HAL
open science

Hypertrophie myocardique, risque vasculaire et métabolisme des monocarbones. Conséquences métaboliques et moléculaires dans un modèle de raton carencé en donneurs de méthyles, et chez le sujet âgé

Maira Alejandra Moreno Garcia Cardenas

To cite this version:

Maira Alejandra Moreno Garcia Cardenas. Hypertrophie myocardique, risque vasculaire et métabolisme des monocarbones. Conséquences métaboliques et moléculaires dans un modèle de raton carencé en donneurs de méthyles, et chez le sujet âgé. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2011. Français. NNT : 2011NAN10004 . tel-01746390

HAL Id: tel-01746390

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746390v1

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

N° attribué par la bibliothèque

|__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|

Ecole doctorale: *Biologie Santé Environnement*

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Mention: *Biologie cellulaire - Nutrition*

Par

Maira Alejandra MORENO GARCIA

Hypertrophie myocardique, risque vasculaire et métabolisme des monocarbones. Conséquences métaboliques et moléculaires dans un modèle de raton carencé en donneurs de méthyles, et chez le sujet âgé

Thèse soutenue publiquement le 31 janvier 2011

Membres du jury :

Rapporteurs :

Monsieur Denis BLACHE Directeur de Recherche, Inserm U498 Université de Bourgogne

Monsieur Jean GIUDICELLI Maître de Conférences, - HDR, Université de Nice

Examinateurs :

Monsieur Jean-Noel FREUN Directeur de Recherche, Université de Strasbourg

Monsieur Jean-Louis GUEANT Professeur des Universités, Université Henri Poincaré Nancy

Monsieur Damien LOGEART Docteur, -HDR Hôpital Lariboisière, Paris

Monsieur Yves JUILLIERE Professeur des Universités, Université Henri Poincaré Nancy

Directeur de thèse

Madame Rosa-Maria GUEANT-RODRIGUEZ Maître de Conférences-HDR, Université Henri Poincaré

Co-directeur de thèse

Inserm
Institut national de la santé et de la recherche médicale

Travail effectué dans l'UMR Inserm 954 « Nutrition génétique et exposition aux risques environnementaux »

Remerciements

Je tiens à adresser mes remerciements les plus chaleureux à tous ceux qui m'ont aidé au cours de la réalisation de ce travail.

Tout d'abord je tiens à remercier le Professeur Jean-Louis Guéant, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour ces années de thèse que j'ai passée à vos côtés. Au cours de ces années, votre grande disponibilité, votre rigueur scientifique, votre enthousiasme et vos précieux conseils m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions. La confiance que vous m'avez accordée ainsi que nos nombreuses discussions m'ont permi de progresser et de mieux appréhender les différentes facettes du métier d'enseignant-chercheur. Soyez assuré, Monsieur, de toute mon estime et de mon profond respect. Aussi un grand merci, pour votre humanité, votre ouverture d'esprit et la patience dont il a témoigné lors de la correction et l'élaboration de mes papiers et de ce manuscrit, merci beaucoup.

Je tiens à remercier Professeur Yves Juillière pour la direction de ce travail, pour vos conseils, votre disponibilité concernant à la Cardiologie et pour la sympathie que vous m'avez témoignée au cours de mes années de thèse. Vous avez contribué à la réalisation de ce travail, soyez assurée de mon plus profond respect face à votre compétence.

Je tiens à remercier Rosa-Maria Guéant pour sa codirection et tout ce que tu as fait pour moi pendant mon doctorat. Par la suite nos relations ont évolué vers une amitié et je tiens à la remercier également pour les moments que nous avons vécu en dehors du labo. Je tiens enfin à te remercier pour ton implication dans ce travail de thèse, aide, disponibilité et nombreux conseils. Sois assuré, Rosita de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

Messieurs Denis Blache et Jean Giudicelli je vous remercier pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail en acceptant d'être les rapporteurs. Recevez ici toute ma gratitude et ma reconnaissance pour le temps et l'énergie que vous avez consacrés à l'évaluation de ce travail.

Messieurs Jean-Noël Freund et Damien Logeart merci d'avoir accepté de prendre part au jury et pour l'attention que vous avez portée à ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier particulièrement Monsieur Yves Malthiery pour ses conseils et collaborations dans ce travail et de m'avoir permis de faire quelques manips au sein de son équipe de recherche.

Je tiens à remercier l'équipe du laboratoire de microscopie électronique tout particulièrement Catherine Strazielle, ainsi que madame *Jacqueline Chanel pour leur aide et soutien mais avant tout pour les bons moments passés ensemble à faire avancer ces travaux de thèse.*

Je remercie très sincèrement l'équipe de Nancyclotep dirigée par Professeur Pierre-Yves Marie et tout particulièrement à Fatiha *Maskali et Sylvain Poussier pour son aide, patience et collaboration dans ce travail.*

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

Je remercie Jean-Marc Alberto, pour sa participation indispensable dans ce travail, il a su me transmettre ses connaissances. C'est à cette occasion que j'ai pu apprécier sa rigueur scientifique ainsi que son humour. Je tiens enfin à le remercier pour son implication dans ce travail de thèse, son aide, sa disponibilité, ses nombreux conseils et son soutien sans faille. Sois assuré, de ma profonde gratitude et de toute mon amitié.

J'exprime également ma gratitude et mon amitié à mes chers collègues et amis du laboratoire Veronique, Nassila, Min, Rafaela, Shabnam, Violette, Thierry, Nicole, Céline, Philippe, Dominique, Shyue-Fang, Sandra, Romain, Florence, Cyril, Nicolas, Sonia, Patrice, Maatem et Hélène. Pour leur disponibilité et leurs encouragements au cours de ma thèse ainsi que pour leur soutien et les rires aux éclats … Sans eux la vie dans le laboratoire aurait été bien terne.

Enfin ce travail est dédicacé à ma petite famille, mon cher mari Luis qui m'a beaucoup aidé grâce a sa confiance et soutien inconditionnel et l'amour qu'il m'a démontré pendant ces années, son amour a adouci ma peine lors de la conclusion de ce travail. Te Amo.

Abreviations

Aβ42 : Peptide bêta amyloïde
ABI : Ankle brachial index
AND : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP : Adénosine 5'-diphosphate
AdoCbl : Adénosylcobalamine
AG : Acodes gras
AGL : Acides gras libres
AOMI : Artériopathie Oblitérative des Membres Inférieures
Apo A-I : Apolipoprotéine A-I
Apo B : Apolipoprotéine B
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messager
ATP : Adénosine 5'-triphosphate
β-AR : Récepteur bêta-adrénergique
BET : Bromure d'éthydium
BHMT : Bétaïne-Homocystéine méthyltransférase
Bp : Base pair - paire de base
BSA : Bovine serum albumin - 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-β-lyase
CH_2-THF : Méthylènetétrahydrofolate
CH_3-THF : Méthyltétrahydrofolate
CLHP : chromatographie liquide à haute performance
CoA : Coenzyme-A
COX : Cytochrome c oxydase
CS : Citrate synthase
Da : Dalton
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DHF : Dihydrofolate
DHFR : Dihydrofolate réductase
DMG : Diméthylglycine
DNMT : DNA methyltransferase - ADN méthyltransférase
DTT : Dithiotréitol
DNP : Dinitrophénol
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK1\2 : Extracellular signal-regulated kinase
ERO : Espèces réactives à l‟oxygène
FAD : Flavine adéninedinucléotide oxydé
$FADH_2$: Flavine adéninedinucléotide réduit
FADH2 : Flavine adénine dinucléotide hydrogénée
FCCP : Carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazone
FMN : Flavine mononucléotide oxydé
$FMNH_2$: Flavine mononucléotide réduite
FPIA : fluorescence polarization immuno assay

GDPHmt : Glycérol phosphate deshydrogenase mitochondrial
GNMT : Glycine-N méthyltransférase
GSH : Glutathion réduit
GSH total : Glutathion total
GSSG : Glutathion oxydé
GPx : Glutathion peroxydase
HA : Acide homocystéique
HDL-C : High densitiy lipoportein-cholesterol /Lipoprotéine de haute densité- cholestérol
Hcy : Homocystéine
hHcy : Hyperhomocystéinémie
JNKs : c-Jun N-terminal kinases
MDA : Malondialdéhyde
MAPKs : Mitogen-activated protein kinases
MAT : Méthionine adénosyltransférase
MeCbl : Méthylcobalamine
MéthylèneTHF : Méthylènetétrahydrofolate
MéthylTHF : Méthyltétrahydrofolate
MMA : Methylmalonic acid - Acide méthylmalonique
MMCoA : Méthylmalonylcoenzyme A
MTHFR : Méthylènetétrahydrofolate réductase
MTR : Méthionine synthase
MTRR : Méthionine synthase réductase
NA : Noradrénalie
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
NF-κB : facteur nucléaire κB
PGC-1 : coactivateur-1, gamma des récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes
PPAR-α : récepteur gamma activé par les proliférateurs des peroxysomes
PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS : Phosphate buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction
PEMT : Phosphatidylétanolamine méthyltransférase
PL : Phospholipides
PLP : Phosphate de pyridoxal (vitamine B6)
PPi : Pyrophosphate
Pi : Phosphate inorganique
RNase : Ribonucléase
RT : Reverse transcription - Transcription inverse
RT-PCR : Real-time Reverse Transcription-Polymerase
ROS : molécules réactives dérivées de l'oxygène
SAH : Sulfonium-adénosyl-L-homocystéine
SAHH : Sulfonium-adénosyl-L-homocystéine hydrolase
SAM : Sulfonium-adénosyl-L-méthionine
SHMT : Sérine hydroxyméthyltransférase
SIRT-1 : Silent information regulator 1
SDS : Sodium dodécylsulfate

SOD	: Superoxide dismutase
TBS	: Tris buffered saline
TC II	: Transcobalamine II
TEP	: tomographie par émission de positons
TML	: Triméthyllysine
TNB	: Trinitrobenzène
TNFA	: Facteur de nécrose tumoral alpha (gène)
TNF-α	: facteur de nécrose de tumeur
TNF-α	: facteur de nécrose de tumeur
THF	: Tétrahydrofolate
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling
VLDL	: Very Low density lipoprotein
Western blot	: Détection des protéines par immno-empreinte

Liste des Tableaux

Etude I

Tableau 1 105

Tableau 2..... 106

Tableau 3 106

Tableau 4 107

Tableau 5..... 107

Tableau 6..... 123

Tableau 7..... 124

Etude II

Tableau 1 147

Tableau 2 148

Tableau 3 149

Liste des figures

FIGURE 1 26
FIGURE 2 27
FIGURE 3. 39
FIGURE 4. 41
FIGURE 5. 42
FIGURE 6. 43
FIGURE 7 44
FIGURE 8 48
FIGURE 9 50
FIGURE 10 57
FIGURE 11 61
FIGURE 12 70
FIGURE 13 71
FIGURE 14 72
FIGURE 15 101
FIGURE 16 102
FIGURE 17 103
FIGURE 18 103
FIGURE 19 104
FIGURE 20 104
FIGURE 21 108
FIGURE 22 109
FIGURE 23 109
FIGURE 24 110
FIGURE 25 111
FIGURE 26 111
FIGURE 27 112
FIGURE 28 113
FIGURE 29 113
FIGURE 30 114
FIGURE 31 115
FIGURE 32 116
FIGURE 33 116
FIGURE 34 117
FIGURE 35 117
FIGURE 36 118
FIGURE 37 119
FIGURE 38 119
FIGURE 39 120
FIGURE 40 120
FIGURE 41 121
FIGURE 42. 122
FIGURE 43 123
FIGURE 44 128
FIGURE 45 133
FIGURE 46 136
FIGURE 47 138
FIGURE 48..... 143
FIGURE 49..... 148
FIGURE 50..... 150

Sommaire

REMERCIEMENTS 1
ABREVIATIONS 3
LISTE DES TABLEAUX 6
LISTE DES FIGURES 7
SOMMAIRE 9
AVANT-PROPOS 15
PUBLICATIONS : 16
COMMUNICATIONS AFFICHÉES : 16
COMMUNICATIONS ORALES : 17
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES
1. INSUFFISANCES CARDIAQUES 20
1.1. CLASSIFICATIONS DES INSUFFISANCES CARDIAQUES 21
1.1.1. MECANISMES DE L'INSUFFISANCE VENTRICULAIRE 21
1.1.1.1. FONCTION VENTRICULAIRE SYSTOLIQUE 21
1.1.1.2. FONCTION VENTRICULAIRE DIASTOLIQUE 22
1.2. MECANISMES D'ADAPTATION DE L'INSUFFISANCE VENTRICULAIRE GAUCHE. 22
1.2.1. MECANISMES D'ADAPTATIONS PRECOCES : 23
1.2.1.1. STIMULATION NEUROHORMONALE : 23
1.2.1.2. DILATATION DU VENTRICULE GAUCHE : 23
1.2.2. MECANISMES D'ADAPTATION RETARDES : 23
1.2.2.1. REMODELAGE VENTRICULAIRE GAUCHE : 23
1.2.2.2. MODIFICATIONS NEUROHORMONALES : 23
2. FACTEURS DE RISQUE DES MALADIES CARDIO-VASCULAIRES. 25
2.1. ORIGINE ET METABOLISME DE L'HOMOCYSTEINE 26
2.2. VOIES DE SYNTHESES 26
2.3. REGULATION NUTRITIONNELLE DU METABOLISME DE L'HOMOCYSTEINE 28
2.4. DEVENIR METABOLIQUE DE L'HOMOCYSTEINE 29
2.5. PATHOGENESE DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE 29
2.5.1. ALTERATION DE LA SYNTHESE DU N5-CH3 THF 29
2.5.2. ALTERATION DE LA REMETHYLATION DE L'HOMOCYSTEINE 30
2.5.3. CAS DE LA TRANSSULFURATION DEFECTUEUSE DE L'HOMOCYSTEINE 30
2.6. PREUVES EXPERIMENTALES 31
2.7. ETIOLOGIE DES HYPERHOMOCYSTEINEMIES SELON LE TAUX SANGUIN 31
2.8. MECANISMES DE LA PATHOGENICITE DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE 32
2.8.1. EFFETS BIOCHIMIQUES DE L'HYPERHOMOCYSTEINEMIE 32
2.8.1.1. PRODUCTION D'UN STRESS OXYDANT 32
2.8.1.2. PRODUCTION ET METABOLISME DU NO 33

2.8.1.3. ACTION SUR LES PROTEINES 33
2.8.1.4. EFFET SUR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET LA TRANSDUCTION DES SIGNAUX 34
2.8.1.5. DIMINUTION DE METABOLITES UTILES 34
2.8.2. ACTIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE L'HOMOCYSTEINE 34
2.8.2.1. FORMATION DE L'ATHEROME ET DE LA THROMBOSE 34
2.8.2.2. MALADIES NEURODEGENERATIVES 35
2.8.2.3. CARCINOGENESE 35
2.8.2.4. PROLIFERATION CELLULAIRE 35
2.8.2.5. MATRICE EXTRACELLULAIRE 36
2.8.2.6. INSUFFISANCE CARDIAQUE 36
3. INSUFFISANCE CARDIAQUE ET APOPTOSE 36
3.1. REGULATION ADRENERGIQUE DE L'APOPTOSE DES CARDIOMYOCYTES ET INSUFFISANCE CARDIAQUE 37
3.2. VOIES PRO ET ANTI-APOPTOTIQUES DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE 39
4. INSUFFISANCE CARDIAQUE ET STRESS OXYDANT 41
4.1. RESERVES ANTI-OXYDANTES AU COURS DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE 45
4.2. STRESS OXYDANT ET DYSFONCTION ENDOTHELIALE 46
5. METABOLISME ENERGETIQUE 46
5.1. CARNITINE 47
5.2. REGULATION DE LA SYNTHESE DE LA CARNITINE 48
5.3. REGULATEURS DU METABOLISME ENERGETIQUE MYOCARDIQUE 49
6. MYOCARDIOPATHIES METABOLIQUES 54
6.1. MITOCHONDRIE 56
6.2. STRUCTURE DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE ET L'ATP SYNTHASE. 56
7. MYOCARDIOPATHIES MITOCHONDRIALES 57
7.1. PHYSIOPATHOLOGIE 58
8. CARDIOPROTECTION ENDOGENE PAR L'ADENOSINE 60
OBJECTIFS DU TRAVAIL 62
ETUDE 1 : MODELE ANIMAL 64
MATERIELS…… 65
1. ANIMAUX ET MODELE 66
1.1. ENTRETIEN DES ANIMAUX 66
1.2. PRELEVEMENT 66
2. PHENOTYPAGE TISULAIRE 67
2.1. ANALYSES MORPHOLOGIQUES 67
2.2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 67
2.3. IMMUNOHISTOLOGIE 67
3. ANALYSES HEMODYNAMIQUES ET FONCTIONNELLES (EVALUATION DE LA FONCTION CARDIAQUE) 69
3.1. MINI TEP 69

3.2. MESURE DE LA TENSION ARTERIELLE « TAIL CUFF METHOD » 70
4. DOSAGES PLASMATIQUES 72
4.1. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DE VITAMINES B12 ET B9 (FOLATES) 72
4.2. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION D'HOMOCYSTEINE....73
4.3. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DU BNP 73
4.4. CONCENTRATION DE CARNITINE ET ACYLCARNITINES....74
5. DOSAGES TISSULAIRES....74
5.1. CONCENTRATION EN VITAMINES B12, B9 (FOLATES) ET EN HOMOCYSTEINE 74
5.2. CONCENTRATION DE BNP 75
5.3. ACTIVITES ENZYMES ET METABOLITES DU CYCLE D'HOMOCYSTEINE 75
5.3.1. METHIONINE SYNTHASE (MS) 75
5.3.2. METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR) 76
5.3.3. S-ADENOSYLMETHIONINE ET S ADENOSYLHOMOCYSTEINE....78
6. MARQUEURS DU STRESS OXYDANT....79
6.1. SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD)....79
6.2. GLUTATHION PEROXYDASE (GPX)....80
6.3. MALONDIALDEHYDE (MDA)....81
7. LES MAP KINASES, APOPTOSE ET AKT 82
8. RT-PCR....85
9. MITOCHONDRIES....87
9.1. RESPIRATION MITOCHONDRIALE....87
9.1.1. ISOLEMENT MITOCHONDRIAL....87
9.1.2. DETERMINATION DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE 88
9.2. DOSAGES ENZYMATIQUES DES COMPLEXES DE LA CHAINE RESPIRATOIRE....89
9.2.1. DOSAGE DE LA NADH UBIQUINONE C REDUCTASE (COMPLEXE I) 89
9.2.2. DOSAGE DE LA SUCCINATE UBIQUINONE REDUCTASE (COMPLEXE II) 90
9.2.3. DOSAGE DE L'UBIQUINONE CYTOCHROME C REDUCTASE (COMPLEXE III) 92
9.2.4. DOSAGE DE LA CYTOCHROME C OXYDASE-COX (COMPLEXE IV) 92
9.2.5. DOSAGE DE LA F1-ATPASE (COMPLEXE V)....93
9.3. DOSAGE ENZYMATIQUES DE QUELQUES ENZYMES DU CYCLE DE KREBS....94
9.3.1. DOSAGE DE LA CITRATE SYNTHASE (CS)....94
9.3.2. DOSAGE DE L'ACONITASE....95
9.3.3. DOSAGE DE LA FUMARASE....96
10. METABOLISME LIPIDIQUE 97
10.1. EXTRACTION LIPIDIQUE....97
10.2. CONCENTRATION DE TRIGLYCERIDES ET CHOLESTEROL....97
10.3. CONCENTRATION DE CARNITINE ET ACYLCARNITINES....97
11. DETERMINATION DES PURINES D'ADENYL 98
12. ANALYSE PROTEOMIQUE DU MYOCARDE 98

14. TESTS STATISTIQUES 99
RESULTATS 100
1. EFFETS DU REGIME CARENCE EN GROUPEMENT METHYLES SUR LES RATONS DE 21 JOURS. .. 101
1.1. OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES 101
1.1.1. DEVELOPPEMENT CORPOREL DES RATONS 101
1.2. OBSERVATION MACROSCOPIQUE DU CŒUR 102
1.2.1. MOYENNE RAPPORT CŒUR/ POIDS 102
1.3. OBSERVATION MICROSCOPIQUES DU CŒUR 102
1.3.1. COUPES TRANSVERSALES DU CŒUR 102
1.3.2. DETERMINATION DE LA TAILLE DES CARDIOMYOCYTES 103
1.4. MARQUEURS D'INSUFFISANCE CARDIAQUE 103
1.4.1. PEPTIDE NATRIURETIQUE DE TYPE B (BNP) 103
1.5. ANALYSES FONCTIONNELLES 104
1.5.1. MINI-TEP 104
1.5.2. PRESSION ARTERIELLE ET FREQUENCE CARDIAQUE 105
2. DOSAGES DES DETERMINANTS NUTRITIONNELS DE L'HOMOCYSTEINE 106
2.1. DOSAGES PLASMATIQUES 106
2.2. DOSAGE TISSULAIRES 107
2.2.1. PHENOTYPAGE METABOLIQUE 108
2.2.1.1. ACTIVITES DES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME DE L'HOMOCYSTEINE 108
2.2.1.2. METABOLITES IMPLIQUEES DANS LES REACTIONS DE METHYLATIONS 108
3. MECANISMES QUI CONDUISENT A UNE HYPERTROPHIE CARDIAQUE 109
3.1. MARQUEURS CARDIAQUES DU STRESS OXYDANT ET PEROXYDATION LIPIDIQUE 109
3.2. VOIES DE SIGNALISATION MAPKS 110
3.3. APOPTOSE 110
3.4. VOIES DE PROLIFERATION AKT/PKB 112
4. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 112
4.1. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES DU CONTENU LIPIDIQUE DANS LES CARDIOMYOCYTES 112
4.2. STATUT LIPIDIQUE AU NIVEAU TISSULAIRE 113
5. METABOLISME ENERGETIQUE 114
5.1. NUCLEOTIDES D'ADENOSINE 114
5.2. POTENTIEL ENERGETIQUE 114
5.3. CARNITINE ET ACYLCARNITINES 115
5.3.1. CONCENTRATIONS DE CARNITINE AU NIVEAU TISSULAIRE 115
5.3.2. CONCENTRATIONS DE CARNITINE AU NIVEAU PLASMATIQUE 116
6. RESPIRATION MITOCHONDRIAL 118
6.1. ACTIVITE DU CITRATE SYNTHASE 118
6.2. REGULATION DE L'ENTREE D'ACIDES GRAS PAR LA CPT1 119
6.3. DOSAGE ENZYMATIQUE DU COMPLEXE DE LA CHAINE RESPIRATOIRE 120

6.4. DOSAGE ENZYMATIQUE DE QUELQUES ENZYMES DU CYCLE DE KREBS 120

7. ANALYSE PROTEOMIQUE DU MYOCARDE 121

8. EFFETS DU RETOUR A UN REGIME NORMAL CHEZ LE RATON ISSU DE MERE CARENCEE..... 122

9. ETUDE DE CORRELATIONS..... 123

DISCUSSION 125

1. CONSEQUENCES MORPHOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES DU REGIME CARENCE EN DONNEURS DE METHYLES SUR LE MYOCARDE 126

2. HOMOCYSTEINE, FOLATES, VITAMINE B12 ET METABOLISME DES MONOCARBONES DANS LE TISSU CARDIAQUE..... 127

3. CONSEQUENCES DE LA CARENCE EN GROUPEMENT METHYLESSUR LE STRESS CELLULAIRE ET L'APOPTOSE..... 127

4. EFFETS METABOLIQUES DU REGIME CARENCE SUR LE MYOCARDE 130

ETUDE 2 : MODELE POPULATIONNELLE 140

MATERIELS..... 141

1. ENVIRONNEMENT ET PARTICIPANTS..... 142

2. LA MESURE DE L'ABI..... 142

3. PRELEVEMENT SANGUIN ET DOSAGES BIOLOGIQUES..... 143

4. ANALYSES STATISTIQUES..... 144

RESULTATS..... 145

1.LES CARACTERISTIQUES DE BASE 146

2.LES FACTEURS PREDICTIFS DE L'ABI 146

3. ASSOCIACION DE L'APO A-I , HDL-C AVEC L'HOMOCYSTEINE 148

4. DISCUSSION 152

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 154

BIBLIOGRAPHIE 156

Avant-propos

L"insuffisance cardiaque chronique est l"une des maladies cardiovasculaires les plus fréquentes dans les pays occidentaux. Malgré de grands progrès dans le traitement de l"insuffisance cardiaque chronique, la morbidité et la mortalité de cette maladie demeurent élevées et continuent d"accaparer une grande partie des ressources de notre système de santé. L"insuffisance cardiaque n"est pas une entité en soi, mais un syndrome dû à des étiologies différentes, comme la maladie coronarienne par exemple, l"hypertension, les maladies valvulaires, etc. L"investigation précise de l"étiologie est importante pour permettre un traitement optimal en fonction de cette étiologie. Les données épidémiologiques ont suggéré que des facteurs biologiques pouvaient être associés à l"augmentation du risque de développer une pathologie cardiovasculaire. Parmi ceux-ci, un intérêt croissant a été porté sur de niveaux élevés d"homocystéine dans le plasma (hyperhomocystéinémie). Les premières observations cliniques ayant permis d"évoquer un lien entre hyperhomocystéinémie et maladies cardiovasculaires furent celles de jeunes adultes présentant une hyperhomocystinurie héréditaire. Ces malades qui ont des teneurs plasmatiques d"homocystéine très élevées présentent fréquemment des accidents vasculaires thromboemboliques liés à une athérosclérose précoce. Depuis une dizaine d"années, les très nombreux travaux expérimentaux et cliniques qui ont tenté de préciser les relations existant entre hyperhomocystéinémie modérée et survenue des maladies cardiovasculaires, tendent à montrer qu"une élévation modérée de l"homocystéinémie est un facteur de risque indépendant pour la survenue d"accidents cardiovasculaires d"origine ischémique. Dans notre laboratoire nous avons montré une association entre l"hyperhomocystéinémie modérée et la dysfonction systolique ventriculaire gauche (DSVG) et plus spécifiquement avec la fraction d"éjection ventriculaire gauche chez 709 patients. L"analyse de régression multiple confirme l"association significative de l"Hcy avec la fraction d"éjection ventriculaire gauche (FEVG). Cela peut expliquer le rôle néfaste de l"homocystéine dans les maladies cardiovasculaires, mais on ne sait toujours pas si l"homocystéine est la cause ou la conséquence de cette maladie. Pour répondre à cette question, nous avons mis en œuvre un modèle de rates adultes présentant une hHcy modérée à cause d"une carence en donneurs de méthyles (vitamines B12, folates et choline) avant la gestation. Ces micronutriments participent à la régulation de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme de l"homocystéine. Afin de se placer dans un contexte physiopathologique proche à la situation clinique évaluée, nous avons choisi d"alimenter les rates avec un régime carencé un mois avant accouplement en le maintenent jusqu"au sevrage de la portée pour comparer les répercutions du régime au niveau myocardique. L"articles publiés en rapport avec ce travail de thèse a 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 l"insuffisance cardiaque.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une exposition des données bibliographiques relatives au sujet de cette thèse. La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes mis en place afin de répondre aux questions posées dans ce projet. Enfin, la dernière partie de ce manuscrit consiste en la présentation et la discussion des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Les travaux effectués durant mon doctorat ont donné lieu aux publications et aux communications suivantes :

Publications :

Article 1

ATHEROSCLEROSIS

Novembre 2010

Homocysteine and ApoA-I are interacting determinants of Ankle Brachial Index in an Ambulatory Elderly Population

Guéant-Rodriguez Rosa Maria,* Spada Rosario,* **Moreno-Garcia Maira,*** Anello Guido, Bosco Paolo, Lagrost Laurent, Romano Antonino, Elia Maurizio, Guéant Jean-Louis

* Contribution égale

Article 2

JOURNAL OF PAHTOLOGY

Février 2011

Methyl Donor Deficiency produces a Cardiomyopathy Related to Imbalanced Methylation/Acetylation of PGC-1α by PRMT1 and SIRT1 in the Rat

Short title: Cardiomyopathy of Methyl Donor Deficiency

Moreno Garcia Maira,* Guéant-Rodriguez Rosa-Maria,* Pooya Shabnam,* Brachet Patrick, Alberto Jean-Marc, Jeannesson Elise, Maskali Fathia, Gueguen Naig, Marie Pierre-Yves, Lacolley Patrick, Herrmann Markus, Juillière Yves, Malthiery Yves, Guéant Jean-Louis.

* Contribution égale

Communications affichées :

- Guéant-Rodriguez Rosa-Maria, **Moreno Garcia Maira**, Brachet Patrick, Alberto Jean-Marc, Jeannesson Elise, Maskali Fathia, Pooya Shabnam, Gueguen Naig, Marie Pierre-Yves, Lacolley Patrick, Herrmann Markus, Juillière Yves, Malthiery Yves, MD, DSc4, Guéant Jean-Louis. Cardiomyopathy Related to PPARα-Impaired Mitochondrial Fatty Acid Oxidation in Hyperhomocysteinemic Rats Deprived in Methyl Donors. **5th Santorini Conference, Santorini Grèce (2010)**

- **M Moreno**, RM Guéant-Rodriguez, JM Alberto, F Maskali, R Guieu, Jullière Y, JL Guéant L. Effets moléculaires et tissulaires sur le myocarde et sur la fonction systolique de la carence en donneurs de méthyles au cours de la gestation et de l"allaitement chez le raton. 36ème forum des jeunes chercheurs : Interactions biologiques de la molécule à la cellule. **Nancy France (2009).**

- Gueant-Rodriguez RM, R.S. Spada RS, Anello G, Bosco P, **Moreno-Garcia MA**, Gueant JL. Homocysteine is an independent predictor of Apo A-1 and of peripheral arterial disease in an eldery population. **ESC Congress Barcelona - Spain (2009).**

Communications Orales :

Moreno M, Guéant-Rodriguez RM, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Marie PY, Guéant JL. Myocardial hypertrophy related with impaired synthesis of carnitine, in pups of dams deprived in methyl donors. 7th International conference on homocysteine metabolism. **Prague, Czech Republic (2009).**

Moreno M, Guéant-Rodriguez RM, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Marie PY, Guéant JL. Altération du métabolisme lipidique dans le tissu myocardique de ratons de 21 jours, carencés en donneurs de méthyles au cours de l"allaitement. 26e congrès annuel groupe de réflexion sur la recherche cardiovasculaire. Palais des congrès**, Nancy France (2009)**.

Moreno M, Guéant-Rodriguez RM, Alberto JM, Jullière Y, Guéant JL. Effets moléculaires et tissulaires sur le myocarde et sur la fonction systolique de la carence en donneurs de méthyles au cours de la gestation et de l"allaitement chez le raton. Journée Claude Huriet de la Recherche Médical. Nancy France (2008).

Moreno M, Guéant-Rodriguez RM, Alberto JM, Jullière Y, Guéant JL. Effets moléculaires et tissulaires sur le myocarde et sur la fonction systolique de la carence en donneurs de méthyles au cours de la gestation et de l"allaitement chez le raton. Journée Claude Huriet de la Recherche Médical. **Nancy France (2007).**

Moreno-Garcia M, Fermin G, Cedeňo L Caractérisation de *Phytophthora infestans* à travers des analyses aloenzymatiques. **Université de Los Andes (2005**).

Donnees bibliographiques

1. L'insuffisance cardiaque

L"insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome complexe, dans lequel une anomalie de la fonction cardiaque est responsable de l"incapacité du cœur à satisfaire les demandes tissulaires. C"est une maladie qui implique des manifestations périphériques par activation neurohormonale et un dysfonctionnement du myocarde (systolique, diastolique et électrique). Le syndrome de L'IC se caractérise par une progression inexorable de la maladie et du remodelage cardiaque. Les éléments essentiels du remodelage incluent une période d"hypertrophie des cardiomyocytes suivie d"une phase de réduction absolue du nombre des cellules [1]. Le syndrome clinique d"insuffisance cardiaque se caractérise ainsi par:

- des signes de dysfonction cardiaque (par ex. diminution de la fraction d"éjection, accroissement de la taille des cavités, forme de flux diastolique anormale, remodelage du ventricule gauche).
- augmentation de la pression de remplissage diastolique, diminution du volume-minute cardiaque.
- des signes cliniques d"insuffisance cardiaque (par ex. stase pulmonaire, reflux hépatojugulaire positif, hépatomégalie, oedèmes péri-malléolaires).

La New York Heart Association (NYHA) a établi une classification clinique pratique du degré de sévérité de l"insuffisance cardiaque selon le degré de dyspnée :

Classe **NYHA I** : absence de dyspnée

Classe **NYHA II** : asymptomatique au repos et la dyspnée et/ou fatigue apparaît lors des efforts les plus intenses entraînant une limitation modérée des activités.

Classe **NYHA III** : les symptômes surviennent lors des efforts de la vie courante avec limitation importante de l'activité physique

Classe **NYHA IV** : incapacité d'effectuer toute activité. Dyspnée de repos

1.1. Classifications de l'insuffisance cardiaque

On distingue schématiquement l"insuffisance cardiaque gauche, droite et globale. L"insuffisance cardiaque gauche est la plus fréquente. A droite comme à gauche, l"insuffisance cardiaque concernt surtout les ventricules.

1.1.1. Mécanismes de l'insuffisance ventriculaire

L"nsuffisance ventriculaire peut être la conséquence d"une maladie intrinsèque du muscle cardiaque (myocardiopathies), d"une diminution de la contractilité, de l"amputation de la masse contractile comme après un infarctus du myocarde, d"une diminution primitive de la distensibilité diastolique du ventricule gauche comme par exemple en cas d"infiltration massive par de la fibrose dans les suites d"une surcharge mécanique du ventricule. En règle générale l"insuffisance ventriculaire est alors l"aboutissement plus au moins lointain d"une surcharge mécanique temporairement compensée. En effet, un ventricule peut en général s"adapter, parfois pour longtemps, à une surcharge mécanique de pression ou de volume. On distingue les insuffisances ventriculaires systoliques et diastoliques.

1.1.1.1. Fonction ventriculaire systolique

La tâche fondamentale du système cardiovasculaire est la perfusion sanguine adéquate des organes. La fonction complexe du cœur est la résultante de caractéristiques myocardiques, d"influences veineuses centrales, de facteurs humoraux, du volume sanguin circulant et de la résistance vasculaire périphérique. Un déterminant essentiel de la fonction cardiaque est la fonction ventriculaire systolique, qui est régulée par 4 mécanismes:

- la fréquence cardiaque
- la précharge (mécanisme de Frank STARLING)
- la contractilité
- la post-charge.

Ces 4 mécanismes permettent au cœur d"adapter le fonctionnement ventriculaire en fonction des besoins changeants des organes périphériques et permettent aussi de maintenir la perfusion des organes lors d"une dysfonction ventriculaire.

1.1.1.2. Fonction ventriculaire diastolique

La fonction ventriculaire diastolique joue un rôle grandissant dans l"estimation globale de la fonction cardiaque. Elle influence aussi bien la pré que la post-charge. Un déterminant essentiel des propriétés diastoliques est la structure du myocarde, dont les caractéristiques conditionnent de manière déterminante la fonction ventriculaire diastolique. L"accroissement du tissu cicatriciel conjonctif après infarctus entraîne par exemple une diminution de l"élasticité du myocarde et une augmentation de la pression de remplissage diastolique, et ainsi, finalement, une stase pulmonaire. La fonction ventriculaire diastolique est aussi influencée par la perfusion du myocarde (ischémie) et le comportement de remplissage du ventricule droit (interaction ventriculaire). En résumé, la dysfonction diastolique peut être définie ainsi : signes cliniques d"insuffisance cardiaque, fonction ventriculaire systolique conservée ou modérément diminuée et augmentation de la pression de remplissage diastolique, ainsi que signes de remplissage diminués et augmentation de la rigidité de la paroi. Une dysfonction diastolique est observée typiquement chez les patients âgés avec une hypertrophie gauche consécutive à des années d"hypertension arterielle systémique. Jusqu"à 40 % des patients avec une insuffisance cardiaque chronique ont une dysfonction diastolique. Une complication typique de la dysfonction diastolique est la survenue d"une fibrillation auriculaire, due à l"accroissement de la pression de remplissage diastolique, la dilatation consécutive de l"oreillette gauche et une hypertension pulmonaire secondaire. Du point de vue clinique, la diastole est divisée en trois phases:

- la phase de relaxation isovolumétrique.
- la phase de remplissage ventriculaire diastolique, avec une première phase de remplissage rapide et une deuxième phase mésodiastolique de remplissage lent (diastase).
- la phase de contraction des oreillettes.

1.2. Mécanismes d'adaptation de l'insuffisance ventriculaire gauche.

Au cours de l"évolution d"une insuffisance ventriculaire gauche, toute une série de mécanismes compensateurs, artériels et périphériques, neurohormonaux et métaboliques, vont intervenir. Ces mécanismes d"adaptation peuvent être séparés en :

- Mécanismes d"adaptation précoces, faisant suite à l"installation d"une insuffisance ventriculaire.
- Mécanismes d"adaptation retardés, observés dans l"insuffisance ventriculaire chronique.

1.2.1. Mécanismes d'adaptations précoces :

1.2.1.1.Stimulation neurohormonale :

Il s"agit essentiellement de la stimulation adrénergique; elle a une triple action : l"action chronotrope positive est responsable d"une accélération de la fréquence sinusale qui contribue au maintien du débit cardiaque au regard d"un volume systolique diminué, l"augmentation de la contractilité par stimulation noradrénergique permet l"augmentation du volume systolique et la stimulation sympathique entraîne également une vasoconstriction artériolaire qui a pour double but, de maintenir une pression aortique suffisante à la vascularisation essentiellement coronaire et cérébrale et de distribuer les débits systémiques.

1.2.1.2. Dilatation du ventricule gauche :

Dénommé régulation hétérométrique de Frank STARLING ou réserve de précharge, elle correspond à l"augmentation de la force de contraction de sarcomères secondaires à leur étirement.

1.2.2. Mécanismes d'adaptation retardés :

1.2.2.1. Remodelage ventriculaire gauche :

Le remodelage ventriculaire gauche correspond aux modifications de la masse et de la géométrie du ventricule gauche qui s"observent dans l"insuffisance ventriculaire gauche chronique. Il s"agit d"un mécanisme spécifique d"adaptation, compensateur d"une insuffisance ventriculaire gauche pour lequel les mécanismes initiateurs persistent. L"augmentation de la masse ventriculaire gauche et les modifications conjointes de sa géométrie constituent pour le ventricule gauche, un mécanisme d"adaptation et une surcharge mécanique de pression ou de volume. Dans les surcharges mécaniques, la finalité de ce remodelage est de permettre un accroissement du travail cardiaque tout en maintenant normales les contraintes développées. Dans les surcharges dites de pression, l"hypertrophie de type concentrique, c"est-à-dire avec une augmentation prédominante de l"épaisseur et une augmentation du rapport épaisseur/rayon est secondaire à une multiplication de sarcomères en parallèle aboutissant à des myocytes plus épais mais pas nécessairement plus longs. Dans les surcharges de volume, la multiplication de sarcomères se fait plus en série qu"en parallèle aboutissant à des myocytes plus longs qu"épais.

1.2.2.2. Modifications neurohormonales :

L"insuffisance cardiaque chronique s"accompagne d"une hyperactivité de divers systèmes neurohormonaux globalement corrélée au degré d"insuffisance. Il existe un déséquilibre entre les systèmes vasodilatateurs et vasoconstricteurs avec classiquement une activation plus précoce des systèmes vasodilatateurs.

- L"activation noradrénergique se poursuit tout au long de la maladie. A terme elle perd son efficacité quand la réserve contractile est virtuelle du fait de la raréfaction myocytaire et quand la réponse chronotrope est altérée du fait d"une réduction du nombre et /ou de la sensibilité des β-récepteurs adrénergiques myocardiques. La vasoconstriction artérielle systémique augmente la post-charge cardiaque, le travail ventriculaire et peut donc favoriser l"épuisement myocardique.
- Les peptides natriurétiques, peptide natriurétique auriculaire (ANF) et peptide natriuretic de type B, (BNP) sont augmentés précocement dans l"histoire naturelle de la maladie. Ils ont une action vasodilatrice et natriurétique. Leur stimulus est essentiellement l"augmentation de distension des oreillettes, mais également de façon plus tardive pour l"ANF et plus spécifiquement pour le BNP.
- L"activité du système rénine angiotensine-aldostérone est cyclique. Elle est marquée à chaque poussée congestive de la maladie et dans l"insuffisance cardiaque terminale. L"augmentation de la rénine plasmatique entraîne une augmentation de la formation de l"angiotensine-II à partir de l"angiotensine-I. L"angiotensine-II a des actions nombreuses et encore incomplètement connues. Elle est en particulier responsable d"une vasoconstriction artérielle et de la sécrétion d"aldostérone. L"angiotensine-II agit également sur la réactivité de micro-vaisseaux coronaires, facilite la transmission nerveuse sympathique, favorise l"hypertrophie de cellules musculaires lisses et des myocytes.
- L"endothéline, vasoconstricteur très puissant sécrété par les cellules endothéliales est augmentée dans l"insuffisance cardiaque chronique et semble être un très puisant facteur pronostique.
- De nombreuses autres substances neurohormonales sont augmentées dans l"insuffisance cardiaque.

Les catécholamines, l"angiotensine-II, l"endothéline et l"aldostérone sont associées à l"action de divers facteurs de croissance et aux cytokines d"origine myocardique (FGF : fibroblast growth factor, NGF : Nerve growth factor, PDGF : platelet derived growth factor, TGF-β : Transforming growth factor, IGF-1 : Insulin-like growth factor-1, CT : Cardiotrophine, LIF : Leukemia inhibitory factor, IL-6 : Interleukina-6, etc.) [2]. Ces signaux activent des innombrables voies intracellulaires de transduction du signal (encore appelées "Cascades") qui permettent à autant de facteurs d"exercer leur influence sur les régions promotrices des gènes (pour ce qui des facteurs de transcription) ou au niveau de la transduction. Ces voies de signalisation ont été particulièrement étudiées chez la souris en utilisant un modèle de sténose de l"aorte thoracique. Dans ce modèle, le stress biomécanique entraîne une hypertrophie du ventricule gauche qui s"accompagne de l"activation de voies de

signalisation lesquelles aboutissent à un phénotype associant divers degrés de dysfonction contractile, d"apoptose et de remodelage moléculaire du myocyte et de fibrose interstitielle [3] . Les premières voies identifiées impliquent les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines Gαq/α11 actives, entre autres la PKC (protéine-kinase C) et les voies de MAP-Kinases (Mitogen-activated protein-kinase) [4]. Les autres principales voies de signalisation responsable d"un remodelage délétère sont les voies activées de manière encore largement incomprise, par le Ca^{2+} intracellulaire : voie de la calcineurine et du facteur de transcription NFAT et la voie de la kinase activée par le couple Ca^{2+}-calmoduline (CaMKII). Ces voies sont activées dans le modèle d"infarctus du myocarde plus au stade de l"insuffisance cardiaque qu"au stade d"hypertrophie compensée [5]. Leur activation, associée à divers degrés de stress oxydatif et d"apoptose des myocytes, aboutit à une diminution du nombre des myocytes, une hypertrophie et une déstructuration des myocytes restants, la réexpression du programme génique fœtal et une fibrose interstitielle importante.

2. Facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires.

Les nombreuses études ont permis d'identifier les principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, ces facteurs peuvent se classer en deux grands types :

- facteurs **«non modifiables»**, l'âge et le sexe masculin et les antécédents familiaux de cardiopathie ischémique précoce
- facteurs "**modifiables"**, l"hypertension, l"hypercholestérolémie, le diabète, l"obésité et le tabagisme.

Les données épidémiologiques recueillies au cours de ces trente dernières années ont suggéré que d"autres facteurs biologiques pouvaient être associés à l"augmentation du risque de développer une pathologie cardiovasculaire. Parmi ceux-ci, un intérêt croissant a été porté sur des taux élevés d"homocystéine dans le plasma (**hyperhomocystéinémie**). Les premières observations cliniques ayant permis d"évoquer un lien entre hyperhomocystéinémie et maladies cardiovasculaires furent celles de jeunes adultes présentant une homocystinurie héréditaire [6,7]. Ces malades qui ont des teneurs plasmatiques d"homocystéine très élevées présentent fréquemment des accidents vasculaires thromboemboliques ou liés à une athérosclérose précoce. Depuis une dizaine d"années, les très nombreux travaux expérimentaux et cliniques qui ont tenté de préciser les relations existant entre hyperhomocystéinémie modérée et survenue des maladies cardiovasculaires, tendent à montrer qu"une élévation modérée de l"homocystéinémie est un facteur de risque indépendant pour la survenue d"accidents cardiovasculaires d"origine ischémique [8,9].

2.1. Origine et métabolisme de l'homocystéine

L"homocystéine est un acide aminé soufré découvert en 1933 par Du VIGNEAUD, qui n"est pas incorporé dans la structure des protéines, mais qui constitue un intermédiaire important dans la fonction de donneur du groupe méthyle de la méthionine et dans le métabolisme de la méthionine vers les autres acides aminés soufrés comme la cystéine. L"homocystine constitue la forme dimérique oxydée (pont disulfure) de l"homocystéine présente de manière permanente dans les milieux biologiques, car l"oxydation est spontanée et rapide (Figure.1). Dans le plasma humain, environ 70–80 % de l"homocystéine est liée aux protéines, principalement l"albumine.

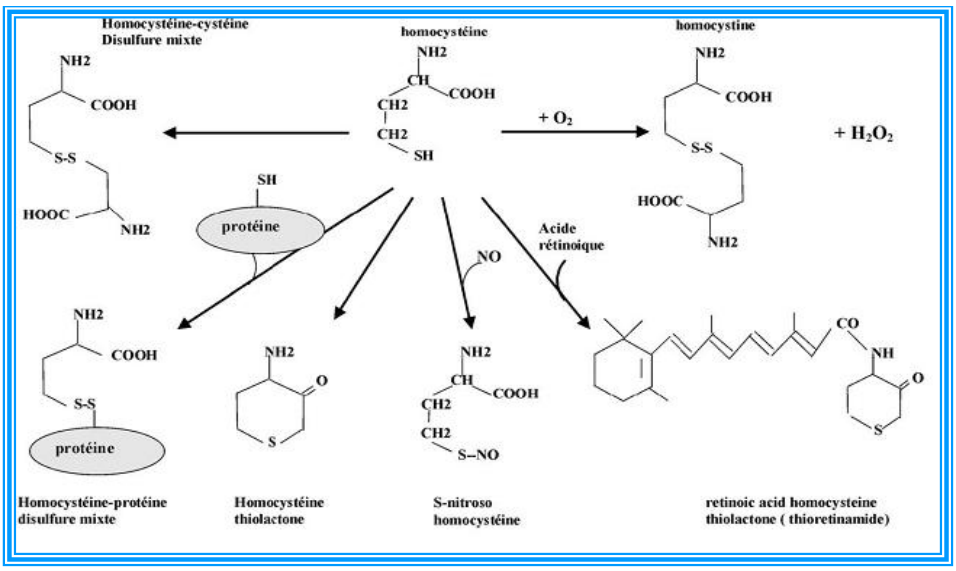


Figure 1. Homocystéine et formules chimiques de la même (d"après Selhub, J. 1999)

2.2. Voies de Synthèses

L"homocystéine est formée par la voie enzymatique de synthèse de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM), un très important donneur de méthyle dans de nombreuses réactions biochimiques. L"homocystéine formée est soit catabolisée en cystathionine soit reméthylée en méthionine. La reméthylation de l"homocystéine est catalysée par la méthionine synthase (MTR) qui requiert le 5-méthyltétrahydrofolate comme donneur de méthyle et la vitamine B12 comme cofacteur. La formation du 5-CH_3THF dépend de la N5,10 méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) qui catalyse la réduction du 5,10-CH_2THF formé à partir du THF. Une voie parallèle de reméthylation indépendante des folates et de la cobalamine, utilise la conversion de la bétaïne en N, N-diméthylglycine sous l"action de la Bétaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT), principalement dans le foie. Cette voie permet de maintenir une concentration tissulaire en méthionine à un niveau suffisant pour assurer la synthèse de la SAM en cas d"une déficience en

folates. La S-adénosylhomocystéine (SAH), formée dans les réactions de transméthylation, est ensuite hydrolysée en homocystéine, qui devient disponible pour démarrer un nouveau cycle de transfert de méthyle. L"hydrolyse de la SAH est une réaction réversible, préférentiellement orientée vers la synthèse de SAH et des concentrations cellulaires élevées de SAH précédent et accompagnent toutes les formes d"hyperhomocystéinémie. Dans la voie de transsulfuration, l"homocystéine se condense avec la sérine pour donner la cystathionine sous l"action de la cystathionine-β-synthase, dépendant du pyridoxal 5"-phosphate (PLP), la forme active de la vitamine B6. La cystathionine est ensuite hydrolysée en cystéine et α-cétobutyrate par une enzyme dépendant du PLP, la c-cystathionase (Figure.2)

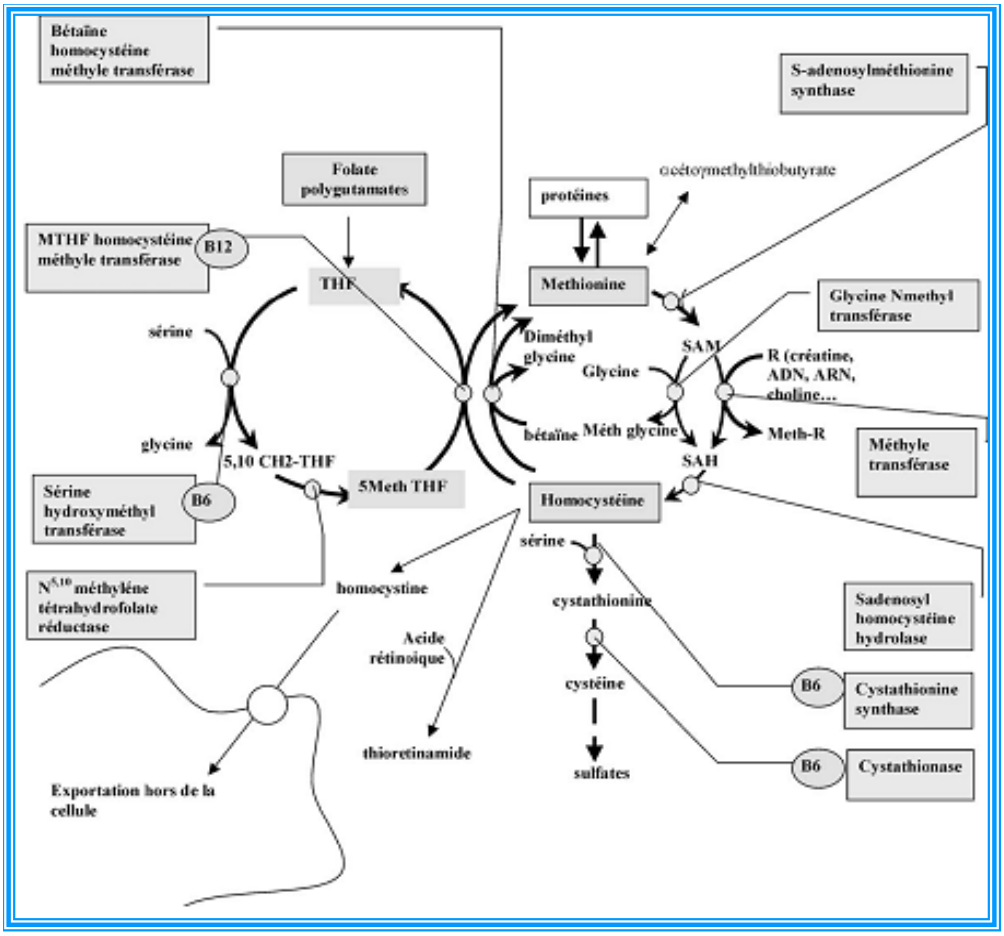


Figure 2. Métabolisme de l"homocystéine (d"après Selhub, J. 1999)

Dans les cellules myocardiques la synthèse de homocystéine est très particulière puisque les cellules myocardiques n"expriment ni l"enzyme principale de son catabolisme (cystathionine-ß-synthase) ni l"enzyme de la voie de reméthylation alternative (Bétaïne homocystéine méthyltransférase). Dans ces conditions, la reméthylation catalysée par la méthionine synthase dépendante de folate et de la vitamine B12, est la seule voie qui peut métaboliser l"homocystéine

dans les cardiomyocytes. C"est-à- dire, les cellules myocardiques pourraient être particulièrement sensibles à la cytotoxicité de l"homocysteine.

