La carence en vitamine B12 induit un stress du réticulum endoplasmique dû à une diminution de la déacétylase SIRT1 et une augmentation de l'acétylation de HSF1

Rose Issam Ghemrawi

▶ **To cite this version:**

Rose Issam Ghemrawi. La carence en vitamine B12 induit un stress du réticulum endoplasmique dû à une diminution de la déacétylase SIRT1 et une augmentation de l'acétylation de HSF1. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0131 . tel-01750124

HAL Id: tel-01750124
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750124

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

Par

Rose Issam GHEMRAWI

La carence en vitamine B12 induit un stress du réticulum endoplasmique dû à une diminution de la déacétylase SIRT1 et une augmentation de l'acétylation de HSF1

Le 27 Septembre 2013

Membres du jury

Rapporteurs:

M. Edward Quadros	PU, SUNY Downstate Medical Center, Brooklyn
M. Bernard Sablonnière	PU-PH, Université de Lilles, Lilles

Examinateurs:

M. Yves Malthiéry	PU-PH, UMR 694 Inserm, Angers
Mme. Sylvie Fournel-Gigleux	DR Inserm, UMR 7365 CNRS, Nancy
Mme. Shyue-Fang Battaglia-Hsu	MCU-PH, UMR 954 Inserm, Nancy, Co-directeur de thèse
M. Jean-Louis Guéant	PU-PH, UMR 954 Inserm, Nancy, Directeur de thèse

UMR 954 Inserm, Laboratoire de Nutrition, génétique et exposition aux risques environnementaux, 9 avenue de la Forêt de Haye-Faculté de Médecine 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Jean-Louis Guéant, directeur de thèse et directeur de l'unité INSERM U954, pour son accueil, sa direction avisée, consciencieuse et fidèle. Je le remercie de m'avoir soutenue et encouragée tout au long de cette thèse avec patience.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Shyue-Fang Battaglia-Hsu, co-directrice de thèse, pour m'avoir guidée, conseillée et enseignée les réflexes du bon chercheur. L'intérêt et l'enthousiasme qu'elle a témoigné, ainsi que le temps qu'elle m'a consacrée, contribuent pour une grande part au résultat final. J'avais vraiment de la chance que tu sois ma co-directrice.

Je remercie Monsieur Edward Quadros et Monsieur Bernard Sablonnière d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'évaluer mon travail.

Madame Sylvie Fournel-Gigleux et Monsieur Yves Malthiéry, je vous remercie pour votre participation au jury de comité de thèse, ma soutenance de thèse et son évaluation.

Mes vifs remerciements s'adressent conjointement à Monsieur Farès Namour pour sa gentillesse, son soutien et pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire pour mon stage de Master 2.

Je remercie Madame Natacha Dreumont-Schuller pour ses conseils, sa patience, sa disponibilité et la correction du manuscrit. Tu m'as tellement appris.

Je tiens à remercier Madame Carole Arnold et Monsieur David Coelho pour leur gentillesse, les bons conseils et la correction du manuscrit.

Je remercie Jean-Marc Alberto, Céline Chéry, Florence Coste, Sophie Lorentz, Justine Flayac, Deborah Helle, Pierre Rouyer et Rémy Umoret pour leur patience, leur aide et leurs conseils.

Un grand merci aux secrétaires Dominique Guillaume et Catherine Tavera pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur patience.

Un grand merci pour tous mes amis au labo Racha, Sara, Rania, Hassan, Fereshteh, Anais, Soufiane, Gaili, Lu, Andréa, Guillaume, Fézé, Eva, Sébastien, Julien, Shabnam, Ma'atem, Hélène, Sonia et Nicolas, pour tous les bons moments passés ensemble, leur bonne humeur et leur soutien.

Un très grand merci pour tou(te)s mes ami(e)s libanais(es) au labo et en dehors du labo, pour l'affectueuse amitié, leur grand support et pour les excellents moments partagés ensemble. Mon séjour à Nancy ne pouvait pas être pareil sans vous.

Rachrouch merci pour tout ce qu'on a partagé ensemble et ce qu'on va partager, je t'aime beaucoup. Friends 4 ever.

Mostafa hayeti ! Je ne serais sûrement pas là aujourd'hui sans toi ! Merci pour tout tout tout ! Quand je vois ce qu'on a déjà accompli ensemble, je sais que je suis très fière, très chanceuse et surtout très contente de t'avoir dans ma vie. Je t'aime.

Ma famille, baba, mama, Hani, Rouba, Hilal, Rabih, Malak, Ahmad, Omar, les parents de Mostafa, je dédie cette thèse pour vous. Vous êtes mon bonheur. Je remercie votre grande présence malgré la distance qui nous sépare. Je vous aime énormément.

Publications:

Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant JL, Battaglia-Hsu S**. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1.** *Cell Death and Disease, 2013, Mars 21.4:e553. doi: 10.1038/cddis.2013.69.*

Communications orales:

Ghemrawi R, Coste F, Gueant JL, Namour B**. Etude des modifications épigénétiques et analyse de l'expression de Igf2 et H19 chez des rats carencés ou non en groupements méthyles.** *VIème journée Claude Huriet de la recherche médicale, Nancy, 17 Décembre 2010.*

Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant JL, Battaglia-Hsu S**. La carence en vitamine B12 induit un stress du réticulum endoplasmique dû à une diminution de la déacétylase SIRT1 et une augmentation de l'acétylation de HSF1.** *VIIIème journée Claude Huriet de la recherche médicale, Nancy, 24 Mai 2013.* ***(1er prix)***

Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant JL, Battaglia-Hsu S**. La carence en vitamine B12 induit un stress du réticulum endoplasmique dû à une diminution de la déacétylase SIRT1 et une augmentation de l'acétylation de HSF1.** *Journée de la FR, Nancy, 7 Juin 2013.*

Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant JL, Battaglia-Hsu S**. La carence en vitamine B12 induit un stress du réticulum endoplasmique dû à une diminution de la déacétylase SIRT1 et une augmentation de l'acétylation de HSF1.** *9th International Homocysteine and One-Carbon Metabolism Conference, Dublin, 8-12 Septembre 2013.*

Communications affichées :

Ghemrawi R, Coste F, Gueant JL, Namour B**. Etude des modifications épigénétiques et analyse de l'expression de Igf2 et H19 chez des rats carencés ou non en groupements méthyles.** *Symposium de la vitamine B12, Nancy, 20-22 Septembre 2012.*

Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant JL, Battaglia-Hsu S**. La carence en vitamine B12 induit un stress du réticulum endoplasmique dû à une diminution de la déacétylase SIRT1 et une augmentation de l'acétylation de HSF1.** *XIème colloque de la société des neurosciences, Lyon, 21-24 Mai 2013.*

Table des matières

Publications 1
Table des matières 5
Abréviations 11
Avant-propos 17
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES 19
Partie 1 : DONNEURS DE GROUPEMENTS METHYLES ET CYCLE DE MONOCARBONES 21
I. Le métabolisme des monocarbones et cycles associés 23
I.1. Le cycle de la méthionine (ou de l'homocystéine) 23
a. La méthionine 23
b. La SAM, la SAH et le rapport SAM/SAH 23
c. L'homocystéine 25
I.2. La voie de la trans-sulfuration 26
I.3. Le cycle des folates 26
II. Les facteurs influençant le cycle des monocarbones 27
II.1 Les facteurs nutritionnels 27
II.1.1. Les folates (vitamine B9) 27
a. Définition et structure chimique 27
b. Histoire 28
c. Nutrition 29
d. Absorption 30
e. Transport 31
f. Stockage et élimination 31
g. Le rôle des folates 31
h. La carence en folates 32
i. Folates et programmation fœtale 32
II.1.2. La vitamine B12 ou cobalamine 33
a. Définition 33
b. Histoire 33
c. Nutrition 34
d. Structure chimique 35
e. Absorption 36
f. Transport 37
g. Stockage et élimination 38
h. Métabolisme cellulaire 38
i. Les défauts du métabolisme de la vitamine B12 39
II.1.2.1 Implication de la vitamine B12 dans le cycle des monocarbones 41

a. La méthionine synthase (MTR, MS, EC 2.1.1.13) 41
1. Généralités 41
2. Le gène 41
3. La protéine 41
4. La régulation de la MS 42
b. La méthylmalonylcoenzyme A mutase (MCM, Mut, EC 5.4.99.2) 43
1. Généralités 43
2. Le gène 43
3. La protéine 43
4. La régulation de l'expression de Mut 43
II.1.2.2 La carence en vitamine B12 44
a. Déficit d'apport 44
b. Défaut d'absorption 44
c. Conséquences de la carence en B12 44
d. Perturbation de l'interaction entre la vitamine B12 et les folates 45
3- Conséquences de la carence en B12 sur la prolifération 46
II.2. Les facteurs génétiques 46
Partie 2 : LES PATHOLOGIES EN LIEN AVEC UNE CARENCE EN VITAMINE B12 47
a. Maladies cardiovasculaires 48
b. Stéatose hépatique 49
c. Maladies osseuses 49
d. Diabète 49
e. Maladies neurodégénératives 50
f. Histoire 50
g. Maladie d'Alzheimer 51
h. Epilepsie 51
i. Sclérose en plaques 51
j. Maladie de Parkinson 51
k. Paralysie supranucléaire progressive/ sclérose latérale amyotrophique 52
Partie 3: LE STRESS DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE 53
I. Fonctions du réticulum endoplasmique 54
a. Stockage du calcium intracellulaire 54
b. Synthèse, transport, maturation et dégradation des protéines 55
c. Synthèse du cholestérol et des lipides 57
d. Production du glucose par la voie de la glycogénolyse 57
e. Biogenèse des autophagosomes 58
II. Le Stress du Réticulum endoplasmique 59

II.1. Origines du stress du réticulum endoplasmique 60
a. Accumulation des protéines mal-repliées 60
b. Influence du calcium 60
c. Environnement redox 60
d. Glycosylation 61
e. Micronutriments et stress du RE 61
f. Glucose, acides aminés, acides gras et stress du RE 61
g. pH 62
II.2. La réponse UPR 63
a. La voie PERK : régulation traductionnelle 64
b. La voie IRE1 : régulation transcriptionnelle (1) 66
c. La voie ATF6 : régulation transcriptionnelle (2) 66
II.3. Transition de la réponse UPR vers l'apoptose 69
a. La voie IRE1-TRAF2-JNK 69
b. Le facteur de transcription CHOP 69
c. La caspase 12 70
II.4. Interactions entre le stress du RE et les autres formes de stress 71
a. Stress métabolique et stress du RE 71
b. Stress oxydant et stress du RE 72
II.5. SIRT1 et stress du RE 73
a. SIRT1 et son rôle biologique 73
b. Implication de SIRT1 dans le stress du RE 74
II.6. Carence en vitamine B12 et stress du RE 75
II.7. Pathologies et stress du RE 75
a. Maladies neurodégénératives 75
b. Cancer 76
c. Inflammation 76
d. Diabète 77
e. Ischémie-reperfusion 78
f. Maladies cardiovasculaires 78
OBJECTIFS D'ETUDE 79
RESULTATS 83
I. La carence en vitamine B12 induit un stress du RE 85
II. Activation de XBP, ATF4 et des marqueurs pro-apoptotiques par le stress du RE dans les cellules TO 90
III. Le stress du RE dans les cellules TO est dû à une augmentation de l'acétylation de HSF1 et une diminution de la déacétylase SIRT1 95

IV. La surexpression de HSF1 dans les cellules TO sauve les cellules de stress du RE et son invalidation dans les cellules OT aggrave le stress du RE 103
V. La vitamine B12 réverse l'activation de stress du RE provoqué par la thapsigargine 112
VI. La réduction de SIRT1 est homocystéine-indépendante et méthylation-dépendante. 117
DISCUSSION ET CONCLUSION 123
BIBLIOGRAPHIE 166
MATERIELS ET METHODES 129
Fiche 1 : Lignées cellulaires 130
Fiche 2: Décongélation des lignées 131
Fiche 3: Repiquage des lignées 132
Fiche 4: Congélation des lignées 133
Fiche 5: Transfection stable des cellules NIE-115 par le pcDNA3-TCII-oléosine ou le pcDNA3-oléosine-TCII 134
Fiche 6: Isolement des clones par dilution limite des cellules transfectées 135
Fiche 7: Liaison de la TCII à la vitamine B12 radiomarquée 136
Fiche 8: Oligonucléotides utilisés pour les réactions de PCR pour les protéines chimères 137
Fiche 9: Extraction d'ADN des cellules transfectées pour la vérification du gène d'intérêt 138
Fiche 10: Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) 139
Fiche 11: Analyse de l'ADN sur gel d'agarose 140
Fiche 12: Différents traitements effectués 141
Fiche 13: Transfection transitoire (SiRNA ou plasmides) 142
Fiche 14: SiRNA et plasmides utilisés 143
Fiche 15 : Extraction des protéines pour l'étude par Western-Blot 144
Fiche 16: Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) 145
Fiche 17: Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) 146
Fiche 18: Transfert des protéines sur membrane de PVDF 149
Fiche 19: Blocage, anticorps primaires et secondaires 150
Fiche 20: Liste des anticorps primaires et secondaires 151
Fiche 21: Immunodétection par révélation en chimiluminescence de l'activité peroxidase 152
Fiche 22: Déshybridation des membranes (STRIPPING) 153
Fiche 23: Immunoprécipitation 154
Fiche 24: Extraction des ARN avec le Kit RNeasy plus 156
Fiche 25: Quantification des ARN 157
Fiche 26: Vérification de l'intégrité des ARN sur gel d'agarose 158
Fiche 27: Transcription inverse des ARN (RT) 159
Fiche 28: PCR quantitative en temps réel 160
Fiche 29: Les amorces utilisées 161

Fiche 30: Marquage d'immunofluorescence 162
Fiche 31: Comptage des cellules vivantes en utilisant : la méthode d'exclusion au Bleu Trypan..... 163
Fiche 32: dosage de l'homocystéine, MMA, SAM et SAH 164
Fiche 33: Analyses statistiques..... 165

Abréviations

5’d Ado : 5’- désoxyadénosyl

5’-UTR : 5' UnTranslated Region (region 5’ non traduite)

ABCD4 : ATP-binding cassette (ABC) transporter D4

AdoCbl : Adénosylcobalamine

Adox : Adenosine dialdehyde

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP : Adénosine monophosphate

ANC : Apports nutritionnels conseillés

AP-2: Activating Protein 2

ARN: Acide ribonucléique

ASK1: Apoptosis signal-regulating kinase 1

ATF4: Activating transcription factor 4

ATF6: Activating transcription factor-6

ATP: Adénosine-5'-triphosphate

BHMT : Bétaïne-homocystéine méthyltransférase

BiP/GRP78: Binding immunoglobulin protein/ Glucose-regulated protein 78

BTB / POZ: BR-C, ttk and bab / Pox virus and Zinc finger

Ca^{2+}: Calcium

Caco-2 : Colon carcinoma

Cbl : Cobalamine

Cbl-IF : Complexe cobalamine-facteur intrinsèque

CBS: Cystathionine β-synthase

CD320: Cluster of differentiation 320

CH3: Groupement méthyle

CHOP : CEBP HOmologous Protein

CNCbl : Cyanocobalamine

COMT : Catéchol-O-méthyltransférase

DHA : Acide docosahexaenoique

DHF: Dihydrofolate

DHFR : Dihydrofolate reductase

DM : Diabète mellitus

DMB : diméthylbenzimidazole

DMSO : Dimethyl sulfoxide

dUMP: Désoxyuracile-monophosphate

dTMP: désoxytymidine-monophosphate

EC: Enzyme commission number

EDEM: ER-degradation enhancing –mannosidase–like protein

eIF2: Eukaryotic translation Initiation Factor 2

ERAD: Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation

ERO1: ER oxydation 1

ERR-α: Estrogen-related receptor α

ERSE: Endoplasmic Reticulum Stress response Element

HIC1: Hypermethylated in cancer 1

HSF1: Heat Shock Factor 1

HSP27: Heat Shock Protein 27

Hsp70: Heat Shock Protein 70

HSP90: Heat Shock Protein 90

FAD: Flavine-adénosine dinucleotide

FGCP: folylpolyglutamate carboxypeptidase

FOXO3: Forkhead box family protein 3

FR: Folate receptor

G6P: Glucose-6-phosphate

GADD34: Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34

GCN2: General Control Nonderepressible 2

GH: γ-glutamyl hydrolase

GRP94: Glucose-regulated protein 94

GRP170/ORP150: Glucose-regulated protein 170/ Oxygen-regulated protein 150

GSH: Glutathion

GSSG: Glutathion oxydé

GLUT2: Glucose transporter 2

H: Haptocorrine

Hcy: Homocystéine

HEK293: Human Embryonic Kidney 293

HRI: Heme Regulated Inhibitor

IF: Intrinsic factor

IGROV1: Ovarian carcinoma

IP3R: Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor

IR: Ischémie -reperfusion

IRE1: inositol-requiring enzyme-1

IRES : Site interne d'entrée des ribosomes

JNK: c-Jun N-terminal kinase 1

KB: Mouth Epidermal Carcinoma Cells

KDa: Kilo Dalton

L-BMAA: Béta-N-méthylamino-L-alanine

L-dopa: Lévodopa

LMBD1 : Lysosomal membrane transporter 1

MAT : Méthionine adénosyltransférase

MMA : Acide méthylmalonique

MMAA: Methylmalonic aciduria type A protein

MMAB: Methylmalonic aciduria type B protein

MMACHC: Methylmalonic aciduria and homocystinuria type C protein

MMADHC: Methylmalonic aciduria and homocystinuria type D protein

MeCbl: Méthylcobalamine

MEF: Mouse Embryonic Fibroblast

Méthylmalonyl CoA mutase : Méthylmalonyl Coenzyme A mutase

MS: Méthionine synthase

MTR: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase

MTRR : 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase

MSR : Méthionine synthase réductase

MTHFR : Méthylène tétra-hydrofolate réductase

N5-MeTHF : N5-méthyltétrahydrofolate

N5,10-MeTHF : N5,10-méthylène tétrahydrofolate

NAD : Nicotinamide-adénine-dinucléotide

NADP: Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate

NQO : NAD(P)H quinone oxydoréductase

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

OH : Groupement hydroxyl

OMS : Organisation mondiale de la santé

ORP150: Oxygen-regulated protein 150

OT: Oléosine-transcobalamine

P : Probabilité

PAS : Structure pré – autophagosomique

PCFT: Proton-coupled folate transporter

PDI: Protein Disulfide Isomerase

PERK: PKR-like ER-associated protein kinase

PG: Polyglutamates

PGC1α: Proxisol proliferator activator receptor gamma coactivator alpha

pH: Potentiel d'hydrogène

PKR: Double-stranded RNA-dependent protein Kinase

PLP: Pyridoxal 5'- phosphate

PP1: Protéine phosphatase 1

PPAR-α: Peroxisome proliferator-activated receptor

PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis

RE: Réticulum endoplasmique

REL : Réticulum endoplasmique lisse

RER : Téticulum endoplasmique rugueux

RFC : Récepteur des folates réduits

RIB1: Riboflavin biosynthesis 1

RIDD: Regulated Ire1-dependent degradation

ROS : Radicaux libres oxygénés

RyR: Ryanodine receptor

S1P: Site-1 Protease

S2P: Site-2 Protease

SAM: S-adénosylméthionine

SAH: S-adénosylhomocystéine

SAHH: S-adénosylhomocystéine hydrolase

SERCA: Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-transport ATPase

SHMT: Sérine hydroxyméthyltransférase

S-FBP: Folate binding proteins solubles

SIR2: Silent information regulator 2

SIRT1: Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1

SNC: Système Nerveux Central

SRP: Signal recognition particule

SW48: Human colon adenocarcinoma

TCII: Transcobalamine II

TG: Thapsigargine

THF: Tétrahydrofolate

TNBC: Triple negative breast cancer

TO: Transcobalamine-oléosine

TRAF2: TNF receptor-associated factor 2

TS: Thymidylate synthase

uORFs: Upstream open reading frames

UPR: Unfolded protein response

XBP1: X-box-binding protein 1

Avant-propos

La carence en vitamine B12 fait partie des priorités affichées par l'OMS qui tente de sensibiliser l'opinion publique sur les inconvénients d'une carence vitaminique notamment au cours du développement. Etant donné que la vitamine B12 se trouve dans les aliments d'origine animale, cette carence apparaît surtout chez les végétaliens. Elle se manifeste par des signes généraux, principalement neuropsychiatriques, une diminution des performances intellectuelles, des signes de démence ainsi que des troubles neurologiques. Elle est également associée à la survenue de plusieurs maladies notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète, les maladies osseuses et les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson.

Afin d'explorer les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la réponse des neurones centraux à la carence en vitamine B12, nous avons développé un modèle cellulaire original correspondant en une transfection stable des cellules dopaminergiques de souris (lignée NIE115) par une protéine chimère contenant le transporteur plasmatique de la vitamine B12, la transcobalamine II, et une protéine d'ancrage membranaire au niveau du réticulum endoplasmique, afin de séquestrer la vitamine B12 dans le cytoplasme (Battaglia-Hsu et al, 2009; Pons et al, 2009)

Les premiers résultats obtenus dans ce modèle ont montré une diminution de la prolifération et une augmentation de la différenciation et de l'apoptose (Battaglia-Hsu et al, 2009; Orozco-Barrios et al, 2009). La transfection de la protéine chimère dans la substance noire des rats induit également un phénotype Parkinson-like (Orozco-Barrios et al, 2009). D'autres travaux du laboratoire ont montré qu'une carence en donneurs de groupements méthyles provoque un déséquilibre du rapport acétylation/méthylation de PGC-1α suite à une réduction de l'expression de SIRT1, induisant donc une altération de l'oxydation des acides gras avec une hypertrophie du myocarde (Garcia et al, 2011, Pooya et al, 2012). L'objectif de ma thèse était donc d'étudier les mécanismes moléculaires liés à la réduction de la prolifération en centrant notre hypothèse sur l'existence d'un lien avec le stress du réticulum en rapport avec une altération de l'expression de SIRT1.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une description des données bibliographiques relatives au sujet de cette thèse. La deuxième partie est dédiée aux résultats obtenus en cas de carence en B12 qui ont permis de mieux comprendre les conséquences de

celle-ci sur les mécanismes moléculaires dans les cellules neuronales. La troisième partie consiste en une discussion de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Enfin, la dernière partie est une annexe détaillant les matériels et les méthodes utilisés.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Partie 1 : DONNEURS DE GROUPEMENTS METHYLES ET CYCLE DE MONOCARBONES

I. Le métabolisme des monocarbones et cycles associés

I.1. Le cycle de la méthionine (ou de l'homocystéine)

a. La méthionine

La méthionine (figure 1) est un acide aminé essentiel jouant un rôle dans la synthèse des protéines. Elle possède une fonction thioéther (-SCH_3).

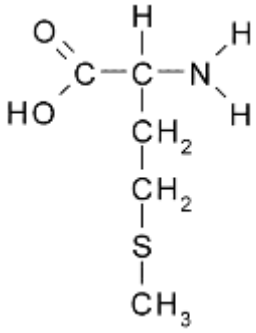


Figure 1 : Structure chimique de la méthionine.

Le groupement méthyle lié à l'atome de soufre peut être transféré. En effet, la méthionine adénosyltransférase (MAT) transfert un groupe adénosyl à la méthionine à partir de l'ATP pour former la S-adénosylméthionine (SAM) (figure 2).

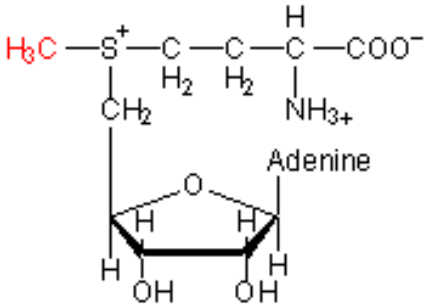


Figure 2 : Structure chimique de la SAM.

b. La SAM, la SAH et le rapport SAM/SAH

La SAM est le donneur universel de groupements méthyles. Elle est libérée dans le cytosol de la cellule. Dans le foie, 50% des apports quotidiens en méthionine sont convertis en SAM et 85% de réactions de méthylation y prennent place (Mudd & Poole, 1975). Durant la réaction de transméthylation, la SAM donne son groupement méthyle à une grande variété de molécules acceptrices (ADN, lipides, protéines, etc..) dans des réactions catalysées par des méthyltransférases et formant la S-adénosylhomocystéine (SAH) (figure 3).

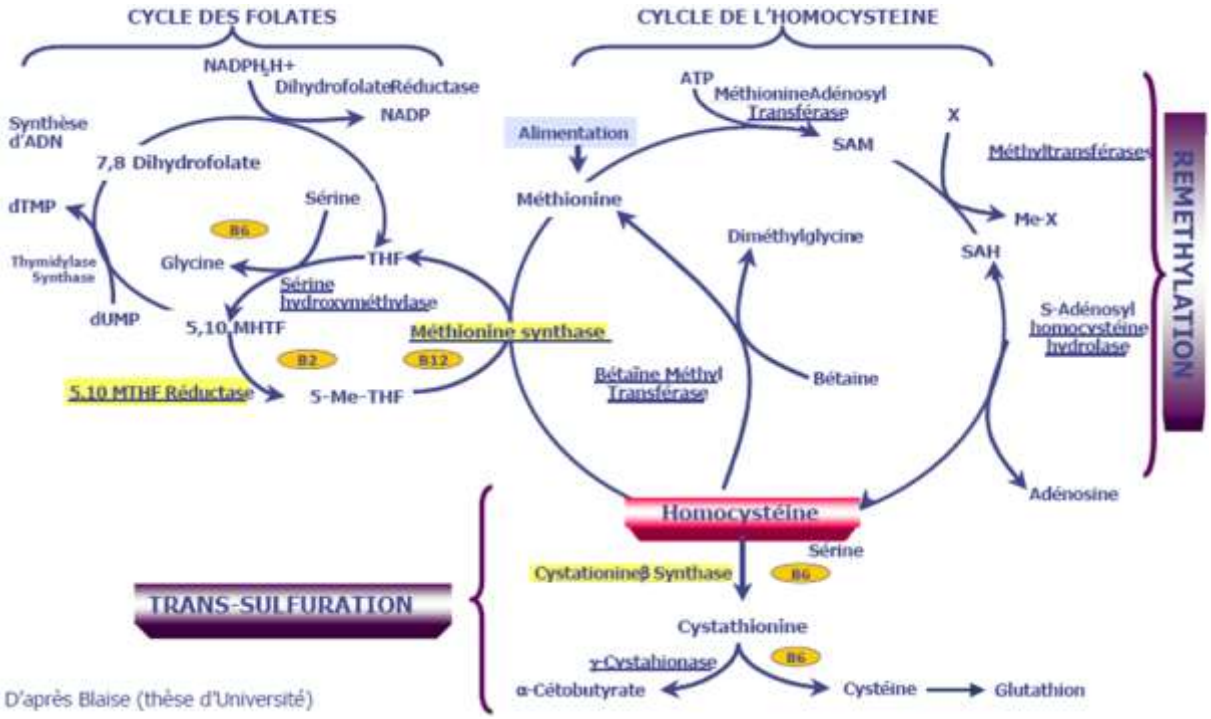


Figure 3 : Le cycle de l'homocystéine (ou méthionine), le cycle des folates, et la voie de transsulfuration (détaillés plus tard).

***THF**: Tétrahydrofolate; **DHF**: Dihydrofolate; **MTHF**: Méthylène-THF; **MeTHF**: Méthyl-THF; **SAM**: S-Adénosylméthionine; **dUMP**: Désoxyuracile-monophosphate; **dTMP**: désoxytymidine-monophosphate; **SAH**: S-adénosyl-homocystéine; **FAD**: Flavine-adénosine dinucléotide; **NADP**: Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate.*

La méthionine synthase (MS, MTR, E.C.2.1.1.13), ayant la méthylcobalamine comme cofacteur, catalyse la méthylation de l'homocystéine pour former la méthionine et le tétrahydrofolate. Le groupement méthyle provient du méthyl-tétrahydrofolate dont la synthèse est catalysée par la méthylène tétra-hydrofolate réductase (MTHFR).
Une fois, la méthionine formée, la méthionine-adénosyl-transférase (MAT, E.C.2.5.1.6) catalyse la synthèse de S-adénosyl-méthionine (SAM) en utilisant l'ATP. Tous les organismes possèdent une ou deux des trois isoformes de la MAT: MATI, MATII et MATIII (Chamberlin et al, 2000). Le transfert de groupements méthyles est catalysé par des méthyltransférases et induit la formation de la SAH. La SAM est également un inhibiteur allostérique de MTHFR, empêchant ainsi la reméthylation de l'homocystéine par une diminution de la synthèse de méthyl-tétrahydrofolate. La SAH formée sera convertie en homocystéine et en adénosine par la S-adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH, E.C.3.3.1.1). C'est la seule réaction réversible parmi toutes les réactions chimiques impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine. Elle est plus en faveur de la synthèse de SAH que de la synthèse de l'homocystéine.
En plus de la MS, il existe une autre enzyme nommée la bétaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT, E.C.2.1.1.5) capable de reméthyler l'homocystéine en méthionine. Cette dernière utilise la bétaïne (provenant de l'alimentation) comme donneur de groupements méthyles. Chez l'homme, la BHMT n'est exprimée qu'au niveau du foie et du rein et est donc moins importante que la MS (Sunden et al, 1997).

La SAH est ensuite hydrolysée par la SAH-hydrolase (SAHH) pour former l'homocystéine (Hcy) et l'adénosine. Il faut noter que la SAH est un puissant inhibiteur compétitif des réactions de méthylation (figure 4) et le métabolisme rapide de l'adénosine et de l'Hcy est nécessaire pour empêcher l'accumulation de SAH.

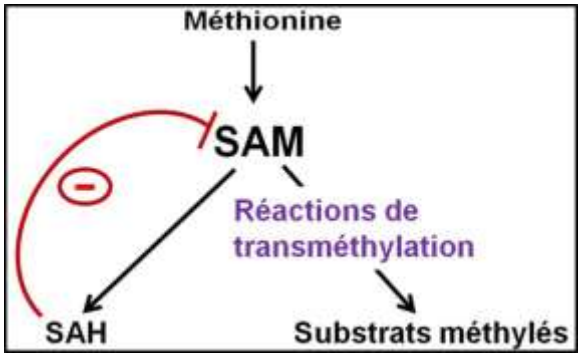


Figure 4 : La SAH est un inhibiteur des réactions de méthylation.

Le rapport SAM/SAH est un indicateur de la capacité de méthylation de la cellule. Plusieurs études ont montré que la diminution de SAM et l'augmentation de SAH dans le foie des rats nourris avec un régime pauvre en méthionine, choline, folates et vitamine B12 induisent des méthylations anormales impliquées dans la formation de cancers (Poirier et al, 1977; Shivapurkar & Poirier, 1983). De plus, cette diminution pourrait accélérer le processus de neurodégénérescence (Duan et al, 2002; Liu et al, 2000).

c. L'homocystéine

L'Hcy est un acide aminé soufré formé à partir de la méthionine (figure 5). Il n'intervient pas dans la synthèse protéique.

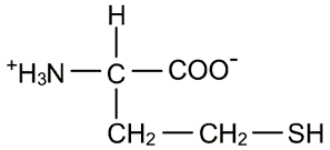


Figure 5 : Structure chimique de l'homocystéine.

L'Hcy est toxique pour la cellule (Boldyrev, 2009; Jakubowski, 2004). L'hyperhomocystéinémie est connue pour provoquer un stress oxydant (Hoffman, 2011) Son élimination est assurée par deux voies :

- la voie de la méthylation aboutissant à la synthèse de la méthionine et la SAM via la méthionine synthase (mécanisme détaillé dans le paragraphe II.1.2.1.a).
- la voie de la trans-sulfuration formant la cystathionine (détaillé dans le paragraphe suivant, figure 3).

Dans la cellule, le taux d'Hcy est maintenu constant (taux cellulaire de 1 µmol/L et taux plasmatique de 10 à 15 µmol/L) (Roblin et al, 2007a) grâce à l'autorégulation de ces deux voies. Cependant, plusieurs facteurs peuvent induire une hyperhomocystéinémie (Roblin et al, 2007a) comme par exemple une réduction de l'apport en vitamine B (B12, B9, B6).

I.2. La voie de la trans-sulfuration

L'Hcy a tendance à s'accumuler dans le sang et les tissus (Franken et al, 1996). Afin de dégrader cet acide aminé toxique, la cellule a besoin d'une réaction catalytique irréversible : « la trans-sulfuration ».

Cette voie consiste en une condensation entre l'Hcy et la sérine formant la cystathionine sous l'action de la cystathionine β-synthase (CBS, E.C. 4.2.1.22). Ensuite, la cystathionine est hydrolysée en cystéine et en α-cétobutyrate par la γ-cystathionase (figure 3). Ces deux dernières enzymes sont dépendantes du pyridoxal 5'- phosphate (PLP), la forme active de la vitamine B6.

Sachant que la cystéine formée donnera le glutathion (régulateur intracellulaire du statut redox), la voie de la trans-sulfuration est surtout active dans les tissus nécessitant une forte concentration de GSH (comme les neurones) (Dringen & Hamprecht, 1999).

I.3. Le cycle des folates

Nous avons indiqué que l'homocystéine peut être méthylée en méthionine par la méthionine synthase (mécanisme détaillé dans le paragraphe II.1.2.1.a). C'est au niveau du cycle des folates (figure 3) que cette réaction se déroule.

La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) réduit, grâce au $FADH_2$, le 5,10-méthylène tétrahydrofolate en N5-méthyltétrahydrofolate (N5-MeTHF). Cette réaction est irréversible *in vivo*.

Le groupement méthyle du N5-MeTHF est transféré à l'homocystéine pour devenir le tétrahydrofolate (THF). Le THF est transformé en N5,10-MeTHF par la sérine hydroxyméthyle transférase ayant la vitamine B6 (le pyridoxal phosphate ou PLP) comme coenzyme et la sérine comme donneur de méthyle (elle sera donc transformée en glycine). La N5,10-MeTHF donne ensuite le 7,8- dihydrofolate (7,8-DHF) grâce à la thymidylate synthase

et permet la synthèse de dTMP à partir de dUMP. La dihydrofolate réductase régénère le THF à partir du 7,8-dihydrofolate et de $NADPH,H^+$.

II. Les facteurs influençant le cycle des monocarbones

II.1 Les facteurs nutritionnels

II.1.1. Les folates (vitamine B9)

a. Définition et structure chimique

L'acide folique (nommé aussi acide ptéroylglutamique) est une vitamine hydrosoluble composée d'un noyau ptérine, d'un acide para-aminobenzoïque et d'une molécule d'acide glutamique (figure 6). La majorité des folates présents dans l'alimentation est constituée des polyglutamates (PG) qui consistent en un enchainement de plusieurs acides glutamiques. L'acide folique ne correspond pas à la forme physiologiquement active. Les formes actives sont les dérivés réduites des polyglutamates (dihydrofolates ou DHF, tétrahydrofolates ou THF) et les dérivés THF (méthylés (CH_3) ou formylés (CHO)) pouvant porter des radicaux carbonés sur les azotes N5 ou/et N10 (figure 7).

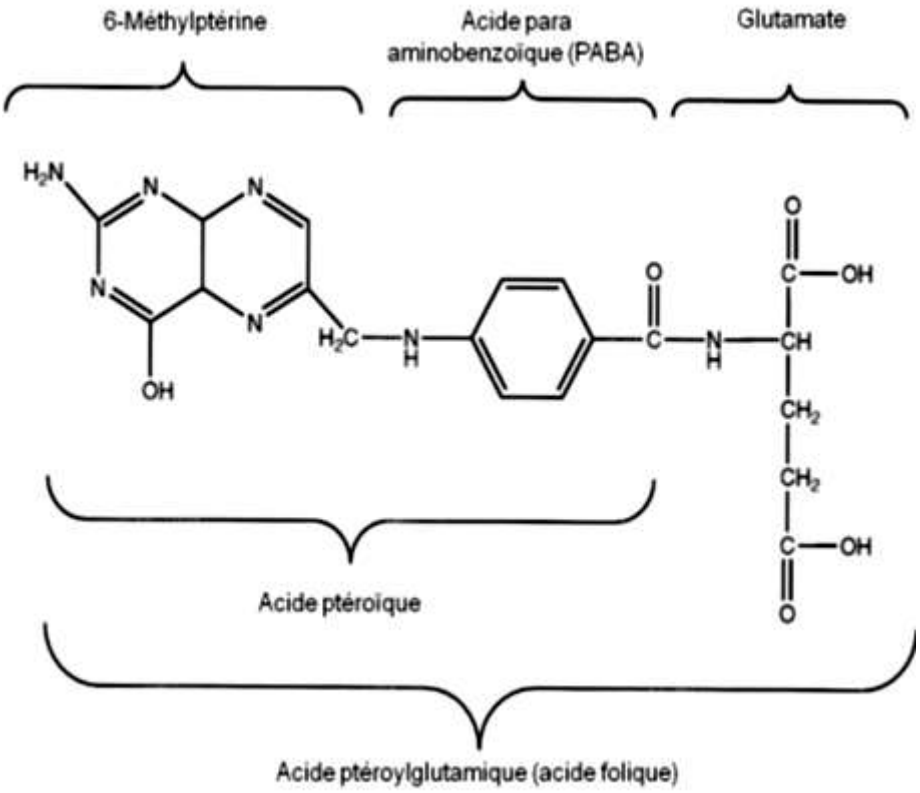


Figure 6 : La structure chimique des folates.

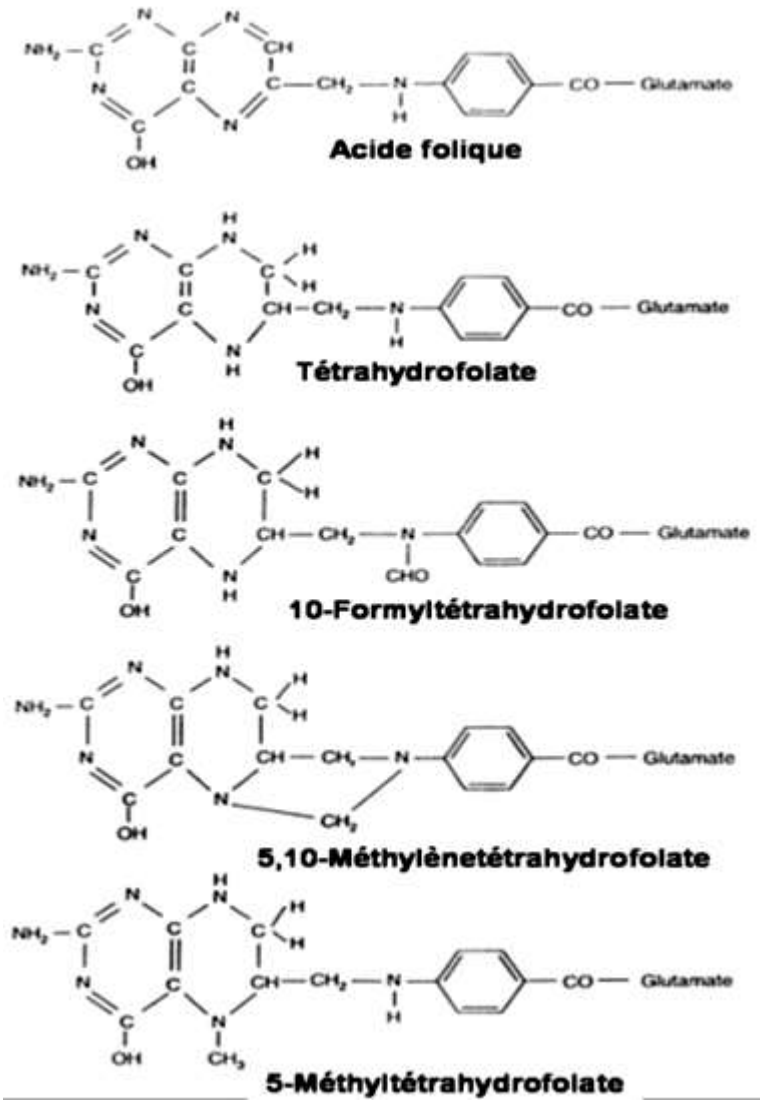


Figure 7 : La structure chimique de l'acide folique, tétrahydrofolate, 10-formyltétrahydrofoalte, N5,10- méthylènetétrahydrofolate, N5-méthyltétrahydrofolate (modifié d'après (Scott, 1999)).

b. Histoire

En 1931, des chercheurs trouvèrent que des extraits de levure pouvaient corriger une anémie macrocytaire chez la femme enceinte (Wills, 1931). Ensuite, en 1935, des anomalies sanguines chez des singes furent également corrigées par des extraits de levure, d'où le premier nom des folates qui fut la vitamine M (Monkey) (Day, 1935). Par la suite, quand les chercheurs voulurent isoler une substance unique, ils découvrirent qu'il s'agissait en fait de plusieurs composés : la folacine, la vitamine B9, et *Lactobacillus casei* factor.

L'origine du nom « folate » provient du latin folium qui signifie feuille parce que les différents composés ont été isolés à partir de feuilles d'épinard (Mitchell et al, 1988).

c. Nutrition

L'apport en folates est exclusivement alimentaire, l'organisme est incapable de les synthétiser. Plusieurs aliments constituent une source importante de folates, notamment le foie, les légumes à feuilles vertes foncées, les haricots, les germes de blé, les levures, le jaune d'oeuf, le lait et produits laitiers, les betteraves, le jus d'orange et le pain complet (Iyer & Tomar, 2009). Cependant, la teneur de cette vitamine diminue en cas de cuisson, de congélation et de mise en conserve. Les valeurs de l'apport nutritionnel conseillé (ANC) en France sont définies par tranche d'âge et en fonction de l'état physiologique dans le tableau 1.

Catégorie	**ANC 2001 (µg/j)**
Nourrissons	70
Enfants de 1 - 3 ans	100
Enfants de 4 - 6 ans	150
Enfants de 7 - 9 ans	150
Enfants de 10 - 12 ans	250
Adolescents de 13 - 15 ans	300
Adolescents de 15 - 19 ans	300
Hommes adultes	330
Femmes adultes	300
Personne âgée de plus de 75 ans	330-400
Femmes enceintes	400
Femmes qui allaitent	400

Tableau 1 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) en folates pour la population française. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 3ème édition, Ed. Tec & Doc.

d. Absorption

Dans les aliments, les folates existent sous forme de polyglutamates. L'enzyme intestinale appelée folylpolyglutamate carboxypeptidase (FGCP) ou γ-glutamyl hydrolase (GH) les catabolise en monoglutamates (Yao et al, 1996). Au niveau du jéjunum proximal de l'intestin grêle, les monoglutamates sont absorbés par le récepteur : « proton-coupled folate transporter » (PCFT) (Zhao et al, 2009). Ensuite, une partie sera méthylée et réduite en N5-MeTHF et passe dans la veine porte grâce à un système de transporteurs spécifiques (Rosenberg, 1990). Le transport des folates peut être plasmatique ou cellulaire (figure 8).

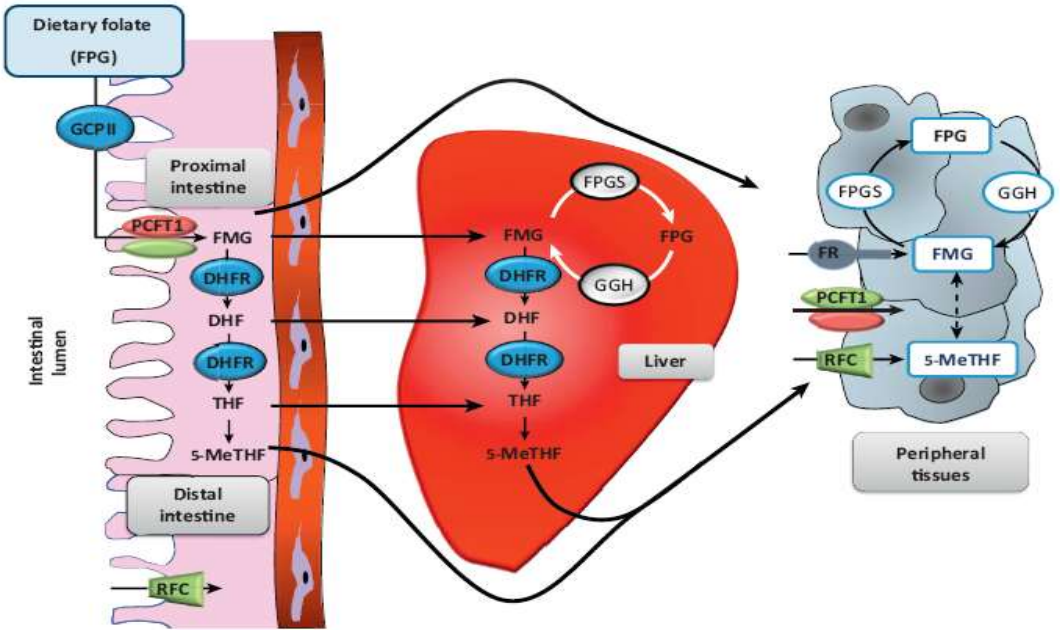


Figure 8 : Absorption et distribution des folates dans le foie et les tissus périphériques (d'après Gueant et al, 2013).

L'absorption des folates se fait au niveau du jéjunum, après hydrolyse en monoglutamate. C'est sous cette forme qu'ils traversent la barrière intestinale pour être acheminés vers le foie. Ce cycle constitue une voie importante de redistribution de l'acide folique aux tissus périphériques. Pour être métaboliquement active, la molécule de folate doit être réduite par l'enzyme dihydrofolate réductase en THF. Puis, la fixation des groupements méthyles en 5 et 10, conduit aux formes circulantes et actives (N5,10-MeTHF et N5-MeTHF). La molécule de 5-MeTHF véhiculée par le sérum doit être déméthylée en THF pour intégrer le cycle folique cellulaire et jouer son rôle de donneur de méthyles.

e. Transport

Dans le plasma, les monoglutamates, surtout sous forme de N5-MeTHF, vont se lier soit à un ligand de faible affinité, l'albumine, qui transporte les folates vers certains tissus comme le placenta et le fœtus, soit à un ligand de haute affinité, « Folate Binding Proteins Solubles » (S-FBP). Ce ligand sert à transporter les folates vers le foie qui contient la moitié de la quantité totale de folate de l'organisme.

Le transport cellulaire est réalisé par 3 systèmes de transport :

- Récepteur des folates réduits (RFC) : il est exprimé au niveau de l'intestin, du rein, dans les axones et les dendrites ainsi que dans la membrane apicale des cellules bordant le canal rachidien (Wang et al, 2001). Ce transporteur a une haute affinité pour les folates réduits (Assaraf & Goldman, 1997).
- Folate receptor (FR) : il est exprimé dans le cortex, le placenta, les glandes salivaires, l'utérus, le pancréas, les glandes bronchiques, les alvéoles pulmonaires. Il a été également retrouvé dans certaines lignées de cellules tumorales, Caco-2 (colon carcinoma), les cellules KB (epidermoid carcinoma) (Antony et al, 1985; Kane et al, 1986), et IGROV1 (ovarian carcinoma) (Weitman et al, 1992). Il a une forte affinité pour l'acide folique et le N5-MeTHF.
- Proton-coupled folate transporter » (PCFT) : il est exprimé dans les membranes apicales des cellules intestinales au niveau de jéjunum proximal, dans le rein, le foie, le placenta, la rétine et le cerveau (Qiu et al, 2006; Zhao et al, 2009). Il a une haute affinité pour l'acide folique.

f. Stockage et élimination

Les folates sont principalement stockés dans le foie, qui contient environ la moitié du stock de l'organisme (10 à 15 mg) surtout sous forme N5-MeTHF. En effet, le foie capte 10 à 20% des folates (principalement N5-MeTHF), le reste sera distribué aux autres tissus. Les réserves en folates permettent de subvenir aux besoins de l'organisme pendant quelques mois.

