviewing of the manuscript.

References

- Ali A, Mehra MR, Lavie CJ, Malik FS, Murgo JP, Lohmann TP, Li S, Lin HC, Milani RV (1998) Modulatory impact of cardiac rehabilitation on hyperhomocysteinemia in patients with coronary artery disease and "normal" lipid levels. *Am J Cardiol* 82: 1557-1560
- Araki A, Sako Y, Fukushima Y, Matsumoto M, Asada T, Kita T (1989) Plasma sulfhydryl containing amino acids in patients with cerebral infarction and in hypertensive subjects. *Atherosclerosis* 79: 139-146
- Bailey DM, Davies B, Baker J (2000) Training in hypoxia: modulation of metabolic and cardiovascular risk factors in men. *Med Sci Sports Exerc* 32: 1058-1066
- Banerjee R, Evande R, Kabil O, Ojha S, Taoka S (2003) Reaction mechanism and regulation of cystathionine B-synthase. *Biochimica and Biophysica Acta* 1647: 30-35
- Blair SN, Kohl HW, Barlow CE, Paffenbarger RS, Gibbons LW, Macera CA (1995) Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. *JAMA* 273: 1093-1098
- Cooper AJ (1983) Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Ann Rev Biochem* 52: 187-222
- De Backer (1998) Physical activity and psychological variables in atherosclerosis. *Acta Cardiol* 29: 107-112
- De Cree C, Whiting PH, Cole H (2000) Interactions between homocyst(e)ine and nitric oxide during acute submaximal exercise in adult males. *Int J Sports Med* 21: 256-262
- Durand P, Fortin LJ, Lussier-Cacan S, Davignon J, Blache D (1996) Hyperhomocysteinemia induced by folic acid deficiency and methionine load-applications of modified HPLC method. *Clinica Chim Acta* 252: 83-93
- Edwards P, Liu PKS, Rose GA (1989) A simple liquid chromatographic method for measuring vitamin B6 compounds in plasma. *Clin Chem* 35: 241-245
- Eriksen G, Liestol J, Bjornholt E, Thaulow L, Sandvik L, Eriksen C (1998) Changes in physical fitness and changes in mortality. *Lancet* 352: 759-762
- Felig P, Wahren J (1971) Amino acid metabolism in exercising man. *J Clin Invest* 50: 2703-2713
- Guilland JC, Moreau D, Genet JM, Klepping J (1988) Role of catecholamines in regulation by feeding of energy balance following chronic exercise in rats. *Physiol Behav* 42: 365-369
- Hankey GJ, Eikelboom JW (1999) Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 354: 407-413

- Hardman AE (1996) Exercise in the prevention of atherosclerotic, metabolic and hypertensive diseases: A review. *J Sports Sci* 14: 201–218
- Henriksson J (1991) Effect of exercise on amino acid concentrations in skeletal muscle and plasma. *J Exp Biol* 160: 149–165
- Hermann M, Wilkinson J, Schorr H, Obeid R, Georg T, Urhausen A, Scharhag J, Kindermann W, Hermann W (2003) Comparison of the influence of volume-oriented training and high-intensity interval training on serum homocysteine and its cofactors in young, healthy swimmers. *Clin Chem Lab Med* 41: 1525–1531
- Jacob N, Bruckert E, Giral P, Foglietti MJ, Turpin G (1999) Cysteine is a cardiovascular risk factor in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis* 146: 53–59
- Jacobsen JG, Smith LH (1968) Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev* 48: 424–511
- Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lonning PE, Ueland PM (1995) Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other amino thiols in patients with early onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 232–240
- Marcucci R, Brunelli T, Giusti B, Fedi S, Pepe G, Poli D, Prisco D, Abbate R, Gensini GF (2001) The role of cysteine and homocysteine in venous and arterial thrombotic disease. *Am J Clin Pathol* 116: 56–60
- Matsuzaki Y, Miyazaki T, Miyakawa S, Bouscarel B, Ikegami T, Tanaka N (2002) Decrease taurine concentration in skeletal muscles after exercise for various durations. *Med Sci Sports Exerc* 34: 793–797
- Pitkanen H, Mero A, Oja SS, Komi PV, Rusko H, Nummela A, Saransaari P, Takala T (2002) Effects of training on the exercise-induced changes in serum amino acids and hormones. *J Strength Cond Res* 16: 390–398
- Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 281: 1632–1637
- Smolin LA, Benevenga NJ (1982) Accumulation of homocysteine in vitamin B6 deficiency. A model for the study of cystathionine synthase deficiency. *J Nutr* 112: 1264–1272
- Steenge GR, Verhoef P, Geenhaff PL (2001) The effect of creatine and resistance training on plasma homocysteine concentration in healthy volunteers. *Arch Intern Med* 161: 1455–1456
- Takekura H, Tanaka H, Wanatabe M, et al. (1986) Effects of taurine on glycolytic and oxidative enzyme activities of rat skeletal muscles. *Sulfur Amino Acids* 9: 125–132
- Taoka S, Ohja S, Shan X, Kruger WD, Banerjee R (1998) Evidence for Heme-mediated Redox Regulation of Human Cystathionine beta-Synthase Activity. *J Biol Chem* 273: 25179–25184
- Vincent KR, Braith RW, Bottiglieri T, Vincent HK, Lowenthal DT (2003) Homocysteine and lipoprotein levels following resistance training in older adults. *Prev Cardiol* 6: 197–203
- Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, Stabler SP, Reynolds RD, Kok FJ, Hennekens CH, Willet WC (1996) Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B12, and folate. *Am J Epidemiol* 143: 845–859
- Watanabe M, Minato K, Ono M (1987) Effects of taurine on the metabolism under physical exercise. *Sulfur Amino Acids* 10: 183–186
- Wright M, Francis K, Cornwell P (1998) Effect of acute exercise on plasma homocysteine. *J Sports Med Phys Fitness* 21: 262–265
- Zighetti ML, Chantarangkul V, Lombardi R, Lecchi A, Cattaneo M (2004) Effects of some pre-analytical conditions on the measurement of homocysteine and cysteine in plasma. *Clin Chem Lab Med* 42: 204–207

Authors' address: Vincent Gaume, Laboratoire de Physiologie et de Pharmacologie-Nutrition Préventive Expérimentale, Faculté de Médecine et de Pharmacie, EA 479, Place Saint Jacques, F-25030 Besançon Cedex, France,
E-mail: vincentgaume@hotmail.com

Defective remethylation of homocysteine is related to decreased synthesis of coenzymes B2 in thyroidectomized rats

A. Ayav^{1,2}, J. M. Alberto¹, F. Barbe¹, L. Brunaud^{1,2}, P. Gerard¹, M. Merten¹, and J. L. Gueant¹

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, INSERM-0014, Medical Faculty, University of Nancy I, Vandoeuvre lès Nancy, France

² Department of Digestive Surgery, University Hospital Brabois, Vandoeuvre les Nancy, France

Received August 23, 2004

Accepted November 18, 2004

Published online January 13, 2005; © Springer-Verlag 2005

Summary. We investigated the influence of hypothyroidism on homocysteine metabolism in rats, focusing on a hypothetical deficient synthesis of FAD by riboflavin kinases. Animals were allocated in control group (n=7), thyroidectomized rats (n=6), rats with diet deficient in vitamin B2, B9, B12, choline and methionine (n=7), thyroidectomized rats with deficient diet (n=9). Homocysteine was decreased in operated rats (2.6 ± 1.01 vs. $4.05 \pm 1.0 \mu\text{mol/L}$, $P=0.02$) and increased in deficient diet rats (29.56 ± 4.52 vs. $4.05 \pm 1.0 \mu\text{mol/L}$, $P=0.001$), when compared to control group. Erythrocyte-Glutathione-Reductase-Activation-Coefficient (index of FAD deficiency) was increased in thyroidectomized or deficient diet rats ($P=0.004$ for both). Methylene-tetrahydrofolate-reductase and methionine-synthase activities were decreased in thyroidectomized rats but not in those subjected to deficient diet. Cystathionine- β -synthase was increased only in operated rats. Taken together, these results showed a defective re-methylation in surgical hypothyroidism, which was due in part to a defective synthesis of vitamin B2 coenzymes. This defective pathway was overcompensated by the increased Cystathionine- β -synthase activity.

Keywords: Thyroidectomy – Homocysteine – Vitamin B2 – MTHFR – MTR – CBS

Introduction

Homocysteine is an amino acid of the one carbon metabolism, which is associated with the risk for cardiovascular diseases, neural tube defects, neurodegenerative disorders, and digestive carcinogenesis (McCully, 1969; Steegers-Theunissen et al., 1991; Mikol et al., 1983; Zapisek et al., 1992). Its plasma level is influenced by pathological events such as deficiency in folate, deficiency in vitamin B12, renal failure and thyroid dysfunction (Nebredo et al., 1998; Barbé et al., 1999; Nair et al., 1994; Guldener et al., 1999). Methionine synthase (MTR) and betaine-homocysteine-methyl-transferase (BHMT) play a key role in

homocysteine metabolism, as they catalyze the synthesis of methionine by re-methylating homocysteine (Fig. 1). BHMT dependant remethylation needs betaine as a co-substrate. S-adenosyl methionine (SAM), the substrate of methylation of DNA, proteins and lipids, is also an inhibitor of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and an activator of Cystathionine β -synthase (CBS), the key enzyme of the trans-sulfuration pathway of homocysteine. MTR dependant remethylation needs the presence of methyltetrahydrofolate as a co-substrate and B12 (methylcobalamin) as a co-factor of MTR (Banerjee and Matthews, 1990; Bestor, 1998; Razin and Riggs, 1980). MTR reductase keeps MTR in active form by reducing the cobalt of vitamin B12 during the catalytic cycle while methyltetrahydrofolate is synthesized from methylenetetrahydrofolate by MTHFR. Both MTHFR and MTR reductase need vitamin B2 as a coenzyme.

We have previously found a decreased synthesis of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) in thyroid dysfunction related to malnutrition (Capo-Chichi et al., 2000). This may result from the influence of thyroid hormones on the expression of flavokinases and FAD synthetase, the enzymes that catalyse the synthesis of FMN and FAD from riboflavin (vitamin B2) respectively (Rivlin, 1970).

We hypothesize therefore that a failure of coenzyme B2 synthesis by flavokinase may affect homocysteine remethylation pathway in hypothyroidism (Fig. 1). The present study was undertaken to investigate this hypothesis in rats subjected to thyroidectomy and/or a methyl-deficient diet.

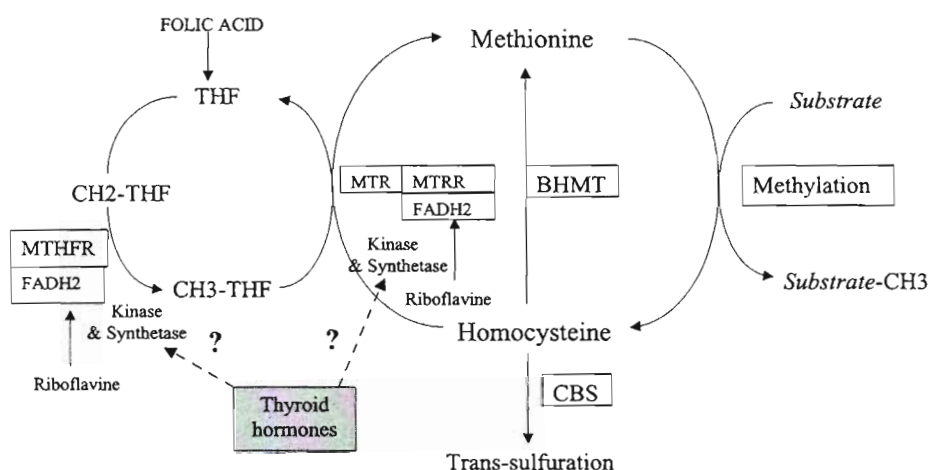


Fig. 1. Hypothetical influence of thyroid hormones on the Vitamin B2 coenzymes (FADH₂) dependant enzyme of the one carbon metabolism. *THF*, Tetrahydrofolate; *CH₂THF*, methylene tetrahydrofolate; *CH₃THF*, methyltetrahydrofolate; *MTHFR*, methylene tetrahydrofolate reductase; *MTR*, methionine synthase; *MTRR*, methionine synthase reductase; *BHMT*, betaine homocysteine methyl transferase; *CBS*, cystathionine β synthase; *FADH₂*, flavin adenine dinucleotide

Materials and methods

Animals

Twenty-nine male Fisher F344 rats were purchased. They were 1 per cage in plastic cages throughout the study at a room temperature of $23 \pm 3^\circ\text{C}$, under a 12 h dark cycle. Free access to tap was allowed. All rats were fed with normal diet for four week before starting the experiment. After this environmental adaptation period, all animals underwent blood sample collection. Animals were then allocated in 4 study groups:

- Group 1 (control group): non operated rats submitted to normal diet ($n = 7$),
- Group 2: thyroidectomized rats submitted to normal diet ($n = 6$),
- Group 3: non operated rats submitted to methyl-deficient diet ($n = 7$),
- Group 4: thyroidectomized rats submitted to methyl-deficient diet ($n = 9$).

In the current study, normal diet was defined as standard food (Maintenance diet M20, Scientific animal food an engineering, Villemoisson-sur-Orge, France); deficient diet was free vitamins B2 and B12, folate, methionine and choline (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). Thyroidectomy was performed by a surgical approach: animals were anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamin 25 mg/kg and a vertical cervicotomy was performed. The thyroid gland was exposed and carefully dissected under binocular glasses ($\times 4$) (Zeiss; USA) with a special attention for parathyroid glands and recurrent nerves. Blood samples were collected from anaesthetized animals by arteria caudalis mediana puncture.

Rats were sacrificed 8 weeks after the inclusion in the groups. Animals were anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamin 25 mg/kg, and following a midline abdominal incision and sternotomy, blood samples were collected from heart puncture. Each blood samples were collected on heparin and then centrifuged for 5 min at 3500 rpm. Aliquots of plasma were stored frozen at -80°C until analysis. Liver were rapidly removed, freeze-clamped in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further used.

Body weight and blood samples were checked the first and the last day of the study. Blood samples were used to determine plasma homocysteine, blood TSH, vitamin B12 and folate levels at the beginning and at the end of the study. The activities of the enzymes involved in methionine metabolism and vitamin B2 status were assessed only at the end of the study.

Assays of TSH, vitamin B2, B12, folate, homocysteine

Blood TSH level was determined by competitive radio immunoassay (Immunotech; Beckman Coulter Company). Vitamin B2 status has been assessed by measuring the Erythrocyte Glutathione Reductase Activation Coefficient (EGRAC) which is the ratio between enzyme activity determined with and without the addition of the cofactor FAD (Glatzle, 1970; Glatzle, 1973; Becker, 1991). Cobalamin and folate levels were determined by radio-dilution isotope assay (SimulTRAC-SNB; ICN Pharmaceuticals- USA). Plasma homocysteine level was determined by fluorescent polarization immunoassay (FPIA) (IMX system Abbott; Norway).

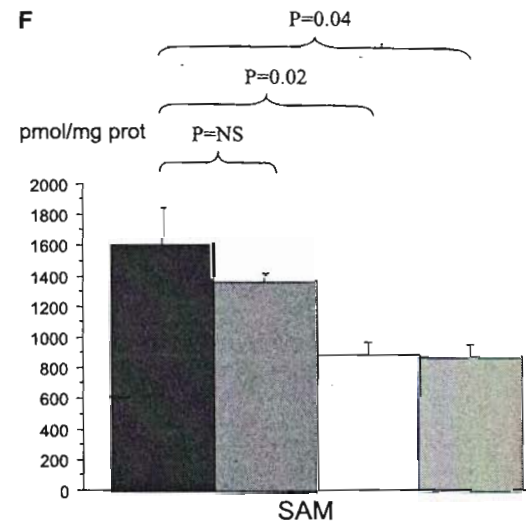
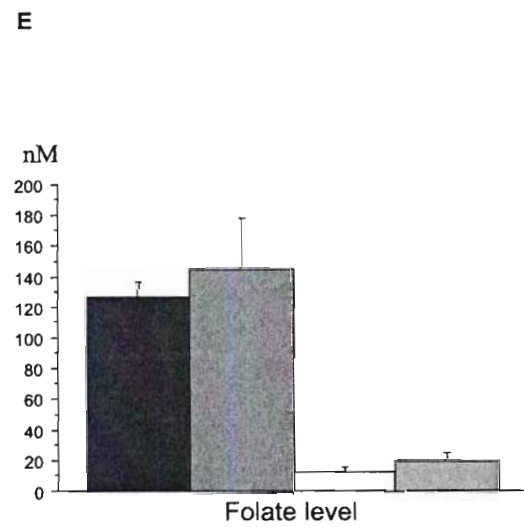
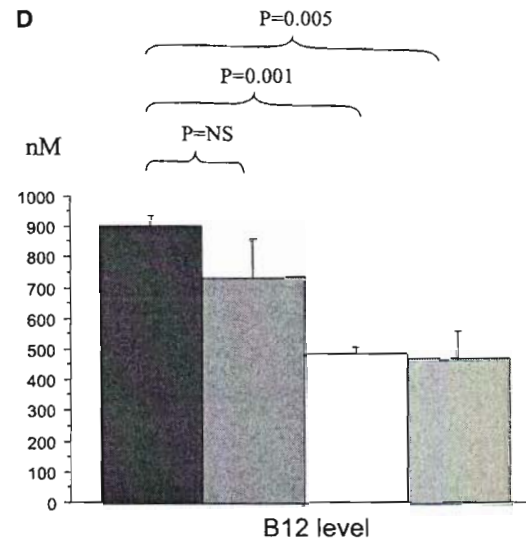
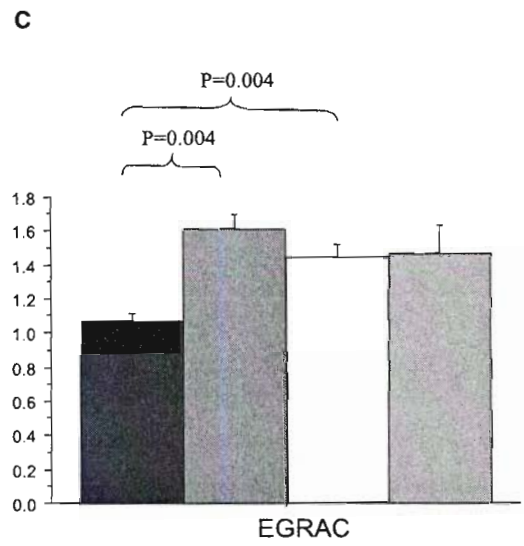
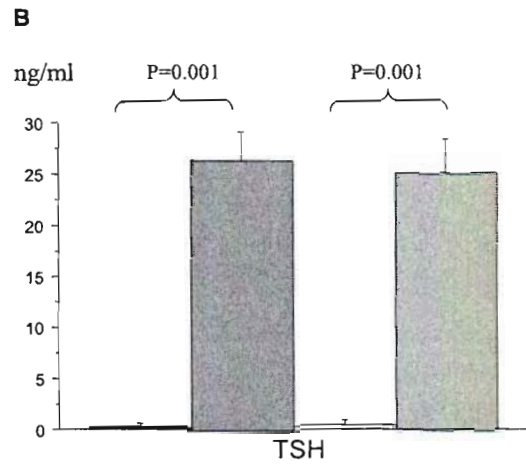
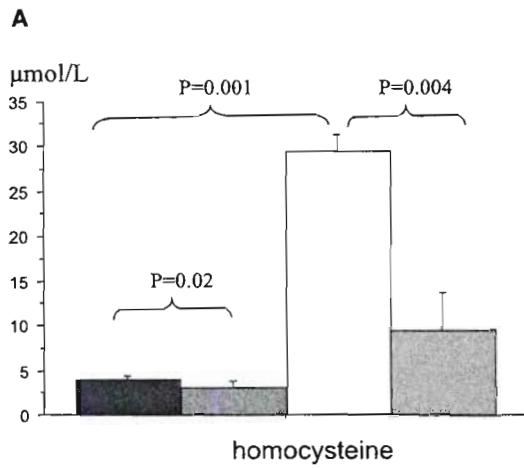
Activities of enzymes involved in methionine metabolism

Methionine synthase (MTR): the method was adapted from Chen *et al.* (Chen, 1995). Proteins were incubated in a buffered solution consisting of 100 mM KH_2PO_4 at pH 7.2, 25 mM DTT, 25 mM ascorbate, 0.5 mM SAM, 50 μM OH-cobalamin, 5 mM D,L-HCY (freshly prepared) and 250 μM [^{14}C]methyl-tetrahydrofolate ($\sim 11,000$ cpm/nmol). The reaction was stopped by adding cold water; after centrifugation, the supernatant was laid on a cationic gel (quaternary ammonium, AG1 \times 8, Cl^- form, Bio-Rad). After elution, [^{14}C]methionine was measured with PicoFluor-40 (Packard Biosciences).

Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) enzymatic activity was assessed as described by Garrow (Garrow, 1996). **Methylene Tetrahydrofolate Reductase (MTHFR)** activity was measured as reported by Kutzbach *et al.* (1971).

Cystathionine β -synthase (CBS): the method was adapted from Taoka *et al.* (1998). Proteins were incubated for 30 min at 37°C in a reactive solution

Fig. 2. Plasma homocysteine level and related determinants in rats subjected to thyroidectomy and/or deficient diet. Data are expressed as mean \pm SD. **A** Homocysteine plasma level; **B** TSH plasma level; **C** Erythrocyte Glutathione Reductase Activation Correlation test (EGRAC); **D** Plasma vitamin B12; **E** Plasma folate; **F** S-adenosylmethionine (SAM) in liver extracts



Group 1: Control group
 Group 2: Thyroidectomized rats. normal diet
 Group 3: Non operated rats. deficient diet
 Group 4: Thyroidectomized rats. deficient diet

containing 0.1 M Tris (pH 8.5), 1 mM cystathionine, 5 mM D,L-serine (Sigma), 1 mM pyridoxal 5'-phosphate, 0.25 μ Ci (14 C) serine (Amersham Biosciences, Saclay, France), and 15 mM homocysteine (Sigma). After washing with 20 mM maleic acid (pH 1.9) and 0.2 M LiCl, radiolabeled cystathionine was eluted with 50 mM acetic acid (pH 4.8), 0.8 M LiCl into Dowex 50WX2-200 gel (Sigma), and then quantified by means of a liquid scintillation analyser (Packard Biosciences, Meriden, CT, USA).

S-Adenosylmethionine (SAM): the method was adapted from Luippold et al. (1999) and based on a reverse phase liquid chromatography technique using a linear acetonitrile gradient. Proteins were precipitated with 0.2 N HClO₄, centrifuged, and the supernatant was filtered through 0.45 μ m before injection on the column (Lichrospher[®], 100 RP-C18, 5 μ m, 250 \times 4 mm I.D). The mobile phase was applied at a flow rate of 0.75 mL/min and consisted in 50 mM sodium phosphate (pH 3.2), 10 mM heptan sulfonate and acetonitrile (10 to 20% from 0 to 20 minutes). Amounts of SAM was quantified by using an UV detector (254 nm).

Statistical analysis

The analysis was performed using StatView (SAS Institute Inc.; Berkeley, USA). All values were expressed as mean \pm standard deviation. Mann-Whitney-U test was used to evaluate differences between continuous variables. Correlations were evaluated using correlation matrix and stepwise multiple regression analysis. Statistical significance was considered for P values < 0.05.

Results

Homocysteine level was highly increased in rats of group 3 (non operated rats submitted to deficient diet) when compared to control group (29.56 ± 4.52 vs. 4.05 ± 1.0 μ mol/L, $P = 0.001$). Inversely, homocysteine level was significantly decreased in rats of group 2 (thyroidectomized rats submitted to normal diet) when compared to control group (2.6 ± 1.01 vs. 4.05 ± 1.0 μ mol/L, $P = 0.02$) (Fig. 2A). Moreover, homocysteine level was dramatically decreased in rats subjected to both thyroidectomy and deficient diet (group 4) when comparing rats submitted to rats subjected only to deficient diet (group 3) (9.55 ± 9.0 vs. 29.56 ± 4.52 μ mol/L, $P = 0.004$). These findings showed that thyroidectomy decreased homocysteine level whatever the nutritional status in methyl precursors was.

TSH level at the end of the study was significantly increased in groups of thyroidectomized rats (groups 2 and 4) when compared to non operated rats (groups 1 and 3) (Fig. 2B), indicating the efficiency of the surgical procedure for producing hypothyroidism. Thyroid and/or diet status had no significant influence on the evolution of plasma creatinine and urea levels between levels at the inclusion day into the study and levels at the end of the study. These changes were equivalent in all 4 groups.

The EGRAC value was significantly increased in thyroidectomized rats (1.61 ± 0.21 vs. 1.07 ± 0.12 , $P = 0.004$), with the same order of magnitude than that observed in rats subjected to a diet deficient in vitamins B

Table 1. Values of enzymes involved in homocysteine metabolism

	Non operated normal diet Group 1 (n = 7)	Thyroidectomized normal diet Group 2 (n = 6)	P-value (Group 2 vs. 1)	Non operated deficient diet Group 3 (n = 7)	P-value (Group 3 vs. 1)	Thyroidectomized deficient diet Group 4 (n = 9)	P-value (Group 4 vs. 1)
MTHFR (nmol/h/mg)	5.12 (\pm 2.94)	2.37 (\pm 0.28)	0.01	2.27 (\pm 0.35)	0.01	2.15 (\pm 0.47)	0.01
MTR (nmol/h/mg)	3.26 (\pm 0.31)	2.43 (\pm 0.63)	0.01	2.99 (\pm 0.47)	NS	2.20 (\pm 0.60)	0.007
CBS (nmol/h/mg)	194 (\pm 60)	355 (\pm 95)	0.01	262 (\pm 79)	NS	215 (\pm 73)	NS
BHMT (nmol/h/mg)	14.6 (\pm 7.0)	14.8 (\pm 4.3)	NS	10.7 (\pm 2.0)	NS	9.5 (\pm 2.9)	NS

MTHFR, Methylene tetra hydro folate reductase
MTR, Methionine synthase
CBS, Cystathionine β synthase
BHMT, Betaine homocysteine methyl transferase

Table 2. Correlation between TSH and metabolic and nutritional markers of one carbon metabolism

	Correlation coefficient	Z	95% CI	P-value
TSH vs				
Homocysteine	-0.469	-2.331	-0.734, -0.081	0.01
EGRAC	0.523	2.661	0.152, 0.765	0.007
MTR	-0.603	-3.197	-0.809, -0.264	0.001
Homocysteine vs				
B9	-0.670	-3.718	-0.845, -0.366	0.0002
B12	-0.524	-2.664	-0.765, -0.152	0.007
SAM	-0.567	-2.804	-0.798, -0.191	0.005
EGRAC vs				
TSH	0.523	2.661	0.152, 0.765	0.007
MTHFR	-0.393	-1.905	-0.688, 0.012	0.05

EGRAC, Erythrocyte glutathione reductase activation correlation

MTHFR, Methylene tetra hydro folate reductase

MTR, Methionine synthase

SAM, S-adenosylmethionine

(1.44 ± 0.19 vs. 1.07 ± 0.12 , $P = 0.004$) (Fig. 2C). The increased EGRAC value indicated a decreasing on vitamin B2 status. As expected, the levels of serum folate and B12 were lower in rats subjected to deficient diet, and was not influenced by thyroidectomy (Fig. 2D and E).

The SAM level was not influenced by thyroidectomy and was decreased by 2-fold in rats subjected to deficient diet (groups 3 and 4) confirming, at a metabolic level, its efficacy (Fig. 2F).

Regarding enzymes involved in re-methylation pathway in thyroidectomized rats (group 2), MTHFR and MTR activities were decreased when compared the control group ($P = 0.01$ for both). Conversely, CBS activity, was highly increased ($P = 0.01$). On the other hand, regarding the same enzymes in deficient diet rats (group 3), only MTHFR activity was significantly decreased compared to control group ($P = 0.01$). Rats subjected to both thyroidectomy and deficient diet (group 4) exhibited a decreased MTHFR and MTR activities ($P = 0.01$ and 0.007 respectively), as observed in those undergoing thyroidectomy alone (Table 1).

In multiple regression analysis, blood TSH level was significantly correlated with MTR, EGRAC and homocysteine (Table 2). The association of TSH level with EGRAC indicated therefore that thyroid hormones are involved in regulating the synthesis of riboflavin coenzymes. The weak association of MTHFR activity with EGRAC ($P = 0.05$) illustrated the already known role of coenzyme B2 in MTHFR activity. The absence of significant correlation between TSH and MTHFR could be due to the limited number of rats ($p = 0.1065$).

Discussion

This study was designed to investigate the influence of surgical hypothyroidism on homocysteine metabolism in rats, concomitantly with the already known nutritional determinants of homocysteine. We focused our interest in the status on FAD and its consequences on the re-methylation pathway. The dramatically increasing of blood TSH level in operated rats showed the efficiency of this surgical model to produce hypothyroidism. We preferred this surgical approach to a "medical thyroidectomy" with propylthiouracil or with radioactive iodine (Rivlin, 1970) in order to eliminate a possible effect of this treatment on homocysteine metabolism.

Contrarily to what has been observed in human hypothyroidism (Ingenbleek et al., 1986; Nebredo et al., 1998; Barbé et al., 1999), hypothyroid rats exhibited a tendency toward a decrease of plasma homocysteine level, in agreement to what has been previously reported by Jacobs et al. (2000). In a previous work, we reported an increase of homocysteine level around $20 \mu\text{mol/L}$ after 2 months in rats subjected to diet deficient in folate, vitamin B12, methionine and choline but not in vitamin B2 (Brunaud et al., 2003). The current deficient diet included the removal of vitamin B2. Under these conditions a higher concentration of homocysteine was observed ($29 \mu\text{mol/L}$), illustrating the importance of vitamin B2 coenzymes in homocysteine metabolism in rats. We observed an increase of EGRAC values in thyroidectomized rats in the same order of magnitude than in rats subjected to a diet deficient in vitamin B2. In addition,

EGRAC was significantly correlated to TSH ($r = 0.523$, 95% CI: 0.152–0.765, $P = 0.007$). These 2 findings showed therefore a decrease synthesis of FAD by riboflavin kinases as previously reported in hypothyroidism (Rivlin and Langdon, 1966; Cimono et al., 1987; Lee et al., 1985). We believe that the low MTHFR activity observed in thyroidectomized rats could be therefore explained by an impaired synthesis of coenzymes B2 riboflavin by riboflavin kinase (Glatzle, 1973). Two experimental findings supported this hypothesis: 1) a low MTHFR activity was reported in hypothyroid rats, which was in the same order of magnitude than that recorded in the rats deficient in vitamins B (2.37 ± 0.28 and 2.27 ± 0.35 nmol/h/mg, respectively); and 2) MTHFR activity was significantly correlated with EGRAC ($r = -0.393$, 95% CI: -0.688 – 0.012 , $P = 0.05$).

Hypothyroid rats exhibited a significant decreasing of MTR activity. This decreased activity observed in rats with hypothyroidism was not depending on vitamin B12 since the level of this vitamin was not different to that reported in the control group. Even though no correlation was found with EGRAC, MTR activity is depending indirectly on FAD, which is the co-enzyme of MTR reductase. Presently, MTR activity was determined in presence of DTT, a reductase chemical agent that does not allow to evaluate the influence of MTR reductase and FAD.

Taken together, our results suggested that hypothyroidism produced a defective re-methylation of homocysteine, with a drop of the activity of the two key enzymes, MTHFR and MTR that could be related in part to a decreased synthesis of FAD. Because of a defective re-methylation pathway, we would have expected hyperhomocysteinemia in hypothyroid rats, as described in hypothyroid humans (Ingenbleek et al., 1986; Nebredo et al., 1998; Barbé et al., 1999). Furthermore, this defective re-methylation was not compensated by BHMT suppletive pathway since the activity of this enzyme in the liver was not influenced by hypothyroidism. In addition, homocysteine metabolism of operated rats was not affected by renal dysfunction as creatinine and urea levels remained unchanged in rats submitted to thyroidectomy and/or deficient diet. In fact, the tendency to hypohomocysteinemia of the thyroidectomized rats can be explained by an increased CBS activity, involved in the trans-sulfuration pathway. This increased activity was not related to an allosteric activation by SAM, as the level of this effector was not affected by thyroidectomy. This means probably that the increased activity of CBS, which has been already observed by others (Heinonen, 1975; Jacobs et al., 2000) played a predominant role on the

homocysteine homeostasis compared to the defective re-methylation pathway, at least in hypothyroid rats.

References

- Banerjee RV, Matthews RG (1990) Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J* 4: 1450–1459
- Barbé F, Klein M, Chango A, Weryha G, Nicolas JP, Leclère J (1999) Hypothyroidism increases plasma homocysteine concentrations. *J Endocrinol Invest* 22: 28
- Becker K, Krebs B, Schirmer RH (1991) Protein-chemical standardization of the Erythrocyte Glutathione Reductase Activation Test (EGRAC TEST). Application to hypothyroidism. *Int J Vitamin Nutr Res* 61: 180–187
- Bestor TH (1998) Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* 393: 311–312
- Brunaud L, Alberto JM, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L, Braun M, Bronowicki JP, Bresler L, Gueant JL (2003) Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats. *Digestion* 68: 133–140
- Capo-Chichi CD, Feillet F, Gueant JL, Amouzou K, Zanon N, Sanni A, Lefebvre E, Assimadi K, Vidailhet M (2000) Concentration of riboflavin and related organic acids in children with protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr* 71: 978–986
- Chen Z, Chakraborty S, Banerjee R (1995) Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *J Biol Chem* 270: 19246–19249
- Cimono JA, Jhangiani S, Schwartz E, Cooperman JM (1987) Riboflavin metabolism in the hypothyroid human adult. *Proc Soc Exp Biol Med* 184: 151–153
- Garrow TA (1996) Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem* 271: 22831–22833
- Glatzle D (1970) Method for detection of a biochemical riboflavin deficiency. Stimulation of NADPH2-dependent glutathione reductase from human erythrocytes by FAD *in vitro*. Investigations on vitamin B2 status in healthy people and geriatric patients. *Int Z Vitaminforsch* 40: 166–183
- Glatzle D (1973) Correlations between riboflavin supply, glutathione reductase activities and flavin levels in rats. *Int J Vitamin Nutr Res* 43: 187–200
- Guldener C, Kulik W, Gerger R, Dijkstra DA, Jakobs C, Reijngoud DJ, Donker AJM, Stehouwer CDA, De Meer K (1999) Homocysteine and methionine metabolism in ESRD: a stable isotope study. *Kidney International* 56: 1064–1071
- Heinonen K (1975) Effects of hypothyroidism and thyroxine substitution on the metabolism of L-methionine, L-cystathionine and taurine in developing rat brain. *Acta Endocrinologica* 80: 487–500
- Ingenbleek Y, Barclay D, Dirren H (1986) Nutritional significance of alterations in serum amino acid patterns in goitrous patients. *Am J Clin Nutr* 43: 310–319
- Jacobs RL, Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT (2000) Plasma homocysteine is decreased in the hypothyroid rat. *Can J Physiol Pharmacol* 78: 565–570
- Kutzbach C, Stokstad EL (1971) Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 250: 459–477
- Lee SS, Mc Cormick DB (1985) Thyroid hormone regulation of flavo-coenzyme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 237: 107–201
- Luippold G, Delabar U, Kloor D, Muhlbauer B (1999) Simultaneous determination of adenosine, S-adenosylhomocysteine and S-adenosyl-

- methionine in biological samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 724: 231–238
- McCully KS (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56: 111–128
- Mikol YB, Hoover KL, Creasia D, Poirier LA (1983) Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 4: 1619–1629
- Nair CPP, Viswanathan G, Noronha JM (1994) Folate mediated incorporation of ring-2-carbon of histidine into nucleic acids: influence of thyroid hormone. *Metabolism* 43: 1575–1578
- Nebredo BG, Ericsson UB, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Aakvaag A, Aanderud S, Lien EA (1998) Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients. *Metabolism* 47: 89–93
- Razin A, Riggs AD (1980) DNA methylation and gene function. *Science* 210: 604–610
- Rivlin R (1970) Regulation of flavoprotein enzymes in hypothyroidism and in riboflavin deficiency. *Adv Enzyme Regul* 8: 239–250
- Rivlin R, Langdon R (1966) Regulation of hepatic FAD levels by thyroid hormone. *Adv Enzyme Regul* 4: 45–58
- Stegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJM, Eskes TK (1991) Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 324: 199–200
- Takoa S, Ohja S, Shan X, Kruger WD, Banerjee R (1998) Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity. *J Biol Chem* 273: 25179–25184
- Zapisek WF, Cronin GM, Lyn-Cook BD, Poirier LA (1992) The onset of oncogene hypomethylation in the livers of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 13: 1869–1872

Authors' address: Prof. Jean-Louis Gueant, Laboratory of cellular and molecular pathology, INSERM-0014, Medical Faculty, University of Nancy I, avenue de la forêt de Haye, 54500, Vandoeuvre lès Nancy, France,
Fax: +33.3.83.15.35.91, E-mail: jl.gueant@chu-nancy.fr

Homocysteine Increases Methionine Synthase mRNA Level in Caco-2 Cells

Sandrine Ortiou, Jean-Marc Alberto, Jean-Louis Guéant and Marc Merten

Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, Equipe INSERM 0014, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy Cedex

Key Words

Methionine dependence • Methionine synthase • Cobalamin • Vitamin B12 • Real-time RT-PCR

Abstract

Background: Methionine synthase (MTR) synthesizes methionine from homocysteine, using cobalamin as a cofactor and 5-methyltetrahydrofolate as a cosubstrate. **Aim:** To determine the influence of homocysteine (Hcy, dimer of homocysteine) in the presence of either cobalamin or methionine on the transcription and the activity of *methionine synthase* in Caco-2, a human adenocarcinoma cell line. **Methods:** Methionine synthase activity and quantification of its mRNA by real-time RT-PCR were determined in cells cultivated under four different conditions: Hcy with cobalamin (Hcy+ Cbl+), Hcy with methionine (Hcy+Met+), methionine with Cbl (Met+ Cbl+) and methionine only (Met+). **Results:** Activity (nmol/h/mg protein) was maximal in cells cultivated in Hcy+Cbl+ (2.45 ± 0.35), compared to cells cultivated in Hcy+Met+ (0.18 ± 0.01 , $p < 0.001$), in Met+ Cbl+ (1.60 ± 0.06 , $p < 0.05$), and in Met+ (0.40 ± 0.05 , $p < 0.001$), suggesting an adaptation of the cells to

requirement in synthesized methionine. The mRNA level of MTR in Hcy+ Cbl+ and Hcy+Met+ (2.82 ± 0.49 and 3.33 ± 0.48 AU, respectively) was about 2.5 / 3.0-fold higher than that in Met+ Cbl+ and in Met+ (1.00 ± 0.13 and 1.20 ± 0.20 AU, respectively, $p < 0.001$). **Conclusion:** Methionine synthase expression of Caco-2 cell is under a transcriptional control influenced by Hcy.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

Introduction

In contrast to normal cells, many cancer cells cannot grow in a medium where methionine is replaced by homocysteine [1, 2]. This phenotypic characteristic, referred as methionine dependence, has led to investigations about cancer therapy through methionine deprivation of patients. Methionine depletion using methioninase, or a diet free of methionine could have a stable inhibitory effect on the growth of malignant cells either *in vitro* [3, 4] or *in vivo* [5, 6] without impairing the growth and the metabolism of normal cells.