2.3. Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine

Les études sur la régulation du métabolisme de l"homocystéine ont montré que l"orientation de l"homocystéine vers la voie de la reméthylation ou de la transsulfuration est sous le contrôle de la disponibilité en méthionine et de SAM. La synthèse *de novo* de la méthionine dépend de la teneur de la ration en groupements méthyle labiles (méthionine, choline) [10,11]. Lorsque l"apport en méthionine est normal, la molécule d"homocystéine est recyclée environ deux fois par la voie de reméthylation avant d"être catabolisée par la voie de transsulfuration. Lorsque l"apport en méthionine diminue de moitié, le nombre de cycles par molécule d"homocystéine augmente deux fois. À l"inverse, lorsque l"apport en méthionine augmente, l"homocystéine utilise principalement la voie de la transsulfuration. La capacité de l"organisme à adapter l"utilisation de l"homocystéine en fonction de l"apport en méthionine implique l"existence d"une régulation commune aux deux voies. Les données expérimentales obtenues principalement par la mesure *in vitro* de l"activité des enzymes suggèrent que cette coordination est réalisée par au moins deux mécanismes. Le premier mécanisme dépend de la capacité de la SAM à inhiber la MTHFR et à activer la cystationine-β-synthase. La SAM bloque donc la synthèse du N-5 méthyltétrahydrofolate nécessaire à la reméthylation de l"homocystéine et favorise la réaction initiale de la transsulfuration. La concentration intracellulaire de la SAM détermine de ce fait le destin métabolique des molécules d"homocystéine. Le second mécanisme dépend de la régulation de la concentration intracellulaire de SAM. Les deux enzymes qui catalysent la synthèse de la SAM (MAT1 et MAT2) présentent une affinité différente pour la méthionine. La première, de poids moléculaire élevé, présente une affinité importante pour la méthionine en fonction des conditions physiologiques ; la seconde, de poids moléculaire plus bas, a une affinité faible pour la méthionine et ne fonctionne de ce fait qu"en présence d"apports élevés en méthionine. Toute variation de la teneur intracellulaire de méthionine modifie donc le taux de synthèse de la SAM. L"utilisation de la SAM est régulée spécifiquement par une réaction dans laquelle son groupement méthyle est transféré sur le groupement aminé de la glycine pour donner la méthylglycine ou sarcosine. Cette réaction est catalysée par la glycine-N-méthyltransférase (GNMT) très abondante dans le foie et inhibée par le N-5- méthyltétrahydrofolate [12], de telle sorte que les folates régulent la teneur intracellulaire de la SAM. Lorsque l"apport en méthionine est élevé, l"enzyme de faible poids moléculaire va catalyser rapidement la transformation de la méthionine en SAM. L"augmentation de la concentration intracellulaire de la SAM va résulter en :

- une inhibition de la MTHFR et de ce fait en un blocage de la synthèse du N5-CH3THF qui entraîne l"activation de la GNMT.
- l"activation de la cystathionine-β-synthase.

À l"opposé, lorsque l"apport de méthionine est faible, la concentration intracellulaire de SAM n"est pas suffisante pour inhiber la MTHFR et, la concentration du N5-CH3THF augmente de telle sorte que la GNMT est inhibée. La voie de reméthylation est donc favorisée d"autant plus que la concentration de la SAM est trop basse pour stimuler la cystathionine-β-synthase. Le Km de la MS pour Hcy est environ 50 µM tandis que celui de CBS est environ 5 mM (100 fois plus haut). A faible concentration d"Hcy c"est la MS qui fixe le substrat, quand Hcy augmente, c"est la CBS qui prend le relais.

2.4. Devenir métabolique de l'homocystéine

L"homocystéine peut non seulement s"oxyder en homocystine mais aussi former des disulfures mixtes avec la cystéine ou d"autres acides aminés soufrés, ou s"oxyder en se cyclisant en thiolactone grâce à l"action d"une paroxonase. Ces dérivés oxydés sont éliminés par voie urinaire. Dans le plasma sanguin, l"homocystéine est retrouvée en très petite quantité sous forme réduite et en plus grande quantité sous forme oxydée d"homocystine, de disulfure mixte avec la cystéine, et majoritairement sous forme de disulfure conjugué aux groupes thiols des protéines principalement l"albumine [13]. La fixation de l"homocystéine sur les thiols protéiques se fait en compétition avec la cystéine plasmatique. Une partie importante de l"homocystéine est métabolisée en cystathionine et transformée en cystéine puis en sulfates. Une autre partie de l"homocystéine est oxydée en acide homocystéique et acide homocystéine sulfinique. Une très faible partie est transaminée en un acide cétonique, l"acide α-céto-méthylthiobutyrique (Figure.1).

2.5. Pathogenèse de l'hyperhomocysteinémie

L"hyperhomocystéinémie est multifactorielle et peut résulter d"un défaut génétique des enzymes clés du cycle de l"homocystéine, d"une déficience en une ou plusieurs vitamines du groupe B et des autres causes comme certaines pathologies (insuffisance rénale) ou la prise de certains médicaments qu"interférent avec le cycle des folates.

2.5.1. Altération de la synthèse du N5-CH3 THF

La synthèse de la méthionine dépend directement de la disponibilité en N5-méthyltétrahydrofolate. Une altération de la synthèse de ce vitamère du fait soit d"un apport insuffisant de folates soit d"une diminution de l"activité de la MTHFR freine la synthèse de la méthionine. L"homocystéine qui devait être reméthylée est donc orientée vers la voie de la transsulfuration. Mais cette voie ne peut prendre en charge la totalité de l"homocystéine pour deux raisons : l"inhibition de la synthèse de la méthionine conduit à une chute de la concentration intracellulaire de la SAM ; le manque de N5- CH3THF permet à la GNMT d"être active de manière optimale de telle sorte que la concentration de la SAM diminue encore et que la synthèse de l"homocystéine est stimulée. La voie de transsulfuration devient inefficace car la concentration de SAM est trop basse et l"homocystéine s"accumule dans les cellules. L"homocystéine non métabolisée se diffuse dans le compartiment plasmatique et s"y accumule.

2.5.2. Altération de la reméthylation de l'homocystéine

Dans le cas d"une altération de la voie de reméthylation de l"homocystéine soit à cause d"une carence en vitamine B12 ou d"un défaut des enzymes synthétisant la méthylcobalamine, les conséquences sont différentes de celles observées lorsque la synthèse du N5-CH3THF est bloquée. Selon l"hypothèse du piège à méthyle, le N5-CH3THF s"accumule lorsque la voie de reméthylation est bloquée. De ce fait, bien que la synthèse de la SAM diminue, les concentrations intracellulaires de la SAM sont peu affectées car l"augmentation de la concentration intracellulaire du N5-CH3THF réduit l"utilisation de la SAM dans la voie de méthylation de la glycine. De ce fait, une plus petite quantité d"homocystéine sera synthétisée à partir de la SAM et la cystathionine-β-synthase sera activée. La voie de transsulfuration étant plus active que dans le cas précédent l"hyperhomocystéinémie devrait être moins sévère.

2.5.3. Cas de la transsulfuration défectueuse de l'homocystéine

Aucun métabolite formé par la voie de la transsulfuration n"affecte directement la voie de reméthylation. Cependant, lorsque la première voie est défectueuse comme dans le cas d"un déficit homozygote de la cystathionine-β-synthase, l"homocystéine est métabolisée en plus grande proportion par la voie de reméthylation. La synthèse de la méthionine est stimulée et la concentration de la SAM dans les cellules augmente jusqu"à ce qu"elle soit suffisamment élevée pour inhiber la MTHFR et ainsi bloquer la voie de reméthylation. Il s"ensuit alors une accumulation de l"homocystéine conduisant à une hyperhomocystéinémie sévère. Lorsque la voie de transsulfuration fonctionne encore en partie comme dans le cas d"un déficit hétérozygote de la cystathionine-β-

synthase ou d"une carence en vitamine B6, la voie de reméthylation et la voie de transsulfuration métabolisent normalement l"homocystéine tant que la quantité d"homocystéine à prendre en charge est faible. La charge métabolique d"homocystéine est faible lorsque l"entrée de méthionine dans la cellule est limitée. C"est le cas du jeûne. En revanche, à la suite d"un apport de méthionine, la concentration intracellulaire de SAM augmente et (1) la synthèse du N5-méthylTHF est inhibée entraînant le blocage de la voie de reméthylation ; (2) l"activité de la GNMT est maximale résultant en une production accrue d"homocystéine issue de l"hydrolyse de la SAH, provenant elle-même de la transméthylation de la SAM sur la glycine. Dans ces conditions, l"homocystéine s"accumule et une hyperhomocystéinémie est observée.

2.6. Preuves expérimentales

Chez le rat, la carence en folates et en vitamines B12 résulte en une augmentation très significative de l"homocystéine [14]. Chez les rats carencés en vitamine B6, l"homocystéinémie mesurée à jeun n"augmente pas [15]. Lorsque les animaux sont gavés par la méthionine, l"homocystéinémie et la teneur du foie en SAM augmentent significativement [12]. Chez le rat carencé en folates un apport de méthionine n"entraîne pas d"augmentation de l"homocystéinémie [16].

2.7. Étiologie des hyperhomocystéinémies selon le taux sanguin

L"hyperhomocystéinémie peut être classée en fonction de sa cause, de sa prévalence et de sa sévérité. Les cas les plus sévères (hHcy totale > 100 µmol/l) sont dus à un déficit des gènes codant pour la cystathionine-β-synthase bien que des mutations homozygotes des gènes codant pour d"autres enzymes puissent résulter en une hyperhomocystéinémie modérée. L"hyperhomocystéinémie modérée est la forme la plus fréquente ; elle est liée à une mutation du gène codant pour les enzymes clés du métabolisme de l"homocystéine et/ou d"un statut inadéquat en folates, vitamines B6 et B12. L"existence d"une relation inverse entre le statut en folates et l"homocystéinémie fut mise en évidence pour la première fois en 1988 [17]. D"autres auteurs ont montré d"une part une relation inverse entre homocystéine et teneurs plasmatiques des folates ou de la vitamine B12 et d"autre part l"efficacité d"une supplémentation vitaminique pour diminuer l"homocystéinémie [18–25]. Tout défaut affectant l"expression des gènes codant pour les enzymes-clés du métabolisme de l"homocystéine peut générer une augmentation de l"homocystéinémie. Les principales anomalies concernent le gène de la MTHFR [26]; le polymorphisme de ce gène a été identifié: il s"agit d"une substitution *677C>T*. Plus récemment, les mutations *2756A>G* de la méthionine synthase [27] et *66A>G* de la méthionine synthase réductase [28] ont été identifiées comme

des facteurs de risque d"une hyperhomocystéinémie. L"impact du polymorphisme de la MTHFR sur l"homocystéinémie dépend du statut en folates. Lorsque la folatémie est élevée (> 15,4 µmol/l) aucune interaction entre la mutation de la MTHFR et l"homocystéinémie n"est observée [29]. À l"inverse, chez les sujets dont la folatémie est basse, l"homocystéinémie est plus élevée chez les homozygotes que chez les sujets avec un génotype normal [29]. Une telle interaction a été confirmée par d"autres. La diminution de l"activité de la MTHFR résulte en un manque de N5-méthylTHF ; ce manque, à l"origine de l"accumulation de l"homocystéine, a aussi pour conséquence une réduction de la disponibilité en groupements méthyles indispensables dans les réactions de méthylation dépendantes de la SAM. D"un autre côté, l"augmentation du taux du méthylènetétrahydrofolate résulte en une plus grande disponibilité en groupements monocarbonés nécessaires à la synthèse du thymidilate. La MTHFR joue donc un rôle pivot en orientant les folates soit vers la synthèse de la SAM soit vers la synthèse d"ARN et d"ADN. L"homocystéinémie augmente aussi avec l"âge et est plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Une hyperhomocystéinémie est aussi associée à une altération de la fonction rénale, une créatininémie élevée, au tabagisme, à la consommation de café, à l"alcoolisme et à la prise de plusieurs médicaments qui interfèrent avec le cycle des folates tels que la L-DOPA, le méthotrexate, ceratins antipaludiques et l"oxyde nitreux [30].

2.8. Mécanismes de la pathogénicité de l'hyperhomocystéinémie

Les désordres du métabolisme aboutissant à un excès d"homocystéine sont associés à de nombreux risques pathogènes : athérogenése, néoplasie, vieillissement, etc. Plusieurs mécanismes expliquent le danger présenté par une hyperhomocystéinémie dans l"organisme.

2.8.1. Effets biochimiques de l'hyperhomocystéinémie

2.8.1.1. Production d'un stress oxydant

L"homocystéine, bien que disposant d"un groupement thiol réducteur, possède paradoxalement des propriétés pro-oxydantes qui ont été passées en revue par Olszewski [31]. L"oxydation de l"homocystéine en homocystine libère du peroxyde d"hydrogéne, H_2O_2. Le groupe thiol de l"homocystéine se lierait aussi aux ions ferreux ou cuivreux pour former un mélange oxydant générant H_2O_2. Ce complexe participe à l"inactivation des systèmes enzymatiques. La forme cyclique de l"homocystéine, l"homocystéine thiolactone, est oxydée en sulfate par un processus mettant en jeu l"ascorbate, le thiorétinamide (produit de conjugaison entre l"homocystéine et l"acide rétinoïque) et le superoxyde, sous contrôle de la thyroxine et de l"hormone de croissance. L"hormone de croissance stimule la production de sulfates à partir de l"homocystéine thiolactone [32]. L"homocystéinémie est

plus élevée chez les patients hypothyroïdiens que chez les sujets ayant une fonction thyroïdienne normale [33]. Une carence en thiorétinaco mitochondrial, un produit de la réaction entre cobalamine, homocystéine et acide rétinoïque, est associée à une formation excessive d"espèces radicalaires dans les cellules malignes et sénescentes. L"homocystéine entraîne une baisse des ARN messagers et de l"activité de la glutathion peroxydase des cellules endothéliales, augmentant ainsi la teneur intracellulaire en H_2O_2 mais aussi en peroxydes organiques et en peroxynitrite qui sont habituellement détruits par la glutathion peroxydase [34]. Le stress oxydant induit par l"homocystéine peut être mis en évidence sur différents modèles cellulaires. Ainsi la potentialisation par l"homocystéine de la toxicité de la protéine amyloïde, qui induit l"apoptose de cellules de neuroblastome humain différenciées SH-SY-5Y, est entièrement supprimée par les antioxydants tels que la vitamine E et la N-acétyl-cystéine [35].

2.8.1.2. Production et métabolisme du NO

L"exposition de cellules endothéliales en culture à de l"homocystéine a un effet biphasique sur la production de monoxyde d"azote (NO). Dans un premier temps, on observe un relâchement de NO, de S-nitrosothiols et de S-nitrosohomocystéine, puis la poursuite de l"exposition entraîne un stress oxydant prédominant qui diminue la production de NO [36]. C"est pourquoi l"exposition de cellules endothéliales à l"homocystéine durant 15 min augmente la sécrétion d"*endothelium-derived releasing factor* (EDRF) et de S-nitroso-homocystéine, alors qu"une exposition supérieure à trois heures diminue cette sécrétion [36]. La S-nitrosohomocystéine, qui se forme lors d"expositions de courte durée, a une action très différente de l"homocystéine étant antiagrégante et ne générant pas H_20_2. Sa formation diminue réciproquement la toxicité du NO et de l"homocystéine qui ne peuvent plus produire de radicaux oxygénés par oxydation. L"homocystéine augmente d"ailleurs la synthèse de NO induite par l"IL1 sur des cellules musculaires lisses de vaisseaux, en activant le gène du NOS par un mécanisme médié par H_2O_2 car inhibé par les *scavengers*, sans doute par activation de NF-κB [37]. Dans les conditions normales, l"endothélium vasculaire joue un rôle important dans la prévention de l"athérosclérose en produisant du NO [38]. Sur le plan expérimental, l"homocystéine provoque une atteinte des cellules endothéliales [39], freine la libération de NO [40] et affecte la vasotonicité dépendant du flux sanguin [41]. L"effet des doses élevées et chroniques d"homocystéine s"expliquerait aussi par la formation de peroxynitrite très toxique par réaction entre le NO et les superoxydes générés par l"oxydation de l"homocystéine.

2.8.1.3. Action sur les protéines

L"homocystéine peut réagir sur les cystéines des protéines pour former des disulfures mixtes. En agissant ainsi, elle perturberait le métabolisme des fibrillines riches en groupes thiols et nécessaires à la bonne organisation des fibres de la matrice extracellulaire. L"homocystéine se fixe aussi sur les LDL au niveau des lysines entraînant l"agrégation des LDL et facilitant leur internalisation par les récepteurs *scavengers*.

2.8.1.4. Effet sur les facteurs de transcription et la transduction des signaux

L"homocystéine induit l"activation de c-myc et c-fos, la synthèse d"ADN et la prolifération de cellules de crête neurale [42]. Cet effet est relié à une stimulation de la translocation de la PKC vers la membrane et une production de diacylglycérol. Bien que l"homocystéine active les *ras* kinases (entraînant l"activation de SRF, le facteur de réponse au sérum) et l"expression des gènes de c-*jun* et c-fos (dont les promoteurs possèdent des éléments SRE de réponse à SRF), elle induit *in vivo* et non *in vitro* une inhibition de l"activité, mesurée par *gel-shift* et *gene reporter*, de leur produit commun d"expression, le facteur de transcription AP1. Or, AP1 possède des cystéines qui sont efficaces à l"état réduit. L"effet de l"homocystéine n"est observé qu"avec la forme réduite et non avec la forme oxydée thiolactone sugérant une fixation sur les cystéines de AP1 [43].

2.8.1.5. Diminution de métabolites utiles

L"hyperhomocystéinémie s"accompagne ou entraîne des changements dans la teneur de nombreux métabolites, par absence de méthylation ou de formation de dérivés soufrés. Par exemple il a été observé une diminution des metabolites comme la S-adénosylméthionine, choline et acétylcholine, phosphatidylcholine, carnitine, créatine, méthylcobalamine, coenzyme A, coenzyme Q, coenzyme Q10, méthyl-nicotinamide, polyamines, chondroitine sulfate et taurine.

2.8.2. Actions physiopathologiques de l'homocystéine

2.8.2.1. Formation de l'athérome et de la thrombose

L"homocystéine intervient dans des nombreuses actions sur le système cardiovasculaire : perturbation du relargage et de l"effet du NO, prolifération des cellules musculaires lisses, modification de la matrice extracellulaire, oxydation des lipoprotéines [44]. L"homocystéine initie aussi la production de TNF-α et de nombreux signaux cellulaires impliqués dans le processus inflammatoire [45]. L"homocystéine se lie aux lipoprotéines et augmente ainsi leur capacité de liaison à la fibrine, potentialisant le risque athérogène [46]. L"homocystéine inhibe l"expression et l"activité de la thrombomoduline à la surface des cellules endothéliales, qui permet l"activation de la protéine

C, un des puissants anticoagulants naturels, et inhibe la fixation de l"antithrombine III aux héparanes sulfates membranaires [47]. Elle inhibe aussi l"activité de l"ectoADPase, potentialisant ainsi l"action agrégante de l"ADP. L"homocystéine provoque la prolifération des cellules musculaires lisses des parois vasculaires. L"homocystéine inhibe la relaxation vasculaire induite par le NO sur des aortes isolées de rat [48]. Ainsi une charge en L-méthionine (100 mg kg–1) chez 17 sujets normaux entraîne, dans l"heure suivante, une baisse de la dilatation artérielle médiée par le flux sanguin. Cet effet est prévenu par une supplémentation en vitamine C pendant une semaine, sans que le taux d"homocystéine ne soit modifié, démontrant que l"effet de l"homocystéine est médié, au moins en partie, par le stress oxydant [49].

2.8.2.2. Maladies neurodégénératives

L"hyperhomocystéinémie a été associée à l"apparition de la maladie d"Alzheimer. Hasegawa et al., ont émis l"hypothèse que ce serait l"acide homocystéique (HA) produit d"oxydation de l"homocystéine, qui jouerait un rôle dans la pathogenèse de la Maladie d"Alzheimer par une régulation positive de la production du peptide β-amyloïde (Aβ42). L"HA augmente fortement l"Aβ42 intracellulaire et cette augmentation pourrait impliquer le stress oxydant car les différentes études menées sur ce sujet montrent justement que des marqueurs du stress oxydant précédent la période d"accumulation de Aβ42. L"hyperhomocystéinémie a été impliqué dans la maladie de Parkinson, plusieurs études ont montré qu"il existe une corrélation entre le développement de la maladie et l"augmentation de l"homocystéine plasmatique.

2.8.2.3. Carcinogenèse

Les cellules cancéreuses ont un défaut de métabolisation de l"homocystéine situé sur la voie de formation du thiorétinaco [50]. La S-adénosyl-homocystéine inhibe le transfert des groupes méthyles de la S-adénosyl-méthionine aux cytosines de l"ADN, par les méthyl transférases [51]. Par ailleurs, la S-adénosyl-homocystéine inhibe aussi le transfert de méthyle aux œstrogènes par les catéchol-O-methyl tranférases, diminuant la détoxication de ces hormones carcinogènes et augmentant ainsi le risque de cancer du sein [52].

2.8.2.4. Prolifération cellulaire

La culture de cellules musculaires lisses en présence de l"homocystéine se traduit par une croissance et une prolifération accrue qui jouent un rôle dans l"athérogenèse [53].

2.8.2.5. Matrice extracellulaire

L"hyperhomocystéinémie perturbe l"organisation des tissus conjonctifs entraînant un basculement du cristallin, une hyperlaxité ligamentaire et un développement anormal des cartilages, retrouvés dans le syndrome de Marfan. Elle agirait sur les fibrillines, mais aussi sur le collagène en se fixant sur les lysines de la tropoélastine empêchant la réticulation de cette molécule par formation de desmosine. Elle pourrait aussi perturber le métabolisme des protéoglycanes soufrés tels que le dermatane et l"héparane [54].

2.8.2.6. Insuffisance cardiaque

Dans notre laboratoire Guéant-Rodriguez RM et al [55], ont démontré l"association entre l"hyperhomocystéinémie modérée et la dysfonction systolique ventriculaire gauche (DSVG) et plus spécifiquement avec la fraction d"éjection ventriculaire gauche chez 709 patients recrutés de manière consécutive lors de la réalisation d"une angiographie coronaire diagnostique et groupés en fonction de la présence ou non de lésions des artères coronaires. L"analyse de régression multiple confirme l"association significative de l"Hcy avec la FEVG. C"est-à-dire, la fraction d"éjection est un déterminant de l"homocystéine chez les patients avec une dysfonction ventriculaire gauche, indépendamment de la maladie coronaire, cela peut expliquer le rôle néfaste de l"homocystéine dans les maladies cardiovasculaires.

Diverses études ont montré que l"hyperhomocysteinemie produit une augmentation de la pression artérielle diastolique en suggèrant une dysfonction diastolique. En adition à ces études l"HHcy affecte la fonction de pompe du myocarde et produit changes au niveau morphologique [56]. Ces études indiquent clairement que l"HHcy a un effet adverse sur la fonction et la structure cardiaque. Depuis des années, les donnes indiquent que l"HHcy peut être un facteur étiologique de l"insuffisance cardiaque mais les mécanismes cellulaires qui pourraient expliquer l"effet de l"HHCy sur le remodelage et sur la fonction pompe sont encore méconnues à l"heure actuelle.

3. Insuffisance cardiaque et apoptose

Le phénomène d"apoptose ou mort cellulaire programmée des cardiomyocytes est actuellement admis dans la pathogénèse de l"insuffisance cardiaque décompensée sur cardiomyopathie dilatée non ischémique ou cardiomyopathie ischémique. En effet les cardiomyocytes formés pendant la vie fœtale ou périnatale précoce doivent durer le temps d"une vie puisque les myocytes adultes endommagés lors d"une quelconque agression ne seront pas remplacés [57]. L"apoptose au niveau du cœur se produit dès les étapes très précoces de la vie, elle est présente pendant le développement embryonnaire normal du système cardio-vasculaire. Elle est impliquée dans le "modelage" postnatal du ventricule droit pour éliminer les cellules superflues [58]. Dans la vie adulte, chez les patients en stade terminal de l"IC, il a été démontré postmortem une diminution de 30 % du nombre de cardiomyocytes (ventricules droit et gauche). L"apoptose a été définie par ses caractéristiques morphologiques : diminution du volume cellulaire, condensation de la chromatine, fragmentation de l"ADN par clivage spécifique entre les nucléosomes (par des endonucléases, en multiples de 180 paires de base), bourgeonnements de la membrane et formation de corpuscules apoptotiques contenant du matériel génomique (destinés à être phagocytés par des macrophages ou des cellules endothéliales par exemple). La présence de cardiomyocytes en apoptose lors de l"insuffisance cardiaque chez l"homme a été initialement démontrée par Narula et al. et Olivetti et al [59, 60]. Depuis, ces observations ont été retrouvées dans le myocarde défaillant quelle que soit l"étiologie de la maladie chez l"homme comme chez l"animal [61]. Les études qui ont exploré la relation cause/effet entre l"apoptose des cardiomyocytes et l"insuffisance cardiaque ont employé, pour prévenir ou induire l"apoptose, des agents ayant des effets potentiellement pléiotropes, tels que les inhibiteurs de l"enzyme de conversion [62] ou l"inactivation des voies de signalisation comme celle du gp130. Dans ce modèle, les niveaux d"apoptose sont très élevés par rapport à ceux observés dans l"insuffisance cardiaque humaine [63]. Récemment, Wenkcer et al., ont démontré, en manipulant une des voies de signalisation de l"apoptose des cardiomyocytes, qu"une faible présence d"apoptose est suffisante pour induire une cardiomyopathie avec des signes cliniques d"insuffisance cardiaque. Leur démonstration s"appuyait sur un modèle de souris transgénique surexprimant la caspase-8 activable de façon conditionnelle dans le cœur. En plus, dans ce modèle murin, l"inhibition de l"activation des caspases et\ou de l"apoptose prévient le remodelage cardiaque et le dysfonctionnement contractile, signes d"insuffisance cardiaque [64].

3.1. Régulation adrénergique de l'apoptose des cardiomyocytes et insuffisance cardiaque

L"augmentation de l"activité du système sympathique dans le myocarde est un événement majeur chez les patients atteints d"insuffisance cardiaque. La noradrénaline (NA), principal neurotransmetteur du système nerveux sympathique, se lie aux récepteurs α et β adrénergiques (β-AR) couplés aux protéines G. Depuis longtemps la NA a été démontrée comme étant cytotoxique pour les cardiomyocytes [65]. En utilisant des cardiomyocytes de rats adultes *in vitro*, Communal et al. ont démontré que les effets cardiotoxiques de la NA sont associés à l"apoptose. Le traitement par la NA (10 µM) pendant 24 h augmente la fragmentation de l"ADN génomique et le pourcentage de cellules en apoptose avec un contenu en ADN hypodiploïde [66]. Les effets proapoptotiques de la NA sont abolis par l"antagoniste β-AR, En outre, les effets apoptotiques de la NA sont mimés par l"agoniste β-AR. Ainsi, la NA stimule l"apoptose via la voie de signalisation des β-AR. Il existe 2 sous types prépondérant de β-AR dans le cœur, les β1-AR et β2-AR. En utilisant des cardiomyocytes de rats adultes *in vitro*, il a été montré que le blocage des β1-AR par un antagoniste sélectif (CGP 20712A) prévient l"apoptose induite par la NA alors que le blocage des β2-AR par un antagoniste sélectif (ICI 118, 551) potentialise l"apoptose induite par la NA. Ces résultats ont également été validés *in vivo* grâce aux modèles de souris transgéniques surexprimant les β1 ou β2-AR. Ainsi, la souris surexprimant les β1-AR au niveau du cœur développe à 9 mois une dilatation du ventricule gauche, associée à une diminution de la fonction contractile. Dans ce modèle l"augmentation du taux d"apoptose est concomitante avec l"apparition des signes d"insuffisance cardiaque [67]. Les souris surexprimant les β2-AR ne semblent pas développer de signes d"apoptose [68]. Les mécanismes moléculaires impliqués d"une part dans la survenue de l"apoptose via l"activation des β-AR, et d"autre part dans les effets anti-apoptotiques de Gi ont été aussi analysés. Parmi les effecteurs moléculaires, les MAPKs *« mitogen-activated protein kinases »*, qui appartiennent à la famille des sérines et thréonine-kinases. Trois sous-groupes de MAPKs ont été identifiés : ERK1\2 *"extracellular signal-regulated kinase"* impliqué dans la régulation de la croissance et de la survie cellulaire, p38-kinases et JNKs *"c-Jun N-terminal kinases"* qui contrôlent la croissance et l"apoptose des cardiomyocytes immatures [69]. Dans des cardiomyocytes de rat adulte, l"activation des β-AR stimule après 15 min l"activité de p38-kinases et des JNKs, puis après 1h celle des ERK1/2. Si l"inhibition de p38-kinase par le composé SB202190 amplifie l"apoptose induite par les β-AR, le PD98059, inhibiteur d"ERK1/2, n"a pas d"effet. L"inhibition des protéines Gi/o, par la toxine PERTUSSIS, bloque l"activation de p38-kinase et potentialise l"apoptose induite par les β-AR, alors que l"activation des Gi par le CARBACHOL a des effets opposés. Enfin, les effets protecteurs du CARBACHOL sont abolis par le SB20190, l"inhibiteur de p38-kinase [70]. Ces résultats indiquent que dans les cardiomyocytes matures :

- la stimulation des β-AR active différentes MAPKs,

- l"activation de p38-kinase tend à prévenir l"apoptose induite par les β-AR.
- les effets protecteurs de la protéine Gi sont dus à l"activation de la p38-kinase.

De plus, l"apoptose induite par la stimulation des β-AR implique l"activation de la voie mitochondriale par les espèces radicalaires de l"oxygène et JNK [71]. En outre, la signalisation via les intégrines β1 protège les cardiomyocytes contre l"apoptose induite par les β-AR, via l"activation d"ERK1/2 [72] (Figure. 3)

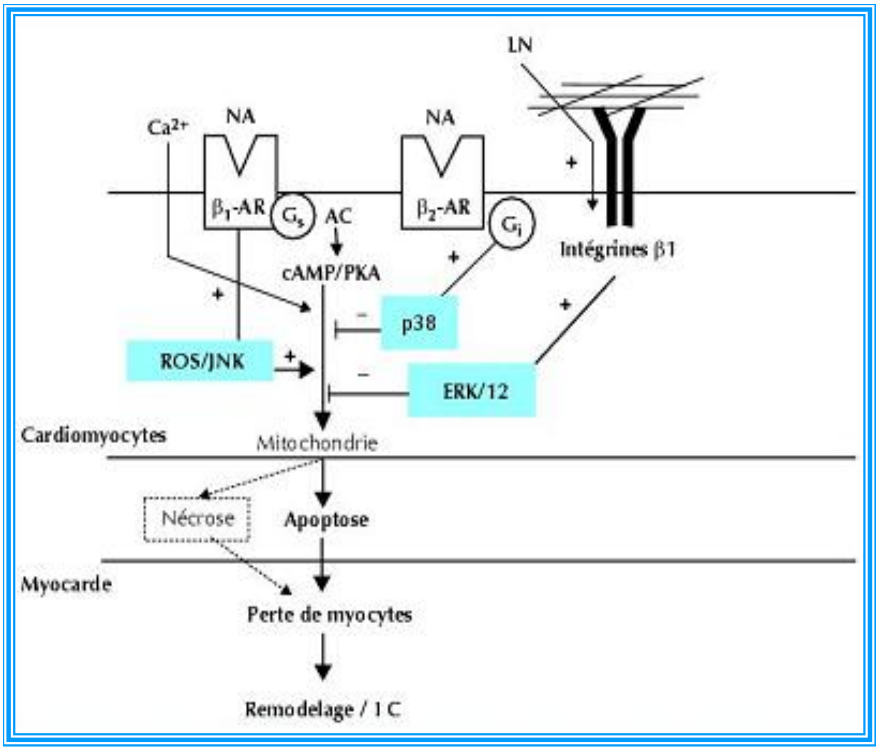


Figure 3. Récepteurs β-adrénergiques et apoptose dans les cardiomyocytes

3.2. Voies pro et anti-apoptotiques dans l'insuffisance cardiaque

Plus récemment, les travaux sur les mécanismes biochimiques conduisant à l"apoptose ont mis en évidence le rôle clef d"une famille de protéases nommées caspases. Les caspases constituent une famille de protéases dirigées contre l"acide aspartique, dont l"activation signe classiquement la phase initiale de l"apoptose. Il existe 2 voies d"activation des caspases : la voie des "death récepteurs" (activée par TNF-α et Fas ligand) et celle des mitochondries (libération du cytochrome-c). Les caspases sont impliquées dans une cascade protéolytique hiérarchisée : le stimulus apoptotique induit le clivage et l"activation des caspases initiatrices : 8, 9,10 qui à leur tour activent les caspases effectrices : 3, 6 et 7 responsables de l"exécution de l"apoptose (coupure des éléments structuraux du cytosquelette et du noyau, activation des endonucléases qui coupent l"ADN)

[57]. Contrairement à la nécrose qui est un phénomène passif et non contrôlé, l"apoptose est contrôlée par des interactions complexes entre des voies de signalisation anti-apoptiques et d"autres pro-apoptotiques. Les protéines de la famille Bcl-2, qui sont anti-apoptiques (Bcl-2, Bcl-xL) ou de la famille pro-apoptotique (Bax, Bid) sont connues pour agir principalement au niveau de la mitochondrie. D"autres facteurs agissent au niveau des caspases, ces facteurs incluent *FADD-like inhibitory protein* (cFlip), ARC ("*Apoptosis Repressor*" inhibiteur de caspases et exprimé exclusivement dans le cœur et les muscles) et la famille des inhibiteurs d"apoptose (IAPs et plus particulièrement XIAP *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*). D"autres protéines comme les protéines de stress ("*heat shock proteins"* ou hsp) et les facteurs de croissance (IGF-1) ont été impliquées dans la régulation de l"apoptose [73] (Figure.4). Chez l"homme, l"expression de la caspase-3 est augmentée chez les patients souffrant d"une dysplasie ventriculaire droite, pathologie qui s"accompagne d"une apoptose importante des cardiomyocytes [74]. Cependant dans les cardiomyocytes de patient en IC, la caspase-3 est activée sans qu"il y ait en parallèle dégradation de l"ADN, signe ultime d"apoptose [75]. Expérimentalement, dans un modèle d"IC induite par la mise en place d"un pace-marker, l"augmentation de l"activité de caspase-3 est associée à l"apparition d"un dysfonctionnement contractile [76]. De même les souris surexprimant, au niveau des cardiomyocytes, la procaspase-3 (précurseur de la caspase-3) présentent, de façon transitoire à l"âge de 9 mois une altération de la fonction cardiaque qui s"accompagne d"une diminution du contenu en myofibrille, ainsi que d"une désorganisation du myofilament, sans que le programme apoptotique ne soit exécuté [77]. *In vitro* dans les cardiomyocytes, la caspase-3 est activée en réponse à l"hypoxie/ré-oxygénation, au stress oxydatif et à la stimulation des β-AR [78, 79]. En effet, l"activation des β-AR des cardiomyocytes induit de façon précoce (6 heures), via la voie mitochondriale, l"activation de la caspase-3, alors que la fragmentation de l"ADN ne survient qu"après 24h. L"ensemble de ces données suggère que l"activation de la caspase-3 peut affecter, lors du développement de l"IC, des cibles distinctes de celles conduisant à l"apoptose des cardiomyocytes : les protéines du myofilament. En utilisant une forme active de caspase-3, Communal et Coll[72]. Ont démontré *in vitro* que les myofibrilles constituent une des cibles cardiaques de la caspase-3. Parmi les protéines myofibrillaires les plus abondantes, la caspase-3 clive spécifiquement la troponine T cardiaque (cTnT) (complexée avec les autres troponines), l"α-actine et l"α-actinine à la fois sous forme purifiée et dans le réseau du myofilament. De plus, le traitement de fibres pelées par la forme active de caspase-3 diminue la relation force\Ca^{2+} et l"activité ATPasique. Si les caspases sont activées dans le cœur défaillant, il est donc possible que le clivage progressif des protéines contractiles constitue une des bases du déclin inexorable de la fonction systolique ventriculaire. Il est important de souligner que de multiples situations pathologiques cardiaques conduisant au développement de l"insuffisance cardiaque,

incluent en plus d"une apoptose myocytaire, une dégradation des protéines myofibrillaires et une désorganisation du sarcomère.

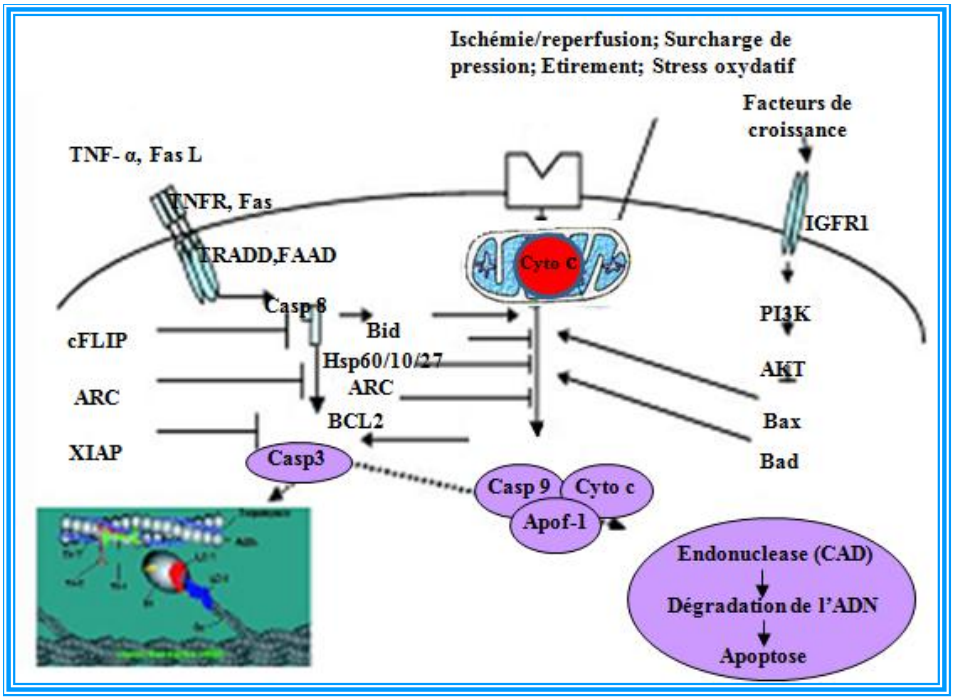


Figure 4. Apoptose dans le cardiomyocyte. (d"après Norula et al 1999).

4. Insuffisance cardiaque et stress oxydant

Le stress oxydant est apparu récemment comme un nouveau facteur impliqué dans la progression de l"insuffisance cardiaque. Il représente un mécanisme de toxicité cellulaire important du fait de son caractère ubiquitaire et des dommages cellulaires dont il est responsable. En effet, il peut être à l"origine de l"apparition, de l"entretien et/ou de l"aggravation de nombreuses pathologies. Parmi les acteurs principaux de ce stress oxydant, les métabolites de l"oxygène, communément appelés espèces réactives de l"oxygène (ERO), jouent un rôle clé. Les ERO sont le plus souvent des radicaux libres, caractérisés par un ou plusieurs électrons non appariés conférant à la molécule une très grande instabilité et par conséquent une très grande réactivité que peut se traduire par des effets toxiques provoqués le plus souvent par des réactions d"oxydation sur les macromolécules intracellulaires telles que les lipides, les protéines ou encore les acides nucléiques (figure.5)

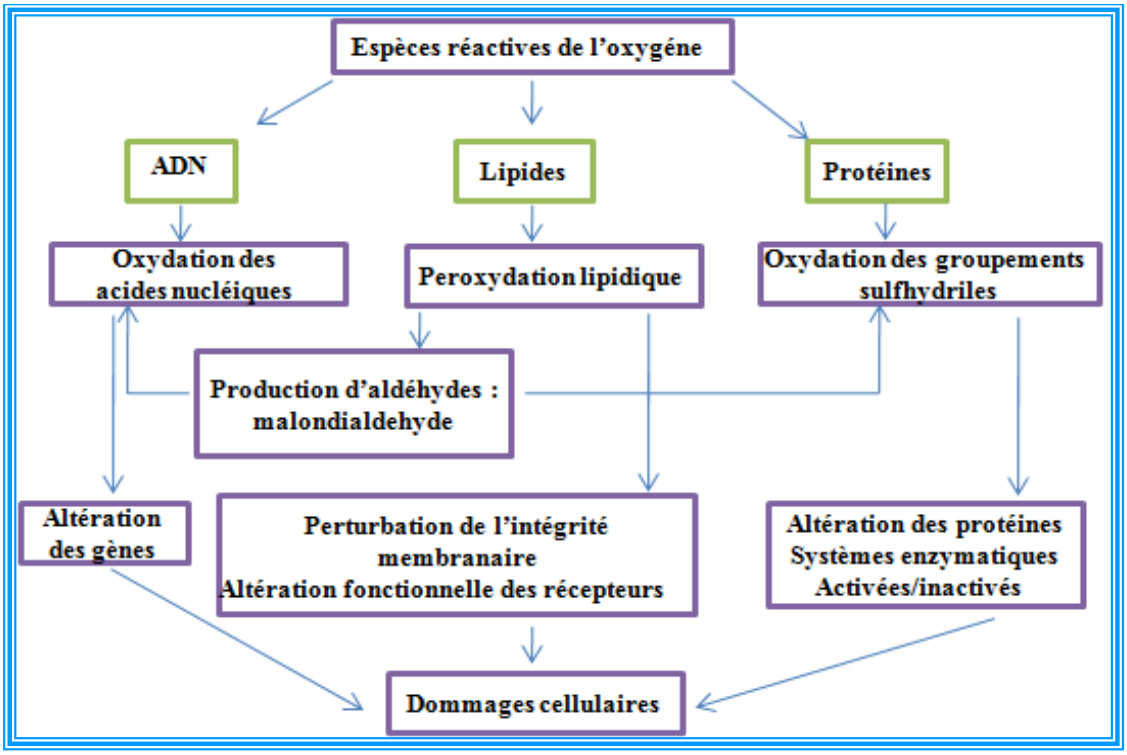


Figure 5. Dégât cellulaire induit par les espèces réactives de l'oxygène (d'après Ide 1999).

Parmi les espèces radicalaires observées dans le myocarde au cours de l'insuffisance cardiaque, on peut citer l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) [80]. Il existe également des ERO non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou encore le peroxynitrite ($ONOO^-$). Le rôle du peroxynitrite dans la pathologie cardio-vasculaire semble majeur du fait de la diminution de la disponibilité du NO que cela engendre mais aussi à cause de son très fort pouvoir oxydant, responsable de la détérioration de la fonction cardiaque [81]. Tous les systèmes enzymatiques impliqués dans la production des métabolites de l'oxygène sont présents dans les principaux types cellulaires de l'appareil cardiovasculaire : les myocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Ces systèmes enzymatiques sont nombreux mais, bien que leur contribution exacte soit encore méconnue, seules trois sources enzymatiques sont prédominantes au cours de l'insuffisance cardiaque : la chaîne respiratoire mitochondriale, la xanthine oxydase et les NADPH oxydases.

- ***mitochondrie*** : La mitochondrie est le site principal de production d'ERO mais également la cible privilégiée de leurs actions délétères et joue, à ce titre, un rôle important dans la pathologie cardiaque. La mitochondrie produit de l'adénosine triphosphate (ATP) avec, comme apport principal, les électrons issus principalement de l'oxydation des acides gras pendant le cycle de Krebs. Ces électrons, transportés à travers les quatre complexes (I à IV) de la chaîne mitochondriale permettent

la formation d"ATP et d"eau à partir de l"oxygène. Normalement, environ 2 à 4 % de l"oxygène réagissant avec la chaîne respiratoire sont incomplètement réduits et donnent des ERO ($O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2). Ces molécules peuvent être prises en charge directement par la présence d"antioxydants, comme la superoxyde dismutase mitochondriale qui convertit $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2, qui est, à son tour, métabolisé en H_2O par la glutathion peroxydase (GPX) (Figure. 6).