Les folates sont éliminés dans les selles et dans les urines.

g. Le rôle des folates

Les folates jouent plusieurs rôles importants :

(A) La synthèse des acides aminés : la conversion de l'histidine en acide glutamique nécessite le THF qui sera transformé en N5,10-MeTHF.

(B) La synthèse des acides nucléiques : la synthèse de la thymine, base pyrimidique nécessaire à la synthèse d'ADN, nécessite l'action de l'enzyme thymidylate synthase ayant le N5,10-MeTHF comme coenzyme (Carreras & Santi, 1995). De plus, au

niveau de la synthèse des bases puriques, le N5,10-MeTHF et le N10-formylTHF forment les 2ème et 8ème atomes de carbone du noyau purine.

(C) La conversion sérine-glycine : elle s'effectue, sous l'action de la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT), à partir de la sérine et du N5,10-MeTHF pour donner la glycine et le 5-formylTHF (Matthews et al, 1982).

(D) La synthèse de la méthionine : la méthionine synthase transfert le groupement méthyle du N5-MeTHF vers l'homocystéine. Cette réaction aboutit à la régénération du THF et à la formation de la méthionine.

h. La carence en folates

La carence en folate est répandue dans les pays non développés et développés mais pour différentes raisons.

Avant 1998, 16 à 20% des Américains étaient carencés en folates. Une fortification en acide folique des céréales et des farines alimentaires a donc été mise en place.

Les causes de la carence en folates sont : une carence d'apport ou une cuisson excessive des aliments, un métabolisme anormal, une malabsorption, des besoins en folates augmentés (femmes enceintes, lactation), l'alcoolisme.

La carence en folates entraîne de nombreux troubles comme l'anémie mégaloblastique, des malformations congénitales, des troubles neurologiques, des *Spina bifida* (Scott, 2001; van der Put & Blom, 2000), des maladies cardiovasculaires (Gerhard & Duell, 1999; Ueland et al, 2000). Cette carence est associée à l'accumulation de l'homocystéine toxique. La reméthylation de l'homocystéine étant bloquée, celle-ci s'accumule et provoque une hyperhomocystéinémie.

i. Folates et programmation fœtale

Les folates jouent un rôle clé dans les interactions entre la nutrition, la programmation fœtale et l'épigénomique (Gueant et al, 2013). Des expérimentations et des évidences basées sur des études de la population montrent que les folates influent sur les mécanismes épigénétiques et épigénomiques notamment la programmation fœtale, ainsi que le retard de la croissance intra-utérine et le développement du cerveau embryonnaire (Forges et al, 2007; Stover, 2011).

La carence en folates pendant la grossesse produit des effets indésirables ayant un impact sur la santé publique mondiale (Forges et al, 2007). En effet, les folates sont essentiels pour le développement du fœtus (Antony, 2007; Kim et al, 2009; Smith et al, 2008) et le statut

maternel en folates influence la méthylation d'ADN et d'ARN des embryons ainsi que l'expression des gènes soumis à empreinte chez les jeunes rongeurs (Gueant et al, 2013).

Des jeunes rats issus d'une mère carencée en folates, présentent plusieurs perturbations de la programmation fœtale. En effet, cette carence induit chez les jeunes rongeurs une stéatose cardiaque et hépatique (Blaise et al, 2007; Garcia et al, 2011; Pooya et al, 2012; Gueant et al, 2013), un décès fœtal ou prématuré, un syndrome de down, des malformations congénitales notamment des malformations du tube neural ainsi que des cardiopathies congénitales (Blom & Smulders, 2011; Gueant et al, 2003; Weingartner et al, 2007). Elle est également associée à une N -homocystéinylation des protéines structurales de l'estomac, une inflammation et une apoptose des cellules gastriques (Bossenmeyer-Pourié et al, 2013).

La programmation fœtale joue également un rôle important au niveau des troubles du cerveau. En effet, la carence en folates des mères affecte la prolifération des cellules neuronales des petits, la migration, la différenciation, la survie, le transport vésiculaire et la plasticité synaptique et ceci suite à des effets épigénomiques et une augmentation dramatique de la N-homocysteinylation des protéines neuronales (Akchiche et al, 2012; Blaise et al, 2009; Kruman et al, 2005; Zhang et al, 2009). Elle produit des difficultés d'apprentissage, des problèmes cognitifs et une faible coordination locomotrice suite à une accumulation d'Hcy, une réduction du rapport SAM/SAH et une augmentation de l'apoptose surtout au niveau du cervelet et du l'hippocampe qui se trouve atrophié (Blaise et al, 2007; Daval et al, 2009; Gueant et al, 2013). La carence en folates et en vitamine B12 est liée à l'apparition des maladies neurodégénératives, un déclin cognitif lié à l'âge et des troubles neuropsychiatriques (Gueant et al, 2013).

II.1.2. La vitamine B12 ou cobalamine

a. Définition

La Cobalamine (Cbl) ou vitamine B12 est une vitamine hydrosoluble. Elle a une structure chimique proche de l'hème, l'atome central de fer étant remplacé par un atome de cobalt, d'où son nom. A l'état naturel, elle existe sous forme de cristaux ou de poudre cristalline de couleur rouge foncé, due au cobalt.

b. Histoire

En 1925, George Whipple a montré que le foie de veau peut corriger certaines anémies. En 1926, George Minot et William Murphy (prix Nobel de médecine en 1934) ont confirmé que le foie est capable d'interrompre l'évolution progressive de l'anémie pernicieuse. Ensuite, en

1948, Karl Folker du laboratoire Merck et Lester Smith du laboratoire Glaxo ont isolé la vitamine B12 à partir du foie. Ceci a bouleversé la thérapie de l'anémie par l'ingestion de quelques microgrammes d'un composé cristallin rouge (Rickes et al, 1948; Smith, 1948) au lieu de plusieurs grammes de foie cru.

En 1956, Dorothy Hodgkin a identifié sa configuration tridimensionnelle (Prix Nobel de chimie en 1964) (Hodgkin et al, 1956). Les transporteurs liant la B12 sont toujours recherchés. Parmi ces structures, le facteur intrinsèque (IF) qui est un accepteur de la B12 et indispensable à son absorption. L'IF a été décrit par Castle et purifié par R. Gräsbeck en 1965 (Grasbeck et al, 1965).

c. Nutrition

L'organisme humain ne synthétisant pas la vitamine B12, l'apport alimentaire est donc indispensable. Elle est principalement présente dans les aliments d'origine animale comme le foie, la viande, les volailles, le jaune d'œuf, les poissons et les crustacés.

Les apports conseillés en vitamine B12 sont très faibles, environ 2 microgrammes par jour chez l'adulte. Les besoins sont variables selon les périodes de la vie. Le tableau suivant récapitule les apports nutritionnels conseillés pour les différentes catégories d'âge.

Tableau 2 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) en vitamine B12 pour la population française. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 3ème édition, Ed. Tec & Doc.

Catégorie	ANC 2001 (µg/j)
Nourrissons	0,5
Enfants de 1 - 3 ans	0,8
Enfants de 4 - 6 ans	1,1
Enfants de 7 - 9 ans	1,4
Enfants de 10 - 12 ans	1,9
Adolescents de 13 - 15 ans	2,3
Adolescents de 15 - 19 ans	2,4
Hommes adultes	2,4
Femmes adultes	2,4
Personne âgée de plus de 75 ans	3
Femmes enceintes	2,6
Femmes qui allaitent	2,8

d. Structure chimique

La vitamine B12 est une molécule organométallique volumineuse. Elle a une structure chimique proche de l'hème mais l'atome central de fer y est remplacé par un atome de cobalt. L'atome de cobalt peut être tri-, bi- ou monovalent (correspondant à 3 niveaux d'oxydation) : Cob(I)alamine, Cob(II)alamine, Cob(III)alamine. La cobalamine appartient à une classe de composés complexes appelés corrinoïdes. La molécule de corrinoïde est constituée de trois parties (figure 9) : un noyau tétrapyrrolique central appelé noyau corrine et deux chaînes axiales, l'une en position α avec un groupement pseudo-nucléotidique diméthylbenzimidazole (DMB) et l'autre un radical anionique variable X en position β qui détermine le nom du composé vitaminique (CN pour cyanocobalamine (forme circulante), OH pour hydroxocobalamine (forme circulante), CH_3 pour méthylcobalamine (cofacteur de réactions de reméthylation en particulier dans la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine) et 5'd Ado pour 5'- désoxyadénosylcobalamine (cofacteur de la méthylmalonyl CoA mutase).

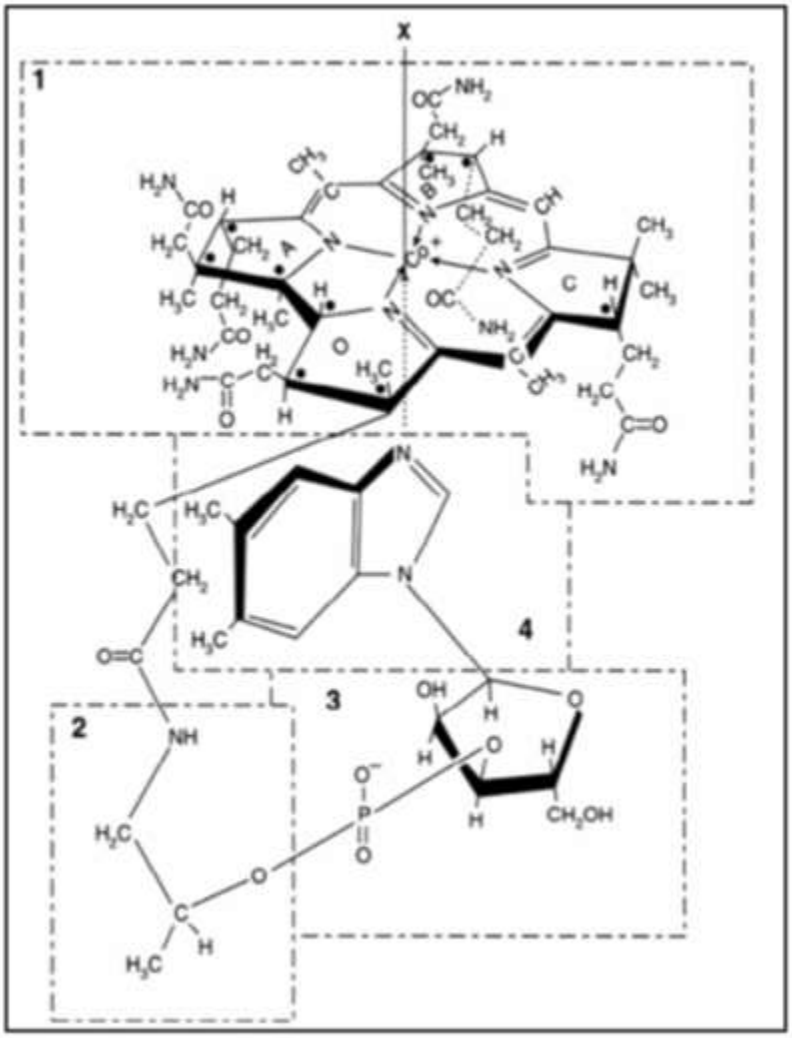


Figure 9: Structure chimique de la vitamine B12 (Modifié d'après Gueant & Namour, 2003).

(1) Groupe tétrapyrrole, (2) amino-1-propanol-2, (3) Groupe ribose-3'-phosphate, (4) Groupe 5,6-diméthylbenzimidazole.

e. Absorption

Le processus d'absorption de la cobalamine (Cbl) est complexe et nécessite l'intervention de plusieurs composés capable de lier la vitamine B12 (figure 10).

Au moment de l'ingestion des aliments, la majorité des Cbl reste attachée aux protéines alimentaires, principalement sous forme d'AdoCbl et de MeCbl. Dans la bouche, les haptocorrines salivaires prennent en charge les Cbl libres. Ensuite, les sécrétions chlorohydropepsiques de l'estomac libèrent la Cbl des protéines alimentaires. En raison du pH acide du suc gastrique, la Cbl va préférentiellement se lier à l'haptocorrine et elle passe au duodénum sous cette forme (Allen et al, 1978). A ce niveau, les haptocorrines sont dégradées par les enzymes pancréatiques exocrines (Russell-Jones & Alpers, 1999). De nouveau libre dans un environnement plus alcalin, la Cbl va pouvoir se complexer au facteur intrinsèque (IF) (Nicolas & Gueant, 1994). L'IF est une glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales de l'estomac, qui va permettre à la cobalamine de franchir la barrière intestinale au niveau iléal (Ganesan et al, 2002). En se liant à la vitamine B12, l'IF se dimérise ce qui lui confère une meilleure résistance à la protéolyse et en même temps protège la vitamine B12 du catabolisme par les bactéries intestinales (Combs, 1998). Le complexe IF-vitamine B12 va se fixer sur un récepteur spécifique de la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'iléon appelé cubam formé de la cubiline associée à la protéine amnionless (Gueant et al, 1988). Une fois internalisé, le complexe va traverser la paroi du tube digestif par endocytose et l'IF est dégradé dans l'entérocyte libérant ainsi la vitamine B12. Pour pénétrer dans le cytoplasme, la B12 traverse la membrane lysosomale par un processus impliquant les protéines LMBD1 et ABCD4 (ATP-binding cassette (ABC) transporter D4), localisée au niveau de la membrane du lysosome (Coelho et al, 2012; Rutsch et al, 2009).

Dans le sang, la vitamine B12 est sous une forme liée à une protéine : la transcobalamine II (TCII) (Nicolas & Gueant, 1994; Seetharam et al, 1999; Seetharam & Li, 2000). Seulement 10-30% de la cobalamine se lie à la TCII, alors que la majorité se lie à l'haptocorrine (Fernandes-Costa & Metz, 1982).

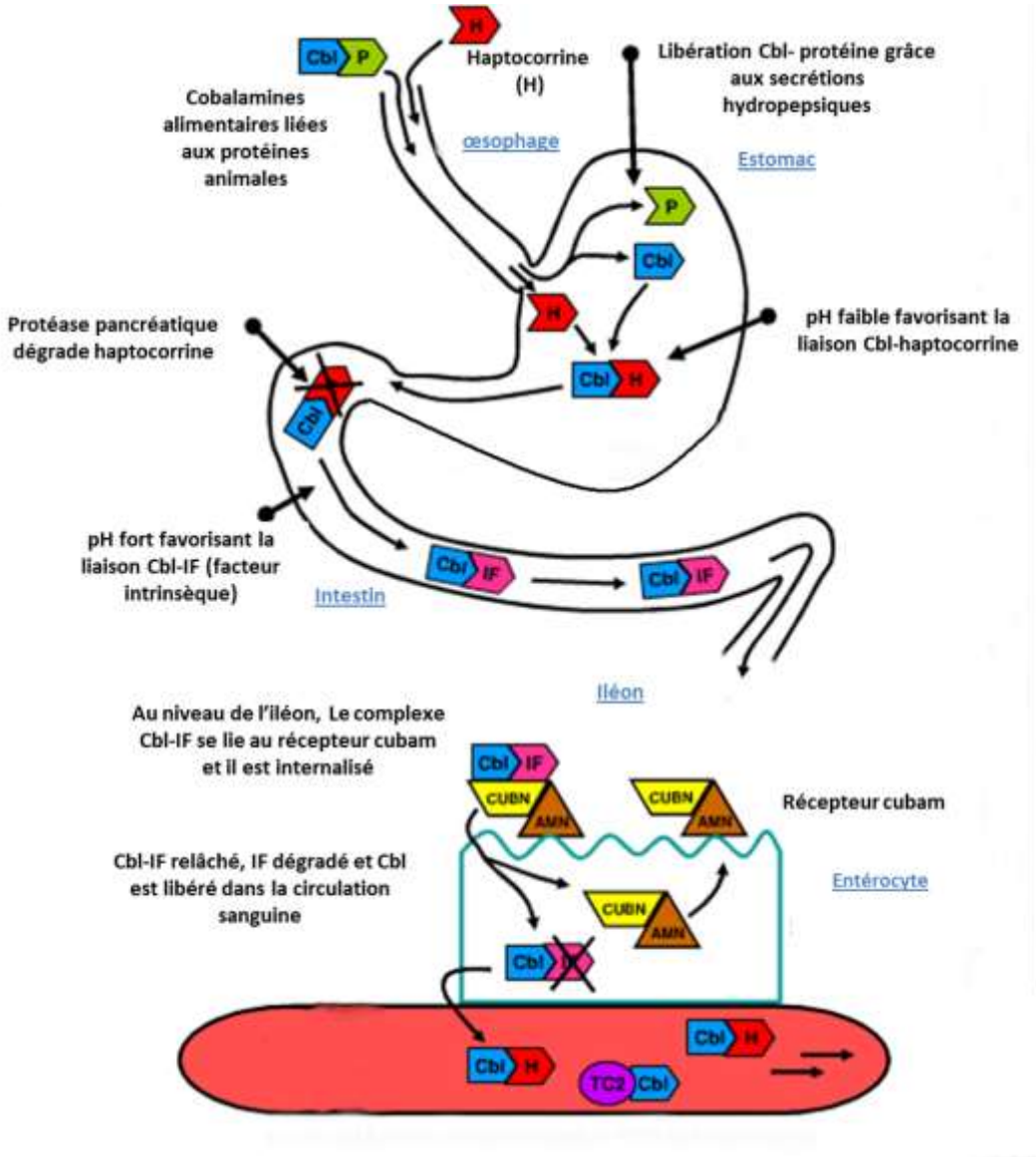


Figure 10 : Mécanisme d'absorption de la vitamine B12 (modifié d'après (Tanner et al, 2012).

H : haptocorrine ; IF : facteur intrinsèque; Cbl : cobalamine; TC2 : transcobalamine II.

f. Transport

Dans le sang, la vitamine B12 est toujours liée à des protéines de transport spécifiques, la transcobalamine II ou l'haptocorrine, qui assurent l'internalisation dans les cellules grâce à un phénomène d'endocytose qui s'opère au niveau des récepteurs membranaires (Seetharam et al, 1999). La Cbl liée à l'haptocorrine est absorbée par les hépatocytes via le récepteur de l'asialoglycoprotéine (donc elle est indisponible aux autres cellules).

Le complexe Cbl/ TCII, circule dans le sang, se fixe par sa partie protéique à un récepteur d'endocystose membranaire spécifique (le récepteur mégalin pour les reins et le CD320 pour le foie et les autres tissus (Cho et al, 2008; Jiang et al, 2013; Nielsen et al, 2012) et pénètre

dans la cellule. La partie protéique (transcobalamine) est dégradée dans le lysosome et la vitamine B12 est libérée (Lildballe et al, 2012). Elle quitte alors les lysosomes et est transformée en coenzymes actifs :

(A) Méthylcobalamine (MeCbl), coenzyme de la méthionine synthase, au niveau du cytoplasme.

(B) Adénosylcobalamine (AdoCbl), coenzyme de la méthylmalonyl –CoA mutase, au niveau de la mitochondrie.

g. Stockage et élimination

La vitamine B12 est essentiellement stockée dans le foie, le cœur et la rate. Le foie humain comporte approximativement 50% du stock (Le Grusse et Watier, 1993*)* correspondant à 2 à 3 mg. Ceci constitue une réserve utilisée par l'organisme pendant 3 à 5 ans car les besoins en vitamine B12 ne constituent que 3 à 4 µg/jour et les apports quotidiens sont importants lors d'une alimentation normale.

Chez l'homme, l'élimination quotidienne de la vitamine B12 est de 2 à 5 µg (McDowell, 2000). Elle est assurée par la bile, la voie fécale et les urines.

h. Métabolisme cellulaire

Nous avons déjà indiqué que la Cbl est convertie en deux dérivés biologiquement actifs, AdoCbl et MeCbl.

En effet, une fois la cobalamine libérée de la TCII, elle est délivrée à la cobalamine adénosyltransférase dans la mitochondrie (Yamanishi et al, 2005) ou à la méthionine synthase dans le cytoplasme (Kapadia, 1995).

Au niveau mitochondrial, la cobalamine adénosyltransférase en conjonction avec une cobalamine réductase non identifiée à l'heure actuelle, catalyse la réduction de la cobalamine en AdoCbl. Cette dernière, étant un coenzyme de la méthylmalonyl-CoA mutase, intervient dans la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA (Krautler, 2005) qui va intégrer le cycle de Krebs et participer à la néoglucogenèse. Le blocage de la méthylmalonyl-CoA mutase, suite à un déficit en cobalamine, entraîne une acidurie méthylmalonique (Grutzner et al, 2013).

Au niveau cytoplasmique, grâce à la méthionine synthase (MS), le groupement méthyle du N5- méthyltétrahydrofolate (N5-MeTHF) est transféré à la Cbl pour donner la MeCbl et le tétrahydrofolate (THF). Ensuite, la MeCbl transfère son groupement méthyle à l'homocystéine pour former la méthionine. La carence en vitamine B12 entraîne une

accumulation du N5-MeTHF ce qui induit une diminution du THF et donc une réduction de la synthèse de thymidylate nécessaire à la synthèse d'ADN.

i. Les défauts du métabolisme de la vitamine B12

L'étude du métabolisme intracellulaire de la cobalamine a abouti à la définition de 9 défauts génétiques, CblE, CblG, CblA, CblB, CblF, CblJ, CblC, CblD et Mut. Ces défauts surviennent par mutation de gènes distincts impliqués dans le transport et le métabolisme de la vitamine B12 (figure 11) et ils peuvent être classés en trois catégories :

- défauts génétiques affectant uniquement la synthèse de la MeCbl : défauts des gènes *MTR* (CblG) et *MTRR*, (CblE). La méthionine synthase réductase MTRR est impliquée dans la régénération de la MS oxydée. Ces deux défauts provoquent une homocystinurie.
- défauts génétiques affectant uniquement la synthèse de l'AdoCbl : défauts des gènes *MMAA* (CblA) et *MMAB* (CblB). Ces défauts provoquent une acidurie méthylmalonique. En effet, la protéine MMAA est nécessaire à la stabilité et à l'activité de la protéine MMAB qui se lie à la vitamine B12 et fonctionne en tant d'ATP : cob(I)alamine adénosyltransférase.
- défauts génétiques affectant la synthèse de la MeCbl et de l'AdoCbl : défauts des gènes *LMBRD1* (CblF), *ABCD4* (CblF), *MMACHC* (CblC) et *MMADHC* (CblD). Ces défauts provoquent une homocystinurie et une acidurie méthylmalonique (Coelho et al, 2008; Watkins & Rosenblatt, 1989; Watkins & Rosenblatt, 2011). Les défauts de *LMBRD1* et *d'ABCD4* inhibent le passage de la vitamine B12 du lysosome vers le cytoplasme (Kim et al, 2012b). MMACHC se lie à la CNCbl, clive le groupement CN et forme le complexe MMACHC-cob(II)alamine (Kim et al, 2008b). La protéine MMADHC interagit avec MMACHC. Suivant leur nature et leur localisation, les mutations du gène *MMADHC* peuvent provoquer les trois phénotypes (Stucki, Coelho et al, 2012).

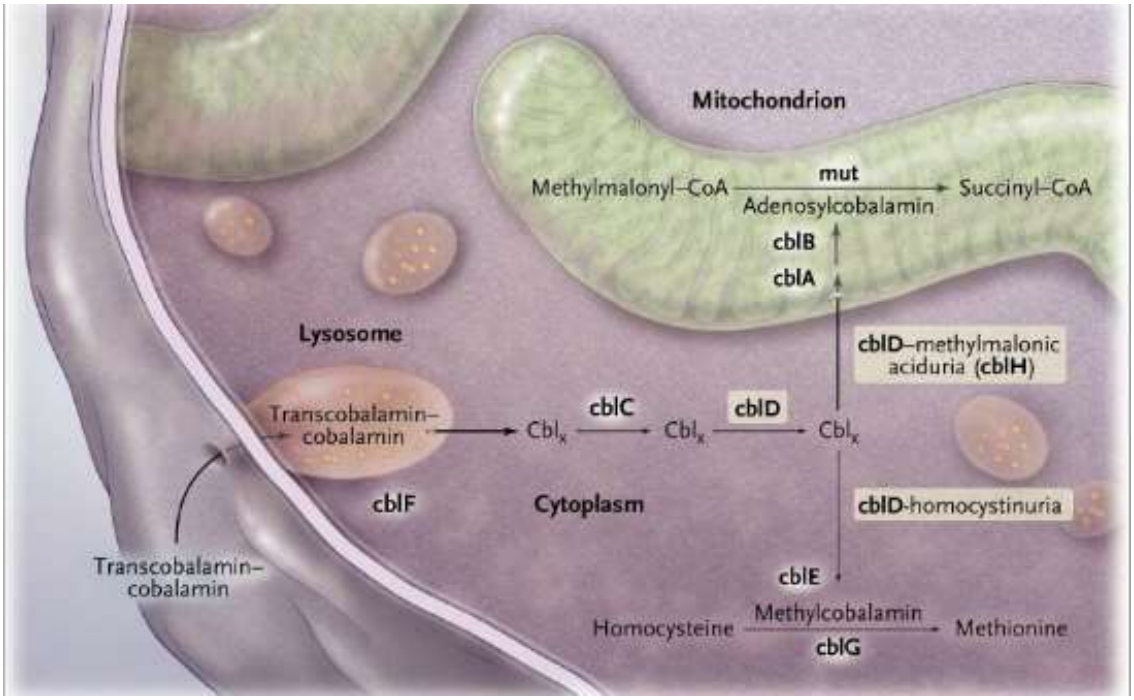


Figure 11: Défauts du métabolisme de la cobalamine d'après (Coelho et al, 2008).

À ce jour, neuf défauts de la voie du métabolisme de la cobalamine ont été décrits. La cobalamine liée à la transcobalamine pénètre dans la cellule par endocytose. Le transport de la B12 libérée du lysosome dans le cytoplasme est défectueux chez les patients atteints du défaut CblF et CblJ (Kim et al, 2012b). Les étapes dans le cytosol après la libération lysosomale sont encore mal connues (CblC et CblD) et la forme exacte de la cobalamine à ce stade n'est pas claire (indiqué par "CBL_X"). Dans le cytoplasme, l'homocystéine est transformée en méthionine sous l'action de la méthionine synthase utilisant la méthylcobalamine (CblE, CblG). Après son transport dans la mitochondrie, la cobalamine est convertie en adénosylcobalamine, cofacteur pour la méthylmalonyl-CoA mutase (mut), par la cobalamine adénosyl-transférase (CblB). Le rôle exact de la protéine associée au groupe CblA n'est pas clair. La protéine CblD constitue un point de branchement entre les voies cytosoliques et mitochondriales.

II.1.2.1 Implication de la vitamine B12 dans le cycle des monocarbones

a. La méthionine synthase (MTR, MS, EC 2.1.1.13)

1. Généralités

La méthionine synthase (MS) est une enzyme cytoplasmique ayant la vitamine B12 ou MeCbl comme cofacteur. Elle transfert le groupement méthyle du N5-MeTHF vers l'homocystéine toxique pour générer la méthionine et le tétrahydrofolate (THF). Cette réaction de transméthylation est importante car ses produits interviennent dans 2 cycles métaboliques: le cycle de la méthionine et celui des folates. De plus, cette réaction élimine l'homocystéine cellulaire connu comme un facteur de risque pour les maladies cardio-vasculaires (Refsum & Ueland, 1998), la fermeture du tube neural ou *Spina Bifida* (Mills et al, 1995), la maladie d'Alzheimer (Clarke et al, 1998) et le parkinson (Allain et al, 1995; Kuhn et al, 1998).

2. Le gène

Chez l'homme, le gène de la MS se situe sur le chromosome 1 en position 1q43. La région codante du gène *MTR* humain est composée de 33 exons et de 32 introns. Le premier ATG (+1) est localisé dans l'exon 1. Le gène code pour une protéine de 1265 acides aminés.

De plus, l'ARNm de la MS peut subir l'épissage alternatif. Trois isoformes sont identifiées (Fofou-Caillierez et al, 2013; Muratore et al, 2013):

- MS non épissée.
- variant dépourvu des exons 16-18 (absence du domaine de liaison aux folates).
- variant dépourvu des exons 16-20 (absence du domaine de liaison au folates et du celui de la coiffe).

Chez la souris, le gène de la MS est au niveau du chromosome 13 en position 13 4.52 cM. Sa région codante est composée de 33 exons et 33 introns. Le premier ATG se situe dans l'exon 2. Le gène code pour une protéine de 1253 acides aminés.

3. La protéine

La méthionine synthase est une protéine cytoplasmique, principalement exprimée dans le muscle squelettique, le pancréas, le cœur, la prostate, les ovaires, les testicules, le thymus et le petit intestin.

La conversion détaillée est schématisée dans la figure 12.

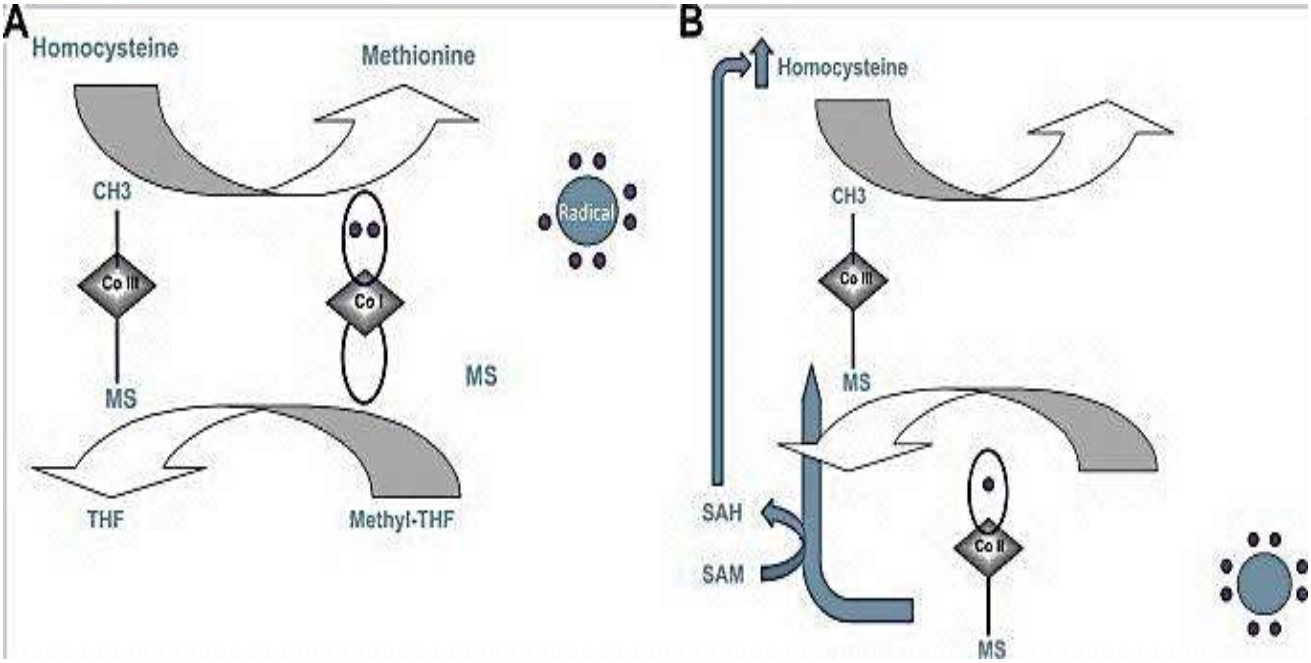


Figure 12: Conversion de l'Hcy en méthionine et de N5-MeTHF en THF par la MS (d'après McCaddon, 2013).

A: La méthionine synthase couplée à la méthyl-cob (III) alamine transfère son groupement méthyle à l'homocystéine pour donner la méthionine et elle génère un intermédiaire transitoire cob (I) alamine. La MS couplée à la méthyl-cob (III) alamine est régénérée lorsque la cob (I) alamine accepte un groupement méthyle de la méthyl-tétrahydrofolate générant la tétrahydrofolate libre. En effet, la cob (I) alamine est vulnérable à l'oxydation par les radicaux libres.

B: L'inactivation de la MS se produit lorsque les radicaux libres oxydent la cob (I) alamine en cob (II) alamine. Sa réactivation nécessite la présence de la SAM, le donneur universel de méthyles. Le stress oxydant induit donc une augmentation de l'homocystéine.

4. La régulation de la MS

Le principal facteur régulant l'expression de la MS est la vitamine B12.

En effet, la vitamine B12 interagit avec un site interne d'entrée des ribosomes (IRES) situé dans la région 5' non codante du transcrit (Oltean & Banerjee, 2005) et stimule la traduction de la MS.

De plus, la région 5' de la MS humaine présente deux uORFs (upstream open reading frames). La mutation de premier et/ou de deuxième uORF inhibe la traduction de la MS (Col et al, 2007).

b. La méthylmalonylcoenzyme A mutase (MCM, Mut, EC 5.4.99.2)

1. Généralités

La méthylmalonylcoenzyme A mutase est une enzyme mitochondriale permettant la conversion du méthylmalonyl-CoA (MMA) en succinyl-CoA en présence de la vitamine B12. En cas de déficit en vitamine B12, l'inactivation de la Mut provoque l'accumulation du MMA toxique ce qui peut contribuer au dysfonctionnement neurologique, agir comme une substance neurotoxique chronique. Il peut aussi altérer le métabolisme énergétique dans le Système Nerveux Central (SNC) (Okun et al, 2002).

2. Le gène

Le gène de la Mut humaine est localisé sur le chromosome 6 en position 6p12.3 alors que chez la souris, il est localisé au niveau du chromosome 17 en position 17 19.55 cM. Sa région codante est formée de 13 exons et 13 introns. Le premier ATG (+1) est dans l'exon 2. Le gène humain code pour une protéine de 750 acides aminés, celui de la souris code pour une protéine de 748 acides aminés.

3. La protéine

La protéine Mut présente dans la mitochondrie est nécessaire pour l'isomérisation du méthylmalonylcoenzyme A en succinylCoA.

Le cofacteur de cette enzyme est l'adénosylcobalamine (AdoCbl). C'est la cobalamine adénosyltransférase en conjonction avec une cobalamine réductase, non identifiée à l'heure actuelle, qui catalyse la réduction de la cobalamine en cob(I)alamine et la réaction de la cob(I)alamine avec l'ATP pour former l'AdoCbl (Banerjee et al, 2009; Padovani et al, 2008).

Le succinyl-CoA formé intègre le cycle de Krebs. Cette réaction se situe dans la matrice mitochondriale. Elle intervient dans le catabolisme des acides gras saturés à nombre de carbone impairs, celui des aminoacides ramifiés, et celui du cholestérol (Chowdhury & Banerjee, 1999).

4. La régulation de l'expression de Mut

L'expression de Mut est régulée par plusieurs facteurs.

En effet, le promoteur contient des séquences caractéristiques, des éléments régulateurs dont les boites CCAAT, les éléments de réponse à l'AMP cyclique et des sites potentiels de liaison à l'AP-2 ainsi que des éléments impliqués dans la coordination de l'expression des protéines mitochondriales nucléaires (Wilkemeyer et al, 1993).

II.1.2.2 La carence en vitamine B12

a. Déficit d'apport

Sachant que la vitamine B12 est majoritairement trouvée dans l'alimentation d'origine animale, la carence en B12 est plus fréquente dans les pays sous-développés où la consommation d'aliments d'origine animale n'est pas suffisante. Dans les pays industrialisés, les carences d'apport sont principalement trouvées chez les sujets végétaliens.

b. Défaut d'absorption

La carence en vitamine B12 peut être due à une malabsorption de B12 ou à des maladies digestives. Par exemple, l'anémie pernicieuse de Biermer est une maladie auto-immune, dans laquelle des auto-anticorps sont dirigés contre les cellules pariétales gastriques produisant l'IF (62% des patients) et contre le facteur intrinsèque (87,5% des patients), conduisant à une incapacité d'absorption de la cobalamine alimentaire.

On observe aussi une carence chez les personnes ayant des gastrectomies totales ou partielles, des maladies chroniques intestinales (maladie de Crohn, colite ulcéreuse, maladie coeliaque) (Akbulut et al, 2010; Headstrom et al, 2008; Murray, 1999), des maladies parasitaires (Stabler & Allen, 2004) comme par exemple la *Giardia lamblia* qui provoque des diarrhées chroniques et des syndromes de malabsorption (Stabler & Allen, 2004).

Les déficits congénitaux du métabolisme de la vitamine B12 sont liés à un déficit en TCII ou IF (maladie d'Imerslund-Gräsbeck) (Tanner et al, 2004).

c. Conséquences de la carence en B12

La carence en B12 induit une diminution de l'activité des enzymes Cbl-dépendante : la méthionine synthase et la méthylmalonylcoenzyme A mutase (Allen et al, 1990). Ceci entraine une accumulation de l'acide méthylmalonique (MMA) et de l'Hcy dans le sang et les urines.

Cliniquement, on retrouve des troubles neurologiques (polynévrites sensitives, ataxie, sclérose combinée de la moelle), hématologiques (macrocytose, anémie mégaloblastique) et digestifs (glossite de Hunter).

Il faut noter que la plupart de ces pathologies peuvent être associées également à des carences en folates combinées ou non avec une carence en vitamine B12.

d. Perturbation de l'interaction entre la vitamine B12 et les folates

La carence en vitamine B12 ne perturbe pas seulement le cycle de la méthionine mais aussi le cycle des folates, et ceci pour deux raisons :

1- perte de l'inhibition allostérique de la MTHFR (Methylène THF réductase) par la SAM : la carence en vitamine B12 provoque une diminution de la méthionine et donc de la SAM. Sachant que la SAM est un effecteur allostérique de la MTHFR, la diminution de la SAM induit une baisse de l'inactivation de la MTHFR. Le N5,10-MeTHF sera converti en N5-MeTHF en abondance. Il y'aura donc une accumulation de N5-MeTHF, un métabolite inactif et une diminution de N5,10-MeTHF, un métabolite actif..

2- Folate trap ou piège des folates : Au cours du cycle des folates, le N5-MeTHF est régénéré en N5,10-MeTHF actif par un transfert du groupement méthyl vers la cobalamine lors de la synthèse de MeCbl, catalysée par la methionine synthase. La carence en vitamine B12 empêche cette réaction de régénération des folates qui se trouvent piégés sous la forme de N5-MeTHF.

Le taux du N5,10-MeTHF diminué inhibe la conversion de dUMP en dTMP (figure 13). L'accumulation de dUMP favorise son incorporation excessive dans l'ADN qui devient plus instable. L'incorporation de dUMP favorise les cassures de brin.

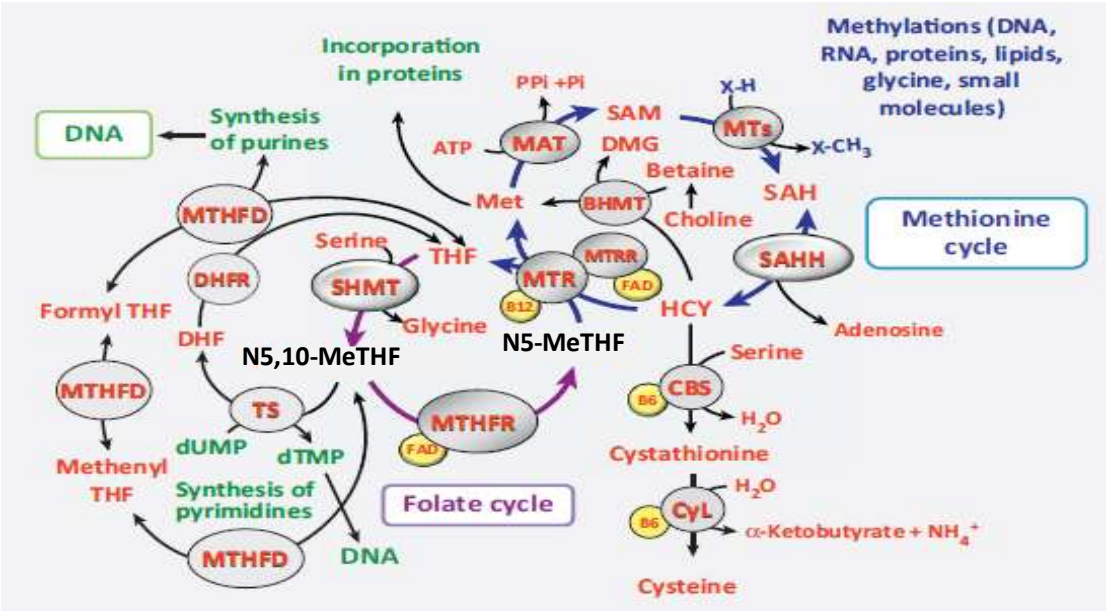


Figure 13 : Lien entre cycle de folates et cycle de la méthionine modifié d'après (Gueant et al, 2013).

3- Conséquences de la carence en B12 sur la prolifération

La carence en vitamine B12 réduit la prolifération, accélère la différenciation et augmente l'apoptose des cellules de neuroblastomes (Battaglia-Hsu et al, 2009; Orozco-Barrios et al, 2009). Cette réduction de la prolifération en cas de déficience en B12 est aussi observée dans des modèles non-neuronaux, notamment des cellules leucémiques (McLean et al, 1997), des lymphomes (Li et al, 2004) et des cellules SW48 et HEK293 invalidées au niveau du récepteur de la transcobalamine, CD320 (Lai et al, 2011).

Ces changements B12-dépendants sont parmi les signes associés à un vieillissement précoce et ils ressemblent à ceux observés dans les cellules stressées. En effet, une étude récemment publiée montre que la carence en B12 induit indirectement un stress du réticulum endoplasmique (RE) via l'accumulation de l'homocystéine (Adaikalakoteswari et al, 2013).

II.2. Les facteurs génétiques

Les polymorphismes génétiques qui affectent les enzymes intervenant dans le cycle des folates et dans celui de la méthionine peuvent induire une perturbation au niveau de ces deux cycles. Il s'agit principalement du polymorphisme des enzymes MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MS A2756G. Un polymorphisme a également été identifié au niveau du transporteur de la vitamine B12, la transcobalamine TC C776G (Namour et al, 2001).

La MTHFR : La substitution de la cytosine en thymidine en position 677 provoque un remplacement de la valine en alanine induisant une diminution de l'activité de MTHFR (Bailey & Gregory, 1999). La substitution de l'adénine en cytosine en position 1298 donc le remplacement du glutamate en alanine est une mutation ponctuelle du domaine régulateur de l'enzyme.

La MS : La substitution de l'adénosine en guanosine en position 2756 donc le remplacement de l'acide aspartique en glycine entraîne un changement de la région responsable de la réduction de la vitamine B12 (Chen et al, 1997). Une mère homozygote ou hétérozygote pour cette mutation aura plus de risque d'avoir un enfant porteur d'une trisomie 21 (Bosco et al, 2003).

La transcobalamine : La substitution de la cystine en guanine en position 766 provoque une mutation de l'arginine en proline. Cette mutation induit une diminution de la concentration plasmatique en transcobalamine ainsi qu'une augmentation de la concentration en Hcy (Namour et al, 2001).

Partie 2 : LES PATHOLOGIES EN LIEN AVEC UNE CARENCE EN VITAMINE B12

Introduction

La communauté scientifique attache beaucoup d'importance sur la vitamine B vu son rôle dans le développement des maladies chroniques. Cet intérêt a commencé quand des individus ayant une homocystinurie, une perturbation innée du métabolisme caractérisé par un excès de la concentration d'homocystéine, souffraient des maladies vasculaires et d'un retard mental (McCully, 1969).

Depuis cette découverte, beaucoup de recherches scientifiques ont été menées, se concentrant principalement sur l'homocystéine et la carence en vitamine B, notamment B9 et B12 et leurs effets sur les maladies, notamment cardiovasculaires (Wald et al, 2002), l'ostéoporose (Gjesdal et al, 2006), le diabète (Kumthekar et al, 2012) et les maladies neurodégénératives (Clarke et al, 1998).

La supplémentation en vitamine B peut avoir des impacts importants sur la santé publique (Clarke et al, 2007) d'où son intérêt majeur.

a. Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de décès dans le monde. Deux grandes méta-analyses des données épidémiologiques publiées en 2002 suggère qu'un abaissement de 25% de la concentration plasmatique d'homocystéine permet la réduction du risque des maladies cardiaques (11-16%) (Wald et al, 2002). En effet, une carence en vitamine B12 est corrélée avec une hyperhomocystéinémie (Chery et al, 2002) et ceci induit un dysfonctionnement systolique du ventricule gauche (Gueant-Rodriguez et al, 2007).

Une étude portant sur la supplémentation en vitamine B12 suggère qu'à des doses élevées de B12, le risque d'avoir des perturbations vasculaires est réduit (Spence et al, 2005).

De plus, de fortes doses de vitamine B12 provoquent une réduction des maladies cardiovasculaires chez les patients subissant une angioplastie coronarienne (Schnyder et al, 2002; Schnyder et al, 2001).

La combinaison entre vitamines B12 et B9 est associée à une amélioration du flux sanguin coronaire des patients ayant une coronaropathie (Bleie et al, 2011) ainsi qu'une hypertrophie du myocarde liée à une diminution de la déacétylase SIRT1 (Garcia et al, 2011).

Des recherches supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre les avantages de la supplémentation en vitamine B12 sur les maladies cardiovasculaires, en particulier chez les personnes atteintes d'une maladie vasculaire préexistante.

b. Stéatose hépatique

Des patients ayant une accumulation hépatique des acides gras présentent une hyperhomocystéinémie (de Carvalho et al, 2013; Roblin et al, 2007b). Ceci a été également prouvé chez des jeunes rongeurs issus d'une mère carencée en vitamine B12 et en folates (Pooya et al, 2012). En effet, ces derniers ont montré que cette carence induit une stéatose hépatique due à une hypométhylation de PGC1-α, une diminution de sa capacité de se lier à ses partenaires et donc une altération de l'oxydation mitochondriale des acides gras (Pooya et al, 2012).

c. Maladies osseuses

L'ostéoporose est caractérisée par une faible masse osseuse et une détérioration micro-architecturale du tissu osseux, entraînant un risque accru des fractures. Cette maladie touche plus de 75 millions de personnes en Europe, aux USA et au Japon.

Des études épidémiologiques montrent qu'une concentration réduite en vitamine B est associée à une faible densité osseuse (Gjesdal et al, 2006; Naharci et al, 2012), un risque accru d'ostéoporose (Dhonukshe-Rutten et al, 2003) et des fractures ostéoporotiques (McLean et al, 2004).

Plusieurs études ont établi un lien entre un taux de vitamine B12 réduit et l'ostéoporose ou la faible densité osseuse (Morris et al, 2005; Tucker et al, 2005). Ainsi, un taux réduit de vitamine B12 est associé à un risque accru de fracture (Dhonukshe-Rutten et al, 2005; McLean et al, 2004) et une rapide perte osseuse chez les femmes âgées (Stone et al, 2004).