Methionine originates from nutrition source and endogenous synthesis. The main pathway of synthesis is the re-methylation of homocysteine by 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (methionine synthase, MTR) in the presence of 5-methyltetrahydrofolate as the methyl donor and cobalamin (Cbl, vitamin B12) as a cofactor [7]. Methionine is the precursor of S-adenosyl-methionine which is the methyl donor for methylation of nucleotides, proteins and lipids. Thus, Cbl and folate are essential limiting factors of methionine synthesis [8, 9] and the consequent methylation reactions. Regulation of MTR expression by either methionine or Cbl may also be crucial in methionine synthesis. Kamely et al. have shown that the removal of methionine from culture medium of BHK cells containing folic acid, Cbl and homocysteine increases MTR activity. This result suggested that MTR was increased under conditions requiring increased methionine synthesis [10]. More recently, it has been shown that Cbl increases expression of MTR by a post-transcriptional mechanism [11, 12]. In contrast to methionine and Cbl, the role of homocysteine on the expression and activity of MTR has been poorly investigated [13]. Homocysteine is known to enhance the transcription of an increasing number of genes [14-16]. Its influence on MTR transcription has even been reported in fungi and yeast [17]. However, its role in the transcription of mammalian MTR is unknown.

In the present study, we investigated the role of Homocysteine (under its stable non cytotoxic dimeric form homocystine, Hcy), comparing it to methionine and Cbl, in both the transcription and the activity of MTR in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2) cultivated for methionine-dependence. We showed herein that MTR mRNA level is influenced by Hcy.

Materials and Methods

Reagents

Methionine, homocysteine, homocystine, homocysteine-thiolactone, L-cystine, S-adenosyl-methionine, hydroxocobalamin, the protease inhibitor cocktail (P8340) and Neutral Red were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). Cyanocobalamin was provided by Aguetant (Lyon, France). [¹⁴C]Methyl tetrahydrofolate was purchased from Amersham Biosciences (Orsay, France) with a specific activity of 57 μCi/μmol. Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Dulbecco's Modified Eagle's Medium without L-methionine and L-cystine were from Gibco Invitrogen Corporation (Cergy Pontoise, France). All other chemicals were of cell culture grade.

Culture conditions

The colonic TC7 cell line which is a subclone of Caco-2 cells [18] was a generous gift from J.N. Freund (INSERM U.381, Strasbourg, France). Cells were routinely grown as described previously [19]. DMEM medium containing 5 % FCS and no methionine (Met free medium) was supplemented with either 30 mg/l L-methionine (Met+), and/or 50 μM Homocystine (Hcy+), each of them with or without Cbl (Cbl+ or Cbl free) at the concentrations indicated in the text. 48 mg /l of L-cystine was always added to the medium which contained neither methionine nor cysteine. At the end of all incubations with the different media, cell viability was assessed by the measurement of the metabolism of the intracellular MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, St Louis, MO, USA) by cells. For the 5th day for dose-response curves or every day for growth curve, cell number was measured by the Dye uptake method using Neutral Red cell incorporation [20]. The results are expressed as the percentage of maximal value of O.D.

Measurements of methionine synthase activity

Cells were seeded at a density of 6×10^3 cells/cm² onto 100 mm Petri dishes and cultured until confluency. Determination of MTR activities was performed by a modification of the radioisotope assay described by Weissbach [21]. In brief, cell lysates (1 mg) were homogenized at 4°C in 0.5 ml of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.2) in the presence of protease inhibitors. After centrifugation (10,000 g, 4°C) for 3 min to remove cell debris, the supernatant was used as crude extract. For measurement of apoenzyme activity, reaction mixture contained 0.25 mM DL-homocysteine, 29 mM dithiothreitol (used as reducing agent), 7 mM β-mercaptoethanol, 0.25 mM S-adenosyl-methionine, 1 μCi (22 μM) [methyl-¹⁴C]MeH₄F, crude extract and 50 μM potassium phosphate buffer in a total volume of 800 μl. The enzyme reaction was carried out under a N₂ atmosphere at 37°C for 1 h in the dark and then stopped by heating at 95°C for 5 min. The assay measures the amount of radioactive methionine formed from 5-[¹⁴C]methyl-THF and Hcy. The mixture was passed through AG-1X8 (Cl⁻) columns (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and ¹⁴C radioactivity in the methionine containing fraction was measured. Holoenzyme were determined by the same procedure except that 25 μM of hydroxo-Cbl was added to the reaction mixture. The radiolabeled methionine was measured in a Packard liquid scintillation counter. Enzyme activity was expressed as nmoles of methionine produced per hour per mg of proteins.

Real-time quantitative RT-PCR of methionine synthase expression

Total RNA was purified from cells grown in 6 well-plates (10⁶ cells/well) using the RNeasy mini kit from Qiagen (Courtaboeuf, France), which includes treatment with DNase. To check for possible DNA contamination of the RNA samples, reactions were also performed in the absence of RT enzyme. The PCR was performed using the FastStart DNA master SYBR green I kit and the Light Cycler instrument from Roche

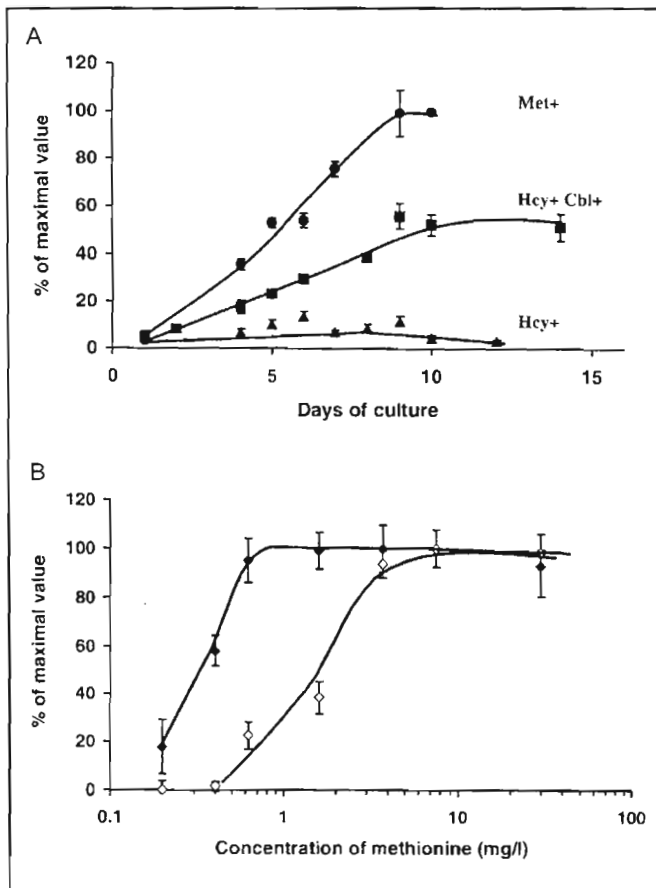


Fig. 1. (A) Effects of culture conditions on growth kinetics of Caco-2/TC7 cells. Cells were cultured in methionine medium (\bullet), or in media devoid of methionine but containing either homocystine (\blacktriangle) or containing both homocystine and cobalamin (\blacksquare). (B): Cell growth dependence on methionine concentration in presence (\blacklozenge) or absence (\circ) of homocystine (50 μ M) and cobalamin (100 nM). Cell number was determined using the dye uptake method. Means \pm S.D. of octaplicate assays are given.

Diagnostics (Manheim, Germany). Specific amplifications were performed using the following primers, forward: 5'-GAGAACCCTCTGCATTGGA-3', reverse: 5'-GGAAGACCTGCATTGGGATA-3'; the expected product size was 121 base pairs. Quantitation was performed using ribosomal 18S as internal standard with the following primers: forward, 5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGG-3'; reverse: 5'-CAGCTTTGCAAC CATACTCC-3'; the expected product size was 163 base pairs. Real-time PCR was carried out using the DNA binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products. Temperature cycling proceeded as follows: 8 min at 95 $^{\circ}$ C to activate the enzyme, followed by 45 cycles consisting of: 95 $^{\circ}$ C for 10 s, 65 $^{\circ}$ C for 5 s and 72 $^{\circ}$ C for 10 s. Then melting

curves analyses were performed by increasing temperature from 70 to 95 $^{\circ}$ C. Results were expressed as arbitrary units (AU) by calculating the ratio of crossing points of amplification curves of MTR mRNA and internal standard, respectively, using the RelQuant software (Roche Diagnostics, Manheim, Germany).

Statistics

All results were expressed as means \pm standard deviation (S.D.). The significance between the effects of culture conditions was determined by analysis of variance (ANOVA). In each experiment, means were determined from octaplicate assays.

Results

Determination of Culture conditions for optimal growth in methionine-free, homocystine-containing medium

Cells were able to proliferate in methionine-free homocystine and cobalamin (Hcy+ Cbl+) medium, with the rate of cell growth being approximately 50% of that in methionine (Met+) medium (figure 1A). Similar results were obtained when homocystine was replaced with Homocysteine-thiolactone. We chose to avoid homocystine because it triggered toxicity to cell growth as shown by MTT test. Once they were plated in Met free medium, cells stopped growing. Conversely, when cells, which were plated in Met free Hcy+ medium for 8 days and which did not grow, were changed to a Met+ medium or to a Hcy+ Cbl+ medium, cell growth resumed to the same rate as when they were newly plated in Met+ or Hcy+ Cbl+ media (data not shown). Cell growth in increasing concentrations of methionine was compared with the cell growth in the same conditions but in the presence of Hcy and Cbl (figure 1B). Dose-response curves showed that a 3 mg/l concentration of Met triggers maximal growth rate and that a low 0.6 mg/l concentration was sufficient to initiate cell growth. When Hcy and Cbl were added in the cell culture medium, they could promote maximal cell growth in the presence of reduced concentrations of Met with a plateau beginning at 0.6 mg/l. Since homocystine and Cbl concentrations appeared important in assessing the ability of cells to proliferate in Met free Hcy + medium, effects of concentrations of these metabolites on cell growth were determined. Cell growth in the presence of 100 nM Cbl was dependent upon the concentration of added Hcy, with a plateau observed at a concentration of 30 μ M (figure 2A). On the other hand, the addition of homocystine to the medium containing methionine had no effect on the growth rate

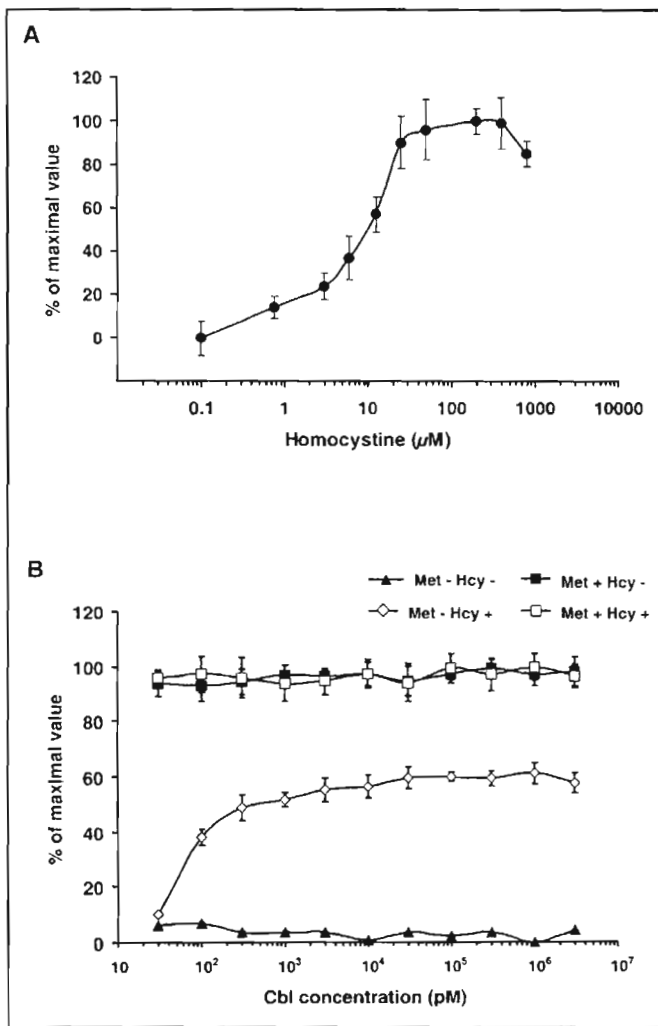


Fig. 2. Influence of concentrations of homocystine (A) and cobalamin (B) on growth kinetics of Caco-2/TC7 cells. Cell number was determined at day five, by Neutral Red incorporation and results are expressed as a percentage of maximal O.D. value. Means \pm S.D. of octuplicate assays are given. (A) Cells were plated in methionine-free medium supplemented with cobalamin in the presence of increasing concentration of homocystine. (B) Cells were plated in the presence of methionine (\blacksquare), in the presence of methionine and homocystine (\square), in the absence of both methionine and homocystine (\blacktriangle), or in the presence of homocystine (\diamond). For each cell culture condition, increasing concentrations of cobalamin have been tested.

of the cells. Similar results were obtained when homocysteine-thiolactone was used instead of homocystine. Cbl concentration dependence of cell growth is shown in figure 2B. Growth of cell cultured in Met+ medium was maximal and was not affected by Cbl concentration. On the contrary, there was no significant

growth in Met free Hcy free medium, whatever the concentration of Cbl. Cells cultured in the presence of 50 μ M of Hcy showed a Cbl-dependent growth rate. The concentration of Cbl in the native Met free medium (30 pM, coming from FCS) was not able to trigger cell growth in the presence of homocystine and was taken into account in the estimation of final concentration. The plateau of maximal growth of cells in Hcy medium was reached at a 0.3 nM concentration of Cbl. Higher concentrations (up to 3 μ M) did not modify cell growth.

Methionine synthase activity and expression

The MTR activity was determined in cells which were cultured in media supplemented with either homocystine and Cbl (Hcy + Cbl+), homocystine and methionine (Hcy+ Met+), methionine and Cbl (Met+ Cbl+) or methionine (Met+), at the concentrations required for optimal growth (figure 3). When enzyme activity was determined without the addition of Cbl in the incubation mixture, the specific activity ranged from a low of 0.05 ± 0.01 for cells cultured in Met+ medium to a high 1.36 ± 0.03 nmol/h /mg of proteins for cells cultured in Met+ Cbl+ ($p < 0.001$). When Cbl was added to saturation before the enzymatic reaction, the activities of MTR raised, showing amounts of total enzyme. These were maximal in Hcy+ Cbl+ and intermediate in Met + Cbl+ media, with activities as high as 2.45 ± 0.35 and 1.60 ± 0.06 respectively, and minimal in Met+ medium and Hcy + Met+ medium, with activities of 0.40 ± 0.05 and of 0.18 ± 0.01 nmol/h/mg of proteins respectively. The replacement of Met by Hcy increased therefore by 1.5-fold the total activity of the enzyme ($p < 0.05$), suggesting a specific effect of Hcy on MTR expression, independent from that of Cbl. This prompted us to set a quantitative real-time RT-PCR assay for looking at whether the culture conditions which led to differences in MTR activities, triggered changes in mRNA level of MTR. The internal reference was the 18S ribosomal RNA as the expression of other commonly used standards (GAPDH, β -actin) were found to be dependent on either DNA methylation rate or cell growth. A specific amplification product was obtained. In addition, the melting peak showed the specificity of amplification (figure 4A). The Light Cycler software calculated the standard curve by plotting the starting dilution of each standard sample vs. the threshold cycle, and the sample concentrations were then calculated accordingly (figure 4 B and C). Figure 4D shows that expression was maximal in cells cultured in Hcy+ Cbl+ and Hcy+ Met+ media (2.82 ± 0.49 and 3.33 ± 0.48 AU, respectively). It was about 2.5 / 3.0-fold

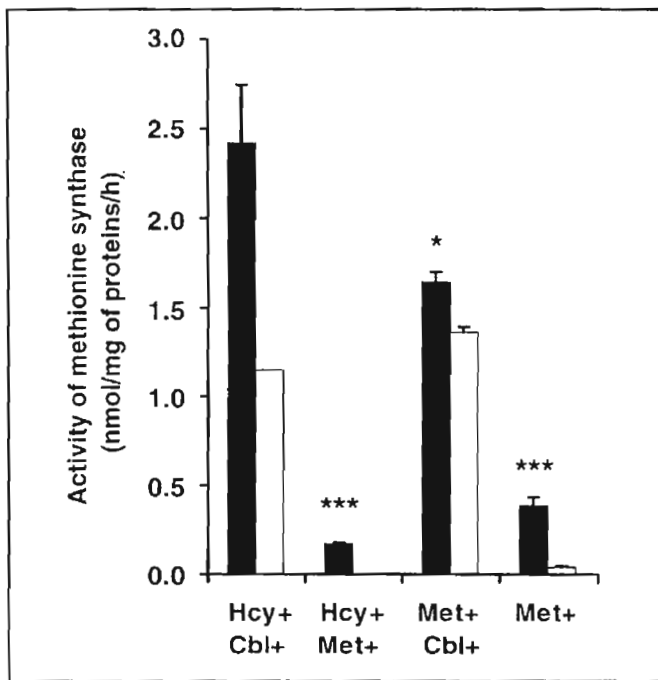


Fig. 3. Activity of methionine synthase in Caco-2/TC7 cells according to the culture conditions. Cells were grown in methionine-free media supplemented with either homocysteine (50 μ M) and cobalamin (100 nM), homocysteine and methionine (30 mg/l), methionine and cobalamin, or methionine. Methionine synthase activity was measured with (dark bars) or without (open bars) cobalamin in the reaction mixture showing presence of respectively total- and holo-enzyme. Cell extracts were obtained as described in material and methods. Mean \pm S.D. of triplicate assays are given. ***: $p < 0.001$, *: $p < 0.05$

higher than that in cells grown either in Met+ Cbl+ (1.00 \pm 0.13 AU, $p < 0.001$) or Met+ (1.20 \pm 0.20 AU, $p < 0.001$), respectively. No significant difference was found between MTR mRNA level in cells grown either in a Met+ Cbl+ or in a Met+ medium. Neither MTR activity nor MTR transcription could be studied in the cells cultivated in Hcy free Met free Cbl+ medium because no sufficient growth could be reached (figure 2 B).