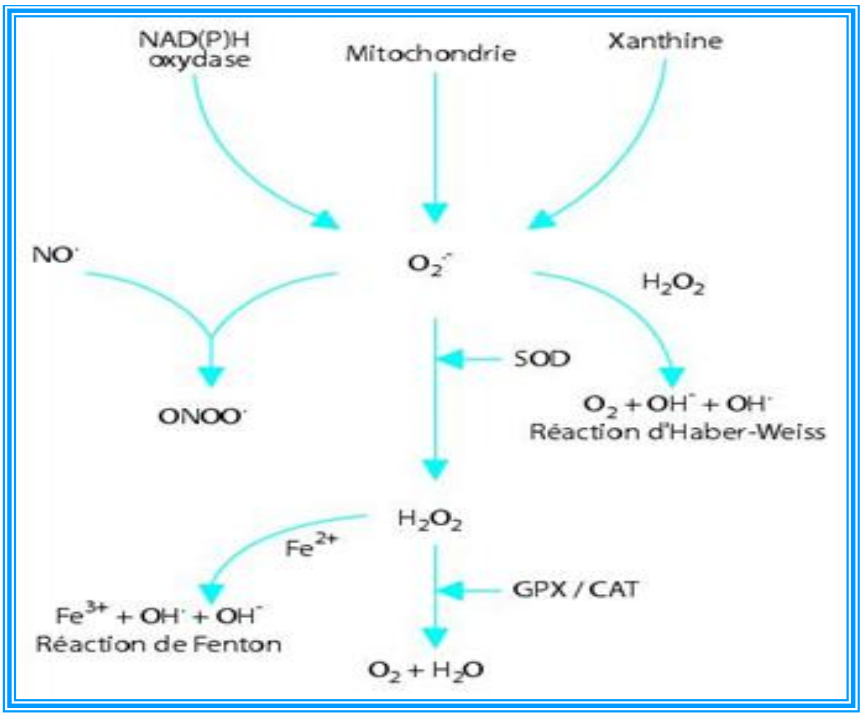


Figure 6. Production d"espèces réactives de l"oxygène. (D"après Ide 1999*).*

Cependant, ces systèmes peuvent être insuffisants lors d"une augmentation massive d"ERO. Cette production peut intervenir au niveau du complexe I ou du complexe III de la chaîne respiratoire. Ceci a été montré dans l"insuffisance cardiaque expérimentalement par Ide et al. [82] ayant observé une augmentation de la production mitochondriale d"anions superoxyde associée à un blocage du transport des électrons au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire (Figure. 7). Cette production d"ERO au niveau de la mitochondrie lui est dommageable et se traduit par une altération des macromolécules mitochondriales. C"est ainsi que la peroxydation lipidique, provoquée par une oxydation des lipides au niveau des acides gras polyinsaturés membranaires, produit des aldéhydes tels que l"hydroxynonenal dont il a été montré récemment qu"il pouvait inactiver l"isocitrate déshydrogénase mitochondriale [83]. L"altération de cette enzyme clé du métabolisme énergétique myocytaire intervient précocement au cours du développement de l"hypertrophie cardiaque [83], et suggère fortement l"implication du stress oxydant dans les altérations métaboliques observées au

cours de l"insuffisance cardiaque. L"ADN mitochondrial (ADNmt) peut également être touché et contribuer au dysfonctionnement myocytaire comme cela a été observé expérimentalement dans un modèle murin après infarctus du myocarde [84]

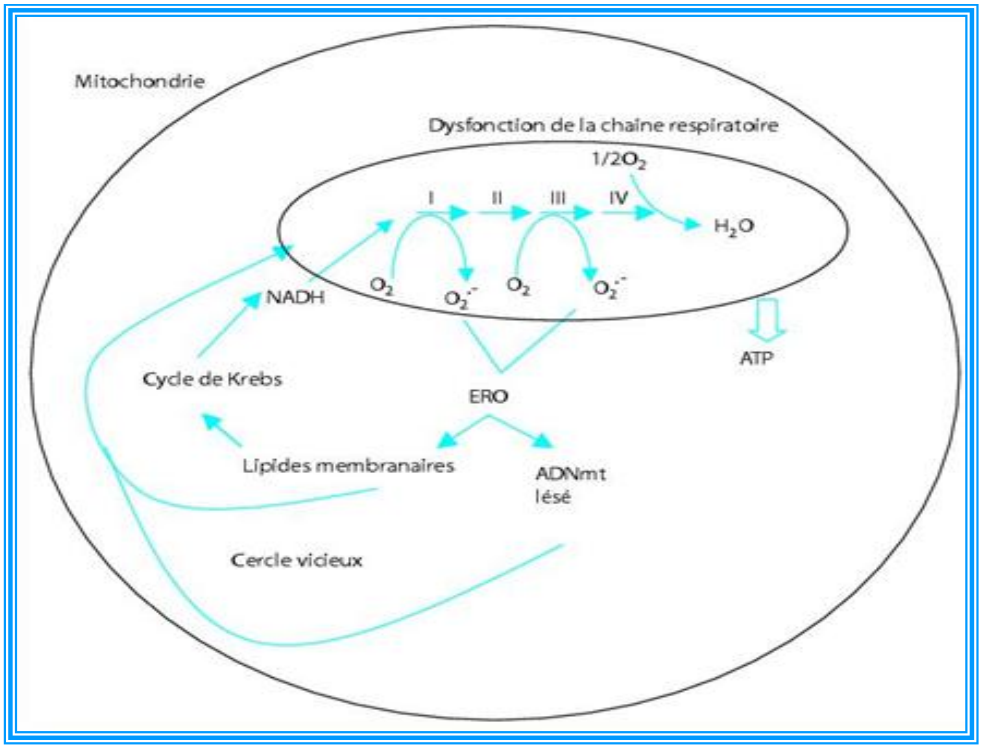


Figure 7. Relations existan entre la production d"espèces réactives de l"oxygène (ERO), la chaîne respiratoire, l"ADN mitochondrial (ADNmt) et le cycle de Krebs. (D"après Ide 1999)

- *la xanthine – oxydase* : La xanthine oxydoréductase est une enzyme dont la fonction principale est la dégradation des purines, conduisant à la production d"acide urique. Chez les mammifères, cette enzyme se présente sous deux formes. La xanthine deshydrogénase qui utilise le NAD^+ comme accepteur d"électrons et la xanthine oxydase qui utilise l"oxygène moléculaire comme accepteur d"électrons, générant O_2^- et H_2O_2. Dans l"organisme, cette enzyme est principalement retrouvée sous la forme xanthine déshydrogénase. La conversion de la xanthine deshydrogénase en xanthine oxydase dépend de différents facteurs tels que le TNFα [85]. Le peroxynitrite, produit de la réaction du NO et d"O_2^-, convertit également la xanthine deshydrogénase en oxydase, probablement par oxydation des cystéines de l"enzyme [86]. L"expression et l"activité de la xanthine oxydase, faible à l"état de base, est augmentée chez les patients souffrant d"insuffisance cardiaque [87]. L"inhibition de l"activité de cette enzyme, par de l"allopurinol, permet d"améliorer la fonction contractile du myocarde, à la fois dans l"insuffisance cardiaque expérimentale et chez l"homme [88, 89].

- la NADPH oxydase : Cette enzyme, complexe protéique constitué de plusieurs sous-unités, a initialement été localisée au niveau des polynucléaires neutrophiles où elle est activée durant la phagocytose pour produire de grandes quantités d'ERO ($O_2^{\cdot-}$) mais également au cours de l'insuffisance cardiaque [90,91]. Il a été montré que le TNFα, dont les concentrations plasmatiques sont augmentées au cours de l'insuffisance cardiaque, stimule cette enzyme et serait un des facteurs responsables du stress oxydant observé chez ces patients [91]. Dans cette étude, les mesures biologiques ont été réalisées à partir d'échantillons sanguins pour évaluer la production plaquettaire d'anions superoxyde, dont l'augmentation est corrélée à celle de la production de TNFα [91]. Un complexe enzymatique similaire est également exprimé dans de nombreuses cellules non phagocytaires de l'appareil cardio-vasculaire. La NADPH oxydase non phagocytaire est également induite par le TNFα et d'autres cytokines mais aussi par l'angiotensine II [92] ou encore les catécholamines [93]. Elle participerait ainsi au développement de l'hypertrophie de la cellule musculaire lisse, à celui de l'athérosclérose et de la dysfonction endothétiale [92]. Ce n'est que très récemment que sa localisation au niveau du cardiomyocyte a été montrée à la fois *in vitro* [94] et *in vivo* chez l'animal [95] et chez l'homme où son rôle paraît être déterminant dans la physiopathologie de la dysfonction cardiaque [96, 97]. Depuis ces dernières années, l'augmentation explosive du nombre d'études soulignant l'importance du rôle de la NADPH oxydase dans la pathologie cardio-vasculaire [98] laisse penser qu'il s'agit là d'une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

4.1. Réserves anti-oxydantes au cours de l'insuffisance cardiaque

À côté de cette augmentation de la production de molécules oxydantes, une diminution des défenses anti-oxydantes est également observée au cours de l'insuffisance cardiaque. Dans la plupart des tissus, les réserves anti-oxydantes sont constituées d'enzymes d'une part, telles que le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, et d'anti-oxydants non enzymatiques d'autre part comme les vitamines C, E et A ou le glutathion. La diminution de ces réserves a été observée dans l'insuffisance cardiaque d'origine ischémique et/ou non ischémique. Ainsi, la diminution de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase plasmatique et de vitamine C, a été observée dans une étude portant sur des patients souffrant de cardiomyopathie ischémique ou cardiomyopathie dilatée [99]. Cette diminution s'accompagne d'une augmentation de marqueurs du stress oxydant tels que les taux plasmatiques de malondialdehyde et de peroxydes lipidiques. Ces modifications biologiques ont été corrélées avec le degré de sévérité de l'insuffisance cardiaque et suggèrent ainsi un rôle de déterminant pronostique du stress oxydant [99]. La diminution des réserves anti-oxydantes, ou tout au moins l'absence d'augmentation de ces défenses qui sont par ailleurs

faiblement représentées dans le myocarde, représente un facteur de vulnérabilité indéniable face à une production accrue d'ERO au cours de l'insuffisance cardiaque. Ceci a été démontré expérimentalement dans un modèle de souris déficiente en superoxyde dismutase, développant très précocement une cardiomyopathie dilatée [100]. Une autre approche, utilisant cette fois un modèle de souris transgénique surexprimant la glutathion peroxydase, a permis de prévenir le remodelage ventriculaire gauche et la dysfonction cardiaque après infarctus du myocarde [101].

4.2. Stress oxydant et dysfonction endothéliale

L'existence d'une dysfonction endothéliale est largement reconnue dans l'insuffisance cardiaque. Cette dysfonction semble être impliquée dans la vasoconstriction et la diminution de la perfusion périphérique observée chez les patients insuffisants cardiaques. La réduction généralisée de la capacité vasodilatatrice contribue à l'augmentation des résistances vasculaires périphériques dans l'insuffisance cardiaque. Cette dysfonction endothéliale, décrite chez l'homme et chez l'animal, peut résulter d'une inactivation accrue du monoxyde d'azote (NO) par les radicaux libres, notamment par les anions superoxydes. Cette destruction du NO diminue sa biodisponibilité et entraîne une altération de la vasodilatation NO-dépendante. Dans la paroi vasculaire, au cours de l'insuffisance cardiaque, le stress oxydant peut résulter d'une production accrue de radicaux libres ou d'une diminution des réserves antioxydantes cellulaires. Toutefois, le stress oxydant ne suffit pas à lui seul à expliquer la dysfonction endothéliale. Des altérations dans la régulation de la production de NO (c'est à dire une diminution de l'expression ou de l'activité de la NOS) et/ou un déséquilibre de la balance entre facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs peuvent être impliqués.

5. Métabolisme énergétique

Le cœur est un organe très riche en lipides en raison de son matériel membranaire, et particulièrement en mitochondries qui représentent près de 30 % à 40 % du volume cardiaque. Les phospholipides (PL) représentent plus de 20 % du poids de l'organe, qui contient de plus une masse appréciable de lipides de réserve sous forme de tryacylglycérols (25 % de lipides totaux). Le bon fonctionnement des cardiomyocytes repose sur un équilibre particulièrement sophistiqué de voies métaboliques assurant l'utilisation et la transformation des lipides, en réponse aux variations instantanées des besoins. La production d'énergie et la synthèse des PL membranaires constituent les deux fonctions métaboliques lipidiques principales du myocarde. Le cœur est parfois décrit comme un “omnivore métabolique” capable de produire l'énergie à partir d'une grande variété de substrats. L'activité contractile permanente du muscle cardiaque nécessite un apport continu en énergie, et

95 % de la production d"énergie cardiaque provient du métabolisme oxydatif. L"approvisionnement en substrats oxydatifs est essentiel à l"activité du myocarde, quelles que soient les conditions nutritionnelles. Le myocarde est donc capable d"utiliser tous les substrats endogènes (glycogène, corps cétoniques, acides aminés) ou exogènes (lipides, glucose, lactate, etc.) Dans le myocarde normal, les sources principales d"énergie proviennent de la β-oxydation des acides gras, du glucose et du lactate. Le rapport entre la consommation d"oxygène et la synthèse d"ATP dépend du substrat utilisé : la quantité d"oxygène consommée pour produire une molécule d"ATP sera supérieure avec les acides gras qu"avec le glucose. L"utilisation des acides gras (AG), par la β-oxydation permet une production d"énergie importante, qui représente 60 % à 70 % de la production cardiaque d"ATP en moyenne sur 24 heures. Le reste est produit à partir du glucose (environ 30 %) est de substrats mineurs (lactate, corps cétoniques et acides aminés). La circulation des AG dans la cellule cardiaque peut se faire par diffusion dans le plan membranaire du fait de la liposolubilité mais le processus plus important est cependant la thio-estérification de l"AG sur un résidu coenzyme a par l"acyl-CoA synthase, étape clé ubiquitaire de toute utilisation par la cellule d"un AG de dix carbones ou plus. L"acyl-CoA entre dans la mitochondrie par la "navette carnitine".

5.1. Carnitine

La L-carnitine est isolée pour la première fois au début du siècle [102]. Sa structure biochimique est déterminée et identifiée à l'acide 3-hydroxy-4-triméthylamoniobutyrate en 1927. Friedman et Fraenkel [103], montraient que cette molécule subissait une acétylation réversible avec des acides carboxyliques de longueurs variant de C2 à C22. Les acides gras à longue et moyenne chaine sont activés par thio-estérification avec la coenzyme A dans le cytoplasme alors que la β-oxydation 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 [104]. Au niveau cytoplasmique, la Carnitine palmitoyltransferase (CPT I,) transfère l"acide carboxylique sur la carnitine par estérification en même temps qu"elle transfère l,,acylcarnitine dans l"espace intermembranaire (Figure 8). La Carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) va permettre le transport d"une acylcarnitine dans la matrice mitochondriale [105]. 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 NAD^+/NADH, H^+ (produit du cycle du citrate, Ac-coA dépendant) qui détermine la vitesse de β-oxydation des acides gras.

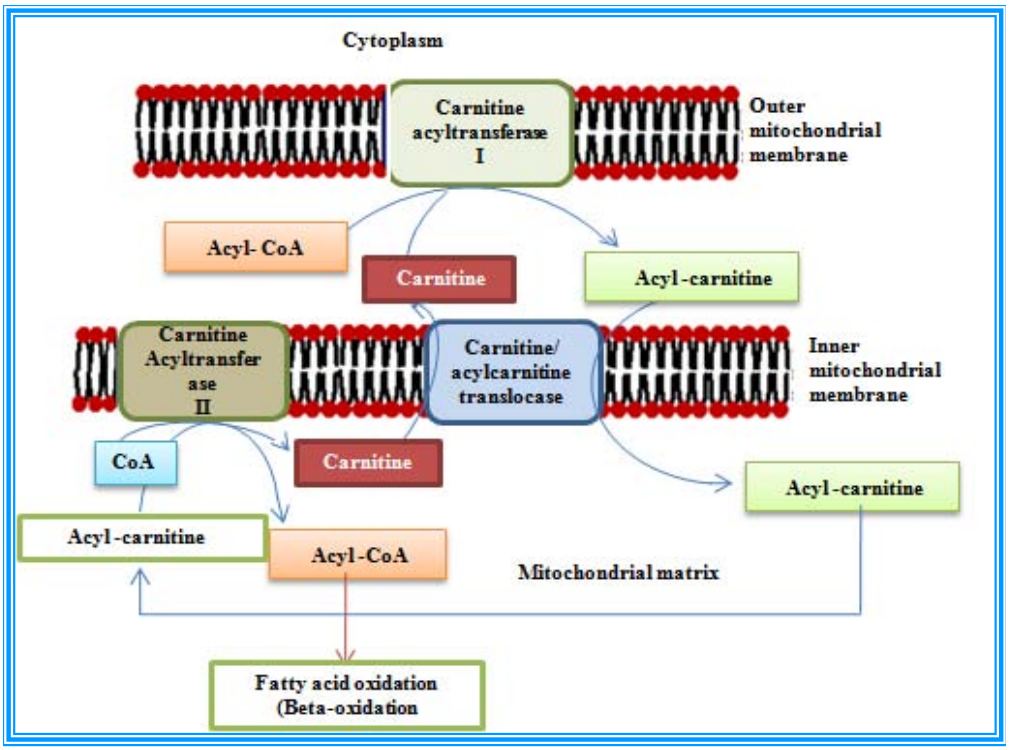


Figure 8. Modèle de translocation membranaire des acides gras du cytosol vers la matrice mitochondriale (d"après Vaz, 2002).

5.2. 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 évènement post-traductionnel catalysé par des méthyltransférases bien spécifiques qui ont toutes en commun d"utiliser la SAM comme donneur de méthyle. L"hydrolyse lysosomiale de ces protéines résulte en un relargage de triméthyllysine (TML) qui est la première étape dans la biosynthèse de la carnitine. 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.

5.3. Régulateurs du métabolisme énergétique myocardique

5.3.1. Le trio PPARs :

Les récepteurs nucléaires PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) ont été découverts en 1990. Les PPAR appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de transcription activés par des ligands. Il existe trois isoformes de PPAR : α, β/δ et γ, tous trois codés par des gènes distincts et présentant des expressions tissulaires différentes. Depuis leur découverte, des études réalisées chez l"homme et les rongeurs ont permis de mettre à jour de nouvelles fonctions des PPAR. Ainsi, il a été montré que PPARγ est impliqué dans l"adipogenèse et la résistance à l"insuline alors que PPARα joue un rôle dans la régulation du métabolisme des lipoprotéines et des lipides. De plus, de nombreuses études montrent une implication de PPARα et de PPARγ dans la régulation de la réponse inflammatoire. En ce qui concerne PPARβ/δ, qui présente une expression ubiquitaire, des études ont montré qu"il est impliqué dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines mais aussi dans la prolifération des préadipocytes et dans l"adipogenèse [106]. PPARα est principalement exprimé dans les tissus présentant une forte activité de catabolisme des AG tels que le cœur, le muscle squelettique et le foie [106]. Ce récepteur nucléaire est également retrouvé dans les cellules de la paroi vasculaire [107] telles que les monocytes-macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, au sein des lésions athérosclérotiques [108] et dans les lymphocytes T [109]. Les fonctions biologiques associées à ce profil d"expression sont la régulation du métabolisme des lipides et des lipoprotéines, l"homéostasie des lipides dans les macrophages et le contrôle de la réponse inflammatoire.

5.3.2. Activation des PPARs

Différents acides gras sont capables de se lier et d"activer les PPARs mais il est bien connu que les PPARs sont aussi régulés par des coactivateurs et des corépresseurs transcriptionnels. Les coactivateurs transcriptionnels agissent directement avec les PPARs et d'autres récepteurs nucléaires pour former une plate-forme pour le recrutement des complexes de protéines qui servent à transformer la chromatine et à recruter le complexe de l'ARN polymérase II. Diverses études montrent que certain coactivateurs sont inductibles et interagissent avec un sous-groupe spécifique de facteurs de transcription. Un exemple de cette dernière classe est le coactivateur-1α (PGC-1α) de PPARγ [110, 111]. Il a été montré que PGC1-alpha coactive les protéines PPAR en recrutant des protéines additionnelles avec une activité histone-acétyltransférase, comme SRC1 et CBP/p300. L"expression cardiaque de PGC-1α est induite après la naissance et en réponse aux stimuli physiologiques incluant un court jeûne, l'exposition au froid, et l'exercice à court terme [110, 111].

Récemment, il a été montrée qu"une autre protéine, Ménage-à-Trois 1 (MAT1) est requise pour la coactivation de PPARα dépendant de PGC-1α [112]. Les complexes coactivateurs transcriptionnels comme PGC-1α et MAT1 serve comme « transducteur » des signes développementaux et physiologiques en contrôlant l'activité PPAR/RXR (figure 9).

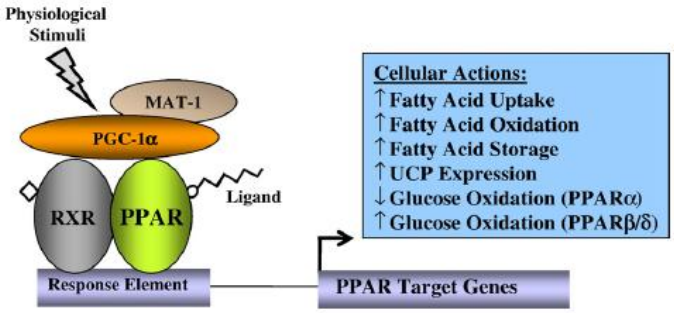


Figure 9. Certaines actions de PGC-1α dans le cœur. (d"après Kelly, 2008).

5.3.3. Régulation du métabolisme des lipides et des lipoprotéines

Les rôles de PPARα dans la régulation du métabolisme des lipoprotéines sont multiples. En effet, il est capable d"agir au niveau du métabolisme lipidique intracellulaire et plasmatique en modifiant les proportions des différentes lipoprotéines.

5.3.3.1. Lipides intracellulaires

PPARα joue un rôle important dans la captation des AG par les cellules et dans leur dégradation en régulant l"expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des AG. Ces fonctions sont corrélées avec un taux d"expression élevé de PPARα dans les tissus présentant un catabolisme des AG important. PPARα module l"expression de gènes impliqués dans le transport des AG [113, 114]. En régulant l"estérification des AG en acyl-CoA par augmentation de l"expression de l"acyl-CoA synthétase, PPARα va ainsi empêcher la sortie des AG des cellules [113, 115]. La mitochondrie représente un lieu important de la β-oxydation intracellulaire. Pour entrer dans cet organite, les AG doivent être modifiés pour être reconnus par les transporteurs spécifiques. PPARα augmente l"expression des CPT-I et II (carnitine palmitoyltransférase), des enzymes de modification des AG permettant leur entrée dans les mitochondries, dans le foie et le muscle [116-119]. De plus, il augmente l"expression d"enzymes mitochondriales de dégradation des AG [119-121]. PPARα contrôle également la production de corps cétoniques en régulant l"expression de la mHMG-CoAS (hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase mitochondriale) [122,123]. L"activation de PPARα conduit donc

à l"augmentation de la dégradation oxydative des AG diminuant ainsi la quantité d"AG libres pour la synthèse des VLDL (*very low density lipoprotein*).

5.3.4. Lipoprotéines et régulation du métabolisme des lipoprotéines

Les lipides (cholestérol, triglycérides, phospholipides), insolubles en milieu aqueux, sont transportés dans le sérum liés à des protéines, sous forme de lipoprotéines auquelles sont attachées des apoprotéines. Les apoprotéines sont elles-mêmes composées de l"association de plusieurs polypeptides, ce qui leur confère une grande variété : dix classes et sous-classes sont connues. Ces classes et sous-classes de protéines diffèrent par leur structure primaire, leur conformation spatiale et leurs fonctions métaboliques. Les lipoprotéines circulantes contiennent une proportion variable de ces protéines. Certaines lipoprotéines sont caractérisées par la présence d"un seul type d"apoprotéine, dite « majeure » (exemple : les apolipoprotéines B pour les LDL ou les apolipoprotéines A pour les HDL).

5.3.4.1. Apolipoprotéines A

Les apolipoprotéines A, ou apoprotéines A, ou Apo A regroupent plusieurs sous-unités dont les plus courantes sont les Apo-A1 et Apo-A2. Les Apo A4, quant à elles, sont surtout étudiées comme modèle génétique. Les Apo A1 se présentent sous forme d"une simple chaîne polypeptidique. Leur affinité est grande pour les phospholipides qui, en retour, modulent fortement la structure secondaire et tertiaire de ces apoprotéines au sein des lipoprotéines. Les Apo A1 constituent la fraction protéique majoritaire des HDL. Elles entrent pour une part bien moindre dans la composition des chylomicrons. Les Apo A2 sont presque exclusivement localisées au niveau des lipoprotéines HDL. Elles sont formées de deux chaînes polypeptidiques identiques, reliées par un pont disulfure. Leur affinité est également très grande pour les phospholipides. Leur lieu de synthèse est l"intestin et le foie, particulièrement pour l"Apo A1. Leurs fonctions, en revanche, sont légèrement dissociées : l"Apo A1 a un rôle structural majeur (lipoprotéines HDL). Elle est également activatrice de la lécithine-cholestérol- acyl-transférase (LCAT). Elle intervient dans la captation des HDL par le foie grâce à un système récepteur-dépendant ; l"Apo A2 joue surtout un rôle modulateur sur l"activité de la lipase hépatique, et entre en compétition avec l"Apo A1 à la surface des HDL [124].

5.3.4.2. Apolipoprotéines B

Les apolipoprotéines B, ou apoprotéines B (Apo B), sont principalement des protéines structurales. Ce sont les apoprotéines majeures des lipoprotéines de basse densité (LDL), mais elles se retrouvent également dans les lipoprotéines précurseurs de ces LDL que sont chylomicrons et lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Deux formes ont été trouvées : l"Apo B100 et l"Apo B48, l"Apo B100 étant quantitativement la plus importante. Sa synthèse a lieu dans les cellules intestinales, où elle est intégrée aux VLDL et aux chylomicrons, mais la plus grande partie est cependant formée au niveau hépatique en vue de sa liaison aux LDL [125].

5.3.4.3. Apolipoprotéines C

Les apolipoprotéines C (Apo C) sont les apolipoprotéines dont le métabolisme et le rôle physiopathologique sont les moins connus et les plus complexes : ce sont les Apo C1, C2, C3. L"Apo C1, présente dans les chylomicrons, les VLDL et les HDL, est synthétisée au niveau hépatique et intestinal. Elle active la lécithine-cholestérol acyltransférase *in vitro*, mais son action *in vivo* n"a pas été démontrée. L"Apo C2, synthétisée elle aussi au niveau du foie et de l"intestin, est retrouvée au niveau des chylomicrons, VLDL et HDL. Elle serait responsable de la liaison des phospholipides à la surface des HDL et surtout elle active la lipoprotéine-lipase. Toujours synthétisée au niveau du foie et de l"intestin, l"Apo C3 se retrouve également dans les lipoprotéines riches en triglycérides : chylomicrons et VLDL, ainsi qu"au niveau des HDL sous trois isoformes. Son action métabolique serait complexe : inhibition de l"action de la lipoprotéine-lipase et de la triglycéride-lipase hépatique, ainsi que de la recapture des VLDL et des *remnants* de chylomicrons par le foie. En effet, le gène de cette apoprotéine se trouve sur le chromosome 11, voisin de celui de l"Apo A1 et de l"Apo A4. La proximité de ces trois gènes sur le même chromosome les rend susceptibles d"une délétion globale. Ce phénomène serait responsable de 10 % des maladies cardiovasculaires prématurées survenant chez le jeune enfant [126].

5.3.4.4. Apolipoprotéines E

Principalement localisées au niveau des VLDL, les apolipoprotéines E (Apo E ou *arginine-rich proteins*) sont des apolipoprotéines structurales mineures qui participent à la régulation du catabolisme et de la captation des lipoprotéines riches en triglycérides ou en cholestérol. Leur synthèse a lieu au niveau de très nombreux organes : foie, cerveau, rein, mais pas au niveau intestinal (contrairement à d"autres apolipoprotéines). Les Apo E ont un rôle dans :

- la redistribution des lipides entre les différentes cellules au sein d"un même tissu ou d"un même organe.
- le transport des lipides depuis leur lieu de synthèse jusqu"aux organes effecteurs ; il existe un récepteur spécifique de l"Apo E au niveau hépatique, mais le plus important est le récepteur Apo B/E de Goldstein et Brown, qui reconnaît à la fois l"Apo B100 et l"Apo E, permettant ainsi l"épuration du cholestérol des LDL. L"Apo E est la clé du récepteur permettant l"internalisation du cholestérol. Elle serait de plus capable de moduler l"existence de ce récepteur au niveau de la membrane cellulaire.

Le gène codant pour cette protéine est situé sur le chromosome 19 et trois isoformes majeurs E2, E3 et E4 sont connues à ce moment [127].

L"importance de PPAR dans les maladies métaboliques et dans la régulation des lipoprotéines a été precisé grâce à l"utilisation de fibrates celles-ci, agonistes de PPARα pour le traitement de l"hyperlipidémie. Chez l"homme, les fibrates diminuent de manière efficace la concentration en triglycérides plasmatiques et augmentent le taux de cholestérol dans les lipoprotéines de haute densité (HDL) [128].

5.3.5. PPARα et lipoprotéines de haute densité (HDL) :

L"activation de PPARα par les fibrates augmente le taux des HDL en augmentant la production des apolipoprotéines AI et AII (apo AI et AII). En effet, il a été démontré que les promoteurs de l"apo AI et l"apo AII humaine possèdent un PPRE dans leur site A et J respectivement [129, 130]. Le rôle de PPARα dans le métabolisme des HDL a été confirmé chez des souris déficientes pour PPARα [131]. En plus d"augmenter le taux des HDL circulants, l"induction de l"expression de l"apo AI va aussi conduire à l"augmentation du transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. En plus de modifier l"expression des apoliprotéines constituant les HDL, les fibrates modulent l"expression d"enzymes impliquées dans la maturation et le catabolisme de ces particules. Ainsi, chez les rongeurs, les fibrates diminuent l"expression de la lipase hépatique [132], de la LCAT (*lecithin cholesterol acyl transferase*) [133], et augmentent la taille des HDL en induisant l"expression de la PLTP (*phospholipid transfert protein*) [134] et en diminuant l"expression protéique du transporteur SR-BI (*scavenger receptor-BI*) dans le foie [135].

5.3.6. PPARα et lipoprotéines riches en triglycérides :

La diminution des concentrations en triglycérides plasmatiques par les fibrates est liée à une augmentation, par PPAR α, dans le cœur, les muscles et le foie, de l"expression et de l"activité de

la LPL (lipoprotéine lipase) [136]. Cette enzyme est impliquée dans l"hydrolyse des triglycérides circulants contribuant ainsi à la diminution de leur taux plasmatique. De plus, les fibrates diminuent l"expression de l"apo CIII, un constituant des particules riches en triglycérides et un inhibiteur de la LPL [137], et augmentent l"expression de l"apo AV dont le taux plasmatique est inversement corrélé avec le taux de triglycérides. Ces effets associés à ceux observés sur le métabolisme des lipides vont conduire à une diminution de la production de particules riches en triglycérides mais aussi à une diminution des concentrations plasmatiques de ces triglycérides.

5.3.7. Les pathologies associées au métabolisme lipoprotéinique

De part leurs fonctions et leurs nombreuses implications dans le métabolisme de l"organisme, les apolipoprotéines et tous les acteurs du transport des lipides sont impliqués dans diverses pathologies. Ces maladies peuvent être la conséquence d"altérations génétiques comme une mutation entrainant la dysfonction ou l"absence de telle ou telle protéine ou la conséquence de facteurs environnementaux comme un apport excessif en graisse qui déborde les systèmes de stockage et de régulation du métabolisme lipidique. La plupart de ces dysfonctions mènent à des dyslipidémies, pouvant favoriser l"émergence de pathologies plus graves. Les apolipoprotéines sont impliquées dans diverses pathologies comme par exemple : La maladie d'Alzheimer, les Dyslipidémies, maladie de rétention des chylomicrons, la maladie de Tangier etc. Néanmoins, différentes études ont montre que les lipoprotéines jouent surtout un rôle important dans les maladies cardiovasculaires. En effet, des études épidémiologiques prospectives, montrent qu"une concentration plasmatique élevée en Lp (a) est un facteur de risque d"athérosclérose coronarienne. En outre, Wakabayashi et al [138], ont demontré que la lipoproteine-a est un déterminant indépendant de la rigidité artérielle chez des patients ayant un diabète de type 2. Néanmoins, la rigidité artérielle est connue pour être un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires. Wang et al [139], en ont démontré qu"il existe une augmentation de la rigidité artérielle associée à une athérosclérose sévère et une fragmentation de l"élasticité laminaire dans les parois aortique en utilisant un modèle de souris knockout pour Apo-E.

6. Myocardiopathies métaboliques

Las myocardiopathies métaboliques sont des affections cardiaques liées au déficit d"une étape du métabolisme cellulaire. Elles regroupent les troubles de la dégradation de graisses, les déficits de la chaine respiratoire et de façon plus anecdotique, les glycogénoses. Les deux premières catégories sont des maladies du métabolisme intramitochondrial, les enzymes du métabolisme du glycogène

sont toutes situées en dehors des mitochondries. Dans les cellules eucaryotes, les réserves énergétiques sont constituées par des lipides (triglycérides ou triacylglycérols) et des polysaccharides (glycogène chez les animaux et amidon chez les plantes). Chez les animaux, les triglycérides (triesters d"acides gras et de glycérol) constituent la principale réserve énergétique de l"organisme. Ces triglycérides peuvent être stockés sous forme de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (*lipid droplets*, formées de triglycérides et d"esters de cholestérol) dans les adipocytes, mais aussi dans toutes les cellules de l"organisme. Les triglycérides cytoplasmiques sont synthétisés par chaque cellule à partir d"acides gras exogènes (d"origine alimentaire, ou hépatique, et transportés par des lipoprotéines qui libèrent les acides gras lors de leur lipolyse), et endogènes (biosynthétisés par les cellules). Cette biosynthèse se fait à partir d"acyl-CoA et de glycérol-3-phosphate qui donnent du 1,2-diacylglycérol-3-phosphate servant à la synthèse de phospholipides et des triacylglycérols. Ces triglycérides des réserves peuvent être dégradés par divers types de lipases qui hydrolysent des liaisons esters et libèrent progressivement les acides gras [140, 141]. Ceux-ci peuvent être utilisés par la cellule elle-même, pour la production énergétique, ou pour la synthèse de lipides complexes membranaires. Ils peuvent en outre être libérés par la cellule (c"est le cas du tissu adipeux) et transportés par le sang (par l"albumine principalement) vers d"autres cellules utilisatrices. Les perturbations du métabolisme lipidique sont associées à diverses formes de cardiomyopathie, dont la plupart résultent d"une déficience de la β-oxydation. Les déficiences congénitales du transport des AG vers la mitochondrie sont liées à la navette carnitine. Certaines formes portent sur une réduction du transport de la carnitine vers le myocyte. La déficience myopathique en carnitine a été attribuée à un défaut du transport de la carnitine à travers la membrane plasmatique des myocytes. L"affaiblissement musculaire est associé à un excès myocytaire de dépôt lipidique qui affecte le myocarde chez certain patients. La déficience systémique en carnitine est une autre forme associée à une dysfonction hépatocérébrale, un affaiblissement musculaire progressif et les plus souvent une cardiomyopathie (dilatée ou hypertrophique). D"autres formes affectent les enzymes de la navette carnitine, par exemple la déficience en carnitine translocase (enzyme liée aux cardiolipides mitochondriaux), la déficience congénitale en CPT2 et en CPT1. D"autres cas de déficience portent sur la β-oxydation elle-même par exemple, la déficience en Acyl-CoA déshydrogénsase, première étape de la β-oxydation a été décrite mais reste rare. Une déficience de l"isoenzyme spécifique des longes chaîne (LCAD), déficience en l"isoenzyme spécifique des très longues chaînes (VLCAD) et d"une down-régulation de l"acyl-coA déshydrogénase spécifique des chaînes moyennes (MCAD) ces altérations peuvent donner de tableaux aigus très sévères qui peuvent conduire à une hypertrophie myocardique, troubles du rythme et insuffisance cardiaque.

Les défauts de la chaîne respiratoire représentent une grande cause d"atteinte cardiaque [142], cette atteinte est très souvent une myocardiopathie hypertrophique qui peut évoluer vers l"insuffisance cardiaque. Des troubles du rythme et de la conduction sont également possibles.

6.1. Mitochondrie

La mitochondrie est un organite intracellulaire qui est responsable de la majorité de la production de l"énergie sous forme d"ATP pour la cellule et représente donc une structure cruciale du fonctionnement cellulaire. La mitochondrie possède un système de double membrane (interne et externe) qui délimite l"espace matriciel mitochondrial dans lequel se trouve, entre autre les enzymes du cycle de Krebs et de la β-oxydation. Le catabolisme de glucides, acides gras et acides aminés s"accompagne de la production d"équivalents réduits que sont le NADH et le $FADH_2$. L"oxydation de ces équivalents réduits par l"O_2 a lieu au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale est à la base de la formation d"énergie.

6.2. Structure de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'ATP synthase.

Les quatre complexes qui constituent la chaîne respiratoire mitochondriale son la résultante de l"association d"une cinquantaine de polypeptides. Chaque complexe est indépendant et contient des groupements prosthétiques engagés dans une série de réactions d"oxydoréduction. En termes de flux d"électrons les complexes sont disposés en fonction de leur potentiel d"oxydoréduction (Figure.10).

- **Complexe I. NADH-Ubiquinone oxydoréductase :**

Le transfert initial d"électrons nécessite le cofacteur réduit NADH. Ce dernier est oxydé sur la face matricielle de la membrane par la NADH-déshydrogénase. Le complexe I catalyse le transfert de 2 électrons du NADH à l"ubiquinone, couplé à l"expulsion de protons de la matrice vers l"espace intermembranaire. Le complexe I peut être inhibé par la roténone.

- **Complexe II. Succinate –ubiquinone oxydoréductase :**

Le complexe II accepte deux électrons du succinate et catalyse la réduction du ubiquitone oxydoréductase en ubiquitone-H2, le succinate étant transformé en fumarate. La réaction met en jeu le FAD, des centres [Fe - S] et le cytochrome b560 attaché au complexe II. Le complexe II joue un rôle important puisque c'est par lui qu'entrent les électrons :

* du FADH2 issu du cycle de Krebs

* porté par le (NADH + H+) formé lors de la glycolyse est transféré sous forme de FADH2 dans la mitochondrie par des systèmes de "navette"

L"utilisation de malonate permet d"inhiber l"activié de ce complexe.

- **Complexe III. Complexe b-cl (ubiquinol-cytochrome C réductase) :**

Les ubiquinones sont des transporteurs libres d"électrons depuis les complexes I et II vers le complexe III. Ce dernier permet un transfert d"électrons à un deuxième transporteur mobile situé dans l"espace intermembranaire, le cytochrome c, qui le relie au dernier complexe de la chaîne respiratoire. Ce transfert d"électrons de l"ubiquinone au cytochrome c est un processus associé à un efflux de protons. L"antimycine A et le myxothiazol inhibent le complexe III à des étapes différentes du transfert d"électrons.

- **Complexe IV. Cytochrome c oxydase :**

Le complexe IV catalyse la dernière réaction d"oxydoréduction qui réduit l"O_2 en H_20 par 4 électrons. Le transfert des électrons est irréversible contrairement à celui ayant lieu entre les complexes I et III. Ce transfert d"électrons est associé à un efflux de protons vers l"espace intermembranaire. Le cyanure est un inhibiteur de la cytochrome c oxydase.

- **L'ATP synthase. F0F1-ATP synthase :**

L"ATP synthase couple la diffusion facilitée des protons à la synthèse d"ATP à partir d"ADP et de Pi et permet donc de transformer la différence de potentiel électrochimique de protons en énergie chimique. L"ATP synthase est inhibée par l"oligomycine qui bloque le transport de protons.

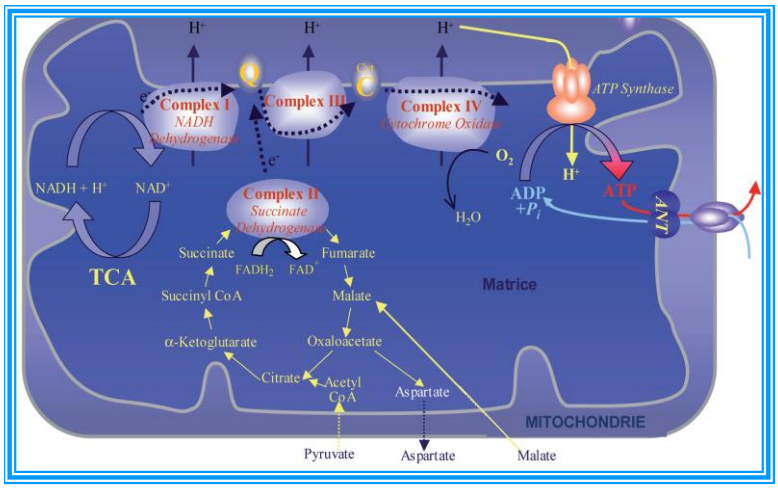


Figure 10. Schéma des complexes de la chaine respiratoire (d"après wikipedia).

7. Myocardiopathies mitochondriales

On désigne, sous le terme de myocardiopathie, l"ensemble des maladies primitives du myocarde associées à une dysfonction cardiaque [143] excluant les myocardiopathies secondaires à une cause précise (anomalies valvulaires, ischémie...). Les myocardiopathies mitochondriales, par

convention, ne comprennent que les seules myocardiopathies dues à un déficit de l"activité de la chaîne respiratoire. Sont donc exclus non seulement les myocardiopathies métaboliques n"intéressant pas le compartiment mitochondrial (maladies lysosomales telles que glycogénoses et mucopolysaccharidoses) mais aussi les déficits enzymatiques mitochondriaux concernant la béta-oxydation des acides gras. Cette définition restrictive tient à l"histoire des cytopathies mitochondriales individualisées initialement par les anomalies morphologiques mitochondriales observées en ultra structure. Mais les anomalies de nombre, de taille et de structure des mitochondries ne sont pas strictement spécifiques puisque l"on peut en rencontrer en cas de myocardiopathie acquise (ischémique, alcoolique...) [144]. Les myocardiopathies sont loin d"être exceptionnelles chez l"enfant : Elles représentent de 7 à 8 % des pathologies cardiaques pédiatriques [145]. Les myocardiopathies métaboliques représenteraient 20 % de cet ensemble [146]. Une incidence élevée (plus de 50 %) de déficit d"activité d"un ou de plusieurs complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire a été trouvée dans ces myocardiopathies, qu"il s"agisse de forme dilatée ou hypertrophique [147, 148]. Leur pronostic, sévère, est dominé par le risque d"incompétence myocardique progressive et de mort subite par trouble du rythme. Parmi les anomalies du métabolisme énergétique, les cytopathies mitochondriales sont à l"origine de myocardiopathies de révélation souvent précoce, dans l"enfance, voire en période néonatale ou même anténatale. Il est nécessaire de rechercher une origine mitochondriale à une myocardiopathie d"étiologie inconnue même isolée. La progression dans l"identification des différentes mutations concernant l"ADNmt, responsables de cytopathie mitochondriale et notamment de myocardiopathie, a révolutionné le concept et l"approche thérapeutique possible des cytopathies mitochondriales.

7.1. Physiopathologie

La cellule myocardique est la plus riche de l'organisme en mitochondries. Elle fonctionne presque exclusivement en aérobiose et sa contraction demande une formation importante d'adénosine triphosphate (ATP). Une diminution de production d'ATP peut se traduire cliniquement par une atteinte cardiaque. La myocardiopathie fait ainsi partie des symptômes fréquents en cas d'anomalie de la phosphorylation oxydative mitochondriale. L'atteinte myocardique est trouvée dans plus de 10 % des cas de cytopathie mitochondriale [145]. À l'inverse, la recherche systématique d'éléments en faveur d'une atteinte mitochondriale chez les enfants souffrant de myocardiopathie inexpliquée a été très productive puisque plusieurs études ont révélé que près de 20 % de ces patients étaient atteints de cytopathie mitochondriale [146]. Le déficit en complexe I ou en NADH coenzyme Q réductase semble être le plus fréquent. Il est notamment responsable d'une forme infantile grave avec

myocardiopathie hypertrophique hypokinétique, associée à une hypotonie, un retard psychomoteur, des troubles respiratoires et une acidose lactique, d'évolution rapidement fatale en quelques mois. Mais il peut aussi entraîner un phénotype musculaire isolé avec une myopathie débutant dans l'enfance ou l'adolescence (l'acidose lactique est surtout marquée après un exercice musculaire) et une myocardiopathie latente de type hypertrophique. Le déficit en complexe IV ou en cytochrome C oxydase est décrit avec une forme musculaire associée à une myocardiopathie hypertrophique débutant dans l'enfance, d'évolution lente, et à l'apparition d'une insuffisance cardiaque à l'adolescence [149]. Cependant, il existe des cas où l'atteinte cardiaque est prédominante et l'évolution rapidement fatale. C'est aussi dans ce déficit qu'est décrite la forme infantile bénigne du nourrisson, initialement très préoccupante avec myocardiopathie hypertrophique hypokinétique, qui s'améliore progressivement spontanément au cours des 2 premières années [150]. Le déficit combiné en complexe I et IV est, des déficits associés, celui qui est le plus souvent rapporté [151]. Il est à l'origine d'une myocardiopathie hypertrophique dans la majorité des cas. On le retrouve aussi dans certains syndromes de KEARNS-SAYRE [144]. Il peut, dans ce cas, s'associer à un déficit en complexe III ou coenzyme Q cytochrome C réductase [144]. Le déficit en complexe III ou coenzyme Q cytochrome C réductase et, plus précisément, en cytochrome b, sous unité de ce complexe, est responsable de la myocardiopathie histiocytoïde (appelée également lipidose cardiaque isolée, ou histiocytose lipidique, ou encore myocardiopathie lipidique focale) qui débute chez le nourrisson et a une évolution rapidement fatale. Elle entraîne une arythmie avec risque majeur de mort subite. Elle se caractérise par une atteinte isolée des fibres myocardiques avec, sur le plan histologique, myofibrilles éparses, dépôts de gouttelettes lipidiques et de glycogène entre celles-ci et accumulation de mitochondries. En étude enzymologique, le déficit en complexe III est uniquement trouvé dans le myocarde [152]. Tous les types et associations de déficits enzymatiques constitutionnels de la chaîne respiratoire mitochondriale peuvent être observés dans les myocardiopathies en sachant que leurs caractéristiques anatomofonctionnelles (hypertrophique, dilatée) ne sont pas discriminantes [153]. Les cardiomyopathies hypertrophiques ou dilatées s"accompagnent d"altérations morphologiques biochimiques et fonctionnelles des mitochondries. Les premières descriptions font état de mitochondries en grand nombre mais plus petites, souvent gonflées, avec une membrane interne altère [154]. Cela s"accompagne de la diminution d"enzymes marqueur de la masse mitochondriale, comme le citrate synthase et d"une diminution de l"utilisation des acides gras au profit des carbohydrates.

8. Cardioprotection endogène par l'adénosine

L'**adénosine** est un nucléoside formé lorsque l'adénine est attachée à un noyau ribose (sous forme de ribofuranose) via une liaison β-N_9glucoside. Elle joue un rôle important dans les processus biochimiques, telles le transfert d'énergie - comme adénosine triphosphate (ATP) et adénosine diphosphate (ADP) - ainsi que dans la transduction de signaux comme adénosine monophosphate cycliquee, AMPc. Elle a également un rôle de neurotransmetteur de type hormonal. Ses principaux sites de formation au niveau cardiaque sont l'endothélium vasculaire (coronaire) et les cardiomyocytes. La source la plus importante de formation de l'adénosine est la déphosphorylation de l'AMP (adénosine monophosphate) par l'enzyme 5'-nucléotidase (Figure.11). La formation d'adénosine est augmentée dans tous les cas où l'activité de la 5'-nucléotidase est augmentée et où la dégradation d'ATP en AMP est importante, en réponse à la diminution des apports et/ou à l'augmentation de la demande en oxygène au niveau du myocarde, l'ATP est hydrolysé en AMP, ce qui augmente la formation d'adénosine, qui est un puissant vasodilatateur artériolaire. L"adénosine effectue son rôle neuromodulateur à travers de l'union à 4 types de récepteurs différents, qui ont été clonés au début des années 90 : A1, A2A, A2B, A3. Ces 4 récepteurs forment le sous-type de récepteurs purinergiques P1, que sont codifiés par des gènes indépendants et possèdent une affinité différente pour l"adénosine. Les récepteurs A1, A2A et A3 sont considérés de haute affinité, tandis que les récepteurs A2B présentent une basse affinité pour l"adénosine. Ces récepteurs purinergiques appartiennent à la famille de récepteurs associés aux des protéines G. L'activation des récepteurs A1 inhibe l'adénylcyclase, diminue la concentration d'AMP cyclique intracellulaire et favorise l'ouverture des canaux potassiques, ce qui réduit indirectement la pénétration de calcium à l'intérieur de la cellule. La stimulation des récepteurs A2 a un effet inverse, elle active l'adénylcyclase. Les effets de la stimulation des récepteurs A3 sont encore mal cernés; on sait cependant qu'elle entraîne une dégranulation des mastocytes avec libération de divers médiateurs à effet pro-inflammatoire. Les effets de l'adénosine résultant de la stimulation des récepteurs A1, A2 et A3 aux conséquences souvent opposées sont extrêmement complexes. L'adénosine est donc la pierre angulaire de l'autorégulation métabolique du flux coronaire : en réponse au déséquilibre entre apport et demande, elle va augmenter le débit coronaire (effet vasodilatateur par le biais des récepteurs A_2) et diminuer la demande en oxygène (diminution de la libération des catécholamines, effet chronotrope et dromotrope négatif, augmentation de l'influx de glucose dans les cellules hypoxiques par le biais des récepteurs A_1). Outre ses effets sur l'autorégulation métabolique, l'adénosine est une molécule dont l'action se situe au carrefour de tous les mécanismes potentiellement responsables des lésions de reperfusion. Ces effets sont classiquement mis sur le compte de l'activation des récepteurs A_2 [155, 156].

En agissant sur ce récepteur, l'adénosine a un effet inhibiteur sur l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium, sur la libération de radicaux libres par les neutrophiles activés (anion superoxyde), sur l'agrégation plaquettaire et sur la libération de thromboxane A_2. Enfin, l'adénosine est l'un des médiateurs de l'effet de préconditionnement. Ce mécanisme cardioprotecteur a été décrit pour la première fois par MURRY *et al.* en 1986 [157]. Plusieurs récepteurs ont été étudiés pour expliquer le phénomène de préconditionnement. De nombreuses études ont montré que l'adénosine, par l'intermédiaire de son récepteur A_1, jouait un rôle important dans le déclenchement du phénomène de préconditionnement [158, 159].