De plus, des patients ayant une sévère ostéoporose et de multiples fractures vertébrales traités deux ans avec la vitamine B12, présentent une augmentation de la densité osseuse et une ostéoporose reversée (Melton & Kochman, 1994).

d. Diabète

Plusieurs études montrent une augmentation de la fréquence du diabète de type 2 chez les sujets carencés en B12 (Kumthekar et al, 2012; Nervo et al, 2011; Pflipsen et al, 2009). L'étude effectuée par Pflipsen et al, sur le sérum de 203 patients ayant du diabète de type 2 montre une diminution du taux de la vitamine B12, une augmentation du MMA et de l'homocystéine. De plus, Qureshi et al, (2011) ont documenté que 33% des patients ayant le diabète de type 2 ont une carence en B12.

Le diabète de type 1 est également associé à une carence en vitamine B12. En effet, une étude effectuée sur 90 patients indiens montre que 45,5% d'entre eux ont un taux réduit en vitamine B12 (Koshy et al, 2012).

e. Maladies neurodégénératives

La démence et les troubles cognitifs sont des problèmes de santé publique chez les personnes âgées (Smith, 2008).

La comparaison entre adultes âgés en bonne santé et ceux atteints de démence a permis d'établir une association entre homocystéine et / ou vitamines B avec les fonctions cognitives (Herrmann & Obeid, 2011).

Une étude épidémiologique estime qu'une réduction de 3µmol/L d'homocystéine réduit le risque de démence de 42,3 % à 22% (Wald et al, 2011).

De plus, une supplémentation en vitamine B (0,8 mg d'acide folique, 0,5 mg de vitamine B12, 20 mg de vitamine B6) ralentit l'atrophie du cerveau et améliore la performance cognitive chez les patients présentant des troubles cognitifs légers (Smith et al, 2010).

f. Histoire

En 1982, Inada et al, (Inada et al, 1982) ont étudié douze autopsie cervicales de patients âgés atteints de démence. Ils se sont intéressés aux modifications histopathologiques, notamment des lobes temporaux et frontaux, et ont trouvé une diminution de la vitamine B12 et de la transcobalamine ainsi qu'une perte de neurones, une dégénérescence de la myéline, une atrophie, une dilatation ventriculaire et des lésions vasculaires.

En 1988, Lindenbaum et al. (Lindenbaum et al, 1988) ont publié un rapport montrant que les patients ayant de faibles niveaux de vitamine B12 présentaient des troubles neuropsychiatriques, En effet, parmi 37 patients, 36 avaient un taux d'homocystéine 3 fois plus élevé que le taux normal.

En 1992, Martin et al, (Martin et al, 1992) ont étudié les effets d'une supplémentation en B12 sur les performances cognitives chez un groupe de 18 participants âgés ayant une carence en B12 et de troubles cognitifs. Ils ont montré que les pertes cognitives chez les personnes âgées peuvent être reversées par une supplémentation en vitamine B12 à condition que celle-ci soit effectuée en début de carence.

g. Maladie d'Alzheimer

En 1984, Cees Van Tiggelen a suggéré que la carence en vitamine B12 peut être associée à la maladie d'Alzheimer. Cole and Prchal (Cole & Prchal, 1984) ont trouvé que la carence en vitamine B12 est fréquente chez les sujets atteints d'Alzheimer.

En 1987, Karnaze and Caramel (Karnaze & Carmel, 1987) ont analysé le sérum de 17 patients ayant une démence dégénérative primaire et ils ont trouvé que 29% des patients avaient une diminution de la vitamine B12.

De plus, des observations effectués sur des patients ayant la maladie d'Alzheimer montrent que ces individus ont des concentrations d'homocystéine significativement élevées, ce qui confirme la théorie que la vitamine B12 est un important facteur de risque modulable chez les personnes âgées ayant des dysfonctionnements cognitifs (Clarke et al, 1998; McCaddon et al, 1998).

h. Epilepsie

. Le lien entre déficience modérée et épilepsie n'est pas bien établi. Par contre, l'administration de doses élevées d'homocystéine chez les animaux peut provoquer des crises d'épilepsie (Kubova et al, 1995). De plus, des taux d'homocystéine élevés, sont associés à des convulsions (Sprince et al, 1969).

i. Sclérose en plaques

Une relation entre la carence en vitamine B12 et la sclérose en plaques a été mise en évidence dans les débuts des années 1990 (Reynolds, 1992). Dans beaucoup de cas, les signes hématologiques de la carence en B12 sont soit absents soit minimes et les niveaux sériques de B12 sont bas ou normale. La sclérose en plaque est considérée comme étant un trouble inflammatoire d'une étiologie inconnue, et il a été suggéré que les réactions chroniques immunitaires ou les processus de réparation de myéline peuvent augmenter la demande en vitamine B12 chez les patients (Reynolds et al, 1992).

Alors que certaines études associent un taux élevé d'homocystéine et la sclérose en plaque (Russo et al, 2008; Teunissen et al, 2005), d'autres ne relèvent pas ce lien (Goodkin et al, 1994; Teunissen et al, 2008).

j. Maladie de Parkinson

Les patients atteints de la maladie de Parkinson ont des niveaux élevés d'homocystéine (Allain et al, 1995; Kuhn et al, 1998) et de MMA (Levin et al, 2010; Toth et al, 2010).

De plus, ces patients sont traités avec la L-dopa, dont le métabolisme nécessite la consommation accrue de SAM, via la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) (Miller et al, 1997), induisant donc une augmentation des niveaux d'homocystéine (Miller et al, 2003; Muller et al, 1999). Il est intéressant de noter que les patients parkinsoniens hyperhomocystéinémiques sont plus susceptibles d'être déprimés, et ne réussissent pas les tâches neuropsychométriques contrairement aux patients normohomocystéinémiques (O'Suilleabhain et al, 2004).

En 2009, Orozco-Barrios et al, ont montré qu'un plasmide codant pour une protéine, séquestrant la vitamine B12, transfecté au niveau de la substance noire des rats, induit un phénotype parkinson-like ainsi qu'une réduction de la prolifération et une augmentation de la différenciation et de l'apoptose des cellules neuronales (Battaglia-Hsu et al, 2009).

Enfin, une supplémentation en B12 réduit les niveaux d'homocystéine (Lamberti et al, 2005), ce qui peut avoir des implications thérapeutiques importantes, d'autant plus que ces patients ont un risque accru de développer des troubles cognitifs et une démence (Zoccolella et al, 2010).

k. Paralysie supranucléaire progressive/ sclérose latérale amyotrophique

Les patients ayant une paralysie supranucléaire progressive et une sclérose latérale amyotrophique ont un niveau d'homocystéine sanguin élevé (Levin et al, 2010), qui peut être dû à une carence en vitamine B12. Ce taux est plus marqué chez les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique et ces malades ont un temps de diagnostic court, ce qui suggère que les niveaux plus élevés en homocystéine peuvent être liés à une progression rapide de la maladie (Zoccolella et al, 2008).

Il est avéré que la L-BMAA (béta-N-méthylamino-L-alanine), induit une sclérose latérale amyotrophique (Pablo et al, 2009). Etant donné que la structure de la L-BMAA est similaire à celle de l'alanine, son incorporation erronée dans la chaine polypeptidique lors de la synthèse des protéines, induit une accumulation des protéines mal repliées (Banack et al, 2010; Field et al, 2011), provoquant ainsi un stress du réticulum endoplasmique (RE), détaillé dans la partie 3 (Okle et al, 2013).

La sclérose latérale amyotrophique peut donc être due à un stress du RE (Okle et al, 2013).

Partie 3: LE STRESS DU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE

I. Fonctions du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) (figure 14) est un organite présent dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Sa taille varie d'une cellule à une autre selon l'activité et les besoins cellulaires en protéines. Le RE est un réseau membranaire qui délimite un espace luminal continu s'étendant à travers le cytoplasme et occupant 10% du volume cellulaire total alors que l'ensemble de ses membranes représente plus de la moitié des membranes cellulaires. La structure du RE s'établit dans la continuité de la membrane nucléaire et sa lumière constitue un environnement favorable à la synthèse, aux modifications, au repliement et à la maturation des protéines sécrétées, des protéines de la membrane plasmique et des organites intracellulaires.

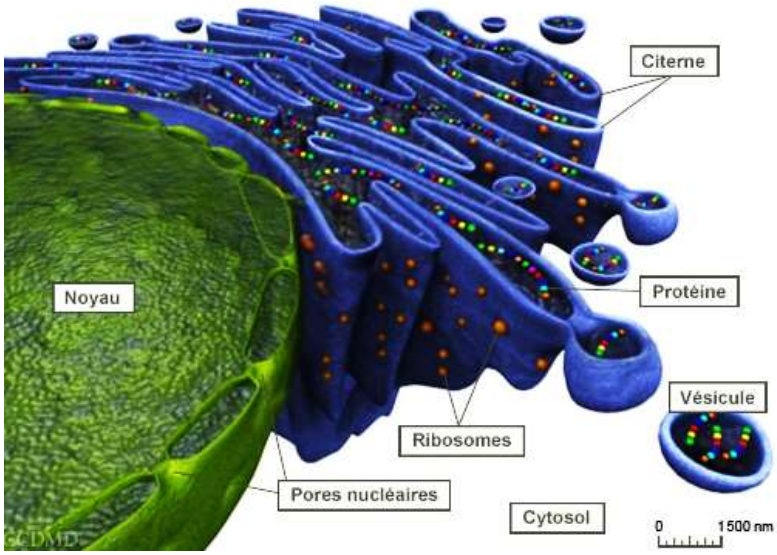


Figure 14 : Structure du réticulum endoplasmique (modifié d'après le livre « la cellule animale »).

Le RE est formé d'un réseau membranaire de citernes et de tubules qui communiquent entre eux. Le RE est formé de 3 parties distinctes: l'enveloppe nucléaire, le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et le réticulum endoplasmique lisse (REL). Le RER tire son nom de la présence de nombreux ribosomes à sa surface qui lui confèrent un aspect granuleux, alors que le REL, exempt de ribosomes, présente une forme plus repliée ou tortueuse.

a. Stockage du calcium intracellulaire

Le RE est un lieu de stockage du Ca^{2+} intracellulaire (Zhang & Kaufman, 2008). En effet, il permet le relargage de Ca^{2+} dans le cytosol en réponse à divers stimuli et assure le pompage

du Ca^{2+} en excès dans le cytosol après une stimulation (Burdakov et al, 2005). La concentration de Ca^{2+} libre dans le cytoplasme est de 100nM, la concentration totale de Ca^{2+} dans le RE est de 500µM à 1mM (Solovyova et al, 2002). Cette concentration est régulée par la présence des récepteurs à la surface des membranes du RE : les RyR (ryanodine receptor) et les IP3R (inositol-1,4,5-trisphosphate receptor), qui permettent la sortie de Ca^{2+} vers le cytosol et des pompes SERCA (Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-transport ATPase) qui assurent l'entrée de Ca^{2+} dans le RE.

b. Synthèse, transport, maturation et dégradation des protéines

Etant un support physique pour les ribosomes, le RE effectue l'assemblage des acides aminés en protéines (Georges Palade, prix Nobel de médecine en 1974). Il participe spécifiquement à la synthèse des protéines luminales du RE, des protéines de l'appareil de Golgi, des endosomes, des lysosomes et des protéines sécrétées. Le RE se trouve naturellement très abondant dans les cellules où la synthèse des protéines est très active comme par exemple dans les cellules hépatiques et dans les cellules nerveuses.

La fonction du RE ne se limite cependant pas seulement à la synthèse des protéines. Grâce à sa continuité avec la membrane plasmique, le RE établit la communication entre les différentes régions de la cellule. Il achemine les protéines et les nutriments absorbés vers les organites où ils peuvent être traités, utilisés ou exportés. Un tiers environ des protéines totales de la cellule transite par le RE comme par exemple : les composants de la membrane externe, de la matrice extracellulaire et des lysosomes ainsi que des protéines chaperons, des enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles et de nombreux récepteurs nécessaires au tri des protéines. En effet, les protéines adressées vers le RE comportent dans leur chaîne polypeptidique une séquence signal reconnue par la protéine SRP (signal recognition particule). Le complexe chaîne polypeptidique-SRP est alors adressé à la membrane du RE où se trouve le récepteur à la SRP. La chaîne polypeptidique entre dans le RE par un canal appelé translocon.

Dans la lumière du RE, les protéines vont être soumises à des contrôles de qualité stricts qui vont s'assurer du bon repliement et de la conformation correcte des protéines. Elles sont alors prises en charge par des protéines chaperons qui sont capables de reconnaître des domaines de protéines naissantes dans leur état provisoire et d'assurer leur repliement approprié (Rapoport, 2007).

La maturation des protéines est assurée par la présence de quatre classes de chaperons dans la lumière du RE :

1) les chaperons à site lectine, calnexine et calreticuline.

2) les chaperons de la famille Hsp70 (BiP/GRP78, GRP170/ORP150)

3) les chaperons de la famille HSP90, GRP94

4) les thiol-oxydoréductases, ainsi que par la Protein Disulfide Isomerase (PDI) assurant la formation des ponts disulfures.

Si ces contrôles sont validés, les protéines nouvellement synthétisées pourront être transportées à leur destination finale alors que s'ils échouent (figure 15), les protéines incorrectement repliées ou modifiées seront reconnues par l'EDEM (ER-degradation enhancing –mannosidase–like protein), ubiquitinées (Goder, 2012) puis dégradées par la voie du protéasome (Ellgaard & Helenius, 2003). Environ la moitié des protéines qui transitent par le RE sont détruites par cette voie. L'autre moitié sera éliminée par un mécanisme d'autophagie (Hamasaki et al, 2013). De plus, le RE comporte un système RIDD (Regulated Ire1-dependent degradation) contribuant à la dégradation d'ARNm (Hegde & Ploegh, 2010).

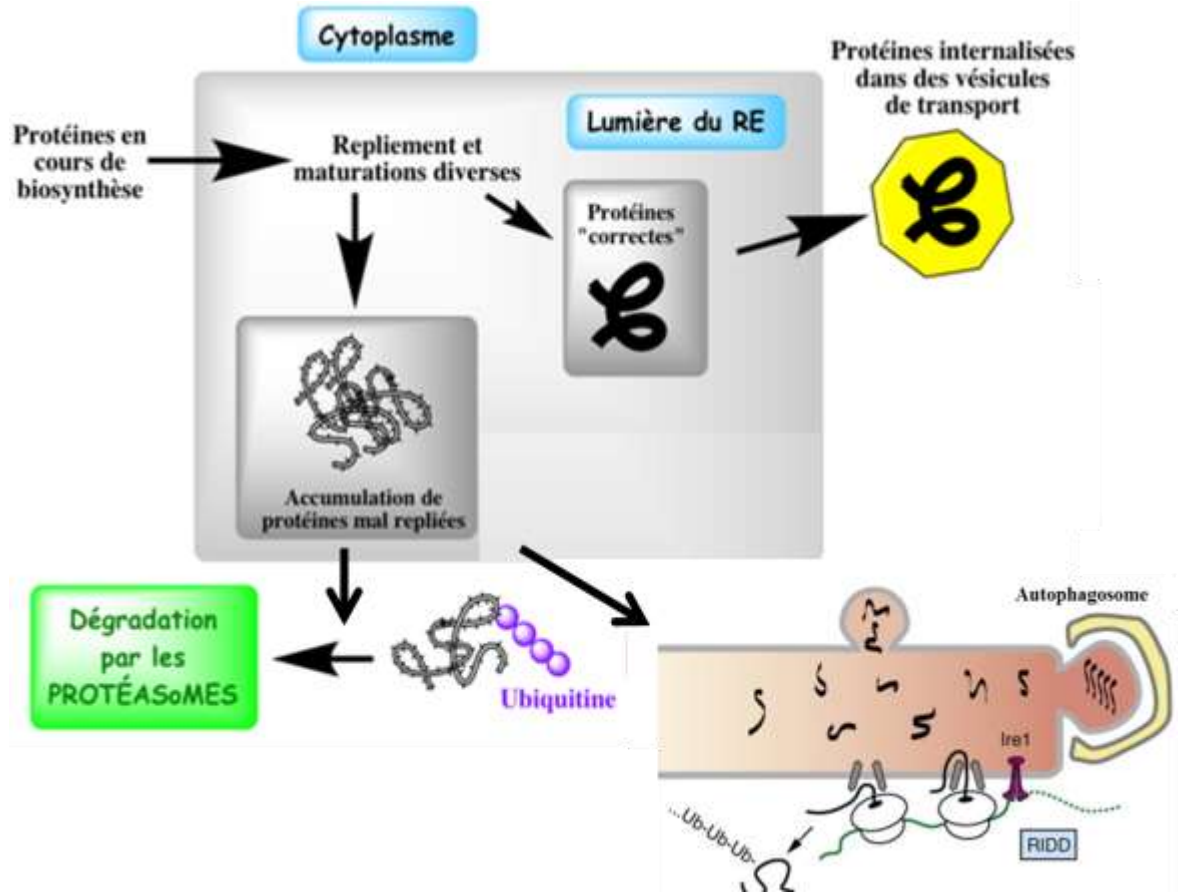


Figure 15: Devenir des protéines arrivant au RE (modifié d'après cours d' E. Jaspard, 2011 et (Hegde & Ploegh, 2010)).

c. Synthèse du cholestérol et des lipides

Le RE est également le site de synthèse de toutes les classes majeures de lipides, phosphatidylcholine (Lagace & Ridgway, 2013) phospholipides et cholestérol comme les stéroïdes dans les cellules sexuelles, les triglycérides dans les cellules adipeuses ainsi que certains produits de sécrétion fréquemment rencontrés dans les cellules glandulaires telles les glandes salivaires et sébacées de la peau. Il joue un rôle dans la synthèse et l'assemblage des lipoprotéines et des céramides. Il est une source de lipides pour la membrane mitochondriale.
Etant spécialisé dans la détoxification de composés solubles dans les lipides, le RE peut être très abondant dans les cellules hépatiques (hépatocytes) pour assurer la détoxification après la prise de certains médicaments.

d. Production du glucose par la voie de la glycogénolyse

La dégradation du glycogène fournit du glucose endogène et permet de répondre temporairement aux besoins énergétiques des tissus. Suite à une période de jeûne, le foie mobilise ses réserves de glycogène afin de libérer du glucose dans le sang. Le processus de dégradation du glycogène a lieu dans le cytosol sauf la réaction d'hydrolyse du glucose-6-phosphate en glucose qui a lieu dans le réticulum endoplasmique des cellules hépatiques. La glucose-6-phosphatase, est associée à la membrane du RE (Arion et al, 1975), son site catalytique est exposé dans la lumière du RE (Freeman et al, 2008) (figure 16).

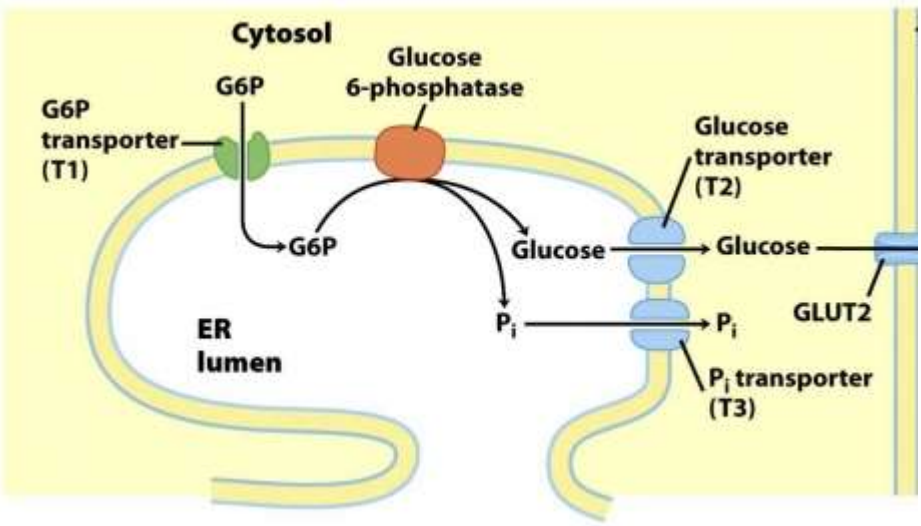


Figure 16: Action de la glucose-6-phosphatase dans le RE (modifié d'après Freeman et al, 2008).

Le glucose-6-phosphate (G6P) est transporté du cytosol vers le lumière du RE par le transporteur T1. La glucose-6-phosphatase hydrolyse le G6P en glucose et en Pi, passant vers le cytosol par les transporteurs T2 et T1, respectivement. Ensuite, le glucose quitte la cellule par le transporteur GLUT2.

e. Biogenèse des autophagosomes

En condition de stress, notamment la carence en nutriments, l'absence de facteurs de croissance ou l'hypoxie, l'autophagie sera stimulée. Une double membrane appelée phagophore séquestre de façon non sélective des constituants du cytoplasme pour former l'autophagosome. Ce dernier migre vers les lysosomes (Weidberg et al, 2011) pour former l'autolysosome. Les autophagosomes sont formés d'une double membrane phospholipidique, formée à partir du RE, du réseau trans-golgien, de la mitochondrie et de la membrane plasmique (Axe et al, 2008; Cuervo, 2010; Reggiori et al, 2005; Young et al, 2006).

En effet, au niveau du RE (figure 16), il y a formation d'une double membrane, riche en effecteurs autophagiques, appelée l'omégasome (Axe et al, 2008). Cette double membrane sera ensuite une structure pré -autophagosomique (PAS) qui donnera l'autophagosome (figure 17).

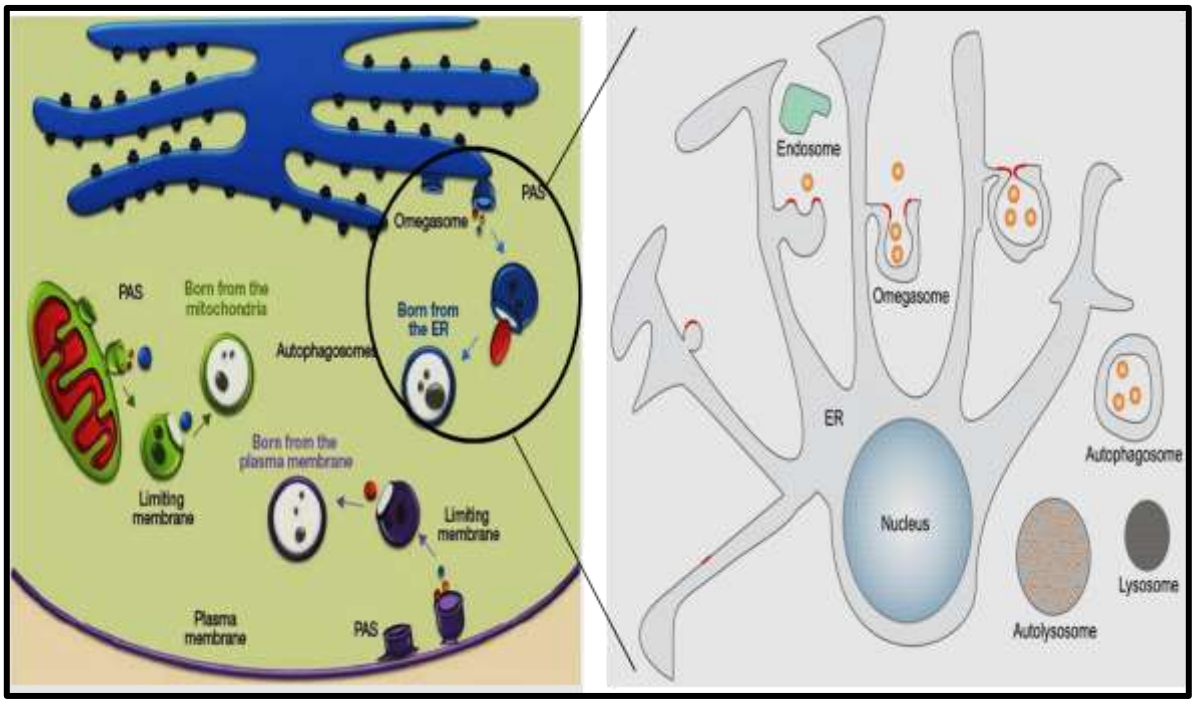


Figure 17 : Formation des autophagosomes à partir du RE, modifié d'après (Cuervo, 2010; Simonsen & Stenmark, 2008).

II. Le Stress du Réticulum endoplasmique

Toute perturbation des fonctions du RE provoque un stress du RE. Ce stress conduit à l'établissement d'un ensemble de voies de signalisation cytoplasmiques et nucléaires collectivement appelées Unfolded Protein Response (UPR) (développées dans la partie suivante). En effet, de nombreuses situations peuvent engendrer un stress du RE, comme l'accumulation de protéines virales dans le RE au cours d'une infection virale (von dem Bussche et al, 2010), un défaut dans la synthèse des phospholipides au sein du RE (Lagace & Ridgway, 2013), la perturbation de la N-glycosylation des protéines dans la lumière du RE en cas de privation en glucose (Benavides et al, 2005), un déséquilibre de l'environnement redox de la lumière du RE causé par l'hypoxie ou des agents oxydants. Ceci interfère avec la formation des ponts disulfure et engendre l'accumulation de protéines mal repliées (Frand et al, 2000)). Une hyperglycémie chez la souris conduit à une augmentation de la synthèse d'insuline par les cellules β du pancréas suivie d'une activation de stress du RE (Harding et al, 2001). D'autres situations déclenchant le stress du RE seront présentées plus en détails dans le paragraphe suivant.

II.1. Origines du stress du réticulum endoplasmique

a. Accumulation des protéines mal-repliées

Toutes les situations induisant une perturbation de la fonction du RE empêchent le repliement correct des protéines. Celles-ci sont séquestrées dans le RE et s'accumulent dans la lumière du RE, obligeant la cellule à déclencher la réponse adaptative UPR. De plus, des souris dont le gène *Ins2* codant pour le précurseur de l'insuline est muté, présentent une hyperglycémie accompagnée par de niveaux élevés de marqueurs de stress du RE, comme GRP78 et CHOP. Puisque la pro-insuline est une protéine du RE, il a été suggéré que son repliement incorrect est causé par le stress du RE (Sundar Rajan et al, 2007).

b. Influence du calcium

Le RE est le site de stockage du calcium (entre 500µM - 1mM contre 0,1 µM dans le cytosol) (Solovyova et al, 2002). Ce calcium est utilisé lors des signalisations cellulaires (Webb and Miller 2003) provoquant une diminution rapide de la concentration du calcium intra-luminale. Sachant que la majorité des protéines chaperons résidentes du RE sont dépendantes du calcium, ces variations de concentration affectent l'activité de ces protéines (Zhang et al, 1997), ce qui peut être à l'origine d'une accumulation des protéines mal repliées et donc d'un stress du RE.

c. Environnement redox

L'environnement luminal du RE favorise la maturation des protéines grâce à : 1- des chaperons, 2- des oxydoréductases, comme la protéine disulfure isomérase (PDI) catalysant la formation des ponts disulfures et 3- un environnement oxydatif adapté (Sitia & Braakman, 2003) comportant les couples redox: glutathione (GSH/GSSG) connu pour être impliqué dans la formation des ponts disulfures (Hayano et al, 1993), NAD(P)H/$NAD(P)^+$, ascorbate/déhydroascorbate et $FADH_2$/FAD.

Lors de la formation des ponts disulfures, la PDI est réduite. Afin de la ré-oxyder, la protéine ERO1 (ER oxydation 1) transfère les électrons directement à l'oxygène, par une réaction dépendante de la flavine, et produit ainsi des radicaux libres oxygénés (ROS) et du glutathion oxydé (GSSG) (Frand & Kaiser, 1998; Tu et al, 2000). Cette accumulation de ROS et de glutathion oxydé peut constituer une source de stress oxydant et donc un stress du RE (l'induction de stress du RE à partir de stress oxydant sera détaillée dans la partie II.4.b).

d. Glycosylation

Lors de la synthèse, les glycoprotéines sont formées suite à la fixation d'oligosaccharides sur le groupement NH2 des chaînes latérales des résidus asparagines accessibles (Hubbard & Ivatt, 1981; Kornfeld & Kornfeld, 1985). La glycosylation est importante pour les raisons suivantes :

- la translocation des glycoprotéines vers le cytoplasme est rendue irréversible grâce à la présence des sucres (Wormald & Dwek, 1999).
- étant hydrophiles, ces sucres augmentent la solubilité des protéines.
- ces oligosaccharides assurent le bon repliement des protéines et empêchent leur agrégation (Stevens & Argon, 1999).

Dans le RE, une altération de la glycosylation des protéines induit le stress du RE.

e. Micronutriments et stress du RE

L'apport en micronutriments peut avoir un effet sur le stress du RE.

En effet, il a été démontré que chez les souris, la carence en vitamine D induit un stress du RE (Weng et al, 2013). De plus, les patients ayant un diabète de type II ont deux fois plus de risques d'avoir des maladies cardiovasculaires s'ils sont carencés en vitamine D (<30 ng/ml) et cela est associé à l'activation du stress du RE (Riek et al, 2012).

La vitamine C protège contre le stress oxydant (Soujanya et al, 2013) et également contre le stress du RE (le lien entre stress oxydant et stress du RE est expliqué dans le paragraphe II.3.b).

L'acide docosahexaenoique (DHA), aussi nommé oméga 3, induit un stress du RE dans les cellules de cancer du sein (TNBC ou Triple Negative Breast Cancer) (Xiong et al, 2012). Dans ce cas, le stress du RE est bénéfique puisqu'il provoque l'apoptose des cellules cancéreuses.

f. Glucose, acides aminés, acides gras et stress du RE

Une perturbation d'apport alimentaire en glucose, acides aminés et acides gras peut induire un stress du RE.

Glucose : La carence en glucose perturbant la conformation des protéines synthétisées provoque le stress du RE (Huber et al, 2013; Kaufman et al, 2002; Ma & Hendershot, 2001). Ceci est corrélé avec une augmentation de l'expression des chaperons BiP et GRP94 (Shiu et

al, 1977). La diminution de flux de glucose perturbe la N-glycosylation des protéines ce qui induit un stress du RE (Benavides et al, 2005).
Il a été aussi démontré qu'une hyperglycémie induit un stress du RE (Harding et al, 2001; Liu et al, 2013).

Acides aminés : Une faible concentration en L-BMAA (béta-N-méthylamino-L-alanine) induit une dérégulation cellulaire accompagnée d'une activation de stress du RE, et une forte concentration en L-BMAA provoquant un stress oxydant (Okle et al, 2013). De plus, la carence en glutamine provoque l'induction de la protéine chaperon BiP (Abcouwer et al, 2002; Marjon et al, 2004). Des rats nourris avec un régime carencé en acides aminés soufrés (méthionine) présentent une diminution de la croissance et une activation des effecteurs de stress du RE (Sikalidis & Stipanuk, 2010).

Acides gras : Le stress du RE est observé dans le foie des souris ayant un régime riche en graisses (Ozcan et al, 2004). En effet, un excès en lipides cause un stress du RE (Boden, 2009; Deldicque et al, 2010; Tsiotra & Tsigos, 2006; Zhang & Kaufman, 2008). Les acides gras saturés (ex : le palmitate) sont connus pour avoir des effets délétères via l'induction d'un stress du RE dans de nombreux types cellulaires (Rieusset et al, 2012).

g. pH

Une protéine est formée d'une chaine d'acides aminés portant des groupements ionisables. Un changement du pH implique un changement de la quantité des atomes H^+. Ces atomes d'hydrogène positivement chargés attirent les acides aminés chargés négativement ce qui provoque une perturbation du repliement des protéines et donc un stress du RE. Au sein d'une protéine, la formation des ponts disulfures peuvent être perturbés suite à un changement du pH. Ces changements sont réversibles, sauf dans des conditions trop acides ou trop basiques (figure 18).

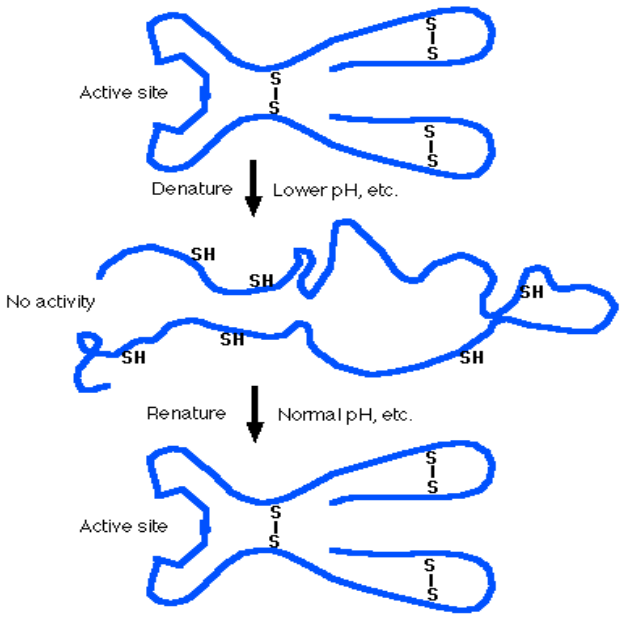


Figure 18: Dénaturation réversible des ponts disulfures à faible pH (d'après http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DenaturingProtein.html).

Il a été démontré que l'acidose, une augmentation de l'acidité, provoque une conformation protéique anormale ainsi qu'une augmentation des protéines chaperons (Massa et al, 1996; Narasimhan et al, 1996). De plus, les conditions de pH inférieures à 6,8 inhibent l'activité des canaux Ca^{2+}/ATPase du RE (Wolosker et al, 1997) et déclenchent un stress et une réponse UPR (Kozutsumi et al, 1988; Paschen & Frandsen, 2001). L'acidose des astrocytes soumis à une ischémie/reperfusion provoque aussi un stress du RE et une activation de la pro-caspase 12 (Aoyama et al, 2005).

II.2. La réponse UPR

Le stress du RE implique l'activation de la réponse UPR (« unfolded protein response ») ayant deux objectifs :

a. activer la transcription de certains gènes, notamment des chaperons ou des foldases du RE, permettant la stimulation du processus de repliement des protéines.
b. ralentir la traduction des protéines afin de limiter la quantité de nouvelles protéines arrivant au RE et donc éviter la surcharge de cet organite (Kaufman, 2002; Schroder & Kaufman, 2005).

Lorsque les deux processus précédents échouent et que le stress se prolonge, la réponse UPR aboutit à l'apoptose (Breckenridge et al, 2003).

Afin d'être efficace, la réponse UPR entraine l'activation de deux voies : une voie traductionnelle et une voie transcriptionnelle. Ceci implique l'activation de trois protéines transmembranaires du RE : PERK (PKR-like ER-associated protein kinase), IRE1 (inositol-requiring enzyme-1) et ATF6 (activating transcription factor-6) (Rutkowski & Kaufman, 2004). En absence de stress, ces trois protéines sont maintenues inactives grâce à leur association à la protéine chaperon BiP/GRP78 (figure 19) (Lee, 2005; Shen et al, 2002). L'accumulation des nouvelles protéines mal repliées dans la lumière du RE entraîne la dissociation du complexe BiP/GRP78, pour assurer le bon repliement des protéines, permettant ainsi l'activation de la voie UPR.

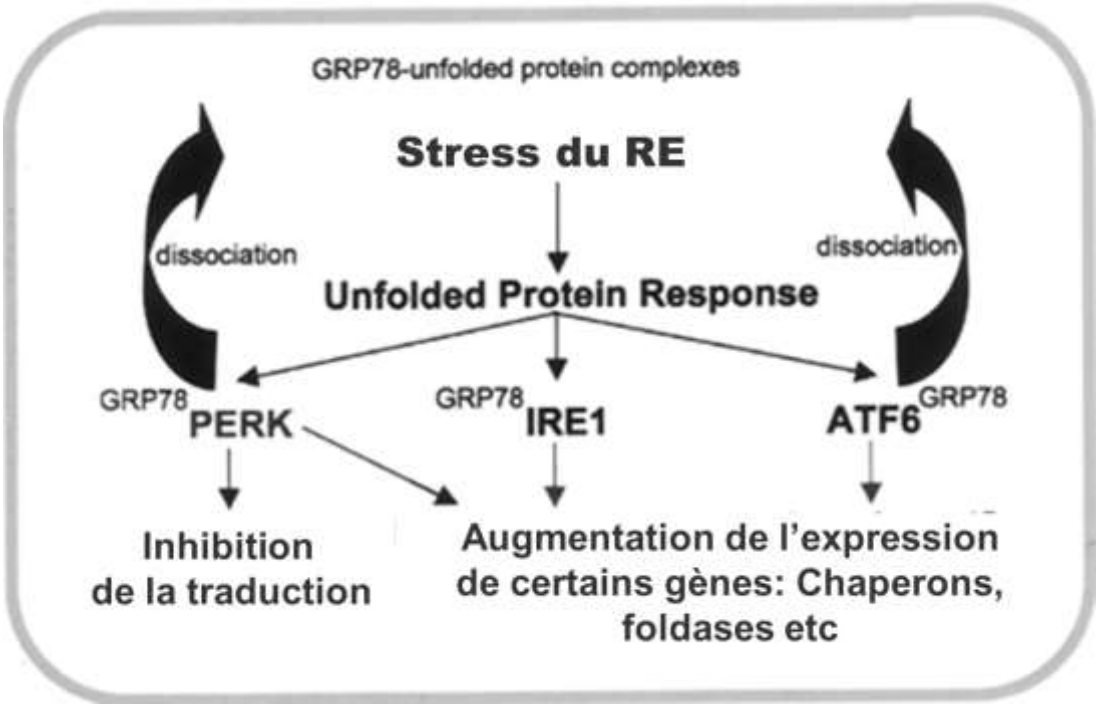


Figure 19: Activation de la réponse UPR, modifié d'après (Austin et al, 2004).
Le stress du RE induit la dissociation de la protéine chaperon BiP/GRP78 des 3 protéines transmembranaires PERK, IRE1 et ATF6, qui seront donc activées. Leur activation induit la stimulation de la transcription des protéines chaperons ainsi que l'inhibition de la traduction via PERK.

a. La voie PERK : régulation traductionnelle (figure 20)

C'est chronologiquement la première voie qui se déroule au cours de la réponse UPR. Elle induit l'inhibition de la traduction afin de ralentir la synthèse protéique et diminuer la charge de protéines dans le RE (Harding et al, 1999). Cette voie est stimulée quand la Ser/Thr kinase

PERK est activée suite à sa dimérisation et son autophosphorylation en *trans*. PERK activée phosphoryle le résidu sérine 51 de la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (Eukaryotic translation Initiation Factor 2) (Scheuner et al, 2001) empêchant ainsi la formation du complexe de pré-initiation de la traduction et donc l'interaction ARNm/sous-unité 40S du ribosome. La traduction protéique est donc atténuée.

Outre PERK, il existe plusieurs kinases pouvant phosphoryler le facteur eIF2α, en réponse à des stress cellulaires : GCN2 (General Control Nonderepressible 2) induite en cas de carence en acides aminés, PKR (Double-stranded RNA-dependent protein Kinase) activée lors d'une infection virale par des ARN double brins, HRI (Heme Regulated Inhibitor) activée en cas de carence en hème.

Malgré l'inhibition de la synthèse protéique, la traduction de l'ARNm du facteur de transcription ATF4 est augmentée (Harding et al, 2000). Ceci est rendu possible par la présence d'uORFs (upstream Open Reading Frames) dans sa partie 5'-UTR. En absence de stress, ces uORFs dont la traduction est dépendante de la coiffe, inhibent la traduction d'ATF4. En cas de stress, la phosphorylation d'eIF2α rend les uORFs non fonctionnels et ATF4 sera traduit indépendamment de la coiffe (Hinnebusch, 1993).

ATF4 induit la transcription des gènes ayant, au niveau de leurs promoteurs, une séquence ERSE (Endoplasmic Reticulum Stress response Element) formée d'une séquence de 19 nucléotides CCAAT-N9-CCAAG (Yoshida et al, 2000) et qui codent pour les chaperons du RE, GRP78 et GRP94, pour des gènes intervenant dans le métabolisme et le transport d'acides aminés, dans la synthèse de glutathion et dans la résistance au stress oxydant (Harding et al, 2003; Ron, 2002; Scheuner et al, 2001).

ATF4 est également impliquée dans l'activation de la voie apoptotique en induisant l'expression de la protéine CHOP (CEBP HOmologous Protein). CHOP est un facteur de transcription activant l'expression des facteurs pro-apoptotiques et inhibant la transcription des facteurs anti-apoptotiques, comme Bcl-2 (Zhang & Kaufman, 2008).

Afin d'éviter que la réponse UPR ne soit hyperactive, ATF4 induit la transcription de GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34) (Jiang et al, 2004). GADD34 se lie à la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase 1 (PP1) et induit la déphosphorylation d'eIF2α (Ma & Hendershot, 2003).

Plusieurs études ont montré l'importance de la voie PERK dans la survie cellulaire surtout en cas de stress du RE. Le syndrome de Wolcott-Rallison, caractérisé par une perte de fonction de PERK, conduit à la destruction des cellules pancréatiques et à un diabète insulino-dépendant (Delepine et al, 2000). De plus, chez la souris, la mutation de la sérine 51

d'eIF2αcombinée à un stress du RE induit un trouble d'inhibition de la traduction et ainsi une diminution de la survie (Scheuner et al, 2001).

b. La voie IRE1 : régulation transcriptionnelle (1) (figure 20)

La protéine IRE1 est une protéine transmembranaire possédant une activité sérine/thréonine kinase et endoribonucléase (Rutkowski & Kaufman, 2004). Chez les mammifères, deux isomères ont été identifiées : IRE1 α (la forme ubiquitaire) et IRE1 β (exprimé dans le tube digestif (Tirasophon et al, 1998; Wang et al, 1998).

En cas de stress du RE, la dissociation de protéine chaperon BiP/GRP78 induit l'oligomérisation d'IRE, sa *trans*-autophosphorylation et donc la stimulation de son activité kinase et endoribonucléase (Korennykh et al, 2009). IRE1 activée permet l'épissage de 26 nucléotides de l'intron de l'ARNm de XBP1 (X-box-binding protein 1). L'ARNm XBP1 épissé est libéré dans le cytosol (Yanagitani et al, 2009). Etant un facteur de transcription, la protéine XBP1 migre dans le noyau et se lie sur des séquences ERSE des promoteurs cibles de la réponse UPR pour induire la transcription des chaperons, des enzymes du RE nécessaires pour la maturation des protéines (Lee et al, 2003) et des enzymes impliquées dans la voie de dégradation ERAD comme la protéine EDEM (ER-degradation-enhancing a-mannosidase-like protein) impliquée dans la reconnaissance des protéines glycosylées mal conformées (Lee et al, 2003).

c. La voie ATF6 : régulation transcriptionnelle (2) (figure 20)

Il existe deux isoformes d'ATF6 : ATF6 α et ATF6 β. L'induction des gènes cibles de la réponse UPR est assurée par l'isoforme α seule. ATF6 possède une partie C-terminale dans la lumière du RE et une partie N-terminale exposée dans le cytoplasme.

En cas de stress, après la libération de BiP/GRP78, ATF6 sera adressée vers le compartiment de Golgi où elle est clivée par les protéases S1P et S2P (Chen et al, 2002). Dans un premier temps, S1P clive au niveau luminal, libérant ainsi la partie C-terminale et laissant sa partie N-terminale ancrée dans la membrane. S2P clive l'extrémité N-terminale en libérant un domaine de 50 KDa ayant une fonction de facteur transcription (Haze et al, 1999; Ye et al, 2000). Celui-ci migre dans le noyau et se fixe au niveau des séquences ERSE (Kokame et al, 2001; Yoshida et al, 1998) pour activer la transcription d'une trentaine de gènes impliqués dans la maturation des protéines du RE notamment BiP/GRP78 et GRP94 (Haze et al, 1999), PDI et des protéines impliquées dans le système ERAD (Adachi et al, 2008).

Il a été démontré que l'invalidation d'ATF6 dans des cultures de MEF induit une perturbation de l'induction des chaperons et donc du stress du RE (Yamamoto et al, 2007).

Enfin, il faut noter que les voies ATF6 et IRE1 interagissent par le fait que XBP1 s'hétérodimérise avec ATF6 afin de reconnaitre le motif CCAAT des séquences ERSE (Yamamoto et al, 2007).

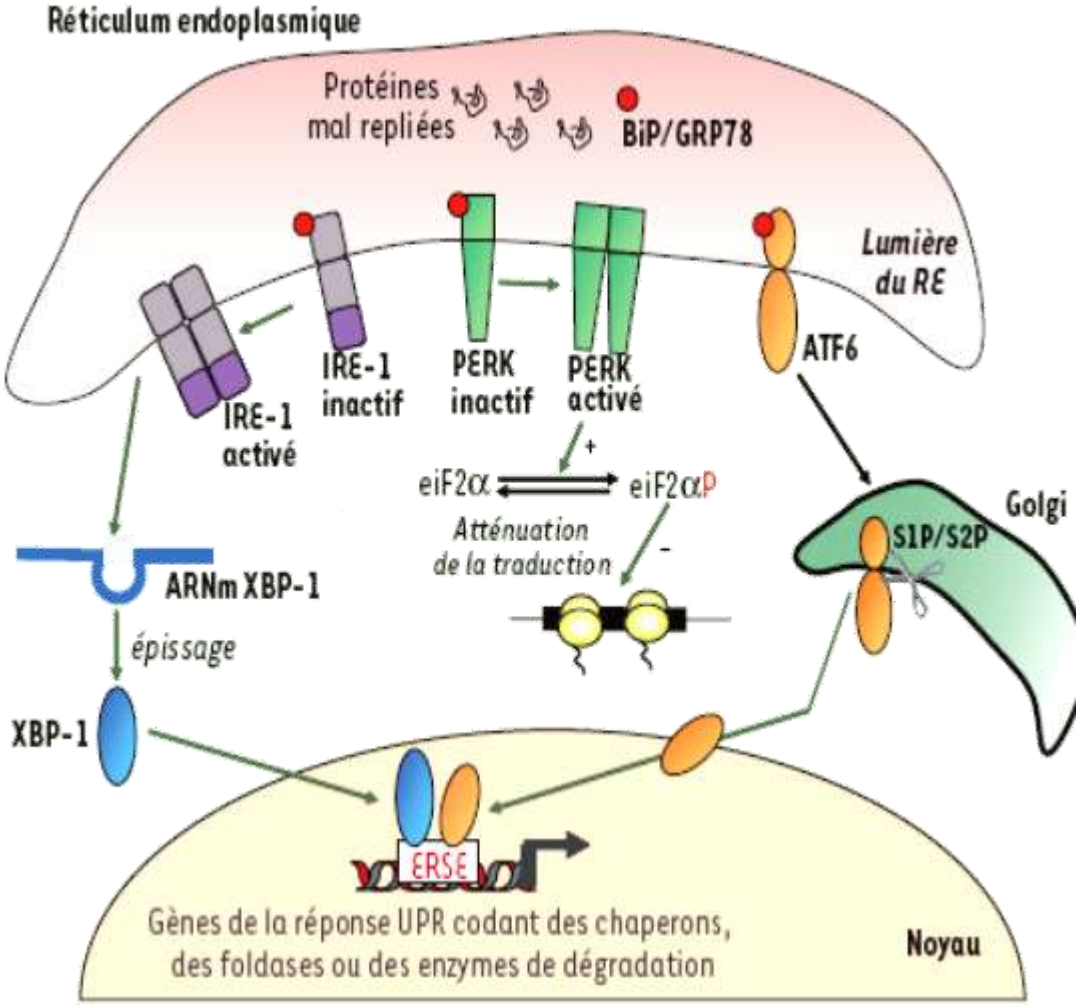


Figure 20: Les différentes composantes de la réponse UPR, d'après (Foufelle & Ferre, 2007).