Discussion

Several reports have assessed the influence of Cbl in the methionine-dependence of cancer cells [22]. Presently, we tested the methionine dependence of Caco-2 cell by using Homocysteine (Hcy) instead of homocysteine, as reported by Halpern *et al.* [2] to avoid

the cytotoxic effect of homocysteine [23]. Indeed, Hcy is internalized similarly to homocysteine and it is subsequently cleaved into two homocysteines within the cell [24]. Optimizing the different conditions of culture of Caco-2 cells showed that the growth curves of Met and Hcy dose-responses were similar in the presence of Cbl. Growth of cells in Hcy+ medium was Cbl-dose-dependent while growth in Met+ medium was independent of the concentration of Hcy and Cbl concentrations. These data suggest that Met is a growth limiting nutrient that could equally be supplied from either external (culture medium) or internal (Cbl-dependent MTR activity) sources.

It has been suggested that a low MTR activity and/or a defective transport of Cbl into the cells may explain methionine dependence [25]. We showed such a low MTR activity in Caco-2 cells, in comparison to those found in methionine-independent cells (>20 nmol/mg proteins/hour) [25]. Intracellular transport of Cbl is maintained in Caco-2 cells [19] and cellular availability of Cbl provided by the culture medium was not impaired in our study (figure 1). MTR activity was dramatically reduced when the cells were grown in Met+, although these conditions triggered maximal growth speed (figure 1A and 3). Previous studies have already evidenced an influence of methionine on MTR activity [10, 26, 27]. Kamely *et al.* observed an inhibitory effect of increasing concentrations of methionine on MTR activity of cells cultivated in presence of Hcy, Cbl and folates [10]. Such an effect was also observed in our study when adding methionine to a medium containing homocysteine, folates and 30 pM Cbl (figure 3). In addition, our work showed that MTR activity was either at the highest or the lowest depending on whether Cbl or methionine were added in a methionine-free cell culture medium enriched with 50 μ M homocysteine. Taken together, all these data suggest that cells adapt their MTR activity to the requirement of endogenous methionine synthesis. This prompted us to evaluate the effect of Hcy on expression of MTR in the presence of either methionine or Cbl in the medium.

It has been proposed that Cbl may have a regulatory effect on MTR activity in addition to its cofactor function. Yamada *et al.* suggested that it may stabilize the holoenzyme, making it resistant to degradation [28]. On the other hand, Gulati *et al.* suggested that cobalamin may increase translation by stabilising the MTR mRNA [11]. More recently, the same group related this observation to a cobalamin responsive element located in the 5'-untranslated region of MTR mRNA [12]. We established a sensitive real-time RT-PCR assay to evaluate the level of MTR mRNA because preliminary experiments in

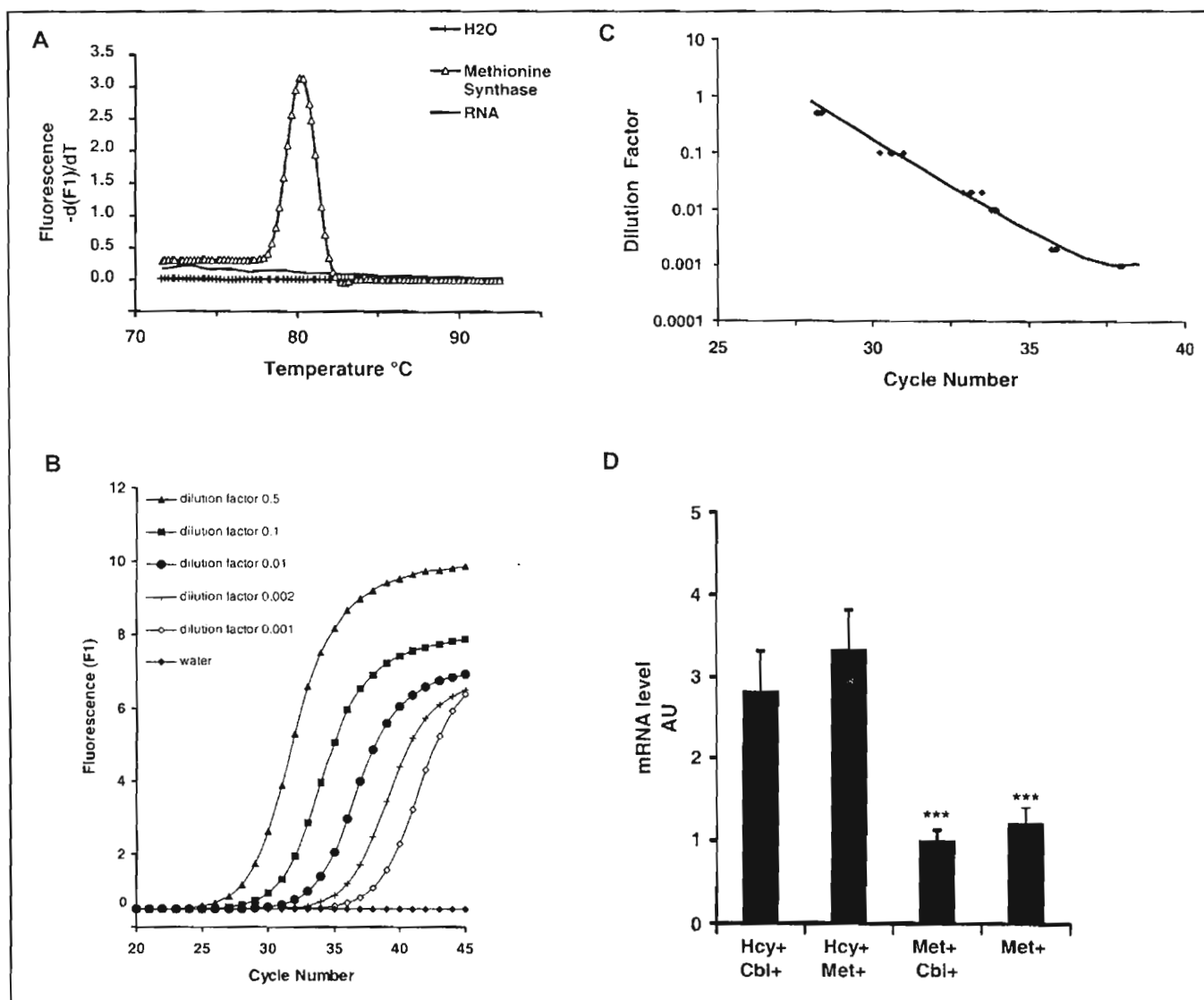


Fig. 4. Expression of methionine synthase in Caco-2/TC7 cells. A) Melting curve from Light Cycler analysis received with the defined primers (Δ) and controls using either deionized water (+) and RNA (-) show specificity and reliability of the amplification. B) Representative standard curve based on serial dilutions (dilution factors from 0.001 to 0.5) of total RNA from Caco-2/TC7. The x-axis represents the cycle number and the y-axis the fluorescent signal. C) Representative graph of the standard curve. The log of the dilution factor was plotted against cycle number at the crossing point. For each dilution,

pentaplicates were reported. This curve represents the basis of relative quantitation. D) MTR mRNA expression in Caco-2/TC7 cells. Cells were grown in methionine-free media supplemented with either homocysteine and cobalamin, homocystine and methionine, methionine and cobalamin, or methionine. Results from three independent experiments ($n=9$) were expressed as arbitrary units (A.U.). No significant difference was found between MTR mRNA level in cells grown either in a Hcy+Cbl+ or in a medium Hcy+Met+. *** : $p<0.001$.

Northern blots showed an extremely low level of transcripts which made this method invalid for mRNA quantification in Caco-2 cells. We evaluated the mRNA levels through amplifying sequences overlapping exons 8 and 9. Our results were in agreement with the data of Gulati et al. since we observed that Cbl increased activity

of MTR in cell culture without improving MTR mRNA level.

In contrast to Cbl [11, 12, 28], the role of homocysteine on the regulation of expression of MTR gene has not been investigated in mammalian cells. Such a role could be hypothesized from the 1.5-fold increase

of MTR activity in Hcy+ Cbl+ medium, compared to the activity in Met+ Cbl+ medium (figure 3). MTR mRNA level was significantly increased in Caco-2 cells grown either in Hcy+ Cbl+ or in Hcy+ Met+, compared to the levels obtained in Met+ Cbl+ and Met+ (figure 4 D). This showed an effect of Hcy, which may correspond to a transcriptional mechanism. Previous studies have observed that methionine depletion induces transcription of several genes, including one encoding for an adenosylmethyltransferase, by a mechanism related to the availability of methionine and to the subsequent synthesis of S-adenosyl-methionine [29]. Presently our results might differ from such a mechanism as we observed no transcription enhancing effect of methionine removal when Hcy was present in the medium (Hcy+Met+ series of figure 4). In order to ascertain this conclusion, it would have been helpful to study the expression and transcription of MTR in cells cultivated in complete depletion of methionine (Hcy free Met free Cbl+ medium), but this was not possible as no significant growth was obtained under these conditions (figure 2 B). Our data showed also that the decrease in MTR activity induced by methionine in the presence of Hcy and Cbl, previously reported by Kamely et al. [10], is not underlied by a transcriptional mechanism. An increasing number of studies have evidenced a specific effect of

homocysteine on transcription of various genes. It increases transcription of *c-fos* and *LPL* (*lipoprotein lipase*) via the AP-1 pathway and of *IL-8* and *Nos2* via the NFκB pathway [14-16]. In addition, a similar effect of homocysteine on MTR mRNA level has very recently been described, in *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, which suggests that the present effect is not limited to cancer cells [17]. The transcription of MTR is influenced by homocysteine, suggesting that it is under the influence of the enzymes which regulate its intracellular level. In this regard, the regulation of cystathionine β-synthase expression has to be considered, as it is the key enzyme of the homocysteine transsulfuration pathway [9].

In conclusion, our data indicate that methionine synthase expression of Caco-2 cells is under a transcriptional control influenced by Hcy.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). The authors would like to thank Céline Chéry and Shyue Fang Hsu for fruitful discussions and revising the manuscript.

References

- Mecham JO, Rowitch D, Wallace CD, Stern PH, Hoffman RM: The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently in human tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;117:429-434.
- Halpern BC, Clark BR, Hardy DN, Halpern RM, Smith RA: The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:1133-1136.
- Miki K, Al-Refaie W, Xu M, Jiang P, Tan Y, Bouvet M, Zhao M, Gupta A, Chishima T, Shimada H, Makuuchi M, Moossa AR, Hoffman RM: Methioninase gene therapy of human cancer cells is synergistic with recombinant methioninase treatment. *Cancer Res* 2000;60:2696-2702.
- Yoshioka T, Wada T, Uchida N, Maki H, Yoshida H, Ide N, Kasai H, Hojo K, Shono K, Mackawa R, Yagi S, Hoffman RM, Sugita K: Anticancer efficacy in vivo and in vitro, synergy with 5-fluorouracil, and safety of recombinant methioninase. *Cancer Res* 1998;58:2583-2587.
- Goseki N, Yamazaki S, Shimojyu K, Kando F, Maruyama M, Endo M, Koike M, Takahashi H: Synergistic effect of methionine-depleting total parenteral nutrition with 5-fluorouracil on human gastric cancer: a randomized, prospective clinical trial. *Jpn J Cancer Res* 1995;86:484-489.
- Tan Y, Xu M, Guo H, Sun X, Kubota T, Hoffman RM: Anticancer efficacy of methioninase in vivo. *Anticancer Res* 1996;16:3931-3936.
- Banerjee RV, Matthews RG: Cobalamin-dependent methionine synthase. *Faseb J* 1990;4:1450-1459.
- Gueant JL, Namour F: Vitamin B12: Absorption, metabolism, and deficiency. Johnson L (ed): *Encyclopedia of Gastroenterology*, Elsevier - academic press, 2003, Vol. 3, pp 619-624
- Scott JM: Folate and vitamin B12. *Proc Nutr Soc* 1999;58:441-448.
- Kamely D, Littlefield JW, Erbe RW: Regulation of 5-methyltetrahydrofolate: homocysteine methyltransferase activity by methionine, vitamin B12, and folate in cultured baby hamster kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:2585-2589.
- Gulati S, Brody LC, Banerjee R: Posttranscriptional regulation of mammalian methionine synthase by B12. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:436-442.
- Oltcan S, Banerjee R: Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. *J Biol Chem* 2003;278:20778-20784.

- 13 Kenyon SH, Waterfield CJ, Timbrell JA, Nicolaou A: Methionine synthase activity and sulphur amino acid levels in the rat liver tumour cells HTC and Phi-1. *Biochem Pharmacol* 2002;63:381-391.
- 14 Desai A, Lankford HA, Warren JS: Homocysteine augments cytokine-induced chemokine expression in human vascular smooth muscle cells: implications for atherogenesis. *Inflammation* 2001;25:179-186.
- 15 Beauchamp MC, Renier G: Homocysteine induces protein kinase C activation and stimulates c-Fos and lipoprotein lipase expression in macrophages. *Diabetes* 2002;51:1180-1187.
- 16 Welch GN, Upchurch GR, Jr., Farivar RS, Pigazzi A, Vu K, Brecher P, Keane JF, Jr., Loscalzo J: Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos2. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:22-31.
- 17 Kacprzak MM, Lewandowska I, Matthews RG, Paszewski A: Transcriptional regulation of methionine synthase by homocysteine and choline in *Aspergillus nidulans*. *Biochem J* 2003;376:517-524.
- 18 Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaux E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, Rousset M: Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* 1994;107:213-225.
- 19 Pons L, Guy M, Lambert D, Hatier R, Gueant J: Transcytosis and coenzymatic conversion of [(57)Co]cobalamin bound to either endogenous transcobalamin II or exogenous intrinsic factor in caco-2 cells. *Cell Physiol Biochem* 2000;10:135-148.
- 20 Finter NB: Dye uptake methods of assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays. *J. Gen. Virol.* 1969;5:419-427.
- 21 Weissbach H, Peterkofski A, Redfield BG, Dickerman H: Studies on the terminal reaction in the biosynthesis of methionine. *J Biol Chem* 1963;238:3318-3324.
- 22 Fiskerstrand T, Christensen B, Tysnes OB, Ueland PM, Refsum H: Development and reversion of methionine dependence in a human glioma cell line: relation to homocysteine remethylation and cobalamin status. *Cancer Res* 1994;54:4899-4906.
- 23 Chen C, Halkos ME, Surowiec SM, Conklin BS, Lin PH, Lumsden AB: Effects of homocysteine on smooth muscle cell proliferation in both cell culture and artery perfusion culture models. *J Surg Res* 2000;88:26-33.
- 24 Foreman JW, Wald H, Blumberg G, Pepe LM, Segal S: Homocysteine uptake in isolated rat renal cortical tubules. *Metabolism* 1982;31:613-619.
- 25 Ashe H, Clark BR, Chu F, Hardy DN, Halpern BC, Halpern RM, Smith RA: N5-methyltetrahydrofolate: homocysteine methyltransferase activity in extracts from normal, malignant and embryonic tissue culture cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;57:417-425.
- 26 Tautt JW, Anuszewska EL, Kozirowska JH: Methionine regulation of N-5-methyltetrahydrofolate: homocysteine methyltransferase and its influence on the growth and protein synthesis in normal, neoplastic, and transformed cells in culture. *J Natl Cancer Inst* 1982;69:9-14.
- 27 Lambert BD, Titgemeyer EC, Stokka GL, DeBey BM, Loest CA: Methionine supply to growing steers affects hepatic activities of methionine synthase and betaine-homocysteine methyltransferase, but not cystathionine synthase. *J Nutr* 2002;132:2004-2009.
- 28 Yamada K, Kawata T, Wada M, Isshiki T, Onoda J, Kawanishi T, Kunou A, Tadokoro T, Tobimatsu T, Mackawa A, Toraya T: Extremely low activity of methionine synthase in vitamin B-12-deficient rats may be related to effects on coenzyme stabilization rather than to changes in coenzyme induction. *J Nutr* 2000;130:1894-1900.
- 29 Leach RA, Tuck MT: Methionine depletion induces transcription of the mRNA (N6-adenosine) methyltransferase. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:1116-1128.