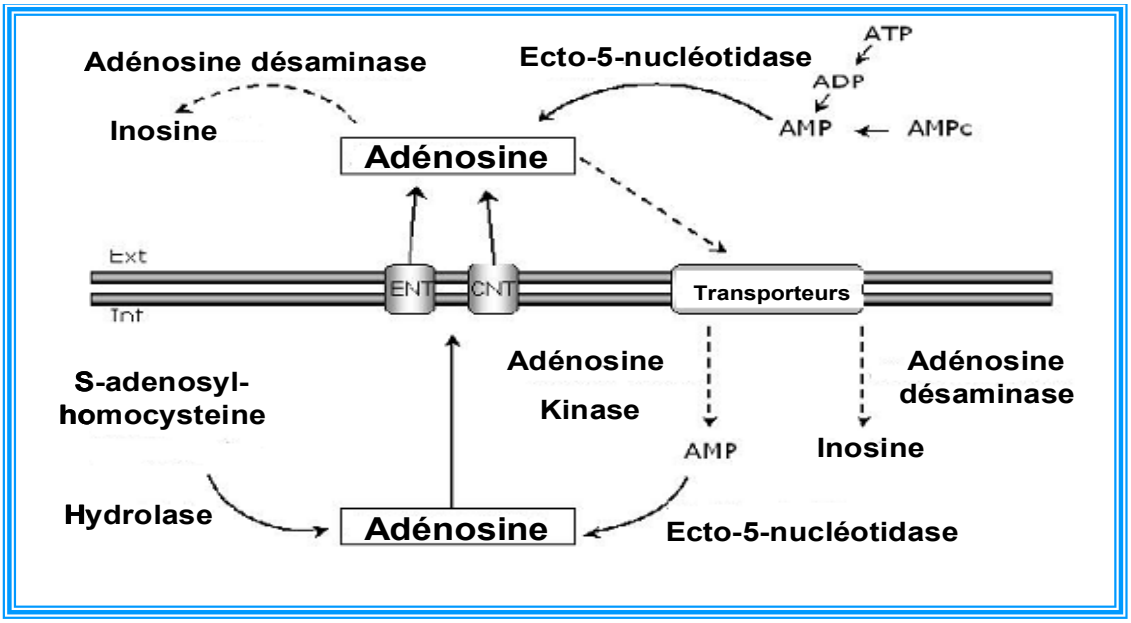


Figure 11. Biosynthèse (ligne continue) et inactivation (ligne pointillée) de l'adénosine. Abréviations : ENT (Transporteur de nucléotides équilibré), CNT (Transporteur de nucléotides concentré).

Objectifs du travail

Au cours du développement, les modifications du métabolisme des monocarbones liées à une malnutrition peuvent être délétères autant pour la mère que pour le nouveau-né. De plus, les conséquences à long terme d"une carence en période gestationnelle et périnatale sont mal connues, notamment en ce qui concerne les pathologies cardiaques. Le rôle de l"homocystéine comme cause ou conséquence des maladies cardiovasculaires n"est pas suffisamment connu à ce jour, notamment dans le contexte de l"échec des essais d"intervention en vitamines donneuses de méthyles (folate et vitamine B12). Nous émettons l"hypothèse d"un lien fort entre métabolisme des lipides et métabolisme des monocarbones à la lumière de travaux récents montrant une influence de l"homocystéine sur la dysfonction systolique ventriculaire gauche (DSVG) et sur les anomalies du métabolisme des lipoprotéines mis en évidence dans deux modèles de souris transgéniques hyperhomocystéinémiques. Pour répondre à cette double question, nous avons:

1) étudié les répercutions du régime carencé en donneurs de groupements méthyles conduisant à une hyperhomocystéinémie sur la fonction myocardique chez le raton de 21 jours né de mères carencées, en centrant notre intérêt sur le métabolisme cellulaire oxidatif des acides gras
2) évalué l"influence des déterminants nutritionnels et métaboliques, vitamine B12, folates, homocysteine et acide méthylmalonique sur le transport plasmatique des lipides dans une population âgée de Sicile, en fonction du risque de développer une artéripathie oblitérante périphérique

ETUDE 1

La carence en donneurs de methyles induit une cardiomyopathie hypertrophique par un desequilibre de la methylation/acetylation de PGC-1α, chez le raton.

Matériels et méthodes

1. Animaux et modèle

1.1. Entretien des animaux

Animaux : Les animaux utilisés dans les expérimentations sont de rats Wistars (Charles River, l'Arbresle, France). Cinq males et cinq femelles sont maintenues à température ambiante (23°C ± 3°C), avec des cycles de 12 h de lumière pour 12 h d'obscurité et un libre accès à la boisson. Les animaux ont été traités en accord avec les recommandations du National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Régime alimentaire : Les animaux ont été soumis à un régime méthyle déficient (Special Diet Service, Saint-Gratien, France) et un régime standard (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France). Le régime méthyle déficient contenant des Vitamine B12 (0 µg/Kg), B2 (0,34 mg/Kg), folates (10 µg/Kg) et choline (60 µg/Kg). Le régime standard est un régime normal complet en vitamine B12 (0.04 mg/Kg), B2 (13 mg/Kg), folates (0.9 mg/Kg), méthionine (4800 mg/Kg) et choline (2100 mg/kg).

Protocole : Un mois avant la mise en accouplement, les rats femelles sont nourris avec une alimentation standard et une alimentation carencée en groupements méthyles. Le carence est maintenue durant toute la gestation et jusqu'au sevrage des ratons (21 jours postnatale). Une étude complémentaire à été menée dans le but de comprendre les effets d'un retour à un régime normal (de 21 à 80 jours) pour les ratons nés de mère carencée. Au regard de ce traitement 2 groupe ont été définis : Le groupe témoin ou la mère a reçu une nourriture standard et le groupe carencé ou la mère a reçu une nourriture carencée en groupements méthyles [160].

1.2. Prélèvement

Les portées ont été sacrifiées à l'âge de 21 jours par décapitation. Avant de la décapitation, les animaux sont anesthésiés sous halothane et un prélèvement sanguin intracardiaque a été réalise. Après la décapitation, le cœur entier a été collecté et rincé dans une solution physiologique PBS (2,7 mmol/L KCl, 140 mmol/L NaCl, 6,8 mmol/L $Na_2HPO_42H_2O$, 1,5 mmol/L KH_2PO_4, pH 7,4). Le cœur destiné à l'étude histopathologique et à la microscopie électronique a été fixé dans du glutaraldehyde 2,5 % dans du tampon cacodylate de sodium pH 7.2 à 4°C. Le cœur destiné au protocole d'immunohistofluorescence a été plongé dans une solution de méthylbutane froide (-30°C). Les cœurs destinés aux analyses biochimiques et de

biologie moléculaire ont été congelés dans de l"azote liquide et conservés à -80 °C jusqu"à leur utilisation.

2. Phenotypage tisulaire

2.1. Analyses Morphologiques

Le cœur a été plongé dans une solution de méthylbutane froide (-30°C) et immédiatement coupé à l"aide d"un cryostat, l"épaisseur des coupes était de 20µm. Les coupes sont déposées sur lames à bords rodés (Menzel-Glaser), non fixées, les lames sont ensuite montées avec une lamelle et un milieu de montage (Eukitt). Les coupes ont été évaluées avec un système d"analyses d"image MCID™ (Cambridge, UK) qui à permit la visualisation de la coupe complète.

2.2. Microscopie électronique

Le cœur prélevé à été coupé en cœur gauche et cœur droit, le cœur gauche a été coupé en petits morceaux et fixé pendant 2 h dans du glutaraldehyde 2,5 % et tamponné avec une solution de cacodylate 0,1 mol/L pH 7.2, à 4°C. Les tissus fixés sont rinçés avec du tampon cacodylate pendant plusieurs heures (minimum 3 h), puis ils sont post-fixés au tétroxyde d"osmium 1 % dans le tampon cacodylate pendant 1h à température ambiante. Les tissus sont ensuite déshydratés par incubations successives dans un bain d"éthanol (50 % à 100 %) et enfin ils sont inclus dans une résine (EPON). De coupes ultra-fines de 70 à 90 nm sont réalisées à l"aide d"un ultra-microtome Reichert-Yung et contrastées à l"acétate d"uranyle et au nitrate de plomb. Celles-ci sont observées à la microscopie électronique de transmission (Philips, CM 12, Hollande). Parallèlement, des coupes semi-fines de 1,5 µm sont réalisées et contrastées au bleu Azur II et observées à la microscopie optique (Olympus).

2.3. Immunohistologie

Les coupes de 20 µm réalisées à l"aide d"un cryostat sont incubées à température ambiante, puis elles sont fixées dans un bain du paraformaldéhyde à 4 % pendant 15 min également à température ambiante, ensuite plongées dans un bain de PBS, 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce. Les coupes obtenues sont incubées en présence de Triton à 0,1 % afin de perméabiliser les membranes, 2 fois pendant 10 min à température ambiante et rincées dans un bain de PBS, 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce. Chaque coupe est ensuite recouverte de BSA à 10 % diluée dans du PBS

pendant 1 h à température ambiante afin de bloquer les sites non spécifiques. L"anticorps primaire, anti-OCTN2 (Chemicon Int., Temecula, CA), dilué 1/200 dans de la BSA, est déposé sur les coupes et incubé à 4°C pendant une nuit dans une chambre humide à l"abri de la lumière et ensuite rincé 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce dans un bain de PBS. Après lavage, l"anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, dilué 1/2000 dans une solution de PBS-BSA 10 % est déposé sur chaque coupe pendant 1 h à l"obscurité dans une chambre humide à température ambiante, après cette étape, les coupes sont lavées et incubées pendant 1min à température ambiante avec du DAPI (5µg/ml). Finalement, les lames sont montées avec une lamelle et un milieu de montage (Gel/Mount, Biomeda).

Pour la détection de l"apoptose, nous avons utilisé deux tests : un test basé sur la sensibilité accrue de l"ADN à la dénaturation thermique des cellules apoptotiques et comme deuxième méthode nous avons utilisé la technique TUNEL. Le premier test, permet la dénaturation de l"ADN par chauffage à 56°C en présence de formamide, et son marquage par l"anticorps monoclonal spécifique de l"ADN simple brin. Le protocole à été adaptée selon Frankfurt et al [161]. Les coupes sont fixées pendant 1 h à température ambiante avec du paraformaldéhyde 5 % après lavage au PBS les coupes sont immergées dans une solution de méthanol à 80 % pendant 45 min à température ambiante puis dans un bain de saponine à 0,2 mg/ml pour perméabiliser les membranes pendant 45 min à température ambiante. Après lavages au PBS, les coupes sont incubées dans une solution de formamide à 50 % pendant 20 min au bain- marie à 56°C et lavées avec du PBS froid avant d"être recouvertes d"une solution de BSA à 10 % contenant 0,2 mg/ml de saponine afin de bloquer les sites non spécifiques pendant 1 h à température ambiante dans une chambre humide. Parallèlement, l"anticorps primaire Apostain (anti-ADNsb/Apostain, AbCys SA) diluée 1/10 dans une solution de BSA à 10 % contenant 0,2 mg/ml de saponine est déposé sur les coupes (100 µl par coupe), l"incubation est réalisée à 4°C pendant deux nuits dans une chambre humide à 4°C. A l"abri de la lumière et après lavages au PBS, l"anticorps secondaire (Alexa Fluor 555 de chèvre **anti IgM** de souris diluée 1/1000) est couplé à un fluorochrome, préparé extemporanément dans du PBS-BSA 10 % est déposé sur chaque coupe à température ambiante pendant 1h à température ambiante. Après lavage au PBS, les coupes sont incubées avec du DAPI (dilué au 1/200 5 µg/ml) pendant 30 s à température ambiante et à l"obscurité dans une chambre humide afin de marquer l"ensemble des noyaux. Les lames sont ensuite montées avec une solution Gel/Mount™. Les lames sont conservées à l"obscurité dans du papier aluminium à 4°C. Le deuxième test correspond à la technique **TUNEL**, qui signifie *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling*. Cette méthode est basée sur le fait que les cellules

apoptotiques voient leur ADN dégradé par des nucléases. Cette dégradation génère des 3' OH libres qui sont reconnus par les transférases qui vont leur ajouter un dUTP biotinylé ou marqué avec un fluorochrome. Il suffit de visualiser le marquage: plus il y a de marquage plus il y a de cellules apoptotiques. La technique a été réalisé en utilisant un kit commercial conformément aux recommandations du fabricant (TdT – FragEL ™ DNA Fragmentation detection kit, Calbiochem, germany).

3. Analyses hémodynamiques et fonctionnelles (évaluation de la fonction cardiaque)

3.1. Mini TEP

La **tomographie par émission de positons** (TEP) est une méthode d'imagerie médicale qui permet de mesurer en trois dimensions l'activité métabolique d'un organe grâce aux émissions produites par les positons issus de la désintégration d'un produit radioactif injecté au préalable. (Terminologie anglo-saxonne : *« positron emission tomography »* - PET ou PETscan-). La TEP repose sur le principe général de la scintigraphie qui consiste à injecter un traceur dont on connaît le comportement et les propriétés biologiques pour obtenir une image du fonctionnement d'un organe. Ce traceur est marqué par un atome radioactif (carbone, fluor, azote, oxygène...) qui émet des positons dont l'annihilation produit elle-même deux photons. La détection de la trajectoire de ces photons par le collimateur de la caméra TEP permet de localiser le lieu de leur émission et donc la concentration du traceur en chaque point de l'organe. C'est cette information quantitative que l'on représente sous la forme d'une image faisant apparaître en couleurs les zones de forte concentration du traceur, ce traceur est le plus souvent le fluor (^{18}F) incorporé dans une molécule de glucose formant le Fluorodeoxyglucose marqué au Fluor 18 (^{18}F-FDG), un sucre semblable au glucose, mais rendu radioactif. C"est la radioactivité de ce fluor particulier rajouté au glucose qui permet sa détection par la caméra TEP. Pour vivre, fonctionner et se reproduire, les cellules ont besoin d"énergie sous forme de glucose, sucre assimilable par l"organisme. Cette source énergétique est essentielle aux nombreuses cellules de l"organisme et elle se trouve naturellement dans le sang. Plus l"activité des cellules est importante, plus leur consommation de glucose augmente. Le ^{18}F-FDG se comporte comme le glucose, mais contrairement à celui-ci, il n"est pas une source d"énergie utilisable par la cellule. Il s"accumule dans la cellule qui devient radioactive. En effet, la molécule ^{18}F- FDG est phosphorylée par la cellule qui "tente" de l'assimiler dans son métabolisme, ce qui l'empêche de ressortir de la cellule et le ^{18}F-FDG-6P s'y accumule. En

devenant radioactive, la cellule émet des rayonnements qui peuvent être détectés par la caméra TEP. Toutes les informations recueillies par la caméra TEP reposent sur la radioactivité repérée dans les tissus après l'injection du ^{18}F-FDG à l"animal. Le système informatique relié à la caméra TEP produit des coupes et des images en trois dimensions des sites du corps où le ^{18}F-FDG s'est accumulé, la (figure. 12) montre le processus d"acquisition.

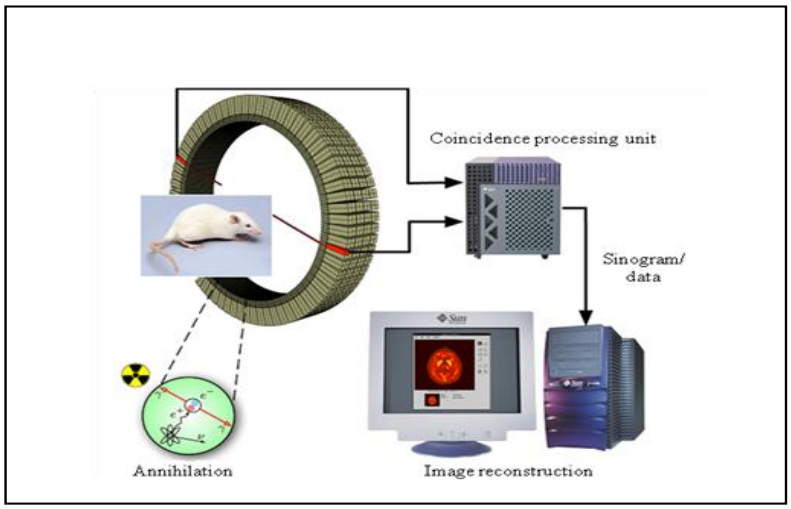


Figure 12. Schéma du processus d"acquisition d"une TEP

Protocole : La **tomographie par émission de positons** a été effectuée en utilisant un *animal Small monitoring and gating system M* 1025T, (Inveon Siemens Medical USA, Inc). Les animaux (rat de sexe male) ont été pesés et anesthésiés en fonction du poids de son corps, ensuite on injecte au rat 74 MBq de ^{18}F-FPRGD4 (injection intraveineuse par voie pénienne). L"animal anesthésié est placé en position ventrale sur le lit d"examen et 4 électrodes sont placées sur les pattes de l"animal. L"examen est réalisé en orbite circulaire sur 180° en allant de 110° jusqu"à 290°, les acquisitions se font pendant 25 min, 30 min après l"injection de ^{18}F-FPRGD4. Pour chaque scan TEP, les régions d"intérêt au niveau cardiaque ont été dessinées en employant le logiciel de fournisseur (ASI Pro 5.2.4.0; Siemens Medical). Une fois l"examen terminé, les animaux sont placés dans l"enceinte pendant 24 heures avant d"être transportés vers une animalerie radioactive pendant une semaine, jusqu"au sevrage du radiomarqueur.

3.2. Mesure de la tension artérielle par la méthode du manchon caudal « Tail cuff method »

La mesure de la pression artérielle systolique au niveau de l"artère caudale peut se faire *in vivo* chez un rat vigil grâce au système *tail-cuff méthode* automatisé et informatisé. Cette

méthode permet de mesurer les pulsations du flux sanguin au niveau de l"artère caudale et de déterminer la pression artérielle systolique correspondant à la disparition de ce flux à la suite du gonflement d"un manchon en latex autour de la queue du rat [162].

Protocole :

L"examen est réalisé que sur des animaux ayant une queue suffisamment longue et en bon état. L"animal est placé dans une boîte de contention aimantée sur une plateforme chauffante (Hatteras Instruments, Blood Pressure Analysis System, model SC-1000). La queue du rat qui dépasse du compartiment est glissée à travers un ballonnet puis posée sur un capteur photoélectrique (Figure 13). Le ballonnet est gonflé par de l"air envoyé par l"enregistreur, et il est relié à un manomètre (qui permet de calibrer l"enregistreur et de vérifier la pression du ballonnet à tout moment). Lorsque la pression dans le ballonnet augmente, il comprime l"artère caudale, empêchant progressivement le sang de passer. Lorsque la pression du ballonnet est égale à la pression systolique de l"artère, celle-ci est écrasée ce qui empêche la circulation du sang.

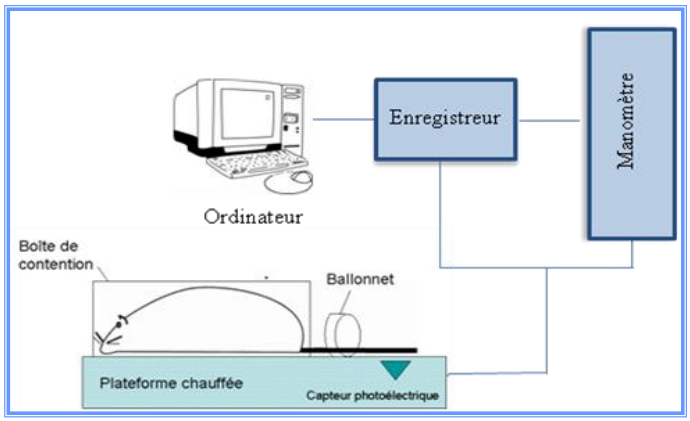


Figure 13. Schéma du montage pour les mesures de pression artérielle des rats.

Le capteur pléthysmographique de l"appareil utilisé fonctionne en convertissant l'énergie lumineuse en énergie électrique : c'est un capteur photoélectrique. Il fonctionne en envoyant un rayon lumineux à travers la peau et en mesurant la quantité de lumière réfléchie. Le capteur photoélectrique convertit la lumière réfléchie en signaux électriques, qui sont ensuite affichés et traités par l'enregistreur. L"intensité de la lumière réfléchie vers le capteur photoélectrique dépend directement du volume sanguin ; une diminution de la lumière réfléchie correspond donc à une diminution du volume sanguin dans l"artère. Ainsi quand la pression augmente dans le ballonnet, l"artère est écrasée, ce qui diminue le passage du sang et provoque une diminution du signal, jusqu"à ce qu"il soit inférieur au seuil d"extinction (défini automatiquement par

l"appareil en fonction du rapport signal/bruit). Cela est interprété par l"enregistreur comme étant la valeur de la pression systolique.

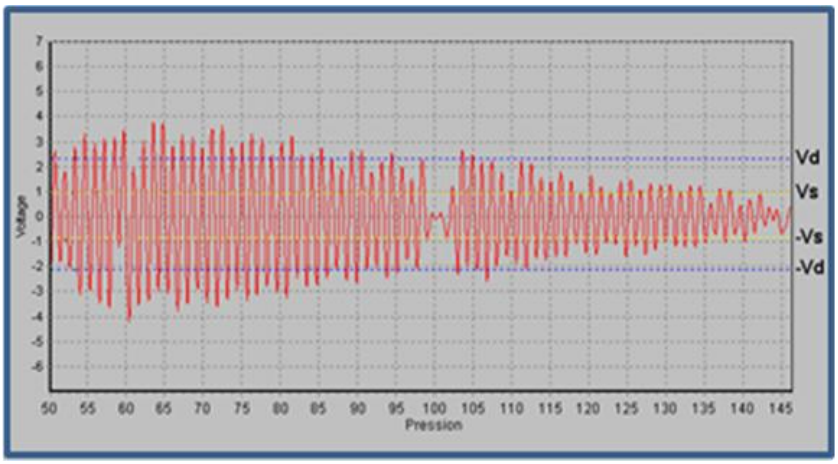


Figure 14. Visualisation du signal recueilli par l"enregistreur au moment de la disparition du signal, soit de la détermination de la pression systolique de l"animal. Vd : seuil d"extinction pour la pression diastolique Vs : seuil d"extinction pour la pression systolique.

Afin d"obtenir des signaux reproductibles (Figure. 14), les rats sont entraînés pendant deux semaines avant les mesures de pression artérielle. En effet, la boîte de contention chauffée est une source de stress pour l"animal, ce qui entraîne une modification de ses paramètres physiologiques (augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle). Pour éviter ce biais, les animaux subissent deux séries de mesures par jour, pour les habituer à la boîte de contention, au bruit de l"appareil et au gonflement du ballonnet autour de leur queue. Seules les mesures obtenues après cette semaine d"entraînement sont prises en compte pour les calculs déterminant la pression artérielle.

4. Dosages plasmatiques

Avant le sacrifice, les animaux sont anesthésiés avec de l"halothane et un prélèvement sanguin intracardiaque est réalisé. Le sang est transféré dans des tubes héparines et ensuite centrifugé à 1000 g/4°C/10 min pour séparer le plasma des globules rouges qui est conservé à -20°C, jusqu"aux dosages.

4.1. Détermination de la concentration de vitamines B12 et B9 (folates)

Les dosages sont effectués après centrifugation (1000 g/4°C/10 min) sur le plasma obtenu, 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 [^{57}Co] et folates [^{125}I]) vis à vis d"un nombre restreint et constant de sites de fixation. Par conséquent, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de l"échantillon. Grâce à cette technique, les taux de vitamine B12 et de folates sont déterminés simultanément dans un seul tube, 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 à 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).

4.2. Détermination de la concentration d'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 2ème 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.

4.3. Détermination de la concentration du BNP

Les peptides natriurétiques de type B comme le BNP, ainsi que le NT-proBNP, se sont imposés comme des biomarqueurs majeurs des pathologies cardiovasculaires, et notamment de l"insuffisance cardiaque. Le BNP est une neuro-hormone à 32 acides aminés synthétisée par les

myocytes des ventricules cardiaques lors d"une tension pariétale accrue par le volume et la pression. Le dosage de BNP a été réalisé grâce au kit commercial Max rat BNP-45 Elisa, conformément aux recommandations du fabricant.

4.4. Concentration de Carnitine et acylcarnitines

La concentration de carnitine libre ainsi que des acylcarnitines a été faite par spectrométrie de masse (Chromosystems Diagnostics by HPLC&LC-MS/MS Germany) en utilisant un kit qui permet la détermination semi-quantitative. La préparation des échantillons est basée sur l"extraction efficace des molécules sur papier buvard, avec post-derivation en esters butyliques et pour assurer une quantification reproductible des molécules, la méthode est basée sur l"utilisation d"étalons internes stables présentant un marquage isotopique (deutérés) pour le calibrage et les mesures. Le dosage a été réalisé, conformément aux recommandations du fabricant.

5. Dosages tissulaires

Après sacrifice des animaux, les cœurs entiers ont été collectés et rincés dans une solution physiologique PBS et congelés dans de l"azote liquide puis conservés à -80°C jusqu"à utilisation. Lors de la préparation des homogénats tissulaires, le cœur est broyé sous azote liquide et la masse du tissu est mesurée. Le broyat est suspendu dans 500 µL de tampon PBS contenant 5 % d"inhibiteur de protéase (*protease inhibitor cocktail*, sigma®) pour 100 mg de tissu. L"échantillon est maintenu dans la glace et traité par sonication (*cell sonifier disruptor,* Branson®) en mode pulsé (*dutty cycle* 30 %) durant 1 minute. L"homogénat obtenu est centrifugé à 20.000 g/4°C/30 min et le culot est éliminé. Les concentrations des protéines totales cytoplasmiques sont mesurées à l"aide du kit *DC protein assay* (Bio-rad®) selon la méthode colorimétrique de Lowry [163].

5.1. Concentration en vitamines B12, B9 (folates) et en homocystéine

Les dosages des vitamines B12 et folates sont effectués sur des homogénats obtenus après centrifugation (20000 g/4°C/30 min) du broyat suspendu en PBS, grâce au coffret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals). Le dosage de homocystéine est effectué sur du homogénats obtenus après centrifugation (20000 g/4°C/30 min) du broyat suspendu en PBS et homogénéisé avec une seringue 2 ml (1 mm à 4°C et une aiguille 1,2 mm), grâce au kit (Abbott) par le système automatisé IMx (Abbott).

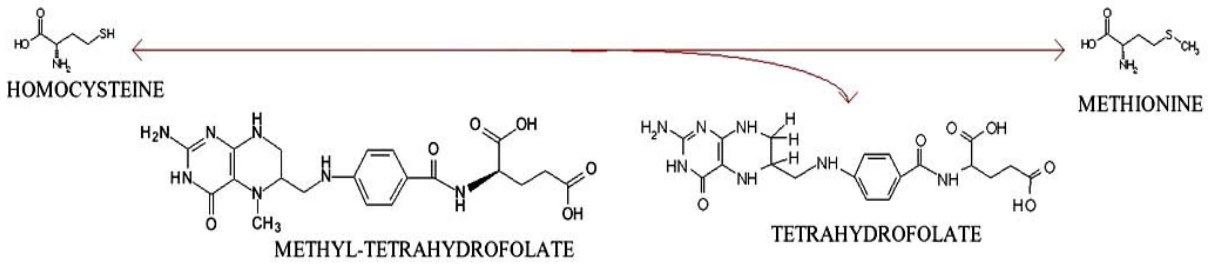
5.2. Concentration de BNP

Le cœur est broyé sous azote liquide et la masse de tissu est mesurée. Le broyat est suspendu dans 500 µL de tampon RIPA 1x contenant 5 % d"inhibiteur de protéase (*protease inhibitor cocktail*, sigma®) pour 25 mg de tissu. L"échantillon est maintenu dans la glace et vortexé pendant 1 min. L"homogénat obtenu est centrifugé à 14.000 g/4°C/3 min et le culot est éliminé. La concentration en protéines totales cytoplasmiques est mesurée à l"aide du kit *DC protein assay* (Bio-rad®). Le dosage de BNP est effectué sur des homogénats obtenus après centrifugation grâce au kit assay Max rat BNP-45 Elisa, conformément aux recommandations du fabricant.

5.3. Activités enzymes et métabolites du cycle d'homocystéine

5.3.1. Méthionine synthase (MS)

La MS est une enzyme cytoplasmique de 135 kDa contenant du zinc. Cette enzyme catalyse l"étape finale de la biosynthèse de méthionine. Elle utilise comme cofacteur la vitamine B12 (méthylcobalamine – MeB12) et comme substrates le N5-méthyl-tétrahydrofolate (N5-mTHF) et l"homocystéine. La synthèse de méthionine se fait en deux étapes : d"abord la méntylcobalamine est formée par un transfer d"un groupment méthyle à partir du N5-mTHF avec formation de MeB12 et tetrahydrofolate, dans un second temps, le MeB12 tranfert son groupement méthyle à l"homocystéine, de manière à restituer le cofacteur cobalamine et de produire de la méthionine



Principe : La mesure de l"activité de la MS a été déterminée à partir de la méthode de Chen et Banerjee [164]**.** Cette mesure est basée sur le transfert d"un groupement méthyle radiomarqué du Me-THF sur l"homocytéine pour former de la méthionine. La séparation de deux éléments radiomarqués est obtenue après un passage dans une colonne chromatographique échangeuse d"anion. La fraction éluée (contenant la méthionine) est alors comptée.

Méthode : 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. Les protéines sont incubées pendant 1 h/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. Le mélange réactionnel est décrit dans la table suivante :

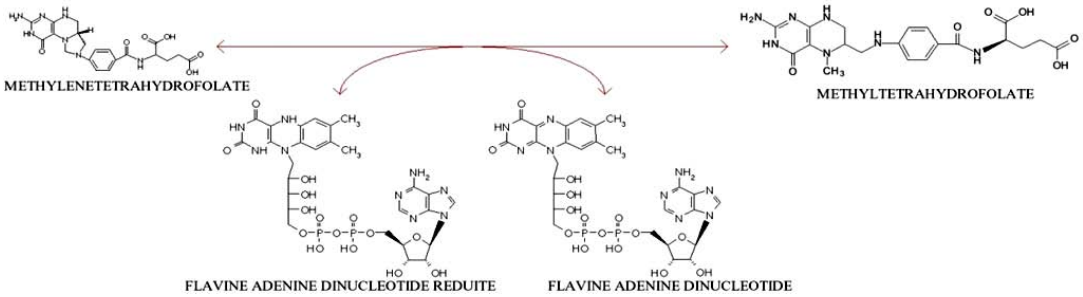
Vol réac : 100 µL	C réaction	**C stock**	***Volume***
Protéines	**~400 µg**	~8 µg/µL	60 µL
Tampon (MTR)	**1X**	10X	10 µL
DTT (H2O)	**25 mM**	580 mM	4,3 µL
Na/Ascorbate (H2O)	**25 mM**	720 mM	3,5 µL
Methyl-B12 (H2O)	**50 µM**	5 mM	1 µL
Homocystéine (HCl 1N)	**1mM**	500 mM	0,20 µL
[14C]MeTHF	**25 µM**	2,5 mM	1 µL
H2O qsp			20,02 µL

Tampon (MTR)=1M $K_2H/KH_2(PO_4)$ pH 7,2+KCl 1M

L"élution a été réalisée sur une colonne échangeuse d"ions anions (ammonium quaternaire, AG1x8, forme Cl^-, Bio-Rad) et la [$^{14}CH_3$] méthionine produite a été mesurée sur un analyseur TRI-CARB, 1900CA (Packard Biosciences) après ajout d"un agent scintillant (PicoFluor-40, Packard).

5.3.2. Méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR)

C'est un homodimère présent dans le cytoplasme, cette enzyme possède un site de liaison pour le FAD et est constituée de 656 acides aminés. Son poids moléculaire est de 74 kDa. Elle catalyse la conversion du 5,10-méthylènetétrahydrofolate (5,10-CH_2-THF) en 5-méthyltétrahydrofolate (5-CH_3-THF) en utilisant le NADPH. MTHFR catalyse la réaction irréversible :



Principe : Bien que la réaction catalysée par la MTHFR est irréversible, on utilisera les propriétés de la MTHFR qui est capable in vitro de catalyser la réaction inverse en présence de Ménadione.

MéthylTHF + ménadione bisulfite → MéthylèneTHF + ménadione réduit

La mesure de l"activité de la MTHFR est basée sur l"oxydation d"un MeTHF radiomarqué en 5-10-CH_2-THF radiomarqué. La séparation des deux éléments radiomarqués est obtenue par la présence de dimédone. Cette dernière va donner des produits de condensation insolubles avec les aldéhydes qui ont été génères à cause de l"instabilité du 5,10-CH_2-THF à pH acide. La radioactivité contenue dans la phase organique correspond aux aldéhydes produits dans la réaction, la phase aqueuse contient la MeTHF non consommée et la méthionine formée par l"activité méthionine synthase parasite.

Méthode : La mesure de l"activité de la MTHFR a été déterminée à partir de la méthode de Kutzbach et Stokstad [165]. Les protéines sont incubées pendant 1 h/37°C dans un bloc chauffant thermostaté et le mélange réactionnel est décrit en la table suivant :

Vol réac : 100 µL	C réaction	**C stock**	***Volume***
Protéines	**~200 µg**	~8 µg/µL	30 µL
K2H/KH2(PO4) pH 6,3	**180 mM**	1,8 M	10 µL
Ménadione Bisulfite	**3,6 mM**	90 mM	4 µL
EDTA (pH 8)	**1,4 mM**	140 mM	1 µL
Ascorbate (H2O)	**7,2 mM**	720 mM	1 µL
FAD (H2O)	**178 µM**	17,8 mM	1 µL
MeTHF (DTT 10 mM)	**50 µM**	22,5 mM	0,22 µL
[^{14}C]MeTHF	**25 µM**	2,5 mM	1 µL
H2O qsp 100 µL			51,78 µL

Puis la réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans la glace et ajoutent un mélange contenant :

Vol réac : 100 µL	C réaction	**C stock**	***Volume***
Formaldéhyde (H2O)	19,6 mM	1 M	5 µL
Dimédone (Ethanol 50 %)	98,0 mM	0,25 M	100 µL
Acétate de Sodium (pH 5,2)	588,2 mM	3 M	50 µL

Le mélange est vortexé 10 sec, puis chauffé à 95°C durant 5 min. Les tubes sont refroidis dans la glace et 500 µL de toluène est ajouté à chaque tube. Après agitation, les tubes sont centrifugés à 1000 g/RT/5 min. La radioactivité contenue dans la fraction organique (toluène) a été mesurée sur un analyseur TRI-CARB, 1900CA (Packard Biosciences) après ajout d"un agent scintillant (PicoFluor-40, Packard).

5.3.3. S-adénosylméthionine et S adénosylhomocystéine

Après le sacrifice de l"animal, le cœur a été rincé dans du PBS, congelé dans l"azote liquide et broyé à l"aide d"un mortier. Le cœur ainsi préparé est pesé et traité en ajoutant 10 µL d"une solution d"acide perchlorique à 3 % ($HClO_4$) pour 1 mg de tissu. L"échantillon est maintenu dans la glace et traité par sonication (*cell sonifier disruptor,* Branson®) en mode pulsé (*dutty cycle* 30 %) durant 1 minute. L"homogénat obtenu est centrifugé à 20.000 g/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. L"échantillon (50 µL) est injecté dans un système de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) sur 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 (générant 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 :

Proportion A	Proportion B
0%	0%
30%	30%
31%	100%
35%	100%
35,1%	0%
45%	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.

6. Marqueurs du stress oxydant

6.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Le superoxyde dismutase est une métalloprotéine avec une activité enzymatique, elle catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène.

$$M^{(n+1)+} - SOD + O_2^- \rightarrow M^{n+} - SOD + O_2$$

$$M^{n+} - SOD + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+} - SOD + H_2O_2.$$

Pour cette raison, cette enzyme est une partie importante du système de défense contre les radicaux libres. 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).

Principe : Cette méthode utilise la xanthine et la xanthine oxydase (XOD) pour générer des radicaux superoxydes, 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 Cu/Zn est mesurée par le degré d‟inhibition de cette réaction. L‟activité de la SOD Mn est mesurée par la même technique après blocage de la SOD Cu/Zn par du cyanure.

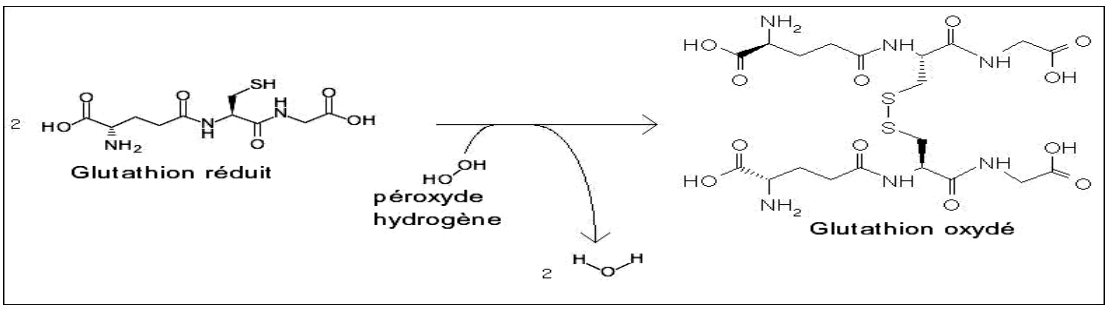
Protocole : La procédure de dosage se fait selon les indications données par le fabricant (Randox©). Le mélange réactionnel contient un mélange de substrats (xanthine et INT), un tampon CAPS-EDTA, la Xanthine oxydase purifiée (80 U/L) et un étalon qui permet de constituer une gamme de dilution du standard (1, ½, ¼, ⅛, $\frac{1}{24}$). 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 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. Les unités enzymatiques de la SOD sont calculées à partir de la gamme étalon et les résultats sont exprimés en U/g de protéine.

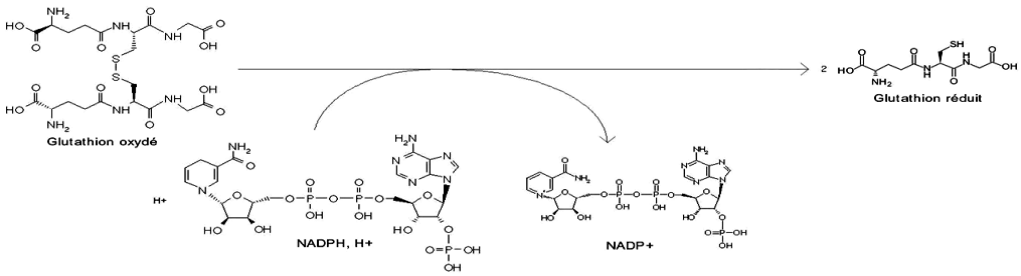
6.2. Glutathion peroxydase (GPX)

La GPX est une enzyme cytoplasmique qui intervient dans la lutte contre les espèces radicalaires oxygénées (*ROS, radical oxygen species*), et plus particulièrement les péroxydes 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 et al, [166] 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
- $K_3Fe(CN)_6$ 0,0395 g
- $NaHCO_3$ 0,200 g
- Eau distillée qsp 100 Ml

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.			
NaH2PO4 50 mM, pH 7			26 mL
NADPH,H+		8,4 mM	1 mL
Glutathion-S-réductase		20 U/mL	0,5 mL
NaN3		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.

6.3. Malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation des lipides est l"oxydation des lipides insaturés, catalysée par une enzyme peroxydase. Cette peroxydation est responsable de dommages tissulaires dus à la formation de radicaux libres lors du processus de peroxydation, parmi les produits finaux derivés de la peroxydation d"acides gras insaturés on peut mentioner le malondialdehyde. La mesure de cette molécule offre un indice sur la peroxydation lipidique.

Principe : La quantité de MDA est basée sur l"action d"un agent chromogénique (N-méthyl-2-phénylindole) qui réagit avec le MDA pour former un adduit qui absorbe en spectrophotométrie à 586 nm.

Protocole : Le cœur est broyé sous azote liquide et la masse de tissu est mesurée. Le broyat est suspendu dans du Tris-HCl 5 % (W/V). L"échantillon est maintenu dans la glace et homogénéisé avec une seringue 2 ml (1mm à 4°C et une aiguille 1,2 mm), L"homogénat obtenu est centrifugé à 3000g/4°C/10 min et le culot est éliminé. Les concentrations en protéines totales cytoplasmiques sont mesurées à l"aide du kit *DC protein assay* (Bio-rad®). La technique utilisée pour mesurer la quantité de MDA est basée sur la méthode décrite par Liu et al, [167] mais le dosage est effectué à l"aide d"un coffret commercial *lipid peroxidation assay kit* (calbiochem®). Les valeurs de MDA sont calculées grâce à une gamme de standard (1, 1, 3,3-tétraméthoxypropane – TMOP).

7. Les MAP kinases, apoptose et AKT

Les protéines MAPK sont des enzymes, des kinases, qui ajoutent des groupements phosphate à d'autres protéines afin de les activer. ERK1/2 et p38 font partie de la famille des MAP kinases qui sont des protéines jouant un rôle dans la division, la croissance et la prolifération cellulaires. **L'apoptose** ou mort cellulaire programmée, est un processus spécialisé qu"implique la participation d"un ensemble de protéines. Le mécanisme d"apoptose est gouverné par deux voies principales d"activation : une voie extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs du TNF et une voie intrinsèque mettant particulièrement en jeu la mitochondrie ; cette voie est gouvernée par des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2 qu"inhibent la formation du complexe APAF1/cytochrome c/caspase 9 nécessaire à l'apoptose contrairement à Bcl-2, Bax et caspase-3 sont de protéines pro-apoptotiques. **Akt1** est impliqué dans la voie de signalisation de la survie cellulaire, en inhibant l'apoptose.

Principe : L"expression de ces protéines a été détectée par la technique de marquage des protéines par immunoempreinte qui 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 et semi-sec.

Protocole :

Préparation des extraits protéiques

Les tissus sont broyés sous azote liquide, puis mis en suspension dans un tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM, NaCl 250 mM, Triton X100 1 %, Deoxycholate 0,2 %, SDS 0,1 %, Vanadate 0,5 mM, EDTA 0,2 mM, PMSF 1 mM et *protease inhibitor cocktail* 5 %). Les échantillons sont agités au vortex, centrifugés à 20000 g/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. Une quantité de 30-40 µg de protéines est utilisée par essai pour le western-blotting.

Electrophorèse sur gel en polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide est préparé à l"aide d"un mini-protean II (Bio-Rad©) à différentes concentrations selon les protéines étudiées. Deux gels peuvent être utilisés dans la

même migration, le gel de concentration et de séparation. Le mélange est remué à la main puis ~7 mL sont déposés entre les 2 plaques de verre du mini-protean (épaissueur 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 est rincé avec une pissette d"eau distillée et séché à l"aide d"un papier Whatman©. Le gel de concentration, permet de concentrer les protéines au début de la migration électrophorétique. 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 s"effectuée à voltage constant de 80 V pendant 30 min (pénétration des échantillons dans le gel) puis maintenue à 110 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 pour le transfert liquide, mais pour le transfert semi-sec nous avons utilisé un voltage constant de 10V pendant 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.

Marquage de l"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 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 pendant 2 h 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 5 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.

Cible de l'anticorps	Source	Anticops primaires	Anticorps Secondaires
Bax	Lapin	1/2000	1/2000
Bcl-2	Chèvre	1/2000	1/2000
Tubuline	Lapin	1/1000	
P38 totale	Lapin	1/2000	1/2000
P38 phosphoryle	Souris	1/2000	1/2000
ERK ½ total	Lapin	1/1000	1/2000
ERK ½ phosphoryle	Lapin	1/1000	1/2000
AKT totale	Lapin	1/1000	1/3000
AKT phosphoryle		1/1000	1/3000
GSK-3β	Lapin	1/2000	1/1000
PTEN		1/2000	1/1000
Caspase 3	Lapin	1/1000	1 /2000
PP2A-c	Lapin	1/1000	1/1000
c-PLA2	Lapin	1/1000	1/1000
c-PLA2 phosphoryle	Lapin	1/1000	1/1000
PPARα	Lapin	1/700	1/2000
OCTN2	Lapin	1/2000	1/3000
PGC-1α	Lapin	1/1000	1/1000

8. RT-PCR

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

Principe : L"étude de l"expression des gènes a été réalisée par RT-PCR en temps réel (*real-time Reverse Transcription-Polymerase*) afin de détecter la concentration des ARNm. Le principe de cette technique consiste à extraire les ARN totaux des tissus à analyser et de le copier *in vitro* en ADNc (ADN complémentaire) simple brin grâce à l"action de la transcriptase inverse, étape obligatoire avant la polymérisation en chaîne qui met en œuvre une ADN polymérase. Les molécules d"ADNc obtenues servent de matrice pour cette réaction et un fragment de l"ADNc cible est amplifié en utilisant un couple d"amorces spécifiques correspondant à la séquence de l"ARN d"intérêt. Le principe de l"amplification *in vitro* repose

sur la répétition de 3 processus : a) la dénaturation des 2 brins d"ADN à 94°C ; b) l"hybridation d"oligonucléotides (amorces) complémentaires d"une séquence cible d"ADN monocaténaire à une température d"hybridation spécifique, etc) la réaction d"élongation par une ADN polymérase thermostable (Taq DNA polymerase) à partir des oligonucléotides, réalisée à la température optimale de 72°C.

Protocole : Les échantillons de tissu cardiaque sont broyés dans l"azote liquide, les ARN totaux sont isolés en utilisant le kit RNeasy mini plus (Qiagen) en suivant scrupuleusement les instructions du fabricant et immédiatement les concentrations de ARN sont mesurées par spectrophotométrie à 260nm, sachant qu"une unité de DO correspond à 40µg/mL d"ARN. Une autre mesure à 280 nm permet d"estimer la contamination des ARN par des protéines résiduelles. Les expériences sont entreprises sur les échantillons ayant un rapport d"absorbance 260/280nm entre 1,8 et 2,0. L"intégrité des ARN est finalement estimée par électrophorèse en gel d"agarose 1 % préparé dans un tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) contenant du bromure d"éthidium (BET) à 1 % (Invitrogen). Ensuite la RT-PCR est réalisé avec le kit RT Quanti Tec Reverse Transcrption conformément aux recommandations du fabricant (Qiagen). Les amorces utilisées pour l"amplification des ARN du TNFA et RP 29 (Ribosomal protéine 29, gène de référence) sont les suivantes :

TNFA : Sens : 5" ATG GGC TCC CTC TCA TCA GT 3" Anti sens : 5" GCT TGG TGG TTT GCT ACG AC 3"
RP 29 : Sens : 5" ATG GGT CTA CAG CAG CTC TA3" Anti sens : 5"GCC CGT ATT TAC GGA TCA GA 3"

Le mélange réactionnel contient (20µl) en total :

Réactifs	*Volume*
Amorce Sens	0,7 µl
Amorce A-sens	0,7 µl
cDNA	1 µl
Master mix 10x	10 µl
H2O Rnase free	7,6 µl

Le programme d"amplification PCR utilisée est le suivant :

Programme	Température	Temps
Dénaturation	95°C	15 min
PCR	95°C	10 s
50 cycles	58°C	15 s
	72°C	10 s
Courbe de fusion 1 cycle	94°C	5 s
	67°C	15 s
	94°C	0 s
Refroidissement	40°C	30 s

9. Mitochondries

La mitochondrie est un organite intracellulaire qui est responsable de la majorité de la production de l'énergie sous forme d'ATP pour la cellule et représente donc une structure cruciale du fonctionnement cellulaire. Le catabolisme de glucides, acides gras et acides aminés s'accompagne de la production d'équivalents réduits que sont le NADH et le $FADH_2$. L'oxydation de ces équivalents réduits par l'O_2 a lieu au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et aboutit à la formation d'énergie.

9.1. Respiration mitochondriale

9.1.1. Isolement mitochondrial

Les mitochondries sont isolées par des adaptations de la technique de Krahenbuhl et al, [168]. Toutes les étapes se font à 4°C.

Principe : Le principe de l'isolement des mitochondries est l'obtention d'organites de taille et de pureté relativement homogènes selon les groupes de rats étudiés. Ainsi la vitesse de la dernière centrifugation (3500 *g*) est inférieure à la précédente (7000 *g*) dans le but de bien nettoyer le culot de mitochondries.

Protocole : Après prélèvement, le cœur est conservé dans 10 ml de tampon d'isolement et dans la glace. Le cœur est haché en petits morceaux (ciseaux) dans le tampon d'isolement et ensuite rincé 3 à 4 fois avec du tampon d'isolement froid (10 volumes), jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Les morceaux de cœur sont homogénéisés dans 10 volumes de tampon d'isolement, au Potter (7 aller-retours, 1000tours/min) jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène, elle est immédiatement centrifugée à 600 *g*, 7000 g et finalement à 3500 *g*. Le culot est resuspendu

dans un minimum de tampon d"isolement (¼ volume) et conservé dans la glace. La quantité de protéines est évaluée grâce au dosage colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique (B C Assay.). Le principe du dosage repose sur la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^{+} par les liaisons peptidiques des protéines. L"acide bicinchoninique chélate les ions Cu^{+} avec une très forte spécificité et forme un complexe soluble coloré en violet. L"absorbance est directement proportionnelle à la concentration protéique qui est calculée à l"aide d"une courbe référence obtenue avec l"albumine.