En absence de stress, la protéine chaperon BiP/GRP78 est associée aux trois protéines transmembranaires PERK, IRE-1 et ATF6 pour les maintenir inactives. Lorsque les protéines malrepliées s'accumulent dans la lumière du RE, BiP/GRP78 se dissocie induisant donc l'activation des trois protéines de la réponse UPR.

PERK s'oligomérise, s'auto-phosphoryle et elle phosphoryle la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eiF2 entraînant une inhibition de la traduction.

ATF6 migre vers le compartiment de Golgi où elle est clivée par les deux enzymes S1P et S2P. Sa partie N-terminale migre dans le noyau et se fixe au niveau des séquences ERSE (ER stress response element).

IRE-1 s'oligomérise, s'auto-phosphoryle et son activité endoribonucléase est activée. Elle épisse l'ARNm du facteur XBP1 qui migre dans le noyau et se fixe sur les séquences ERSE des promoteurs cibles de la réponse UPR.

II.3. Transition de la réponse UPR vers l'apoptose

Quand tous les efforts mis en œuvre pour lutter contre le stress du RE échouent, la réponse UPR bascule vers la mort cellulaire (Breckenridge et al, 2003).

Trois mécanismes apoptotiques sont produits à partir du RE.

a. La voie IRE1-TRAF2-JNK (figure 21)

Il a été démontré que dans les cellules HeLa, la surexpression d'IRE1 induit l'apoptose (Iwawaki et al, 2001).

En effet, suite à un stress prolongé, IRE1 forme un complexe hétérodimérique avec TRAF2 (TNF receptor-associated factor). Ce complexe interagit avec la pro-caspase 12 induisant son clivage (Nakagawa & Yuan, 2000; Nakagawa et al, 2000; Yoneda et al, 2001). La caspase 12 activée clive la pro-caspase 9 qui clive la pro-caspase 3 aboutissant donc à une apoptose (Morishima et al, 2002).

De plus, le complexe IRE1/TRAF2 permet le recrutement de ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) (Nishitoh et al, 2002), qui active JNK (c-Jun N-terminal kinase 1) (Urano et al, 2000). JNK est responsable de l'activation d'une cascade de signalisation apoptotique comprenant l'inhibition de la protéine anti-apoptotique, Bcl-2 (Yamamoto et al, 1999) et l'activation de la protéine pro-apoptotique Bim (Putcha et al, 2003).

b. Le facteur de transcription CHOP (figure 21)

Les facteurs de transcription ATF6 (Gotoh et al, 2002) et ATF4 (Fawcett et al, 1999; Harding et al, 2000) activent la transcription du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (C/EBP homologous protein).

Il a été démontré que la surexpression du facteur de transcription CHOP induit une apoptose (Gotoh et al, 2002) et les cellules MEF CHOP$^{-/-}$ sont résistantes à l'apoptose initiée par le stress du RE (McCullough et al, 2001; Zinszner et al, 1998). De plus, la diminution de la masse des cellules β pancréatiques, dans un modèle de souris diabétique, est accompagnée d'une induction de CHOP (Oyadomari et al, 2002).

Au niveau moléculaire, CHOP régule négativement la transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (McCullough et al, 2001), induit la transcription des deux protéines pro-apoptotiques : PUMA conduisant à l'activation de Bax (Cazanave et al, 2010), et Bim conduisant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et donc la mort cellulaire (Puthalakath et al, 2007) et elle induit la translocation de la protéine pro-apoptotique Bax du

cytosol vers la mitochondrie pour provoquer le relargage du cytochrome C (Gotoh et al, 2004).

c. La caspase 12 (figure 21)

Lorsque le stress du RE se prolonge, les protéines pro-apoptotiques Bak et Bax se dimérisent au niveau de la membrane du RE et de la mitochondrie, entraînant une fuite de calcium dans le cytosol. Ce calcium libéré active la protéase calpaïne (dépendante de Ca^{2+}) qui clive et active la pro-caspase 12 (Orrenius et al, 2003). La caspase 12 active une cascade de signalisation conduisant à l'apoptose.

En effet, des cellules MEF caspase $12^{-/-}$, soumises à un stress du RE, sont protégées contre l'apoptose (Nakagawa et al, 2000).

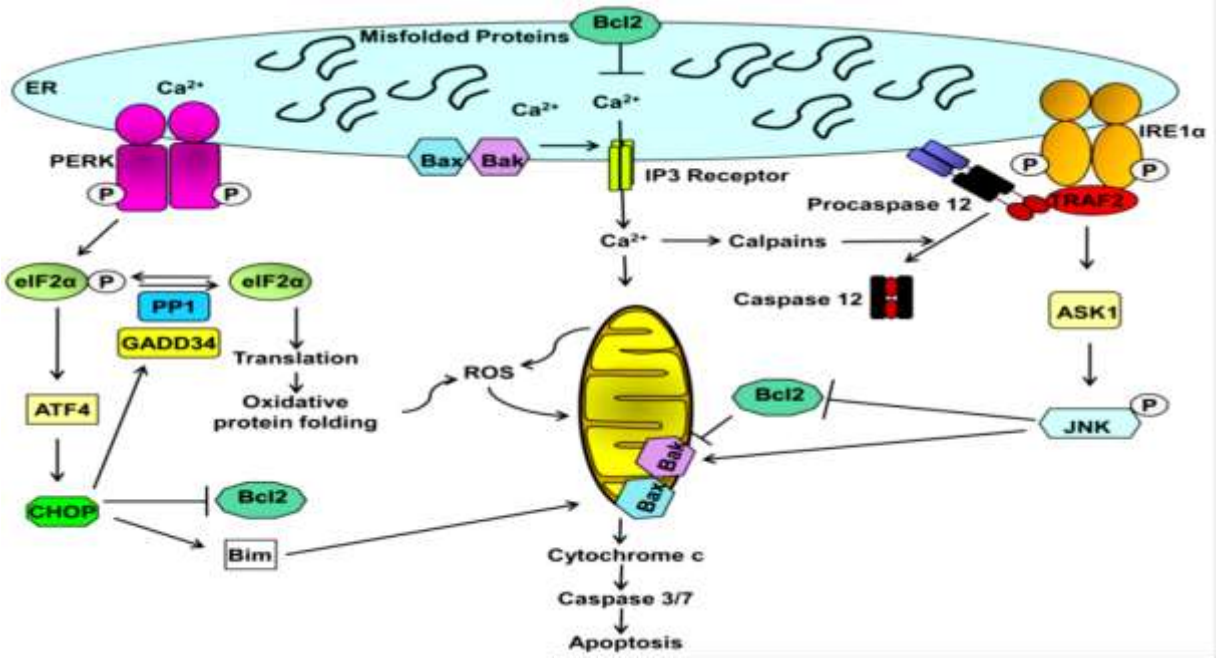


Figure 21: Activation de l'apoptose suite à un stress du RE prolongé, modifié d'après (Malhi & Kaufman, 2011).

Un stress prolongé du RE est associé à la mort cellulaire. Les protéines pro-apoptotique Bax et Bak ainsi que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 sont localisées au niveau de la membrane du RE et régulent l'homéostasie du calcium. Le calcium libéré du RE active les calpaïnes qui clivent la pro-caspase 12 induisant l'apoptose. Les effecteurs de la caspase 12 est la caspase 9 activant la pro-caspase 3. CHOP induit la transcription de la protéine pro-apoptotique Bim et inhibe la transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. JNK est activé par le complexe IRE1/TRAF2. Il active la famille des protéines pro-apoptotiques et inhibe la famille des protéines anti-apoptotiques.

II.4. Interactions entre le stress du RE et les autres formes de stress (figure 22)

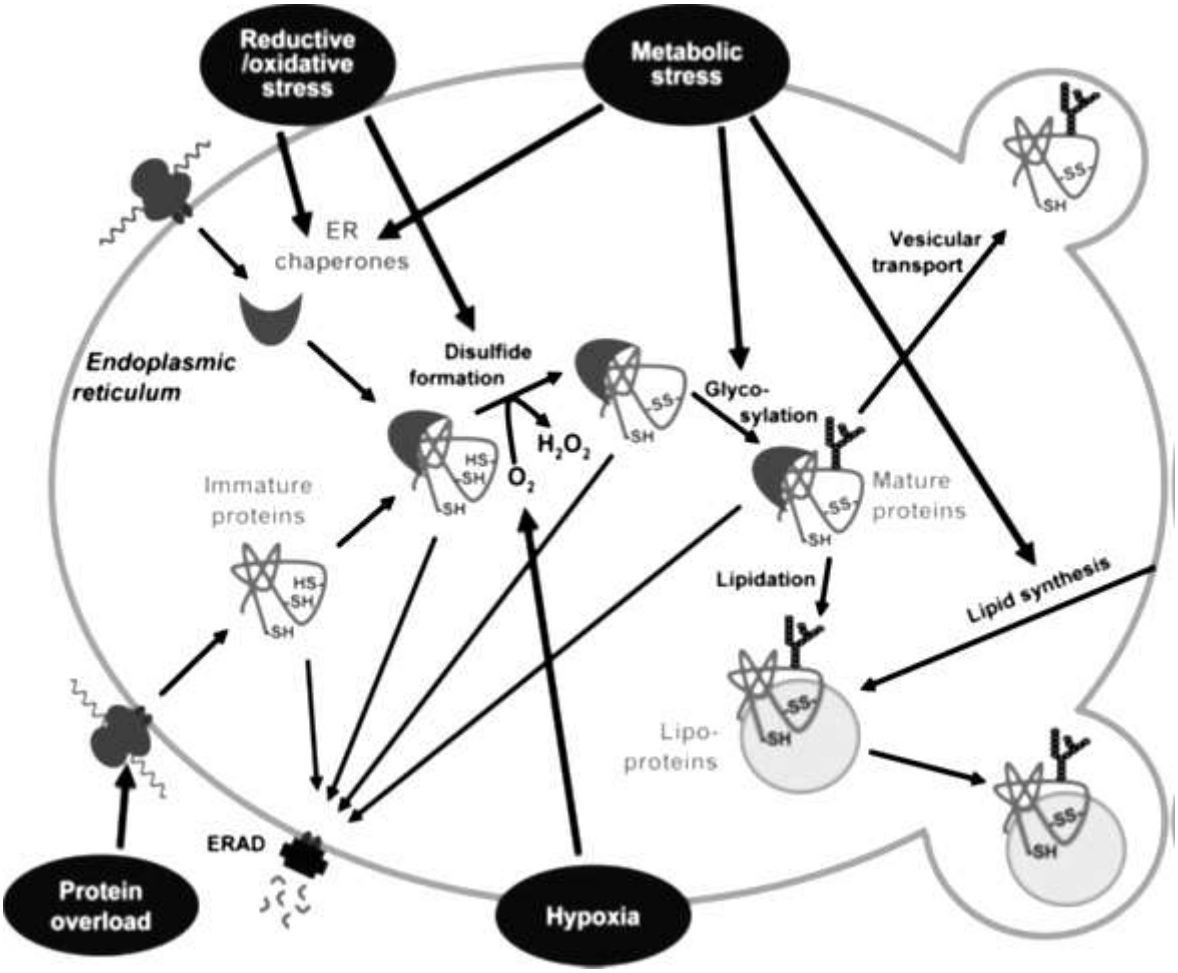


Figure 22: Interaction du stress du RE avec le stress oxydant et le stress métabolique (d'après (Mandl et al, 2013).

La cellule peut être exposée à un excès des espèces réactives d'oxygène (ROS) ou d'une perturbation de l'apport en glucose, acides aminés et acides gras, ce qui induit des stress oxydants et métaboliques. Ceux-ci influent sur les protéines chaperons, la formation des ponts disulfures et la glycosylation des protéines. Ils ont un effet direct sur le processus de repliement, ils induisent donc une accumulation des protéines mal repliées et un stress du RE.

a. Stress métabolique et stress du RE

Les pathologies associées au syndrome métabolique, comme l'obésité, la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires, sont devenues l'une des plus graves menaces pour la santé humaine. Au cours de la dernière décennie, il est devenu clair

que l'obésité est associée à l'activation d'un stress cellulaire (Hotamisligil, 2003). Un acteur clé dans la réponse au stress cellulaire est le RE.

Les perturbations métaboliques provoquent un trouble de l'homéostasie du RE, conduisent à l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE (Hampton, 2000; Harding et al, 2002; Mori, 2000), induisent un stress du RE et activent le système UPR. Parmi les conditions métaboliques déclenchant le stress du RE, on cite : le glucose et l'hyperinsulinémie, la carence en nutriments et les lipides (Kharroubi et al, 2004). Il a été démontré que le stress du RE émerge du stress métabolique surtout celui causant l'obésité (Ozcan et al, 2004). L'accumulation de cholestérol dans les membranes du réticulum endoplasmique (RE) peut causer un stress du RE (Muoio & Newgard, 2004). L'augmentation des réserves adipeuses peut également favoriser le stress du RE dans certains tissus insulino-sensibles, comme le foie des souris obèses (Muoio & Newgard, 2004).

La perturbation de l'apport en glucose, acides aminés et acides gras (paragraphe II.1.f) provoque un stress du RE suite à un stress métabolique.

b. Stress oxydant et stress du RE

Nous avons vu dans le paragraphe II.1.c que lors de la formation des ponts disulfures, le RE produit des espèces réactives d'oxygène (ROS). Ces ROS rendent le RE sensible au stress oxydant. Il a été démontré qu'un stress oxydant peut induire une inactivation des protéines chaperons et des protéines de contrôle qualité du RE ainsi qu'une formation incontrôlée des ponts disulfures (Stadtman & Levine, 2003).

Lors d'un stress oxydant, la voie UPR sera activée, principalement la voie PERK.

Celle-ci fait intervenir le facteur de transcription Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) pour lutter contre le stress oxydant (Cullinan & Diehl, 2004). Nrf2 se fixe au niveau du promoteur du gène d'ATF4 (Miyamoto et al, 2011). De plus, la protéine Nrf2 forme un complexe avec la protéine ATF4 (He et al, 2001).

Ce complexe a plusieurs gènes cibles, on cite :

- l'hème oxygénase 1 (HO-1) : une enzyme catalysant la réaction de la dégradation de l'hème et produisant l'antioxydant bilirubine (He et al, 2001).
- la NAD(P)H quinone oxydoréductase (NQO) : une enzyme catalysant la réduction des quinones, afin d'éviter la participation de leurs électrons dans un stress oxydant (He et al, 2001).
- la gamma-glutamylcystéine synthase : une enzyme catalysant la biosynthèse de glutathion (Ehren & Maher, 2013).

- la glutathion S-transférase : une enzyme conjuguant les radicaux libres avec le glutathion (Huang et al, 2000; Ishii et al, 2000; Venugopal & Jaiswal, 1996; Wild et al, 1999).

De plus, les ROS provoquent des dommages au niveau du RE et induisent la mort cellulaire par activation de CHOP (Hayashi et al, 2005; Prasad et al, 2011). CHOP génère également des ROS (McCullough et al, 2001; Voehringer, 1999) et interfère avec la synthèse de glutathion par un mécanisme qui reste inconnu (Kumar et al, 2012).

ATF4 est nécessaire à l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de glutathion, permettant ainsi la protection contre le stress oxydant (Lu, 1999). La déficience des cellules en ATF4 provoque l'inactivation des gènes de protection contre le stress oxydant (Harding et al, 2003).

Lors de la formation des ponts disulfures, PDI réduite sera réoxydée par la protéine ERO1 (ER Oxidoreductin 1). Sachant que la réponse UPR active une protéine RIB1, nécessaire pour l'activité d'ERO1 et induisant sa surexpression, il a été démontré que la surexpression d'ERO1 induit une augmentation de ROS (Haynes et al, 2004), une diminution de la GSH (Cuozzo & Kaiser, 1999) et une augmentation du stress oxydant via l'inhibition de l'activité de glutathion (Haynes et al, 2004) et l'augmentation des radicaux libres.

En conclusion, le stress du RE et le stress oxydant sont liés.

II.5. SIRT1 et stress du RE

a. SIRT1 et son rôle biologique

La sirtuin 1 déacétylase (SIRT1) est un homologue de SIR2 (silent information regulator 2) présent chez les levures. Elle catalyse la déacétylation des histones et des protéines de façon NAD-dépendante, et régule ainsi un grand nombre de fonctions cellulaires. Elle a été identifiée comme un facteur de répression transcriptionnelle au niveau des télomères et de l'ADN ribosomal (Brachmann et al, 1995; Ivy et al, 1986; Smith & Boeke, 1997) et sa surexpression prolonge la durée de vie des levures (Kaeberlein et al, 1999) et du ver *Caenohabditis elegans* (Tissenbaum & Guarente, 2001). Bien que les modalités précises du rôle de SIR2 dans le prolongement de la durée de vie demeurent inconnues, son rôle dans le maintien de la stabilité du génome et la réparation de l'ADN, ainsi que son implication dans la réponse au stress oxydant et dans la signalisation insuline/ IGF-1, sont probablement tous en rapport avec sa fonction de prolonger la durée de vie.

Des études menées dans notre laboratoire ont montré que des jeunes rongeurs issus d'une mère carencée en donneurs de groupements méthyles (folates et B12) présentent une accumulation des graisses dans le cœur et le foie (Garcia et al, 2011; Pooya et al, 2012).

Cette carence induit une hypertrophie cardiaque, altère l'oxydation mitochondriale des acides gras et diminue l'activité des complexes I et II de la chaine respiratoire chez ces jeunes rongeurs (Garcia et al, 2011). Ces modifications ont été liées à une diminution de l'expression de PPAR-α (peroxisome proliferator-activated receptor), d'ERR-α (estrogen-related receptor α), ainsi qu'un déséquilibre du rapport méthylation/acétylation de PGC-1α (proliferator activated receptor γ coactivator-1α) suite à une réduction de l'expression et de l'activité de la déacétylase SIRT1 (Garcia et al, 2011).

Chez les mammifères, la diminution de l'expression de SIRT1 est liée à la différenciation cellulaire, au vieillissement, à la sénescence ainsi qu'à diverses manifestations pathologiques telles que la résistance à l'insuline et un sévère stress oxydant (Kwon & Ott, 2008). Son rôle en tant que protéine de réponse au stress a tout d'abord été mis en évidence par son interaction avec les protéines p53 et FOXO3 (forkhead box family protein 3), induisant une diminution des dommages de l'ADN et de stress oxydant (Brunet et al, 2004; Luo et al, 2001). L'association de SIRT1 avec p53 et FOXO3, lui permet de les déacétyler. La déacétylation de p53 la rend moins active pour induire l'apoptose et la sénescence, alors que la déacétylation de FOXO3 potentialise son activité transcriptionnelle, conduisant à la surexpression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN (Chen et al, 2005).

Un autre acteur clé de la réponse au stress dépendante de SIRT1 est la protéine HSF1 (Heat Shock Factor 1), dont l'activation augmente la transcription de chaperons moléculaires tels que HSP70 et HSP90. SIRT1 déacétyle HSF1 et potentialise sa liaison au promoteur des gènes des chaperons moléculaires (Chen et al, 2005). L'activation de SIRT1 participe ainsi à la protection des cellules contre les contraintes liées aux protéines endommagées, mal repliées ou agrégées.

En plus de son rôle dans la protection contre les stress lié aux dommages d'ADN, aux protéines mal repliées et au stress oxydant, SIRT1 protège aussi la cellule contre le stress provoqué par une insuffisance nutritionnelle (Grimm et al, 2011; Strum et al, 2009). L'expression de SIRT1 est réduite chez les rongeurs ayant une alimentation déficiente en donneurs de méthyles ou riche en graisses ou en glucose (saccharose) (Chen et al, 2010; Deng et al, 2007; Heyward et al, 2012; Tang et al, 2012).

b. Implication de SIRT1 dans le stress du RE

Plusieurs études montrent l'implication de SIRT1 dans l'induction de stress du RE.

En effet, il a été démontré que la surexpression hépatique de SIRT1 atténue le stress du RE en inhibant la réponse UPR (Li et al, 2011).

De plus, SIRT1 atténue le stress du RE induit par les palmitates et ceci en activant la protéine chaperon ORP150 (Jung et al, 2012).

L'utilisation de resveratrol, un activateur de SIRT1, induit l'activation de IRE1α et l'épissage de l'ARNm de XBP1 et par suite une activation du stress du RE (Wang et al, 2011b).

Sachant que SIRT1 déacétyle XBP1 et inhibe son activité transcriptionnelle, des cellules MEF $SIRT1^{-/-}$ présentent une résistance au stress du RE, tendant vers une apoptose plus importante que celle trouvée chez les MEF $SIRT^{+/+}$ (Wang et al, 2011a).

II.6. Carence en vitamine B12 et stress du RE

Il n'a jamais été proposé de lien direct entre la carence en vitamine B12 et le stress du RE. En 2013, un article récent (Adaikalakoteswari et al, 2013) présente un lien entre la carence en B12 et le stress du RE mais via l'augmentation de l'homocystéine. En effet, il est connu que l'homocystéine induit un stress du RE (Belal et al, 2012).

Comme nous avons vu dans le chapitre 1, l'homocystéine est un intermédiaire essentiel à la synthèse de méthionine et de cystéine. Son groupement thiol réactif est facilement oxydé et crée des radicaux libres induisant un stress oxydant et des dysfonctionnements cellulaires (Welch & Loscalzo, 1998). De plus, l'homocystéine peut perturber le repliement des protéines au sein du RE en formant des ponts disulfures illégitimes avec les cystéines (Lentz & Sadler, 1993). Des cellules cultivées en présence d'homocystéine présentent une augmentation de l'expression des gènes cibles de la réponse UPR notamment BiP, GRP94, CHOP et ATF4 (Kokame et al, 1996; Outinen et al, 1999; Werstuck et al, 2001; Zhang et al, 2001).

Pour résumer, la carence en B12 induit l'accumulation de l'homocystéine qui provoque un stress oxydant causant un stress du RE.

II.7. Pathologies et stress du RE

a. Maladies neurodégénératives

En cas du stress du RE, l'accumulation des protéines mal repliées peut former des agrégats dans le RE ainsi que dans le cytosol. Ces agrégats sont toxiques (Bence et al, 2001). En effet, les neurones sont sensibles aux agrégats protéiques et plusieurs études montrent l'implication de stress du RE dans l'induction des maladies neurodégénératives (Althausen et al, 2001; Deslauriers et al, 2011; Hayashi et al, 2005; Hoozemans et al, 2005; Lin & Popko, 2009; Milhavet et al, 2002; Unterberger et al, 2006).

Il a été démontré que le stress du RE est un médiateur de la sclérose en plaques (Deslauriers et al, 2011; Lin & Popko, 2009). L'étude de Deslauriers *et al.* (2011) montre une augmentation de GRP78 et de l'épissage de XBP1 chez ces patients.

Le stress du RE est activé en cas de la maladie d'Alzheimer. Les patients ont une activation de la voie PERK (Unterberger et al, 2006) et une surexpression des protéines chaperons (Hoozemans et al, 2005). Les souris qui servent de modèle pour la maladie d'Alzheimer présentent une augmentation de CHOP, un marqueur de stress du RE-induisant la mort cellulaire (Milhavet et al, 2002).

Une des causes de la maladie de Parkinson est la mutation du gène Parkin, une protéine ligase de l'ubiquitine. En effet, l'expression de la protéine Parkin est augmentée lors d'un stress du RE et la surexpression de Parkin non mutée dans les cellules neuronales leur confère une résistance au stress du RE en inhibant la mort cellulaire (Doyle et al, 2011; Oyadomari & Mori, 2004).

De plus, le stress du RE est impliqué dans l'induction de l'ischémie neuronale. Des souris atteintes d'ischémie neuronale ont une augmentation de phospho-eIF2α (Althausen et al, 2001), de CHOP et d'ATF4 (Hayashi et al, 2005).

b. Cancer

Des études effectuées sur des tumeurs humaines, animales et des lignées cellulaires de cancer du sein, de carcinome hépatocellulaire, de tumeur gastrique ou d'adénocarcinome, montrent une activation du stress du RE ainsi qu'une réponse UPR assurant la survie de ces cellules cancéreuses (Dery et al, 2013; Tsai & Weissman, 2010).

Des cellules tumorales $PERK^{-/-}$ sont plus petites et moins viables que les cellules $PERK^{+/+}$, suggérant que PERK permettrait la survie des cellules tumorales (Blais & Bell, 2006).

Dans les cellules tumorales, les caractéristiques protectrices de la réponse UPR assurent une survie et une prolifération continue même sous traitement par chimiothérapie. L'activité persistante de ces voies de survie, principalement dans les cellules tumorales, pourrait constituer une cible thérapeutique (Schonthal, 2012).

c. Inflammation

Une accumulation des espèces réactives d'oxygène (ROS) entraîne une inflammation., dans le RE, la formation des ponts disulfures par la PDI et l'ERO1 (ER Oxidoreductin 1)(Zhang & Kaufman, 2008) génère des ROS. Afin de lutter contre ces ROS, la voie PERK est activée

entraînant la transcription sélective du facteur ATF4 et donc de Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) ce qui induit la transcription de gènes anti-oxydants.
La tunicamycine, inducteur de stress du RE, induit une faible accumulation des ROS dans des cellules sauvages alors qu'elle entraîne une accumulation massive et délétère des ROS dans les cellules ayant une activité nulle de PERK (Cullinan & Diehl, 2004; Harding et al, 2003).
De plus, le stress du RE lutte contre l'inflammation en activant le facteur de transcription NF-κB. En absence de stimuli inflammatoires, NF-κB est cytoplasmique et inactive liée à son inhibiteur (IκB). En réponse au stress du RE, le domaine cytoplasmique d'IRE1 se complexe avec TRAF2 et avec IκB kinase. Cette interaction entraîne la phosphorylation activatrice de IκB kinase qui va inhiber IκB. IκB se dissocie alors de NF-κB ce qui conduit à la dégradation de IκB par le protéasome et à la translocation de NF-κB dans le noyau (Hasnain et al, 2012).
Le stress du RE pourrait induire l'inflammation par un mécanisme indépendant de NF-κB. En effet, la thapsigargine, un fort stimulateur du stress du RE, entraîne une augmentation de la production de cytokines inflammatoires (Peters & Raghavan, 2011).

d. Diabète

Le Diabète dit sucré ou diabète de type II est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie dûe à une diminution de l'action de l'insuline. Le diabète de type I est caractérisé par une destruction des cellules β du pancréas induisant une diminution de la production d'insuline (Eizirik et al, 2008).
Dans une étude effectuée sur des souris Akita, la mutation du gène *Ins2* codant pour le précurseur de l'insuline a entraîné une hyperglycémie et une dimlinution du nombre de cellules β ainsi qu'une augmentation des marqueurs de stress notamment BiP et CHOP (Wang et al, 1999). il a été suggéré que le mal repliement de la pro-insuline serait dû au stress du RE (Sundar Rajan et al, 2007).
La mutation homozygote du gène PERK dans un modèle murin induit l'apoptose des cellules β et l'apparition d'un diabète de type I (Kim et al, 2008a). Finalement, plusieurs études montrent l'induction de la réponse UPR modifie l'équilibre lipidique cellulaire, via l'accumulation d'intermédiaires lipidiques, et conduit à l'insulino-résistance (Samuel & Shulman, 2012).

e. Ischémie-reperfusion (IR)

On observe l'IR dans divers contextes, comme la transplantation d'un organe solide, l'occlusion transitoire des artères cérébrales d'un infarctus du myocarde ou d'une chirurgie cardiovasculaire (Hansson, 2005; Myoishi et al, 2007; Que et al, 2004).

Il a été démontré que le stress du RE est impliqué dans la survenue des lésions d'IR (Xu et al, 2005). En effet, l'ischémie entraine une hypoxie tissulaire et une carence en glucose ce qui provoque un déficit en ATP, une diminution de la concentration intraréticulaire en calcium et une altération de l'activité de BiP. De plus, la reperfusion suivant l'ischémie induit un stress oxydant altérant le statut redox et conduisant à la formation de protéines mal conformées (Sheridan & Bonventre, 2000).

f. Maladies cardiovasculaires

Le stress du RE est aussi impliqué dans les maladies cardiovasculaires comme l'hypertrophie cardiaque et l'insuffisance cardiaque (Jain, 2013).

L'hypertrophie cardiaque est caractérisée par une augmentation de la taille des cardiomyocytes sans qu'ils ne subissent de division cellulaire.

Bien que cette hypertrophie serve à compenser la fonction cardiaque, l'hypertrophie prolongée peut devenir préjudiciable, et induire un dysfonctionnement cardiaque (Wang et al, 2004). Chez les patients présentant une hypertrophie cardiaque, l'analyse morphologique des cellules de cœur dégénérées montre une dilatation des citernes du RE, ce qui est un indicateur d'un stress du RE (Maron et al, 1975). Plusieurs études ont constaté une augmentation marquée de l'expression de GRP78, en cas d'hypertrophie cardiaque, ce qui suggère l'association entre l'activation de la réponse UPR et l'insuffisance cardiaque chez l'homme (Dally et al, 2009).

De plus, chez les souris, le stress du RE prolongé induit une apoptose CHOP-dépendante en cas d'insuffisance cardiaque mais pas d'hypertrophie cardiaque, suggérant que la mort cellulaire CHOP-dépendante peut être impliquée dans la transition de l'hypertrophie cardiaque à l'insuffisance cardiaque (Minamino & Kitakaze, 2010).

OBJECTIFS D'ETUDE

Les cellules sont constamment soumises à des contraintes environnementales, notamment l'abondance ou le manque des nutriments essentiels. Dans ce conditions, les cellules peuvent rapidement réduire la traduction et la prolifération cellulaire afin d'assurer leur survie (Spriggs et al, 2010). Un de ces nutriments est la vitamine B12, jouant un rôle majeur dans les régulations épigénomiques dépendantes de la S-adénosyl méthionine (SAM) et dont la carence produit des troubles neurodégénératifs et cognitifs par des mécanismes inconnus. La compréhension de ces mécanismes est d'une grande importance, compte tenu du rôle clé de la vitamine B12 au cours de la périnatalité et du vieillissement. En effet, la carence en vitamine B12 est associée à un développement cognitif anormal (Bhate et al, 2008) et à des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et le Parkinson (Garrod et al, 2008; McCaddon, 2006).

Afin d'induire une déficience en B12, notre laboratoire a précédemment établi un modèle de cellules neuronales dopaminergiques NIE115 carencées en vitamine B12, ceci par l'ancrage de la transcobalamine, une protéine de liaison ayant une haute affinité pour la vitamine B12, au niveau du RE grâce à sa fusion à l'oléosine (Battaglia-Hsu et al, 2009; Pons et al, 2009). La protéine chimère transcobalamine-oléosine (TO) réduit la disponibilité cellulaire en B12 dirigée vers le cytoplasme et la mitochondrie. Ceci provoque la diminution de l'activité de la méthionine synthase et une diminution de la SAM biodisponible. La conformation de la protéine chimère oléosine-transcobalamine (OT) ne permet pas la liaison de la B12. Les cellules OT constituent donc un contrôle négatif.

De plus, sachant que le plasmide de transfection comporte la G418 nécessaire pour la sélection des cellules transfectées, les cellules TO et OT sont en permanence cultivées en présence de G418 pouvant provoquer un stress (Jin et al, 2004).

Les conséquences les plus marquées dans les cellules TO comprennent une diminution de la prolifération, une augmentation de la différenciation et de l'apoptose (Battaglia-Hsu et al, 2009; Orozco-Barrios et al, 2009). Ces changements sont parmi les signes associés à un vieillissement prématuré et à la mort cellulaire, et ils portent certaines ressemblances avec ceux observés dans les cellules soumises au stress.

La carence en vitamine B12 n'a jamais été documentée comme inducteur direct de stress du RE. Il est connu qu'elle provoque indirectement un stress du RE par l'accumulation de l'homocystéine (Adaikalakoteswari et al, 2013).

Notre objectif est donc de répondre à quatre grandes questions :

1- Pourquoi la carence en vitamine B12 induit-elle une diminution de la prolifération, une augmentation de la différenciation et de l'apoptose ? Est-ce dû à un stress du RE ?

2- Sachant que la carence en donneurs de groupements méthyles provoque une hypertrophie du myocarde et une altération de l'oxydation des acides gras suite à une réduction de la déacétylase SIRT1 (Garcia et al, 2011), est-ce que la carence en vitamine B12 induit un stress du RE suite à l'altération de l'expression de SIRT1 ?

3- La carence en vitamine B12 peut-elle directement induire un stress du RE (et non pas indirectement suite à l'accumulation de l'homocystéine) ?

4- Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de ce stress? Sont-ils dépendants de la méthylation?

RESULTATS

I. La carence en vitamine B12 induit un stress du RE

La présence d'un important stress cellulaire dans les cellules TO déficientes en B12 est tout d'abord identifié par l'augmentation du niveau protéique des transducteurs de stress du RE, P-PERK, P-IRE1α et ATF6 (figure 23) ainsi que par la phosphorylation élevée du facteur d'initiation de la traduction (P-eIF2α) et ceci en les comparant avec les cellules contrôles OT. Etant donné que le niveau élevé de P-eIF2α dans les cellules TO peut être inversé par l'addition de la vitamine B12 ou la SAM, nous suggérons que cette réponse au stress est B12-dépendante et méthylation-dépendante (figure 23).

Pendant le stress du RE, l'activation d'ATF6 implique sa translocation du RE vers le noyau via l'appareil de Golgi (Chen et al, 2002), nous avons donc utilisé la technique d'immunofluorescence pour examiner la translocation d'ATF6 et nous avons constaté que dans les cellules carencées TO, ATF6 est nucléaire dans ~ 20% des cellules ($p < 0,001$) comparativement aux cellules contrôles OT où ATF6 est nucléaire dans près de 10% des cellules (figure 24). Ces résultats suggèrent que l'activation d'ATF6 a lieu après la protéolyse effectuée dans le compartiment de golgi (Shen & Prywes, 2005).). De plus, le traitement par SAM et par la vitamine B12 des cellules carencées induit une diminution du pourcentage d'ATF6 nucléaire à environ 13% (pour le traitement SAM) et 10% (pour le traitement B12).

Etant donné que la phosphorylation de la sérine 51 d'eIF2α est une réponse à de multiples stress cellulaires, y compris ceux induits par des perturbations nutritionnelles, nous avons étudié les kinases impliquées dans cette phosphorylation. La forte augmentation du niveau de P-eIF2α observée dans les cellules TO est principalement liée au stress du RE, compte tenu de l'augmentation de l'expression de PKR-like kinase du réticulum endoplasmique (PERK) (figure 23) et l'expression inchangée d'autres kinases d'eIF2α, comme PKR (double-stranded RNA-activated protein kinase), GCN2 (general control non-repressed 2) et HRI (heme-regulated eIF2α kinase) (figure 25).

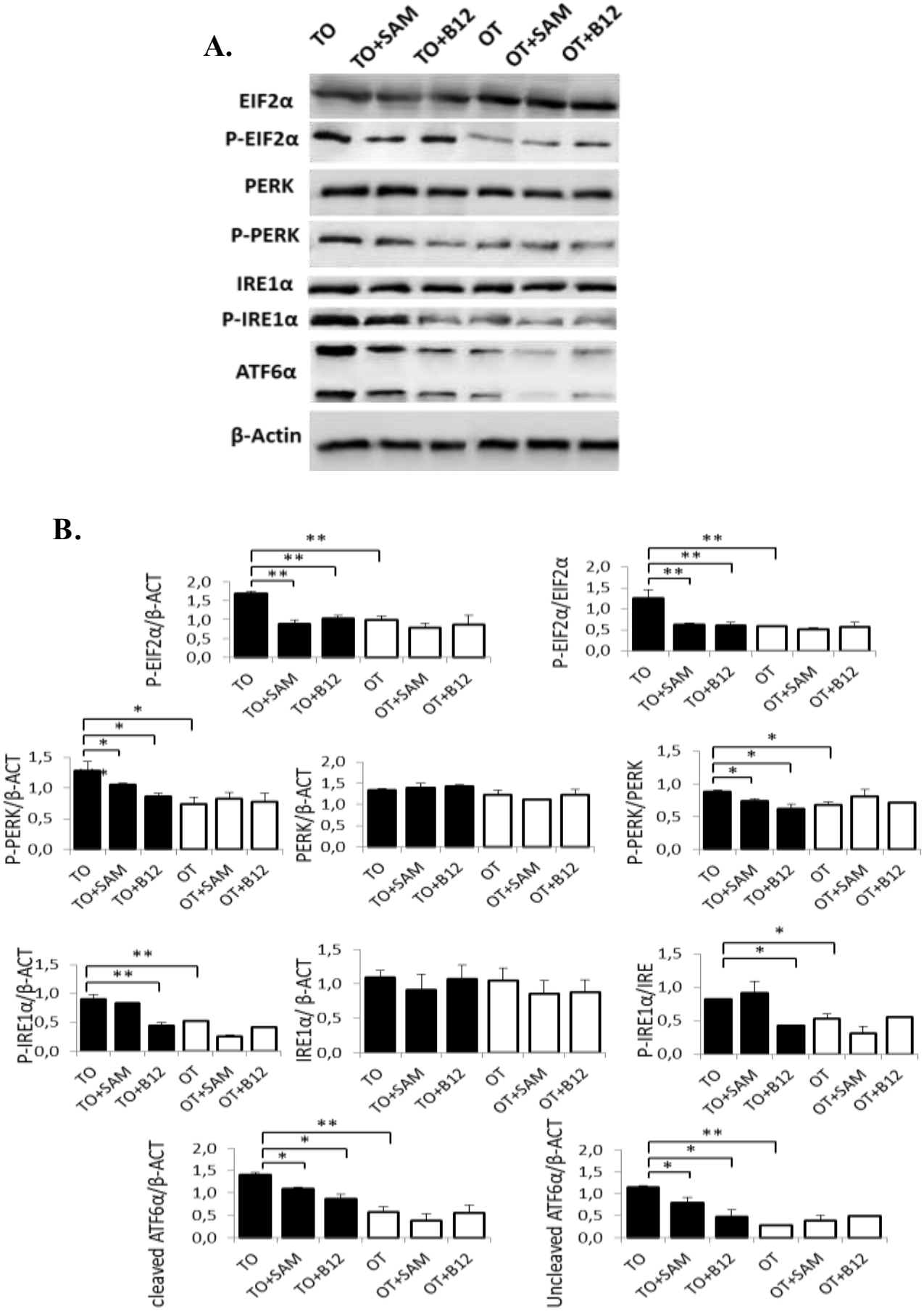

A.
TO
TO+SAM
TO+B12
OT
OT+SAM
OT+B12
EIF2α
P-EIF2α
PERK
P-PERK
IRE1α
P-IRE1α
ATF6α
β-Actin
B.
P-EIF2α/β-ACT
P-EIF2α/EIF2α
P-PERK/β-ACT
PERK/β-ACT
P-PERK/PERK
P-IRE1α/β-ACT
IRE1α/ β-ACT
P-IRE1α/IRE
cleaved ATF6α/β-ACT
Uncleaved ATF6α/β-ACT

Figure 23 : La carence en vitamine B12 induit un stress du RE.

A : Westerns blots présentant eIF2α, eIF2α phosphorylée [P-eIF2α], PERK et sa forme phosphorylée [P-PERK], IRE1α, IRE-1α phosphorylée [P-IRE1α] ainsi qu'ATF6 obtenu à partir des cellules TO déficients en B12 et des cellules contrôles OT avant et après traitement avec la vitamine B12 (20 µM pendant 7 jours) et avec la S-adénosyl méthionine (SAM) (75 µM pendant 5 jours).

B : Analyses densitométriques des blots : Les bandes des protéines sont normalisées par rapport à la β-actine obtenue à partir des mêmes blots. Les ratios de P-eIF-2α/eIF-2α, P-IRE-1α/IRE-1α, P-PERK/PERK sont calculées en utilisant les résultats de la densitométrie. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

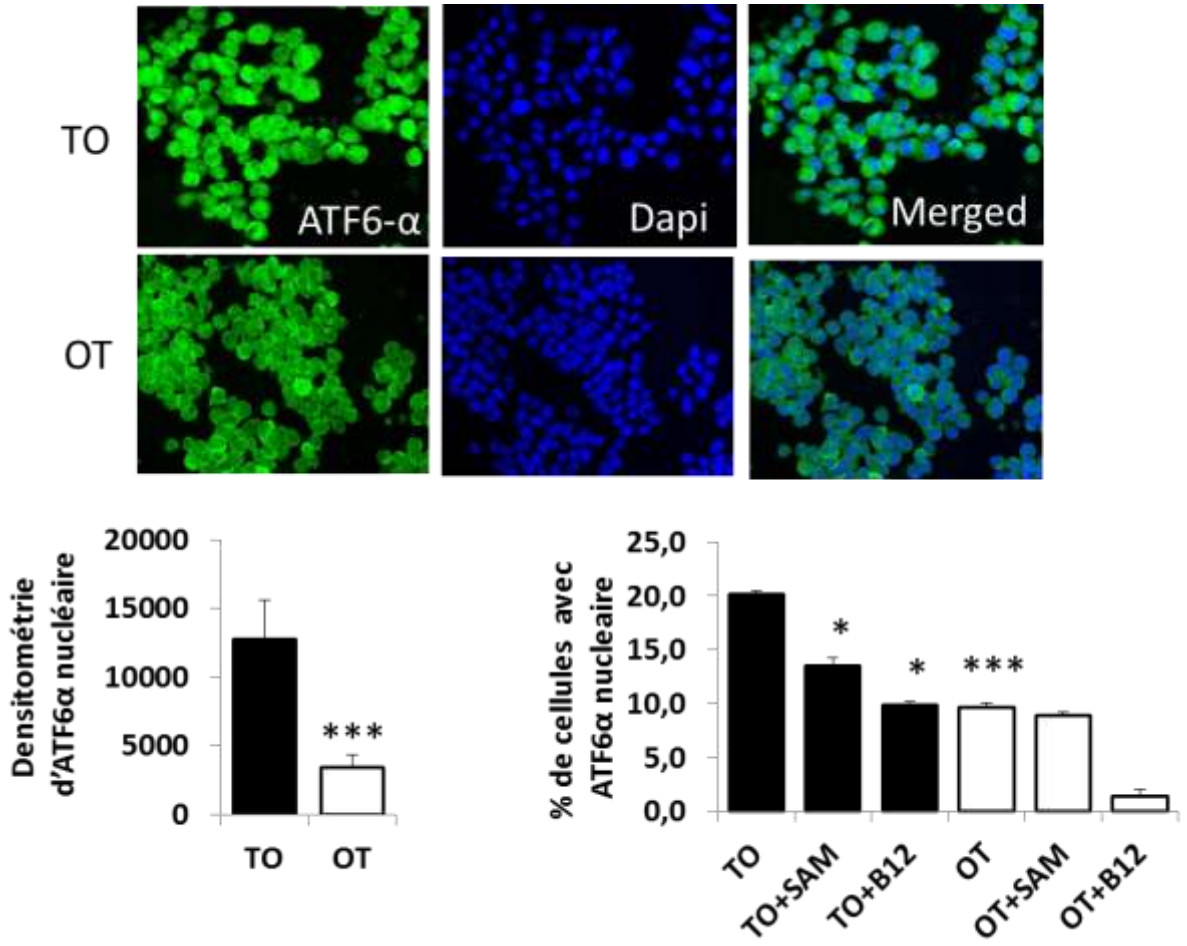


Figure 24 : Dans les cellules carencées en B12, l'augmentation de la forme clivée d'ATF6 est corrélée avec sa localisation nucléaire.

Les cellules carencées en B12 (TO) et les cellules contrôles (OT) sont colorées avec un anticorps anti-ATF6 couplé à l'Alexa 488 (vert) et avec DAPI (bleu) marquant le noyau. Le nombre de cellules ayant un marquage nucléaire dans ces deux types cellulaires est comparé dans plus de 300 cellules et s'est révélé être significativement différent à p <0,0001. De plus, le pourcentage de cellules ayant une localisation nucléaire d'ATF6 est comparé entre TO et OT avant et après traitement par la vitamine B12 et SAM. Avant le traitement, 20% des cellules TO présentent une localisation nucléaire d'ATF6 contre 10% chez les OT ; après traitement SAM et B12, le niveau est réduit, respectivement, à environ 13% et 10% des cellules TO.

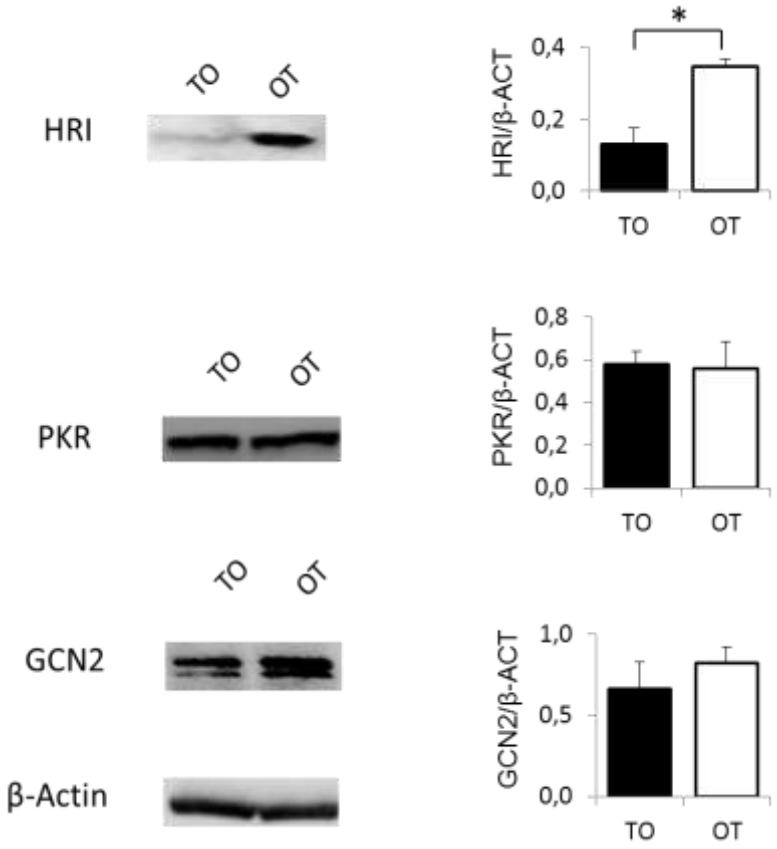


Figure 25: Expression des trois kinases d'eIF2α, PKR (double-stranded RNA-activated protein kinase, GCN2 (general control non-repressed 2) et HRI (heme-regulated eIF2alpha kinase) dans les cellules TO et OT.

L'expression de HRI est diminuée dans les cellules TO (p <0,001), contrairement aux deux autres kinases entre TO et OT. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

II. Activation de XBP, ATF4 et des marqueurs pro-apoptotiques par le stress du RE dans les cellules TO

Afin d'évaluer les conséquences du stress du RE induit par la carence en vitamine B12, nous avons étudié : (1) ATF4 et XBP, deux principaux effecteurs situés immédiatement en aval des trois transducteurs de stress, ainsi que (2) les deux protéines pro-apoptotiques, CHOP et caspase-3 clivée.