Vitamin B₁₂ Is a Strong Determinant of Low Methionine Synthase Activity and DNA Hypomethylation in Gastrectomized Rats

Laurent Brunaud^{a-c} Jean-Marc Alberto^a Ahmet Ayav^{a-c} Philippe Gérard^a
Farès Namour^a Laurent Antunes^a Marc Braun^d Jean-Pierre Bronowicki^a
Laurent Bresler^c Jean-Louis Guéant^a

^aCellular and Molecular Pathology in Nutrition, EMI, INSERM 0014, URM IFREMER 20, and ^bDepartment of Experimental Surgery, Faculté de Médecine BP 184, ^cDepartment of Digestive and Visceral Surgery, CHU Nancy-Brabois, Vandœuvre-lès-Nancy, and ^dDepartment of Radiology, CHU Nancy-Central, Nancy, France

Key Words

Vitamin B₁₂ · Methionine synthase · DNA methylation · Rats, gastrectomized

Abstract

Background/Aims: The respective influence of folate and vitamin B₁₂ deficiency on 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 transcription and activity, and on DNA methylation. **Methods:** Sixty-one rats were administered normal diet or diet deficient in choline, methionine, folic acid and vitamin B₁₂. Forty-seven of them underwent total gastrectomy or ileal resection. **Results:** Low vitamin B₁₂ was observed only in gastrectomized rats. Low folate was observed in rats under deficient diet. Total MTR activity (holo- + apo-enzyme) was lowered only with vitamin B₁₂ level <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 affects MTR expression by a non-transcriptional mechanism different from a protective effect on MTR proteolysis. It is also a strong determinant of DNA hypomethylation.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

Introduction

Methionine synthase (MTR) plays a key role in homocysteine metabolism, as it catalyzes the synthesis of methionine by remethylating homocysteine in the presence of methyltetrahydrofolate 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-adenosylmethionine, the substrate of DNA methyltransferases. DNA methylation is one of the mechanisms involved in the regulation of gene transcription, through the binding of spe-

L. Brunaud and J.-M. Alberto contributed equally to this work.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2003 S. Karger AG, Basel
0012-2823/03/0683-0133\$19.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/dig

Prof. J.L. Guéant, Laboratory of Cell and Molecular Pathology in Nutrition
INSERM EMI 0014 Medical Faculty, University of Nancy I
FR-54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex (France)
Tel. +33 3 83154484, Fax +33 3 83153591
E-Mail Jean-Louis.Gueant@medecine.uhp-nancy.fr

cific proteins to the methylated DNA sequences. This causes changes in the chromatin structure, making the DNA less accessible and preventing active functional transcription [1]. The 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 [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 diet deficient in choline, methionine, vitamin B₁₂ and folate in non-operated and in gastrectomized Fischer F344 rats with and without ileal resection.

Methods

Animals

Fifteen-week-old male Fischer F344 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 ± 3°C, under a 12 h light/12 h dark cycle. Each rat was fed in its cage and free access to water was allowed. Standards for use of laboratory animals established by the Institute of Laboratory Animal Resources, US National Academy of Sciences, were followed.

Diet

A methyl group-deficient diet (MD) and a methyl group-adequate diet (MA) were used. The 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).

Feeding and Surgical Protocol

All rats were fed MA diet 1 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). TG alone was performed in group 3 (n = 7) and all these rats were fed with MA diet. IR 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 group 6 (n = 7), respectively.

Surgery was performed under anesthesia by intraperitoneal injection of ketamine 25 mg/kg (Pfizer, New York, N.Y., USA). After a midline laparotomy, the stomach was excised together with a 1-mm cuff of esophagus and a 1-mm cuff of duodenum. An end-to-end anastomosis between esophagus and duodenum was performed with 8/0 Surgipro (USSC, USA) under binocular glasses (×4) (Zeiss, Oberkochen, Germany). Distal small bowel resection was performed with mean 7.4 ± 0.4 cm length from the cecum. End-to-end anastomosis was performed with 8/0 Surgipro (USSC) under binocular glasses (×4) (Zeiss). 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 groups 1 and 2 (TG + IR) and all rats from groups 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 (Costa Mesa, Calif., USA; Kit No. 90697.3-7). Selected rats were fed with one dose of 20 µl of [⁵⁷Co]-cobalamin (0.7 · 10⁻⁹ g at 7.4 kBq). Diets were not modified during the test. After oral ingestion of labeled cobalamin, feces were closely collected and cumulative activity was measured at 24, 48, 72 and 144 h.

Assays of Vitamin B₁₂, Folate and Homocysteine

Each blood sample was collected on EDTA and then centrifuged for 10 min at 3,000 rpm. Aliquots of plasma were stored frozen at -80°C until analysis. Cobalamin and folate plasmatic levels were determined by radiodilution isotope assay (simulTRAC-SNB; ICN Pharmaceuticals). Liver vitamin B₁₂ levels were evaluated using the same method. Homocysteine level was determined by fluorescent polarization immunoassay (IMX System; Abbott, Oslo, Norway).

MTR Activity

Liver cells were homogenized on ice in 9 volumes of potassium phosphate (100 mmol/l) buffer, pH 7.4, and centrifuged for 20 min at 48,000 g, 4°C. MTR activity was determined as described previously [17]. Aliquots of supernatant were incubated in 100 µl 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, St. Louis, Mo., USA), 0.5 mmol/l S-adenosyl-methionine, 0.02 mM (Biolabs Inc., Vancouver, Canada), 25 mmol/l DTT (dithiothreitol) (Sigma Aldrich), 0.25 µCi [¹⁴C]-5 methyltetrahydrofolic acid (44 µmol/Ci) (Amersham-Pharmacia, Piscataway, N.J., USA), 50 µmol/l methylcobalamin (Sigma Aldrich). This mixture was incubated during 60 min/37°C in an anaerobic chamber in which the 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, Richmond, Calif., USA). The column was washed with 3 ml of water and the eluted fractions were collected in scintillation vials. A scintillation fluid (Picofluor; Packard, Downers Grove, Ill., 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 milligram of protein. The protein concentration of liver homogenates was estimated by BCA assay (Pierce, Rockford, Ill., USA).

Semiquantification of MTR and Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase RNA by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from liver frozen in liquid nitrogen, using Trizol reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, Md., USA), and quantified by UV spectrophotometry at 260 and 280 nm. The incubation mixture of the reverse transcription (20 μ l total volume) contained 2 μ g total RNA, 2 μ l DTT 0.1 mol/l (purchased with enzyme), 8 μ l dTNP 1.25 mmol/l (dTNP mix 10 mmol/l; Sigma Aldrich), 2 μ l of a hexanucleotide mix 10 \times (Boehringer Mannheim, Meylan, France). Then 200 units M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL) and 0.5 μ l RNase inhibitor (RNAGuard[®]; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) were added after 3 min heating at 65°C. Reverse transcription was performed at 38°C for 1 h and stopped at 95°C for 5 min. PCR was carried out with 2 μ l of reverse transcription product, 6 μ l dNTP 1.25 mmol/l, 1.5 μ l primers 12 μ mol/l, 1.25 U Taq DNA polymerase (AmpliTaQ[®] DNA Polymerase; Perkin-Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J., USA) in 50 μ l 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, hybridization at 50.9°C for 30 s and elongation at 72°C for 20 s. For MTR transcript amplification, sense primer was 5' CAG ATA TAA TTG GCT TGT CAG GAC 3', antisense primer was 5' TTT CAT CTA ACA GCT GAG AAC ACA C 3'. For glyceraldehyde phosphate dehydrogenase transcript amplification (reference transcription level), sense primer was 5' TCA TTG ACC TCA ACT ACA TGG TCT A 3', antisense 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 Corp., Norwalk, Conn., USA). Amplification products were visualized under ultraviolet light after agarose/ethidium bromide electrophoresis. Quantification of gel bands was performed on a Bio-Rad Multi-Analyst[™]/PC version 1.1. Molecular weights marker was ϕ X174/HacIII DNA ladder (Sigma Aldrich).

Global DNA Methylation

Liver cells were mashed on liquid nitrogen. Pellets were added with 1 ml TBS (Tris-buffered saline) mixed with 1 ml lysis buffer (Perkin-Elmer). The mixture was incubated with 55,000 units RNase A (Sigma Aldrich) during 2 h at room temperature and then overnight with 40 units of proteinase K (Life Technologies, Gaithersburg, Md., USA) at 65°C. A solution was prepared with phenol (Fluka, Buchs, Switzerland) 70%, pH 8.0/chloroform. Two milliliters of this last solution were added with 2 ml of the mixture. Centrifugation 5,000 g/20 min/4°C. The 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 μ g DNA were incubated with [³H]-methyl-S-adenosylmethionine, 5 μ Ci (Amersham-Pharmacia), 4 units Sss I methylase (Biolabs Inc.), 50 mmol/l

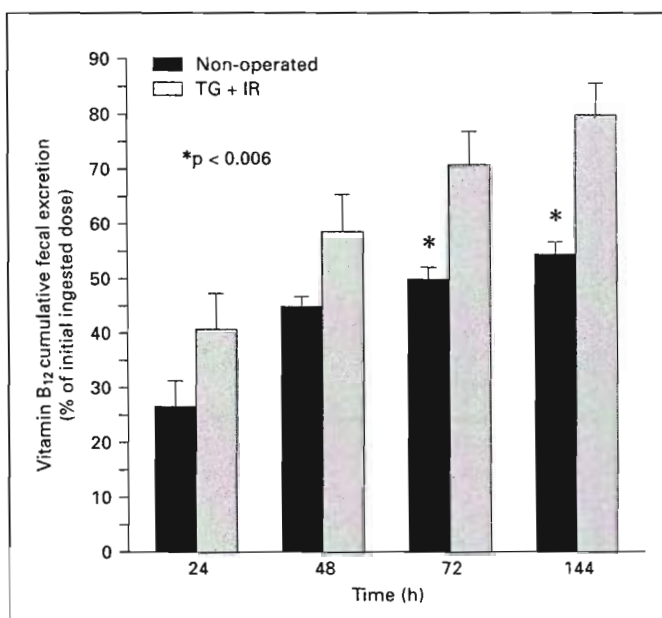


Fig. 1. Cumulative percentage of fecal excretion of [⁵⁷Co]-cobalamin in 14 non-operated rats and in 14 rats that underwent total gastrectomy and ileal resection (TG + IR).

NaCl, 10 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l MgCl₂ and 1 mmol/l DTT, pH 8, in a final volume of 50 μ l, during 3 h at 37°C. Samples were placed on a paper Whatman DE-81 (Fischer Scientific, Springfield, N.J., USA). Washed and dried paper disks were placed in polyethylene vials containing 10 ml Picofluor scintillation fluid (Packard). β -Counting of radiolabeled DNA corresponded to methyl transfer on CpG islands.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using StatView (Abacus Concepts, Berkeley, Calif., USA). The Mann-Whitney U-test was used to evaluate differences between continuous variables. Survival was assessed using Kaplan-Meier estimate and log rank test. All values were expressed as either mean \pm SE 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 values of $p < 0.05$.

Results

Gastrectomy was efficient in impairing vitamin B₁₂ assimilation as cumulative excretion of fecal [⁵⁷Co]-cobalamin was more important in group 1 rats (TG + IR) than in non-operated rats, at 72 and 144 h after ingestion ($p = 0.006$) (fig. 1). Gastrectomized rats (groups 1–3) underwent a weight loss after 1 month delay, but their weight

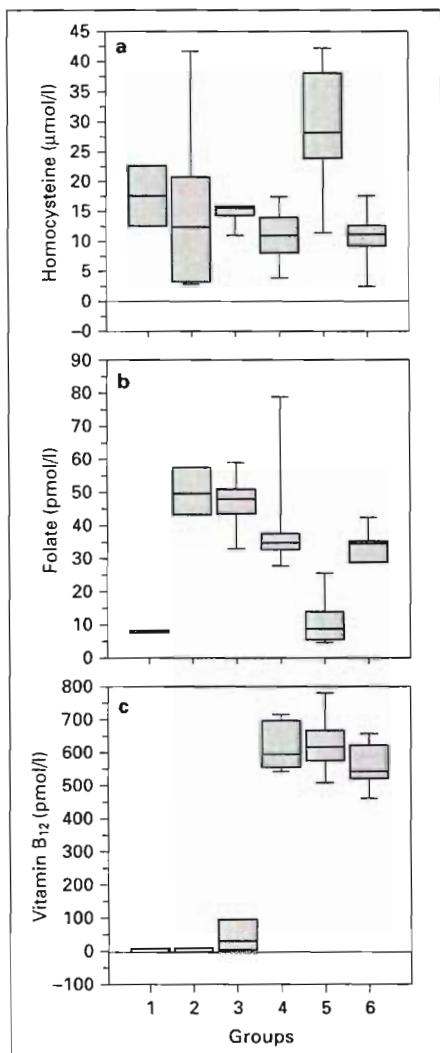


Fig. 2. Plasma level at death (box plots: median, quartiles and extreme values) of homocysteine, folate and vitamin B₁₂ of operated and non-operated rats fed with either an adequate or a deficient diet. Box plots of (a) homocysteine, (b) folate and (c) vitamin B₁₂.

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), plasma vitamin B₁₂ levels were dramatically lowered in the three groups of gastrectomized rats, after 1 month delay ($p < 0.001$). No statistical difference was found between these three groups. No decrease of vitamin B₁₂ plasmatic level was found in group 4 (MA diet/IR) (fig. 2). Finally, a 200-pmol/l threshold value of vitamin B₁₂ was defined as the superior limit that included only rats belonging to the

groups 1–3 (gastrectomized rats). In contrast to what was observed for vitamin B₁₂, TG had no dramatic effect on folate blood level (fig. 2). Indeed, folate was significantly lowered only in rats fed a deficient diet (groups 1 and 5). In addition, this difference was also noticed between the gastrectomized rats with and without the deficient diet ($p < 0.01$) (fig. 2). Similarly to vitamin B₁₂, we defined a threshold value of 20 nmol/l which corresponded to the limit including only rats from groups 1 and 5 (deficient diet).

We also determined liver vitamin B₁₂ levels and found similar variations to 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 and 533 ± 24 fmol/mg ($p = 0.001$). The decrease was in the same order of magnitude as vitamin B₁₂ plasma levels and a significant correlation was found between both markers ($R = 0.79$, $p = 0.0006$). The homocysteine plasma level was significantly increased in the groups which had a low blood folate level (groups 1 and 5), independently of the surgical procedure (fig. 2). The 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 (groups 1 and 5) ($p = 0.0005$), but not in MA diet rats (groups 2–4 and 6).

No difference of MTR activity was found in rats with a plasma folate level < 20 nmol/l (groups 1 and 5). In contrast, MTR activity was significantly lowered in rats with vitamin B₁₂ plasmatic level < 200 pmol/l (groups 1–3) ($p = 0.002$) (fig. 3). MTR gene transcription, estimated by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, did not depend on blood vitamin B₁₂ levels (fig. 4). The ratio of cDNA amplified from MTR/glyceraldehyde phosphate dehydrogenase RNA was estimated respectively at 0.73 ± 0.22 and 0.80 ± 0.33 in liver extracts from rats with blood vitamin B₁₂ > 200 and < 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' (fig. 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 vitamin 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 vitamin B₁₂ (holoenzyme) for preventing the apoenzyme proteolysis as we found no difference in saturation of the enzyme by vitamin B₁₂. Indeed, the ratio of MTR activity determined without versus with addition of vitamin B₁₂ in the

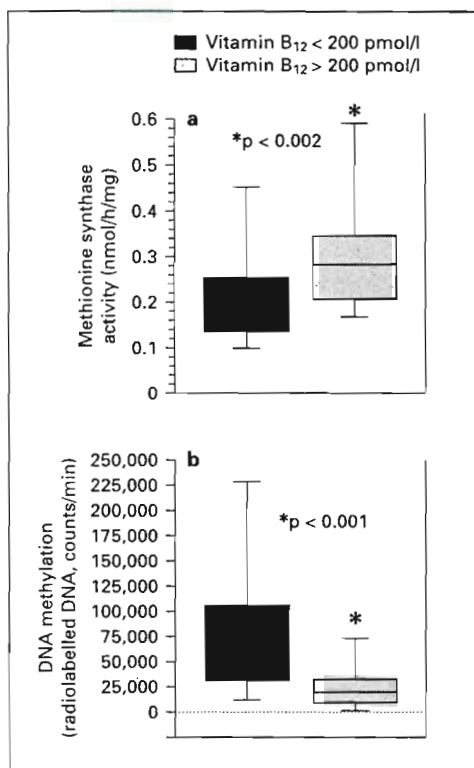


Fig. 3. Effect of vitamin B₁₂ deficiency on liver methionine synthase activity and on DNA methylation. **a** Methionine synthase activity in rats with vitamin B₁₂ plasma levels <200 and >200 pmol/l. **b** DNA methylation (counts per minute) in rats with vitamin B₁₂ plasma levels <200 and >200 pmol/l.

assay was respectively estimated to be 0.52 ± 0.34 and 0.71 ± 0.25 in rats with a vitamin B₁₂ level <200 and >200 pmol/l ($p = 0.385$).

Global DNA methylation was significantly lowered in rats with vitamin B₁₂ plasmatic level <200 pmol/l ($p = 0.001$) (fig. 3). These rats were the same as those with low MTR activity (fig. 3). In addition, MTR activity was significantly lower in liver extracts with hypomethylated DNA (less than 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 <20 nmol/l ($p = 0.009$).

We evaluated by multiple regression analysis the relations between DNA methylation, MTR and its coen-

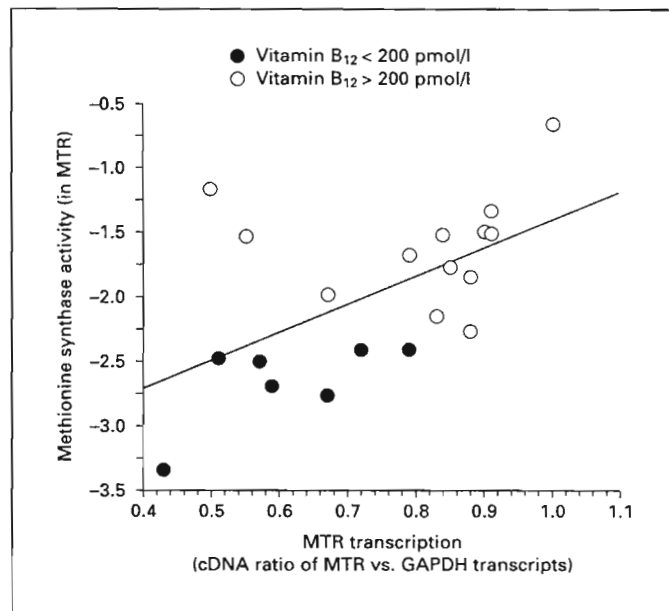


Fig. 4. Relation between methionine synthase activity (ln MTR) and MTR transcription (determined by cDNA ratio of RT-PCR of MTR vs. GAPDH transcripts), in 7 gastrectomized rats with vitamin B₁₂ deficiency and 13 non-operated rats with a vitamin B₁₂ blood level >200 pmol/l. The activity of MTR was significantly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

zymes. 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 MTR 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).