9.1.2. Détermination de la consommation d'oxygène

La consommation d"oxygène des mitochondries isolées est déterminée avec un oxygraphe (Hansatech et Oroboros) à l"aide d"une électrode sensible à l"oxygène. Les mesures sont effectuées à 30°C et indiquent des vitesses d"utilisation de l"oxygène par unité de temps et par mg de protéines mitochondriales. Cette technique permet d"apprécier la fonctionnalité des mitochondries. La consommation d"oxygène mitochondriale est donc déterminée avec différents substrats (pour les différents complexes de la chaîne respiratoire) et sous différents états (contrôle et stimulation de la respiration différente). Ainsi, l"addition d"ADP induit une forte consommation d"oxygène (respiration à l"état 3) dépendante de l"utilisation de la force proton-motrice par l"ATP-synthase pour la phosphorylation de l"ADP, et contrôlée par le système phosphorylant (activité de l"ATP-synthase, transport de l"ADP et de l"ATP), par le système d"oxydation (activité des complexes de la chaîne respiratoire, transport des substrats, efficacité du pompage des protons) et par la fuite de protons (perméabilité membranaire, protéines découplantes). L"ajout d"oligomycine (qui inhibe l"activité de l"ATP-synthase) induit un ralentissement de la respiration (respiration à l"état 4- oligomycine) qui est dépendante de l"utilisation de la force proton-motrice par la fuite de protons et sous le contrôle du système de la fuite de protons et du système d"oxydation. Enfin, l"ajout d"une concentration saturante de FCCP (molécule qui dissipe la force proton-motrice) induit une consommation d"oxygène maximale (respiration à l"état découplé) contrôlée par le système d"oxydation. Le rapport des taux de consommation d"oxygène état 3 / état 4-oligomycine défini le contrôle de la phosphorylation sur la consommation d"oxygène et est utilisé comme un indicateur de la qualité de la préparation des mitochondries.

Protocole : La consommation d"oxygène de mitochondries isolées est déterminée à travers des combinaisons de substrats et d"inhibiteurs possibles.

Substrat du complexe I (et II) : malate (5.0 mM) + pyruvate (2.5 mM)
malate (5.0 mM) + glutamate (5 mM)
glutamate (5 mM)
malate (5.0 mM) + palmitoyl-l-carnitine (40 µM)

Substrat du complexe II : succinate (5mM) + roténone (5 µM; inhibiteur cI)

Substrat du complexe IV : ascorbate (5mM) + TMPD (0,5 mM) + KCN (1,0 µM; inhibiteur cIII)

Composition du milieu:

Réactifs	*Quantité*
KCl	0,895 g
KH2PO4	1,360 g
HEPES	0, 040 g
EGTA	0, 038 g
MgCl2	0, 040 g
BSA	0,300 g
Eau distilléé	100ml

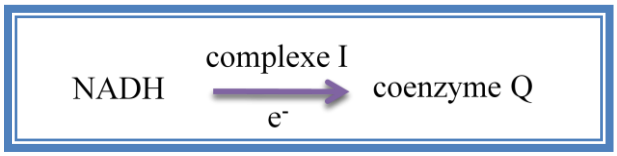
La mesure est démarrée par l"ajout de 0,5 mg de mitochondries isolées dans 2 ml du Milieu de respiration (pH 7,4) (état 2). Ensuit la respiration est stimulée par l"ajout de 0,5mM d"ADP (état 3) et inhibée par l"ajout de 4 µg/ml d"**oligomycine** (état 4-oligomycine), la respiration est encore restimulée par l"ajout de 1 µM de **FCCP** (état découplé).

9.2. Dosages enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire

Les dosages enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire sont effectués en utilisant la méthode décrite par Malgat *et al,* [169]. Le principe des dosages repose sur le transfert d"électrons de donneurs (c"est à dire de substrats) à un accepteur. Les dosages permettent la mesure par spectrophotométrie du taux d"apparition de l"accepteur réduit ou du taux de disparition du donneur oxydé.

9.2.1. Dosage de la NADH Ubiquinone C Réductase (complexe I)

Ce dosage consiste à mesurer l"oxydation du NADH :



Principe : Le complexe I permet le transfert des électrons de NADH au coenzyme Q, remplacé dans le dosage par un analogue : la décylubiquinone. Le NADH peut aussi être oxydé par le cytochrome b_5 réductase de la membrane mitochondriale externe. Pour cette raison, le dosage est donc aussi effectué en présence de roténone (inhibiteur du complexe I) pour permettre la quantification de l"activité non sensible à la roténone et donc indépendante du complexe I.

Protocole : La mesure de l"activité de la NADH Ubiquinone C Réductase est réalisé a partir de protéines mitochondriales, les protéines sont incubées pendant 2 minutes / 37°C dans un bloc chauffant thermostaté et le mélange réactionnel est décrit dans le tableau suivant :

	Concentration mmoles/l	**Volume µl**	**Concentration finale mmoles/l**
Tampon phosphate pH 7,5	100	500	50
Sérum albumine sans AGL	50 mg/ml	75	3,75 mg/ml
Décylubiquinone	25	4	0,1
Mitochondries		10	10 µg de protéines
Eau ppi		400	

La réaction est démarrée en ajoutant 10 µl de **NADH**. La lecture de la cinétique s"effectue à 340 nm et à 37°C et le même dosage est effectue avec 5 µl de **roténone** dans le milieu réactionnel. Cinétique d"ordre 1. ε NADH = 6220 M^{-1}. Cm^{-1}. Les résultats sont exprimés en $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéines.

9.2.2. Dosage de la Succinate Ubiquinone Réductase (complexe II)

Le complexe II catalyse deux réactions enzymatiques successives :

Succinate + FAD → fumarate + FADH2

FADH2 + ubiquinone → FAD + ubiquinol

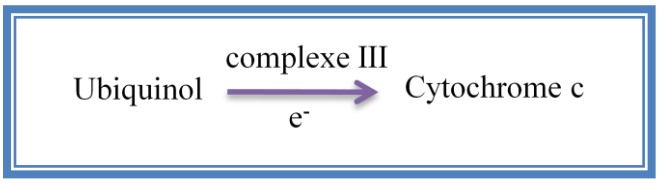
Le dosage du complexe II fait intervenir un composé chimique de couleur bleue, le dichlorophénolindophénol (DCPIP), qui absorbe la lumière à 600 nm. Lorsque le DCPIP est réduit par l'ubiquinol, il perd sa couleur bleue et n'absorbe plus la lumière. Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 600 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe II. Dans ce dosage l'ubiquinone est remplacé par un analogue, le décylubiquinone.

Protocole : La mesure de l"activité de la Succinate Ubiquinone Réductase est réalisé à partir de protéines mitochondriales, les protéines sont incubées pendant 2 minutes/37°C dans un bloc chauffant thermostaté et le mélange réactionnel est décrit dans le tableau suivant :

	Concentration mmoles/l	**Volume µl**	**Concentration finale mmoles/l**
Tampon phosphate pH 7,5	100	500	50
Sérum albumine sans AGL	50 mg/ml	50	2,5 mg/ml
KCN	10	100	1
Roténone	2,5	2	5 µmoles/l
Antimycine	1 mg/ml	5	5 µg/ml
Eau ppi		66	
Succinate	500	60	30
Mitochondries	-	5	5 µg
DCPIP	0,5	200	100 µmoles/l

La réaction est démarrée en ajoutant **2 µl de décylubiquinone (**25 mM). La lecture de la cinétique s"effectue à 600 nm et à 37°C. Cinétique d"ordre 0. ε DCPIP = 21000 M^{-1}. Cm^{-1}. Les résultats sont exprimés en $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéines.

9.2.3. Dosage de l'Ubiquinone Cytochrome C Réductase (complexe III)



Le principe du dosage repose sur la mesure de la réduction du cytochrome-c qui une fois réduit absorbe la lumière à 550 nm. L'augmentation de l'absorbance à 550 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe III. Dans ce dosage l'ubiquinol est remplacé par un analogue, le décylubiquinol. Ce dosage est réalisé en présence et en absence d'antimycine A (inhibiteur spécifique du complexe III), afin d'obtenir l'activité de réduction du cytochrome-c spécifique du complexe III.

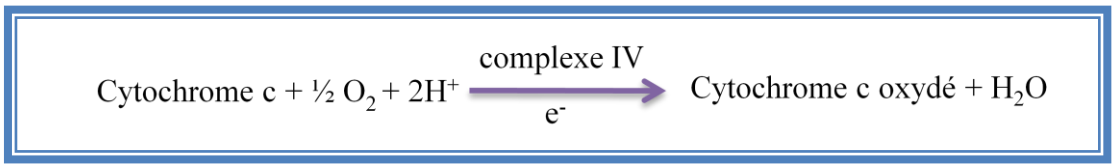
Protocole : La mesure de l"activité de l"Ubiquinone Cytochrome-c Réductase est réalisé à partir de protéines mitochondriales, les protéines sont incubées pendant 30sec /37°C dans un bloc chauffant thermostaté et le mélange réactionnel est décrit dans le tableau suivant :

	Concentration mmoles/l	**Volume µl**	**Concentration finale mmoles/l**
Tampon phosphate pH 7,5	200	500	100
E.D.T.A.	1	50	0,050
Sérum albumine sans AGL	50 mg/ml	20	1 mg/ml
KCN	10	100	1
Eau ppi	-	220	-
Cytochrome C oxydé	1	100	0,100
Mitochondries	-	5	5 µg prot

La réaction est démarrée en ajoutant **4 µl de décylubiquinone (**25 mM). La lecture de la cinétique s"effectue à 550 nm et à 37°C et le même dosage s"effectue avec 5 µl d"Antimycine dans le milieu réactionnel. La cinétique est de l"ordre 0. ε cyt c = 18500 M^{-1}. Cm^{-1}. Les résultats sont exprimés en $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéines.

9.2.4. Dosage de la cytochrome C Oxydase-Cox (complexe IV)

La réaction enzymatique catalysée par le complexe IV est la suivante :



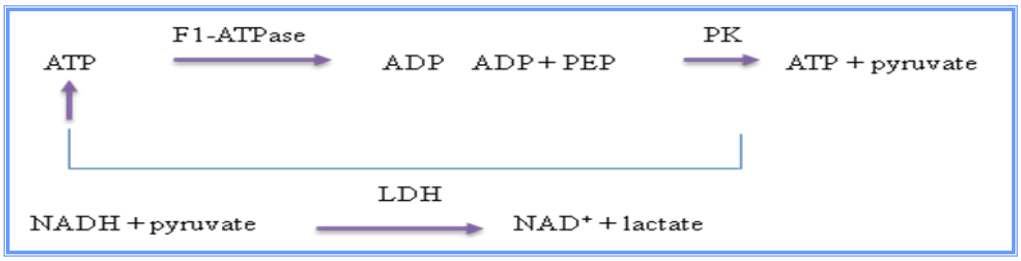
Le complexe IV permet le transfert des électrons du cytochrome-c au dioxygène (O_2). Le principe du dosage repose sur la mesure de l'oxydation du cytochrome-*c*. Le cytochrome-c réduit absorbe la lumière à 550 nm, la diminution de l'absorbance à 550 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe IV.

Protocole : 998 µl d"une solution de cytochrome-c est incubée pendant 3 min à 37°C. Ensuite la réaction est démarrée en ajoutant **2 µl** (2 µg de protéines) de mitochondries isolées, immédiatement le mélange est vortexé et la lecture de la cinétique s"effectue à 550 nm à 37°C. Cinétique d"ordre 1. ε cyt c = 18500 M^{-1}. Cm^{-1} Les résultats sont exprimés en $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéines.

9.2.5. Dosage de la F1-ATPase (complexe V)

L"activité du complexe V est effectuée en utilisant la technique adaptée de Rustin et al, [170].

Principe : La F0F1-ATP synthase catalyse la synthèse de l"ATP à partir de l"ADP + Pi. C"est une réaction réversible, aussi le principe de la réaction consiste à mesurer l"hydrolyse de l"ATP en ADP + Pi par la F1-ATPase, la formation d"ADP étant couplée à la formation de NAD^+ grâce à la présence de la pyruvate kinase (PK) et de la lactate déshydrogénase (LDH).



Protocole : Les mitochondries sont décongelées à température ambiante et diluées à **1 mg/ml** dans le tampon G2 dans la glace. Ensuite ont été soniqué 6 fois pendant 5 secondes avec 30

seconds de repos entre chaque sonication (mode pulse 39 %). Le mélange réactionnel est décrit dans table suivant :

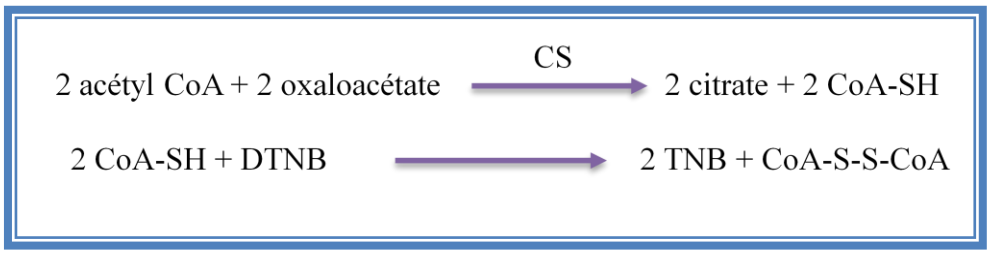
Réactifs	Concentration mM	Volume µl	Concentration finale mM
Tampon G2		200	
H2O		670	
Mitochondries		100	10 µg
± oligomycine	1 mg/ml	10	10 µM

Tampon G2 : Pour 5 ml de tampon G1, ajouter FCCP à 10 mM ; antimycine A à 2,5 mg/ml ; LDH à 5 U/µl ; PK à 5 U/µl. **Tampon G1** : (PEP 2,0 mM; ATP 0,5 mM; $MgCl_2$ 5,0 mM; KC 10,0 mM; Tris 50,0 mM; BSA 5 mg/ml ; Eau distillée et Ajuster à pH 8 avec de l'HCl 5 M). Le mélange est incube pendant **3 minutes** à **37°C** et la réaction est déclenchée par addition de **30 µL de NADH 10 mM.** La lecture de la cinétique s‟effectue à 340 nm et à 37°C et le même dosage s‟effectue avec 10 µl d‟oligomycine et sans oligomycine dans le milieu réactionnel. Cinétique d‟ordre 1. ε NADH = 6220 M^{-1}. Cm^{-1}. Les résultats sont exprimés en $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéines.

9.3. Dosage enzymatiques de quelques enzymes du cycle de Krebs

9.3.1. Dosage de la Citrate Synthase (CS)

Ce dosage consiste à mesurer la formation du trinitrobenzène (TNB) :



Protocole: Dans un tube à hémolyse est préparé le mélange réactionnel décrit dans le tableau suivant :

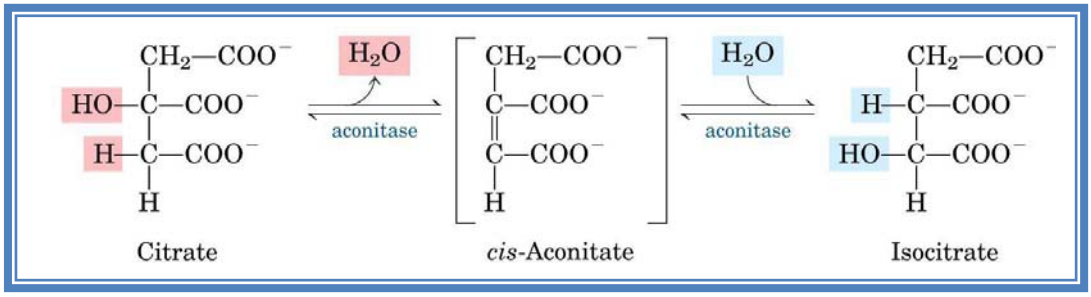
	Concentration initiale mmoles/l	Volume µl	Concentration finale mmoles/l
DTNB/tampon	1	150	0,15
Acide oxaloacétique	10	50	0,5
Acétyl Co A	10	30	0,3
Triton X 100	10 %	10	0,1 %
Eau ppi		750	

Le mélange est incubé pendant 2 min à 37°C et la réaction est démarrée en ajoutant **10 µg** de protéines de mitochondries isolées (10-50 µg pour homogénat). La lecture de la cinétique s"effectue à 412 nm et à 37°C. Cinétique d"ordre 1. ε TNB = 13600 M^{-1}. Cm^{-1}

9.3.2. Dosage de l'Aconitase

L"aconitase est une enzyme du cycle de Krebs. Cette protéine à centre fer-soufre catalyse la réaction d'interconversion réversible du citrate en isocitrate via le cis-aconitate. Il existe une aconitase mitochondriale (intervenant dans le cycle de Krebs) mais également une aconitase cytosolique, qui, chez les animaux, possède une double fonctionnalité : une activité d'aconitase, dont le rôle physiologique n'est pas connu, et une activité "Iron Responsive Elément - Binding Protein" (IRE-BP) permettant une régulation post-transcriptionnelle dans le métabolisme du fer. Ces 2 aconitases sont codées par deux gènes différents.

L"aconitase produit à partir de l"isocitrate du cis-aconitate absorbant à 240nm



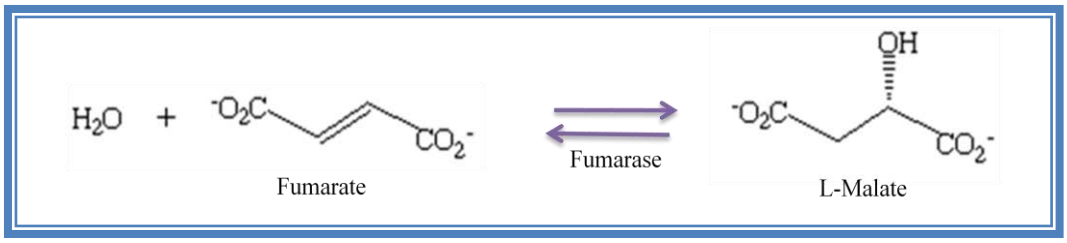
Protocole : Dans un tube à hémolyse est préparé le mélange réactionnel décrit dans le tableau suivant :

	Concentration mM	Volume en µl	Concentration finale en mM
Tampon Tris	100 mM	500	50
MnCl2	10 mM	50	0,50
Isocitrate de Na	500 mM	200	100
Triton	1 %	10	0,01 %
H2O		220	

Le mélange est incubé pendant 5 min à 37°C et la réaction est démarrée en ajoutant **20 µg** de protéines des mitochondries isolées. La lecture de la cinétique s"effectue à 240 nm et à 37°C. Cinétique d"ordre 1. ε Aconitate = 3600 M^{-1}. Cm^{-1}

9.3.3. Dosage de la Fumarase

La Fumarase (ou fumarate hydratase) est une enzyme du cycle de Krebs. Elle catalyse l"hydratation du fumarate en L-malate. En présence de Malate, la fumarase produit du fumarate absorbant à 250 nm



Protocole : Dans un tube à hémolyse est préparé le mélange réactionnel décrit dans le tableau suivant :

	Concentration initiale mM	Volume µl	Concentration finale mM
Tampon Phosphate	100	850	85
H20		50	
EDTA	10	10	0,1
Malate	500	50	25
Triton	10 %	20	0,2 %

Le mélange est incubé pendant 5 min à 37°C et la réaction est démarrée en ajoutant **20 µg** de protéines de mitochondries isolées. La lecture de la cinétique s"effectue à 250 nm et à 37°C. Cinétique d"ordre 1. ε Fumarate = 4880 M^{-1}. Cm^{-1}

10. Métabolisme lipidique

10.1. Extraction lipidique

La technique est adaptée de Folch *et al,* [171]. 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, ensuite on ajoute 200 µl du mélange de H_2O et méthanol (1:1). L"homogénat obtenu est centrifugée et 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 pour évaporation sous une atmosphère d"azote.

10.2. Concentration de triglycérides et cholestérol

Pour réaliser les dosages de triglycérides et du cholestérol, l"extrait lipidique est resuspendu dans du liquide physiologique (Ringer) contenant 3 % de BSA Ono *et al,.* [172] les mesures sont réalisées avec un automate multiparamètrique (Olympus AU400).

10.3. Concentration de carnitine et acylcarnitines

Les acylcarnitines et carnitine 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©)

11. Détermination des purines d'adényl

Pour l"extraction de purines la technique est adaptée de Giannattasio et al, [173]. Les tissus sont broyés sous azote liquide, puis mis en suspension dans un 1 ml de PCA 3 % et immédiatement vortexés pendant 50 s et maintenus dans la glace pendant 20 mn. Le mélange est centrifugé à 12.000 *g* pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est neutralisé par l"adition de 1 volume de 0,5M KOH plus 0,2 volume de 1M KH_2PO_4, pH 7,5 et incubé pendant 15 min dans la glace. Le précipité de perchlorate de potassium est finalement enlevé par centrifugation (17900 *g* pendant 20 min à 4°C). Le mélange des purines d'adénil est réalisé en utilisant le protocole de Katayama et al, [174], dans 100 µl du homogénat nous avons ajouté 10 µl de 2-chloroacetaldehyde (4,0 M), plus 100 µl d"acétate (1,0 M, pH 4,5), le mélange est chauffé à 80°C pendant 20min et 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) sur une colonne NovaPack (C18,4 µm 150 x 3.9 mm) maintenu à 30°C à un débit constant de 0,8 mL/min (générant une pression d"environ 85 bar). Le gradient continu appliqué par la pompe consiste en un mélange de tampon A (phosphate de sodium 50 mM, pH 3,1 ; 5 mM tetrabutyl ammonium bromide (TBAB) et acétonitrile 40 %) et de tampon B (phosphate de sodium 50 mM, pH 3,1 et 5 mM TBAB). Finalement le potentiel énergétique a été calculé en utilisant la formule suivant :

$$\boldsymbol{Potential}\ \text{énergétique} = \frac{\mathrm{ATP} + 0.5\ \mathrm{ADP}}{\mathrm{ATP} + \mathrm{ADP} + \mathrm{AMP}}$$

12. Analyse protéomique du myocarde

L"analyse protéomique a été réalisée comme décrit par Chanson et al., avec quelques modifications. Les cœurs ont été broyés sous azote liquide et homogénéisés à 4°C dans le tampon d"extraction constitué de 50 mM DTT. L"homogénat obtenu est centrifugé à 18000 g pendant 15 min et le culot est éliminé. Les concentrations des protéines totales cytoplasmiques sont mesurées à l"aide du kit *DC protein assay* (Bio-rad® Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) selon la méthode colorimétrique de Lowry [163]. 500 µg de protéines par gel ont été séparées par électrophorèses bidimensionnelle 2-D PAGE. Le gel obtenu a été ensuite coloré avec bleu de comassie, et scanné en utilisant un scanner, *Amersham Image* (GE Healthcare,

Orsay, France). La quantification des changements de protéines a été effectuée par l‟analyse des profils d'expression utilisant le logiciel de Progenesis SameSpots (dynamique non linéaire, Newcastle sur Tyne R-U). Des spots montrant un changement significatif ont été analysées par le spectromètre de masse MALDI-TOF (Voyager DE-Pro, Perseptive BioSystems, Farmingham MA). Les masses de peptides mono-isotopiques ont été comparées aux bases de données génomiques ou protéomiques en ligne NCBI avec la MASCOTTE, [http:// www.matrixcience.com/search_form_select.htlm]. Des profils protéiques différentiels exprimés ont été évaluées par l'analyse d'Ingenuity Pathways (IPA) (système d'ingéniosité, la vue de Montain, CA, Etats-Unis), une application de logiciel qui permet d'identifier des réseaux des protéines avec un intervalle de confiance de 99 % de ne pas être produit par chance. Après de l‟analyse IPA les interactions entre les protéines est manuellement inspectée pour éliminer tous les faux résultats possibles.

13.Tests statistiques

Nos données ont été analysées à l‟aide du logiciel SPSS 17.0 pour Windows (Chicago IL. ETATS-UNIS). Des variables continues ont été rapportées comme la moyenne +/- les écartypes. Des données brutes ont été comparées en employant l'analyse d‟ANOVA. Des analyses de régression univariables ont été réalisés en utilisant le test de Pearson et la z-corrélation pour évaluer les relations entre le poids de cœur et le poids corporel, la BNP, les acylcarnitines, l‟homocysteine, la vitamine B12 et le folate. Le niveau minimum de différence significative statistique a été défini pour un $P< 0,05$.

Résultats

1. Effets du régime carencé en groupement méthyles sur les ratons de 21 jours.

1.1. Observations morphologiques

1.1.1. Développement corporel des ratons

Au niveau de l‟anatomie générale des ratons, il a été observé des différences morphologiques dès la naissance. Par exemple les ratons issus d‟une mère carencée présentent une pilosité très peu développée au 13e jour postnatal en comparaison avec les ratons témoins. Au niveau locomoteur les ratons témoins se déplacent sur les 4 membres alors que les ratons carencés rampent uniquement (Figure. 15).

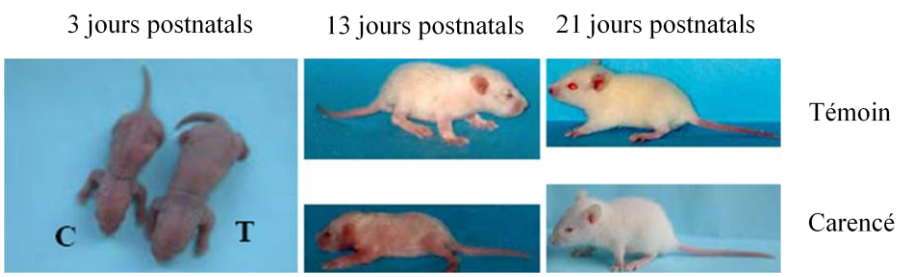


Figure 15. Différents stades du développement (J 3, J13, J21) des ratons soumis à un régime déficient en groupement méthyles

Par ailleurs, les ratons carencés sont nettement plus petits à la naissance par rapport aux ratons nés d‟une mère non carencée. La différence de taille persiste avec l‟âge, c'est-à-dire, à 21 jours postnatals, le raton carencé présente une taille inferieure à celle du raton témoin. Cette différence de taille s‟accompagne d‟une différence de poids, à 21 jours postnatals, le raton carencé présente un poids très nettement inferieur à celui du raton témoin (17,87 ± 2,11 vs 42,2 ± 0,89 grammes, P< 0,001).

1.2. Observation macroscopique du cœur

1.2.1. Moyenne rapport cœur/ poids

Au niveau de la taille du cœur des ratons, nous observons à simple vue des différences de taille chez les animaux témoins par rapport aux animaux carencés. Le cœur chez les ratons témoins parait être plus grand que chez les ratons carencés, mais cette différence visuelle est relative, puisque elle ne correspond pas au rapport cœur/poids. En effet, le rapport cœur/poids d"un raton né d"une mère carencée à 21 jours postnatal est plus grand que le rapport cœur/poids d"un raton né d"une mère non carencée (7,9±1,3 vs 5,9±0,7). Cependant, nous avons observé que chez les animaux de 20 jours post-coïtales (période gestationnelle) la différence du rapport cœur/poids n"est pas significative (5,1±0,1 vs 4,9±0,8). C"est-à-dire l"augmentation du rapport cœur/poids est seulement visible après le sevrage (21 jours postnatal) (Figure 16).

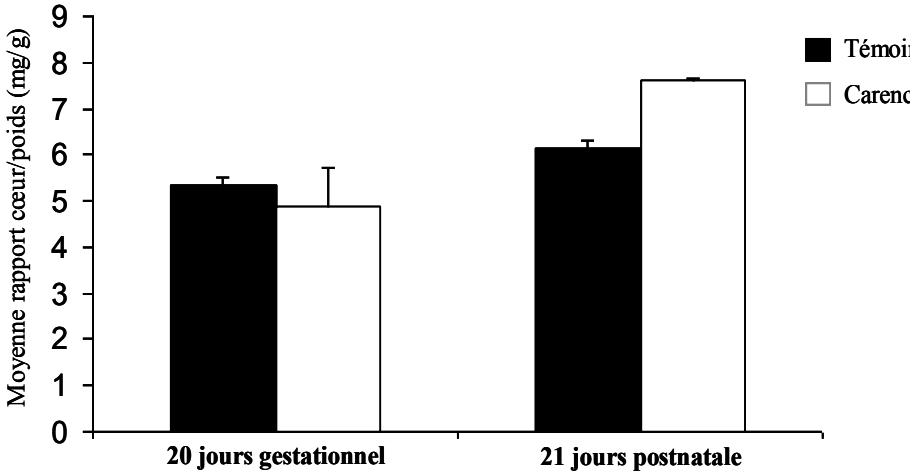


Figure 16. Comparaison du rapport cœur/poids (mg/g) entre les ratons carencés et témoins à 21 jours (n=46). Différence significative P<0,05, ***P<0,001.

1.3. Observation microscopiques du cœur

1.3.1. Coupes transversales du cœur

Au niveau histologique, dans ce modèle nutritionnel, la carence en folates et vitamine B12 induit une **augmentation de l'épaisseur** des parois du myocarde chez les ratons carencés par rapport aux témoins (Figure 17).

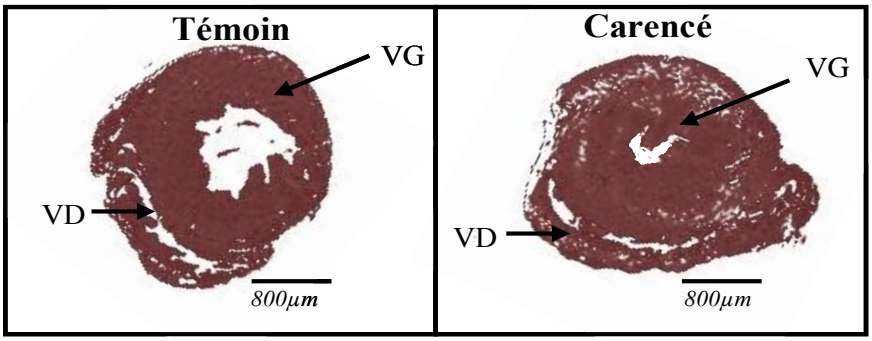


Figure 17. Coupes du cœur de ratons âgés de 21 jours et nés de mère ayant reçu un régime normal (gauche) ou un régime carencé (droite). Ventricule droit (VD) Ventricule gauche (VG).

1.3.2. Détermination de la taille des cardiomyocytes

La réduction de la cavité ventriculaire gauche trouvée chez les animaux carencés est accompagnée d"une augmentation de la taille des cardiomyocytes (surface µm^2) chez les animaux carencée par rapport aux témoins (685,3±49 vs 364,2±30 ; P< 0,001) (Figure 18).

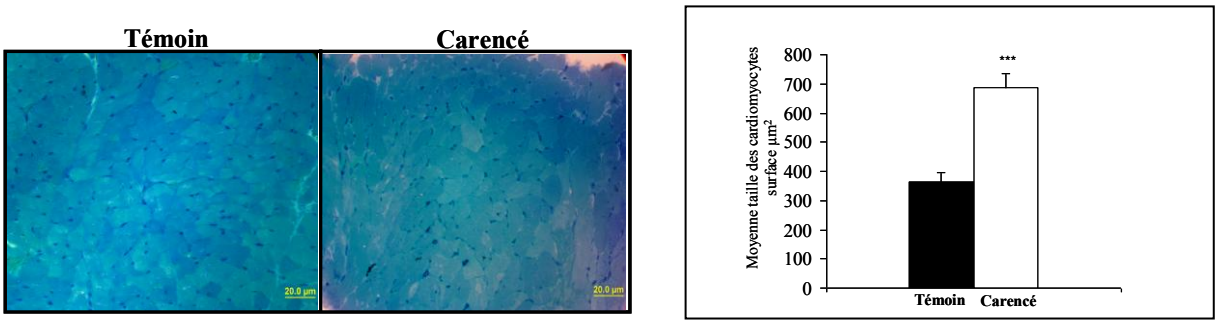


Figure 18. (a) Analyse microscopique de coupes transversales du ventricule gauche de ratons âgés de 21 jours et nés de mère ayant reçu un régime normal (gauche) ou un régime carencé (droite) après marquage au bleu Azur II. (b) Comparaison de la taille des cardiomyocytes entre les deux groupes évalués. Différence significative P<0,05, ***P<0,001.

1.4. Marqueurs d'insuffisance cardiaque

1.4.1. Peptide natriurétique de type B (BNP)

Des dosages du BNP ont été effectués sur le cœur et plasma chez les ratons de 21 jours postnatals. Comme montre la (figure 19), les ratons carencés présentent une augmentation significative de la concentration du BNP au niveau plasmatique et tissulaire par rapport au groupe témoin (0,32±0,04 vs 0,04±0,01 et 0,69±0,2 vs 0,34±0,1) respectivement.

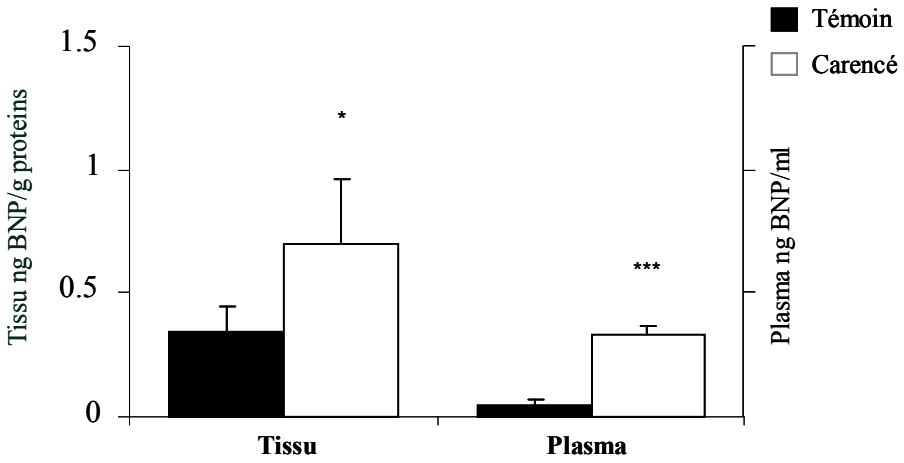


Figure 19. Dosage tissulaire et plasmatique du BNP chez le raton de 21 jours carencé et non carencé. Différence significative *p<0,05 ; ***p=0,0001

1.5.Analyses fonctionnelles

1.5.1. Mini-TEP

Afin d"évaluer l'impact de la carence en groupement méthyles au niveau fonctionnel du cœur nous avons évalué différents paramètres grâce à la tomographie à émission de positrons (**PET**). La **PET** montre que la cavité du ventricule gauche chez le raton carencé est plus petite par rapport au témoin (Figure 20). Ces résultats sont en accord avec l"**augmentation de l'épaisseur** des parois du myocarde que cause une réduction de la cavité ventriculaire gauche observée lors de l"analyse histologique. Ceci confirme la présence d"une hypertrophie cardiaque du ventricule gauche.

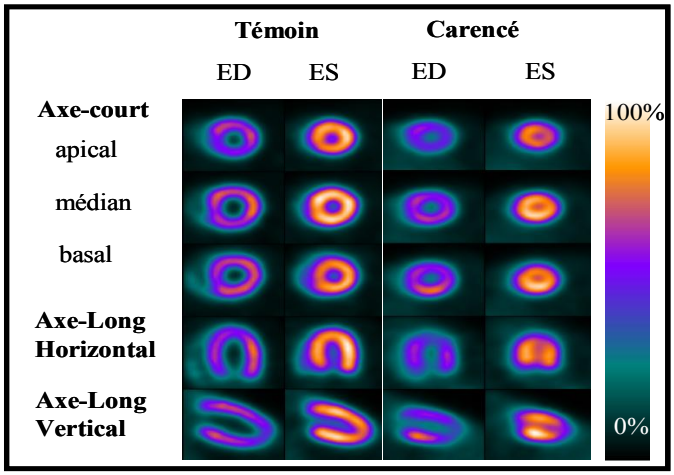


Figure 20. Analyses fonctionnelle du cœur de rats témoin et carencé en utilisant la tomographie à émission de positrons.

Parallèlement nous avons évalué de différents paramètres fonctionnels chez les animaux soumis à un régime carencé et normal (Tableau 1). On observe dans ce modèle nutritionnel que les animaux carencés présentent une fraction d"éjection plus élevée que les animaux témoins. En revanche, les volumes diastolique et systolique des cavités ventriculaires sont significativement inférieurs chez les animaux carencés par rapport aux témoins.

Paramètres	Témoin	Carencé	Valeur -*p*
Fraction d'éjection %	61 ± 11	70,2 ± 9	0,04
Volume diastolique final (µL)	183 ± 87	119 ± 41	0,01
Volume systolique final (µL)	74 ± 29	38 ± 26	0,03
Captation myocardique	2,6 ± 0.8	4,2 ± 1.5	0,05
Stroke	81 ± 16	109 ± 17	0,01

Tableau 1. Paramètres fonctionnelle du cœur de ratons témoin et carencé en utilisant la Tomographie à émission de positrons.

1.5.2. Pression artérielle et fréquence cardiaque

Nous avons évalué la fréquence cardiaque et la pression artérielle chez les ratons issus de mères carencées en groupement méthyles, en utilisant la méthode pléthysmographique du manchon caudal, cette méthode évalue les variations du volume sanguin dans un organe en utilisant la mesure de déplacement de volumes. Les résultats montrent qu"il n"y a pas de variation au niveau de la fréquence cardiaque ni au niveau de la pression artérielle chez les ratons carencés par rapport aux témoins (Tableau 2).

Paramètres	Témoin	Carencé	Valeur -*p*
Fréquence cardiaque	324 ± 22	331 ± 13	Ns
Pression artérielle diastolique (mm Hg)	55 ± 4	70 ± 4	
Pression artérielle systolique (mm Hg)	125 ± 9	125 ± 6	Ns
Pression artérielle moyenne (mm Hg)	82 ± 4	96 ± 4.5	Ns

Tableau 2. Détection de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle chez les ratons. Valeurs : Moyenne ± SEM Différences, statistiquement significative (p<0,05), ANOVA. Ns : no significative

2. Dosages des déterminants nutritionnels de l'homocystéine

2.1. Dosages plasmatiques

Les dosages plasmatiques montrent une diminution du taux de vitamine B12 et folates chez les ratons carencés par rapport au groupe témoin. Les diminutions observées s"accompagnent d"une augmentation de la concentration plasmatique en homocysteine chez les animaux carencés par rapport aux animaux témoins, conduisant à une hyperhomocysteinémie « modérée » au moment du sevrage (tableau 3).

Paramètres	Témoin	Carencé	Valeur -*p*
Vitamine B12 (pmol/L)	599 ± 23	159 ± 9	0,0001
Folate (nmol/L)	68,5 ± 3.8	7,7 ± 1.8	0,0001
Homocystéine (µmol/L)	6,05 ± 0.19	29,2 ± 5.0	0,0001

Tableau 3. Dosages plasmatiques de la vitamine B12, Folates et Homocysteine. Valeurs :Moyenne ± SEM Différences statistiquement significative (p<0 ,05), ANOVA

Par ailleurs, nous avons noté l"existence d"une corrélation positive entre le poids des ratons de 21 jours et les concentrations plasmatiques en folates et vitamine B12 (tableau 4). Ceci signifie que la carence entraine une perte de poids.

Paramètre	Déterminant	Corrélation	Valeur -*p*
Poids	**Folates**	0,841	0,0001
Poids	**Vitamine B12**	0,956	0,0001

Tableau 4. Test Z de corrélation entre le poids des rats et les concentrations plasmatiques en folates et vitamine B12.

2.2. Dosage tissulaires

L"analyse des concentrations tissulaires montre qu"il existe des différences significatives entre le groupe carencé et témoin pour les concentrations en vitamine B12 et folates. Comme attendu le taux de folates est diminué chez les ratons carencés. Par contre, de mamière paradoxale, nous avons observé une augmentation de la concentration en vitamine B12. En revanche, il n"y a aucune différence au niveau de la concentration en l"homocystéine entre les deux groupes évalués (tableau 5).

Paramètres	Témoin	Carencé	Valeur -*p*
Vitamine B12 (nmol/g protéine)	1,07± 0,40	**2,56 ± 0,47**	0,0001
Folates (nmol/g protéine)	20 ± 5,1	16,5 ± 11	0,001
Homocystéine (nmol/g protéine)	98 ± 42	82 ± 30	0,67

Tableau 5. Dosages cardiaques de la vitamine B12, folates et homocystéine. Valeurs : Moyenne ± SEM Différences statistiquement significative ($p<0,05$), ANOVA

2.2.1. Phénotypage Métabolique

2.2.1.1. Activités des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocysteine

Afin d"évaluer les conséquences de la carence en groupements méthyles chez les ratons de 21 jours, nous avons mesuré les activités des enzymes impliquées dans la régulation de l"homocystéine au niveau cardiaque; les résultats sont exprimés en nmol /h/mg de protéines (Figure 12Génération et métabolisme des espèces réactives oxygénées (ROS, reactive oxygen species).

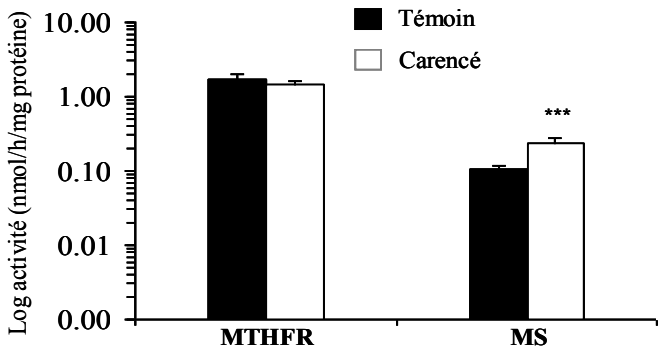


Figure 21. Activités enzymatiques du cycle de l"homocystéine dans le cœur des rats de 21 jours carencés et no carFigure 22encés en groupements méthyles : méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR); méthionine syntase (MS). (P<0,05, ***P<0,001), ANOVA. (n = 11).

Nous observons, qu"il n"existe pas de différence significative de l"activité MTHFR entre les deux groupes. En revanche chez les ratons carencés, il existe une augmentation significative de l"activité Méthionine synthase (MS) par rapport aux ratons témoins. Ce résultat est en accord avec le taux élevé tissulaire de vitamine B12 chez les animaux carencés, car la vitamine B12 favorise l"activité de la MS dont elle est le cofacteur indispensable.

2.2.1.2. Métabolites impliquées dans les réactions de méthylations

Nous nous sommes ensuite intéressés aux produits impliqués dans les réactions de méthylation : S-adénosyl-méthionine **(SAM)** et S-adénosyl-homocystéine **(SAH).** Les résultats sont exprimés en nmol /g de tissu. Les concentrations cardiaques de SAM et SAH sont calculées grâce aux aires de pic et à partir d"une gamme standard. Les résultats montrent une

augmentation significative des taux SAH chez les ratons carencés par rapport aux témoins, dont le rapport SAM/SAH diminue (Figure 22).

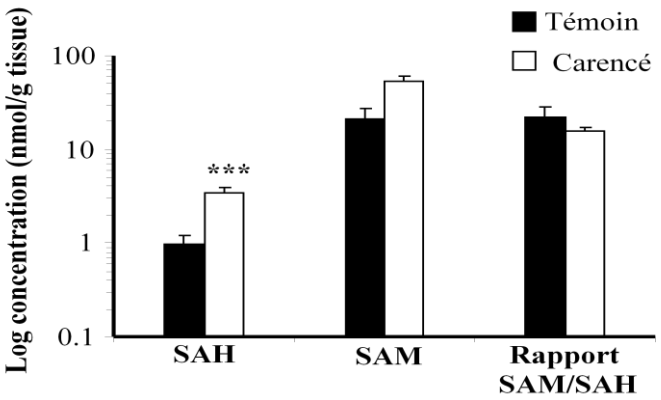


Figure 22. Concentrations des métabolites impliqués dans le cycle de l"homocystéine à J21 (n = 11). SAM: S-adénosylméthionine; SAH: S-adénosylhomocystéine. (*P<0,05, ***P<0,001), ANOVA

3. Mécanismes qui conduisent à une hypertrophie cardiaque

3.1. Marqueurs cardiaques du stress oxydant et peroxydation lipidique

Nous avons mesuré des facteurs impliqués dans le stress oxydant dans le cœur des ratons de 21 jours, afin d"évaluer les conséquences d"une carence en groupement méthyles. Les résultats montrent que **l'activité SOD**, qu"elle soit mitochondriale (Cu/Zn dépendante) ou cytoplasmique (Mn dépendante), **ne varie pas** chez le raton né de mère carencée par rapport au groupe témoin. De la même façon, on observe que **l'activité GPX et la quantité de MDA ne varie pas** entre les deux groupes (Figure 23).

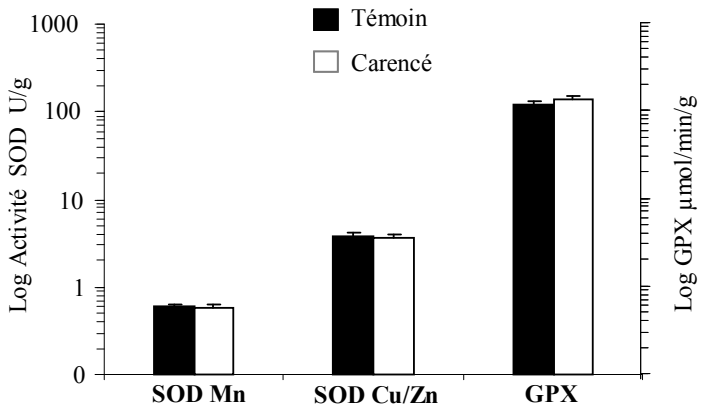


Figure 23. Activités superoxyde dismutase (SOD) manganèse dépendante (Mn) ou cuivre et zinc dépendante (Cu/Zn); Glutathion peroxydase (GPX). Valeurs : Moyenne ± SEM Différences statistiquement significatives (p<0,05), ANOVA

3.2. Voies de signalisation MAPKs

Les résultats montrent qu"il n"y a pas de différences entre les deux groupes étudiés de l"expression de p44 et p42 (ERK). En revanche, il" existe des différences significatives pour p44 et p42 phosphorylé chez les ratons carencés l"intensité de l"expression de p42 et p44 phosphoryle, apparaît plus faible par rapport aux ratons témoins (Figure 24). Ce résultat n"est pas en faveur d"une activation d"ERK1/2. Concernant la p38 MAP Kinase, il"y a une diminution significative de la expression de p38 total et phosphorylé chez les ratons carencés par rapport aux témoins.

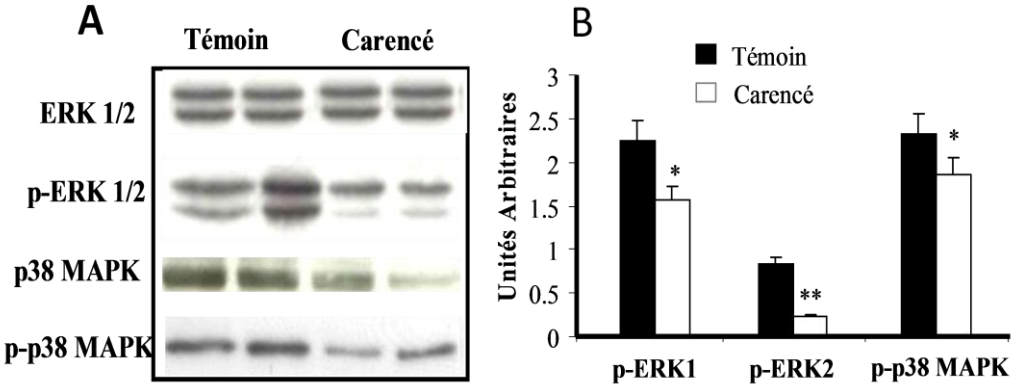


Figure 24. Etude de l"expression de protéines MAPKs par Western Blot dans les cœurs des rats. Les bandes ont été mesurées par densitométrie et les niveaux de la phosphorylation de MAPK ont été normalisées aux niveaux de protéine totale de ces molécules dans le même échantillon et ont été exprimées en unités arbitraires (*P<0,05, ***P<0,001), ANOVA

3.3. Apoptose

Nous avons étudié **l'apoptose** par trois techniques (Western blot, TUNEL et Apostain). Par Western blot, nous avons évalué l'expression des protéines impliquées dans l"apoptose, par exemple BCL2 (protéine anti-apoptotique et régulatrice de la prolifération cellulaire), Bax (inducteur de l"apoptose) et Caspase 3 (principal effecteur de la cascade apoptotique). Les résultats montrent que la carence en donneurs de groupements méthyles induit une diminution significative dans l"expression des protéines Bax et caspase 3. En revanche, il" y à une augmentation de l"expression de la protéine Bcl2. (Figure 25).