Le niveau d'ATF4 augmente dans les cellules carencées (figure 26) probablement à cause de l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2α. L'activation d'ATF4 peut être reversée seulement par l'ajout de B12, mais pas SAM.
L'épissage de XBP par IRE1α de 1U →1S [U= Unspliced (non épissé), S= Spliced (épissé)] est plus important dans les cellules TO (figure 26), confirmant l'activation de la réponse au stress du RE.

Dans les cellules TO, la forte expression des marqueurs pro-apoptotiques CHOP et caspase-3 clivée ainsi que la diminution de la prolifération présentée par une baisse de Ki67 (marqueur de prolifération) montrent que le stress du RE tend vers un stress irréversible et donc vers la mort cellulaire (figure 27). De plus, nous avons effectué un co-marquage entre ATF6 et le marqueur d'apoptose caspase-3 clivée ou le marqueur de la prolifération Ki67. Ce co-marquage montre bien la corrélation entre prolifération/mort cellulaire et le stress du RE (figure 28). Chez les cellules TO, la diminution de Ki67 et l'augmentation de la caspase-3 clivée est bien corrélée avec l'activation de stress du RE et la localisation nucléaire d'ATF6.

Cette réponse au stress des cellules TO est corrélée avec une diminution des chaperons moléculaires BiP, HSP70, HSP90 et HSP27 comparativement aux cellules OT (figure 29).

Etant donné que l'expression réduite des chaperons peut être liée à l'état d'acétylation de HSF1 (Heat Shock Factor 1), un facteur de transcription activant l'expression des protéines chaperons, et que HSF1 est déacétylé par la déacétylase SIRT1, nous avons examiné le rôle de SIRT1 dans l'induction de stress du RE en cas de carence en vitamine B12.

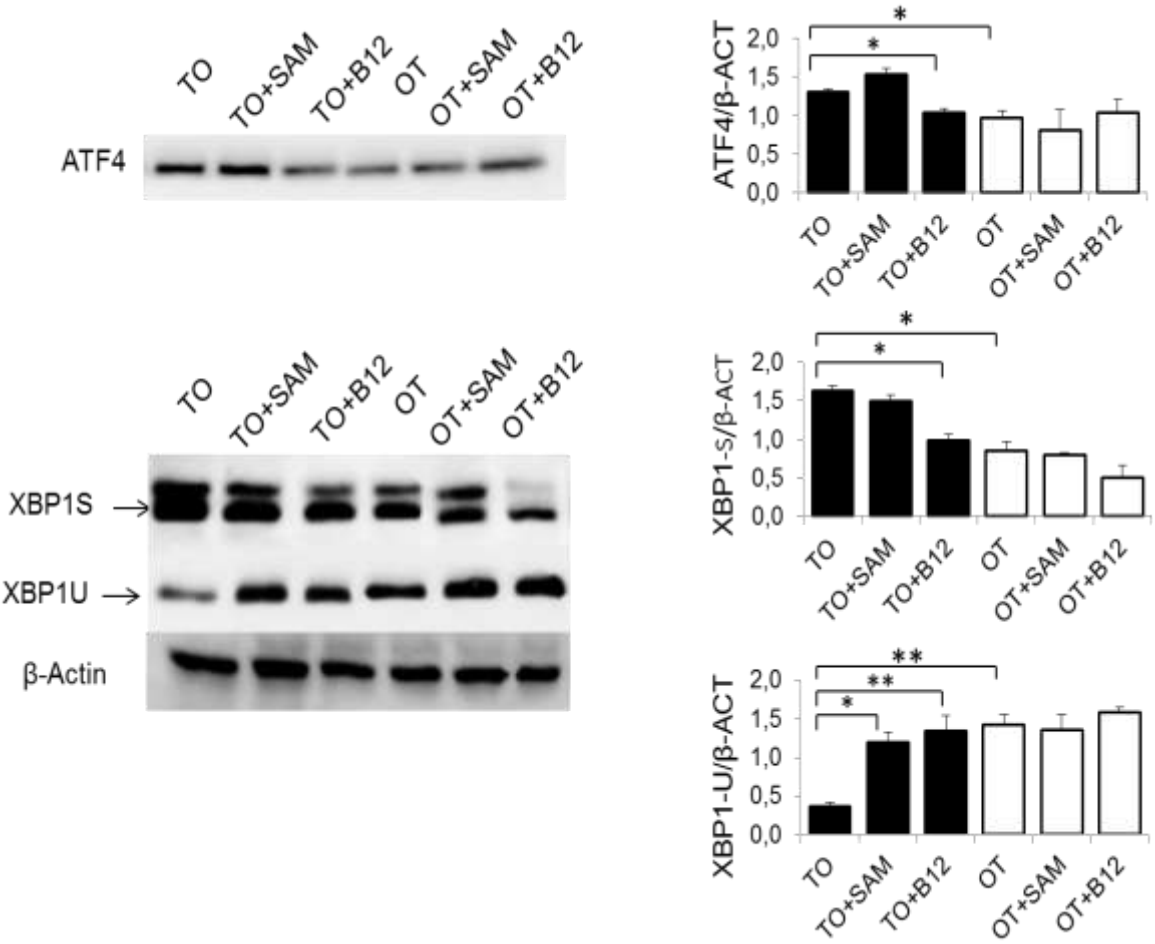


Figure 26: Dans les cellules carencées en B12, XBP et ATF4 sont activés par le stress du RE.

Dans les cellules TO, les voies de signalisation en aval de stress du RE sont activées. Ceci est montré par une augmentation d'ATF4 et de XBP épissé. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

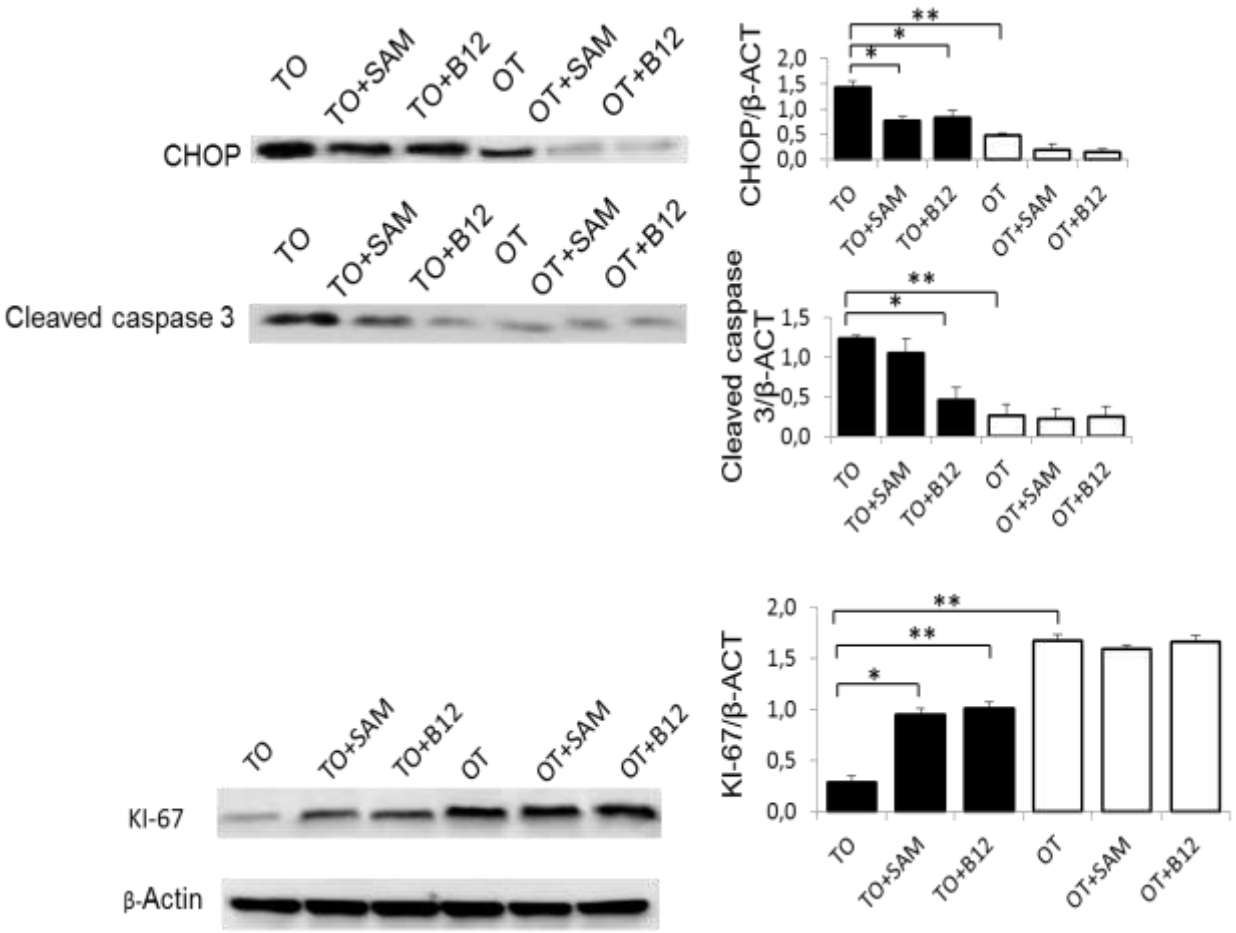


Figure 27: La carence en B12 induit un stress de RE qui tend vers l'apoptose (mal-adaptation).

La carence en B12 induit un stress du RE irréversible. Ceci est montré par une augmentation de l'expression de CHOP, de la caspase-3 clivée et une nette diminution de la prolifération cellulaire (Ki67). Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

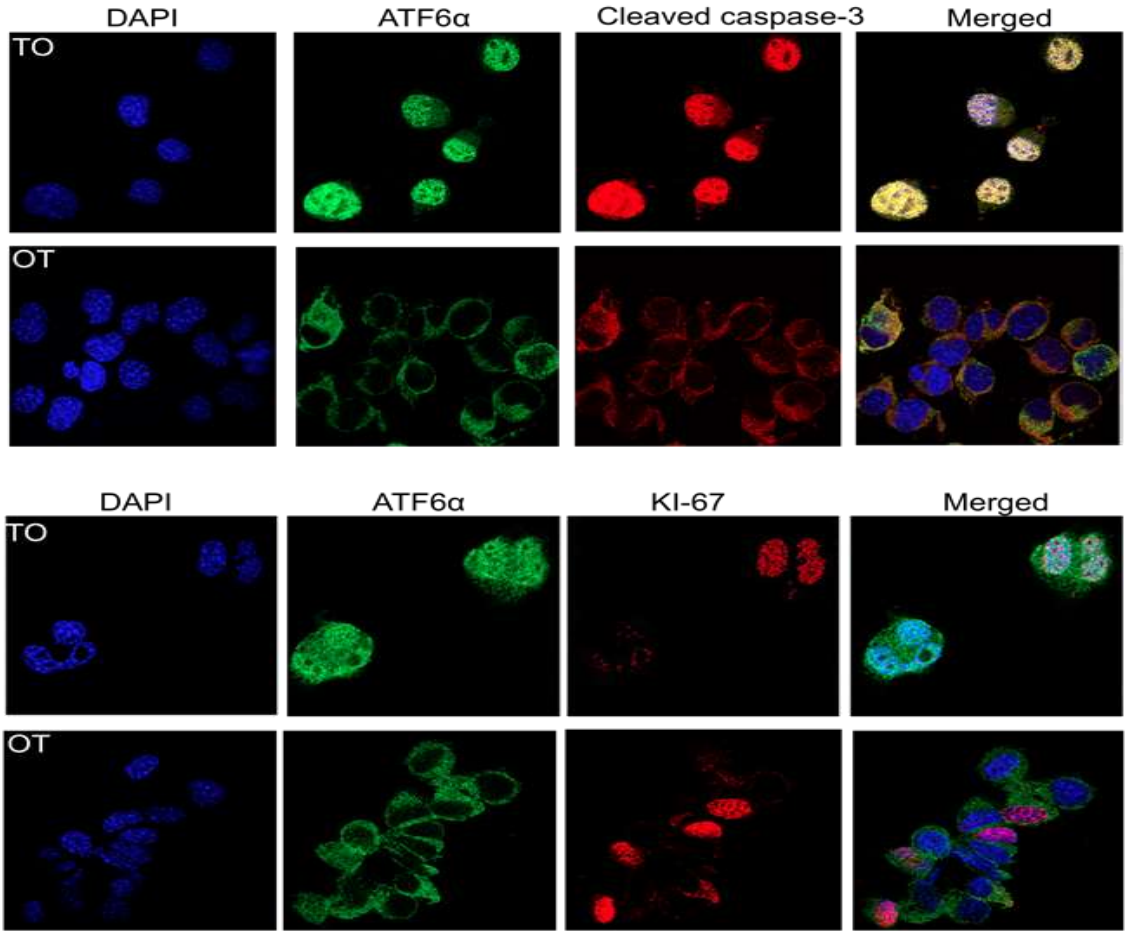


Figure 28: Corrélation entre mort cellulaire/prolifération et stress du RE.

Les images confocales du co-immunomarquage entre ATF6/caspase-3 clivée (marqueur apoptotique) et ATF6/Ki67 (marqueur de prolifération) montrent la corrélation entre mort cellulaire/prolifération et stress du RE. Dans les cellules carencées TO, l'augmentation de la caspase-3 clivée et la diminution de Ki67 sont corrélées avec une localisation nucléaire d'ATF6.

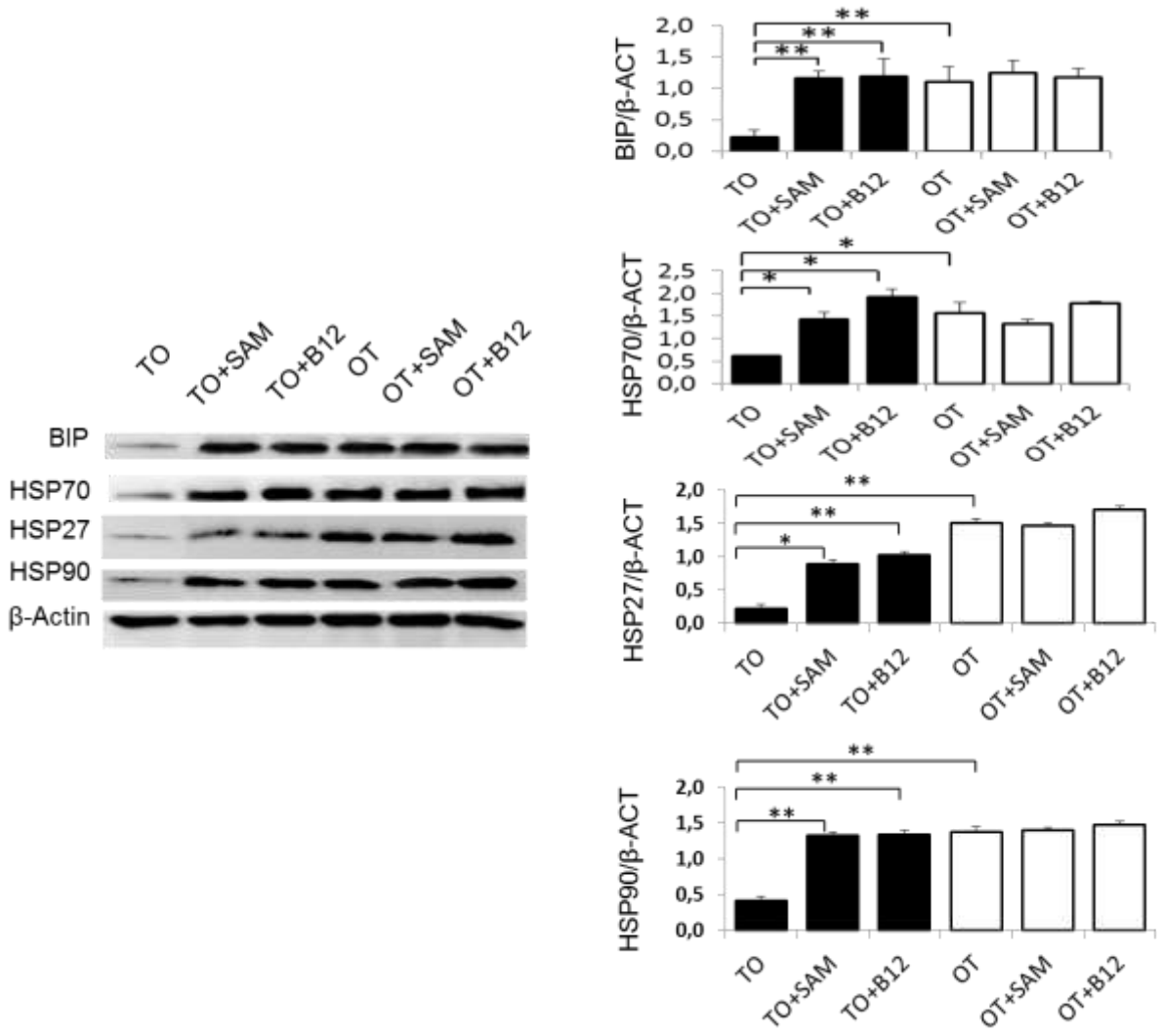


Figure 29: Le stress du RE dans les cellules TO est corrélé avec une diminution des protéines chaperons.

L'activation des transducteurs de stress du RE est liée à la diminution des chaperons BiP, HSP70, HSP27 et HSP90. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

III. Le stress du RE dans les cellules TO est dû à une augmentation de l'acétylation de HSF1 et une diminution de la déacétylase SIRT1

La réponse au stress dépendante de SIRT1 implique HSF1, un facteur de transcription clé capable d'activer les gènes codant pour les protéines chaperons. Il est connu que la déacétylation de HSF1 par SIRT1 induit son activation (Westerheide et al, 2009).
Etant donné que les protéines chaperons sont significativement réduites en cas de carence en B12 (figure 29), nous voulions savoir si ceci est dû à l'acétylation de HSF1 et si cette acétylation est associée à l'expression de SIRT1.

Le western blot de HSF1 montre que la carence en B12 induit sa diminution (figure 30A). De plus, l'immuno-précipitation de HSF1 suivie par un western blot où nous avons utilisé un anticorps anti-acétyl-lysine montre une augmentation d'acétyl-HSF1 dans les cellules carencées (figure 30A). Cet état acétylé dans les cellules carencées est corrélé avec une localisation cytoplasmique de HSF1 (et donc une perturbation de son activité en tant que facteur de transcription) (Figure 230). De plus, dans les cellules TO, les images confocales, obtenues après immunocytofluorescence, montrent que la localisation cytoplasmique de HSF1 est corrélée avec une augmentation de la caspase-3 clivée et une diminution du marqueur de prolifération Ki67 (figure 31).

En accord avec ces résultats, la transcription et l'expression de SIRT1 sont réduites dans les cellules carencées. Cette réduction est B12-dépendante ($p < 0,001$) (figure 32A).
Pour confirmer le lien entre SIRT1 et le stress du RE dans ces cellules, nous avons étudié la réponse au stress du RE dans des cellules traitées avec un activateur ou un inhibiteur de SIRT1. D'une part, nous avons traité les cellules TO avec SRT1720, un activateur de SIRT1, afin de restaurer l'activité diminuée de SIRT1, et d'autre part, nous avons traité les cellules contrôles OT avec EX527, un inhibiteur de SIRT1, dans le but de diminuer l'activité de SIRT1. Comme le montre la figure 32B, l'activation de SIRT1 dans les cellules TO par SRT1720 entraîne une augmentation de l'expression de BiP, une diminution de celle d'ATF4 et de CHOP alors que la répression de l'activité de SIRT1 dans les cellules OT par EX527 conduit à une réduction de BiP et une augmentation d'ATF4 et de CHOP.

L'invalidation de SIRT1 dans les cellules OT, par deux siRNA (siSIRT1) indépendants, induit une diminution de l'expression des chaperons Hsp70 et BiP ($p < 0,01$) et une augmentation de

celle des transducteurs de stress du RE ($p < 0,05$) (figure 32). L'ajout de la vitamine B12 diminue l'expression de ces transducteurs malgré l'inhibition de SIRT1, ce qui suggère un effet protecteur de la vitamine B12 sur le stress du RE (figure 33).

De plus, la surexpression de SIRT1 dans les cellules TO a induit une augmentation du niveau protéique de SIRT1 ($p < 0,001$), contrairement aux cellules OT ($p > 0,05$). Ceci st corrélé avec une réduction significative de stress du RE et une augmentation de la prolifération cellulaire mises en évidence par la réduction de P-IRE1α ($p < 0,05$), P-PERK ($p < 0,05$) et Ki67 ($p < 0,05$) (figure 34). Ces changements sont probablement dus à l'augmentation de l'expression des protéines chaperons ($p < 0,05$) dans les cellules TO (figure 34) suite à l'augmentation de HSF1 causée par la surexpression de SIRT1.

Toutes ces données suggèrent que le stress du RE dans les cellules déficientes en vitamine B12 est causé par une diminution de l'expression de SIRT1 et une augmentation de l'acétylation de HSF1.

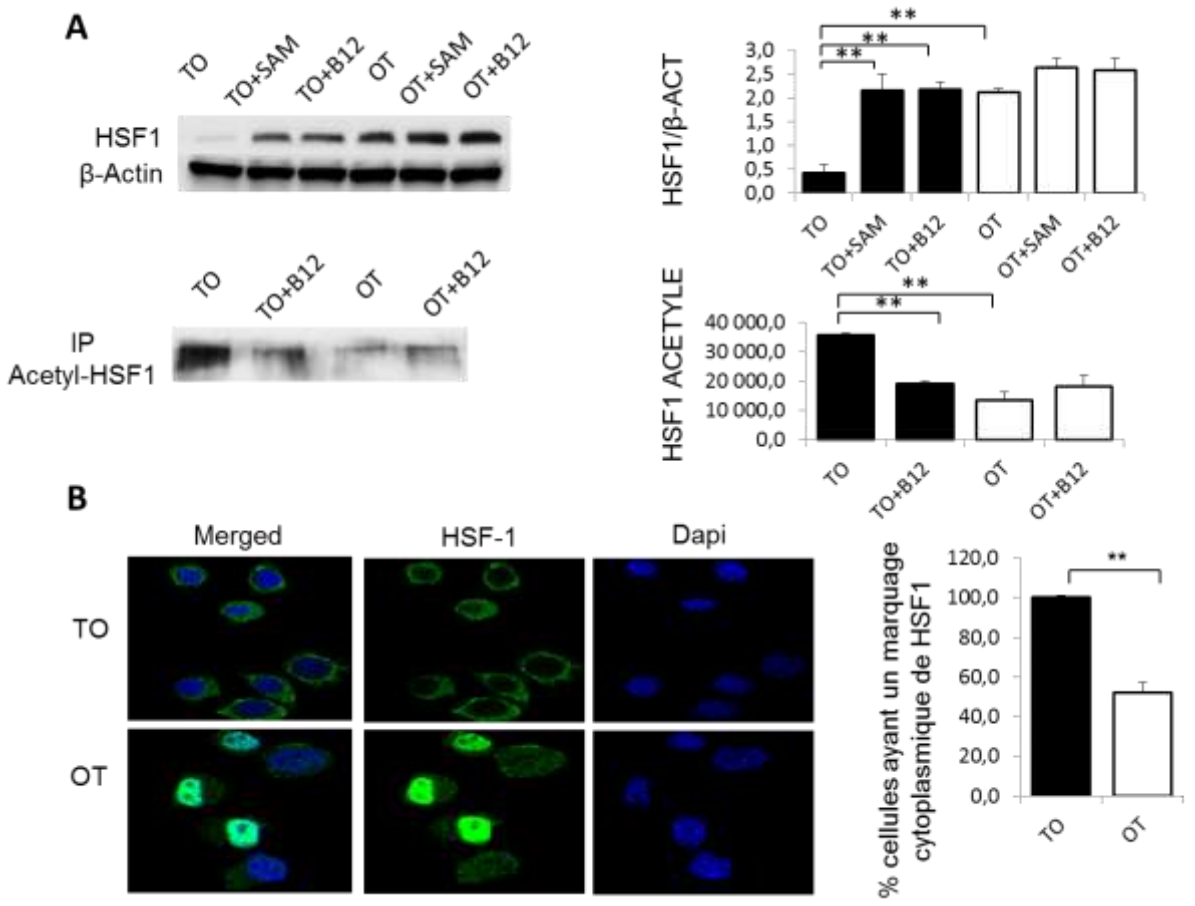


Figure 30: La carence en B12 induit une inactivation et une diminution de l'expression de HSF1.

A : Dans les cellules TO, la protéine HSF1 est significativement réduite comparativement aux cellules contrôles OT ($p<0.01$). De plus, HSF1 est fortement acétylé dans les cellules TO ($p<0.01$).

B : L'immunofluorescence de la protéine HSF1 (vert) montre un marquage 100% cytoplasmique chez les TO comparativement aux cellules OT où dans 50% des cellules, HSF1 est nucléaire ($p<0.0001$). Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 300 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

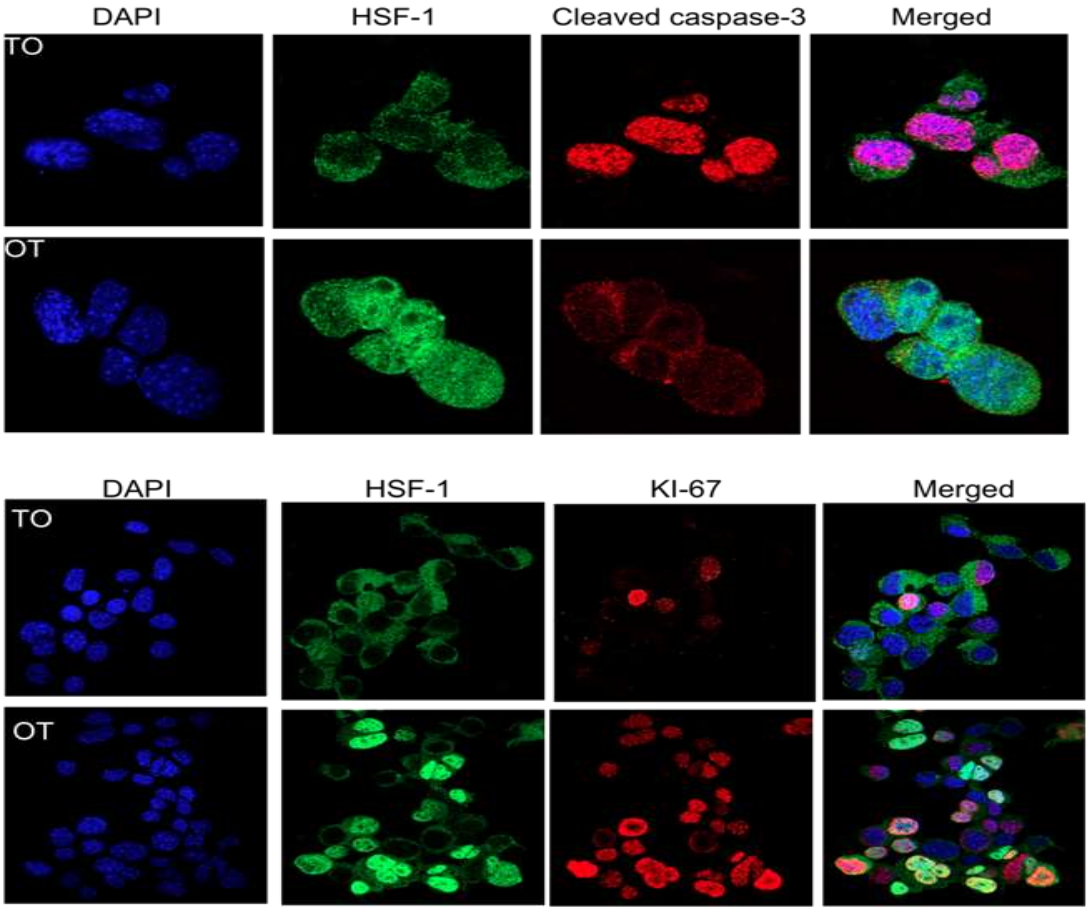


Figure 31: Corrélation entre mort cellulaire/ prolifération et localisation de HSF1.

Les images confocales du co-immunomarquage entre HSF1/caspase-3 clivée (marqueur apoptotique) et HSF1/Ki67 (marqueur de prolifération) montrent la corrélation entre mort cellulaire/ prolifération et la localisation de HSF1. Dans les cellules carencées TO, l'augmentation de la caspase-3 clivée et la diminution de Ki67 sont associées à une localisation cytoplasmique de HSF1.

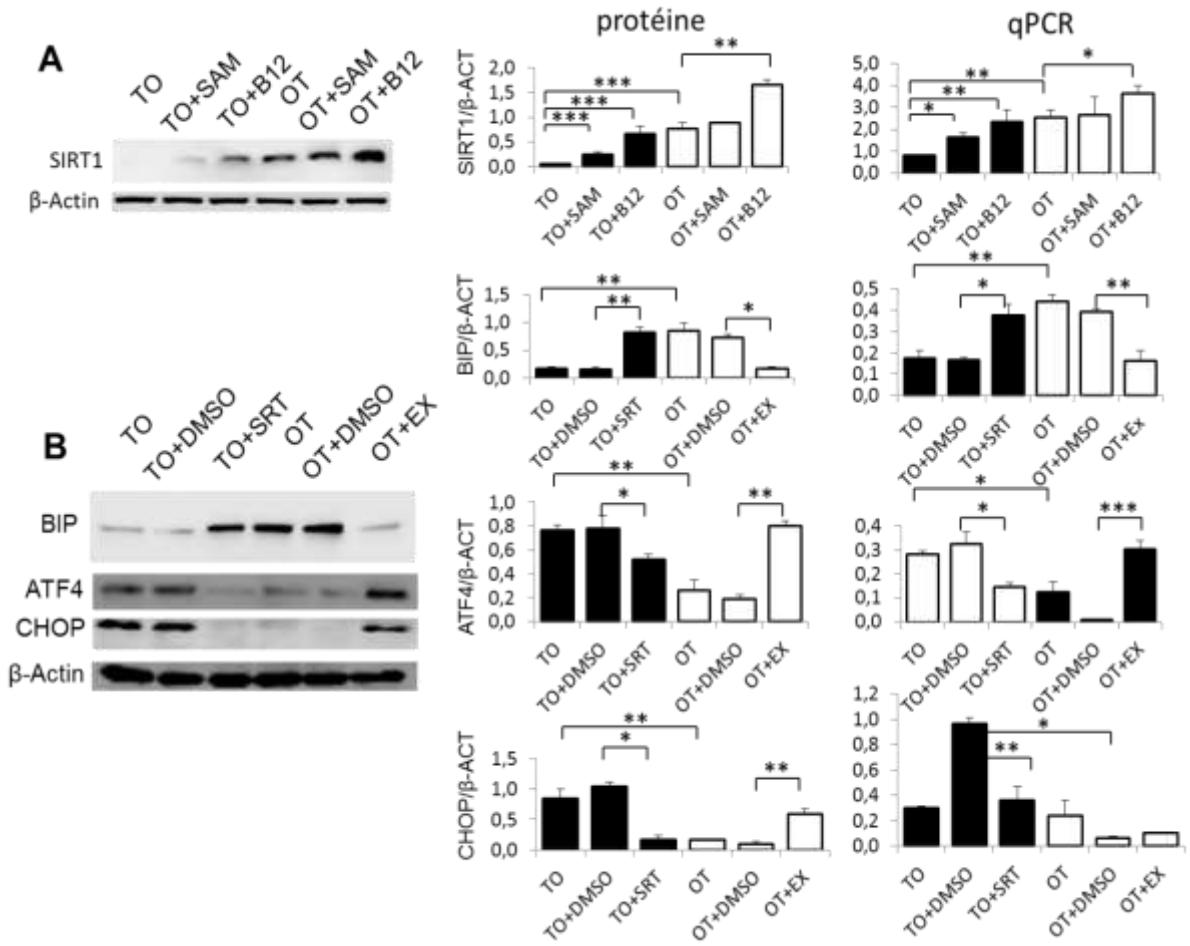


Figure 32: Dans les cellules déficientes en B12, le stress du RE est dû à l'inactivation de SIRT1.

A : Le niveau protéique et d'ARN de SIRT1 est plus faible dans les cellules TO comparativement aux cellules OT. La supplémentation en B12 ou SAM augmente significativement le niveau d'expression de SIRT1 dans des cellules TO (p <0,001).

B : Le traitement des cellules TO par un activateur de SIRT1 (SRT1720, ici noté SRT) et des cellules OT par un inhibiteur de SIRT1 (EX527, ici noté EX), modifie l'expression des marqueurs de stress du RE: dans les cellules TO, SRT augmente l'expression de BiP et réduit l'expression d'ATF4 et de CHOP (p <0,05, p <0,01 et P <0,01, respectivement); dans les cellules OT, EX diminue l'expression de BiP et conduit à une augmentation d'ATF4 et de CHOP (p <0,01, p <0,01 et p <0,05, respectivement). Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

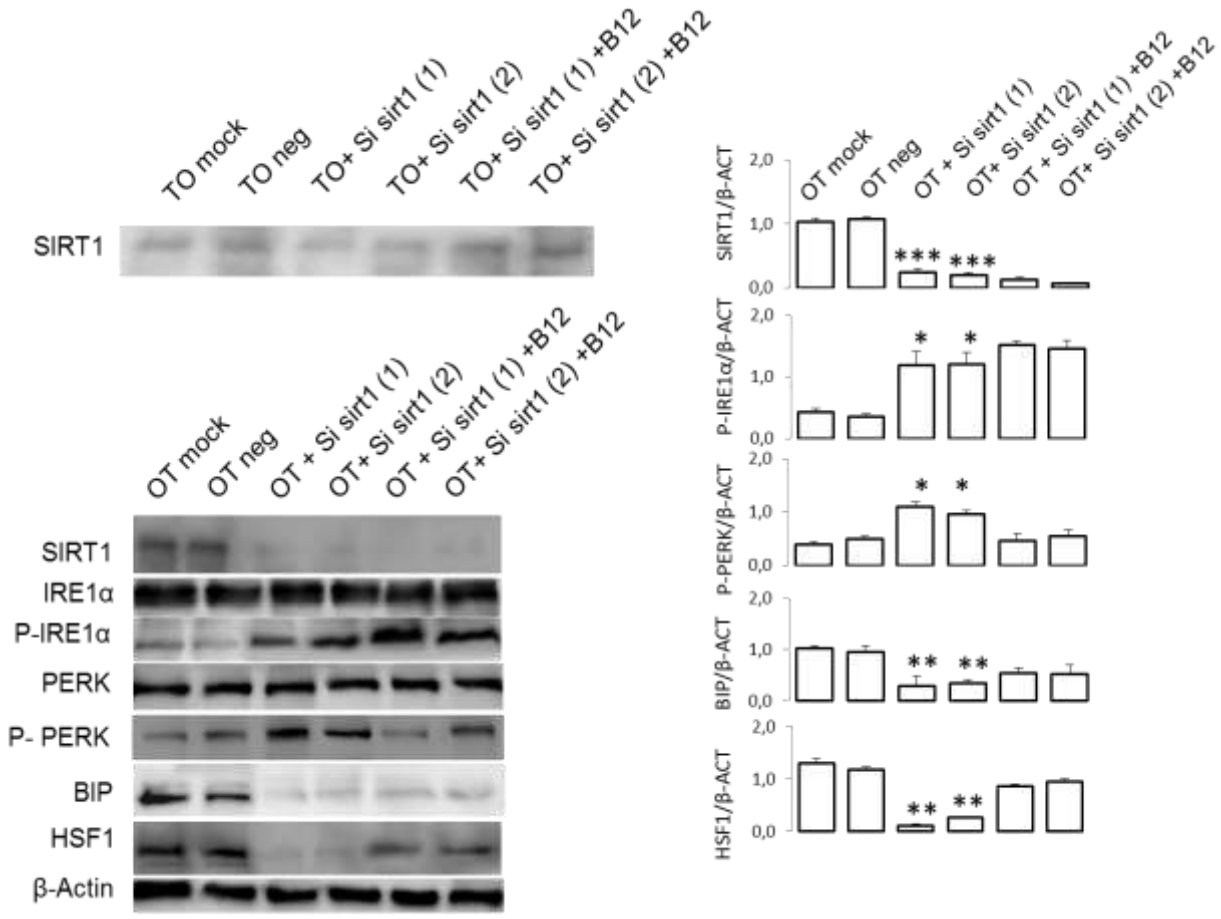


Figure 33: Le stress du RE dans les cellules TO est dû à la diminution de l'expression de SIRT1.

L'invalidation de l'expression de SIRT1 dans les cellules contrôles OT ($p<0.001$) en utilisant deux différents siSIRT1, entraîne une diminution de l'expression de HSF1 et de BiP ($p <0,01$, $p <0,01$) ainsi qu'une augmentation de P-IRE1α et de P-PERK ($p <0,05$, $p <0,05$). Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type ($p <0,05$; ** $p <0,01$; *** $p <0,001$).*

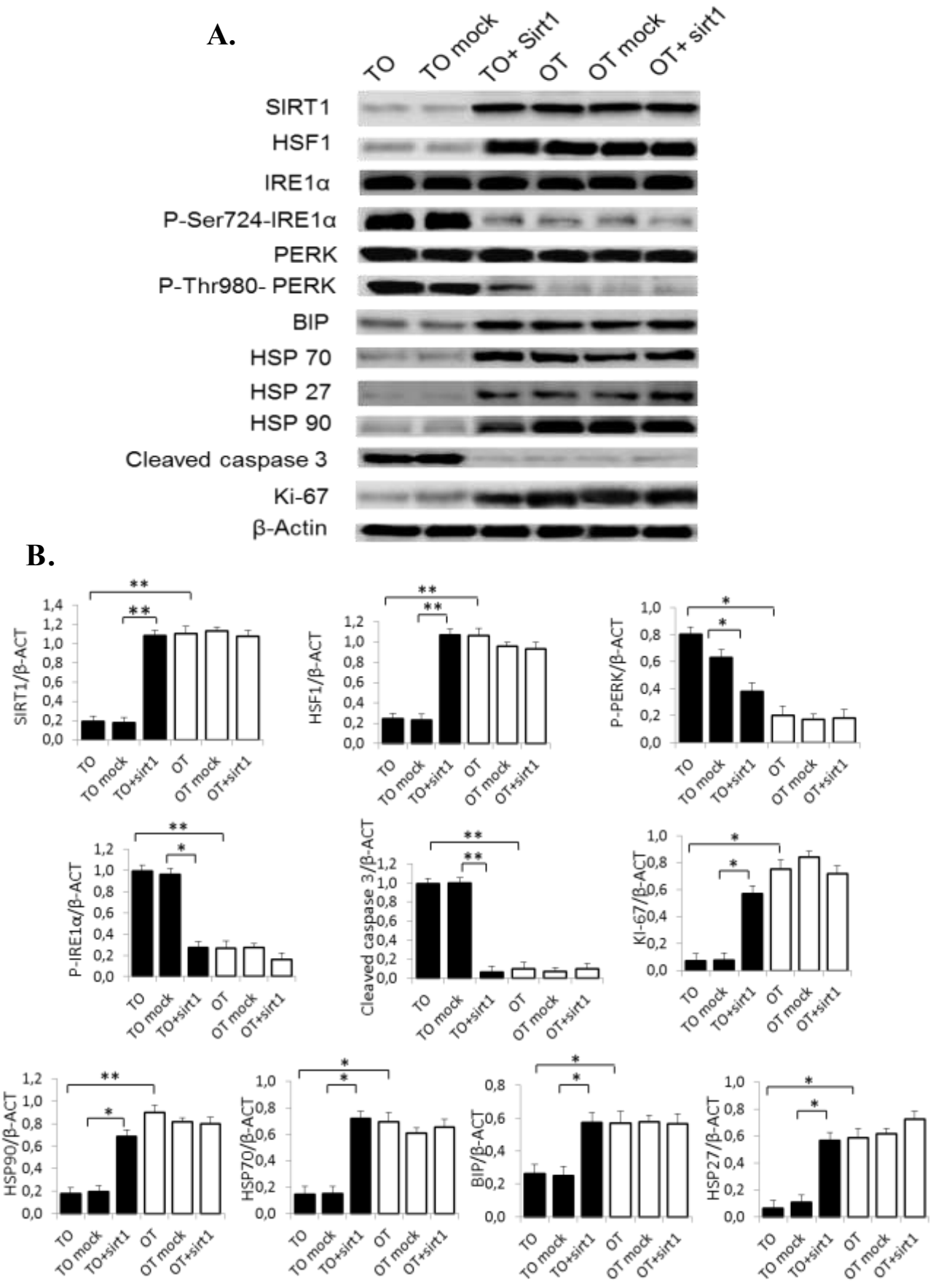

A.
TO
TO mock
TO+ Sirt1
OT
OT mock
OT+ sirt1
SIRT1
HSF1
IRE1α
P-Ser724-IRE1α
PERK
P-Thr980- PERK
BIP
HSP 70
HSP 27
HSP 90
Cleaved caspase 3
Ki-67
β-Actin
B.
SIRT1/β-ACT
HSF1/β-ACT
P-PERK/β-ACT
P-IRE1α/β-ACT
Cleaved caspase 3/β-ACT
KI-67/β-ACT
HSP90/β-ACT
HSP70/β-ACT
BIP/β-ACT
HSP27/β-ACT
TO
TO mock
TO+sirt1
OT
OT mock
OT+sirt1

Figure 34: La surexpression de SIRT1 dans les cellules TO réduit le stress du RE.

(A) La surexpression de SIRT1 dans les cellules TO ne conduit pas seulement à une augmentation de SIRT1 mais aussi de HSF1 ($p<0.001$). Ceci est corrélé avec une augmentation des chaperons, notamment BiP, HSP70, HSP27 et HSP90 ($p<0.05$), une réduction de stress du RE (p-IREα et p-PERK ; $p<0.05$) et de l'apoptose (caspase-3 clivée, $p<0.05$), ainsi qu'une restauration de la prolifération (Ki67, $p<0.05$).

(B) Analyses densitométriques des blots : Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

IV. La surexpression de HSF1 dans les cellules TO sauve les cellules de stress du RE et son invalidation dans les cellules OT aggrave le stress du RE

Afin d'évaluer le rôle direct de HSF1 dans le stress du RE-B12 dépendant, nous avons invalidé HSF1 dans les cellules OT et nous l'avons surexprimé dans les cellules TO.

L'invalidation de HSF1, dans les deux types cellulaires, est effectuée avec un siRNA contre HSF1 (figure 35 et figure 36). Dans les cellules TO, aucun effet de cette invalidation ne peut être discerné au niveau de l'expression des chaperons ou des marqueurs de stress du RE. L'absence d'effet peut être lié au fait qu'aucune réduction supplémentaire de HSF1 ne peut être détectée dans les cellules TO. Par contre, dans les cellules OT, le même siRNA réduit l'expression de HSF1 ($p < 0,01$), induisant une forte augmentation des marqueurs de stress ($p < 0,05$), probablement en raison de la diminution significative de l'expression des chaperons ($p < 0,05$). L'ajout de la vitamine B12 compense l'effet de l'invalidation de HSF1.

Ensuite, nous avons effectué une transfection transitoire des cellules TO et OT en utilisant deux plasmides indépendants : (1) une forme constitutivement active de HSF1 (HSF1-act) et (2) une forme mutante dominante négative de HSF1 (HSF1-inact) (figure 37 et figure 38).
Dans les cellules TO, la transfection de HSF1-act conduit à une augmentation de l'expression de HSF1 ($p < 0,05$) et par conséquent à une augmentation de l'expression des protéines chaperons ($p < 0,05$), une réduction de stress du RE ($p < 0,05$) et de l'apoptose ($p < 0,05$) et une augmentation de la prolifération cellulaire (Ki67) ($p < 0,05$). Cependant, aucun effet ne peut être détecté quand les cellules TO sont transfectées avec le plasmide HSF1-inact. Les cellules OT transfectées avec le plasmide HSF1-act, ne présentent aucune différence au niveau de stress du RE tandis que la transfection avec le plasmide HSF1-inact provoque des effets indésirables. Il s'agit notamment de la réduction de l'expression des protéines chaperons, l'augmentation des marqueurs de stress du RE et de l'apoptose et la diminution de la prolifération cellulaire (Ki67) (figure 37 et figure 38).

De plus, nous avons utilisé un activateur pharmacologique, le celastrol, dans le but d'augmenter l'activité de la protéine HSF1. Nous avons observé les mêmes résultats en cas de transfection avec le plasmide HSF1-act (figure 39 et figure 40). Dans les cellules TO, le celastrol provoque une augmentation significative de l'expression de HSF1 ($p < 0,05$). Cette augmentation est corrélée avec une diminution de stress du RE ($p<0,05$), de l'apoptose (p

<0,05) et une augmentation de la prolifération (Ki67, p <0,05). Dans les cellules OT, aucune différence n'est détectée, au niveau de l'expression de HSF1 ou des événements en aval, tels que l'expression de protéines chaperons, le niveau de stress du RE, l'apoptose et la prolifération cellulaire.

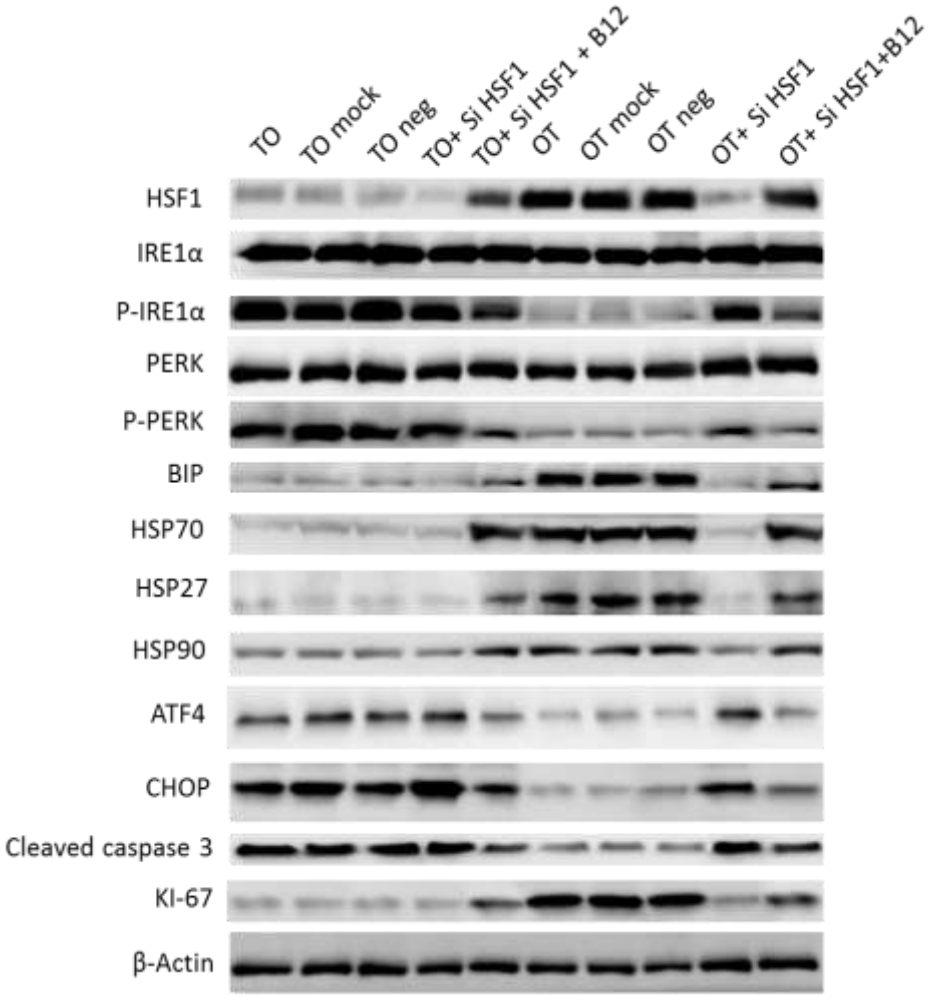


Figure 35: L'invalidation de HSF1 dans les cellules OT induit un stress du RE.