Table 1. Determinants of hyperhomocysteinemia (upper quartile, >18.7 $\mu\text{mol/l}$), decreased liver holomethionine 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)

Dependent determinants	Excluded determinants	Residual significant determinants	Odds ratio	95% CI	p value
t-Hcys >18.7 $\mu\text{mol/l}$	MTR, B ₁₂ DNA hypomethylation	Folate <20	20.78	7.76–55.61	<0.0001
MTR <0.1 UI/mg	Folate, t-Hcys, DNA hypomethylation	B ₁₂ <200	15.75	2.81–88.14	0.0017
DNA hypomethylation	Folate, t-Hcys, B ₁₂ Folate, t-Hcys, MTR	MTR <0.1 B ₁₂ <200	17.07 7.31	3.35–86.91 1.77–30.24	0.0006 0.006

t-Hcys = Plasma total homocysteine; MTR = methionine synthase; CI = confidence interval.

Discussion

Vitamin B₁₂-deficient living animals are useful for elucidating physiologic functions of vitamin B₁₂ [12]. Disappearance of gastric intrinsic factor after TG 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 (fig. 2). Finally, our model combining TG 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 vitamin B₁₂-deficient rats. Vitamin B₁₂ had no effect on MTR transcription, as previously reported in five 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 activ-

ity. 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 methylcobalamin [12, 13], although different results were obtained by studying the effect of vitamin B₁₂ supplementation in cell culture. According to this hypothesis, stabilization of the enzyme by coenzyme binding would be less prominent when the vitamin B₁₂ level is low (<200 pmol/l), leading to an increase of apoenzyme degradation. Presently, this hypothesis was unlikely as there was no significant difference of saturation of MTR between rats with vitamin B₁₂ <200 and >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 artifactual 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. [12] found no difference of MTR activity by adding or not vitamin B₁₂ in the assay. 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 oxidoreductive agent, DTT, produces an MTR activity corresponding to apo- and holo-MTR, even in the absence of the cofactor 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 homocys-

teine 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 post-initiation 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 Johnson LR, Alpers DH (eds): *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;15:449-452.
- 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 Barnerjee RV (ed): *Chemistry and Biochemistry of B₁₂*. New York, Wiley, 1999, pp 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. *Endocr Rev* 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, Gucant JL, Abdelmouttalcb 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.

Transcobalamin deficiency due to activation of an intra exonic cryptic splice site

FARES NAMOUR,¹ ANNE-CATHERINE HELFER,¹ EDWARD V. QUADROS,² JEAN-MARC ALBERTO,¹ HA M. BIBI,³ LARS ORNING,⁴ DAVID S. ROSENBLATT⁵ AND GUÉANT JEAN-LOUIS¹ ¹Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, Faculté de Médecine de Nancy, Cedex, France. ²Departments of Medicine and Biochemistry, SUNY-Downstate Medical Center, Brooklyn, NY, USA, ³Pediatric Department, Clinical Genetic Institute Barzilai Medical Centre, Ashkelon, Israel, ⁴Axis-Shield ASA, Okern, Oslo, Norway, and ⁵Division of Medical Genetics, Department of Medicine, McGill University Health Center, Montreal, Quebec, Canada

Received 23 June 2003; accepted 22 August 2003

Summary. Transcobalamin (TC), a vitamin B12 (cobalamin, Cbl) binding protein in plasma, promotes the cellular uptake of the vitamin by receptor-mediated endocytosis. Inherited TC deficiency is an autosomal recessive disorder characterized by megaloblastic anaemia caused by cellular vitamin B12 depletion. It may be accompanied by neurological complications, including a delay in psychomotor and mental development. This report describes three sisters with inherited TC deficiency resulting from a splicing defect in the TC gene. A point mutation was identified in intron 3 splice site of the TC gene that activates a cryptic splice site in exon

3. The transcript generated has an in-frame deletion of 81 nucleotides and the resulting truncated protein is unstable and not secreted by the cells. Until now, genetic studies have been reported in only five patients with TC deficiency and the molecular defect was different in each of them, which gives evidence for a genetic heterogeneity of the disease.

Keywords: transcobalamin deficiency, mutation, splice site, vitamin B12, anaemia.

Vitamin B12 (Cobalamin, Cbl) forms complexes with three proteins: intrinsic factor (IF), haptocorrin (HC) and transcobalamin (TC) (Nexo, 1998). IF is required for vitamin B12 intestinal uptake, whereas TC transports vitamin B12 to tissues and cells that express specific receptors, which internalize the vitamin as the TC–Cbl complex (Rothenberg & Quadros, 1995). Upon its entry into the cell, the TC is degraded, the Cbl is released and converted to the co-enzyme forms, adenosylcobalamin and methylcobalamin, which serve as cofactors for two Cbl dependent enzymes, the mitochondrial methylmalonyl CoA mutase and the cytosolic methionine synthase (Quadros *et al.* 1976; Chanarin, 1979).

Inherited TC deficiency is an autosomal recessive disorder that results in clinical Cbl deficiency because of cellular Cbl depletion (Hakami *et al.* 1971; Cooper & Rosenblatt, 1987; Kaikov *et al.* 1991; Fowler, 1998). In these cases, plasma Cbl is usually in the normal range because most of the Cbl in

the circulation is bound to HC. TC deficiency presents in early infancy as severe anaemia, failure to thrive and, sometimes, neurological complications, including a delay in psychomotor and mental development (Hall, 1992).

Bibi *et al.* (1999) described three sisters, whose parents were first cousins. All three patients presented with megaloblastic anaemia, thrombocytopenia and methylmalonic aciduria that responded to vitamin B12 treatment. Some 40 reports describing TC deficiency have been published to date, but the molecular defects underlying the disorder have been identified in only five patients. The genetic abnormalities detected are heterogeneous and include extensive deletion, single nucleotide deletion, nonsense mutation and more recently, a variance in RNA editing (Li *et al.*, 1994a,b; Qian *et al.* 2002).

In this report, we describe the molecular studies of the three siblings reported by Bibi *et al.* (1999). The parents and their three unaffected children were also studied. In searching for the molecular basis of TC deficiency and its impact on the functional properties of the translated TC, we have identified a point mutation in intron 3 splice site of the TC gene that activates a cryptic splice site in exon 3. The resulting mRNA is 81 nucleotides shorter and yields a

Correspondence: Fares Namour, Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, EMI-INSERM 0014, Faculté de Médecine de Nancy, 54500 Vandoeuvre, Cedex, France. E-mail: b.namour@chu-nancy.fr

truncated protein (lacking 27 amino acids) that does not bind Cbl and is unstable.

MATERIALS AND METHODS

Patients. The patients were 9-, 10- and 11-year-old female children of Moroccan parents who were first cousins. Three additional siblings, two girls and a boy were unaffected. All studies were conducted after obtaining the informed consent of all individuals involved and the approval of the hospital ethical committee. Serum and whole blood were available for all family members but skin biopsy for fibroblast cultures was available from the second affected sister only. The fibroblast cell line kept at the Repository for Mutant Human Cell strains (Montreal, Canada) was forwarded to our laboratory for our studies. Normal skin fibroblast cultures used as a control were a gift from the genetics department at this hospital. The fibroblasts were propagated at 37°C in minimum essential medium (MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS), 2 mmol/l L-glutamine and 1 × non-essential amino acids. Cos cells were cultured at 37°C in MEM, containing 10% FCS and 4 mmol/l L-glutamine.

Assays for serum B12 and TC. Total unsaturated B12 binding capacity (UB₁₂ BC) and that caused by unbound TC (apo-TC) in serum were measured as previously described (Jacob *et al.* 1977; Djalali *et al.* 1990; Benhayoun *et al.* 1993). The fraction of TC saturated with Cbl (holo-TC) was determined using the holo-TC assay kit (ICN diagnostics, Orsay, France) (Ulleland *et al.* 2002).

RNA/DNA extraction, DNA amplification, cloning and translation in the reticulocyte lysate system. Total RNA and genomic DNA were extracted from fibroblasts using the RNeasy kit and the QIAamp spin column procedure, respectively (Qiagen, Hilden, Germany). Full length TC cDNAs were obtained after reverse transcription and amplification with forward primer JLO1 and reverse primer JLO2 as described elsewhere (Namour *et al.* 2001). TC cDNAs were also amplified as several overlapping fragments using primer pairs encompassing the full length cDNA as previously described (Namour *et al.* 2001). Notably, amplification with forward primer S2 (286 TGCCAGGGCAAG CCTCCAT 305) and reverse primer AS2 (690 GATCTC CTCTCGCACTGTTCT 670) generated a 404 bp fragment containing 5' end of exon 3, exon 4 and 3' end of exon 5. The region of the gene encompassing exon 3 and containing the 5' end of intron 3 was also amplified from genomic DNA using forward primer DEL1 located in intron 2 (5' ATTA-CTGGCCTTGTCCTAGG 3') and reverse primer GTI located in intron 3 (5' AGAATGGATGGTGGGAAAGAC 3'). Amplification was carried out in a 50 µl volume containing 1.5 mmol/l MgCl₂, 200 mmol/l dNTP mixture, 20 pmol of each primer and 1.25 U of Taq polymerase (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA). An initial denaturation step at 94°C for 1 min was followed by 30 polymerase chain reaction (PCR) cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 58°C and 30 s at 72°C, and ended with a 7 min incubation at 72°C. DNA sequencing and cloning of the full length TC cDNAs in the pcDNA3 vector were performed as

previously described (Namour *et al.* 2001). For the *in vitro* translation reaction, a TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System was used following the manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI, USA). The positive control for these experiments was a cDNA isolated from CaCo-2 cells that had previously been cloned in a pcDNA3 vector (Namour *et al.* 2001). The product of the *in vitro* transcription-translation reaction was analysed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Transfection studies in Cos cells. Cos cells (1.5 × 10⁶) were seeded in 75 cm² flasks and after 24 h in culture, were transfected with 35 µg full-length normal or mutant TC cDNA containing plasmid using the calcium phosphate method. Two days post-transfection, cells were washed with phosphate-buffered saline, extracted with lysis buffer (Tris 50 mmol/l pH 7.4, NaCl 150 mmol/l, 1% Triton X-100, protease inhibitors cocktail 100 µl/10⁷ cells, purchased from Sigma, St Louis, MO, USA), then the cell debris was removed by centrifugation at 30 000 g and the supernatant fraction was analysed for Cbl binding capacity. Co-transfection with β-galactosidase plasmid was used to correct for transfection efficiency.

Cell lysates and culture medium were incubated with cyano [⁵⁷Co]Cbl and analysed by gel filtration chromatography to identify TC bound Cbl as previously described (Namour *et al.* 2001). Cbl binding was also determined by saturation analysis and removal of free cyano [⁵⁷Co]cbl by adsorption to haemoglobin-coated charcoal (Gottlieb *et al.* 1965).

Metabolic radiolabelling of TC. Cos cells (5 × 10⁵) cultured in 25 cm² flasks were transfected with plasmid DNA (pcDNA3-normal TC or pcDNA3-mutant TC) using Exgen 500 transfection reagent (Euromedex, Mundolsheim, France). After 4 h, the cells were washed with methionine-free Dulbecco's modified essential medium (DMEM) and incubated with 2.22 GBq of ³⁵S methionine (Amersham, Orsay, France) in 3 ml medium (90% methionine-free DMEM and 10% FCS) for 24 h. Following the incubation, the medium was collected and 500 µl of the medium was mixed with 3 µl of rabbit anti-TC polyclonal antiserum and incubated overnight at 4°C. To this solution, 50 µl of protein A Sepharose CL4B (Amersham, Orsay, France) was added, mixed for 2 h at 4°C and the protein A bound antibody-TC was collected by centrifugation at 200 g for 3 min at 4°C. The sepharose beads were washed four times with 10 mmol/l Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/l NaCl, resuspended in SDS-PAGE buffer (Tris-HCl 62.5 mmol/l pH 6.8, glycerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoethanol 5%) and heated at 100°C for 5 min. Protein A-sepharose beads were then pelleted by centrifugation and an aliquot of the supernatant fraction was analysed by SDS-PAGE in a 12% gel. The gel was dried and the ³⁵S-methionine-labelled protein was revealed by autoradiography.

RESULTS

Transcobalamin in plasma

Apo-TC levels were dramatically decreased in the three affected siblings (48, 24 and 56 pmol/l) whereas the unaffected members of the family with no signs of Cbl

deficiency had borderline low apo-TC concentrations (median 359 pmol/l, range 310–423). In the affected siblings, holo-TC was detected at 6.6 and 11 pmol/l in two of them and was undetectable in the other sibling. In the healthy family members, the holo-TC median value was 31.5 pmol/l (range 18–70) (Table I). These results were confirmed by gel filtration chromatography of serum incubated with [⁵⁷Co]Cbl where TC-bound Cbl was undetectable in the affected siblings but eluted as a major peak in asymptomatic family members.

Genetic analysis

Reverse transcription-PCR of RNA extracted from normal fibroblasts and amplified with primers S2 (located in exon 3) and AS2 (located in exon 5), yielded a fragment with an expected size of 404 bp. Similar analysis of RNA from the patient's fibroblasts yielded a smaller fragment (Fig 1A) that, by DNA sequence determination, was missing 81 nucleotides in the 3' end of exon 3. This deletion began with GT, which is known to be the consensus sequence of the

donor splice site of introns. Next we examined the region around exon 3 in genomic DNA using reverse primer GTI in intron 3 and a forward primer DEL1 hybridizing to the 3' end of intron 2. Amplification of genomic DNA using these primers yielded fragments of the same 312 bp size (Fig 1B). Sequencing of this fragment from the patient's DNA identified a mutation T → G at the donor splice site of intron 3 which forced the dinucleotide ³⁴⁷GT³⁴⁸ in exon 3 to be activated as a cryptic donor splice site. The resulting abnormal splicing yielded a truncated TC cDNA lacking the last 81 nucleotides in exon 3 but with a conserved reading frame. Genomic DNA extracted from whole blood drawn from all the family members was amplified with DEL1/GTI and sequenced. All affected siblings were homozygous for the mutation and asymptomatic family members (including the parents) were heterozygous.

In vitro transcription and translation with the TNT[®] reticulocyte lysate system followed by immunoprecipitation of the product with a monospecific antiserum to TC and SDS-PAGE analysis, yielded a smaller size protein for the

Table 1. Transcobalamin levels and the genotype of the family with congenital transcobalamin deficiency.

Patient	Holo-TC (pmol/l)	Apo-TC (pmol/l)	Gel filtration serum	Mutation
Index case	ND	48	TC not detected	Homozygote
Affected sister 1	11	24	TC not detected	Homozygote
Affected sister 2	6.6	56	TC not detected	Homozygote
Sister 3	27	423	TC present	Heterozygote
Brother	41	372	TC present	Heterozygote
Sister 4	70	310	TC present	Heterozygote
Mother	18	342	TC present	Heterozygote
Father	36	348	TC present	Heterozygote
Control				
Mean	61	514		
Range	24–157	350–1300		

ND, not detectable.

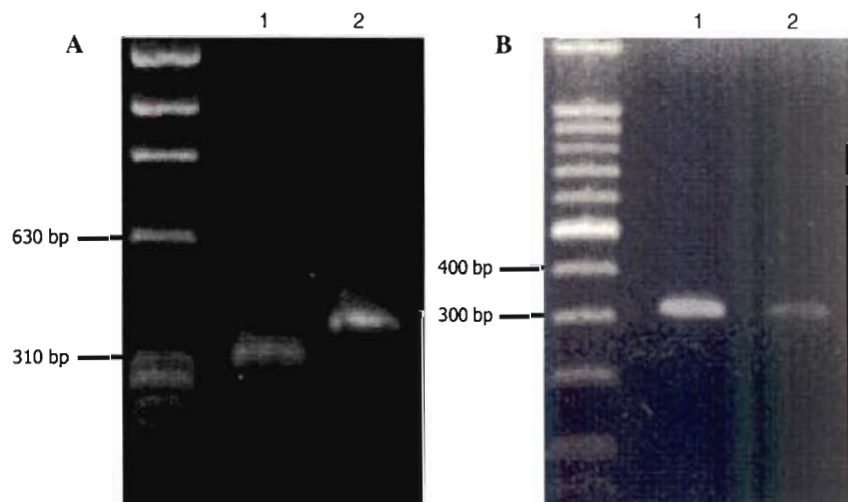


Fig 1. Agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining of PCR products generated by RT-PCR of RNA extracted from cultured fibroblasts (A) and by genomic DNA amplification (B). (A) Transcobalamin (TC) fragment was generated using a forward primer (S2) located at the 5' end of exon 3 and a reverse primer (AS2) located in exon 5. Lane 1, mutant TC; lane 2, normal TC. (B) TC fragment was generated using a forward primer (Del 1) located in exon 3 and a reverse primer (GTI) located in intron 3. Lane 1, mutant TC; lane 2, normal TC.

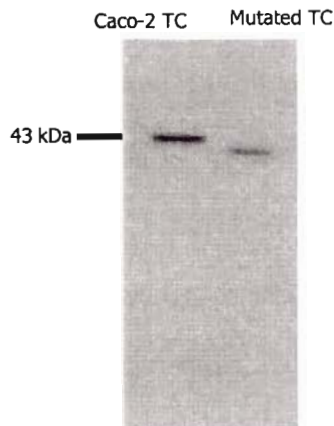


Fig 2. SDS-PAGE analysis of an *in vitro* transcription-translation product of transcobalamin (TC) cDNA in pcDNA vector. The ³⁵S-methionine labelled TC was immunoprecipitated with an anti-serum to human TC, separated in a 10% gel and the proteins visualized by autoradiography. Lane 1, normal TC; lane 2, mutant TC with a 27 AA deletion.

transcript generated from the mutant TC cDNA, a finding consistent with a 27 amino acid deletion (Fig 2).

Transfection studies

Cos cells transfected with a pcDNA3 vector containing no target cDNA produced 0.5 nmol of TC/L, which was consistent with the amount of TC produced by these cells propagating in culture. However, Cos cells transfected with a plasmid containing the normal TC cDNA derived from CaCo-2 cells produced 30 nmol of TC/L of culture medium as quantified by the amount of [⁵⁷Co]Cbl associated with a protein corresponding to the size of TC by gel filtration chromatography. Cos cells transfected with pcDNA3 containing the mutant TC cDNA failed to produce any additional TC other than the amount corresponding to the TC constitutively synthesized by these cells. These results were further confirmed by measuring the binding of [⁵⁷Co]Cbl with the charcoal assay in culture medium and cell lysates, which showed increased binding in medium from cultures transfected with the plasmid containing the normal cDNA but not with the plasmid containing the mutant cDNA (Fig 3). No binding activity was found in the lysates of cells transfected with the normal TC cDNA, which is in agreement with TC being constitutively secreted into the extracellular compartment (Quadros *et al*, 1989). However, no TC was found in the cells transfected with mutant TC thus ruling out a defect in the secretory pathway as a likely cause for the lack of TC in the culture medium.