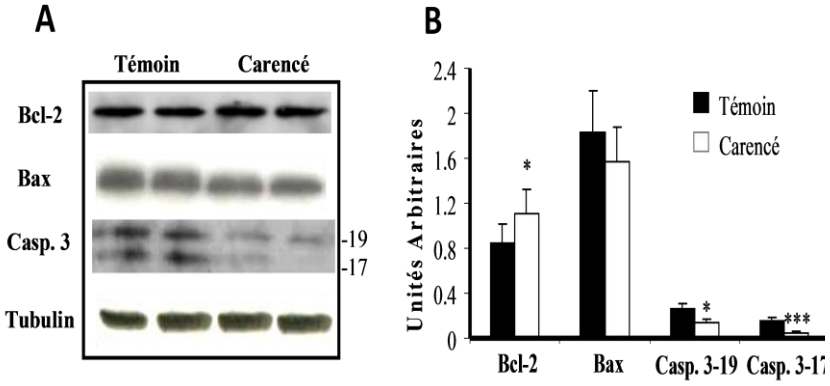


Figure 25. Etude de l"expression de protéines apoptotiques par Western Blot dans les cœurs des rats. Les bandes ont été mesurés par densitométrie et les niveaux d"expression ont été normalisés aux niveaux de protéine Tubuline dans le même échantillon et ont été exprimé en unités arbitraires (*P<0,05, ***P<0.001), ANOVA

Parallèlement nous avons confirme grâce à la technique TUNEL et Apostain que chez le rats carencés il n"y a pas d"apoptose (Figure 26). Cet-à-dire le régime carence n"entraine pas un état apoptotique chez les ratons carencés.

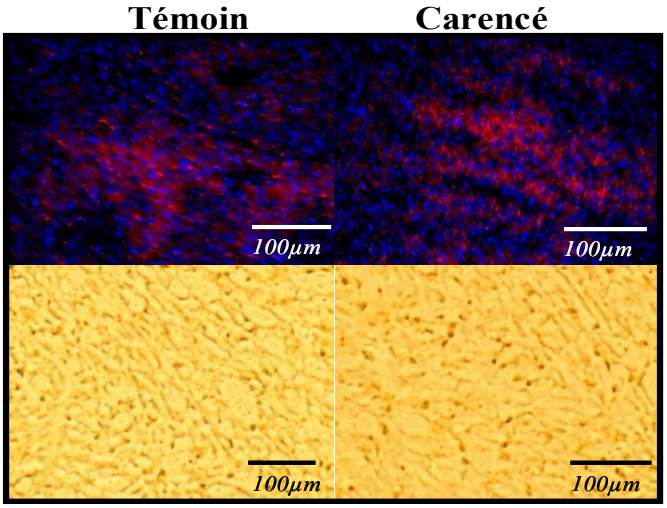


Figure 26. Detection de cellules apoptotiques à travers des études immunohistochimiques :a) detection par aposteine ;b) marcage Tunnel

3.4. Voies de prolifération AKT/PKB

Par rapport aux voies de signalisation AKT/PKB, les résultats montrent qu"il n"y a pas de différence significative au niveau de l"expression chez les ratons issus d"un régime carencé (Figure 27). Cet-à-dire il n"y a pas d"activation de ces voies, voies que par ailleurs sont impliquées dans l"hypertrophie myocardique.

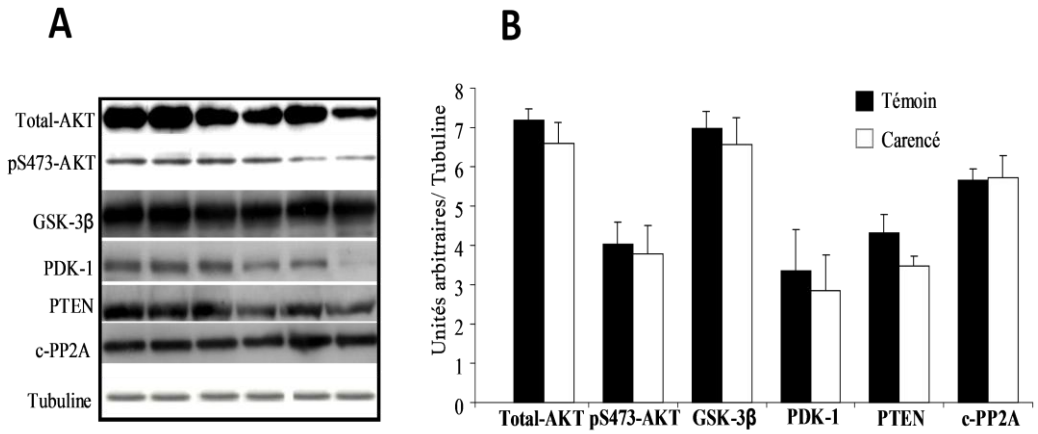


Figure 27. Etude de l"expression de protéines apoptotiques par Western Blot dans les cœurs des rats. Les bandes ont été mesurés par densitométrie et les niveaux d"expression ont été normalisés aux niveaux de protéine Tubuline dans le même échantillon et ont été e exprimé en unités arbitraires (*P<0,05), ANOVA

4. Microscopie électronique

4.1. Observations microscopiques du contenu lipidique dans les cardiomyocytes

L"observation des cardiomyocytes en microscopie électronique révèle la présence de gouttelettes lipidiques. Ces gouttelettes lipidiques sont accumulées dans le cytoplasme chez les animaux carencés. La structure du réticulum endoplasmique, similaire entre les deux groupes de ratons, est normale et homogène, cela montre que cet organite ne subit pas de stress particulier. Par ailleurs, il a été mis en évidence une désorganisation mitochondriale, les analyses ultra-structurales révèlent un alignement mitochondrial perturbé le long des myofibrilles, chez les animaux carencés (Figure 28).

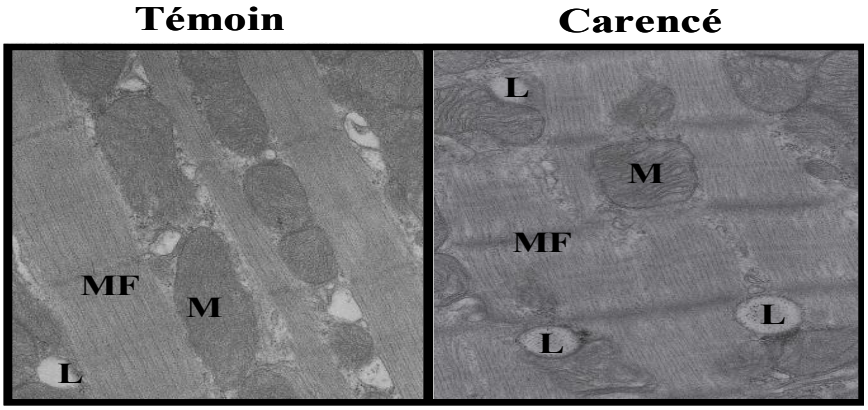


Figure 28. Observation d"une stéatose cardiaque modérée et une perturbation de l"alignement mitochondriale à long des myofibrilles dans le groupe carencé.

4.2. Statut lipidique au niveau tissulaire

Nous avons évalué le statut lipidique au niveau tissulaire et les résultats montrent une augmentation significative de la concentration en lipides totaux, cette augmentation concerne aussi bien le cholestérol total et les triglycérides chez les animaux carencés par rapport aux témoins (Figure 29). Ceci signifie que les animaux carencés présentant une stéatose myocardique.

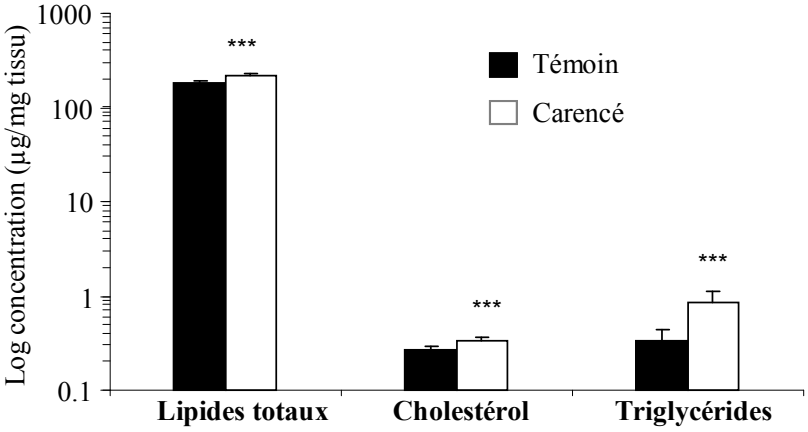


Figure 29. Lipides totaux, cholestérol total et triglycérides chez ratons de 21 jours. (*P<0,05, ***P<0,001), ANOVA.

5. Métabolisme énergétique

5.1. Nucléotides d'adénosine

Pour evaluer le potential energétique chez les cardiomyocytes nous avons mesuré par HPLC la concentration de nucléotides d‟adénosine (ATP, ADP, AMP). Les résultats montrent une forte diminution de la concentration d‟ADP et d‟ATP et une légère augmentation de la concentration en AMP chez le raton carencé par rapport au témoin (Figure 30).

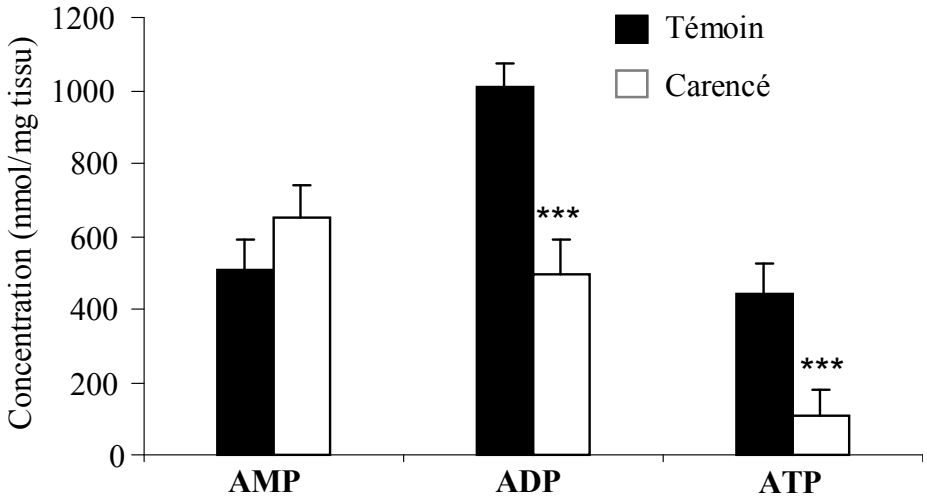


Figure 30. Détermination de la concentration d‟adénies nucléotides chez les ratons. Valeurs : Moyenne ± SEM Différences statistiquement significative ($p<0,05$), ANOVA

5.2. Potentiel énergétique

Nous avons déterminé le potentiel énergétique. Les résultats font apparaître une forte diminution ensuite du rapport ATP/ADP chez les ratons carencés en comparaison aux témoins (Figure 31).

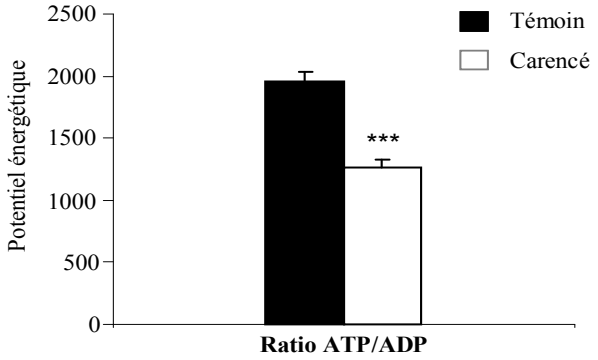


Figure 31. Détermination du potentiel énergétique chez les ratons.
Valeurs : Moyenne ± SEM Différences statistiquement significatives ($p<0,05$), ANOVA

5.3. Carnitine et acylcarnitines

5.3.1. Concentrations de carnitine au niveau Tissulaire

Pour essayer d'expliquer les résultats précédents, nous avons mesuré les concentrations en carnitine libre ou liée au niveau tissulaire, grâce à une analyse par chromatographie à haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (LCMS/MS). Les résultats montrent que les animaux carencés présentent une baisse significative des concentrations cardiaques en carnitine libre et totale. La concentration en acétylcarnitine, est également diminuée chez les ratons carencés. Pour les acylcarnitines, les ratons carencés présentent une diminution significative de la concentration d"acylcarnitines à chaînes moyennes, courtes, et longues (Figure 32).

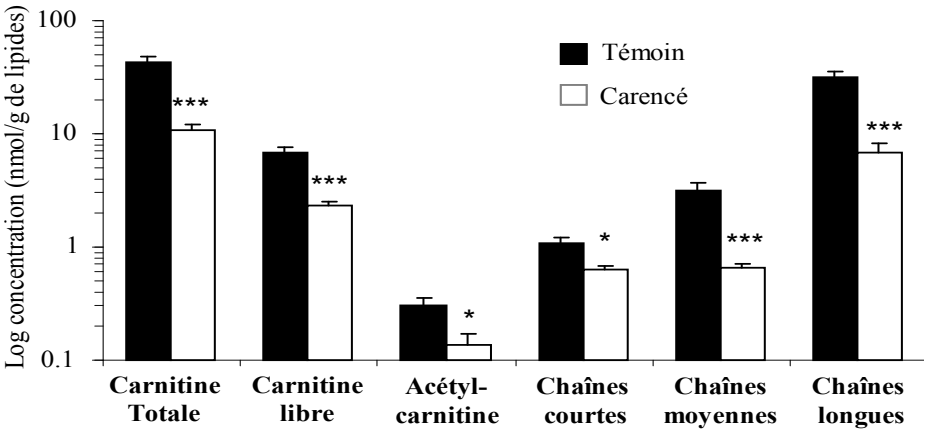


Figure 32. Concentrations cardiaques en dérives de carnitine chez les ratons. Valeurs : Moyenne ± SEM Différences statistiquement significatives (p<0,05), ANOVA

5.3.2. Concentrations de carnitine au niveau Plasmatique

Nous avons mesuré les concentrations plasmatiques en carnitine libre ou liée. Les résultats montrent que les animaux carencés présentent une baisse significative des concentrations plasmatiques en carnitine libre, totale et acétylcarnitine. En revanche, il y a une augmentation significative des acylcarnitines à chaines moyennes, courtes et longues chez les animaux carencés par rapport aux témoins (Figure 33).

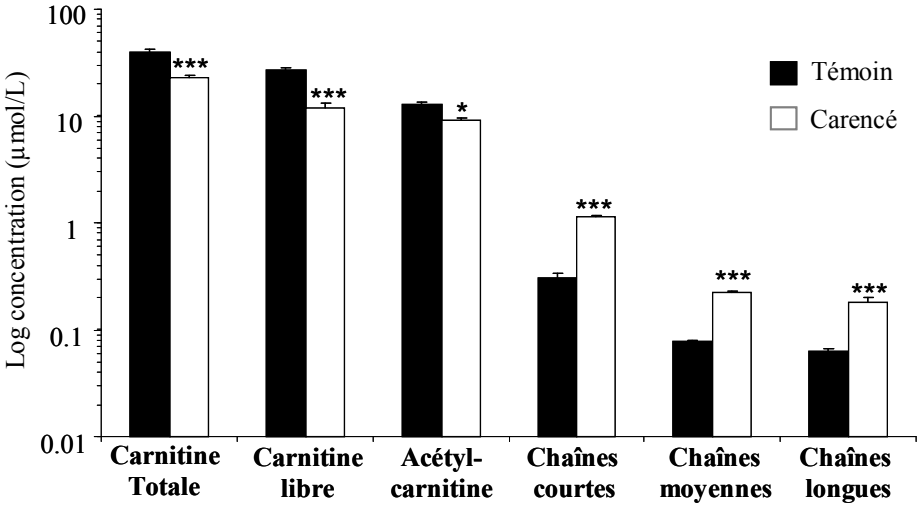


Figure 33. Concentrations plasmatiques en dérives de carnitine chez les ratons. Valeurs : Moyenne ± SEM Différences statistiquement significatives (p<0,05), ANOVA

Nous nous sommes ensuite intéressés au principal transporteur de carnitine dans les cardiomyocytes (OCTN2). Les analyses immunohistochimique montre une diminution de la concentration du transporteur OCTN2 chez les animaux carencés. Ce résultat explique la baisse significative de la concentration de carnitine au niveau tissulaire et plasmatique chez les animaux carencés (figure 34).

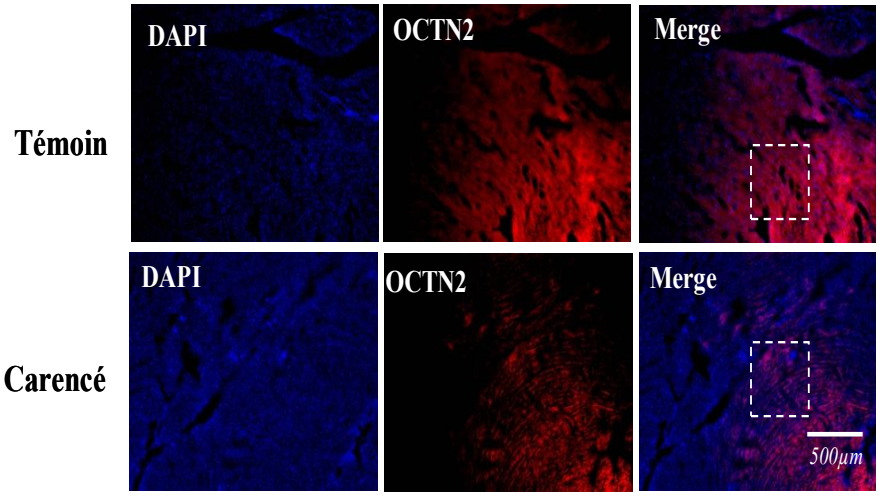


Figure 34. Détermination de l"expression d"OCTN2 par analyses immunhistochimique chez les ratons. Les images ont été prises à partir d"un microscope Leica (objectif x4).

Comme nous l"avons vu dans l"analyse précédant, l"expression d"OCTN2 est diminuée de façon significative chez les animaux carencés, ces résultats ont été confirmés par Western blot, où nous observons aussi une diminution significative de l"expression protéique d"OCTN2 (Figure 35).

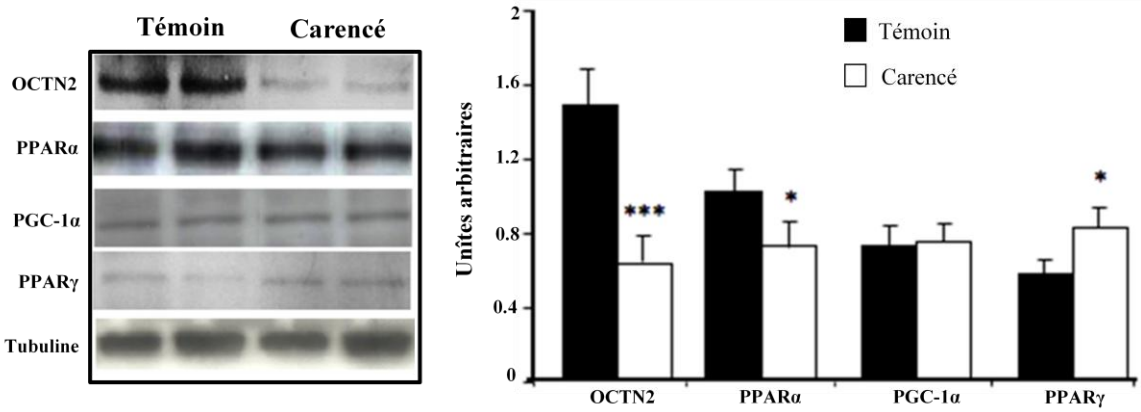


Figure 35. Etude de l"expression de protéines impliques dans le metabolisme energetique par Western Blot dans les cœurs des rats. Les bandes ont été mesurés par densitométrie et les niveaux d"expression ont été normalisés aux niveaux de protéine Tubuline dans le même échantillon et ont été exprimé en unités arbitraires (*P<0,05), ANOVA

Nous avons ensuite évalué l‟expression de PPARα et PGC-1α. En effet, PGC-1α est le régulateur principal de PPARα, lequel exerce un effet direct sur la régulation d‟OCTN2. Les résultats montrent qu‟il existe une diminution significative de l‟expression de PPARα chez les animaux carencés, par contre nous n‟observons pas de différence significative concernant l‟expression de PGC-1α entre le deux groupes étudiés.

6. Respiration mitochondriale

Les résultats montrent (Figure 36) une baisse globale de la respiration mitochondriale quelque soit le substrat utilisé avec une diminution significative des activités liées au complexe I. C'est-à-dire au niveau de la chaîne avec des substrats amenant du NADH par exemple pyruvate, malate et glutamate.

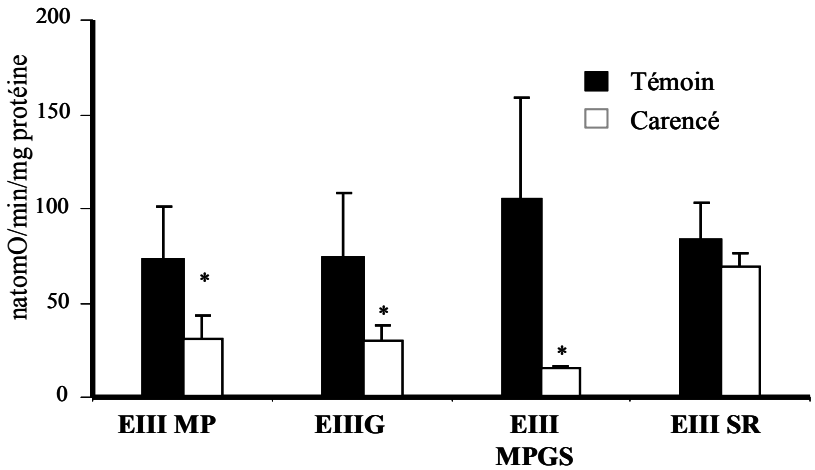


Figure 36. Etude de la respiration mitochondriale dans le cœur de ratons de 21 jours. (*P<0,05), ANOVA

6.1. Activité du citrate synthase

Nous avons évalué l‟activité du citrate synthase sur des l‟homogénats tissulaires cardiaques après l‟élimination des noyaux parce que le citrate synthase est utilisée comme marquer de la masse mitochondriale. Les résultats ne montrent pas de différence au niveau de l‟activité de la cytrate synthase. Ce résultat est en faveur d‟une diminution de la quantité de mitochondries dans le cœur de ratons soumis au régime carencé (Figure 37).

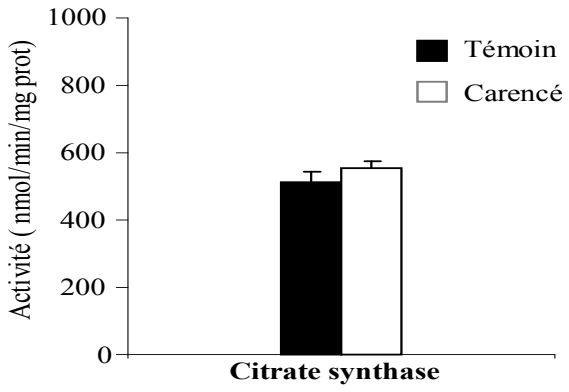


Figure 37. Evaluation de l"activité citrate synthase dans le cœur de ratons de 21 jours. (*P<0,05), ANOVA

6.2. Régulation de l'entrée d'acides gras par la CPT1

La ration de consumation d"oxygène entre palmytoyl-l- Carnitine/palmytoyl CoA comme substrats respiratoire permet l"évaluation de la régulation de l"entrée d"acides gras dans la mitochondrie *via* la CPTI. Les résultats montrent qu"il ne semble pas avoir limitation de l"entrée des acides gras par la CPT-1 particulière chez les carencés, puisque le rapport palmytoyl Carnitine/palmytoyl CoA n"est pas différent entre les deux groupes (Figure 38).

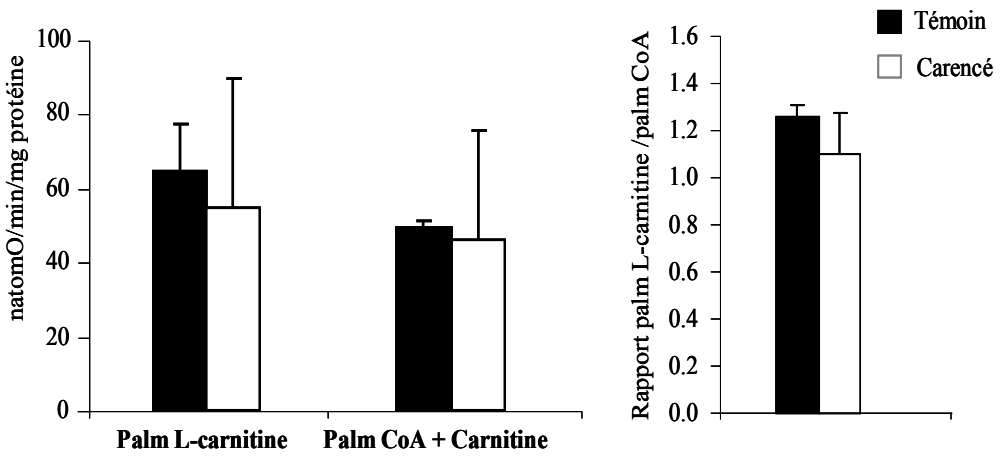


Figure 38. Evaluation de la régulation de l"entrée d"acides gras dans la mitochondrie via la CPTI dans le cœur de ratons de 21 jours. (*P<0,05), ANOVA

6.3. Dosage enzymatique du complexe de la chaîne respiratoire

Au niveau de la fonction des complexes de la chaîne respiratoire, les résultats montrent que chez les animaux carencés il‟y a une diminution de l‟activité des complexes (I et II) mais cette diminution est plus marquée pour le complexe I (Figure 39). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par les oxygraphies.

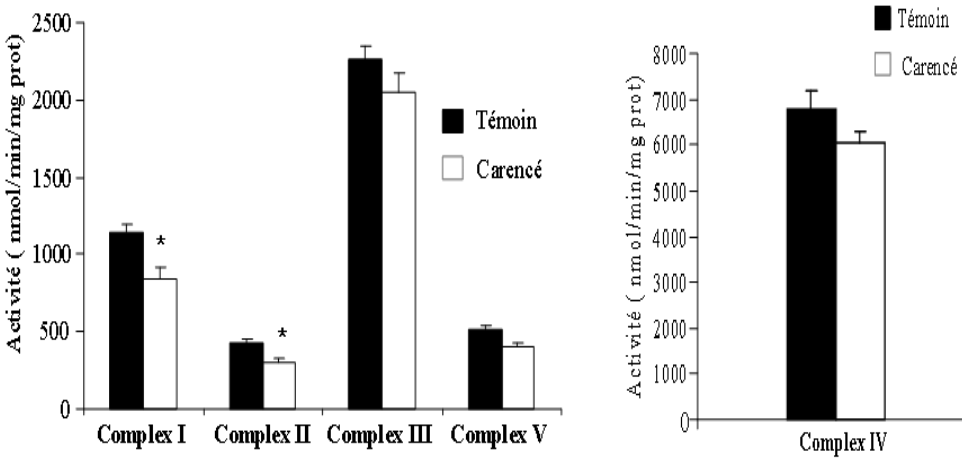


Figure 39. Activite enzymatique du complexe de la chaîne respiratoire dans le cœur de ratons de 21 jours. (*P<0,05), ANOVA

6.4. Dosage enzymatique de quelques enzymes du cycle de Krebs

Afin de vérifier si cette diminution est consécutive à une diminution d‟apport en substrats nous avons évalué l‟activité de quelques enzymes du cycle de Krebs particulièrement les activités citrate synthase, aconitase et fumarase. Les résultats montrent qu‟il n‟y a pas de différence au niveau des activités de la cytrate synthase, aconitase et fumarase entre les deux groupes évalués (Figure 40).

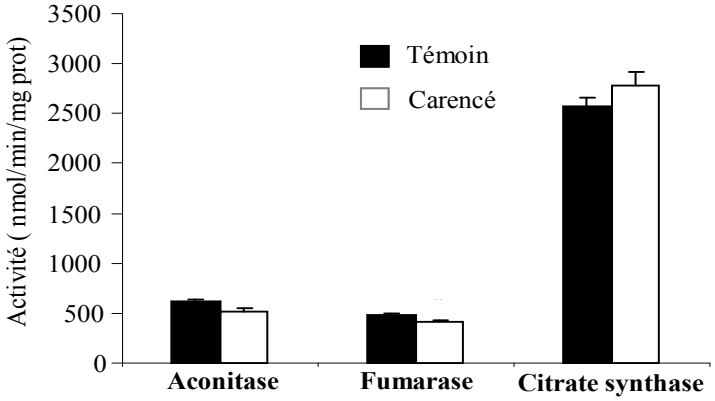


Figure 40. Evaluation de quelques enzymes du cycle de Krebs dans le cœur de ratons de 21 jours. (*P<0,05), ANOVA

7. Analyse protéomique du myocarde

L"analyse protéomique fait apparaître 8 protéines qui présentent des changements quantitatifs significatifs par rapport a leur abondance. Ces protéines sont impliquées dans le métabolisme énergétique et sont en relation avec PPAR-α et PGC-1 α. Parmi ces protéines nous avons trouvé que la [MTPA (42%)], acylCoA dehydrogenase à chaine courte [SCAD (25%)], aldose reductase [AKR1B1 (17%)], NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1α subunit 10 [NDUFA10 (34%) et NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein-2 [NDUFV2 (20%)] diminuent chez les ratons soumis au régime carencé (Figure 41).

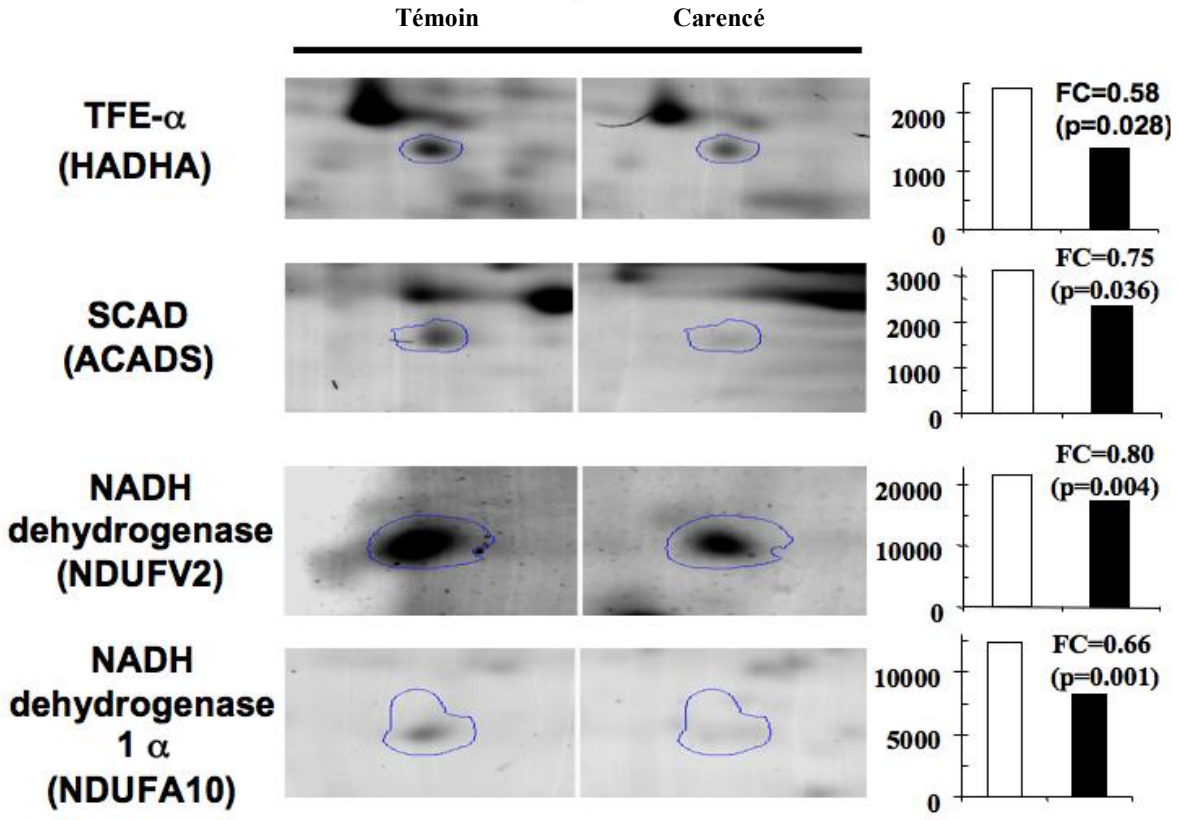


Figure 41. Analyse protéomique de quelques proteines impliques dans le metabolisme energetique mitochondriale dans le cœur de ratons de 21 jours

Chez les animaux témoins il existe une augmentation de l"abondance de certaines protéines comme par exemple : fatty acid binding protein-3 [FABP-3(37%)], Acyl-coenzyme A thioesterase 2 [ACOT-2 (65%)], isocitrate dehydrogenase [IDH3A (26%)] et la protéine Hspd1 [HSPD1 (19%)] (Figure 42).

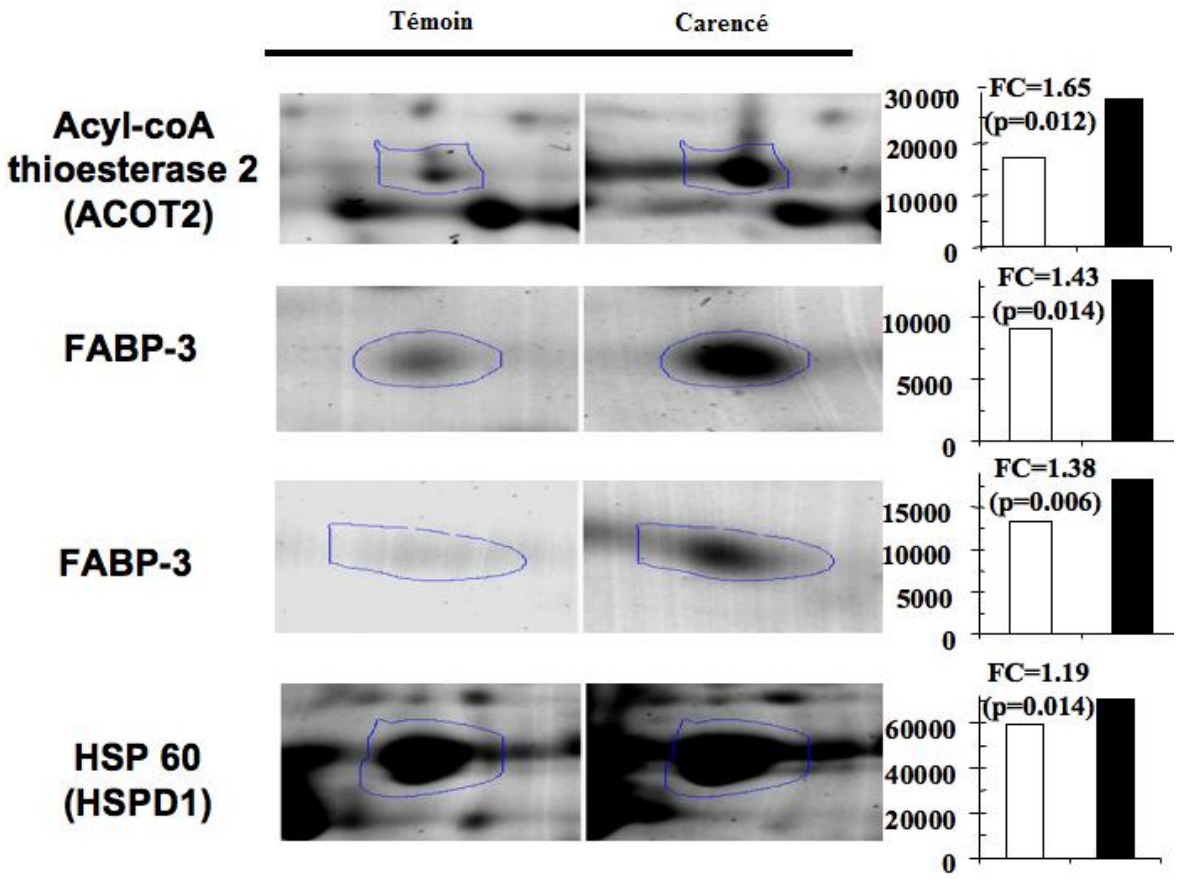


Figure 42. Analyse protéomique de quelques proteines impliques dans le metabolisme energetique mitochondriale dans le cœur de ratons de 21 jours.

8. Effets du retour à un régime normal chez le raton issu de mère carencée

Après le sevrage, (21 jours postnatals) un groupe de ratons carencés a été nourri avec un régime standard jusqu"à 80 et 240 jours de vie. Ces ratons ont été comparés à un groupe témoin issu de mères non carencées. Une série de dosages ont été effectuée pour évaluer les effets d"un régime normal et sur la réversibilité potentielle de l"hypertrophie myocardique. Les résultats observés ne montrent pas de différence significative entre les deux groupes, que ce soit pour les concentrations de BNP plasmatiques et tissulaire comme pour le rapport cœur/poids (Figure 43).

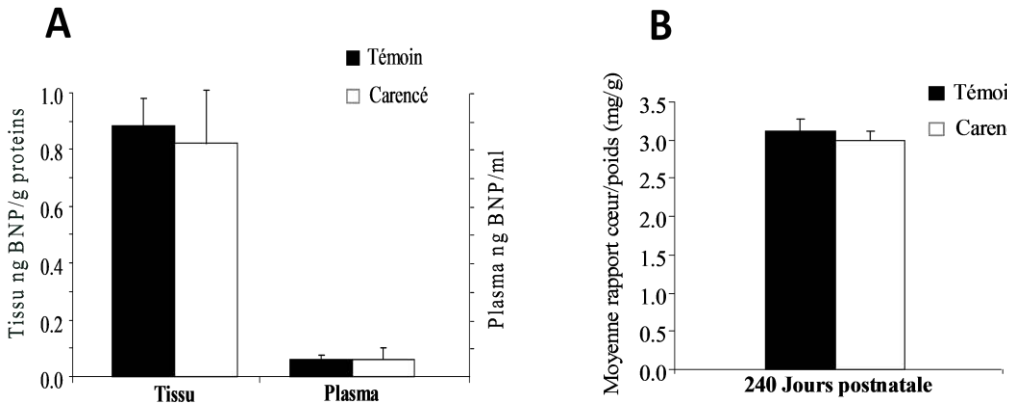


Figure 43. Effet du retour à une regine normal dans le cœur de ratons de 80 et 240 jours, ANOVA

9. Etude de Correlations

L"association entre le rapport cœur/poid, BNP, Homocystéine, folates et vitamine B12 a été évaluée chez les animaux en effectuant une analyse univariée (Tableau 6). Cette analyse montre une corrélation entre les folates, la vitamine B12 et l"homocystéine avec l"hypertrophie myocardique (rapport cœur/poids) et les concentrations de BNP plasmatique.

	Homocystéine mmoles/l	**Folate**	**Vitamine B12**
Rapport cœur (mg)/poid(g)	r = 0,500 p = 0,0043	r = -0,670 p = 0,0001	r = -0,609 p = 0,0003
BNP plasmatique	r=0,693 p= 0,0001	r= - 0,754 p= 0,0001	r= -0,819 p= 0,0001

Tableau 6. Association en analyse univariée entre les indicateurs de l"hypertrophie cardiaque et les determinant de l"homocystéine. Le tableau contient les valeurs de coefficients de corrélation (r).

Dans le même sens, nous avons observé une association positive entre les différentes formes de la carnitine et le rapport cœur/poid, BNP et Homocystéine.

Acylcarnitines	Rapport cœur (mg)/corp(g)	BNP plasmatique	Homocystéine
Chaînes courtes	r = 0,648 p = 0,0001	r = 0,845 p = 0,0001	r = 0,630 p = 0,0001
Chaînes moyennes	r = 0,660 p = 0,0001	r = 0,789 p = 0,0001	r = 0,733 p = 0,0001
Chaînes longues	r = 0,693 p = 0,0001	r = 0,705 p = 0,0001	r = 0,525 p = 0,0005

Tableau 7. Association en analyse univariée entre les dérivés de carnitine et les déterminants de l" homocystéine. Le tableau contient les valeurs de coefficients de corrélation (r).

Discussion

1. Conséquences morphologiques et fonctionnelles du régime carencé en donneurs de méthyles sur le myocarde

Récemment, plusieurs études de population ont suggéré une association entre l"Hcy et l"insuffisance cardiaque, l"hypertrophie cardiaque et le BNP [175-178]. Afin de tester si cette association serait la cause ou la conséquence de l"insuffisance cardiaque, nous avons mis en place un modèle de rat carencé en donneurs de groupements méthyles qui induisent une augmentation de la concentration de l'homocystéine au niveau plasmatique [179]. En utilisant ce modèle, nous avons démontré pour la première fois un lien entre la carence en folates et vitamine B12 avec le développement de l"hypertrophie cardiaque chez les rongeurs.

Dans notre modèle, le régime carencé en donneur de méthyles a été efficace dans le sens où il induit une diminution de la concentration en folates et vitamine B12 avec une augmentation de la concentration de l"homocystéine (5 fois plus élevée chez le raton carencé par rapport au raton contrôle comme nous l"avons décrit dans la littérature) [179]**.** En même temps, nous avons observé que le régime carencé en donneurs de méthyles induit chez le raton de 21 jours une hypertrophie cardiaque, qui est accompagnée d"une augmentation de l"épaisseur de la paroi du myocarde et du rapport cœur/poids corporel. Ces résultats sont en accord avec les observations conceranat l'agrandissement des cardiomyocytes (surface) chez les ratons carencés et aussi que l"augmentation significative des concentrations tissulaires et plasmatiques du **BNP** *peptide natriurétique de type B*-, comme on le voit typiquement dans une insuffisance cardiaque sa synthèse est augmentée en cas de distension de ce tissu, ce qui fait penser que l"élévation du taux de BNP est en rapport avec une augmentation de la production de cette protéine et non pas seulement une augmentation du relargage de celle-ci lors d'une destruction des cellules cardiaques.

Dans notre cas, l"augmentation du BNP n"était pas accompagnée d"altération au niveau de la tension artérielle moyenne systémique [180]. Cela signifie que nous sommes en présence d"une hypertrophie ventriculaire gauche avec post-charge normale (absence d"hypertension artérielle). En effet, cette hypertrophie augmente de façon significative la fonction cardiaque et cela explique pourquoi chez le raton carencé la fraction d"éjection est augmentée, alors que la dysfonction diastolique, exprimée par la pression de remplissage et par les résistances aortiques,

n"a pas pu être étudié à cause de la petite taille des ratons. En conclusion la carence en groupement méthyles a un effet néfaste sur le remodelage cardiaque.

2. Homocystéine, folates, vitamine B12 et métabolisme des monocarbones dans le tissu cardiaque

Comme attendu, la concentration en folates dans le tissu cardiaque est diminuée chez les ratons carencés. En revanche, le dosage de la concentration de la vitamine B12 montre des résultats paradoxaux. En effet, la concentration de la vitamine B12 était augmentée d"un facteur 2 chez les ratons carencés. Ce résultat est inattendu car l"organe principal de stockage de vitamine B12 est le foie. Il semble donc que la quantité de vitamine B12 dans le foie (de l"ordre du milligramme) est suffisante pour subvenir aux besoins tissulaires pendant plusieurs années. Un autre élément d"explication de ce résultat est la possibilité qu"il existe, à la surface tissulaire cardiaque, une surexpression du récepteur TC-B12, du fait d"une déficience en vitamine B12 au niveau plasmatique chez les animaux carencés. En effet, certains auteurs ont montré que le nombre de récepteurs de la vitamine B12 à la surface cellulaire varie en fonction des besoins tissulaires [181].

Nos résultats montrent qu"il n y a pas de différence dans la concentration d"homocystéine au niveau tissulaire entre les deux groupes évalués. Ces résultats sont inattendus car les cellules myocardiques n"expriment ni l"enzyme principale de son catabolisme (cystathionine-ß-synthase) ni l"enzyme de la voie de reméthylation alternative (Bétaïne homocystéine méthyltransférase) [182]. Dans ces conditions, la reméthylation catalysée par la méthionine synthase (MS) dépendante des folates et de la vitamine B12, est la seule voie qui puisse métaboliser l"homocystéine dans les cardiomyocytes. Pour essayer d"apporter une explication à ces résultats, nous avons determiné l"activité de la MS. Les résultats obtenus montrent que les animaux carencés présentent une augmentation de l"activité de la MS. Cette augmentation de l"activité de la MS peut être expliquée par l"augmentation de la concentration en vitamine B12 au niveau tissulaire. Diverses études ont montré que la vitamine B12 augmente l"expression de la MS par un mécanisme post-transcriptionel [183]. L"induction de l"expression de la MS 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) [184] Les animaux carencés présentent également des taux très élevés de SAH avec une diminution du rapport SAM/SAH considéré comme le potentiel de méthylation. Ces résultats nous ont conduit à penser qu"il existe une accélération du cycle de reméthylation d"homocysteine en méthionine

chez le cardiomyocyte, ce qui pourrait expliquer pourquoi l'homocystéine ne s'accumule pas chez les animaux carencés. Par conséquent, la cardiomyopathie hypertrophique observée dans notre étude ne serait pas une conséquence d'une altération de la reméthylation de l'homocystéine dans le myocarde, mais serait liée à l'hyperhomocystéinémie qui reflète la carence en donneurs de groupement méthyle dans les autres tissus [179].

3. Conséquences de la carence en groupement méthylessur le stress cellulaire et l'apoptose

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) [185]. 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 44).

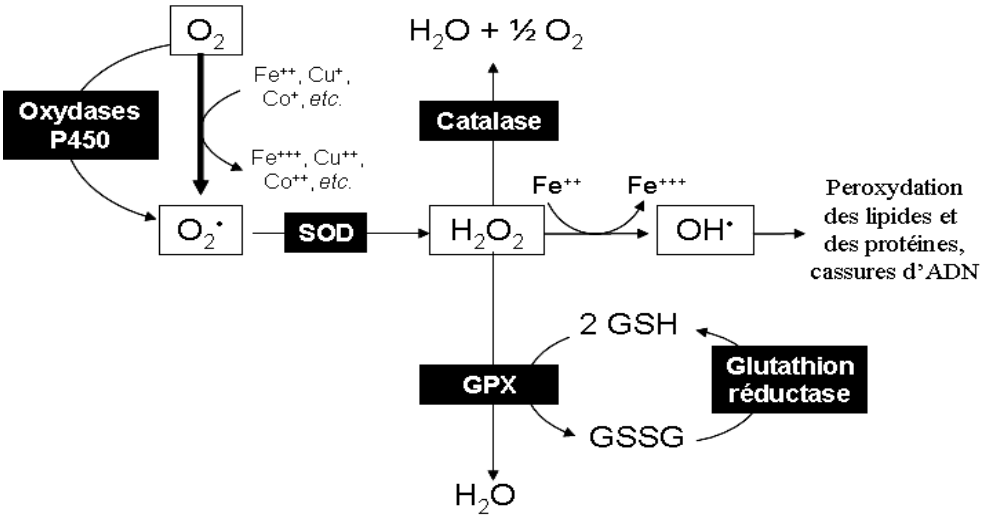


Figure 44. Génération et métabolisme des espèces réactives oxygénées (ROS, reactive oxygen species chez les mammifères.

Les mécanismes enzymatiques comportent les 2 isoformes de la superoxyde dismutase (SOD Mn et SOD Cu/Zn), de 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 déshydrogénase (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. [186-187]

Dans notre modèle animal les mesures d"activité des différentes SOD n"ont montré aucune différence significative entre les 2 groupes de ratons. Cela signifie que les cardiomyocytes ne semblent pas souffrir d"un stress oxydant lié à l"anion superoxyde. Dans le même sens, les cardiomyocytes n"ont montré aucune différence par rapport à la GPX entre les 2 groupes évalués, c"est-à-dire la déficience en folates et vitamine B12 ne conduit pas à une diminution de la capacité de répondre aux groupements péroxydés tels que les lipides ou les radicaux libres oxygénés (ROS).

En mesurant le taux de MDA, produit de la péroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés, et la carbonylation de protéines (Robert, 2005) [188], nous nous sommes rendu compte qu"il n"y a pas de stress oxydant chez les cardiomyocytes, c"est à dire que ce mécanisme a eu une influence limitée dans notre modèle. Cette observation et en opposition avec plusieurs données de la littérature qui suggèrent que l"homoysteine peut exercer des effets pro-oxydants dans le foie, le cerveau et le tissu vasculaire [179 , 189-197]. Néanmoins, dans les cardiomyocytes, il a été demontré l"existence d"une relation entre le stress oxydatif et l"hypertrophie cardiaque. Ces résultats sont surprenants mais une possible explication est que la concentration d"homoystéine plasmatique n"est pas assez élevée pour générer un effet pro-oxydant. En effet, car la plupart des études montre que l"effet de l"homocystéine est dose-dépendante [198]. Une autre explication possible à ces résultats est que presque le 99 % de l"homocystéine existe sous diverses formes oxydées indetectables dans la plupart des essais de dosage d"homocystéine. En effet, le potentiel pro-oxydant d"homocystéine peut être dû à différentes formes alternatives de la même molécule [199].

Pour essayer de donner une possible explication à l"hypertrophie observée chez les ratons de 21 jours, nous avons évalué différentes voies de signalisation et des facteurs pro-inflammatoires impliqués dans le développement d"une hypertrophie cardiaque tels que les voies de signalisation MAPKs, AKT, l"apoptose et le TNFα. Les résultats montrent que l"hypertrophie observée ne provient pas d"altérations en relation à l"apoptose, les MAPK et AKT dans notre modèle. Par ailleurs, il a été montré que les concentrations plasmatiques du TNFα, sont augmentées au cours de l"insuffisance cardiaque, et que le TNFα stimule la NADPH oxydase, enzyme productrice de grandes quantités d"ERO ($O_2^{\cdot -}$) au cours de l"insuffisance cardiaque [200]. Dans notre modèle, nous avons observé qu"il existe une diminution de l"expression du TNFα. Ce résultat pourrait être expliqué par l"augmentation de

la concentration de SAM, car l"expression du TNFα est réprimée par l"augmentation de la SAM [201]. Cette diminution du TNFα, chez les animaux carencés, pourrait expliquer l"absence de stress oxydant et d"apoptose dans notre modèle. En conclusion, l"hypertrophie observée dans notre modèle ne provient pas de l"activation des voies de signalisation des MAPKs, de l"apopotose, d"AKT ni des facteurs pro-inflammatoires impliqués dans le développement d"une hypertrophie cardiaque.