La transfection des cellules TO avec le siHSF1 n'induit pas de changements du stress du RE ou de l'apoptose. Par contre, l'invalidation de HSF1 dans les cellules OT provoque une diminution des protéines chaperons ($p<0.05$) et par conséquent un stress du RE, l'apoptose ($p<0.05$) et une diminution de la prolifération (Ki67) ($p<0.001$).

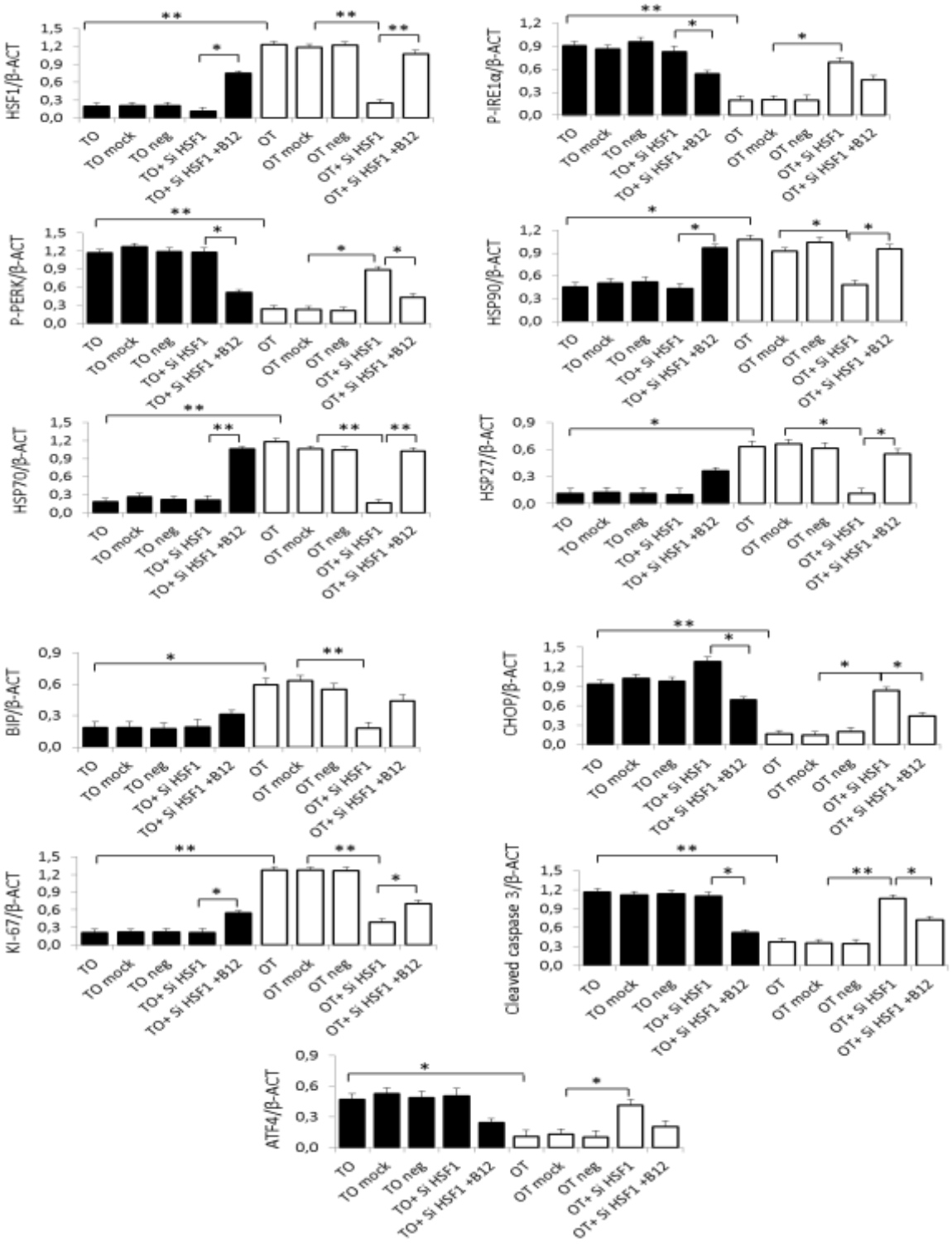


Figure 36: Densitométrie des western blots suite à l'invalidation de HSF1.

*Les bandes des protéines sont normalisées par rapport à la β-actine obtenue à partir des mêmes blots. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (*p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

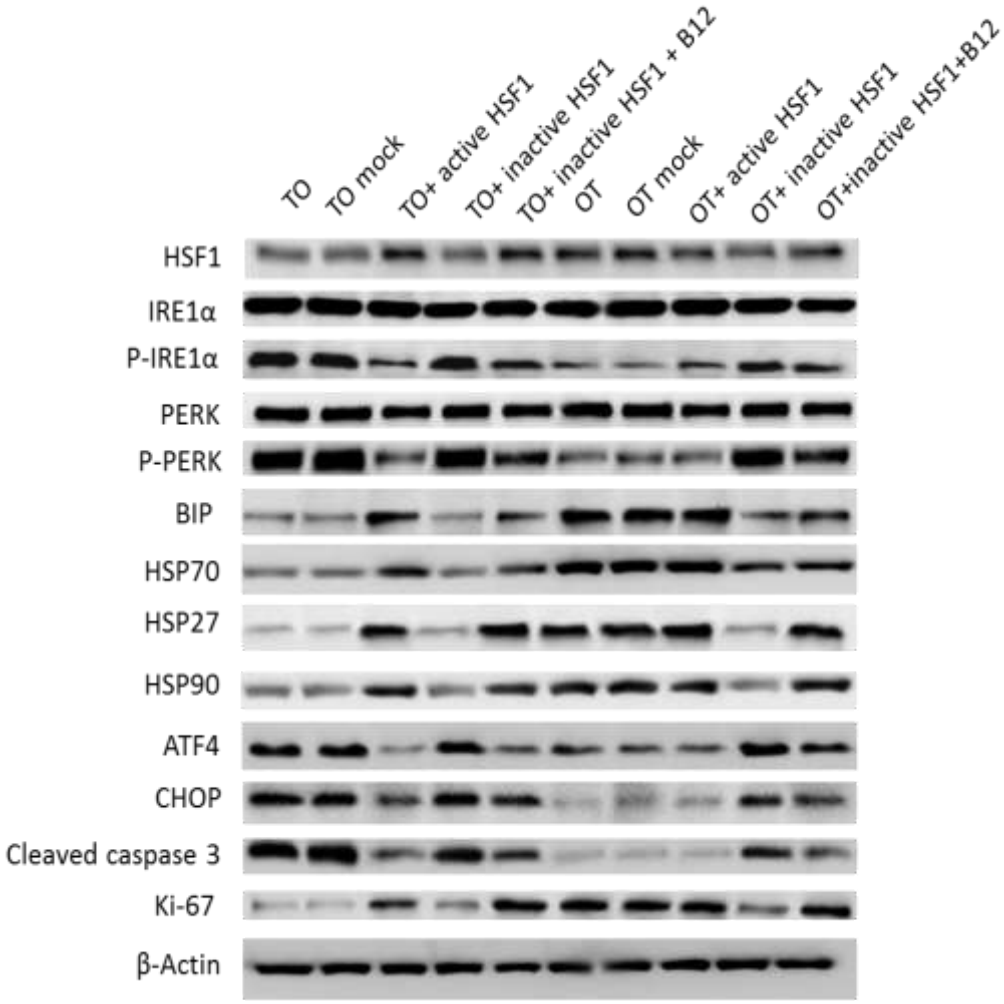
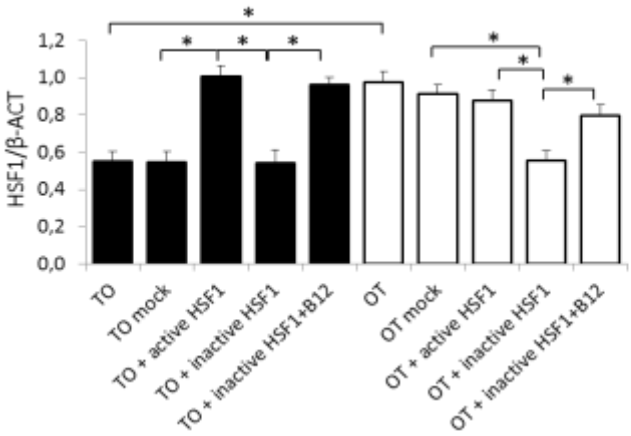
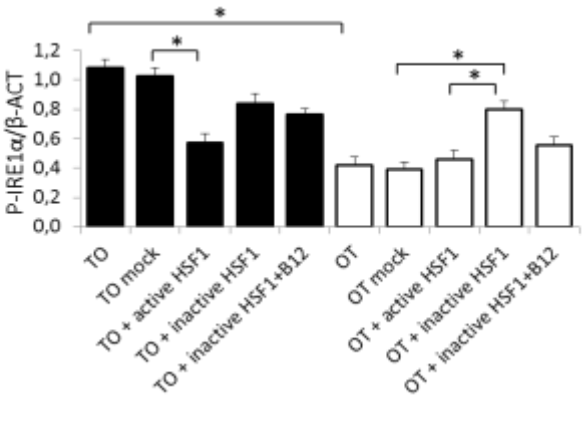
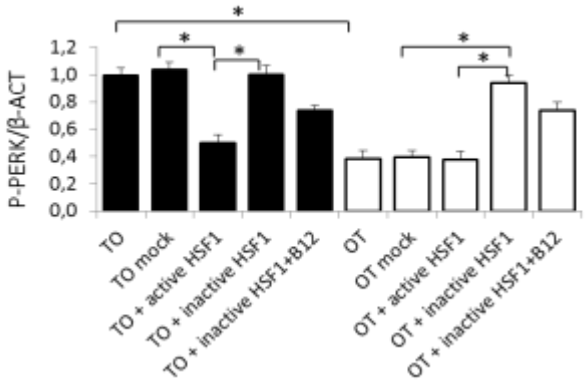


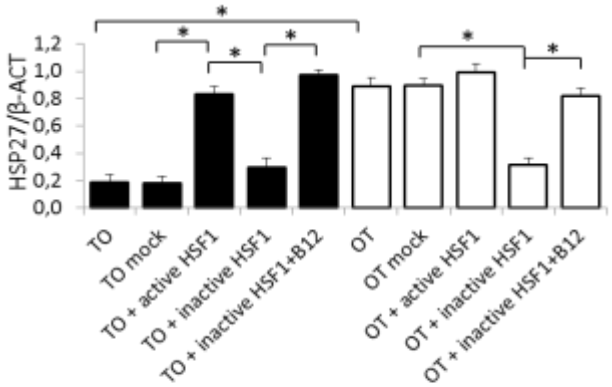
Figure 37: La surexpression de HSF1 dans les cellules TO diminue le stress du RE.

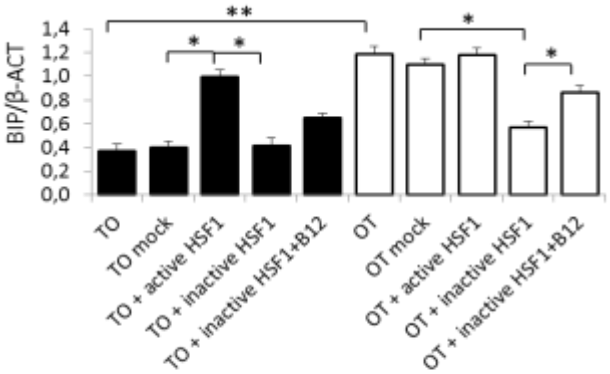
La transfection des cellules TO avec le plasmide HSF1-act a un effet positif sur le stress du RE. Elle induit l'augmentation des chaperons, la réduction de stress du RE et l'apoptose ainsi que l'augmentation de la prolifération. Nous obtenons des résultats opposés dans les cellules OT transfectées avec le plasmide HSF1-inact.

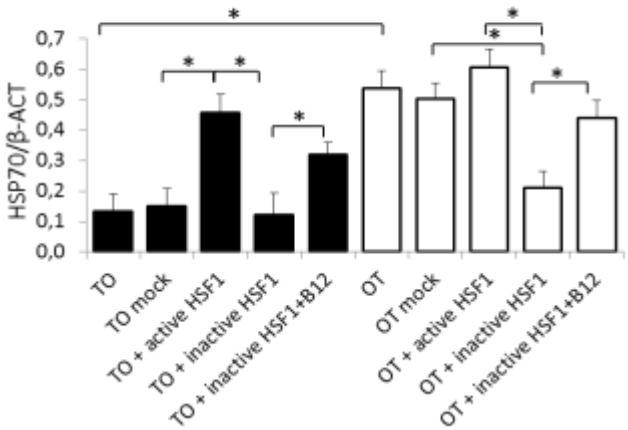

HSF1/β-ACT
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
TO
TO mock
TO + active HSF1
TO + inactive HSF1
TO + inactive HSF1+B12
OT
OT mock
OT + active HSF1
OT + inactive HSF1
OT + inactive HSF1+B12

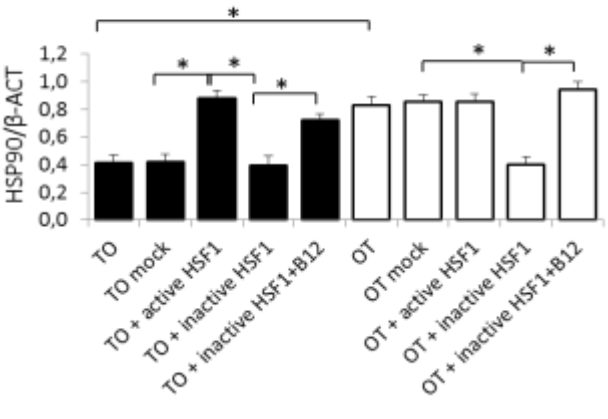

P-IRE1α/β-ACT
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
TO
TO mock
TO + active HSF1
TO + inactive HSF1
TO + inactive HSF1+B12
OT
OT mock
OT + active HSF1
OT + inactive HSF1
OT + inactive HSF1+B12


P-PERK/β-ACT
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
TO
TO mock
TO + active HSF1
TO + inactive HSF1
TO + inactive HSF1+B12
OT
OT mock
OT + active HSF1
OT + inactive HSF1
OT + inactive HSF1+B12


HSP27/β-ACT
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
TO
TO mock
TO + active HSF1
TO + inactive HSF1
TO + inactive HSF1+B12
OT
OT mock
OT + active HSF1
OT + inactive HSF1
OT + inactive HSF1+B12


BIP/β-ACT
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
TO
TO mock
TO + active HSF1
TO + inactive HSF1
TO + inactive HSF1+B12
OT
OT mock
OT + active HSF1
OT + inactive HSF1
OT + inactive HSF1+B12


HSP70/β-ACT
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
TO
TO mock
TO + active HSF1
TO + inactive HSF1
TO + inactive HSF1+B12
OT
OT mock
OT + active HSF1
OT + inactive HSF1
OT + inactive HSF1+B12


HSP90/β-ACT
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
TO
TO mock
TO + active HSF1
TO + inactive HSF1
TO + inactive HSF1+B12
OT
OT mock
OT + active HSF1
OT + inactive HSF1
OT + inactive HSF1+B12

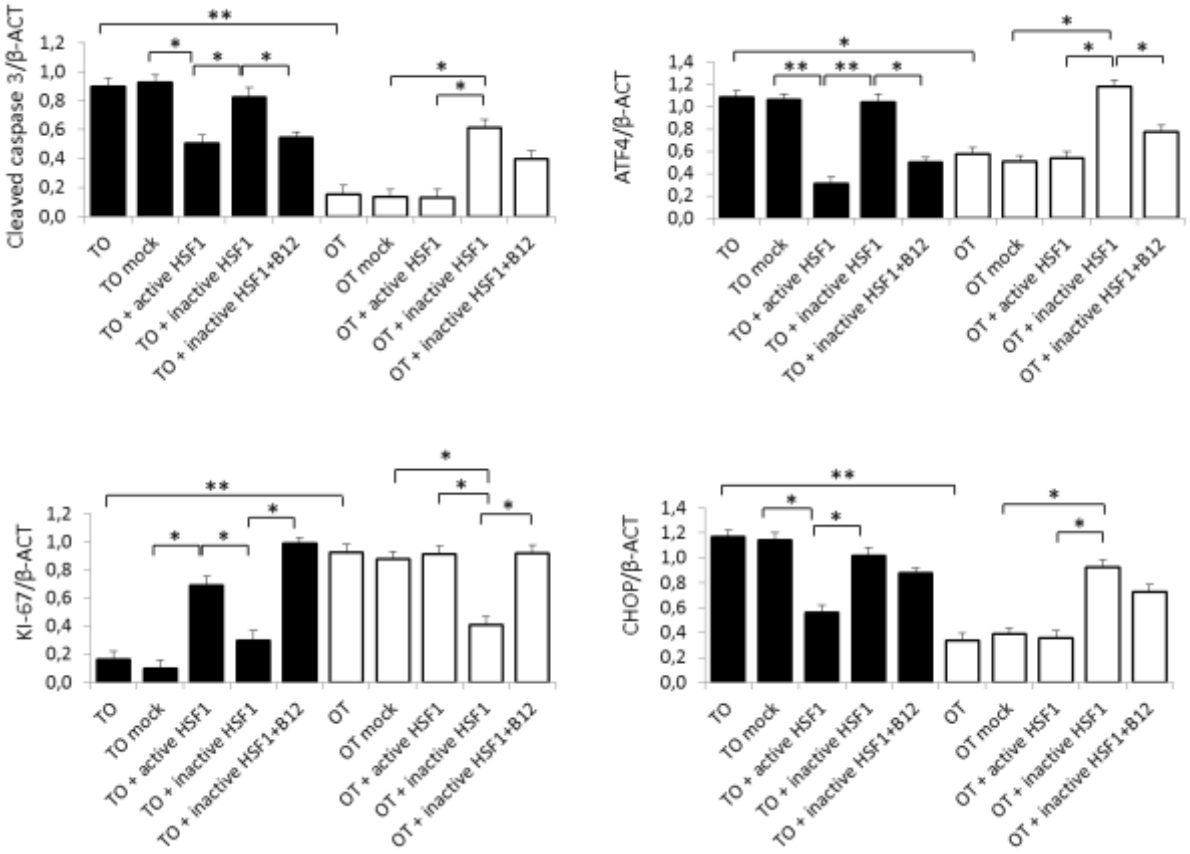


Figure 38: Densitométrie des western blots obtenus après transfection des cellules avec les plasmides HSF1-act et HSF1-inact.

*Les bandes des protéines sont normalisées par rapport à la β-actine obtenue à partir des mêmes blots. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (*p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

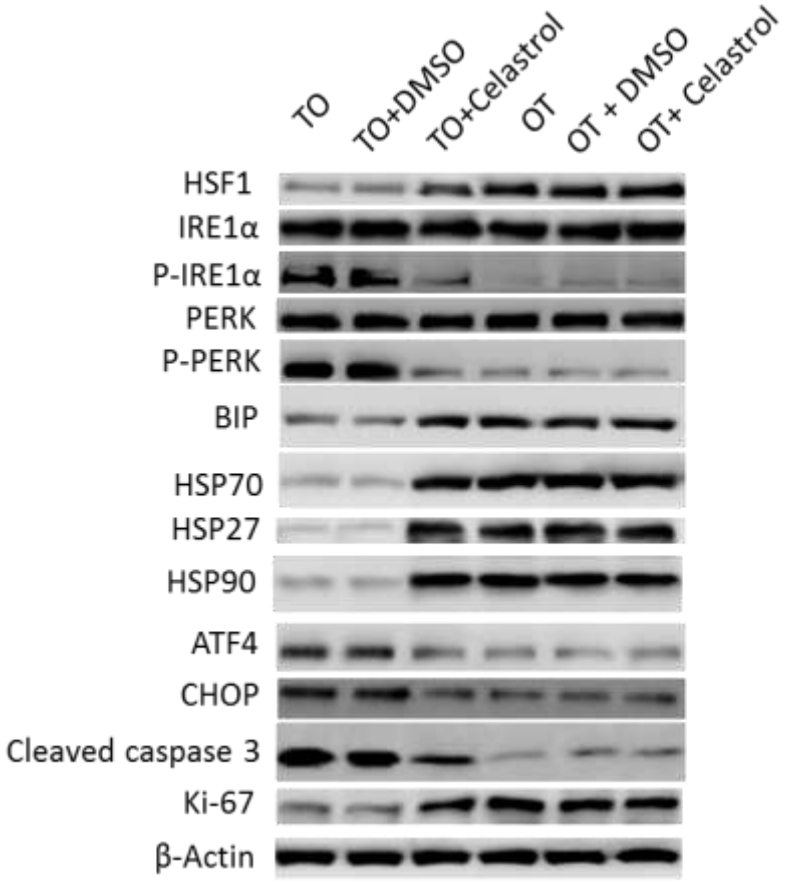


Figure 39: L'activation de HSF1 dans les cellules TO réduit le stress du RE.

Dans les cellules TO, HSF1 activé par le celastrol induit une augmentation de l'expression des protéines chaperons corrélée à une diminution de stress du RE et de l'apoptose. L'effet de celastrol n'est pas observé dans les cellules OT.

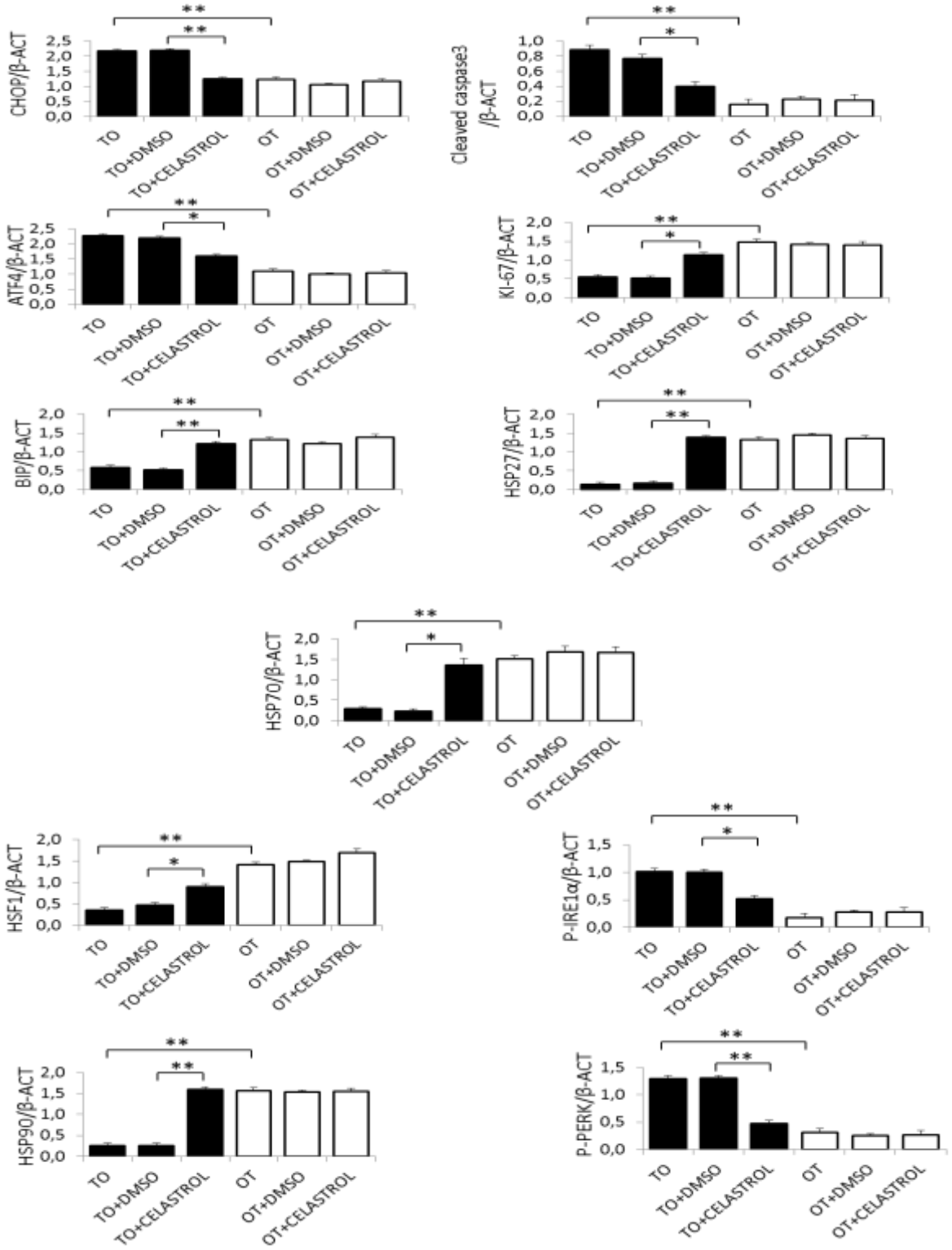


Figure 40: Densitométrie des western blots obtenus après activation par le celastrol.

*Les bandes des protéines sont normalisées par rapport à la β-actine obtenue à partir des mêmes blots. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (*p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

V. La vitamine B12 réverse l'activation de stress du RE provoqué par la thapsigargine

Afin d'évaluer l'effet modulateur de la vitamine B12 sur le stress du RE, nous avons étudié l'effet de son ajout sur des cellules soumises à la thapsigargine (TG), un inhibiteur de la pompe calcique du RE et un puissant stimulateur de stress du RE.

Dans les cellules OT, la TG induit l'activation des transducteurs de stress du RE, P-IRE et P-PERK ($p < 0,05$), contrairement aux cellules TO (figure 41). Par contre, la TG semble augmenter l'apoptose dans les cellules TO (figure 42). De plus, il réduit le niveau protéique de BiP et HSP70 dans les cellules TO et OT (figure 42), sans avoir un effet sur leur transcription élevée (figure 43).
Des réductions protéiques similaires étaient récemment trouvées chez des cellules bêta du pancréas traitées avec la TG en raison de l'augmentation de la dégradation par le protéasome (Rosengren et al, 2012).

La vitamine B12 est un remarquable protecteur contre le stress du RE induit par la TG. En effet, l'ajout de la B12, sur les cellules traitées avec la TG, réverse l'activation des transducteurs de stress du RE (figure 41) et de l'apoptose (figure 42) et il induit l'augmentation de l'expression des protéines chaperons (figure 42). Ces effets protecteurs de la vitamine B12 ont été également observés dans les cellules TO et OT traitées avec EX527, un inhibiteur de SIRT1 (figure 44).

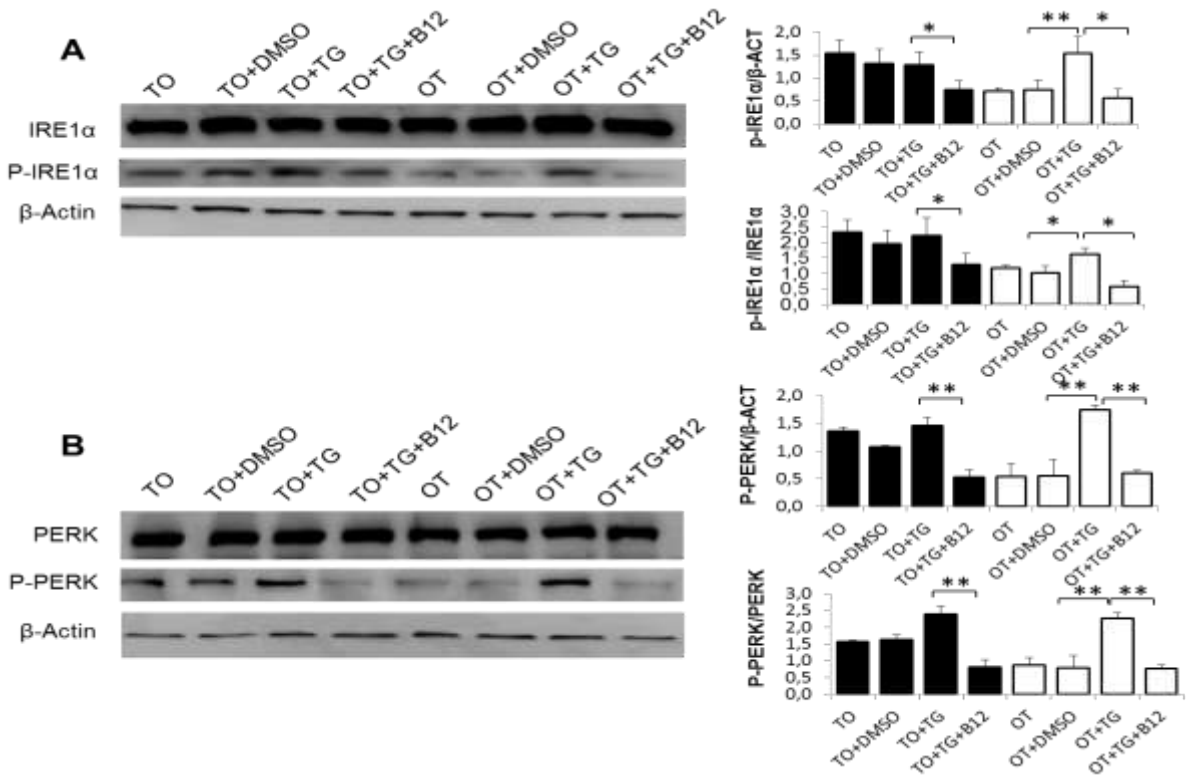


Figure 41: La thapsigargine induit une activation de stress du RE.

A : L'expression de P-IRE1α augmente dans les cellules OT traitées avec la TG (p<0.01). L'ajout de la vitamine B12 réduit le niveau de P-IRE1α dans les cellules TO et OT (p<0.05). B : L'activation de P-PERK dans les cellules OT traitées avec la TG est plus marquée que celle dans les cellules TO traitées. L'expression de P-PERK diminue suite à l'ajout de la vitamine B12.

*Les bandes des protéines sont normalisées par rapport à la β-actine obtenue à partir des mêmes blots. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (*p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

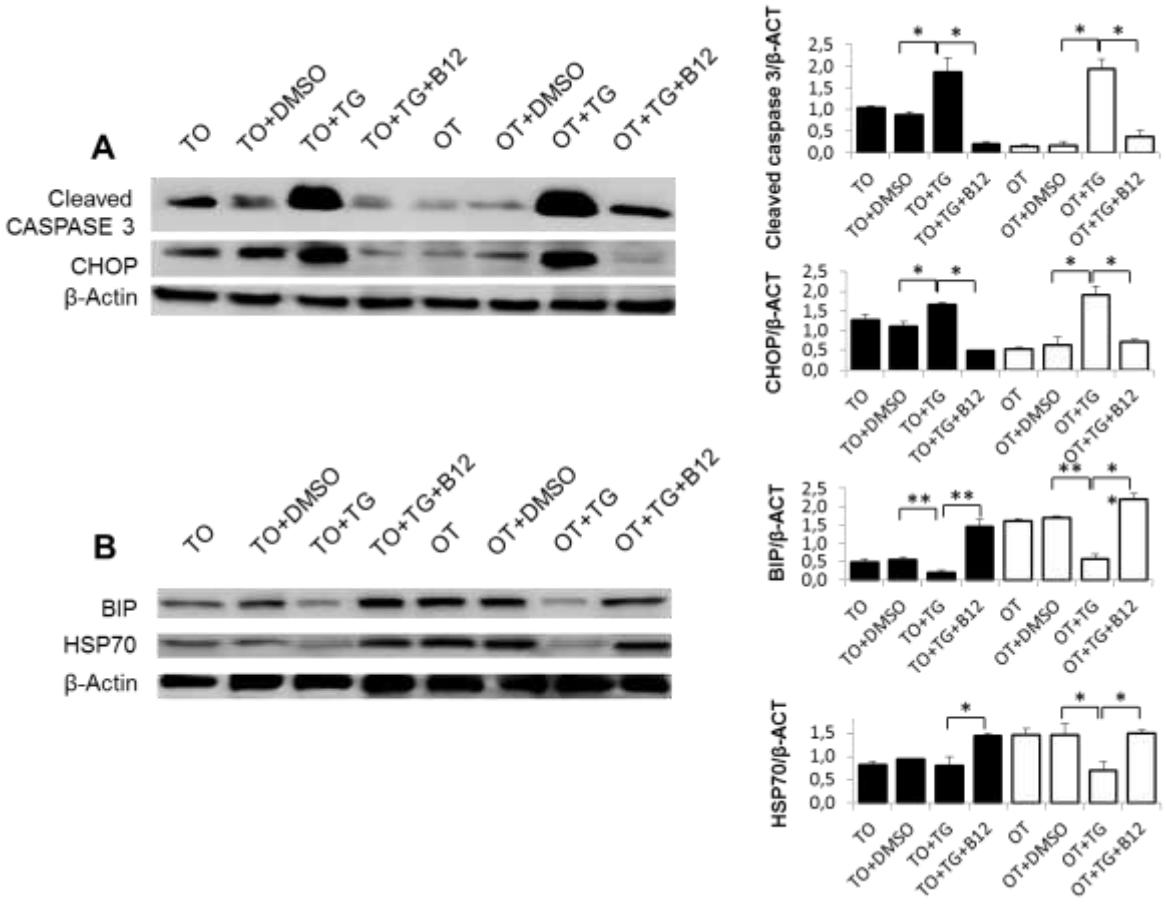


Figure 42: Le stress du RE causé par la thapsigargine conduit à l'apoptose.

A : Le traitement par la TG à 1µM pendant 5 heures induit une augmentation de l'expression de CHOP et du clivage de la caspase-3 dans les deux types cellulaires. Cet effet est réversé par l'ajout de la vitamine B12 ($p<0,05$).

B : Le traitement par la TG réduit à la fois l'expression de Bip et de HSP70 dans les cellules TO et OT. L'ajout de la vitamine B12 précédée par un traitement à la TG induit la diminution significative de BiP et de HSP70 dans les cellules TO ($p<0.01$).

Les bandes des protéines sont normalisées par rapport à la β-actine obtenue à partir des mêmes blots. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type ($p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).*

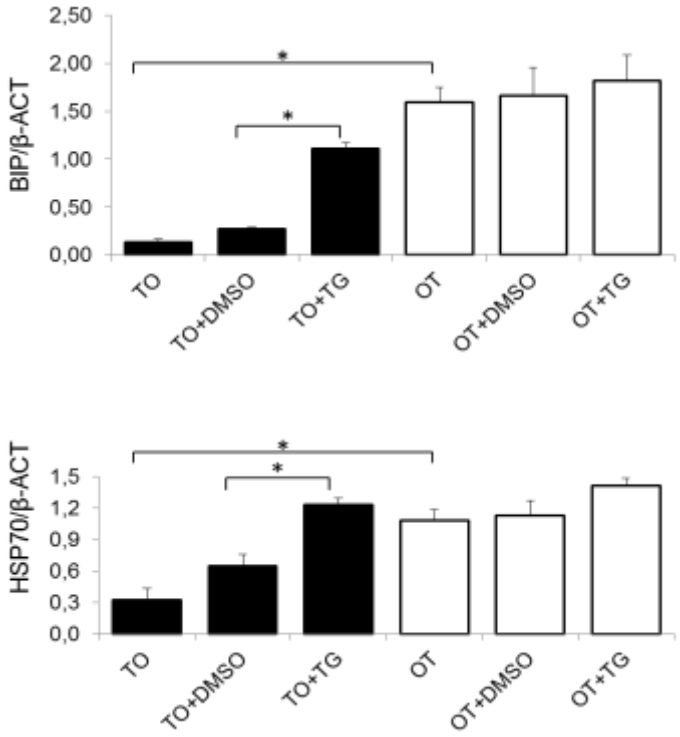


Figure 43: La thapsigargine augmente la transcription des chaperons BiP et HSP70.

*Dans les cellules TO, le traitement par la TG (1µM pendant 5 heures) induit une augmentation significative de la transcription de BiP ($p<0.001$) et de HSP70 ($p<0.01$) contrairement aux cellules contrôles OT. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (*p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

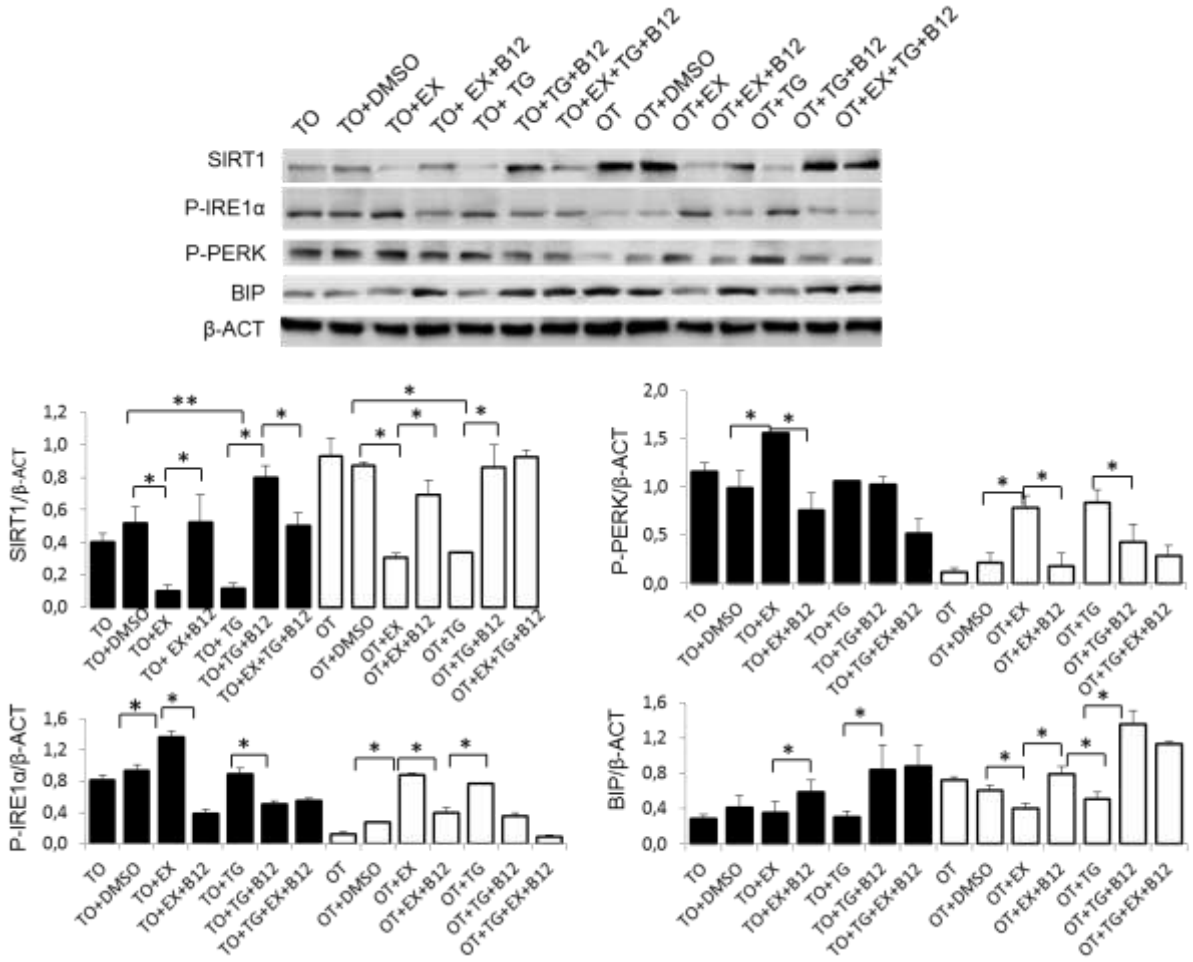


Figure 44: L'effet de l'inhibiteur de SIRT1 sur les marqueurs de stress est modulé par la vitamine B12.

*EX527, l'inhibiteur de SIRT1, réduit l'expression de SIRT1 dans les cellules TO et OT ($p<0.01$). L'ajout de la vitamine B12 reverse les effets de EX527 sur les transducteurs de stress, P-PERK ($p<0.05$) et P-IRE1α ($p<0.05$) ainsi que sur l'expression de BiP ($p<0.05$). Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (*p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

VI. La réduction de SIRT1 est homocystéine-indépendante et méthylation-dépendante.

Afin de savoir si l'homocystéine présente suite à une carence en B12 (figure 45A) déclenche un stress du RE, nous avons évalué l'effet de l'homocystéine sur l'expression de SIRT1. Nous avons mesuré une augmentation de l'expression de SIRT1 dans les cellules TO et OT après un long traitement d'homocystéine (30µM pendant 6-7 jours) (figure 45B). Ce résultat nous a permis de conclure que la quantité faible/modérée d'homocystéine produite par les cellules TO ne joue aucun rôle sur l'induction de stress du RE SIRT1-dépendant.

La concentration en acide méthylmalonique (MMA) augmente dans les cellules carencées en B12 (figure 46A). Par contre, nous ne trouvons aucune modification des marqueurs de stress du RE suite à un ajout de MMA sur les cellules contrôles (figure 46B et figure 47).

Nous avons également testé l'hypothèse selon laquelle l'expression de SIRT1 pourrait être médiée par un mécanisme méthylation-dépendant.
Sachant que la capacité de méthylation des cellules carencées est diminuée (diminution du rapport SAM/SAH) (figure 48A), nous avons traité les cellules contrôles avec l'inhibiteur des méthyltransférases, adénosine dialdehyde (Adox) (Dolzhanskaya et al, 2006). L'Adox entraîne une diminution de la transcription et de la traduction de SIRT1 (figure 48B) ainsi qu'une diminution du niveau protéique de HSF1, HSP70 et BiP, corrélée avec une augmentation des transducteurs de stress du RE et une augmentation de la traduction et la transcription de HIC1 (hypermethylated in cancer 1) (figure 49).

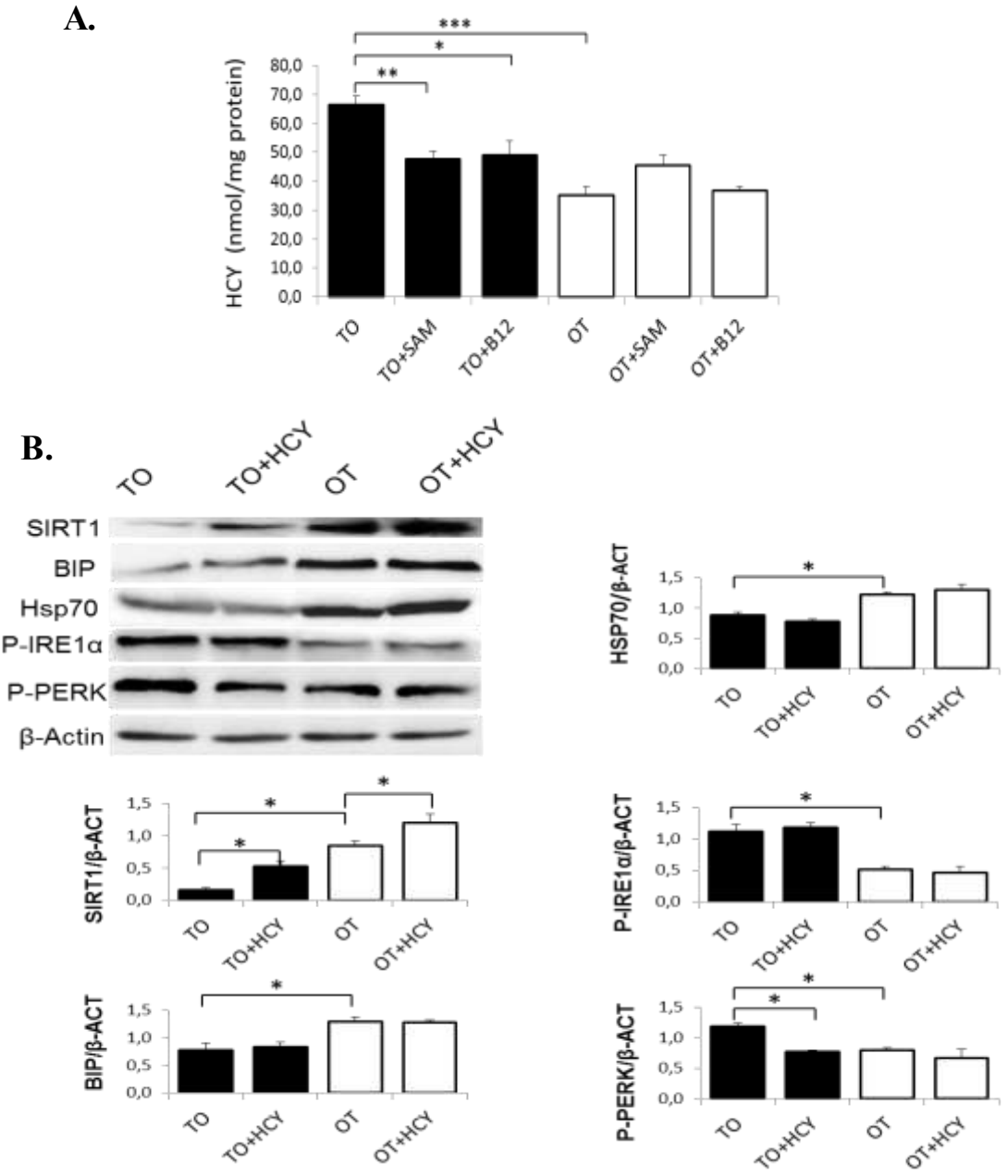


Figure 45: La réduction de l'expression de SIRT1 est homocystéine-indépendante.

A: Le taux d'homocystéine augmente dans les cellules TO comparativement aux cellules OT. Les traitements par SAM et la vitamine B12 induisent la diminution de l'homocystéine.

B: Le traitement par homocystéine induit une augmentation de l'expression de SIRT1 dans les cellules TO et OT ($p<0.05$).

Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type ($p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).*

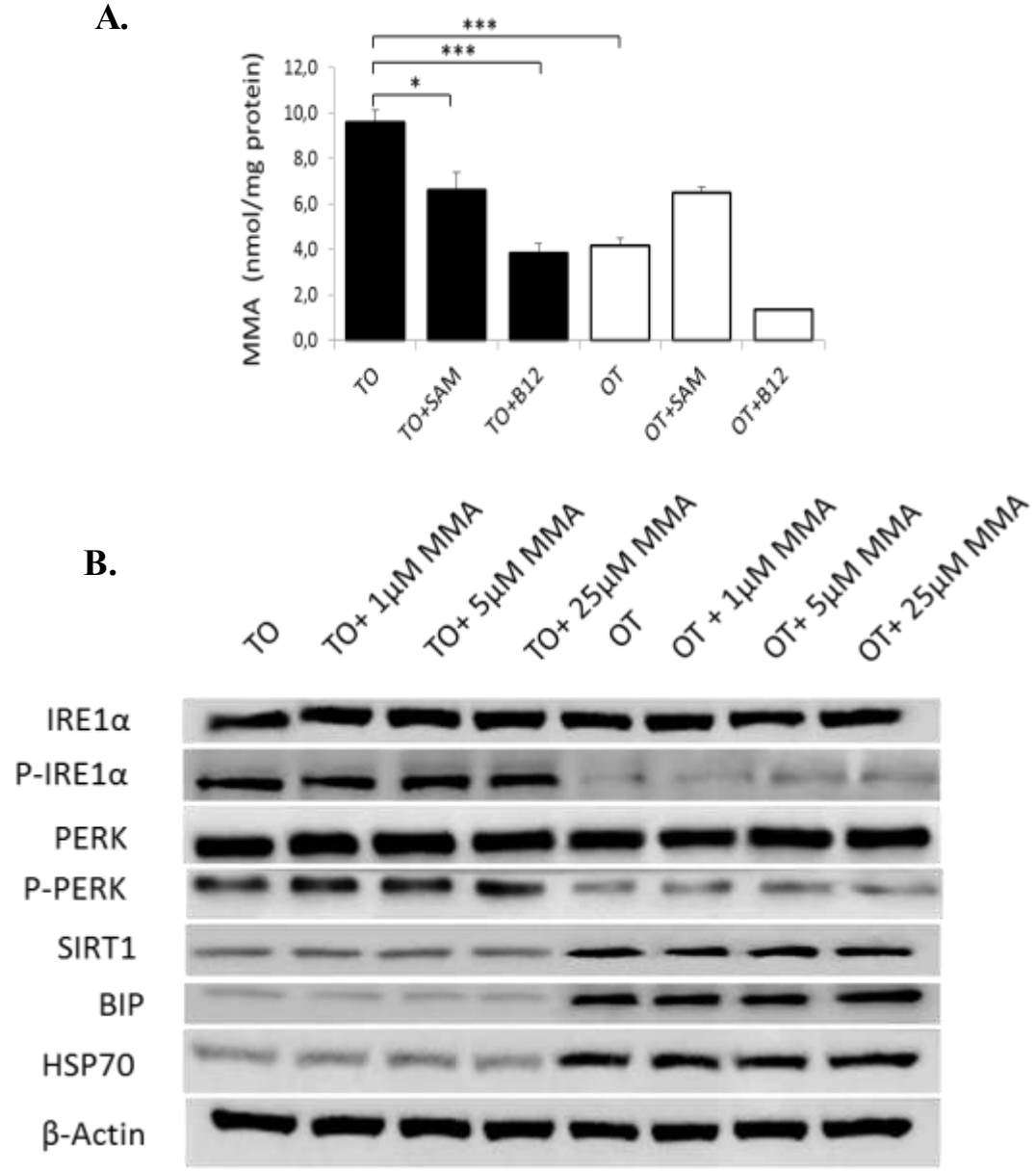


Figure 46: L'acide méthylmalonique n'a aucun effet sur le stress du RE.

A: MMA augmente dans les cellules TO comparativement aux cellules OT. Il sera réduit suite à un traitement SAM et B12.

B: Afin de savoir si MMA est neurotoxique, différentes doses de MMA sont ajoutées au milieu des cellules TO et OT pendant 7 jours. Aucune différence significative n'est observée au niveau des marqueurs de stress du RE, P-IRE1α et P-PERK, de SIRT1, ou des protéines chaperons BiP et HSP70 (p> 0,05).

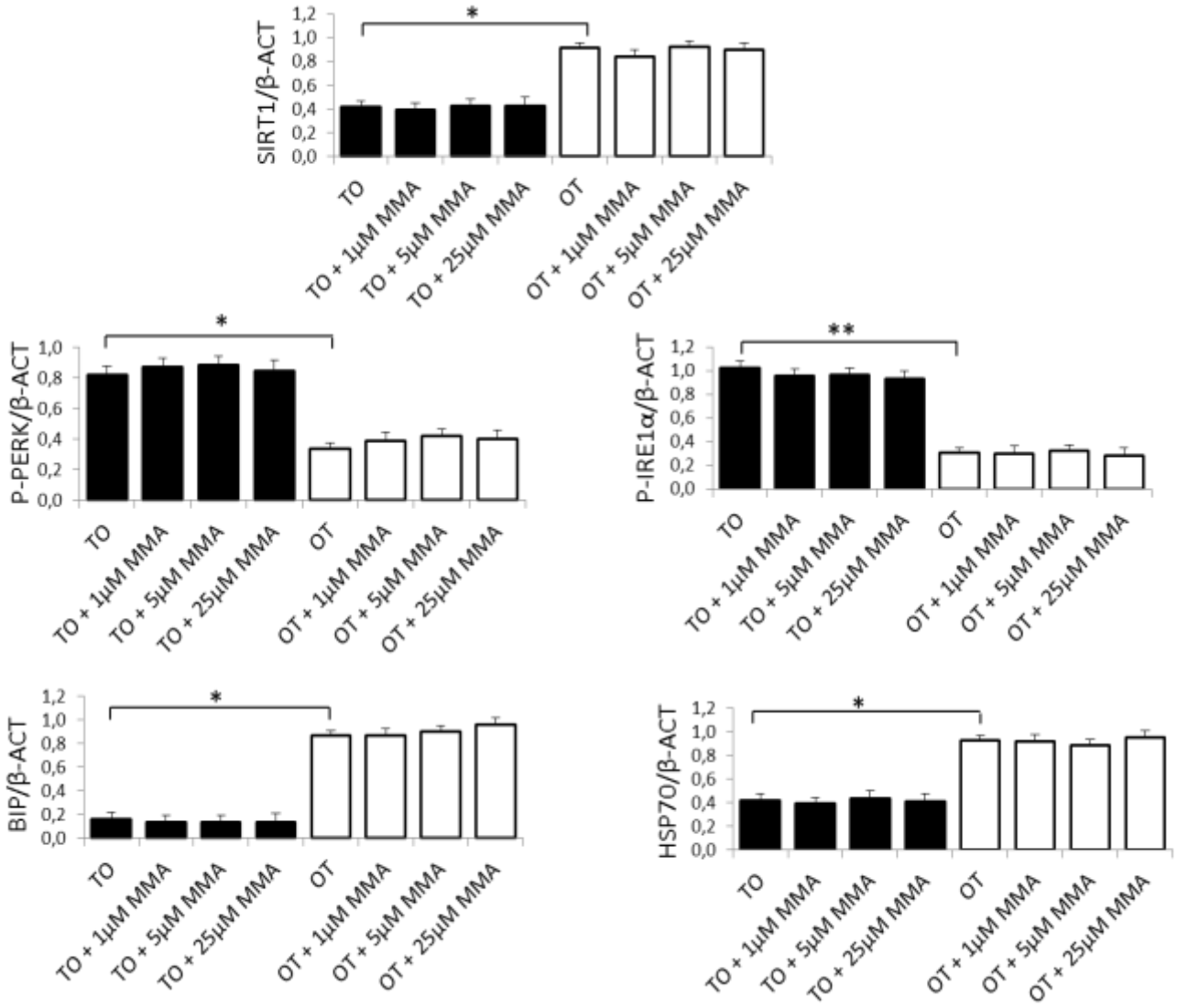


Figure 47: Densitométrie des western blots obtenus après traitement avec MMA.

*Les bandes des protéines sont normalisées par rapport à la β-actine obtenue à partir des mêmes blots. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (*p<0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).*

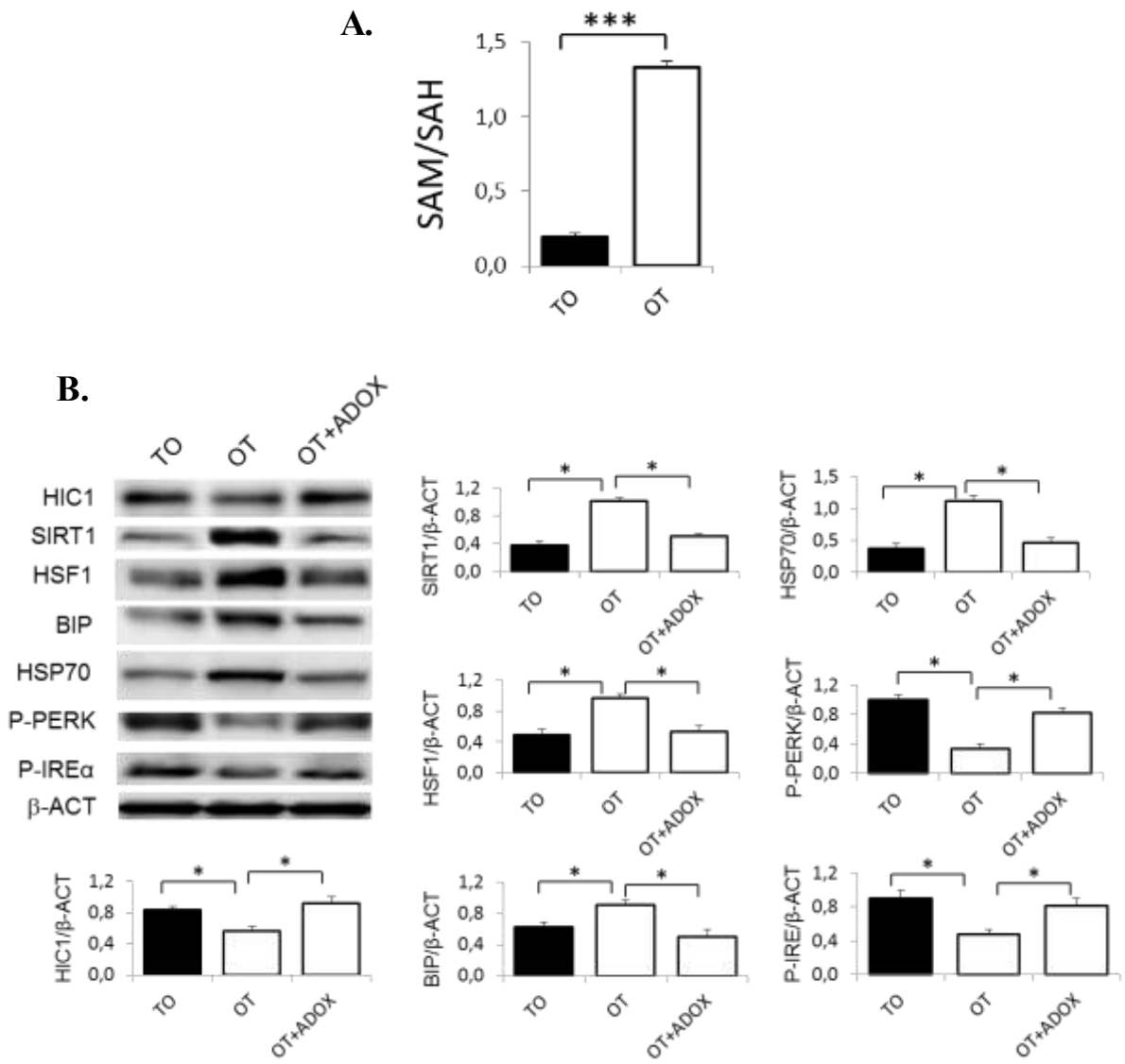


Figure 48: La réduction de l'expression de SIRT1 est méthylation-dépendante.

A: Le rapport SAM/SAH, présentant la capacité de la cellule à faire des réactions de méthylation, diminue dans les cellules TO.

B: dans les cellules OT, le traitement par Adox augmente l'expression de HIC1 (hypermethylated in cancer 1) ($p < 0,05$). Ceci est corrélé avec une diminution de l'expression de SIRT1, BiP et HSP70 ainsi qu'une induction de stress du RE ($p < 0,05$).

Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type ($p<0,05$; ** $p <0,01$; *** $p <0,001$).*

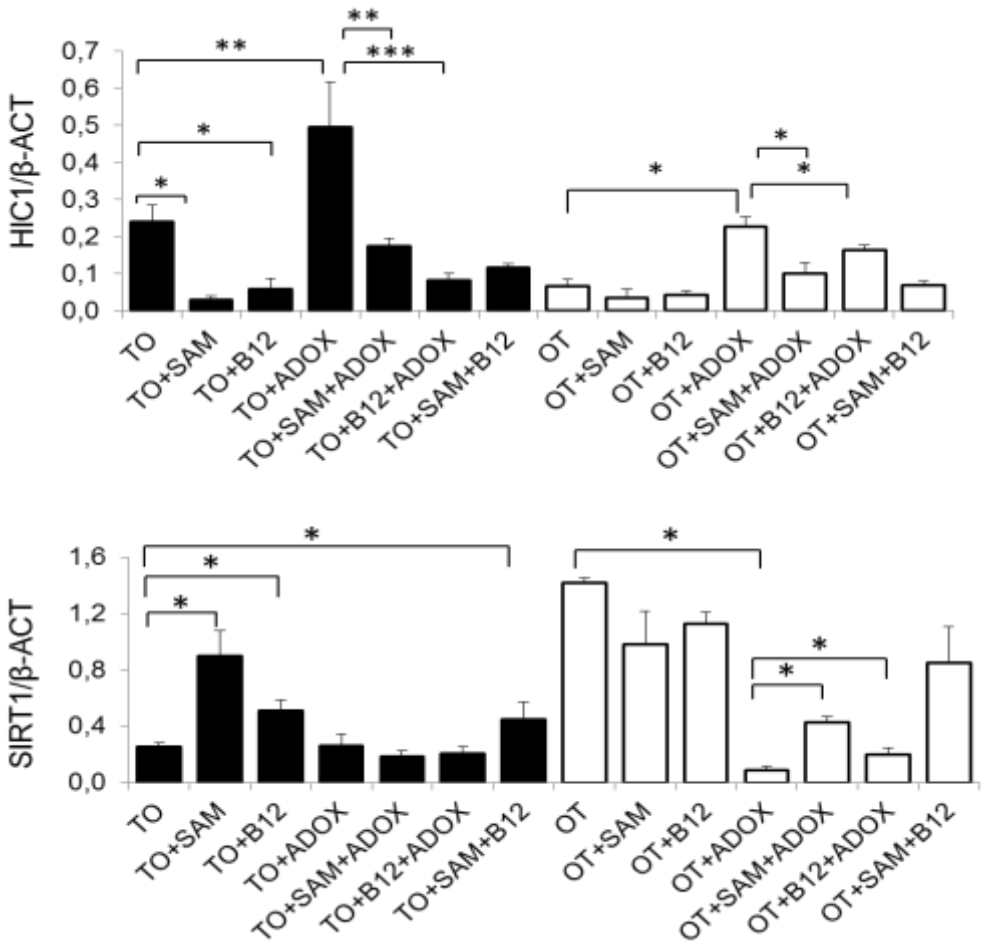


Figure 49: Influence de la S-adénosyl méthionine (SAM), vitamine B12 et l'inhibiteur des méthyltransférases Adox sur l'abondance des transcrits de HIC1 et SIRT1 dans les cellules TO et OT.

Adox augmente de manière significative les transcrits de HIC1 dans les cellules TO ($p<0,001$), ce qui peut être partiellement reversé par l'ajout de la SAM ($p <0,01$) ou de la B12 ($p<0,001$). Ces mêmes changements se produisent également dans les cellules contrôles OT (panneau supérieur).

Inversement, le traitement Adox ne diminue les transcrits de SIRT1 que dans les cellules OT. L'ajout de la SAM ou de la B12 réverse cette réduction de SIRT1 ($p<0,05$) (panneau inférieur).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Des études antérieures ont démontré que la disponibilité cellulaire en vitamine B12 est importante pour la prolifération cellulaire (Battaglia-Hsu et al, 2009; Lai et al, 2011; Orozco-Barrios et al, 2009; Pons et al, 2009). Notre travail met en évidence la participation du stress du RE dans la prolifération. Nos données montrent clairement que la carence en vitamine B12 produit un stress du RE suite à l'altération de l'expression de SIRT1 et par conséquent, une augmentation de l'acétylation de HSF1.

En effet, dans les cellules TO déficientes en B12, la réduction de l'expression de SIRT1 entraîne une augmentation de l'acétylation de HSF1. L'ajout de la vitamine B12 ou SAM, sur ces cellules carencées, restaure le niveau d'expression de SIRT1.

Le fait que dans les cellules TO mais aussi dans les cellules contrôles OT traitées avec l'inhibiteur de la méthylation (Adox), nous retrouvons une réduction de l'expression de SIRT1 accompagnée d'une augmentation de l'expression de HIC1 et d'une réduction de, HSF1 et des protéines chaperons de la famille HSP70 et donc une augmentation de stress du RE, suggère l'implication de la méthylation sur l'expression de SIRT1 et par conséquent sur le stress du RE. En effet, SIRT1 interagit avec le domaine BTB / POZ de HIC1 pour former un complexe de répression de sa propre transcription (Chen et al, 2005).

Westerheide et al. (Westerheide et al, 2009) ont démontré que SIRT1, en déacétylant HSF1, potentialise la liaison entre HSF1 et le promoteur des protéines chaperons conduisant à une augmentation de l'expression de ces protéines.

Suite à la réduction de l'expression de SIRT1 dans les cellules TO carencées en vitamine B12, l'acétylation accrue de HSF1 atténue la quantité optimale des chaperons moléculaires nécessaire pour une croissance cellulaire appropriée, ce qui induit une augmentation B12-dépendante de P-PERK et par la suite à une augmentation de la phosphorylation de P-eIF2α. Ceci provoque une augmentation de l'expression d'ATF4 qui est impliquée dans l'inhibition de la traduction des protéines du RE (Matus et al, 2011).

Il faut noter que l'expression protéique de HSF1 est significativement réduite dans les cellules carencées. Bien que la raison exacte de cette diminution ne soit pas claire, la baisse de niveau protéique de SIRT1 pourrait négativement réguler HSF1 (Kim et al, 2012a). Nous avons aussi confirmé cette hypothèse en sur-exprimant SIRT1.

Dans les cellules en senescence, la réponse au choc thermique est associée à une réduction de niveau protéique/activité de HSF1 causé par SIRT1 (Kim et al, 2012a). La réponse au choc thermique assurée par HSF1 est cruciale pour la cellule. Une dysfonction de cette réponse provoque une réponse UPR induite par l'accumulation des protéines mal repliées. Nous avons

montré que dans les cellules TO, cette réponse UPR est susceptible d'induire l'apoptose suite à l'augmentation de l'expression de CHOP et du clivage de la caspase3.

Des études antérieures ont montré qu'un taux élevé d'homocystéine (allant de 1 à 10 mM) peut rapidement induire une réponse au stress du RE avec une augmentation des chaperons moléculaires comme BiP (Althausen & Paschen, 2000; Kokame et al, 2000; Werstuck et al, 2001). En revanche, nous avons montré que l'ajout d'homocystéine, à une concentration compatible aux changements métaboliques des cellules TO, provoque une augmentation du niveau protéique de SIRT1 dans les cellules carencées en B12 ou non. Donc, la réduction de l'expression de SIRT1 dans les cellules TO n'est pas liée à l'accumulation d'homocystéine.

Nous avons également exclu la participation de la neurotoxine MMA dans le stress du RE. Suite à un traitement MMA allant de 1 à 25 µM, aucune modification des marqueurs de stress du RE n'a été observée.

L'effet modulateur de la vitamine B12 sur le stress du RE est un de nos résultats les plus importants. Notre étude a utilisé la TG comme un agent d'activation de stress du RE. Dans les cellules TO, ce traitement n'exerce aucune activation supplémentaire des transducteurs de stress du RE. Au contraire, il oriente les cellules vers l'apoptose. Dans les cellules OT, la TG induit un stress du RE et active l'apoptose. La supplémentation en B12 dans les deux types cellulaires rétablit le niveau de SIRT1 et réduit ainsi l'activation des transducteurs de stress du RE et l'apoptose via l'expression accrue de chaperons de la famille HSP70.

Il est intéressant de noter que l'effet bénéfique de la supplémentation en B12 sur le stress du RE persiste même après la réduction de l'expression et de l'activité de SIRT1. Alors qu'une carence en vitamine B12 sensibilise les cellules aux agressions en aval, la supplémentation en B12 peut réduire un stress du RE préexistant.

Ces effets bénéfiques de la supplémentation en vitamine B12 ouvrent une perspective thérapeutique sur ses effets neuro-protecteurs, notamment sur les troubles neurodégénératifs liés à un stress du RE causé par une carence en B12, tels que la maladie de Parkinson (Huber & Superti-Furga, 2011; Matus et al, 2011). Le Parkinson est la deuxième maladie la plus fréquente parmi les maladies neurodégénératives liées au vieillissement.

Les facteurs environnementaux et les mécanismes pathologiques conduisant à la maladie de Parkinson ne sont pas encore clairement définis (Huber & Superti-Furga, 2011). Récemment, des travaux menés dans notre laboratoire ont montré qu'une altération du métabolisme de la vitamine B12 dans les neurones dopaminergiques de la substance noire des rats, conduit à l'apoptose et induit un phénotype Parkinson-like (Orozco-Barrios et al, 2009). Nos résultats

actuels indiquent que l'apoptose de ces cellules dopaminergiques est conséquente à une réponse au stress du RE. Ceci est en accord avec des études antérieures suggérant l'implication de SIRT1 et du stress du RE dans la perte des neurones dopaminergiques (Egawa et al, 2011; Outeiro et al, 2007). Nos résultats peuvent contribuer à la compréhension de l'association observée dans les études cliniques entre la carence en vitamine B12 et la maladie de Parkinson (de Lau et al, 2006).

Les patients atteints de la maladie de Parkinson traités par la lévo-dopa présentent une augmentation de la consommation de SAM suite à l'O-méthylation de la lévo-dopa par la catéchol- O-méthyl transférase (COMT). Par conséquent, chez ces patients, la diminution de la concentration en SAM peut exacerber les effets de la carence en vitamine B12, et donc induire un stress du RE ou intensifier un stress du RE déjà existant (Miller et al, 1997).

L'impact de la carence en vitamine B12 sur l'apoptose des cellules dopaminergiques suite à l'activation de stress du RE souligne l'importance de la prévention contre cette carence.

SIRT1 n'est pas seulement impliqué dans les maladies neurodégénératives mais aussi dans les maladies métaboliques, cardiovasculaires, le cancer et l'inflammation (Garcia et al, 2011; Guarente, 2011, Pooya et al, 2012) (figure 50). L'hyperacétylation/hypométhylation de PGC-1α suite à une réduction de l'expression de SIRT1 produit une altération de l'oxydation des acides gras avec hypertrophie du myocarde chez des jeunes rongeurs carencés en donneurs de groupements méthyles (Garcia et al, 2011).

L'activation pharmacologique ou génétique de SIRT1 peut être très bénéfique pour ces maladies. En effet, deux différents composés activateurs de SIRT1 sont actuellement en phase d'essai clinique 1 ou 2. Les numéros des essais cliniques sont : NCT00937326, NCT00964340, NCT01014117, NCT01018017, NCT01018628, NCT01262911, NCT01031108, et NCT01154101 (Numéros ClinicalTrials.gov) (Guarente, 2011).

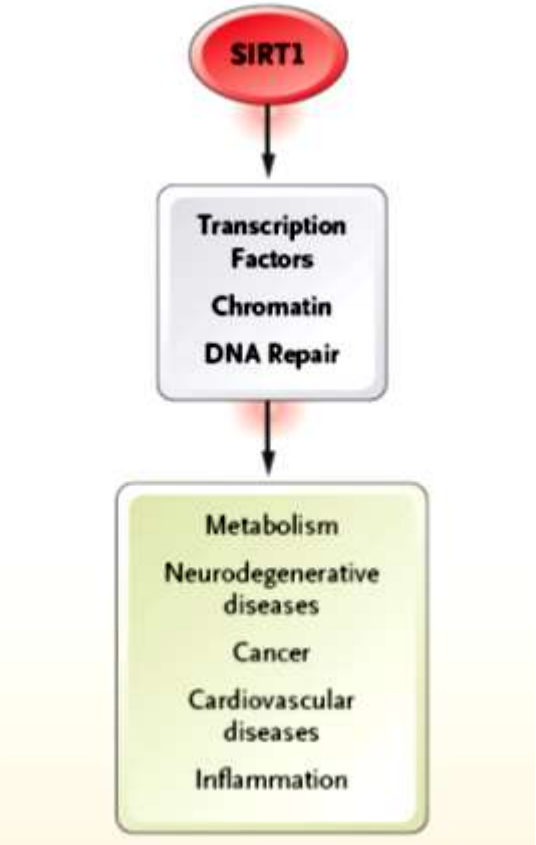


Figure 50 : Catégories des cibles déacétylées par SIRT1 et leurs maladies associées, modifié d'après (Guarente, 2011).

Les cibles de SIRT1, une sirtuine impliquée dans la régulation du métabolisme et de la réponse au stress, comprennent des facteurs et des cofacteurs de transcription, des histones et d'autres protéines de la chromatine ainsi que des composantes de la machinerie de réparation d'ADN. La déacétylation de ces cibles provoque des maladies métaboliques, neurodégénératives, cardiovasculaires, du cancer et une inflammation. Les mécanismes exacts associant la déacétylation avec ces maladies sont inconnus.

En conclusion, nous avons présenté des preuves indiquant qu'une diminution de la disponibilité cellulaire en B12 conduit à un stress du RE médié par la diminution de l'expression de SIRT1. A son tour, cette réduction entraîne à la fois une diminution de l'expression et une hyper-acétylation de HSF1, ce qui entraîne une réduction de l'expression des chaperons moléculaires nécessaires à une croissance cellulaire normale (figure 51). Ces mécanismes moléculaires peuvent contribuer à des effets neurodégénératifs dans les cellules dopaminergiques carencées en vitamine B12.

De plus, nous avons montré que des cellules traitées avec la TG et supplémentée en B12, seront protégées contre le stress du RE conduisant à l'apoptose.

Par conséquent, nous suggérons que le fait d'avoir suffisamment de B12 a un effet bénéfique/protecteur et peut protéger les cellules contre toute attaque en aval. Elle assure la prolifération cellulaire, la diminution de l'apoptose et elle protège l'organisme de certaines maladies, notamment les maladies neurodégénératives.

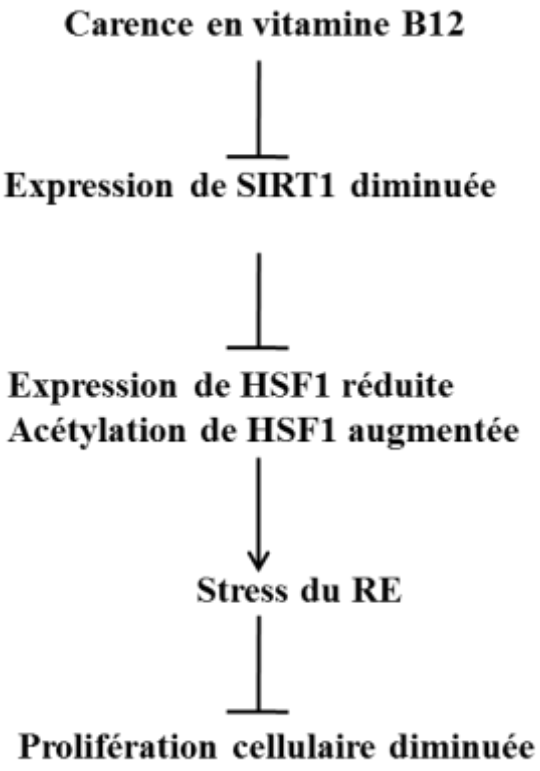


Figure 51 : Récapitulatif de nos résultats.

Nos résultats montrent qu'une carence en vitamine B12 induit la diminution de l'expression de SIRT1. Ceci est corrélé avec une diminution de l'expression de HSF1 et une augmentation de son acétylation (inactivation) induisant donc un stress du RE et une diminution de la prolifération cellulaire.

MATERIELS ET METHODES

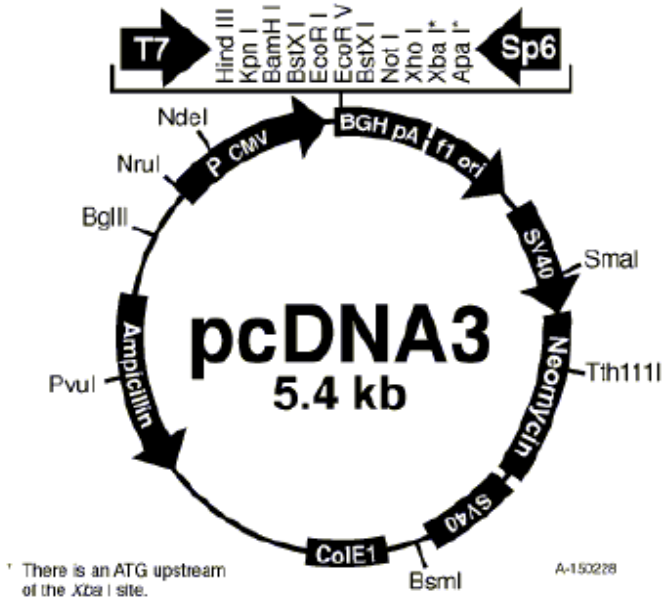
Fiche 1 : Lignées cellulaires

La lignée cellulaire étudiée est la lignée NIE-115①. Cette lignée a été transfectée (fiche 2) ou non (cellules NIE-115 sauvage ou WT) par :

- Un plasmide Transcobalamine-Oléosine (**TO**), séquestrant la vitamine B12, pour donner les cellules TO carencées en vitamine B12.
- Un plasmide Oléosine-Transcobalamine (**OT**), incapable de séquestrer la B12, pour donner les cellules contrôles OT. Ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que les cellules TO carencées en B12.

En effet, le plasmide utilisé est le pcDNA3②. Les ADNc codant Transcobalamine-Oléosine et Oléosine-Transcobalamine ont été cloné au niveau des sites de restriction *Bam HI* et *Xba I*.

Ce vecteur contient le promoteur fort du cytomégalovirus humain (CMV) pour l'expression dans la majorité des cellules de mammifères, le promoteur T7 pour la transcription *in vitro*, les gènes de résistance à l'ampicilline et à la néomycine, et l'origine de réplication de *E. coli*. La néomycine ou G418 est utilisée pour la sélection des cellules transcfectées par ce plasmide.



Comments for pcDNA3:
5446 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter: bases 864-882
Polylinker: bases 889-994
Sp6 promoter: bases 999-1016
BGH poly A: bases 1018-1249
SV40 promoter: bases 1790-2115
SV40 origin of replication: bases 1984-2069
Neomycin ORF: bases 2151-2945
SV40 poly A: bases 3000-3372
ColE1 origin: bases 3632-4305
Ampicillin ORF: bases 4450-5310

①Lignée NIE-115 sous clone de cellules C-1300 issus de neuroblastomes murins
②Invitrogen, Life Technology, France

Fiche 2: Décongélation des lignées

-Déposer 10 mL du milieu de prolifération dans une boite de pétri de100 mm①.

Le milieu de prolifération :

- Le milieu de culture est le DMEM 41965② complémenté de 2 mM L-glutamine①, 1 mM pyruvate de sodium② et 10% sérum de veau fœtal③.
- Les antibiotiques utilisés : Penicilline② 50U/mL et Streptomycine② 50mg/mL

-Sortir le cryotube④ de congélateur (-80°C) et le réchauffer rapidement dans un bain-marie à 37°C.

-Nettoyer l'extérieur du cryotube à l'alcool.

-Transvaser le contenu du cryotube dans la boite de pétri.

-Dans ~4 heures, changer le milieu de culture et *ajouter 1 mg/mL du G418 pour les cellules TO et OT*, mais pas pour les WT.

-Changer le milieu après 48h.

① Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
② Tous les produits sont fournis par : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
③SVF, Sérum de veau fœtal décomplémenté : PAA laboratories
④ Cryotube, Nalgène : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

Fiche 3: Repiquage des lignées

Tous les produits doivent être à température ambiante.

- Dans un Falcon 50 mL①, préparer 45 mL du milieu de prolifération (*ajouter 1mg/mL de G418 pour les cellules TO et OT*).

-Eliminer le milieu de culture, présent dans la p100, par aspiration avec la fiole à vide contenant de la javel.

-Décrocher les cellules avec une micropipette p 1000.

-Resuspendre les cellules dans le Falcon 50 mL pour bien homogénéiser.

-Ensemencer les cellules dans des 3 boites de pétri de100 mm (15 mL / boite).

① Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France

Fiche 4: Congélation des lignées

1 boite de pétri de100 mm confluente de presque 6.10^6 cellules pour 1 ampoule (cryotube)① :

-Préparer le milieu de congélation dans de la glace : 5% DMSO②, 20% SVF③, 5% penicilline/streptomycine④.

-Récupérer les cellules dans un Falcon de 15 mL⑤ puis centrifuger à 200g pendant 5 minutes.

-Jeter le surnageant et déposer 1 mL du milieu de congélation sur le culot et resuspendre.

-Transférer les cellules ainsi suspendues dans un cryotube①.

-Placer les cryotubes dans la boite de congélation⑥.

-Placer cette boîte 24h à -80°C. Puis transférer les tubes dans une boite en carton et laisser à -80°C.

-Référencer les tubes congelés et décongelés dans les registres de cultures cellulaires.

① Cryotube : Nalgéne ; VWR international, Fontenay-sous-Bois, France
② DMSO (Dimethylsulfoxide) : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
③SVF, Sérum de veau fœtal décomplémenté : PAA laboratories
④Tous les produits sont fournis par : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
⑤Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
⑥Boite de congélation : Nalgéne Cryo (VWR international, Fontenay-sous-Bois, France) dans laquelle l'alcool isopropylique permet une congélation progressive

Fiche 5: Transfection stable des cellules NIE-115 par le pcDNA3-TCII-oléosine ou le pcDNA3-oléosine-TCII

1) La veille de la transfection :

-Dans une plaque de 6 puits①, ensemencer 5.10^5 cellules NIE-115 / puit dans 2,5 mL du milieu de culture (fiche 2).

2) Une heure avant la transfection :

-Rincer les cellules avec du milieu RPMI② (sans SVF, sans antibiotiques, sans pyruvate de sodium).

-Retirer le RPMI et rajouter 2,5 mL de RPMI② avec 1% pyruvate de sodium (sans SVF, sans antibiotiques).

3) La transfection :

-Mélanger 1 µg du plasmide d'intérêt dans 250 µL d'opti-MEM②, homogénéiser doucement.

-Mélanger 4 µL de lipofectamine 2000③ dans 250 µL d'opti-MEM②, homogénéiser doucement et incuber 5 minutes à température ambiante.

-Ajouter la solution de lipofectamine③ à la solution d'ADN et non l'inverse. Homogénéiser doucement et incuber 20 minutes à température ambiante.

-Déposer le mélange lipofectamine③/ADN sur le milieu (goutte à goutte) et mélanger rapidement par agitation douce.

-Placer les cellules à 37°C, 5% de CO2.

-Après 4 heures, ajouter 10% SVF.

-Replacer les cellules à 37°C et à 5% de CO2 pendant 48 heures.

4) La sélection :

-48h après la transfection, commencer la sélection en ajoutant dans le milieu de culture classique du G418 à 1 mg/mL.

-Environ 3 jours après le début de la sélection, quand les cellules WT non transfectées, sensibles au G418, seront mortes, isoler les clones par la méthode de dilution limite (Fiche 6).

① Plastiques stériles à usage unique : BD Falcon, Dutscher, Brumath, France
② Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
③ Invitrogen, Saint Aubin, France

Fiche 6: Isolement des clones par dilution limite des cellules transfectées

Cette méthode est délicate en terme de maintenir en vie après un repiquage une cellule isolée dans un puit. Il est nécessaire de refaire plusieurs fois la dilution limite pour obtenir des clones véritables.

-Ensemencer les cellules transfectées dans une boite de pétri de 100 mm①.
-Au bout d'environ deux semaines, les boites contiennent suffisamment de cellules pour pouvoir les isoler.
-Dans un falcon de 15 mL②, récupérer une petite quantité de ces cellules.
-Ajouter quelques mL du milieu contenant G418 et bien homogénéiser.
-Transférer 100 µL de ces cellules dans un puit de plaque 96 puits① contenant 100µL de milieu avec G418.
-Faire des dilutions au 1/2 en cascade et croiser les doigts en espérant que les clones survivent.
-Repérer, avec un feutre, les puits ne contenant qu'une seule cellule.
-Une fois les cellules seront à confluence dans la plaque de 96 puits①, transférer les cellules dans une plaque des 24 puits ①puis dans une boite de pétri de 100 mm①.
- Tester la liaison de la transcobalamine à la vitamine B12 (Fiche 7) et vérifier par PCR (fiches 8, 9, 10) l'expression du gène d'intérêt (Transcobalamine-Oléosine TO ou Oléosine-Transcobalamine OT).

① Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
② Plastiques stériles à usage unique : BD Falcon, Dutscher, Brumath, France

Fiche 7: Liaison de la TCII à la vitamine B12 radiomarquée

-Décoller les cellules, centrifuger à température ambiante, à 200g, pendant 5 minutes.

-Laver le culot 2 fois avec de PBS①.

-Resuspendre le culot dans 1 mL du tampon TBS ②contenant un cocktail d'antiprotéases③.

-Passer les cellules 30 fois à la seringue.

-Ajouter 5 µL B12 radiomarquée au [57Co].

-Mettre sous agitation rotative pendant 30 min à 4°C.

-Centrifuger 30 min à 12000g à 4°C.

-Récupérer le surnageant et ajouter sur le culot 700 µL de TBS puis centrifuger 15 min à 15000g à 4°C.

-Répéter la dernière étape.

-Compter les surnageants et les culots.

① PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
②TBS 10X préparé à partir de Tris 200 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,4 ajusté avec HCl
③Protease Inhibitor Cocktail for mammalian tissues (P8340) (Sigma, St Louis, USA)

Fiche 8: Oligonucléotides utilisés pour les réactions de PCR pour les protéines chimères

Gène	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce ①② 5' ➔ 3'	Tm ③ (°C)	Taille de produit de PCR (pb)
Transcobalamine-Oléosine (TO)	TC Oléo S TC Oléo AS	ccc cta ctt aac ctc cgt ga gga gag gag caa cag agt gc	62 64	355
Oléosine-Transcobalamine (OT)	Oléo TC S TC Oléo AS	cga cag gta cat ggg acg ac cct agg agg cac tgc tgg ta	68 64	350

① Les oligonucléotides ont été synthétisés par le service commun de biologie moléculaire
② Les oligonucléotides utilisés ont été choisis à l'aide du programme Primer 3 (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA) accessible par l'adresse Internet, http://www.genome.wi.mit.edu
③ Le Tm est calculé (4°C pour G ou C et 2°C pour A ou T) sans tenir compte des sites de restriction

Fiche 9: Extraction d'ADN des cellules transfectées pour la vérification du gène d'intérêt

-Récupérer les cellules dans un Eppendorf 1,5 mL①.
-Centrifuger pendant 5 min, 200g, à température ambiante.
-Laver le culot 2 fois avec du PBS②.
-Ajouter 50 µL d'eau ultra-pure DNase free.
-Faire 3 fois congélation dans l'azote liquide/décongélation dans un bain-marie à 37°C.
-Amplifier l'ADN par PCR (fiche 10).

①Eppendorf, France
②PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France

Fiche 10: Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

1) Mélanger dans un microtube stérile (0,2 mL)① :

	Volume
H_2O ultra-pure stérile et DNase free	Qsp 25µL
Tampon PCR 10X②	2,5µL
MgCl2 50 mM	0,75µL
dNTP 10 mM	0,5µL
Amorce sens (10 µM)③	0,5 µL
Amorce anti-sens (10 µM)③	0,5 µL
ADN plasmidique	2 µL
Ampli Taq DNA polymérase④ (5u/µL)	0,15µL

2) Programme PCR⑤

	Température	**Durée**
	Dénaturation initiale 94°C	2 min
30 à 35 cycles	Dénaturation 94°C	15 sec
	Hybridation Tm⑥ -5°C	20 à 60 sec
	Elongation 72°C	1 min/kb d'ADN à amplifier
	Terminaison de la réaction	5 min

①Tube PCR en polypropylène Thermowell™ (Corning-Costar, Elmira, NY, USA)
②Tampon Ampli*Taq*® 10X : Tris-HCl 100 mM (pH 8,3), KCl 500 mM (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)
③Voir liste détaillée des amorces (fiche 6)
④Ampli*Taq*® DNA Polymerase : 5 U/µL (Perkin Elmer). Enzyme dépourvue d'activité exonucléase 3'à5' et possédant une activité transférase terminale-like ajoutant le plus souvent une base A non matricielle en 3' des amplimères
⑤Thermocycleur :GeneAmp® PCR System 2400 (PE Biosystems, Foster City, CA 94404, USA)
⑥Tm= Tm le plus bas des 2 amorces du couple choisi

Fiche 11: Analyse de l'ADN sur gel d'agarose

-Afin de préparer un gel d'agarose, peser la quantité appropriée d'agarose① selon la taille des ADN étudiés.

Concentration d'agarose (% en p/V)	Gamme de tailles idéales (en kb)
0.3	5 – 60
0.6	1 – 20
0.7	0.8 – 10
0.9	0.5 – 7
1.2	0.4 – 6
1.5	0.2 – 3
2.0	0.1 – 2

-Ajouter 80 mL du tampon TBE 1X ②.

-Chauffer au four à micro-ondes jusqu'à ébullition (~ 3 minutes).

-Refroidir à ~50°C sur la paillasse.

-Ajouter une goutte du bromure d'éthidium (BET)③ et homogénéiser.

-Mettre le peigne dans le support.

-Verser la solution d'agarose dans le support et laisser polymériser à température ambiante.

-Retirer le peigne et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie du tampon TBE 1X.

-Déposer dans les puits, un marqueur de taille appropriée④ et les échantillons (10 µL de produits PCR mélangés avec 2 µL de solution de dépôt⑤).

-Fermer la cuve et faire migrer l'ADN sous une tension constante de 110 V pendant 37 min.

-L'ADN contenu dans le gel est visualisé sur une plaque UV (312 nm) par Image Master™VDS.

①Agarose standard, Euromedex

② Tampon TBE 10X: Tris 890 mM acide borique 890 mM, EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid) 20 mM (pH 8,0) Wide Mini-Sub™ Cell (Bio-Rad Laboratories)

③Bromure d'éthidium (BET) : Eurobio

④ fX174 RF DNA/*Hae*III Fragments : 72-1353 pb (11 bandes) (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA)

- pUC18/MspI : 26-501 (12 bandes) ; Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
- 100 bp DNA Ladder : 100-1000 pb (11 bandes) (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
- 1 kb DNA Ladder : 250-10000 pb (14 bandes) (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
- SmartLadder : 200-10000 pb (14 bandes) marqueur de quantification (Eurogentec)

⑤Solution de dépôt 6X : Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v), EDTA 0,1 mM (pH 8,0), SDS 0,5% (p/v), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Fiche 12: Différents traitements effectués

Avant et après un traitement, un test de la capacité des cellules TO à lier la vitamine B12 (fiche 7) est effectué.

-Hydroxycobalamine, SAM, Adox, TG, Celastrol, MMA, Homocystine et l'inhibiteur de SIRT1 (EX527) sont achetés de Sigma (Lyon, France). L'activateur de SIRT1 (SRT1720) est obtenu d'Euromedex (Strasbourg, France).

Produit	Concentration	Durée du traitement
B12 (Hydroxycobalamine)	20µM	7 jours
SAM	75µM	5 jours
TG	1µM	5 heures
Adox	20µM	24-36 heures
Celastrol	3µM	24 heures
EX527	1µM	7 heures
SRT1720	5µM	8 heures
MMA	1 ; 5 et 25 µM	7 jours
Homocystine	15 µM	6 jours

Fiche 13: Transfection transitoire (SiRNA ou plasmides)

Avant la transfection, un test de la capacité des cellules TO à lier la vitamine B12 (fiche 7) est effectué.

1) La veille de la transfection :

- Dans une plaque de 6 puits①, ensemencer 2.10^5 cellules NIE-115 / puit dans 2,5 mL du milieu de culture (fiche 2).

2) Une heure avant la transfection :

- Rincer les cellules avec du milieu RPMI② (sans SVF, sans antibiotiques, sans pyruvate de sodium).
- Retirer le RPMI et rajouter 2,5 mL de RPMI② avec 1% pyruvate de sodium et 0,5 mg/mL G418 (sans SVF, sans antibiotiques).

3) La transfection :

- Mélanger 1 µg du plasmide d'intérêt ou 30 µL du SiRNA correspondant dans 250 µL d'opti-MEM②, homogénéiser doucement.
- Mélanger 4 µL de lipofectamine 2000③ dans 250 µL d'opti-MEM②, homogénéiser doucement et incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter la solution de lipofectamine③ à la solution d'ADN et non l'inverse. Homogénéiser doucement et incuber 20 minutes à température ambiante.
- Déposer le mélange lipofectamine③/ADN sur le milieu (goutte à goutte) et mélanger rapidement par agitation douce.
- Placer les cellules à 37°C et à 5% de CO2.
- Après 4 heures, ajouter 10% SVF et 0,5 mg/mL G418.
- Replacer les cellules à 37°C et à 5% de CO2 pendant 48 heures.

① Plastiques stériles à usage unique : BD Falcon, Dutscher, Brumath, France
② Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
③ Invitrogen, Saint Aubin, France

Fiche 14: SiRNA et plasmides utilisés

-Le siRNA contrôle est obtenu de Applied Biosystems, Saint Aubin, France, sa séquence est : 5'-UUGAUGUGUUUAGUCGCUA-3'

-Les deux siRNA ciblé contre SIRT1 sont obtenus de Life Technologies (Saint Aubin, France), les séquences de siRNA sont :

siSIRT1-1: 5'-GCUUGGAAGAUGAUACGGATT-3'

siSIRT1-2: 5'-GAAAACUACUUCGAAAUUATT-3'

-Le siRNA ciblé contre HSF1est obtenu de Fisher Scientific (Illkirch, France), la séquence de siRNA est: siHSF1: 5'-AGCAAAAAGUUGUCAACAATT-3'.

Concernant les surexpressions, les deux plasmides SIRT1 et HSF1 sont obtenus à partir de Addgene (Cambridge, MA, USA). Les plasmides HSF1-act et HSF1-inact sont un don du Dr N Harrison (Columbia University, New York City, NY, USA). HSF1-act dispose d'une délétion des acides aminés 203 à 315 du domaine régulateur de HSF1, alors que HSF1-inact a une délétion des acides aminés 453 à 523 situés dans le domaine d'activation de la transcription.

Fiche 15 : Extraction des protéines pour l'étude par Western-Blot

-Entretien des cellules dans des boites de pétri de100 mm①.

-Lorsque les cellules sont à confluence, rincer 2 fois les boites avec 5 mL de PBS② (possibilité de congeler les boites à -80°C jusqu'au jour de l'extraction).

-Sur de la glace, ajouter 650 µL de tampon RIPA③ par boite.

-Gratter les cellules et transférer dans des microtubes.

- Effectuer 3 cycles de congélation /décongélation (Azote liquide/bain marie à 37°C)

-Soumettre les cellules à une sonication pendant 15 minutes à 4°C.

-Centrifuger 30 min à 12000 rpm et à 4°C.

-Récupérer le surnageant et doser les protéines (fiche 16).

① Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
②PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
③***Tampon RIPA:*** Dissoudre dans l'eau ultrapure:
NaCl: 8 g/l
Na2HPO4: 1,44 g/l
KH2PO4: 0,24 g/l
NP40: 1 %
DOC: 0,5 %
SDS : 0,1 %

Tampon de lyse RIPA contenant :
Tampon RIPA
PMSF : 10µl/ml RIPA
Na3VO4 : 10µl/ml RIPA
Cocktail antiprotéase (Roche Applied Science, Meylan, France) : 1 tablette/10ml RIPA
Anti-phosphatase (Roche Applied Science, Meylan, France) : 1 tablette /10ml RIPA

Sachant que :
PMSF:10 mg/ml d'éthanol
Na3VO4 : à 100mM 18, 39 mg/ml d'H2O

Fiche 16: Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

Ce dosage est réalisé à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay® Reagent ①.