[³⁵S]methionine radio-labelling, followed by immunoprecipitation with a polyclonal anti-TC antibody, identified TC in the culture medium of Cos cells transfected with the plasmid containing normal TC cDNA but no TC was detected in the medium of Cos cells transfected with the plasmid containing the mutant TC cDNA (Fig 4) and in addition, no [³⁵S]methionine-labelled TC accumulated in the cells (data not shown).

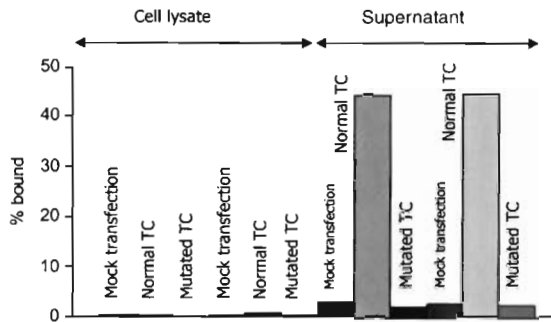


Fig 3. Binding of ⁵⁷Co-Cbl in the culture medium and cell lysates of Cos cells transfected with pcDNA3 vector containing normal or mutant transcobalamin cDNA.

No transfection	+	-	-
pcDNA3 normal TC	-	+	-
pcDNA3 mutated TC	-	-	+

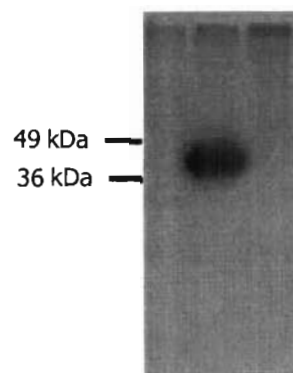


Fig 4. SDS-PAGE analysis of immunoprecipitated ³⁵S-methionine labelled transcobalamin (TC) in the culture medium of transfected Cos cells. Lane 1, not transfected; lane 2, pcDNA 3 containing normal TC cDNA and lane 3, pcDNA 3 containing mutant TC cDNA.

DISCUSSION

To date, the molecular basis of TC deficiency has only been reported in five patients and these reports have identified distinct mechanisms leading to TC deficiency. As TC deficiency is an autosomal recessive disease, both alleles must be mutated for the phenotype to be expressed. In one report, one affected child had an extensive deletion on one TC allele and a four-nucleotide deletion in the other, leading to a reading frame shift and a premature termination codon (Li *et al*, 1994a). Both the mutations caused TC mRNA and protein deficiency resulting in vitamin B12 cellular depletion. A second report described two children with nonsense mutations and single nucleotide deletions on both TC alleles

resulting in a frameshift and premature termination (Li *et al.* 1994b). Both patients had undetectable TC mRNA and protein in their fibroblasts. More recently, two unrelated patients were described with the same TC deficiency phenotype, characterized by a full length TC transcript, and immunoreactive TC that did not bind [⁵⁷Co]Cbl because of several mutations identified in the cDNA but not in the corresponding regions of the genomic DNA. These mutations were ascribed to RNA editing mechanisms and the authors showed that editing of the primary transcript can produce a non-functional protein and thus constitute another genetic mechanism of TC deficiency (Qian *et al.* 2002).

In this study, we describe three sisters with TC deficiency confirmed by the inability of the cultured fibroblasts to internalize Cbl without exogenously added TC (Bibi *et al.* 1999). In all three cases, a transversion (T → G) at the splice site in both TC alleles suppresses the wild-type donor splice site of intron 3. As a consequence, a cryptic splice site in exon 3 is activated which interacts with the acceptor splice site of intron 3 to produce an alternatively spliced transcript lacking 81 nucleotides. This in-frame deletion would yield a truncated protein that is 27 amino acids shorter than the normal TC (lacking residues from E99 to H126). Aberrant mRNA splicing because of mutations at splice junctions is a common cause of genetic disease (Brinkmann *et al.* 1991; Aminoff *et al.* 1999; Attanasio *et al.* 2003; Mine *et al.* 2003; Tanner *et al.* 2003) and accounts for approximately 15% of all point mutations; as many as 60% of these involve the G-T dinucleotide (Krawczak *et al.* 1992).

Three phenotypes of inherited TC deficiency have been identified: (1) absence of a functional or immunoreactive TC (Li *et al.* 1994a); (2) an immunologically crossreacting protein is detected but this protein does not bind Cbl (Seligman *et al.* 1980); (3) TC binds Cbl normally but the TC–Cbl complex does not bind to the membrane receptor (Haurani *et al.* 1979). The mutant TC described in this report was transcribed and translated normally in a cell-free system but when transfected into cultured cells, the protein was not secreted as evidenced by the lack of a functional or immunoreactive TC protein in the culture medium. This finding was in agreement with the sizeable decrease of TC in the serum of the three affected siblings and the inability of the fibroblasts from one affected sibling to secrete TC. This could happen if the mutant TC was sequestered in the cytoplasm because of a defect in intracellular protein routing. However, this seems unlikely because no TC was detected in the lysates of cells transfected with the mutant TC. The other possibility is that the mutant TC is unstable and is rapidly degraded in the cytoplasm. Many proteins, including cyclins and other regulators of the cell cycle and transcription factors, undergo proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway (Sommer & Wolf, 1997; Doherty *et al.* 2002). Proteasomes are involved in regulating the levels of physiological proteins (Boudjelal *et al.*, 2000; Rui *et al.*, 2001). They degrade natively disordered substrates (Liu *et al.* 2003) and truncated proteins (Emi *et al.* 2002). Therefore, a TC with a

27 amino acid deletion may present a misfolded configuration that renders it susceptible to degradation by the proteasome. It has been recently shown that disulphide bonds are critical for human TC function and stability. However, the six conserved cysteine residues are not equivalent in the context of intracellular folding and expression. Disruption of the C3–C249 disulphide bond seems to have no effect on the expression and function of TC. Disruption of disulphide bonds C98–C291 or C147–C187 results in the expression of a misfolded TC that is rapidly degraded by the proteosomal system (Kalra *et al.* 2003). The deletion of residues E99–H126 described here is in close proximity to C98. The resulting configuration may weaken the C98–C291 disulphide bond and affect the stability of TC thus promoting proteosomal degradation of the truncated protein.

In conclusion, this study describes a TC deficiency because of a mutation at a splice junction. A total of four genetic studies (including the present study) have now been reported in patients with TC deficiency and in all four, the gene defect was different, which emphasizes the genetic heterogeneity of the disease.

REFERENCES

- Aminoff, M., Carter, J.E., Chadwick, R.B., Johnson, C., Gräsbeck, R., Abdelaal, M.A., Broch, H., Jenner, L.B., Verroust, P.J., Moestrup, S.K., de la Chapelle, A. & Krahe, R. (1999) Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. *Nature Genetics*, **21**, 309–313.
- Attanasio, C., David, A. & Neerman-Arbez, M. (2003) Outcome of donor splice site mutations accounting for congenital afibrinogenemia reflects order of intron removal in the fibrinogen alpha gene (FGA). *Blood*, **101**, 1851–1856.
- Benhayoun, S., Adjalla, C., Nicolas, J.P., Guéant, J.L. & Lambert, D. (1993) Method for the direct specific measurement of vitamin B12 bound to transcobalamin II in plasma. *Acta Haematologica*, **89**, 195–199.
- Bibi, H., Gelman-Kohan, Z., Baumgartner, E.R. & Rosenblatt, D.S. (1999) Transcobalamin II deficiency with methylmalonic aciduria in three sisters. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **22**, 765–772.
- Boudjelal, M., Wang, Z., Voorhees, J.J. & Fisher, G.J. (2000) Ubiquitin/proteasome pathway regulates levels of retinoic acid receptor γ and retinoid X receptor α in human keratinocytes. *Cancer Research*, **60**, 2247–2252.
- Brinkmann, A.O., Kuiper, G.G., Ris-Stalpers, C., van Rooij, H.C., Romalo, G., Trifiro, M., Mulder, E., Pinsky, L., Schweikert, H.U. & Trapman, J. (1991) Androgen receptor abnormalities. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **40**, 349–352.
- Chanarin, I. (1979) Biochemistry of cobalamins. In: *Megaloblastic Anaemias*, pp. 4–21. Blackwell Scientific, Oxford, UK.
- Cooper, B.A. & Rosenblatt, D.S. (1987) Inherited defects of vitamin B12 metabolism. *Annual Review of Nutrition*, **7**, 291–320.
- Djalali, M., Guéant, J.L., Lambert, D., El Kholty, S., Saunier, M. & Nicolas, J.P. (1990) High-performance liquid chromatographic separation and dual competitive binding assay of corrinoids in biological material. *Journal of Chromatography*, **529**, 81–91.
- Doherty, F.J., Dawson, S. & Mayer, R.J. (2002) The ubiquitin-proteasome pathway of intracellular proteolysis. *Essays in Biochemistry*, **38**, 51–63.

- Emi, Y., Omura, S., Ikushiro, S. & Iyanagi, T. (2002) Accelerated degradation of mislocalized UDP-glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) proteins in Gunn rat hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **405**, 163–169.
- Fowler, B. (1998) Genetic defects of folate and cobalamin metabolism. *European Journal of Pediatrics*, **157**(Suppl. 2), S60–S66.
- Gottlieb, C., Lau, K.S., Wasserman, L.R. & Herbert, V. (1965) Rapid charcoal assay for intrinsic factor gastric juice unsaturated B12 binding capacity. antibody to IF serum and serum unsaturated B12 binding capacity. *Blood*, **25**, 875–884.
- Hakami, N., Neiman, P.E., Canellos, G.P. & Lazerson, J. (1971) Neonatal megaloblastic anaemia due to inherited transcobalamin II deficiency in two siblings. *New England Journal of Medicine*, **285**, 1163–1170.
- Hall, C.A. (1992) The neurologic aspects of transcobalamin II deficiency. *British Journal of Haematology*, **80**, 117–120.
- Haurani, F.I., Hall, C.A. & Rubin, R. (1979) Megaloblastic anaemia as a result of an abnormal transcobalamin II (Cardeza). *Journal of Clinical Investigation*, **64**, 1253–1259.
- Jacob, E., Wrong, K.J.T. & Herbert, V. (1977) A simple method for the separate measurement of transcobalamins I, II and III: normal ranges in serum and plasma in men and women. *Journal of Laboratory Medicine*, **89**, 1145–1152.
- Kaikov, Y., Wadsworth, L., Hall, C. & Rogers, P.C.J. (1991) Transcobalamin II case report and review of literature. *European Journal of Paediatrics*, **150**, 841–843.
- Kalra, S., Li, N., Seetharam, S., Alpers, D.H. & Seetharam, B. (2003) Function and stability of human transcobalamin II: role of intramolecular disulfide bonds. C98-C291 and C147-C187. *American Journal of Cell Physiology*, **285**, C150–C160.
- Krawczak, M., Reiss, J. & Cooper, D.N. (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human Genetics*, **90**, 41–54.
- Li, N., Rosenblatt, D.S., Kamen, B.A., Seetharam, S. & Seetharam, B. (1994a) Identification of two mutant alleles of transcobalamin II in an affected family. *Human Molecular Genetics*, **3**, 1835–1840.
- Li, N., Rosenblatt, D. & Seetharam, B. (1994b) Nonsense mutation in human transcobalamin II deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **204**, 1111–1118.
- Liu, C.W., Corboy, M.J., DeMartino, G.N. & Thomas, P.J. (2003) Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science*, **299**, 408–411.
- Mine, M., Brivet, M., Touati, G., Grabowski, P., Abitbol, M. & Marsac, C. (2003) Splicing error in E1 alpha dehydrogenase mRNA caused by novel intronic mutation responsible for lactic acidosis and mental retardation. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 11768–11772.
- Namour, F., Olivier, J.L., Abdelmoutalib, I., Adjalla, C., Debard, R., Salvat, C. & Guéant, J.L. (2001) Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT629 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocystein concentration in blood. *Blood*, **97**, 1092–1098.
- Nexo, E. (1998) Cobalamin binding proteins. In: *Vitamin B12 and B12 Proteins* (ed. by B. Kräutler, D. Arigoni & B.T. Golding), pp. 461–476. Wiley-VCH, Weinheim.
- Qian, L., Quadros, E.V., Regec, A., Zittoun, J. & Rothenberg, S.P. (2002) Congenital transcobalamin II deficiency due to errors in RNA editing. *Blood, Cells, Molecules and Diseases*, **28**, 134–142.
- Quadros, E.V., Matthews, D.M., Hoffbrand, A.V. & Linnell, J.C. (1976) Synthesis of cobalamin coenzymes by human lymphocytes in vitro and the effect of folates and metabolic inhibitors. *Blood*, **48**, 609–619.
- Quadros, E.V., Rothenberg, S.P. & Jaffe, E.A. (1989) Endothelial cells from human umbilical vein secrete functional transcobalamin II. *American Journal of Physiology*, **256**, C296–C303.
- Rothenberg, S.P. & Quadros, E.V. (1995) Transcobalamin II and the membrane receptor for the transcobalamin II–cobalamin complex. In: *Clinical Haematology: Megaloblastic Anaemia* (ed. by S.N. Wickramasinghe), pp. 499–514. Baillière Tindal, London, UK.
- Rui, L., Fisher, T.L., Thomas, J. & White, M.F. (2001) Regulation of insulin/insulin-like growth factor-1 signaling by proteasome-mediated degradation of insulin receptor substrate-2. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 40362–40367.
- Seligman, P.A., Steiner, L.L. & Allen, R.H. (1980) Studies of a patient with megaloblastic anaemia and an abnormal transcobalamin II. *New England Journal of Medicine*, **303**, 1209–1212.
- Sommer, T. & Wolf, D.H. (1997) Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB Journal*, **11**, 1227–1233.
- Tanner, S.M., Aminoff, M., Wright, F.A., Liyanarachchi, S., Kuronen, M., Saarinen, A., Massika, O., Mandel, H., Broch, H. & la Chapelle de A. (2003) Amnionless, essential for mouse gastrulation, is mutated in recessive hereditary megaloblastic anaemia. *Nature Genetics*, **33**, 426–429.
- Ulleland, M., Eilertsen, I., Quadros, E.V., Rothenberg, S.P., Fedosov, S.N., Sundrehagen, E. & Örnning, L. (2002) Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. *Clinical Chemistry*, **48**, 526–532.

Review

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 and Jean-Louis Guéant¹

¹ Laboratory of Cell and Molecular Pathology in Nutrition,

² Department of Experimental Surgery, INSERM EMI 0014 Medical Faculty, University of Nancy I, Vandoeuvre lès Nancy, France

³ Department of General and Endocrine Surgery, CHU Nancy-Brabois (HA), Vandoeuvre lès Nancy, France

⁴ Department of Radiology, CHU Nancy-Central, Nancy, France

Deficiencies of the major dietary sources of methyl groups, 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 abnormal DNA methylation. Vitamin B₁₂ and folate also play important roles 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. The aim of this study was to review the effects of methyl-deficient diets on DNA methylation and liver carcinogenesis in rats, and to evaluate the role of vitamin B₁₂ status in defining carcinogenicity of a methyl-deficient diet. Several studies have shown that a methyl-deficient diet influences global DNA methylation. Evidence from *in vivo* studies has 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. In contrast, the effect of vitamin B₁₂ withdrawal, in addition to choline, methionine and folate, induced hepatocellular carcinoma in less than 5% of rats. Clin Chem Lab Med 2003; 41(8):1012–1019

Key words: Cancer; Cobalamin; Gastrectomy; Liver; Methyl-deficiency; Rat.

Abbreviations: MTHFR, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.20); MTR, methionine synthase.

Introduction

Dietary choline and lipotrope deficiencies are among the most studied pathological processes induced by nutritional modifications in experimental animals (1). Since 1946, the long-term administration of diets deficient in choline has been known to cause liver cancer in rats (2). Even though such diets were later found to be contaminated with aflatoxin, the role of a 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 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 the presence or absence of carcinogens (8–13) or drugs impairing the 5,10-methylenetetrahydrofolate metabolism (one carbon metabolism) (14, 15) (Figure 1).

The use of carcinogens and/or specific drugs has been considered as controversial since these substances could be responsible for liver tumour 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 i) the effects of the use of carcinogens on liver carcinogenesis, ii) the role of diets deficient in choline and methionine with or without vitamin B₁₂/folate on liver carcinogenesis, and iii) effects of total gastrectomy on vitamin B₁₂ levels.