4. Effets métaboliques du régime carencé sur le myocarde

Les perturbations du métabolisme lipidique sont associées à diverses formes de cardiomyopathie, dont la plupart résultent d"une déficience de la β-oxydation. Diverses études ont montré qu"une altération du métabolisme lipidique peut conduire à une hypertrophie cardiaque (myocardiopathies métaboliques) [202].

L'examen en microscopie électronique du myocarde montre une rupture de l"alignement des mitochondries avec les myofibrilles. Cette désorganisation mitochondriale pourrait modifier la fonction et les interactions entre les protéines de la membrane externe mitochondriale et les protéines associées au cytosquelette. En effet, il existe des complexes fontinales associés aux sarcomères et au réticulum endoplasmatique (ie. ICEUs, unités énergétiques intracellulaires). Ces complexes sont importants pour une variété de fonctions comme par exemple : le couplage énergétique et le métabolisme oxydatif.[203] En effet, la rupture de l"alignement des mitochondries et probablement le stress mécanique produits par l"hypertrophie cardiaque, pourraient conduire à une interférence avec les mécanismes compensatoires qui nécessitent une production d"énergie suffisante pour maintenir la fonction cardiaque et un transfert efficace d"énergie depuis les mitochondries vers les sites d"utilisations énergétiques.

L"examen en microscopie électronique montre également une accumulation des gouttelettes lipidiques à proximité des mitochondries, suggérant une altération de leur oxydation. En accord avec cette hypothèse nous avons constaté une absence d"hypertrophie cardiaque pendant la période gestationnelle (20 jours post-coïtales). En effet, le glucose est le principal fournisseur d"énergie au niveau cardiaque avant la naissance, alors qu"après la naissance, ce rôle appartient aux acides gras provenant du lait [204].

Nous avons évalué les marqueurs métaboliques au niveau mitochondrial tels que les dérivés d"adénosine ATP, ADP et AMP. L'**adenosine monophosphate** (AMP) est un ester de l'acide phosphorique et de l'adénosine, qui peut également être produit lors de la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) par l'enzyme adénylate kinase, par combinaison de deux

molécules d'adénosine diphosphate (ADP) :2 ADP → ATP + AMP. Une molécule d'AMP peut aussi être produite par l'hydrolyse d'une liaison phosphate de haute énergie de l'ADP: ADP → AMP + P_i. L'AMP peut aussi être produite par l'hydrolyse de l'ATP en AMP et pyrophosphate: ATP → AMP + PP_i. Quand l'ARN est dégradé dans les systèmes vivants, des nucléosides monophosphatés sont formés, dont l'adénosine monophosphate. L'**adénosine diphosphate** ou **ADP** est un ester de l'acide phosphorique et du nucléoside adénosine. Il est le produit de déphosphorylation de l'ATP par les enzymes ATPases. L'ADP est convertie en ATP par l"ATP synthase. L'ADP peut réagir avec elle-même pour former une molécule d'ATP et une molécule d'AMP, réaction catalysée par l'enzyme adénylate kinase: 2 ADP ↔ ATP + AMP. L'ADP est le produit final qui résulte de la perte d'un groupe phopshate de l'ATP, situé à l'extrémité de la molécule [205]. La conversion de ces deux molécules joue un rôle critique dans l'acheminement de l'énergie pour beaucoup de processus vitaux [206].

Dans notre modèle, les résultats ont montré qu"il existe une forte diminution des ces dérivés et par conséquence du potentiel énergétique. Cette diminution, 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 cholestérol et à la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytosol myocardique. Finalement, comme l"ADP est également un fort régulateur de la respiration (Chance et Williams, 1955) [207], il est attendu que sa diminution induise une forte baisse de la phosphorylation oxydative et donc de la synthèse d"ATP.

Une modification du métabolisme des acides gras apparaît susceptible d"enclencher un stress métabolique dans le myocarde. Il nous est donc apparu important d"évaluer la respiration et l"activité des enzymes de la mitochondrie en mesurant les paramètres les plus couramment impliqués dans respiration mitochondriale (complexe de la chaîne respiratoire et activités enzymatiques du cycle de Krebs). Les résultats montrent qu"il y a une baisse de la respiration maximale en présence d"ADP, qui est plus importante dans les étapes liées au complexe I que celles liées au complexe II. Il y a une diminution de la capacité de phosphorylation oxydative maximale avec comme conséquence une diminution de la respiration au niveau du complexes 1 et II. En revanche, en présence de FCCP, c"est-à-dire en condition non-phosphorylante, la force proton-motrice est uniquement consommée par les réactions de fuite de protons. Dans ce cas, la consommation d"oxygène n„est pas différente dans les deux groupes évalués (respiration liée au complexe V).

La diminution de la capacité de phosphorylation oxydative maximale pourrait aussi être une conséquence d"une baisse de la masse mitochondriale. Pour le vérifier cette hypothèse,

nous avons évalué l‟activité citrate synthase, considérée comme un marqueur de la quantité de mitochondries. Les résultats obtenus montrent qu‟il n‟y a pas de différence au niveau de ce paramètre. En ce qui concerne les activités des complexes III, IV et V, de la CPT1 et des enzymes du cycle de Krebs, les résultats montrent qu‟il n‟y a pas de modification entre les deux groupes évalués, tandis que les activités des complexes 1 et II ont diminué. Cette diminution est cohérente avec la diminution de la respiration par rapport aux complexe 1 et II.

Pour autant, la difficulté réside à savoir quels types de protéines seront exprimées et quel sera l‟impact sur le reste du métabolisme. Ainsi, on peut imaginer que l‟expression non contrôlée de certaines protéines pourrait avoir des effets néfastes au niveau métabolique sur les cardiomyocytes. Toutes les hypothèses sont envisageables, mais pour obtenir des informations de ce type, nous avons réalisé des analyses de protéomique sur les tissus cardiaques. Les résultats montrent que chez le cardiomyocyte, il existe une expression altérée des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique (expression réduite de la NADH déshydrogénase (NDUFV2) et NADH déshydrogénase 1 sous-complexe Alpha 10 (NDUFA10)) [208]. Cette diminution pourrait expliquer la diminution de la respiration associée aux complexes 1, II et la diminution de la concentration d‟ATP observée chez les animaux carencés. En effet, la **NADH-déshydrogénase** est une flavoprotéine dont la fonction esl l‟oxydation du NADH. Cette oxydation du NADH, au sain de la chaine respiratoire, va générer une force électro-motrice suffisante pour le synth§se de 3 ATP au niveau de l‟ATP synthase.

L'analyse protéomique montre une expression réduite des protéines impliquées dans la β-oxydation des acides gras et le stockage des lipides tels que l‟acyl CoA déshydrogénase à chaîne courte C2-C3, également nommé SCAD, la protéine Hspd1 (chaperonne impliquée dans le pliage de l‟acyl-CoA déshydrogénase à chaîne moyenne [208] et aussi une diminution très marquée de l‟enzyme trifonctionnelle (MTPA). Cette dernière enzyme catalyse les trois étapes finales de la β-oxydation mitochondriale des acides gras (figure 45).

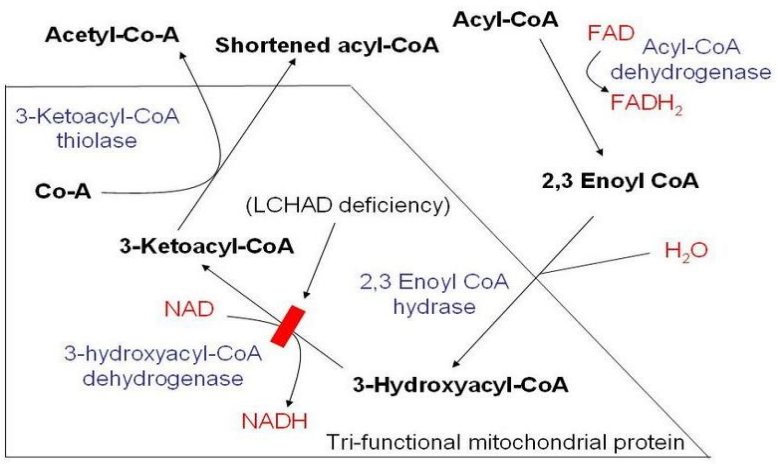


Figure 45. Activité de la protéine mitochondriale octamérique trifonctionnelle (MTPA)

Ibdah et al, [209] ont montré dans un modèle animal (souris) que l"absence de la protéine trifonctionnelle mitochondriale (MTPA-/-) conduit à une dégénérescence modérée à sévère des cardiomyocytes après la naissance. Nos résultats sont en accord avec une étude de protéomique récente, réalisée par Meng, C., et al [210] qui montre que chez le rat hypertendu, des protéines MTPA et de la NADH déshydrogénase 1 sous-complexe Alpha 10 ont une expression réduite. En outre, une expression altérée de ces deux enzymes mitochondriales contribue à l"hypertrophie cardiaque avant l"apparition de l"hypertension artérielle [210].

L"expression accrue de FABP3, protéine spécifique du cœur pourrait aussi participer aux conséquences néfastes du régime carencé en groupement méthyles sur le myocarde. Cette protéine a récemment été associée à un effet cardio-dépressif similaire aux FABP4 [211].

À côté de son rôle dans le métabolisme intracellulaire des acides gras, elles peuvent exercer des effets spécifiques à travers sa liaison extracellulaire à des récepteurs de haute affinité situés sur la membrane plasmique des cardiomyocytes [212]. Nous avons donc poursuivi notre étude en examinant le métabolisme de la carnitine puisque sa synthèse dépend de la SAM et par conséquent elle dépend également de la vitamine B12 et les folates. La carnitine (1-3-hydroxy-4-NNN-triméthylaminobutyrate) joue un rôle indispensable dans le métabolisme :

- Elle intervient dans le transport des acides gras à longue chaîne du cytosol vers la matrice mitochondriale où a lieu la β-oxydation

- La carnitine est impliquée dans le transfert des produits de la β-oxydation péroxysomale tel que l"acétylcoenzyme-A vers la mitochondrie pour l"oxydation en CO_2 et H_2O dans le cycle de Krebs.
- La carnitine intervient à d"autres niveaux tels que la modulation du ratio acyl-CoA/CoA-SH, 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 micro- et macrovésiculaire [213-214]. Il a été démontré précédemment que le régime *carencé* maternel provoquait chez la progéniture une augmentation du nombre gouttelettes lipidiques et de lipides. C"est-à-dire qu"une déficience en carnitine pourrait être la cause de la stéatose cardiaque observée lors des analyses microscopiques. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons évalué les concentrations de carnitines dans le tissu cardiaque et au niveau plasmatique. Nous avons observé une diminution de la concentration plasmatique de la **carnitine totale**, de **l'acetyl carnitine** et de la **carnitine libre** probablement due à la synthèse limitée de la triméthyl-lysine en relation avec une disponibilité limitée de la SAM dans les tissus périphériques chez le raton carencé [215 , 216]. En revanche, les carnitines à chaînes courtes, moyennes et longues sont augmentées chez les animaux carencés. Ces résultats sont en accord avec l"étude réalisée par Ibdah et al, où ils observent chez la souris (MTPA-/-), une augmentation du taux plasmatique des trois groupes de acylcarnitines [206].

Chez les animaux carencés la diminution de carnitine et des acylcarnitines est plus importante dans le tissu cardiaque que dans le plasma. Ceci évoque une déficience au niveau de l'importation de la carnitine [217-218]. Pour vérifier cette hypothèse nous avons évalué l'expression d"OCTN2, le principal transporteur sodium-dépendant de la carnitine cardiaque qui joue un rôle dans la réabsorption, la distribution et l"homéostasie intracellulaire de la carnitine [219-220]. Les résultats montrent que l'expression de l'OCTN2 est significativement diminuée chez les rats carencés. Cette expression altérée pourrait expliquer :

- l'accumulation de lipides dans les gouttelettes que nous avons observées dans le myocarde chez les ratons carencés.
- la déficience systémique des carnitines.

- L‟hypertrophie cardiaque observée avec comme conséquence l‟altération du métabolisme énergétique.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Masamichi et al, (1998) [221] qui ont montré, en utilisant un modèle de souris déficiente en carnitine, que cette diminution de carnitine conduit à une cardiomyopathie hypertrophique accompagnée d‟une diminution de l'ATP, de l‟ADP et par conséquent d‟une diminution du potentiel énergétique.

Dans le même sens, Takahashi, R., et al. (2007) [218] ont montré chez la souris comportant une mutation spontanée du gène OCTN2, une déficience systémique en carnitine et lorsqu‟ils sont soumis à une surcharge de pression ils obsevent une hypertrophie cardiaque et des troubles du métabolisme énergétique du myocarde. En même temps, ils montrent aussi la réversibilité de ces anomalies grâce à la supplémentation avec différentes doses de carnitine [222,223]. Il existe différentes études chez les enfants où les mutations homozygotes du gène SLC22A5 (MIM # 603377) qui code pour l‟OCTN2 sont également responsables du développement d'une forme génétique d'hypertrophie cardiaque semblable à celle de notre modèle carencé. [224] Cette cardiomyopathie héréditaire se produit dans l'enfance et plus souvent dans la vie adulte [224].

En revanche, dans le cas des mutations hétérozygotes, les manifestations cardiaques sont moins fréquentes [225]. Dans ce contexte, nos résultats suggèrent d‟évaluer dans quelle mesure des variantes du gène OCTN2 et les déficiences acquises et héritées en folates/vitamine B12 peuvent être synergiquement associées à la prédominance et à la sévérité de l'hypertrophie cardiaque et l‟insuffisance cardiaque. Parmi les mécanismes moléculaires qui peuvent être à la base du lien entre le régime carencé et l'expression d'OCTN2, on peut suspecter le rôle de PPARα et l'effet de l‟hyperhomocystéinémie sur l'expression de PPARα [226-228]. PPARα est une marque distinctive d‟un cœur défaillant corrélée à une diminution de l‟expression des gènes impliqués dans l'oxydation d'acides gras [229, 230]. Cependant, ces changements de métabolisme d'acides gras se produisent à une étape avancée de la cardiomyopathie, mais pas à une étape précoce de la maladie cardiovasculaire [231, 232].

Dans notre modèle animal carencé en groupement méthyles, l‟altération de la β-oxydation des acides gras est liée à une expression réduite des protéines qui sont sous le contrôle de PPARα. Ainsi, la diminution de l'expression de PPARα dans le tissu cardiaque chez les rats carencés pourrait participer à la diminution dramatique de l'expression d‟OCTN2. De plus, PPARα exerce un effet direct sur la régulation d‟OCTN2 et augmente l‟incorporation de la carnitine par l'intermédiaire d'OCTN2 chez le rat, la souris et le porc [233-234] (Figure 46).

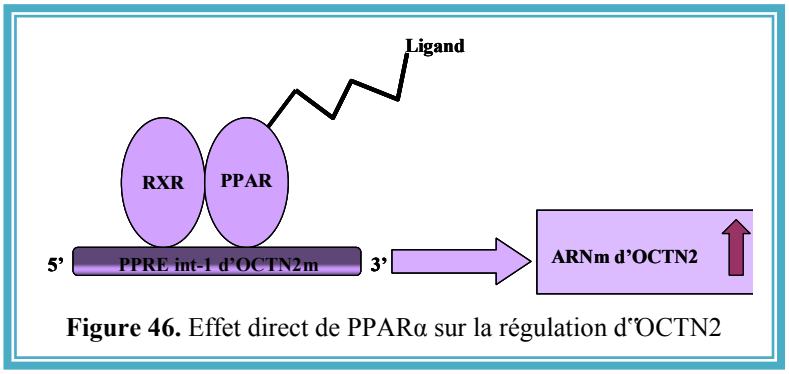


Figure 46. Effet direct de PPARα sur la régulation d'OCTN2

A partir des ces observations, la diminution de l'expression de PPARα pourrait donc contribuer à la diminution de l'expression d'OCTN2 dans le myocarde chez les animaux carencés. En plus, l'analyse protéomique révèle que PPARα est le déterminant le plus marqué des changements observés sur l'expression des **protéines** impliquées dans la β-oxydation des acides gras et le stockage des lipides dans le myocarde chez les ratons carencés.
Parmi ces **protéines**, 4 sont directement sous l'influence de PPARα :

I. Protéine trifonctionnelle mitochondriale (MTPA),
II. Acyl-CoA déshydrogénase à chaîne courte (SCAD)
III. Acyl-coenzyme A thioestérase-2 (ACOT2)
IV. Protéine de liaison aux acides gras-3 (FABP3) [229-231, 167, 234-235].

Ces protéines sont impliquées dans la régulation de la β-oxydation.

L'effet de l'hyperhomocystéinémie sur l'expression de PPARα a été vérifié sur les cellules HepG2, où il a été démontré que l'Hcy réduit l'expression de PPARα [236] et diminue l'ARNm et les niveaux d'expression de PPARα dans les monocytes, par un mécanisme probablement lié à une hyper-méthylation du promoteur [237]. Par ailleurs, phospho-p38 augmente la co-activation de PPARα à travers de PGC-1α dans le cœur et par conséquence PPARα peut agir comme un effecteur en aval de p38. Dans notre modèle PPARα et phospho-p38 peuvent agir simultanément sur le myocarde des ratons carencés et conduire à des altérations de l'expression des gènes impliqués au niveau du métabolisme énergétique [238]. L'analyse protéomique a révélé que les changements des protéines NADH déshydrogénase flavoprotéine 2 (ubiquinone), isocitrate déshydrogénase et la protéine Hspd1 pourraient être influencés par PGC-1α et/ou PPARγ (Co-activateurs de transcription). Les co-régulateurs de transcription sont des protéines essentielles à l'activation de l'expression des gènes. Ces co-

régulateurs ne se lient pas à l"ADN mais associés aux facteurs de transcription, ils servent de pont entre la machinerie basale de transcription et l"ADN, ils sont ainsi impliqués dans le remodelage de la chromatine.

PGC-1α est une protéine nucléaire de 91 kDa appartenant à une petite famille de co-activateurs comprenant PERC/PGC-1β (PGC-1 related estrogen receptor coactivator) et PRC (PGC-1 related coactivator) [239]. Il est le premier co-activateur à présenter une relative spécificité d"expression au niveau tissulaire. Il est exprimé dans le tissu adipeux brun, le cœur, les muscles squelettiques, le rein, le foie, le pancréas et le cerveau, chez l"homme comme chez les rongeurs [240-244].

Sur le plan métabolique, PGC-1α exerce un rôle régulateur essentiel dans le métabolisme énergétique et dans la biogenèse des mitochondries cardiaques [245]. Au niveau du muscle, consécutivement à un exercice, et après la naissance dans le cœur, l"augmentation de la mitochondriogenèse et de la respiration mitochondriale s"accompagnent d"une synthèse accrue d"ATP. Les niveaux d"ARNm de PGC-1α sont augmentés dans ces deux situations [240, 246- 247]. Une surexpression de PGC-1α dans des pré-adipocytes blancs [240], dans des myotubes [248] ou dans des myocytes cardiaques en culture [247] augmente les niveaux de gènes Oxphos impliqués dans la phosphorylation oxydative (ATP-synthase, cytochrome oxydase et cytochrome c) ; les cellules exprimant PGC-1α présentent également une augmentation de la biogenèse mitochondriale. Ces travaux suggèrent que PGC-1α règle l"expression des gènes Oxphos dans le muscle squelettique et le tissu adipeux brun et exerce une régulation des UCP différente selon le tissu. L"expression de PGC-1α dans les myocytes cardiaques, entraîne aussi une augmentation des taux d"ARNm de la medium chain acyl coenzyme A déshydrogénase (MCAD) et de la carnitine palmitoyl transférase-1 (CPT-1), qui contrôle l"étape limitante de l"oxydation des acides gras [249, 247, 250]. Dans notre modèle, son expression n'est pas été modifiée par la carence en donneurs de méthyles, un résultat qui est en accord avec l"absence de modification des activités des complexes III-V, CPT1 et des enzymes du cycle Krebs y compris la citrate synthase. Contrairement à notre modèle, une étude montre que la souris surexprimant PPARγ développe une cardiomyopathie dilatée avec une expression accrue des gènes impliqués dans la fixation des acides gras, le stockage et l'oxydation [229]. PPAR-γ est exprimée à un niveau très faible dans le myocarde, comparativement au tissu adipeux et aura des conséquences plus limitées que PPARα [229]. Toutefois, dans le myocarde d"animaux

carencés, l'expression accrue de PPAR-γ mériteraient davantage d'attention compte tenu de son rôle potentiel dans la cardiomyopathie et l‟insuffisance cardiaque [229].

Le lien entre la carence en groupement méthyles (par conséquence l‟hyperhomocystéinémie) et l‟altération de la β-oxydation et la cardiomyopathie observée dans notre modèle est illustré par la corrélation entre l'homocystéine, les folates et la vitamine B12 avec le niveau plasmatique d‟acylcarnitines, le BNP et le rapport cœur/poids corporel. Dans notre modèle l‟homocystéine pourrait se comporter comme un facteur aggravant de la maladie, à travers l‟altération de la β-oxydation des acides gras, son effet sur PPARα, l‟import de carnitine dépendent des OCTN2 chez les animaux carencés, et peut être aussi chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque, où une association significative entre l'homocystéine et le NT-proBNP a été indiqué précédemment. (Figure 47)

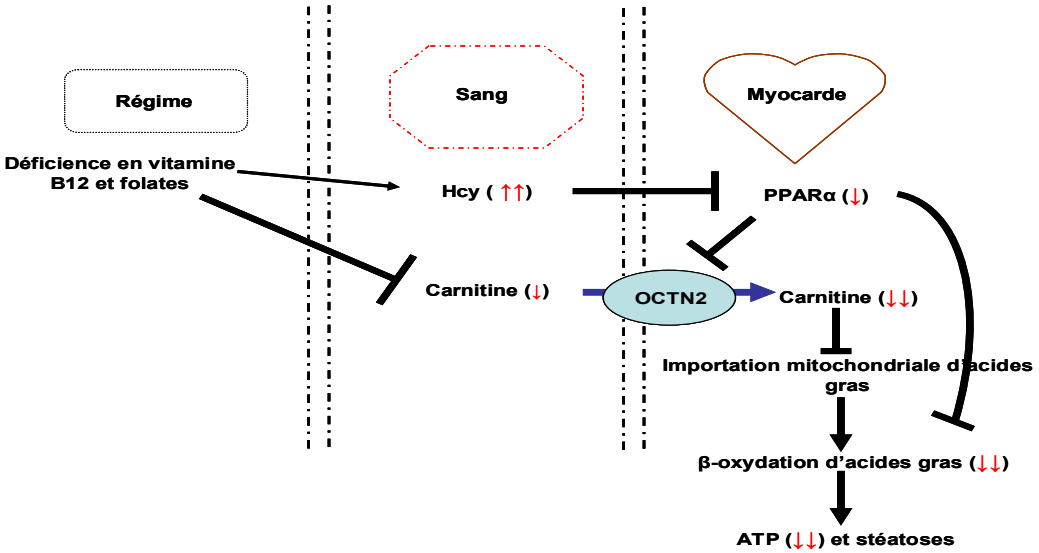


Figure 47. Modèle de la conséquence de la carence en groupement méthyles chez les cardiomyocytes

Nos résultats devraient aussi mériter un examen plus approfondi et des évaluations cliniques dans le traitement de maladies cardiovasculaires, les altérations dans l‟expression d‟OCTN2 pourraient avoir des conséquences sur mauvaise efficacité du traitement de l'insuffisance cardiaque congestive, les arythmies et l'hypertension. En effect OCTN2 contribue comme transporteur des ces drogues vers le myocarde [234]. Une autre question ouverte est le débat sur les excès de risque d'insuffisances cardiaques congestives associées à la rosiglitazone ou la pioglitazone, médicaments utilisés chez les patients diabétiques [252]. Dans ce contexte, l'influence potentielle de l'hyperhomocystéinémie sur l'expression déséquilibrée entre PPARα

et PPARγ dans le myocarde doit être envisagée. L‟homocystéine est un facteur prédictif de mortalité chez les patients avec des maladies cardiovasculaires, mais l'abaissement de son niveau sanguin en suppléments de vitamine B n'a montré aucun avantage dans les populations, ayant soit un risque élevé de maladie vasculaire ou d'infarctus du myocarde [253, 254]. La plupart de ces études ne considèrent pas l'insuffisance cardiaque. L‟avantage des suppléments de vitamines B chez les patients avec une insuffisance cardiaque reste donc une question ouverte, en particulier chez les patients qui présentent des taux élevés d‟homocystéine et d‟acylcarnitine.

ETUDE 2

L'homocystéine et l'Apo A-I sont déterminants de l'ankle brachial index chez une population ambulatoire de personnes âgées

Matériels et méthodes

1. Environnement et participants

San Teodoro et Cesaro sont deux villages d'environ 1500 habitants chacun dans le territoire des Monts Nebrodi, en Sicile (1150 m). En 2005, toutes les personnes âgées entre 60 et 85 ans ont été invitées à participer à l'étude. Le nombre des sujets potentiels à être recrutés a été 955, dont 538 femmes et le nombre final de volontaires inclus a été 667 (70,3%), dont 400 femmes. L'étude a été menée de porte à porte et un examen clinique et un entretien individuel a été effectué par un médecin, sur les conditions environnementales, socio-économiques et cliniques, l'utilisation de médicaments, les signes et les symptômes des maladies et leurs facteurs de risque. Le diagnostique de l"artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) a été fait à partir de la mesure de l"ankle brachial index (ABI) selon les critères bien établis par ailleurs.[256-266] Tous les sujets ont donné son consentement éclairé par écrit, et le comité local éthique a approuvé le protocole de l'étude (IRCCS de l'arriération mentale et le vieillissement du cerveau, Oasi Maria SS, Troina, Sicile) conformément à la Déclaration d'Helsinki et de bonnes pratiques cliniques.

2. La mesure de l'ABI

L'ABI a été effectuée conformément aux recommandations des sociétés savantes,[254] en utilisant une sonde Doppler de poche (V2008, avec une sonde de 8 MHz, GIMA, Gessate, Italie). La pression artérielle systolique a été enregistrée à la fois dans les deux artères brachiales et sur les artères pédieuses et postérieures tibiales après que le patient ait resté au repos en décubitus dorsal pendant 10 minutes. (Figure 48) Les pressions des deux bras ont été enregistrées. Si les pressions artérielles des bras ne sont pas égaux, alors la pression artérielle la plus élevée a été utilisé pour les calculs ultérieurs du rapport de pression artérielle. Nous avons examiné cinq catégories ABI, ABI <0,90 (abaissé), de 0,90 à 0,99 (borderline), 1,00 à 1,09 (faible), 1.10 à 1.29 (normal), égal ou supérieur à 1,30 (haut), tel qui est décrit par McDermott et collaborateurs. [266]

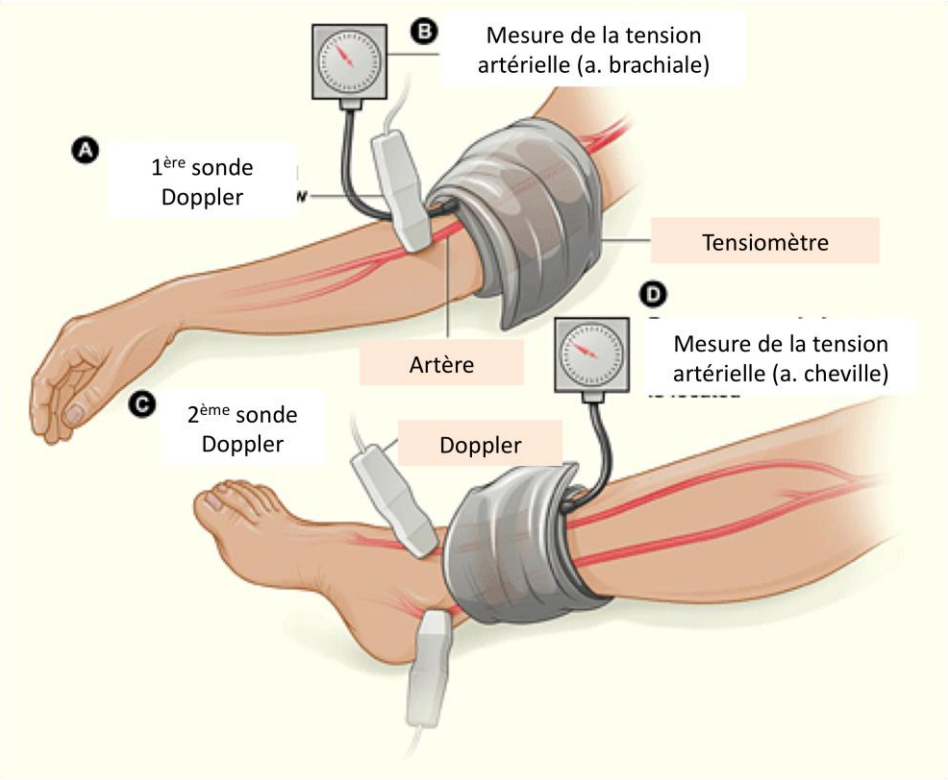


Figure 48. Mesure de l‟ «ankle brachial index » (ABI). L‟ABI est le ratio de la tension artérielle systolique de la cheville / tension systolique de l‟artère brachiale.

3. Prélèvement sanguin et dosages biologiques.

Tous les participants ont subi un prélèvement d'échantillon de sang veineux à jeun, L‟échantillon a été immédiatement centrifugé et conservé à -20 ° C jusqu'à l'analyse de la vitamine B12 et de folate. D'autres paramètres ont été immédiatement analysés : Hcy et l'acide méthylmalonique (AMM, un marqueur de la carence en vitamine B12), ces paramètres ont été déterminés par HPLC, tel qui est décrit par Battaglia et collaborateurs avec une colonne ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 um, 2.1x50 mm, Waters Corporation).[267] La Vitamine B12, les folates, l‟HDL-C, la créatinine et d'autres paramètres biologiques ont été dosés comme décrit par ailleurs.[55, 268-9] La formule de Friedewald a été utilisée pour calculer les lipoprotéines de basse densité-cholestérol (LDL-C), sauf dans 2 sujets ayant des taux sériques de triglycérides supérieur à 8,0 mmol / l ou un dosage direct à été réalisé .[270] Les Apolipoprotéines AI et B ont été mesurées par immunonéphélémétrie (Siemens Co., Ltd, France). La distribution de la taille HDL (HDL2b, de 9,71 à 12,90 nm; HDL2a, 8.77 à 9.71 nm; HDL3a, de 8,17 à 8,77 nm; HDL3b, de 7,76 à 8,17 nm et HDL3c, 7.21 à 7.76 nm) a été évaluée par gradient d‟électrophorèse sur gel polyacrylamide (PAGE) dans 15 échantillons de sérum, dont 8 dans le quartile supérieure et 7 dans le quartile inférieur de l'Hcy, comme décrit précédemment.[271]

4. Analyses Statistiques

Les données continues ont été exprimées sous forme de moyenne ± écartypes ou en médiane (25ème-75ème percentile), en fonction de la distribution des données. La prévalence a été rapportée en pourcentage. Nous avons utilisé les tests Mann-Whitney et U-test, pour évaluer les différences des médianes et des moyenes entre les deux groupes. La corrélation de plusieurs variables a été testée par une analyse de régression multiple. Pour les variables à distribution asymétrique, une transformation logarithmique a été réalisée avant l'analyse de régression multiple. Une telle transformation a été appliquée à l'Hcy. L'association entre les marqueurs sanguins et l"ABI a été évaluée avec l'analyse de covariance, ajustée sur le sexe. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives. Les corrections pour les comparaisons multiples ont été faites en utilisant le test de Bonferroni. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Stata version 11.0 SE (Stata Corp, Texas, USA).

Résultats

1. Les caractéristiques de base

Les caractéristiques cliniques et biochimiques de la population sont présentées dans le tableau 1. L'âge moyen des 667 participants était de 71,5 ans, 400 sujets (60,0%) étaient des femmes et 28,9% avaient des antécédents des maladies cardio-vasculaires, y compris les accidents vasculaires cérébraux, les accidents ischémiques transitoires, l"angor et / ou l"infarctus du myocarde. La moyenne d"ABI était de 1,09 ± 0,01. La prévalence d"ABI faible a été de 5,8 pour cent (n = 39). L"ABI était 1,5 fois plus élevé chez les sujets diabétiques et chez les hommes, et 2 fois de plus chez les fumeurs et chez les sujets avec un ABI faible, comparés à ceux avec un ABI normal (tableau 1). En revanche, le pourcentage de diabète sucré dans la catégorie "ABI haut" était similaire à celle rapportée dans la population générale (tableau 1). Le symptôme claudication intermittent a été signalé dans 13 cas des 39 (33%) sujets présentant un ABI faible. L"Hcy était fortement associée aux folates (R = -0,258, IC 95%: -0,328, -0,184, P <0,001) et à la vitamine B12 (R = -0,253, IC 95: -0,324, -0,180, P <0,001), mais elle n"était associée ni avec la créatinine (P = 0,972), ni avec la protéine C-réactive (P = 0,572).

2. Les facteurs prédictifs de l'ABI

Les facteurs prédictifs de l"ABI. Les 5 catégories de ABI étaient associés positivement (P de tendance) avec la tension artérielle systolique (TAS), et diastolique (TAD), l'Apo A-I, les folates et la vitamine B12. À l'inverse, une tendance négative des groupes ABI a été observée avec l'âge, Hcy, la protéine C-réactive et la créatinine (tableau 1). Des résultats similaires ont été obtenus lors du regroupement de catégorie 2 (borderline) avec la catégorie 1 (abaissé) ou de catégorie 3 (faible). Le P de tendance d'association des différentes catégories ABI avec soit TAS soit TAD a été moins significative si la catégorie « ABI élevé» a été exclue des analyses, tandis que des résultats similaires ont été observé avec les autres paramètres (tableau 1). Dans l"analyse de régression univariée, les prédicteurs de la ABI ont été, par ordre d'importance, l'âge, TAS, TAD, Log-Hcy, Apo A-I, la créatinine, la protéine C-réactive, les folates et la B12 (tableau 2). En excluant la catégorie « élevée », les facteurs prédictifs étaient l'âge (P <0,001), TAS (P <0,001), TAD (P <0,035), Log-Hcy (P <0,001), Apo A-I (P <0,001) et d'acide folique (P = 0,010). En analyse multivariée dans un modèle incluant la créatinine et les autres variables significatives dans l'analyse univariée, les facteurs prédictifs indépendants de l"ABI étaient l'âge, la TAS, l"Apo A-I et Log-Hcy dans la population générale (tableau 2). Puisque en analyse

univariée l"ApoA- et Hcy étaient associées, nous avons réalisé également l'analyse multivariée avec deux modèles supplémentaires en tenant en compte soit l"Apo A-I, soit le Log-Hcy comme des variables indépendants de l"ABI (tableau 2). Les résultats du modèle sans Apo A-I (deuxième modèle), montrent que le Log-Hcy était associée à l"ABI avec un P <0,001 ; dans le modèle qui exclus le Log-Hcy (troisième modèle), l"Apo A-I été associée à l"ABI avec un P <0,001 (tableau 2). D"autre part, si l'on exclut le groupe de haut ABI des analyses, les facteurs prédictifs de l"ABI étaient l'âge (P <0,001), Log-Hcy (β-coefficient =- 3,89, P <0,001, deuxième modèle sans ApoA-1) et Apo A-I (β = 3,67, P <0,001, troisième modèle sans Log-Hcy). La même conclusion a été atteinte si l'on exclut de l'analyse les sujets avec des antécédents des maladies cardio-vasculaires.

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et biologiques de la population étudiée, selon les 5 groupes* d"ankle brachial index (ABI).

Caractéristiques (%, médiane et interquartiles ou moyenne ± écartypes)	Tous **n=667**	1-2 (abaissé et bordeline) **n=44 (6.6%)**	3 (low/normal) **n=164 (24.6%)**	4 (normal) **n=304 (45.6%)**	5 (High) **n=155 (23.2%)**	P-for trend All groups/ Groups 1-4
Hommes, n (%)	267 (40,0)	32 (72,7)	69 (42,1)	107 (35,2)	59 (38,1)	<0,001/<0,001
Age (années)	71,5 ± 0,3	76,1±1,0	72,0±0,5	71,1±6,9	70,6±6,8	<0,001/<0,001
Tension artérielle systolique (mmHg)	141 ± 1	147±23	147±21	142±20	130±17	<0,001/0,029
Tension artérielle diastolique (mmHg)	78 ± 1	78±14	82±11	80±12	74±12	0,001/0,785
Tabagisme n (%)	78 (11,7)	9 (23,1)	23 (14,0)	36 (11,8)	10 (6,5)	0,034/0,264
Diabète mellitus n (%)	153 (22,9)	17 (38,6)	35 (21,3)	64 (21,1)	37 (23,9)	0,085/0,041
Cholestérol Total (mmol/L)	202 (176–226)	198 (164-227)	204 (177-226)	199 (172-224)	206 (182-235)	0,187/0,761
Triglycérides (mmol/L)	108 (79–146)	115 (84-182)	98 (74-133)	110 (79-150)	110 (83-1141)	0,988/0,760
HDL cholestérol (mmol/L)	58 (48–68)	59 (49-6)	58 (46-70)	57 (48-69)	58 (49-69)	0,290/0,694
LDL cholestérol (mmol/L)	118 (95-141)	116 (83-138)	120 (97-141)	114 (94-137)	122 (85-147)	0,338/0,673
Apo A-I (g/L)	1,7 (1,5–1,9)	1,5 (1,3-1,7)	1,6 (1,4-1,9)	1,7 (1,5-1,9)	1,7 (1,5-1,9)	<0,001/<0,001
Apo B (g/L)	1,0 (0,9–1,2)	1,0 (0,9-1,1)	1,0 (0,9-1,2)	1,0 (0,9-1,2)	1,0 (0,9-1,2)	0,374/0,323
Homocystéine (µmol/L)	14,5 (11,9–18,1)	19,8 (14,6-22,5)	15,3 (12,6-19,7)	14,0 (11,7-16,9)	13,5 (10,9-16,9)	<0,001/<0,001
Folates (nmol/L)	11,8 (8,7–15,8)	9,9 (7,2-13,5)	10,9 (8,3-16,1)	12,1 (9,2-16,0)	12,4 (9,3-16,3)	0,002/0,009
Vitamine B12 (pmol/L)	297 (209–401)	237 (178-391)	299 (213-404)	283 (204-404)	323 (240-401)	0,024/0,277
Acide Méthylmalonique (mmol/L)	0,15 (0,11-0,24)	0,23 (0,13-0,36)	0,16 (0,11-0,24)	0,15 (0,11-0,23)	0,14 (0,09-0,21)	0,015/0,021
Créatinine (mmol/L)	9 (8-11)	9 (8-11)	9 (8-11)	9 (8-11)	9 (8-11)	0,178/0,907
Albumine (g/L)	43 (41-45)	42 (41-44)	43 (41-45)	43 (41-45)	42 (41-44)	0,419/0,654
Protéine C-réactive (mg/L)	2,8 (1,6-5,4)	2,3 (1,0-5,1)	3,3 (1,9-6,6)	2,6 (1,5-5,1)	2,9 (1,7-5,4)	0,626/0,743

Tableau 2: Analyse univariée et multivariée des déterminants de l"ankle brachial index (ABI) en 667 volontaires âgés, ajustée au sexe.

	Univarié		Multivarié					
Déterminants			1ère model (avec Apo A-1 et LogHomocystéine)		2ème model (sans Apo A-1)		3ème model (sans Log-Homocystéine)	
	Corrélation	P	coefficient Bêta	P	coefficient Bêta	P	coefficient Bêta	P
Age	-0,163	0,001	-2,74	0,006	-2,63	0,009	-3,22	0,001
Créatinine sérique	-0,102	0,008						
Albumine	-0,028	0,461						
Apo A-I	+0,136	0,001	2,79	0,005	-	-	2,86	0,004
Protéine C-réactive	-0,007	0,851						
Cholestérol Total	+0,061	0,116						
Triglycérides	+0,005	0,895						
HDL-cholestérol	+0,066	0,089						
LDL-cholestérol	+0,034	0,378						
ALAT	-0,059	0,130						
ASAT	-0,051	0,191						
Log-Homocystéine	-0,218	<0,001	- 2,41	0,016	-3,41	0,001	-	-
Folates	+0,116	0,003						
Vitamine B12	+0,114	0,003						
Acide Méthylmalonique	-0,109	0,060						
Tension artérielle systolique	-0,324	<0,001	-7,91	<0,001	-7,67	<0,001	-8,06	<0,001
Tension artérielle diastolique	-0,229	<0,001						

3. Association de l'Apo A-I, HDL-C et la taille des particules HDL avec l'homocystéine.

Des corrélations négatives statistiquement significatives ont été observées entre l'Apo A-I et l"Hcy (P <0,001) et entre les HDL-C et l" Hcy (P = 0,003) (figure 49). Des résultats semblables ont été obtenus lors de l'exclusion, soit du groupe à haut ABI, soit chez les sujets ayant des antécédents de maladies cardio-vasculaires.

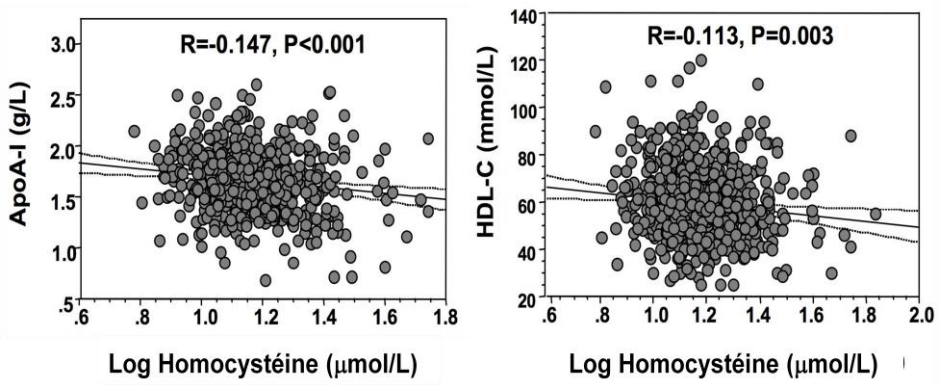


Figure 49. Corrélation de Pearson entre l'homocystéine totale transformation logarithmique (Log-Hcy) et soit apoprotéine A1 (Apo A-1) (haut) ou HDL-cholestérol (HDL-C) (en bas).

En analyse de régression univariée, les facteurs déterminants de l'Apo A-I étaient l'albumine, le Log de la protéine C-réactive, le taux de cholestérol total, les triglycérides, le HDL-cholestérol, le Log-Hcy et l"AMM et en analyse multivariée, les déterminants de l"Apo A-I étaient le taux de cholestérol, les triglycérides, le HDL-cholestérol et le Log-Hcy (tableau 3). Les déterminants de HDL-C ont été la créatinine sérique, l'albumine, le cholestérol total, les triglycérides, les ALAT, le Log-Hcy, la vitamine B12, l'Apo A-I, la protéine C-réactive et l'acide folique (P <0,001, P <0,001, P <0,001, P <0,001, P = 0,003, P = 0,004, P = 0,009, P = 0,010, P = 0,020 et P = 0,040, respectivement). En analyse multivariée, les facteurs prédictifs indépendants de HDL-C ont été le taux de cholestérol, des triglycérides, du Log-Hcy et l'albumine (β-coefficient = 11,8 et p <0,001, β = -13,9 et P <0,001, β = -2,3 et P <0,001 et β = 2,1 et P = 0,022, respectivement).

Tableau 3: Analyse uni- et multivarié des déterminants de la concentration plasmatique de l"Apo A-I chez les 667 volontaires.

Déterminants	Univarié		Multivarié	
	Corrélation	P	Bêta coefficient	P
Age	-0,031	0,455		
Créatinine	-0,085	0,038		
Albumine	+0,134	0,001		
Log- Protéine C-réactive	-0,143	0,001		
Total cholestérol	+0,377	0,001	3,43	0,006
Triglycérides	-0,139	0,001	4,65	<0,001
HDL-cholestérol	+0,762	<0,001	25,41	<0,001
LDL-cholestérol	-0,012	0,772		
ALAT	-0,034	0,407		
ASAT	+0,059	0,152		
Log-Homocystéine	-0,147	<0,001	-3,08	0,002
Folates	+0,034	0,411		
Vitamine B12	+0,088	0,031		
Acide Méthyl malonique	-0,162	0,009		

Nous avons étudié en outre l'influence de l'Hcy sur la distribution de la taille HDL par SDS-PAGE chez 15 sujets avec une concentration contrastée en homocystéine. Nous avons observé une augmentation de la concentration des HDL3c (petite taille) chez les sujets ayant une concentration d'Hcy dans le quartile supérieure comparée aux sujets dans le quartile inférieur (Figure 50A). En outre, une corrélation significative a été observée entre HDL2a et la vitamine B12. (Figure 50B)

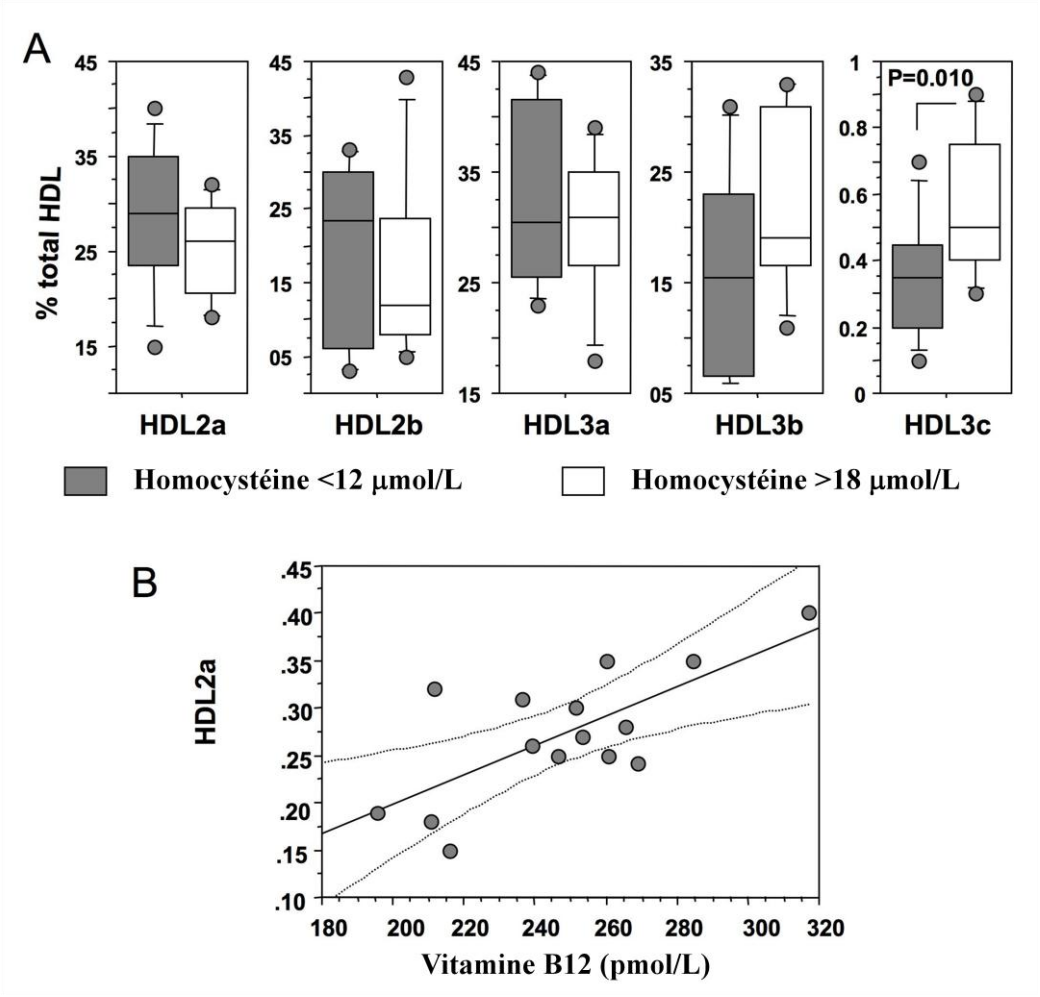


Figure 50. A, Boîtes à moustaches (médiane et les quartiles) de la distribution (en pourcentage) des particules de HDL dans 15 échantillons de sérum, dont 8 dans la le quartile supérieur de l'Hcy et 7 dans le quartile inférieur de l'Hcy. La taille des particules HDL (HDL2a, de 8,77 à 9,71 nm; HDL2b, de 9,71 à 12,90 nm; HDL3a, 8,17 à 8,77 nm; HDL3b, de 7,76 à 8,17 nm et HDL3c, 7,21 à 7,76 nm) a été évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 1,5 à 25%. B, Corrélation de Pearson entre HDL2a et la vitamine B12 sérique.

Discussion

Dans cette étude d'une population ambulatoire des personnes âgées, la prévalence d"un ABI abaissé était similaire à celle observée dans d'autres études épidémiologiques.[266,272] Nous avons constaté aussi une forte incidence de cas avec un haut ABI, indiquant une rigidité artérielle chez les patients âgés.[254] Ces personnes pourraient avoir la maladie artérielle, malgré leur élevé ABI. Pour procéder à cette limitation du diagnostique, nous avons aussi évalué l'association entre l"ABI avec les déterminants de l'Hcy et le métabolisme des lipides, en excluant les sujets avec un «haut» ABI et nous avons trouvé des résultats similaires à ceux obtenus dans la population entière. L"homocystéine est un facteur indépendant des maladies cardiovasculaires et d"évènements liés à la thrombose.[249-50, 273, 275-6] A l"heure actuelle, il existe un consensus pour considérer l"Hcy comme un facteur de risque indépendant de survenu d"une AOMI plus que pour la maladie coronaire.[273] Cependant, la plus part des facteurs qui influencent l"ABI peuvent aussi avoir une influence sur le taux d"Hcy.[254-9, 261] De ce point de vue, il convient de noter que le taux sanguin Hcy n'était ni associé avec la créatinine ou avec la protéine C-réactive dans notre population. En accord avec une étude antérieure, nous avons trouvé une association de l'ABI avec l'âge, TAS, la protéine C-réactive, l"HDL et l'Apo A-I en analyse univariée.[274] L'ABI a également été associé à des déterminants nutritionnels de l'Hcy, l"acide folique et la vitamine B12 et aussi avec le AMM, un marqueur du métabolisme cellulaire de la vitamine B12. L"Hcy et l"Apo A-I ont été les deux facteurs prédictifs indépendants de l'ABI, en analyse multivariée. L'association de l'Hcy avec AOMI a été clairement mis en évidence dans une méta-analyse récente basée sur 14 études.[263] Deux autres études, conçues comme des études cas-témoins a partir d"une large cohorte de sujets âgées de de 40 ans et plus, montrent que l"inflammation et les HDL-C sont des facteurs prédictifs les plus solides de la AOMI ; dans ces études l"Hcy n"était pas associée à l"AOMI.[257, 274] Néanmoins, le facteur de confusion entre l'association de l"Hcy et les HDL-C n'a pas été mise en évidence dans ces études et cela peut expliquer les discordances entre ces études et la nôtre, en plus de la différence d'âge et l'état nutritionnel des populations respectives. Les sujets volontaires de notre étude étaient âgés de 60 ans, avec un moyenne d"âge de 71,5 ans, aucun n'a reçu un régime enrichie en folates dans l"alimentation et /ou des suppléments en acide folique et de vitamine B12 et, pourtant ils avaient une concentration plus élevée que celle rapportée Hcy dans les études mentionnés ci-dessus.[257, 274]

En accord avec nos données sur l'association entre l'Apo A-I et Hcy chez les humains, une expression réduite de l'Apo A-I a été signalé chez des souris avec une hyperhomocystéinémie génétiquement induite par une déficience en MTHFR + / - .[232] Dans ce

modèle de souris, l'expression hépatique réduite d'Apo A-I résulte d"une l'influence de l'Hcy sur l'expression des récepteurs PPARs alpha (peroxisome proliferator-activated) et sur l'activité du promoteur de l"Apo A-I.[232] En concordance avec ce mécanisme, une étude randomisé en double aveugle avec administration oral du fénofibrate chez une cohorte importante de patients diabétiques de type 2 mellitus a montré que la prise orale des activateurs de PPARs induisent des changements du taux circulants d"Hcy et Apo A-I.[277] L'association de la vitamine B12 et de AMM avec l'Apo A-I et les particules HDL2a observée dans notre étude montre une influence de la B12 cellulaire (nécessaire pour le métabolisme de l'Hcy et AMM) dans la synthèse hépatique des particules HDL naissantes. Ces associations devraient mériter une attention particulière dans le contexte des données récentes sur les effets moléculaires de la disponibilité cellulaire de B12 réduite et sur la régulation d'Apo A-I, qui sont compatibles avec une influence de la vitamine B12 sur l'expression de l'Apo A-I en relation avec l'activation du TNF et de l'inhibition de la voie des MAP Kinases.[267, 278-9] En plus de son influence sur l'Apo A-I, nous avons également observé que l'hyperhomocystéinémie est associée à une augmentation de la concentration des HDL3c de petite taille, suggérant une altération de la maturation de molécules HDL par une mécanisme lié a l'Apo A-I. Ceci est en accord avec l'absence de grandes particules des HDL observée chez les souris hyperhomocystéinémiques cbs-/-apoE-/-.[265]. La plupart des études d'intervention qui visent à diminuer le risque de maladies cardiovasculaires en réduisant le taux d"Hcy avec des suppléments en vitamines du groupe B ont échoué ; elles n"ont pas montré un bénéfice de la supplémentation sur la réduction de survenu de maladies cardiovasculaires et/ou ses complications.[249-50, 275] En outre, plusieurs études n'ont pas conclu de manière concordante pour démontrer la présence d'une relation indépendante entre Hcy et la rigidité des artères et l'épaisseur intima média.[280-1] En revanche, un récent essai clinique randomisé de supplémentation en folates montre que chez les patients avec une supplémentation l"ABI augmente et la vitesse de l'onde de pouls diminue, ce qui suggère une influence du métabolisme des folates sur l"homéostasie des artères des membres inférieures.[282] A côté de ces résultats contrastés entre la cardiopathie ischémique versus l"artériopathie des membres inférieurs, on connaît peu les mécanismes qui sont mis en jeu pour l'association entre Hcy et l"artériopathie oblitérante des membres inférieurs. Nos données suggèrent que l'influence de l'Hcy sur Apo A-I et le métabolisme des HDL pourrait influencer l"apparition d"une AOMI. Enfin, à côté du rôle prédominant athéro-protecteur des HDL dans le transport inverse du cholestérol, les HDL de petite taille peuvent également avoir des propriétés anti-thrombotiques et anti-inflammatoires.[282]

Conclusions et perspectives

Conclusions générales

Nos données permettent d"établir pour la première fois un lien entre l'insuffisance cardiaque (développement d'une cardiomyopathie chez les rongeurs) et la carence de donneurs/précurseurs méthyliques (folate et vitamine B12). L'hypertrophie cardiaque qui a été observée dans cette étude résulte d"une altération de l'oxydation d'acides gras et du métabolisme énergétique comme conséquence d"une synthèse et d"une importation altérée de d'OCTN2-dépendent de la carnitine. Ceci suggère d'étudier en détail l'influence d"une carence en vitamine B12 et folates sur le cœur à différentes périodes de la vie en particulière chez les nouveau-nés porteurs des maladies métaboliques et pendant la grossesse et le vieillissement. D"autre part, nous avons montré que l'Hcy et Apo A-I ont été deux facteurs métaboliques déterminants de l'ABI dans une population ambulatoire de volontaires âgés d'une région rurale de la Sicile. L'influence négative de l'Hcy sur Apo A-I et sur le métabolisme des HDL ouvre des nouvelles perspectives sur l'implication de l'Hcy dans la physiopathologie de l'athérothrombose.

Perspectives

Un certain nombre de questions restent ouvertes :

- L"avantage de suppléments de vitamines B chez les patients avec une insuffisance cardiaque, en particulier dans les patients qui présentent des taux élevés d"homocystéine et acylcarnitine.
- l'augmentation de la concentration tissulaire de la vitamine B12 détecté chez les ratons carencés semble avoir une fonction essentielle dans un myocarde hypertrophique. Ceci suggère d'étudier en détail le mécanisme (s) et les conséquences fonctionnelles des récepteurs Transcobalamin (cblTC-R) en determinant le rôle de la vitamine B12 dans la régulation de l'expression de CblTC-R à l'aide de différents modèles cellulaires.

Bibliographie

[1]. Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, et al. The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. J Mol Cell Cardiol 1995; 27 : 291-305.

[2]. Sakata Y, Hoit BD, Liggett SB, Walsh RA, and Dorn GW. Decompensation of pressure over-load hypertrophy in G alpha q-overexpressing mice. Circulation 1998; 97:1488-95.

[3]. Frey N and Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. Annu Rev Physiol 2003; 65:45-79.

[4]. Dorn GW and Force T. Protein Kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. J Clin Invest 2005; 115:527-37.

[5]. Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, et al. Calcineurin / NFAT coupling participates in pathological, but no physiological, cardiac hypertrophy. Circ Res 2004; 94:110-8.

[6]. Mudd SH, Finkelstein JD, Irrevere F and Laster L. Homocystinuria: an enzymatic defect. Science 1964; 143:1443–5.

[7]. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. Am J Pathol 1969; 56:111-28.

[8]. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS and Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. Jama 1995; 274:1049-57.

[9]. Brattström L, Israelsson B, Norrving B, Bergqvist D, Thome J, et al. Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease. Atherosclerosis 1990; 81:51–60.

[10]. Mudd SH and Poole JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. Metabolism 1975; 24:721-34.

[11]. Mudd SH, Ebert MH, Scriver CR. Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. Metabolism 1980; 29:707-20.

[12]. Cook RJ and Wagner C. Glycine N-methyltransferase is a folate binding protein of rat liver cytosol. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:3631-4.

[13]. Miner SES, Evroski J and Cole DEC. Clinical chemistry and molecular biologyof homocysteine metabolism: an update. Clin Biochem 1997; 30:189-201.

[14]. Miller JW, Nadeau MR, Smith J, Smith D and Selhub J. Folate deficiency-induced homocysteinemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine"s coordinate regulation of homocystéine metabolism. Biochem J 1994; 298:415-9.

[15]. Miller JW, Ribaya-Mercado JD, Russell RM, Shephard DC, Morrow FD, et al. Total homocysteine in fasting plasma is not a good indicator of B6 deficiency. Am J Clin Nutr 1992; 55:1154-60.

[16]. Miller JW, Nadeau MR, Smith D and Selhub J. Vitamin B6 vs folate deficiency: comparison of responses to methionine loading in rats. Am J Clin Nutr 1994; 59:1033-9.

[17]. Kang SS, Zhou J,Wong PWK, Kowalisyn J and Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolatereductase. Am J Hum Genet 1988; 43:414-21.

[18]. Dalery K, Lusier-Cacan S, Selhub J, Davignon J, LatourY, et al. Homocysteine and coronary artery disease in French Canadian subjects: relationship with vitamin B12, B6, pyridoxal phosphate and folate. Am J Cardiol 1995;75 : 1107-11.

[19]. Franken DG, Boers GH, Blom HJ and Trijbels JM. Effect of various regimens of vitamin B6 and folic acid on mild hyperhomocysteinemia in vascular patients. J Inherit Metab Dis 1994; 17: 159-62.

[20]. Kang SS, Wong PW and Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. Metabolism 1987; 36 : 458-62.

[21]. Naurath HJ, Joosten E, Riezler R, Stabler SP, Allen RH,et al. Effects of vitamin B12, folate, and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. Lancet 1995; 346:858-9.

[22]. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ, Delport R, et al. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. J Nutr 1994; 124:1927-33.

[23]. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, et al. Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. Z Kardiol 2004; 93:439-53.

[24]. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D and Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in the elderly. Jama 1993; 270:2693-8.

[25]. Chango A, Potier de Courcy G, Boisson F, Guilland J-C, Barbé F, et al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductas (MHTFR). Commonmutations, folate status and plasma homocysteine in healthy French adults of the SU.VI.MAX cohort. Br J Nutr 2000; 84:891-3.

[26]. Selhub J. Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr 1999; 19: 217-46.

[27]. Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JW, et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. Genet Epidemiol 1999; 17: 298-309.

[28]. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66 polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocystéine concentrations. Atherosclerosis 2001; 157:451-6.

[29]. Jacques PF, BostomAG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetatrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. Circulation 1996; 93:7-9.

[30]. Refsum U, Ueland PM, Nygard O and Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med 1998; 49:31-63.

[31]. Olsewski A and McCully K. Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. Free Radic Biol Med 1993; 14: 683-93.

[32]. McCully KS. Growth disorders and homocysteine metabolism. Ann Clin Lab Sci 1975; 5:147-52.

[33]. Nedrebo BG, Ericsson UB, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, et al. Plasma total homocysteine in hyperthyroid and hypothyroid patients. Metabolism 1998; 47:89-93.

[34]. Upchurch G, Welch G, Fabiani A, Freedman J, Johnson J, et al. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. J Biol Chem 1997; 27: 17012-7.

[35]. Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, et al. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. J Neurochem 2001; 78:249-53.

[36]. Stamler J, Osborne J, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. J Clin Invest 1993; 91:308-18.

[37]. Welch GN, Upchurch GR, Farivar RS, Pigazz A, Vu K, et al. 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.

[38]. Upchurch GR, Welch GN and Loscalzo J. Homocysteine, EDRF, and endothelial function. J Nutr 1996; 126: 1290.

[39]. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. Clin Chem 1998; 44:1833-43.

[40]. Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, et al. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 279: 671-8.

[41]. Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT and Creager MA. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endotheliumdependent vasodilatation in humans. Circulation 1997; 95: 1119-21.

[42]. Dalton M, Gadson P, Wrenn R and Rosenquist T. Homocysteine signal cascade: production of phospholipids, activation of protein kinase C, and the induction of c-fos and c-myc in smooth muscle cells. FASEB 1997; 11: 703-11.

[43]. SuzukiY, Lorenzi M, Shi S, Day R and Blumberg J. Homocysteine exerts cell type-specific inhibition of AP1 transcription factor. Free Rad Biol Med 2000; 28:39-45.

[44]. BellamyMF and McDowell IF. Putative mechanisms for vascular damage by homocysteine. J Inher Metab Dis 1997;20:307-15.

[45]. Hofman MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. J Clin Invest 2001; 107: 675-83.

[46]. McCully KS, Olszewski AJ and Vezeridis MP. Homocysteine and lipid metabolism in atherogenesis: effect of the homocysteine thiolactonyl derivatives, thioretinaco and thioretinamide. Atherosclerosis 1990; 83: 197-206.

[47]. Harpel P, Zhang X and Borth W. Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. J Nutr 1996: 1285S-9S.

[48]. Emsley A, Jeremy J, Gomes G, Angelini G and Planer F. Investigation of the inhibitory effects of homocysteine and copper on nitric oxidemediated relaxation of rat isolated aorta. Br J Pharmacol 1999; 126: 1034-40.

[49]. Chambers J, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid O and Kooner J. Demonstration of a rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia, an effect reversible with vitamin C therapy. Circulation 1999; 99:1156-60.

[50]. McKully KS. Chemical pathology of homocysteine. II. Carcinogenesis and homocysteine. Ann Clin Lab Sci 1994; 24:27-59.

[51]. Ueland PM. Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. Pharmacol Rev 1982; 34:223-53.

[52]. Mannisto PT, Ulmanen I, Lundstrom K, Taskinen J, Tenhunen J, et al. Characteristics of catechol O-methyl-transferase (COMT) and properties of selective COMT inhibitors. Prog Drug Res 1992; 39:291-350.

[53]. Tsai JC, Perella M, Yoshizumi M, Hsier CM, Haber E, et al. Promotion of vascular smooth cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci 1994; 91: 6369-73.

[54]. Khan M, Yamauchi M, Srisawasdi S, Stiner D, Doty S, et al. Homocysteine decreases chondrocyte-mediated matrix mineralisation in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell micro-mass cultures. Bone 2001; 28: 387-98.

[55]. Guéant-Rodriguez RM, Juillière Y, Nippert M, Abdelmouttaleb I, Herbeth B, et al. Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions. J Thromb Haemost 2007; 5 :1209-16.

[56]. Sundström J and Vasan RS. Homocysteine and heart failure: a review of investigations from the Framingham Heart Study. Clin Chem Lab Med 2005; 43:987–992

[57]. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. Am J Pathol 2000; 157: 1415-30

[58]. James TN. Apoptosis in cardiac disease. Am J Med 1999; 107: 606-2

[59]. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. N Engl J Med 1996; 335: 1182-9.

[60]. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, et al. Apoptosis in the failing human heart. N Engl J Med 1997; 336: 1131-41.

[61]. Kang PM and Izumo S. Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. Circ Res 2000; 86: 1107-13.

[62]. Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG and Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. Am J Physiol 1997; 272: 2313-9.

[63]. Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. Cell 1999; 97: 189-98.

[64]. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. J Clin Invest 2003; 111: 1497-504.

[65]. Dubus I, Samuel JL, Marotte F, Delcayre C and Rappaport L. Beta-adrenergic agonists stimulate the synthesis of noncontractile but not contractile proteins in cultured myocytes isolated from adult rat heart. Circ Res 1990; 66: 867-74.

[66]. Communal C, Singh K, Pimentel DR and Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. Circulation 1998; 98: 1329-34

[67]. Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeyer TJ, Pende A, Raynolds MV, et al. Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. J Mol Cell Cardiol 2000; 32: 817-30.

[68]. Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, Cheng H, Akhter SA, et al. Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. Circ Res 1999; 84: 43-52.

[69]. Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Brown JH, et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. J Biol Chem 1998; 273: 2161-8.

[70]. Communal C, Colucci WS and Singh K. p38 mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation. J Biol Chem 2000; 275: 19395-400.

[71]. Remondino A, Kwon SH, Communal C, Pimentel DR, Sawyer DB,et al. Beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species\c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of the mitochondrial pathway. Circ Res 2003; 92: 136-8.

[72]. Communal C, Singh M, Menon B, Xie Z, Colucci WS, et al. beta1 integrins expression in adult rat ventricular myocytes and its role in the regulation of beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis. J Cell Biochem 2003; 89: 381-8

[73]. Hasegawa K, Iwai-Kanai E and Sasayama S. Neurohormonal regulation of myocardial cell apoptosis during the development of heart failure. J Cell Physiol 2001; 186: 11-8.

[74]. Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, et al. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. N Engl J Med 1996; 335: 1190-6.

[75]. Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, et al. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 8144-9.

[76]. Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, Beltrami AP, Hintze TH, et al. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. Circ Res 2001; 89: 279-86.

[77]. Condorelli G, Roncarati R, Ross J, Pisani A, Stassi G, et al. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 9977-82.

[78]. Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A and Izumo S. Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. Circ Res 2000; 87: 118-25.

[79]. Suzuki K, Kostin S, Person V, Elsasser A and Schaper J. Time course of the apoptotic cascade and effects of caspase inhibitors in adult rat ventricular cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 983-94.

[80]. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, et al. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. Circ Res 2000; 86: 152-7.

[81]. Ferdinandy P and Schulz R. Peroxynitrite: toxic or protective in the heart? Circ Res 2001; 88 : E12-3.

[82]. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. Circ Res 1999 ; 85 : 357-63.

[83]. Benderdour M, Charron G, DeBlois D, Comte B and Des Rosiers C. Cardiac mitochondrial $NADP^+$-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-hydroxynonenal adducts formation: an event that precedes hypertrophy development. J Biol Chem 2003; 278: 45154-9.

[84]. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. Circ Res 2001; 88: 529-35.

[85]. Friedl HP, Till GO, Ryan US and Ward PA. Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. FASEB J 1989; 3: 2512-8.

[86]. Sakuma S, Fujimoto Y, Sakamoto Y, Uchiyama T, Yoshioka K, et al. Peroxynitrite induces the conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in rabbit liver. Biochem Biophys Res Commun 1997; 230: 476-9.

[87]. Jong JW, van der MP, Nieukoop AS, Huizer T, Stroeve RJ, et al. Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans. Circ Res 1990; 67 : 770-3.

[88]. Cappola TP, Kass DA, Nelson GS, Berger RD, Rosas GO, et al. Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Circulation 2001; 104: 2407-11.

[89]. Ekelund UE, Harrison RW, Shokek O, Thakkar RN, Tunin RS, et al. Intravenous allopurinol decreases myocardial oxygen consumption and increases mechanical efficiency in dogs with pacing-induced heart failure. Circ Res 1999 ; 85 : 437-45.

[90]. Ellis GR, Anderson RA, Lang D, Blackman DJ, Morris RH, et al. Neutrophil superoxide anion-generating capacity, endothelial function and oxidative stress in chronic heart failure: effects of short- and long-term vitamin C therapy. J Am Coll Cardiol 2000 ; 36 : 1474-82.

[91]. De Biase L, Pignatelli P, Lenti L, Tocci G, Piccioni F, et al. Enhanced TNF alpha and oxidative stress in patients with heart failure: effect of TNF alpha on platelet O2- production. Thromb Haemost 2003; 90: 317-25.

[92]. Sorescu D and Griendling KK. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. Congest Heart Fail 2002; 8: 132-40.

[93]. Bleeke T, Zhang H, Madamanchi N, Patterson C and Faber JE. Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species. Circ Res 2004; 94: 37- 45.

[94]. Xiao L, Pimentel DR, Wang J, Singh K, Colucci WS, et al. Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)- adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. Am J Physiol Cell Physiol 2002; 282 : C926-34.

[95]. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M and Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. Hypertension 2002; 40: 477-84.

[96]. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, et al. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. Circulation 2003; 108: 1567-74.

[97]. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, et al. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. J Am Coll Cardiol 2003; 41: 2164-71.

[98]. Terashima M, Ohashi Y, Azumi H, Otsui K, Kaneda H, et al. Impact of NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species on coronary arterial remodeling: a comparative intravascular ultrasound and histochemical analysis of atherosclerotic lesions. Circ Cardiovasc Interv 2009; 2:196-204.

[99]. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. J Am Coll Cardiol 1998; 31: 1352-6.

[100]. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 9782-7.

[101]. Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. Circulation 2004; 109: 544-9.

[102]. Steiber A, Kerner J and Hoppel C. "Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective". Mol Aspects Med 2004; 25: 455-73.

[103]. Friedman S and Fraenkel G. Reversible enzymatic acetylation of carnitine. Arch Biochem Biophys 1955; 59:491-501.

[104]. Bremer J. The role of carnitine in intracellular metabolism. J Clin Chem Clin Biochem 1990; 28:297-301.

[105]. Vaz FM and Wanders RJ. Carnitine biosynthesis in mammals. Biochem J 2002; 361:417-29.

[106]. Pineda Torra I, Gervois P and Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. Curr Opin Lipidol 1999; 10: 151-159.

[107]. Buchan KW and Hassall DG. PPAR agonists as direct modulators of the vessel wall in cardiovascular disease. Med Res Rev 2000; 20: 350-366.

[108]. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M et al. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. Circulation 2000; 101: 2411-2417.

[109]. Jones DC, Ding X and Daynes RA. Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARα in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. J Biol Chem 2002; 277: 6838-6845.

[110]. Handschin C and Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. Endocr Rev 2006; 27:728-35.

[111]. Finck BN and Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. J Clin Invest 2006;116:615-22.

[112]. Sano M, Izumi Y, Helenius K, Asakura M, Rossi DJ, et al. Menagea-trois 1 is critical for the transcriptional function of PPARgammacoactivator 1. Cell Metab 2007;5:129-42.

[113]. Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B and Auwerx J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARα and PPARβ activators. J Biol Chem 1997; 272: 28210-28217.

[114]. Frohnert BI, Hui TY and Bernlohr DA. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. J Biol Chem 1999; 274: 3970-3977.

[115]. Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, et al. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. J Biol Chem 1995; 270: 19269-19276.

[116]. Brandt JM, Djouai F and Kelly DP. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. J Biol Chem 1998; 273: 23786-23792.

[117]. Mascaró C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG et al. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. J Biol Chem 1998; 273: 8560-8563.

[118]. Minnich A, Tian N, Byan L and Bilder G. A potent PPARα agonist stimulates mitochondrial fatty acid beta-oxidation in liver and skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 280: E270-E279.

[119]. Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARα/β, but not PPARγ, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. Circ Res 2003 ;92 : 518-524.

[120]. Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD and Kelly DP. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 11012-6.

[121]. Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, et al. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα). J Biol Chem 1998; 273: 5678-84.

[122]. Ortiz JA, Mallolas J, Nicot C, Bofarull J, Rodríguez JC et al. Isolation of pig mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene promoter : characterization of a peroxisome proliferator-responsive element. Biochem J 1999; 337: 329-35.

[123]. Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG and Haro D. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. J Biol Chem 1994; 269: 18767-72.

[124]. Breslow, J. L. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90: 8314-8.

[125]. Schumaker VN, Phillips ML and Chatterton JE. Apolipoprotein B and low-density lipoprotein structure: implications for biosynthesis of triglyceride-rich lipoproteins. Adv Protein Chem 1994; 45: 205-48.

[126]. Shulman RS, Herbert PN, Wehrly K and Fredrickson DS. Thf complete amino acid sequence of C-I (apoLp-Ser), an apolipoprotein from human very low density lipoproteins. J Biol Chem 1975; 250: 182-90.

[127]. Rall SC Jr, Weisgraber KH and Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. J Biol Chem 1982; 257: 4171-8.

[128]. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. Circulation 1998 ; 98 : 2088-93.

[129]. Vu-Dac N, Schoonjans K, Laine B, Fruchart JC, Auwerx J et al. Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. J Biol Chem 1994; 269: 31012-8.

[130]. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC et al. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. J Clin Invest 1995; 96: 741-50.

[131]. Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C et al. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. J Biol Chem 1997; 272: 27307-12.

[132]. Staels B, Peinado-Onsurbe J and Auwerx J. Down-regulation of hepatic lipase gene expression and activity by fenofibrate. Biochim Biophys Acta 1992; 1123: 227-30.

[133]. Staels B, Van tol A, Skretting G and Auwerx J. Lecithin: cholesterol acyltransferase gene expression is regulated in a tissue-selective manner by fibrates. J Lipid Res 1992; 33: 727-35.

[134]. Bouly M, Masson D, Gross B, Jiang XC, Fievet C et al. Induction of the phospholipid transfer protein gene accounts for the high density lipoprotein enlargement in mice treated with fenofibrate. J Biol Chem 2001;276: 25841-7.

[135]. Mardones P, Pilon A, Bouly M, Duran D, Nishimoto T et al. Fibrates down-regulate hepatic scavenger receptor class B type I protein expression in mice. J Biol Chem 2003; 278: 7884-90.

[136]. Heller F and Harvengt C. Effects of clofibrate, bezafibrate, fenofibrate and probucol on plasma lipolytic enzymes in normolipaemic subjects. Eur J Clin Pharmacol 1983 ; 25 : 57-63.

[137]. Malmendier CL, Lontie JF, Delcroix C, Dubois DY, Magot T et al. Apolipoproteins C-II and C-III metabolism in hypertriglyceridemic patients. Effect of a drastic triglyceride reduction by combined diet restriction and fenofibrate administration. Atherosclerosis 1989; 77: 139-49.

[138]. Wakabayashi I and Masuda H.Lipoprotein (a) as a determinant of arterial stiffness in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. Clin Chim Acta 2006; 373: 127-31.

[139]. Wang YX and Fitch RM. Vascular stiffness: measurements, mechanisms and implications. Curr Vasc Pharmacol 2004; 2: 379-84.

[140]. Kolditz CI and Langin D. Adipose tissue lipolysis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2010; 13:377-81.

[141]. Aschner P. Metabolic syndrome as a risk factor for diabetes. Expert Rev Cardiovasc Ther 2010; 8:407-12.

[142]. Levitas A, Muhammad E, Harel G, Saada A, Caspi VC,et al. Familial neonatal isolated cardiomyopathy caused by a mutation in the flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase Eur J Hum Genet 2010;18:1160-5.

[143]. Pohjoismäki JL, Goffart S, Taylor RW, Turnbull DM, Suomalainen A, et al. Developmental and pathological changes in the human cardiac muscle mitochondrial DNA organization, replication and copy number. PLoS One 2010;5:e10426.

[144]. Marin-Garcia J, Goldenthal MJ and Moe GW. Mitochondrial pathology in cardiac failure. Cardiovasc Res 2001; 49:17-26.

[145]. Schrijver I, Pique LM, Traynis I, Scharfe C and Sehnert AJ. Mitochondrial DNA analysis by multiplex denaturing high-performance liquid chromatography and selective sequencing in pediatric patients with cardiomyopathy. Genet Med 2009; 11: 118-26.

[146]. Bonnet D, de Lonlay P, Gautier I, Rustin P, Rötig A et al. Efficiency of metabolic screening in childhood myocardiopathies. Eur Heart J 1998; 19:790-3.

[147]. Buchwald A, Till H, Unterberg C, Oberschmidt R, Figulla HR, et al. Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. Eur Heart J 1990; 11 : 509-16.

[148]. Izgi C, Cevik C, Bakal RB and Ozkan M. Severe obstructive hypertrophic cardiomyopathy occurring secondary to mitochondrial disease. Turk Kardiyol Dern Ars 2009;37:332-6.

[149]. Maron BJ, Ferrans VJ and Roberts WC. Ultrastructural features of degenerated cardiac muscle cells in patients with cardiac hypertrophy. Am J Pathol 1975;79:387-434.

[150]. Maingourd Y, Kachaner J, Fermont L, Batisse A, Sidi D, et al. Severe hypotrophic and hypokinetic myocardiopathies secondary to obstructive malformations of the left heart infants. Arch Mal Coeur Vaiss 1983; 76:484-92**.**

[151]. Antozzi C and Zeviani M. Myocardiopathies in disorders of oxydative metabolism. Cardiovasc Res 1997; 35: 184-99.

[152]. Papadimitriou A, Neustein HB, Dimauro S, Stanton R and Bresolin N. Histiocytoid cardiomyopathy of infancy : deficiency of reductible cytochrome b in heart mitochondria. Pediatr Res 1984; 18: 1023-8.

[153]. Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodelling. Cardiovasc Res 2009;81:412-9.

[154] . van Bilsen M, van Nieuwenhoven FA and van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental. Cardiovasc Res. 2009;81:420-8.

[155]. Norton ED, Jackson EK, Turner MB, Virmani R and Forman MB. The effects of intravenous infusions of selective adenosine A_1-receptor and A_2-receptor agonists on myocardial reperfusion injury. Am Heart J 1992; 123 : 332-8.

[156]. Schlack W, Schäfer M, Uebing A, Schäfer S, Borchard U,et al. Adenosine-A2-receptor activation at reperfusion reduces infarct size and improves myocardial wall function in the dog heart. J Cardiovasc Pharmacol 1993; 22: 89-96.

[157]. Murry CE, Jennings RB and Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986; 74 : 1124-36.

[158]. Yellon D, Baxter G and Marber M. Angina reassessed : pain or protector? Lancet 1996 ;347 :1059-62.

[159]. Kiesman WF, Elzein E and Zablocki J. A1 adenosine receptor antagonists, agonists, and allosteric enhancers. Handb Exp Pharmacol 2009;193:25-58.

[160]. Blaise S, Alberto JM, Nedelec E, Ayav A, Pourie G,et al . Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. Pediatr Res 2005; 57:777-82.

[161]. Frankfurt OS. Immunoassay for single-stranded DNA in apoptotic cells. Methods Mol Biol 2004;282:85-101.

[162]. Edge JH, Hodgin, JB, Hagaman JR and Smithies O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. Hypertension 1995; 25: 1111-5.

[163]. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-75.

[164]. Chen Z, Chakraborty S and Banerjee R. Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. J Biol Chem 1995;270:19246-9.

[165]. Kutzbach **C** and Stokstad EL. Mammalian Methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. Biochim Biophys Acta 1971;250:459-477.

[166]. Paglia DE and Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967;70:158-69.

[167]. Liu J, Yeo HC, Doniger SJ and Ames BN. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. Anal Biochem 1997;245:161-6.

[168]. Krähenbühl S, Talos C, Fischer S and Reichen J. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. Hepatology 1994; 19: 471-479.

[169]. Malgat M, Durrieu G and Mazat J. Enzymatic and polarographic measurements of the respiratory chain complexes. Mitochondrial Diseases Springer Verlag 1999; 357-377.

[170]. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin Chim Acta 1994;228:35-51.

[171]. Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 1957; 226:497-509.

[172]. Ono H, shimano H, katagiri H, Yahagi N, Sakoda H, et al. Hepatic Akt activation induces marked hypoglycaemia, hepatomegaly and hypertriglycemia with sterol regulatory element binding protein involvement. Diabetes 2003; 52:2905-18.

[173]. Giannattasio S, Gagliardi S, Samaja M and Marra E. Simultaneous determination of purine nucleotides, their metabolites and β-nicotinamide adenine dinucleotide in cerebellar granule cells by ion-pair high performance liquid chromatography. Brain Research Protocols 2003; 10:168-74.

[174]. Katayama M, Matsuda Y, Shimokawa K, Tanabe S, Kaneko S, et al. Simultaneous determination of six adenyl purines in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence derivatization. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; 760:159-63.

[175]. Guéant-Rodriguez RM, Juillière Y, Nippert M, Abdelmouttaleb I, Herbeth B, et al. Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions. J Thromb Haemost 2007; 5:1209-16.

[176]. Herrmann, W, Herrmann, M, Joseph J, and Tyagi SC. Homocysteine, brain natriuretic peptide and chronic heart failure: a critical review. Clin Chem Lab Med 2007; 45:1633- 44.

[177]. Herrmann M, Müller S, Kindermann I, Günther L, König J, et al. Plasma B vitamins and their relation to the severity of chronic heart failure. Am J Clin Nutr 2007; 85:117-23.

[178]. Chen P, Poddar R, Tipa EV, Dibello PM, Moravec CD et al. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. Adv Enzyme Regul 1999; 39:93-109.

[179]. Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourié C et al. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteineassociated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. Am J Pathol 2007; 170:667-79.

[180]. Gardner, D.G., Chen, S., Glenn, D.J., and Grigsby, C.L. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. Hypertension 2007; 49:419-26.

[181]. Kalra S, Ahuja R, Mutti E, Veber D, Seetharam S et al. Cobalamin-mediated regulation of transcobalamin receptor levels in rat organs. Arch Biochem Biophys 2007; 463:128–32.

[182]. Chen P, Poddar R, Tipa EV, Dibello PM, Moravec CD, et al. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. Adv Enzyme Regul 1999; 39:93-109

[183]. Oltean S and Banerjee R. Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. J Biol Chem 2003; 278:20778-84.

[184]. Ortiou S, Alberto JM, Guéant JL, Merten M. Homocysteine increases methionine synthase mRNA level in Caco-2 cells. Cell Physiol Biochem 2004; 14:407-14.

[185]. Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, and Cao J. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. Environ Health Perspect 1998; 106:1219-28.

[186]. Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. J Biol Chem 1997; 272:17012-7.

[187]. Nishio E and 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; 122:269-74.

[188]. Robert K, Nehme J, Bourdon E, Pivert G, Friguet B, et al. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. Gastroenterology 2005; 128:1405-15.

[189]. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E et al. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and upregulates PP2A, proNGF and TACE. Proc Natl Acad Sci U S A 2009 ; 106 : 21930-5.

[190]. Ventura E, Durant R, Jaussent A, Picot MC, Morena M, et al. Homocysteine and inflammation as main determinants of oxidative stress in the elderly. Free Radic Biol Med 2009; 46:737-44.

[191]. Rogers EJ, Chen S and Chan A. Folate deficiency and plasma homocysteine during increased oxidative stress. N Engl J Med 2007; 357:421-2.

[192]. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. J Clin Invest 2001;107:1263-73.

[193]. Chanson A, Rock E, Martin JF, Liotard A and Brachet P. Preferential response of glutathione-related enzymes to folate-dependent changes in the redox state of rat liver. Eur J Nutr 2007; 46:204-12.

[194]. Chambers JC, Ueland PM, Wright M, Doré CJ, Refsum H, et al. Investigation of relationship between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and vascular endothelial function in healthy human subjects. Circ Res 2001 ; 89:187-92.

[195]. Zhang Q, Zeng X, Guo J, and Wang X. Oxidant stress mechanism of homocysteine potentiating Con A-induced proliferation in murine splenicT lymphocytes. Cardiovasc Res 2002; 53:1035-42.

[196]. Loscalzo J.The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. J Clin Invest 1996; 98:5-7.

[197]. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lønning PE and Ueland PM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15:232-40.

[198]. Zhang Q, Zeng X, Guo J and Wang X. Oxidant stress mechanism of homocysteine potentiating conA-induced proliferation in murine splenic T lymphocytes. Cardiovasc Res 2002; 53: 1035–42

[199]. Chambers JC, Ueland PM, Wright M, Doré CJ, Refsum H et al. Investigation of relationship between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and vascular endothelial function in healthy human subjects. Circ Res 2001; 89: 187–92.

[200]. Hoffman DR, Haning JA and Cornatzer WE. Effects of a methyl-deficient diet on rat liver phosphatidylcholine biosynthesis. Can J Biochem 1981; 59:543-50

[201]. Veal N, Hsieh CL, Xiong S, Mato JM, Lu S et al. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha promoter activity by S-adenosylmethionine and 5'-methylthioadenosine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004;287:G352-62.

[202]. Ventura-Clapier R, Garnier A and Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. Cardiovasc Res 2008; 79:208-17.

[203]. Farabee MJ. The Nature of ATP and Biological Energy. Serial on the Internet 2002; 7.

[204]. Murugappa S and Kunapuli SP. The role of ADP receptors in platelet function. Front Biosci 2006; 11:1977-86.

[205]. Corydon TJ, Hansen J, Bross P and Jensen TG. Down-regulation of Hsp60 expression by RNAi impairs folding of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase wild-type and disease-associated proteins. Mol Genet Metab 2005; 85:260-70.

[206]. Ibdah JA, Paul H, Zhao Y, Binford S, Salleng K et al. Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death. J Clin Invest 2001; 107:1403-9.

[207]. Meng C, Jin X, Xia L, Shen SM, Wang XL et al. Alterations of mitochondrial enzymes contribute to cardiac hypertrophy before hypertension development in spontaneously hypertensive rats. J Proteome Res 2009; 8:2463-75.

[208 Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, Christ T, Ravens U, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. Circ Res 2009; 105:326-34.

[209]. Burton PB, Hogben CE, Joannou CL, Clark AG, Hsuan JJ, et al. 1994. Heart fatty acid binding protein is a novel regulator of cardiac myocyte hypertrophy. Biochem Biophys Res Commun 1994; 205:1822-28.

[210]. Spaniol M, Kaufmann P, Beier K, Wuthrich J, Torok M, et al. Mechanisms of liver steatosis in rats with systemic carnitine deficiency due to treatment with trimethylhydraziumpropionate. J Lipid Res 2003; 44:144-53.

[211]. Tein I. Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects. J Inherit Metab Dis 2003; 26:147-69.

[212]. Delabar U, Kloor D, Luippold G and Mühlbauer B. 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 1999; 724:231-8.

[213]. Paglia DE, and Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70:158-69.

[214]. Vaz FM and Wanders RJ. Carnitine biosynthesis in mammals. Biochem 2002; 361:417-29.

[215]. Stanley CA. Carnitine deficiency disorders in children. Ann N Y Acad Sci 2004; 1033:42-51.

[216]. Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H et al. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. Nat Genet 1999; 21:91-4.

[217]. Wu X, Huang W, Prasad PD, Seth P, Rajan DP, et al. Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. J Pharmacol Exp Ther 1999; 290:1482-92.

[218]. Takahashi R, Asai T, Murakami H, Murakami R, Tsuzuki M, et al. Pressure overload-induced cardiomyopathy in heterozygous carrier mice of carnitine transporter gene mutation. Hypertension 2007; 50:497-502.

[219]. Kuwajima M, Lu K, Sei M, Ono A, Hayashi M, et al. Characteristics of cardiac hypertrophy in the juvenile visceral steatosis mouse with systemic carnitine deficiency. J Mol Cell Cardiol 1998; 30:773-81.

[220]. Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H et al. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. Nat Genet 1999; 21:91-4.

[221]. Lamhonwah AM, Wong J, Tam C, Mai L and Tein I. Organic cation/carnitine transporter family expression patterns in adult murine heart. Pathol Res Pract 2009; 205:395-402.

[222 Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 1957; 226:497-509.

[223]. Briand Gl. 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. J Mass Spectrom 1995 30:1731-1741.

[224]. Krähenbühl S, Talos C, Fischer S and Reichen J. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. Hepatology 1994; 19:471-9.

[225]. Madrazo JA., and Kelly DP. The PPAR trio: Regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. J Mol Cell Cardiol 2008; 44:968-75.

[226]. Stavinoha MA, RaySpellicy JW, Essop MF, Graveleau C, Abel ED et al. Evidence for mitochondrial thioesterase 1 as a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-regulated gene in cardiac and skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 2004; 287:E888-95.

[227]. Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, et al. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). J Biol Chem 1998; 273:5678-84.

[228]. van Vlies N, Ferdinandusse S, Turkenburg M, Wanders RJ and Vaz FM. PPAR alpha-activation results in enhanced carnitine biosynthesis and OCTN2-mediated hepatic carnitine accumulation. Biochim Biophys Acta 2007; 1767:1134-42.

[229]. Eder K and Ringseis R. The role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional regulation of novel organic cation transporters. Eur J Pharmacol 2010; 628: 1-5.

[230 Schachtrup C, Emmler T, Bleck B, Sandqvist A and Spener F. Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. Biochem J 2004; 382:239-45.

[231]. Kawabe K, Saegusa H, Seto K, Urabe H and Motojima K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and its response element are required but not sufficient for transcriptional activation of the mouse heart-type fatty acid binding protein gene. Int J Biochem Cell. Biol 2005; 37:1534-46.

[232]. Mikael LG, Genest J Jr and Rozen R. Elevated homocysteine reduces apolipoprotein A-I expression in hyperhomocysteinemic mice and in males with coronary artery disease. Circ Res 2006; 98:564-71.

[233]. Yideng J, Zhihong L, Jiantuan X, Jun C, Guizhong L, et al. Homocysteine-mediated PPARalpha, gamma DNA methylation and its potential pathogenic mechanism in monocytes. DNA Cell Biol 2008; 27:143-50.

[234]. Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE, Präger D, Haney J, Möritz KU, et al. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). Circulation 2006; 113:1114-22.

[235]. Puigserver P and Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocrinol Rev 2003; 24: 78-90.

[236]. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, et al. A cold-inducible coactivator of nuclearreceptors linked to adaptive thermogenesis. Cell 1998; 92: 829-39.

[237]. Larrouy D, Vidal H, Andreelli F, Laville M and Langin D. Cloning and mRNA tissue distribution of human PPARgamma coactivator-1. Int J Obesity 1999; 23: 1327-32.

[238]. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. Nature 2001; 413: 131-8.

[239]. Yoon JC, Xu G, Deeney JT, Yang SN, Rhee J, et al. Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. Dev Cell 2003; 5: 73-83.

[240]. De Souza CT, Gasparetti AL, Pereira-da-Silva M, Araújo EP, Carvalheira JB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin secretion. Diabetologia 2003; 46: 1522-31.

[241]. Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, et al. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC- 1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 6472-7.

[242]. Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, et al. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferatoractivated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferatoractivated receptor-alpha in skeletal muscle. Diabetes 2003; 52: 2874-81.

[243]. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. J Clin Invest 2000; 106: 847-56.

[244]. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell 1999; 98: 115-24.

[245]. Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, et al. Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. J Biol Chem 2003; 278: 33370-6.

[246]. Vega RB, Huss JM and Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. Mol Cell Biol 2000; 20: 1868-76.

[247]. Iwata D, Kato Y, Wakayama T, Sai Y, Kubo Y, et al. Involvement of carnitine/organic cation transporter OCTN2 (SLC22A5) in distribution of its substrate carnitine to the heart. Drug Metab Pharmacokinet 2008; 23:207-15.

[248 Tzoulaki I, Molokhia M, Curcin V, Little MP, Millett CJ, et al. Risk of cardiovascular disease and all cause mortality among patients with type 2 diabetes prescribed oral antidiabetes drugs: retrospective cohort study using UK general practice research database. BMJ 2009 ; 339 : b431.

[249]. Bønaa KH, Njølstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. N Engl J Med 2006; 354:1578-88.

[250]. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, et al. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. N Engl J Med 2006; 354:1567-77.

[251]. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, et al. Heart disease and stroke statistics-2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation 2008; 117: e25-146.

[252]. Rayner M, Allender S and Scarborough P. Cardiovascular disease in Europe. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2009; 16: S43-7.

[253]. Fowkes FG, Housley E, Cawood EH, Macintyre CC, Ruckley CV, et al. Edinburgh Artery Study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population. Int J Epidemiol 1991; 20: 384-92.

[254]. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzer NR, Bakal CW, Creager MA, et al. ACC/AHA Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic). Circulation 2006; 113: e463-654.

[255]. Khawaja FJ, Bailey KR, Turner ST, Kardia SL, Mosley TH , et al. Association of novel risk factors with the ankle brachial index in African American and non-Hispanic white populations. Mayo Clin Proc 2007; 82: 709-16.

[256]. McDermott MM, Ferrucci L, Guralnik JM, Tian L, Green D, et al. Elevated levels of inflammation, d-dimer, and homocysteine are associated with adverse calf muscle characteristics and reduced calf strength in peripheral arterial disease. J Am Coll Cardiol 2007; 50: 897-905.

[257]. Vidula H, Tian L, Liu K, Criqui MH, Ferrucci L, et al. Biomarkers of inflammation and thrombosis as predictors of near-term mortality in patients with peripheral arterial disease: a cohort study. Ann Intern Med 2008; 148: 85-93.

[258]. Sentí M, Nogués X, Pedro-Botet J, Rubiés-Prat J and Vidal-Barraquer F. Lipoprotein profile in men with peripheral vascular disease. Role of intermediate density lipoproteins and apoprotein E phenotypes. Circulation 1992; 85: 30-6.

[259]. Ridker PM, Stampfer MJ and Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. JAMA 2001; 285: 2481-5.

[260]. Wald DS, Law M and Morris J. Serum homocysteine and severity of coronary artery disease. Thrombosis Research 2003; 111: 55-7.

[261]. Undas A, Brozek J and Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. Thromb Haemost 2005; 94: 907-15.

[262]. Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. J Thromb Haemost 2005; 3: 1646-54.

[263]. Khandanpour N, Loke YK, Meyer FJ, Jennings B and Armon MP. Homocysteine and peripheral arterial disease: systematic review and meta-analysis. Eur J Vasc Endovasc Surg 2009; 38: 316-22.

[264 Woo KS, Sanderson JE, Sun YY, Chook P, Cheung AS, et al. Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. Circulation 2000; 101: E116.

[265]. Liao D, Tan H, Hui R, Li Z, Jiang X, et al. Hyperhomocysteinemia decreases circulating high-density lipoprotein by inhibiting apolipoprotein A-I Protein synthesis and enhancing HDL cholesterol clearance. Circ Res 2006; 99: 598-606.

[266]. McDermott MM, Liu K, Criqui MH, Ruth K, Goff D, et al. Ankle-brachial index and subclinical cardiac and carotid disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. Am J Epidemiol 2005; 162: 33-41.

[267]. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E et al. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and upregulates PP2A, proNGF and TACE. Proc Natl Acad Sci U S A 2009 ; 106 : 21930-5**.**

[268]. Guéant-Rodriguez RM, Juilliére Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, et al. 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; 94: 510-5.

[269]. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. Clin Chem 1995; 41: 717-23.

[270]. Friedewald WT, Levy RI and Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972; 18: 499-502.

[271]. Lagrost L, Athias A, Herbeth B, Guyard-Dangremont V, Artur Y, et al. Opposite effects of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein on the size distribution of plasma high density lipoproteins. Physiological relevance in alcoholic patients. J Biol Chem 1996; 271: 19058-65.

[272]. Newman AB, Siscovick DS, Manolio TA, Polak J, Fried LP, et al. Ankle-arm index as a marker of atherosclerosis in the Cardiovascular Health Study. Cardiovascular Heart Study (CHS) Collaborative Research Group. Circulation 1993; 88: 837-45.

[273]. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33: S1-75.

[274]. Pradhan AD, Shrivastava S, Cook NR, Rifai N, Creager MA, et al. Symptomatic Peripheral Arterial Disease in Women: Nontraditional Biomarkers of Elevated Risk. Circulation 2008; 117: 823-31.

[275]. Antoniades C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, Marinou K and Stefanadis C. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials. Eur Heart J 2009; 30: 6-15.

[276]. Carrero JJ, López-Huertas E, Salmerón LM, Baró L and Ros E. Daily supplementation with (n-3) PUFAs, oleic acid, folic acid, and vitamins B-6 and E increases pain-free walking distance and improves risk factors in men with peripheral vascular disease. J Nutr 2005; 135: 1393-9.

[277]. Masson D, Koseki M, Ishibashi M, Larson CJ and Miller SG. Increased HDL cholesterol and apoA-I in humans and mice treated with a novel SR-BI inhibitor. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009; 29: 2054-60**.**

[278]. Beers A, Haas MJ, Wong NC and Mooradian AD. Inhibition of apolipoprotein AI gene expression by tumor necrosis factor alpha: roles for MEK/ERK and JNK signaling. Biochemistry 2006; 45: 2408-13.

[279]. Taskinen MR, Sullivan DR, Ehnholm C, Whiting M, Zannino D, et al. Relationships of HDL cholesterol, ApoA-I, and ApoA-II with homocysteine and creatinine in patients with type 2 diabetes treated with fenofibrate. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009; 29: 950-5.

[280]. de Bree A, Mennen LI, Zureik M, Ducros V, Guilland JC, et al. Homocysteine is not associated with arterial thickness and stiffness in healthy middle-aged French volunteers. Int J Cardiol 2006;113: 332-40.

[281]. Nakhai-Pour HR, Grobbee DE, Bots ML, Muller M and van der Schouw YT. Circulating homocysteine and large arterial stiffness and thickness in a population-based sample of middle-aged and elderly men. J Hum Hypertens 2007; 21: 942-8.

[282]. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. J Clin Invest 2006; 116: 3090-100.