Methionine Metabolism and DNA Methylation

Vitamin B₁₂ and folate play important roles 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-adenosyl methionine. S-adenosyl methionine derives from methionine, which

*E-mail of the corresponding author: lbrunaud@planete.net

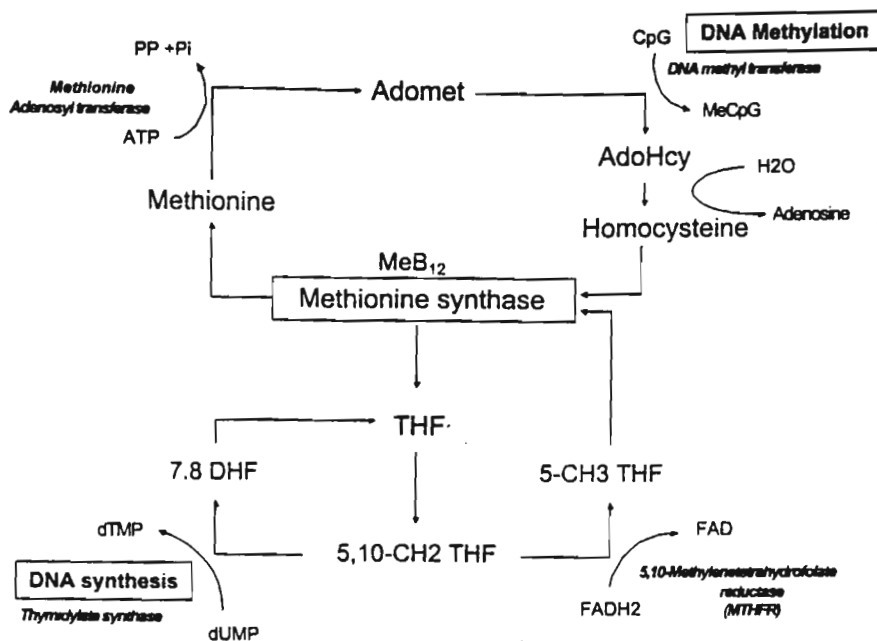


Figure 1 Diagram showing that methionine is synthesized by transmethylation of homocysteine by methionine synthase in the presence of vitaminic coenzymes, methyltetrahydrofolate and methylcobalamin. AdoHcy, adenosylhomocysteine;

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

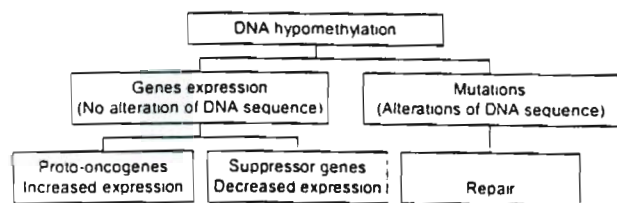


Figure 2 Relationship between DNA methylation and epigenetic control of gene expression and maintenance of genomic integrity.

is synthesized by methylation of homocysteine by methionine synthase (MTR) in the presence of 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 one-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 re-

duced, and methylation of DNA is theoretically reduced. However, evidence from *in vitro* cultures and *in vivo* studies has 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, the 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, the 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 levels below 200 pmol/l in F344 rats, and that vitamin B₁₂ was the single independent determinant of low MTR activity by logistic regression analysis (23). 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 have 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 (24). 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 (25). 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 a dietary folate-free diet results in diminished hepatic total choline and decreased S-adenosylmethionine concentrations (24). It has been shown that animals fed diets deficient in choline and methionine have hypomethylated DNA (24, 26). It seems to be that all organs may have changes in global DNA methylation elicited by the nutritional status. However, most studies have assessed DNA methylation in the liver, gut, brain, kidney, leucocytes, and not elsewhere. 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, 27, 28). Similar data have been reported in humans. A folic acid depletion study of nine postmenopausal women in a metabolic unit showed an increased DNA hypomethylation in lymphocytes (29). 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, 30, 31). 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 limitation, 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 behaviour observed in a typical neoplasm. Much of the focus of molecular biological 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 (32). The most likely mechanisms through which global DNA hypomethylation may induce neoplastic transformation include activation of oncogenes, inactivation of tumour-suppressor genes, induction of genomic instability and increased mutability that result in abnormal chromosomal structures (16, 33). Thus, changes in methylation status can be considered as being a pre-established state that facilitates tumour initiation and/or progression.

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 tumourigenesis (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 (34). Thus, in theory, decreased methylation, and hence relief of transcriptional silencing, may allow the expression of previously quiescent proto-oncogenes to become active and induce the cell proliferation events. Alternatively, increased methylation at previously unmethylated sites, such as the promoter regions of a tumour suppressor gene, may result in their silencing through inhibition of transcription and their inability to suppress cell proliferation (4, 20, 32, 35). Some observations from several groups have shown that the total 5-methylcytosine content of DNA is decreased during hepatocarcinogenesis and colonic carcinogenesis (4, 26, 32, 36). 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, 36). In the same way, MTR and methyltetrahydrofolate reductase gene polymorphisms have been related to genomic hypomethylation and carcinogenesis (37–39). For example, carriers of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.20) (MTHFR) C677T variant have been considered as being at increased risk of developing colorectal neoplasia (40).

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, 41). 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 mutations but may also result in the generation of single- and double-stranded DNA breaks, chromosome breakage and micronucleus formation (42). 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 (32). Several studies showed that the uracil level in DNA was 70-fold higher in individuals with serum folate <4 ng/ml relative to individuals with serum folate >4 ng/ml (16, 42). 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 (41).

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 (43).

Rat Model and Hepatocarcinoma

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 that 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 pre-existing initiated hepatocytes (4, 44). Other investigations have consequently been conducted on the interactions between hepatocarcinogens and liver tumour promoters and labile methyl groups. Two categories of chemical agents provide evidence that chemical carcinogenesis occurs in part through abnormal methylation processes: i) classical carcinogens and tumour promoters and ii) the anti-metabolites 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 tumourigenic activities of 2-acetylaminofluore, diethylnitrosamine, phenobarbital, and dichlorodiphenyltri-chloroethane 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 anti-metabolites 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 (45). Methyl-deficiency accelerates and magnifies the appearance of preneoplastic molecular and morphological changes in the target cells and, ultimately, accelerates the development of tumours (31). However, the use of carcinogens has been considered as controversial for studying liver carcinogenesis since it is impossible to differentiate the respective effects of these substances and of the restrictive diets in liver tumourigenesis *in vivo*.

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, 30). The diet most frequently used for long-term studies with the methyl-deficient rat model is the Lombardi diet, which 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) (46). Feeding rats this diet has been shown to cause hepatocellular carcinomas in 20–50% of the animals after 12–24 months (Table 1) (6, 30, 47).

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, 44). 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

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

Authors	Year	Diet composition					n	Hepatocellular carcinoma	Delay (months)
		Choline	Methionine	Folate	B ₁₂	Amino acid			
Nakae (47)	1992	-	+	+	+	nd	10	20%	12
Lombardi (46)	1988	-	+	+	+	nd	19	26%	16
Lombardi (46)	1988	-	+	+	+	nd	15	73%	12
Yokoyama (10)	1985	-	+	+	+	nd	37	22%	11
Nakae (47)	1992	-	+	+	+	AA-defined	10	100%	12
Mikol (8)	1983	-	-	+	+	nd	30	40%	19
Ghoshal (30)	1984	-	-	+	+	nd	45	51%	13–24
Henning (6)	1996	-	Low*	-	+	nd	10	100%	15
Hoover (9)	1984	-	-	-	-	nd	29	3.4%	12
Mikol (8)	1983	-	-	-	-	nd	30	0%	19

AA defined, choline-deficient L-amino acid defined diet; nd, not defined; * low methionine (0.23%).

modification is the unavoidable and unpredictable contamination of target nutrients by the protein sources of semi-purified diets (48). In comparison with the Lombardi diet, Nakae *et al.* showed that 100% of the rats fed the amino acid defined diet for 52 weeks developed hepatocellular carcinomas (30, 47). Their interpretation of the different effects on carcinogenesis of the two 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, 48). The tumourigenic 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 (49). These deficient diets also generate the presence of a new form of DNA methyltransferase (Dnmt; EC 2.1.1.73) activity in the liver tumours of rats fed the methionine and choline deficient diet, which could possibly explain in part the alterations in DNA methylation produced by the diet (50). Beside alterations of DNA methylation, genetic susceptibility and/or hormonal status are also important factors in liver tumourigenesis 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 (25). 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 that eventually contributes to the development of liver cancers (25).

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

Folate deficiency alone has little effect on hepatic lipid and carcinogenesis (31). 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 (5). 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% gelatine and 15% soy oil. It contained 0.23% methionine, 10 µg 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 (51). Feeding a folate-choline-

deficient and methionine-low diet also resulted in a similar decrease in the S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio in the liver, compared to a diet deficient only in choline and methionine (52).

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 (53). The effect of vitamin B₁₂ withdrawal in addition to choline, methionine and folate in deficient diets 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 and co-workers showed that Fischer rats fed with this diet for 52 weeks without carcinogens had a hepatocarcinoma incidence of only 3.4% (9). We also confirmed this low occurrence since we found no liver tumour occurrence in a group of seven 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 with a negative result. Animal livers harvested at death were free of tumour at pathology examination. However, a histological activity index was assessed in rat livers using a modified semi-quantitative score deriving from the Metavir and Working party of the World Congress of Gastroenterology scores (54, 55). 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 a severe methyl-deficient diet (deficient in choline, methionine, folate, and vitamin B₁₂) is probably not sufficient to promote tumour occurrence (Table 2). These results are in contrast with the effects of diets deficient in choline, methionine, and folate (without carcinogens) since this last diet is able to trigger liver tumours in more than 40% of rats (Table 1). However, this discrepancy between effects of choline-devoid and severe methyl-deficient diets (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 a 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 with a methyl-deficient diet on DNA methylation and liver carcinogenesis. We confirmed that vitamin B₁₂ plasma

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

Diet deficient in	Total gastrectomy	B ₁₂ deficiency	Median survival (quartiles) (months)	Liver MRI (at 1 year)	Mean liver dysplasia score (0-3)	Liver tumour pathology
Choline, methionine, folate	Yes	Severe	1.6 (1.4-3.4)	-	0 (±0)	No tumour
No deficiency	Yes	Severe	2.8 (2.0-5.8)	-	0 (±0)	No tumour
Choline, methionine, folate	No	Mild	20.5 (17.0-21.8)	Normal	0.6 (±0.2)	No tumour
No deficiency	No	No deficiency	21.2 (19.5-22.8)	Normal	0.2 (±0.2)	No tumour

MRI, magnetic resonance imaging.

levels were lower in gastrectomized rats than in methyl- and vitamin B₁₂-deficient diet fed animals (56). In fact, in our experience, a 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 (57-60). We found that i) vitamin B₁₂ plasma levels were similar in rats that underwent total gastrectomy and concomitant ileal resection than in those with only total gastrectomy; ii) ileal resection alone was not efficient enough to provide low plasma levels of vitamin B₁₂ (23). This indicated that an intrinsic factor was likely produced in the gastric wall and not in duodenum or jejunum as proposed by some authors (61). This also indicated that intrinsic factor-vitamin B₁₂ receptor expression was likely not restricted to the ileum in rats (59, 62). An advantage of using a surgical model to reach vitamin B₁₂ deficiency is to obtain a more dramatic decrease in B₁₂ plasma levels and to avoid substances such as nitrous oxide or other drugs that do produce B₁₂ deficiency (12, 63) but for which it is impossible to exclude interference with liver tumour 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% (59, 64, 65). Furthermore, a body weight loss occurred in survivor rats (65, 66). Although survival can be as long as 3 to 10 months after gastrectomy in a single rat (67, 68), we consider that gastrectomy is not an effective way to get long term B₁₂-deficient survivor rats. Thus, gastrectomized rats do not survive long enough to permit the evaluation of liver tumourigenicity (23) (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 i) type and amount of protein as the major sources of methionine, ii) the levels of methionine and choline in the diets, and iii) 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 (31). Dietary vitamin B₁₂ is crucial for carcinogenicity of a methyl-deficient diet. Indeed, the carcinogenicity of a methyl-deficient diet is much higher in the presence of vitamin B₁₂, compared to a methyl-deficient diet without B₁₂ (48).

References

- 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.
- Copeland DH, Salmon WD. The occurrence of neoplasms in the liver, lungs and other tissues of rats as a result of prolonged choline deficiency. *Am J Pathol* 1946; 22:1059-79.
- Poirier L. The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. *J Nutr* 2002; 132:2336S-9S.
- Poirier LA. Methyl-group deficiency in hepatocarcinogenesis. *Drug Metab Rev* 1994; 26:185-99.
- Poirier LA, Zapizek W, Lyn-cook B. Physiological methylation in carcinogenesis. *Prog Clin Biol Res* 1990; 340:97-112.
- Henning SM, Swendseid ME. The role of folate, choline, and methionine in carcinogenesis induced by methyl-deficient diets. *Adv Exp Med Biol* 1996; 399:143-55.
- 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.
- Mikol YB, Hoover KL, Creasia D, Poirier LA. Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1983; 4:1619-29.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. Brunaud L, Alberto JM, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L, et al. Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats. *Digestion* 2003. In press.
 24. Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr* 2002; 132:2333S–5S.
 25. Zeisel SH. Choline: An important nutrient in brain development, liver function and carcinogenesis. *Am J Clin Nutr* 1992; 11:473–81.
 26. Wainfan E, Dizik M, Stender M, Christman JK. Rapid appearance of hypomethylated DNA in livers of rats fed cancer-promoting, methyl-deficient diets. *Cancer Res* 1989; 49:4094–7.
 27. 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.
 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; 55:1894–901.
 29. 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; 32:1204–12.
 30. Ghoshal AK, Farber E. The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Carcinogenesis* 1984; 5:1367–70.
 31. Rogers A. Methyl donors in the diet and responses to chemical carcinogens. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:659S–65S.
 32. Wajed SA, Laird PW, Demeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001; 234:10–20.
 33. Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics. *Annu Rev Genet* 1996; 30:44f–64.
 34. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301:89–92.
 35. Bestor TH. Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* 1998; 393:311–2.
 36. Fang JY, Xiao SD. Alterations of DNA methylation in gastrointestinal carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16:960–8.
 37. 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.
 38. 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.
 39. 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.
 40. Ryan BM, Weir DG. Relevance of folate metabolism in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Lab Clin Med* 2001; 138:164–76.
 41. 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.
 42. Blount BC, Ames BN. DNA damage in folate deficiency. *Baillieres Clin Haematol* 1995; 8:461–78.
 43. 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.
 44. 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; 11:273–81.
 45. Rogers AE, Newberne P. Aflatoxin B1 carcinogenesis in lipotrope-deficient rats. *Cancer Res* 1969; 29:1965–72.
 46. 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.
 47. 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; 52:5042–5.
 48. Nakae D. Endogenous liver carcinogenesis in the rat. *Pathology International* 1999; 49:1028–42.
 49. Poirier L. The role of methionine in carcinogenesis *in vivo*. *Adv Exp Med Biol* 1986; 206:269–82.
 50. 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.
 51. James S, Yin L. Diet-induced DNA damage and altered nucleotide metabolism in lymphocytes from methyl-donor deficient rats. *Carcinogenesis* 1989; 10:1209–14.
 52. Henning SM, McKee RM, 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.
 53. 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* 1979; 14:575–84.

54. 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.
55. Working party of the World Congress of Gastroenterology. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology* 1994; 22:983-93.
56. 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.
57. 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.
58. Owens J, Scott JSD, Cooksley WG. The retention of cobalamin by the liver in the cobalamin-deficient rat. *Clin Sci* 1985; 68:553-60.
59. 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.
60. Giorgini GL, Iannuccilli E, Leduc LP, Thayer W. Control of intrinsic factor secretion in rats. *Dig Dis* 1973; 18:332-6.
61. Adachi S, Kawamoto T, Otsuka M, Todoroki T, Fukao K. Enteral vitamin B₁₂ supplements reverse postgastrectomy B₁₂ deficiency. *Ann Surg* 2000; 232:199-201.
62. Alpers DH, Rusell-Jones GJ. Intrinsic factor, haptocorrin, and their receptor. in: Barnerjee RV, editor. *Chemistry and biochemistry of B₁₂*. New York: John Wiley & Sons Inc, 1999:411-40.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.

Received 09 February 2003, revised 5 May 2003,
accepted 5 May 2003

Corresponding author: Laurent Brunaud, MD, Laboratory of Cell and Molecular Pathology in Nutrition, INSERM EMI 0014 Medical Faculty, University of Nancy I, 54505 Vandoeuvre lès Nancy cedex, France
Phone: +33 383 15 44 84, Fax: +33 383 15 35 91,
E-mail: lbrunaud@planete.net

Nom : **Monsieur ALBERTO**

Prénom : **Jean-Marc**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : **BIOLOGIE CELLULAIRE - NUTRITION**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 5/10/06

Le Président de l'Université

Jean-Pierre FINANCE



RÉSUMÉ

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé porteur de groupement thiol réducteur qui joue un rôle central dans les processus de méthylation cellulaire. L'hyperhomocystéinémie (HHcy) est associée à diverses anomalies au niveau du cœur, du cerveau ou du foie. Les maladies qui en résultent vont de la stéatose hépatique aux maladies cardiovasculaires, défauts de fermeture du tube neural ou encore à la maladie d'Alzheimer. Des perturbations des activités de transmethylations, SAM dépendantes, et/ou une augmentation du stress oxydant, sont impliquées dans la pathogenèse de ces maladies.

L'objectif de ce travail est de déterminer les facteurs conduisant d'une HHcy, sévère ou modérée, à l'apparition de stéatose hépatique. La stéatose est caractérisée par une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes qui, à terme, peut conduire à une fibrose, voire une cirrhose. Dans un deuxième temps, nous avons évalué le statut redox hépatique, généralement associé à la stéatose.

La carence maternelle (folates, vitamine B12 et choline) induit chez le raton âgé de 21 jours une HHcy modérée, en même temps qu'apparaît une stéatose hépatique. L'HHcy est due à une baisse du ratio SAM/SAH. Cela provoque une chute de la synthèse de carnitine et aboutit à une stéatose hépatique. L'HHcy induit une augmentation des marqueurs du stress oxydant. Chez les souris transgéniques *cbs* ^{-/-}, il y a une accumulation de SAH, inhibiteur des méthyltransférases, qui perturbe le cycle de reméthylation de l'Hcy.

Notre modèle nutritionnel d'HHcy modérée, due à un *methyldeficient*, a permis d'établir une relation entre reméthylation de l'Hcy, synthèse hépatique de la carnitine et stéatose hépatique.

Mots clés : Homocystéine, stéatose, carnitine, méthylation, vitamine B12, folates, glutathion.

ABSTRACT

Homocysteine (Hcy) is a sulphur-containing amino acid that plays a central role in cellular methylation processes. hyperhomocysteinemia (HHcy) has been linked to various abnormalities occurring in liver, heart and brain. The relevant pathologies can range from hepatic steatosis to cardiovascular disease, neural tube defect and Alzheimer disease. Although the mechanisms for these are not clear, the perturbation of the SAM dependant transmethylations and the elevation of the oxidant stress could be involved in the pathogenesis of these diseases.

The aim of this work was to determine the factors leading from moderate or severe HHcy, to hepatic steatosis, a condition characterized by triglycerides accumulation that can lead to fibrosis and cirrhosis. In addition, we have studied the changes of hepatic redox status as a consequence of HHcy.

In our study, we used 21 days-old young rats born to mothers that had undergone a feeding of methyl-donor deficient diet (in folate, vitamin B12 and choline) prior to the pregnancy. The maternal deficiency in methyl donor, induced in these pups moderate HHcy. Additionally, hepatic steatosis appeared in these pups. HHcy induced the drop of the SAM/SAH ratio and led to a decrease in carnitine synthesis, causing the hepatic steatosis. We found that Hcy accumulation also led to an increase of the oxidant stress. In transgenic mice *cbs* ^{-/-}, there is SAH accumulation, potent inhibitor of methyltransferases, that disturbs Hcy remethylation cycle.

So, we have established a relationship between Hcy remethylation, carnitine synthesis and hepatic steatosis using the moderate HHcy nutritional model through using the methyl deficient diet.

Key words: Homocysteine, steatosis, carnitine, methylation, vitamin B12, folate, glutathione.