-Préparer une gamme étalon (50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 et 2000 µg/mL, en triple) à partir d'une solution stock de BSA② (bovine serum albumin) diluée dans la même solution que les échantillons à doser (tampon de lyse RIPA).
-Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes de réactif A (BCA)③avec 1 volume de réactif B (CuSO4)④.
-Distribuer 25 µL de chaque dilution de BSA ou d'échantillon à doser sur une plaque de 96 puits.
-Trois blancs sont réalisés avec 25 µL de diluant seul.
-Ajouter 200 µL de réactif de travail et agiter la plaque.
-Couvrir la plaque et la placer 30 min à 37°C.
-Laisser refroidir la plaque à température ambiante.
-Mesurer l'absorbance sur un spectrophotomètre lecteur de plaques à 570 nm.
-La droite de régression étalon est tracée et la concentration protéique des échantillons est déduite à partir de la courbe étalon.

①Pierce, Rockford, IL, USA
②Ampoule contenant de la BSA à 2,0 mg/mL dans une solution de NaCl à 0,9% (p/v) et NaN3 à 0,05% (p/v)
③ Réactif A : solution aqueuse contenant BCA-Na2 1% (p/v), Na2CO3 2% (p/v), tartrate-Na2 0,16%, NaOH 0,4% (p/v) et NaHCO3 0,95% (p/v) (pH 11,25)
④ Réactif B : solution de CuSO4.5H2O à 4% (p/v) dans de l'eau déionisée

Fiche 17: Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE)

1) Préparation des échantillons

-Prévoir un dépôt de 30µg de protéines par puit.

· Dans un tube, ajouter 1 volume de tampon de dépôt Laemmli 2X①à 1 volume d'échantillon.

· Chauffer 5 mn les échantillons à 100°C.

2) Préparation des gels

-Nettoyer les plaques de verre à l'alcool.

-Monter l'appareil d'électrophorèse②: plaques de verre et espaceurs (1,5 mm).

-Préparer le gel de migration à la concentration souhaitée③. Pour 1 gel prévoir 10mL de solution.

-Couler les gels entre les deux plaques de verre.

-Déposer environ 500 µl d'isopropanol et laisser polymériser le gel (15 minutes), puis rincer à l'eau distillée.

-Préparer le gel de concentration à 5 % ④(pour 1 gel prévoir 4 mL) et couler le au-dessus du gel de séparation.

-Positionner le peigne en Téflon en évitant la formation de bulles et laisser polymériser.

-Monter l'appareil en assemblant les deux supports de gel sur le système central.

-Remplir le réservoir central (cathode) jusqu'en haut ainsi que la cuve avec le tampon de migration⑤.

-Retirer le peigne.

-Charger les puits avec les échantillons et les marqueurs de poids moléculaire⑥.

3) Migration sur un générateur à voltage constant

-Brancher la cuve d'électrophorèse sur un générateur de courant continu.

-Laisser migrer à 80V les échantillons dans le gel de concentration environ 15mn puis à 110V dans le gel de migration.

-Arrêter la migration quand le front de migration atteigne le bas du gel (environ 2 heures).

① Tampon Laemmli X2 ; Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
②Appareil d'électrophorèse Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
③

Gel de migration		5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6 %	H_2O MQ	2,7	5,3	8	10,6	13,3	15,9	21,1	26,5
	Acrylamide Mix 29:1	1	2	3	4	5	6	8	10
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8 %	H_2O MQ	2,3	4,6	7	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
	Acrylamide Mix 29:1	1,3	2,7	4	5,3	6,7	8	10,7	13,4
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10 %	H_2O MQ	2	4	5,9	7,9	9,9	11,9	15,8	20
	Acrylamide Mix 29:1	1,7	3,3	5	6,7	8,3	10	13,3	16,6
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12 %	H_2O MQ	1,7	3,3	5	6,6	8,3	9,9	13,2	16,4
	Acrylamide Mix 29:1	2	4	6	8	10	12	14	20
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15 %	H_2O MQ	1,2	2,3	3,5	4,6	5,7	6,9	9,2	11,4
	Acrylamide Mix 29:1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20	25
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

④

Gel de concentration		1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
	H_2O MQ	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
	Acrylamide Mix 29:1	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1	1,3	1,7
	Tris 0,5M pH 6,8	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1	1,25
	SDS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
	APS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
	TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

⑤**Tampon de migration 10x concentré (pour 1 litre)** :
Tris 250 mM 30g
Glycine 1,92 M 144g
SDS 1% (p/v) 10g
PH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl ; conserver à 4°C),
A utiliser 1X concentré : diluer 100ml de la solution 10X et compléter à 1 litre (Utiliser à température ambiante).
⑥Marqueurs de poids moléculaires : *Low Molecular Weight* ; LMW - Amersham Pharmacia, UK

Fiche 18: Transfert des protéines sur membrane de PVDF

Electro-transfert « liquide »①

-Equilibrer les éponges et les papiers filtres environ 1 h avant la fin de la migration.

-Découper une membrane PVDF② ou en nitrocellulose à la dimension du gel (7x8 cm).

-Perméabiliser la membrane PVDF dans du méthanol pendant 30 sec.

-Equilibrer la membrane dans le tampon de transfert③ froid pendant 5 min (max).

-Démonter l'appareil de migration et tremper le gel d'électrophorèse dans le tampon de transfert froid (5 min max).

-Superposer les différents éléments du sandwich sur la partie blanche de la cassette dans l'ordre suivant :

- éponge
- un papier filtre④
- la membrane PVDF ou nitrocellulose
- le gel de polyacrylamide
- un papier filtre
- éponge

-Expulser les bulles d'air.

-Placer la cassette dans le module de transfert en mettant bien la face noire de la cassette contre la face noire du module.

-Mettre le glaçon et placer le montage dans la cuve remplie du tampon de transfert.

-Brancher l'appareil sur un générateur de courant continu et transférer à ampérage constant 350 mA pendant 45 minutes.

-Démonter le sandwich et récupérer la membrane.

①Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories)
②Membrane polyvinylidene difluoride membrane, (PVDF), porosité 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-
Coquette, France)
③Tampon de transfert 10X (pour 1 litre) :
Tris 480 mM, 58.1g
Glycine 390 mM 29,3g
SDS 0,375% (13mM) 3,75
PH~9,2 (ne pas ajuster avec HCl ; conserver à 4°C).
A utiliser 1X concentré : diluer 100ml de la solution 10X+200ml d'éthanol 100% et compléter à 1 litre (Utiliser froid)
④Papier buvard d'épaisseur 1 mm (blotting paper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA))

Fiche 19: Blocage, anticorps primaires et secondaires

Blocage

- Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane dans du tampon de blocage① pendant au moins 1 h à température ambiante sous agitation lente.

Anticorps primaire (fiche 20)

-Incuber la membrane avec l'anticorps primaire dirigé contre une protéine donnée dans du tampon de blocage (5mL/membrane) pendant 1 nuit à 4°C, sous agitation lente, dans de petits sacs en plastique scellés.

Lavage

-Rincer la membrane avec du TBST ② 4 fois 10 minutes sous agitation rapide à température ambiante.

Anticorps secondaire (fiche 20)

-Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaires conjugués à la peroxidase pendant 1 h sous agitation lente à température ambiante.

-Laver la membrane avec du TBST pendant 1 heure sous agitation rapide.

①Tampon de blocage : Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,15 M (TBS) contenant du Tween 20® à 0,3% (v/v) et 5% de lait en poudre écrémé ou 5% BSA

②Tampon de lavage : TBS contenant Tween® 20 à 0,05% (v/v)

Fiche 20: Liste des anticorps primaires et secondaires

Anticorps primaires	Utilisé pour	Fournisseur	Dilution 1er anticorps	Host	Dilution 2éme anticorps	blocage
Acetyl-lysine	IP WB	Cell Signaling	1/700	Lapin	1/2000	BSA
ATF4	WB	Abnova	1/200	Souris	1/2000	BSA
ATF6	WB IF	Santa Cruz	1/500	Souris	1/2000	Lait
β-actine	WB	US biological	1/1000	Poule	1/2000	Lait
BiP	WB	Cell Signaling	1/700	Lapin	1/2000	BSA
Caspase 3 clivée	WB	Cell Signaling	1/700	Lapin	1/2000	Lait
CHOP	WB	Cell Signaling	1/700	Souris	1/2000	BSA
eIF2α	WB	Cell signaling	1/1000	Lapin	1/2000	BSA
GCN2	WB	Cell signaling	1/700	Lapin	1/2000	BSA
HIC1	WB	Santa Cruz	1/700	Souris	1/2000	Lait
HRI	WB	Santa Cruz	1/700	Lapin	1/2000	
HSF1	IP WB IF	Cell signaling	1/700	Lapin	1/2000	BSA
HSP27	WB	Cell signaling	1/700	Lapin	1/2000	BSA
HSP70	WB	Stress marq	1/700	Souris	1/2000	Lait
HSP90	WB	Cell signaling	1/700	Lapin	1/2000	Lait
IRE1α	WB	Cell signaling	1/700	Lapin	1/2000	BSA
Ki67	WB	Abcam	1/700	Lapin	1/2000	Lait
PERK	WB	Cell signaling	1/700	Lapin	1/2000	BSA
PKR	WB	Santa Cruz	1/700	Lapin	1/2000	Lait
P- eIF2α	WB	Cell signaling	1/700	Lapin	1/2000	Lait
P- IRE1α	WB	Novus Biologicals	1/700	Lapin	1/2000	BSA
P-PERK	WB	Cell signaling	1/700	Lapin	1/2000	BSA
SIRT1	WB	Cell signaling	1/700	Lapin	1/2000	BSA
XBP1	WB	Biodesign,Memphis	1/700	Lapin	1/2000	Lait

Anticorps secondaires conjugués à la peroxidase:

1. Anti-Souris IgG – HRP sc 2314 Santa Cruz Biotechnology
2. Anti-Lapin IgG – HRP sc 2313 Santa Cruz Biotechnology
3. Anti-Poule IgG – HRP 6100 Southern Biotech

Fiche 21: Immunodétection par révélation en chimiluminescence de l'activité peroxidase

-L'activité peroxidase est révélée par chimiluminescence①.

-Déposer sur la membrane (protéines vers le haut) une solution d'ECL™.

-Laisser 1 min, puis sécher la membrane.

-Disposer la membrane entre 2 films plastique.

-Utiliser une détecteur FUSION-FX7 pour révéler les membranes.

① 3ECL+Plus (Amersham Pharmacia Biotech, UK) est basé sur la synthèse enzymatique d'un ester acridinique émettant une lumière intense

Fiche 22: Déshybridation des membranes (STRIPPING)

-Chauffer le tampon de déshybridation① dans un bain- marie à 37- 50°C (sous la hotte).

-Remplir un bac en verre de tampon de déshybridation**.**

-Immerger les membranes pendant 30 min à 37-50°C.

-Rincer rapidement les membranes à l'eau distillée.

-Rincer ensuite avec du TBST② 2x10 min, sous une agitation rapide.

-Reprendre le protocole de western à partir du blocage.

①**Tampon de déshybridation** : Pour 1 litre
100 mM 2-mercaptoethanol: 7 ml
2 % SDS: 20g
62,5mM Tris HCL pH 6,7: 7,57g
②**TBST 10x :** Pour 1 litre
Tris 200 mM: 24,2g
NaCl 1,5 M: 87,5g
pH 7,4 à ajuster avec HCl
qsp H2O MilliQ
Conserver à 4°C

Fiche 23: Immunoprécipitation①

1) Préparation les solutions :

Wash buffer 1 :

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

Wash buffer 2 :

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

Wash buffer 3 :

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

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

2) Extraction des protéines :

-Ajouter 500 µL de Wash buffer 1 par boite de pétri p100 et gratter.

-Faire 3 congélation-décongélation (azote liquide-eau chaude).

-Sonification pendant 15 minutes à 4°C.

-Doser les protéines (méthode BCA-fiche 16).

3) Immunoprécipitation de la protéine cible :

-Ajouter 25-50µL de la suspension homogène d'agarose protéine A ou G à l'échantillon (500µg) et incuber 3 heures (ou toute la nuit) à 2-8°C en agitation lente.

-Vortexer les tubes puis centrifuger à 12,000 g pendant 20 sec à 4°C. Transférer le surnageant dans un nouveau tube.

-Ajouter à l'échantillon 5 µl d'anticorps (volume à adapter) et agiter doucement 2h à 4°C.

-Ajouter 25 µl de suspension homogène d'agarose protéine A ou G à l'échantillon et incuber 3h (ou toute la nuit) à 2-8 °C en agitation lente.

-Vortexer les tubes puis centrifuger à 12,000 g pendant 20 sec à +4°C.

-Eliminer le surnageant, ajouter 500 µl de Wash buffer 1, resuspendre le culot, vortexer et incuber 20 min à 4°C sous agitation lente.

-Répéter les deux étapes précédentes.

-Vortexer les tubes puis centrifuger à 12,000 g 20 sec 4°C. Enlever le surnageant, ajouter 500 µl de Wash buffer 2, vortexer et incuber 20 min à 4°C sous agitation lente.

-Répéter l'étape précédente.

-Vortexer les tubes puis centrifuger à 12,000 g 20 sec 4°C. Enlever le surnageant, ajouter 500 µl de Wash buffer 3, vortexer et incuber 20 min à 4°C sous agitation lente.

-Eliminer le surnageant.

4) Préparation pour gel d'électrophorèse :

-Resuspendre le culot dans 50µl de tampon Laemmli 2X + 50 µl d'H2O.

-Chauffer 3min à 100°C.

-Centrifuger à 12000 g 20 sec.

-Transférer le surnageant dans un nouveau tube.

-Laisser refroidir l'échantillon à température ambiante avant de déposer dans le gel.

Fiche 24: Extraction des ARN avec le Kit RNeasy plus ①

Toutes les étapes du protocole RNeasy devront être accomplies à température ambiante.

-Lyser les cellules poussant sur des plaques 6 puits avec 350 µL RLT/b-Mercaptoéthanol②.

-Récupérer le lysat dans un tube de 1,5 mL.

- Ici, les échantillons peuvent être placés à –80°C. Dans ce cas, décongeler les échantillons pendant 15-20 min à 37°C dans un bain-marie.

-Passer le lysat à travers d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre adaptée à une seringue RNase-free.

-Transférer le lysat dans une colonne d'élimination d'ADN génomique. Centrifuger pendant 15 s à ≥8000 g. Si le volume excède 700 µl, faire cette étape en 2 fois.

-Ajouter 1 volume d'éthanol 70% (RNase-free) et mélanger en pipetant. Ne pas centrifuger.

-Déposer jusqu'à 700 µl de l'échantillon sur une mini-colonne RNeasy placée dans un tube collecteur de 2 mL. Centrifuger pendant 15 s à ≥8000 g. Jeter l'éluat. Si le volume excède 700 µl, recharger la même colonne RNeasy et centrifuger comme ci-dessus. Jeter l'éluat..

-Déposer 700 µL de tampon RW1 sur la mini-colonne, et centrifuger pendant 15s à ≥8000 g. Jeter l'éluat.

-Laver avec 500 µL de tampon RPE③ et centrifuger pendant 15s à ≥8000 g. Jeter l'éluat.

-Relaver avec 500 µL de tampon RPE et centrifuger pendant 2min à ≥10000 g. Jeter l'éluat.

-Transférer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL. Centrifuger pendant 1 min à ≥10000 g.

-Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. Déposer 30-50 µL d'eau RNasefree sur la membrane. Centrifuger 1 min à ≥8000 g pour éluer.

①Rneasy plus Mini Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France

② Préparer le volume à utiliser, à savoir 10 ml de b-Mercaptoéthanol par ml de tampon RLT

③Ajouter de l'éthanol au tampon RPE avant utilisation soit 44 ml d'éthanol 70% Rnase-free dans les 11 ml de tampon RPE

Fiche 25: Quantification des ARN

-Diluer les échantillons d'ARN dans de l'eau Milli-Q à un 1/120ème dans une cuve en quartz.

-Lire l'absorbance à 260 et 280 nm avec à un spectrophotomètre.

Une concentration d'ARN de 40 µg/mL donne une absorbance d'environ une unité de DO.

La concentration en ARN est calculée selon la formule suivante :

[ARN] = 44 µg/mL x A260nm x facteur de dilution.

Le ratio A260 / A280 est également calculé pour vérifier la pureté de la solution. Celui-ci doit être compris entre 1,8 et 2. Un ratio inférieur signifie une contamination par des protéines. Un ratio supérieur indique une dégradation des ARN.

-Faire des aliquotes de 1 µg d'ARN pour faire la transcription inverse (fiche 27).

Fiche 26: Vérification de l'intégrité des ARN sur gel d'agarose①

1) Préparation du gel d'agarose :

-Dissoudre l'agarose à raison de 1% (p/v) dans du tampon TBE 1X② (Tris, Borate, EDTA) (80-100 mL).

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

-Attendre que le mélange refroidisse.

-Ajouter une goutte de bromure d'éthidium (BET)③ et homogénéiser.

-Couler le mélange dans le support de la cuve d'électrophorèse④.

-Laisser polymériser pendant environ 20 min.

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

2) Préparation et dépôt des échantillons d'ARN :

- Ajouter de l'eau MilliQ sur les ARN qsp 10 µL et 2 µL de tampon de dépôt⑤.

-Déposer les 12 µL finaux dans les puits du gel

-Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu puis faire migrer pendant 35 min à 110 V.

3) Observation des ARN sur gel d'agarose :

-Une fois la migration achevée, arrêter le générateur et sortir le support de la cuve puis visualiser l'ARN contenu dans le gel sur une plaque UV (312 nm) par Image MasterTM VDS⑥.

-Deux bandes correspondant aux ARNr 28S et 18S sont alors visibles sur le gel. Si les ARN sons dégradés, un smear est alors observé.

①Agarose standard, Euromedex
②Tampon TBE 10X: Tris 890 mM acide borique 890 mM, EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid) 20 mM (pH 8,0), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
③Bromure d'éthidium (BET) : Eurobio
④Cuve d'electrophorèse, BioRad
⑤Solution de dépôt 6X : Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v), EDTA 0,1 mM (pH 8,0), SDS 0,5% (p/v), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
⑥Image MasterTM VDS, Pharmacia Biotech

Fiche 27: Transcription inverse des ARN (RT)①

-Sur un volume d'ARN équivalent à 1µg par échantillon, compléter avec de l'eau (RNase free) jusqu'à 12µl.

-Ajouter dans chaque tube 2µl de tampon gDNA Wipeout®.

-Centrifuger à la centrifugeuse de paillasse.

-Incuber 5 minutes à 42°C au Thermocycleur.

-Mettre les tubes rapidement dans la glace.

-Mélanger :

	Pour 1 échantillon	**RT- sans enzyme**	**RT- sans ARN**
Quantiscript RT Buffer	4 µL	4 µL	4 µL
RT primer mix	1 µL	1 µL	1 µL
Quantiscript Reverse Transcriptase (enzyme)	1 µL	0 µL	1 µL
ARN+ gDNA Wipeout	14 µL	14 L	- +14 µL H2O

-Centrifuger brièvement à la centrifugeuse de paillasse.

-Placer dans le Thermocycleur préchauffé et sélectionner le programme RT :

15 min à 42°C, 3 minutes à 95°C.

-Faire des aliquotes et Conserver les ADNc produit à -80°C.

① Utilisation du kit QuantiTect Reverse Transcription de Qiagen

Fiche 28: PCR quantitative en temps réel①

1) Description du Master mix :

- HotStarTaq DNA Polymerase (n'a pas d'activité enzymatique à température ambiante).
- QuantiTect SYBR Green PCR Buffer: Contenant Tris·HCl, KCl, (NH4)2SO4, 5 mM MgCl2, pH 8.7 (20°C)
- dNTP mix: Contient dATP, dCTP, dGTP, et dTTP/dUTP
- Fluorescent dyes: **SYBR Green I** émet de la fluorescence lorsqu'il se lie à l'ADN double brin.

2) Procédure :

-Décongeler les échantillons d'ADNc dans la glace, le master mix, les amorces et l'eau RNase free.

-Préparer un mix selon le tableau suivant :

Réactifs	Pour 1 puit (µL)	Témoin
Eau RNase free	7,8	7,8
Master Mix 10x	10	10
Amorce sens à 10 µM	0,6- 0,9	0,6- 0,9
Amorce antisens à 10 µM	0,6- 0,9	0,6- 0,9
ADNc	1	1 µL H2O (pas d'ADNc)
Volume final	20	20

-Dans les puits d'une plaque 96 puits②, mettre 19 µL de mix.

-Ajouter 1 µL d'ADNc de la dilution souhaitée (généralement 1/10) soit pour la gamme étalon soit pour l'échantillon à quantifier relativement à la gamme.

-Mettre un film adhésif transparent et autocollant sur la plaque.

-Programmer le bloc thermostaté③ pour un nombre de cycle compris entre 35 et 45 avec 3 étapes par cycle : la dénaturation à 94°C pendant 30 s, l'hybridation à 55- 57°C (selon les amorces utilisées) pendant 30 s, l'élongation à 72°C pendant 30 s.

①Utilisation du Kit Quantitect™ SYBR® Green PCR de Qiagen
②ABgene® PCR Plates, Thermo-Fast® 96, Semi-Skirted, AB-0990, Thermo Scientific
③iCyclerTM , Biorad

Fiche 29: Les amorces utilisées

Couple d'amorces ①	Séquences	T^{re} d'hybridation	Dilution de l'ADNc	Volume d'amorces 10 µM (µL)
SIRT1	S:5'-GACGATGACAGAACGTCACAC-3' AS: 5'-CGAGGATCGGTGCCAATCA-3'	56 °C	1/6	1,2
CHOP	S: 5'-GTCCCTAGCTTGGCTGACAGA-3' AS: 5'-TGGAGAGCGAGGGCTTTG-3'	56 °C	1/10	0,6
BiP	S: 5'-ACTTGGGGACCACCTATTCCT-3' AS: 5'-CGAGGATCGGTGCCAATCA-3'	56 °C	1/10	0,6
ATF4	S: 5'-ATGGCGCTCTTCACGAAATC-3' AS: 5'-ACTGGTCGAAGGGGTCATCAA-3'	56 °C	1/4	0,6
HSP70	S: 5'-GCGTGGGGGTATTCCAACAT-3' AS: 5'-TGAGACGCTCGGTGTCAGT-3'	56 °C	1/10	0,6
HIC1	S: 5'-GGCCATTCGAGGCAGCTAC-3' AS: 5'-AGGTTTAGCAGGTTGTCATGC-3'	56 °C	ADNc pure	1,8

①Les oligonucléotides ont été synthétisés par Eurogentec (Les Ulis, France). Les amorces pour la PCR quantitative ont été purifiées par HPLC. Les oligonucléotides utilisés ont été choisis à l'aide du logiciel Primer 3 (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA) accessible par l'adresse Internet, http://www.genome.wi.mit.edu

Fiche 30: Marquage d'immunofluorescence

-Traiter des lamelles① en verre avec une solution de poly-L-lysine de 15 µg/mL .

-Ensemencer 2.10^5 cellules /lammelle (fiche 32).

-Rincer 3 fois avec du PBS②.

-Fixer les cellules 14 min avec une solution de para-formaldéhyde③ 4% à 4°C.

-Rincer 1 fois 5 min avec du PBS contenant 0,1 M glycine.

-Rincer 1 fois 5 min avec du PBS.

-Perméabilisation membranaire : 1 fois 10 min avec une solution de Triton 0,1% (Triton X-100④/PBS).

-Rincer 2 fois 1 min avec du PBS contenant de tween (50µL Tween dans 50 mL PBS).

-Rincer 1 fois 5 min avec du PBS.

-Incuber toute une nuit à 4°C avec une solution de BSA⑤ 3% et sous agitation lente.

-Incuber avec l'anticorps primaire, à température ambiante, pendant 1h et sous agitation lente.

-Rincer 4 fois 5 min avec une solution de Triton BSA 3%/PBST.

-Incuber 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire, à l'abri de la lumière et sous agitation lente.

-Rincer 2 fois 5 min avec une solution du PBS.

-Incuber 20 secondes avec une solution de DAPI (436 nM)⑥.

· Rincer 4 fois 5 min avec du PBS.

· Rincer 1 fois avec de l'eau

· Monter les lamelles sur des lames à l'aide d'une goutte de solution de montage⑦.

· Maintenir les lames à l'abri de la lumière et à 4°C.

· Analyser les lames en microscopie confocale ou à fluorescence⑧.

①Lamelles en verre diamètre 14 mm, stérilisées : CML, Nemours, France : Sigma Aldriche
②PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
③Para-formaldéhyde (4%) à dissoudre dans du PBS 1X : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
④Triton X-100 : BDH, VWR international, France
⑤BSA, Bovin Serum Albumin : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
⑥DAPI: Sigma, Lyon, France
⑦Liquide de montage: faramount mounting medium (DAKO, Carpinteria, CA, USA)
⑧Microscope : microscope à fluorescence : BX51WI ; Olympus, Rungis, France ou microscope confocal : Nikon C2.

Fiche 31: Comptage des cellules vivantes en utilisant : la méthode d'exclusion au Bleu Trypan

-Décrocher les cellules avec une micropipette p 1000.

- Prélever 50 µL de l'homogénat cellulaire dans un tube à essai.

-Introduire 10 µL de la solution de Bleu trypan①.

-Homogénéiser doucement.

-Déposer 10 µL du mélange entre lame et lamelle de l'hématimètre②.

-Compter les cellules au microscope (Ne compter pas les cellules bleues correspondant aux cellules mortes).

-Faire la moyenne des 2 grilles.

- Comptage des cellules : nombre moyen de cellules par carré x facteur de dilution x 10^4.

① Solution Bleu trypan : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
② Cellule de Thoma: VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

Fiche 32: dosage de l'homocystéine, MMA, SAM et SAH

Dosage est effectué sur cellules TO et OT, traitées ou non avec la SAM ou la B12.

-Ensemencer des cellules dans des plaques 6 puits.

-Après 48 heures, gratter les cellules et centrifuger à 15000 rpm pendant 5 min.

-Aspirer le milieu en suspension.

-Analyse par LC-MS/MS①.

①Acquity UPLC (Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France) et un triple quadripôle Spectromètre de masse 4000 QTRAP (AB Sciex, Courtaboeuf, France)

Fiche 33: Analyses statistiques

Les données ont été analysées avec le logiciel Stata 12.0 (StataCorp, College Station, TX, USA) et rapporté en moyenne ± S.E. Les données ont été comparées par une analyse de la variance (Test Anova) avec le test de Fisher. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

Les résultats ont été indiqués par des astérisques en chiffres (*P<0.05; **P<0.01 et ***P<0.001).

BIBLIOGRAPHIE

Abcouwer SF, Marjon PL, Loper RK, Vander Jagt DL (2002) Response of VEGF expression to amino acid deprivation and inducers of endoplasmic reticulum stress. *Investigative ophthalmology & visual science* 43: 2791-2798

Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K (2008) ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell structure and function* 33: 75-89

Akbulut S, Altiparmak E, Topal F, Ozaslan E, Kucukazman M, Yonem O (2010) Increased levels of homocysteine in patients with ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology : WJG* 16: 2411-2416

Akchiche N, Bossenmeyer-Pourie C, Kerek R, Martin N, Pourie G, Koziel V, Helle D, Alberto JM, Ortiou S, Camadro JM, Leger T, Gueant JL, Daval JL (2012) Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26: 3980-3992

Allain P, Le Bouil A, Cordillet E, Le Quay L, Bagheri H, Montastruc JL (1995) Sulfate and cysteine levels in the plasma of patients with Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 16: 527-529

Allen RH, Seetharam B, Podell E, Alpers DH (1978) Effect of proteolytic enzymes on the binding of cobalamin to R protein and intrinsic factor. In vitro evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *The Journal of clinical investigation* 61: 47-54

Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J (1990) Diagnosis of cobalamin deficiency I: usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *American journal of hematology* 34: 90-98

Althausen S, Mengesdorf T, Mies G, Olah L, Nairn AC, Proud CG, Paschen W (2001) Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2alpha, elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice. *Journal of neurochemistry* 78: 779-787

Althausen S, Paschen W (2000) Homocysteine-induced changes in mRNA levels of genes coding for cytoplasmic- and endoplasmic reticulum-resident stress proteins in neuronal cell cultures. *Brain research Molecular brain research* 84: 32-40

Antony AC (2007) In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *The American journal of clinical nutrition* 85: 598S-603S

Antony AC, Kane MA, Portillo RM, Elwood PC, Kolhouse JF (1985) Studies of the role of a particulate folate-binding protein in the uptake of 5-methyltetrahydrofolate by cultured human KB cells. *The Journal of biological chemistry* 260: 14911-14917

Aoyama K, Burns DM, Suh SW, Garnier P, Matsumori Y, Shiina H, Swanson RA (2005) Acidosis causes endoplasmic reticulum stress and caspase-12-mediated astrocyte death. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25: 358-370

Arion WJ, Wallin BK, Lange AJ, Ballas LM (1975) On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Molecular and cellular biochemistry* 6: 75-83

Assaraf YG, Goldman ID (1997) Loss of folic acid exporter function with markedly augmented folate accumulation in lipophilic antifolate-resistant mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 272: 17460-17466

Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH (2004) Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell death and differentiation* 11 Suppl 1: S56-64

Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* 182: 685-701

Bailey LB, Gregory JF, 3rd (1999) Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *The Journal of nutrition* 129: 919-922

Banack SA, Caller TA, Stommel EW (2010) The cyanobacteria derived toxin Beta-N-methylamino-L-alanine and amyotrophic lateral sclerosis. *Toxins* 2: 2837-2850

Banerjee R, Gherasim C, Padovani D (2009) The tinker, tailor, soldier in intracellular B12 trafficking. *Current opinion in chemical biology* 13: 484-491

Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE, Martinez-Fong D, Daval JL, Gueant JL (2009) Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 21930-21935

Belal C, Ameli NJ, El Kommos A, Bezalel S, Al'Khafaji AM, Mughal MR, Mattson MP, Kyriazis GA, Tyrberg B, Chan SL (2012) The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum (ER) stress protein Herp counteracts mutant alpha-synuclein-induced ER stress via the homeostatic regulation of ER-resident calcium release channel proteins. *Human molecular genetics* 21: 963-977

Benavides A, Pastor D, Santos P, Tranque P, Calvo S (2005) CHOP plays a pivotal role in the astrocyte death induced by oxygen and glucose deprivation. *Glia* 52: 261-275

Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292: 1552-1555

Bhate V, Deshpande S, Bhat D, Joshi N, Ladkat R, Watve S, Fall C, de Jager CA, Refsum H, Yajnik C (2008) Vitamin B12 status of pregnant Indian women and cognitive function in their 9-year-old children. ***Food and nutrition bulletin*** **29: 249-254**

Blais J, Bell JC (2006) Novel therapeutic target: the PERKs of inhibiting the integrated stress response. ***Cell cycle*** **5: 2874-2877**

Blaise SA, Nedelec E, Alberto JM, Schroeder H, Audonnet S, Bossenmeyer-Pourie C, Gueant JL, Daval JL (2009) Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis. ***Experimental neurology*** **216: 231-238**

Blaise SA, Nedelec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourie C, Gueant JL, Daval JL (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. ***The American journal of pathology*** **170: 667-679**

Bleie O, Strand E, Ueland PM, Vollset SE, Refsum H, Igland J, Nordrehaug JE, Nygard OK (2011) Coronary blood flow in patients with stable coronary artery disease treated long term with folic acid and vitamin B12. ***Coronary artery disease*** **22: 270-278**

Blom HJ, Smulders Y (2011) Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. ***Journal of inherited metabolic disease*** **34: 75-81**

Boden G (2009) Endoplasmic reticulum stress: another link between obesity and insulin resistance/inflammation? ***Diabetes*** **58: 518-519**

Boldyrev AA (2009) Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. ***Biochemistry Biokhimiia*** **74: 589-598**

Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Gueant JL (2003) Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. ***American journal of medical genetics Part A*** **121A: 219-224**

Bossenmeyer-Pourie C, Pourie G, Koziel V, Helle D, Jeannesson E, Gueant JL, Beck B (2013) Early methyl donor deficiency produces severe gastritis in mothers and offspring through *N*-homocysteinylation of cytoskeleton proteins, cellular stress, and inflammation. ***FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*** **27: 2185–2197**

Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD (1995) The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. ***Genes & development*** **9: 2888-2902**

Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. ***Oncogene*** **22: 8608-8618**

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303: 2011-2015

Burdakov D, Petersen OH, Verkhratsky A (2005) Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function. *Cell calcium* 38: 303-310

Carreras CW, Santi DV (1995) The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annual review of biochemistry* 64: 721-762

Cazanave SC, Elmi NA, Akazawa Y, Bronk SF, Mott JL, Gores GJ (2010) CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 299: G236-243

Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Thomas J, Pao VY, Nguyen TK, Levy HL, Greene C, Freehauf C, Chou JY (2000) Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *American journal of human genetics* 66: 347-355

Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B (1997) Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *The Journal of biological chemistry* 272: 3628-3634

Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB (2005) Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123: 437-448

Chen X, Shen J, Prywes R (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *The Journal of biological chemistry* 277: 13045-13052

Chen YR, Fang SR, Fu YC, Zhou XH, Xu MY, Xu WC (2010) Calorie restriction on insulin resistance and expression of SIRT1 and SIRT4 in rats. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 88: 715-722

Chery C, Barbe F, Lequere C, Abdelmouttaleb I, Gerard P, Barbarino P, Boutroy JL, Gueant JL (2002) Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 40: 1105-1108

Cho W, Choi J, Park CH, Yoon SO, Jeoung DI, Kim YM, Choe J (2008) Expression of CD320 in human B cells in addition to follicular dendritic cells. *BMB reports* 41: 863-867

Chowdhury S, Banerjee R (1999) Role of the dimethylbenzimidazole tail in the reaction catalyzed by coenzyme B12-dependent methylmalonyl-CoA mutase. *Biochemistry* 38: 15287-15294

Clarke R, Birks J, Nexo E, Ueland PM, Schneede J, Scott J, Molloy A, Evans JG (2007) Low vitamin B-12 status and risk of cognitive decline in older adults. *The American journal of clinical nutrition* 86: 1384-1391

Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM (1998) Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. ***Archives of neurology*** **55: 1449-1455**

Coelho D, Kim JC, Miousse IR, Fung S, du Moulin M, Buers I, Suormala T, Burda P, Frapolli M, Stucki M, Nurnberg P, Thiele H, Robenek H, Hohne W, Longo N, Pasquali M, Mengel E, Watkins D, Shoubridge EA, Majewski J, Rosenblatt DS, Fowler B, Rutsch F, Baumgartner MR (2012) Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. ***Nature genetics*** **44: 1152-1155**

Coelho D, Suormala T, Stucki M, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS, Newbold RF, Baumgartner MR, Fowler B (2008) Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. ***The New England journal of medicine*** **358: 1454-1464**

Col B, Oltean S, Banerjee R (2007) Translational regulation of human methionine synthase by upstream open reading frames. ***Biochimica et biophysica acta*** **1769: 532-540**

Cole MG, Prchal JF (1984) Low serum vitamin B12 in Alzheimer-type dementia. ***Age and ageing*** **13: 101-105**

Cuervo AM (2010) The plasma membrane brings autophagosomes to life. ***Nature cell biology*** **12: 735-737**

Cullinan SB, Diehl JA (2004) PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. ***The Journal of biological chemistry*** **279: 20108-20117**

Cuozzo JW, Kaiser CA (1999) Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. ***Nature cell biology*** **1: 130-135**

Dally S, Monceau V, Corvazier E, Bredoux R, Raies A, Bobe R, del Monte F, Enouf J (2009) Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing and failing human heart. ***Cell calcium*** **45: 144-154**

Daval JL, Blaise S, Gueant JL (2009) Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*** **106: E1; author reply E2**

Day D (1935) Some Chemical Aspects of Calcium Deficiency Effects on Pisum Sativum. ***Plant physiology*** **10: 811-816**

de Carvalho SC, Muniz MT, Siqueira MD, Siqueira ER, Gomes AV, Silva KA, Bezerra LC, D'Almeida V, de Oliveira CP, Pereira LM (2013) Plasmatic higher levels of homocysteine in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). ***Nutrition journal*** **12: 37**

de Lau LM, Koudstaal PJ, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM (2006) Dietary folate, vitamin B12, and vitamin B6 and the risk of Parkinson disease. ***Neurology*** **67: 315-318**

Deldicque L, Cani PD, Philp A, Raymackers JM, Meakin PJ, Ashford ML, Delzenne NM, Francaux M, Baar K (2010) The unfolded protein response is activated in skeletal

muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 299: E695-705

Delepine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Lathrop GM, Julier C (2000) EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nature genetics* 25: 406-409

Deng XQ, Chen LL, Li NX (2007) The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 27: 708-715

Dery MA, Jodoin J, Ursini-Siegel J, Aleynikova O, Ferrario C, Hassan S, Basik M, Leblanc AC (2013) Endoplasmic reticulum stress induces PRNP prion protein gene expression in breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 15: R22

Deslauriers AM, Afkhami-Goli A, Paul AM, Bhat RK, Acharjee S, Ellestad KK, Noorbakhsh F, Michalak M, Power C (2011) Neuroinflammation and endoplasmic reticulum stress are coregulated by crocin to prevent demyelination and neurodegeneration. *Journal of immunology* 187: 4788-4799

Dhonukshe-Rutten RA, Lips M, de Jong N, Chin APMJ, Hiddink GJ, van Dusseldorp M, De Groot LC, van Staveren WA (2003) Vitamin B-12 status is associated with bone mineral content and bone mineral density in frail elderly women but not in men. *The Journal of nutrition* 133: 801-807

Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, Lips P, Smit JH, van Staveren WA (2005) Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20: 921-929

Dolzhanskaya N, Merz G, Denman RB (2006) Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein. *Biochemistry* 45: 10385-10393

Doyle KM, Kennedy D, Gorman AM, Gupta S, Healy SJ, Samali A (2011) Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *Journal of cellular and molecular medicine* 15: 2025-2039

Dringen R, Hamprecht B (1999) N-acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain. *Neuroscience letters* 259: 79-82

Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman, II, Cadet JL, Mattson MP (2002) Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 80: 101-110

Egawa N, Yamamoto K, Inoue H, Hikawa R, Nishi K, Mori K, Takahashi R (2011) The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6alpha, protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *The Journal of biological chemistry* 286: 7947-7957

Ehren JL, Maher P (2013) Concurrent regulation of the transcription factors Nrf2 and ATF4 mediates the enhancement of glutathione levels by the flavonoid fisetin. *Biochemical pharmacology* 85: 1816-1826

Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M (2008) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine reviews* 29: 42-61

Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews Molecular cell biology* 4: 181-191

Fawcett TW, Martindale JL, Guyton KZ, Hai T, Holbrook NJ (1999) Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *The Biochemical journal* 339 (Pt 1): 135-141

Fernandes-Costa F, Metz J (1982) Vitamin B12 binders (transcobalamins) in serum. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 18: 1-30

Field NC, Caller TA, Stommel EW (2011) An explanation for the changes in collagen in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Medical hypotheses* 77: 565-567

Fofou-Caillierez MB, Mrabet NT, Chery C, Dreumont N, Flayac J, Pupavac M, Paoli J, Alberto JM, Coelho D, Camadro JM, Feillet F, Watkins D, Fowler B, Rosenblatt DS, Gueant JL (2013) Interaction between methionine synthase isoforms and MMACHC: characterization in cblG-variant, cblG and cblC inherited causes of megaloblastic anemia. *Human molecular genetics*

Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Human reproduction update* 13: 225-238

Foufelle F, Ferre P (2007) [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Medecine sciences : M/S* 23: 291-296

Frand AR, Cuozzo JW, Kaiser CA (2000) Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends in cell biology* 10: 203-210

Frand AR, Kaiser CA (1998) The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* 1: 161-170

Franken DG, Blom HJ, Boers GH, Tangerman A, Thomas CM, Trijbels FJ (1996) Thiamine (vitamin B1) supplementation does not reduce fasting blood homocysteine concentration in most homozygotes for homocystinuria. *Biochimica et biophysica acta* 1317: 101-104

Fuso A, Scarpa S (2011) One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: is it all a methylation matter? *Neurobiology of aging* 32: 1192-1195

Ganesan T, Khadra MH, Wallis J, Neal DE (2002) Vitamin B12 malabsorption following bladder reconstruction or diversion with bowel segments. ***ANZ journal of surgery*** **72: 479-482**

Garcia MM, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Gueguen N, Marie PY, Lacolley P, Herrmann M, Juilliere Y, Malthiery Y, Gueant JL (2011) Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. ***The Journal of pathology*** **225: 324-335**

Garrod MG, Green R, Allen LH, Mungas DM, Jagust WJ, Haan MN, Miller JW (2008) Fraction of total plasma vitamin B12 bound to transcobalamin correlates with cognitive function in elderly Latinos with depressive symptoms. ***Clinical chemistry*** **54: 1210-1217**

Gerhard GT, Duell PB (1999) Homocysteine and atherosclerosis. ***Current opinion in lipidology*** **10: 417-428**

Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, Refsum H, Drevon CA, Gjessing HK, Tell GS (2006) Plasma total homocysteine level and bone mineral density: the Hordaland Homocysteine Study. ***Archives of internal medicine*** **166: 88-94**

Goder V (2012) Roles of ubiquitin in endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD). ***Current protein & peptide science*** **13: 425-435**

Goodkin DE, Jacobsen DW, Galvez N, Daughtry M, Secic M, Green R (1994) Serum cobalamin deficiency is uncommon in multiple sclerosis. ***Archives of neurology*** **51: 1110-1114**

Gotoh T, Oyadomari S, Mori K, Mori M (2002) Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. ***The Journal of biological chemistry*** **277: 12343-12350**

Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M (2004) hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. ***Cell death and differentiation*** **11: 390-402**

Grasbeck R, Simons K, Sinkkonen I (1965) Isolation of intrinsic factors from human gastric juice. ***Acta chemica Scandinavica*** **19: 1777-1778**

Grimm AA, Brace CS, Wang T, Stormo GD, Imai S (2011) A nutrient-sensitive interaction between Sirt1 and HNF-1alpha regulates Crp expression. ***Aging cell*** **10: 305-317**

Grutzner N, Heilmann RM, Stupka KC, Rangachari VR, Weber K, Holzenburg A, Suchodolski JS, Steiner JM (2013) Serum homocysteine and methylmalonic acid concentrations in Chinese Shar-Pei dogs with cobalamin deficiency. ***Veterinary journal***

Guarente L (2011) Sirtuins, aging, and metabolism. ***Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*** **76: 81-90**

Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Nippert M, Abdelmouttaleb I, Herbeth B, Aliot E, Danchin N, Gueant JL (2007) Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions. ***Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*** **5: 1209-1216**

Gueant JL, Gerard A, Monin B, Champigneulle B, Gerard H, Nicolas JP (1988) Radioautographic localisation of iodinated human intrinsic factor in the guinea pig ileum using electron microscopy. ***Gut*** **29: 1370-1378**

Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, Ferri R, Romano A, Candito M, Namour B (2003) Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? ***Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*** **41: 1473-1477**

Gueant JL, Namour F, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL (2013) Folate and fetal programming: a play in epigenomics? ***Trends in endocrinology and metabolism: TEM*** **24: 279-289**

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. ***Nature*** **495: 389-393**

Hampton RY (2000) ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. ***Current biology : CB*** **10: R518-521**

Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. ***The New England journal of medicine*** **352: 1685-1695**

Harding HP, Calfon M, Urano F, Novoa I, Ron D (2002) Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. ***Annual review of cell and developmental biology*** **18: 575-599**

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. ***Molecular cell*** **6: 1099-1108**

Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D (2001) Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. ***Molecular cell*** **7: 1153-1163**

Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. ***Nature*** **397: 271-274**

Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. ***Molecular cell*** **11: 619-633**

Hasnain SZ, Lourie R, Das I, Chen AC, McGuckin MA (2012) The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. ***Immunology and cell biology*** **90: 260-270**

Hayano T, Inaka K, Otsu M, Taniyama Y, Miki K, Matsushima M, Kikuchi M (1993) PDI and glutathione-mediated reduction of the glutathionylated variant of human lysozyme. ***FEBS letters*** **328: 203-208**

Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Chan PH (2005) Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. ***Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*** **25: 41-53**

Haynes CM, Titus EA, Cooper AA (2004) Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. ***Molecular cell*** **15: 767-776**

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. ***Molecular biology of the cell*** **10: 3787-3799**

He CH, Gong P, Hu B, Stewart D, Choi ME, Choi AM, Alam J (2001) Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. ***The Journal of biological chemistry*** **276: 20858-20865**

Headstrom PD, Rulyak SJ, Lee SD (2008) Prevalence of and risk factors for vitamin B(12) deficiency in patients with Crohn's disease. ***Inflammatory bowel diseases*** **14: 217-223**

Hegde RS, Ploegh HL (2010) Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. ***Current opinion in cell biology*** **22: 437-446**

Herrmann W, Obeid R (2011) Biomarkers of neurodegenerative diseases. ***Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*** **49: 343-344**

Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD (2012) Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. ***Neurobiology of learning and memory*** **98: 25-32**

Hinnebusch AG (1993) Gene-specific translational control of the yeast GCN4 gene by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2. ***Molecular microbiology*** **10: 215-223**

Hodgkin DC, Kamper J, Mackay M, Pickworth J, Trueblood KN, White JG (1956) Structure of vitamin B12. ***Nature*** **178: 64-66**

Hoffman M (2011) Hypothesis: hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress. ***Medical hypotheses*** **77: 1088-1093**

Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, Rozemuller JM, Baas F, Eikelenboom P, Scheper W (2005) The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. ***Acta neuropathologica*** **110: 165-172**

Hotamisligil GS (2003) Inflammatory pathways and insulin action. ***International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*** **27 Suppl 3: S53-55**

Huang HC, Nguyen T, Pickett CB (2000) Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*** **97: 12475-12480**

Hubbard SC, Ivatt RJ (1981) Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. ***Annual review of biochemistry*** **50: 555-583**

Huber AL, Lebeau J, Guillaumot P, Petrilli V, Malek M, Chilloux J, Fauvet F, Payen L, Kfoury A, Renno T, Chevet E, Manie SN (2013) p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. ***Molecular cell*** **49: 1049-1059**

Huber K, Superti-Furga G (2011) After the grape rush: sirtuins as epigenetic drug targets in neurodegenerative disorders. ***Bioorganic & medicinal chemistry*** **19: 3616-3624**

Inada M, Toyoshima M, Kameyama M (1982) Cobalamin contents of the brains in some clinical and pathologic states. ***International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernahrungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*** **52: 423-429**

Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M (2000) Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. ***The Journal of biological chemistry*** **275: 16023-16029**

Ivy JM, Klar AJ, Hicks JB (1986) Cloning and characterization of four SIR genes of Saccharomyces cerevisiae. ***Molecular and cellular biology*** **6: 688-702**

Iwawaki T, Hosoda A, Okuda T, Kamigori Y, Nomura-Furuwatari C, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K (2001) Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. ***Nature cell biology*** **3: 158-164**

Iyer R, Tomar SK (2009) Folate: a functional food constituent. ***Journal of food science*** **74: R114-122**

Jain A (2013) Endothelin-1 induced endoplasmic reticulum stress in disease. ***The Journal of pharmacology and experimental therapeutics***

Jakubowski H (2004) Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. ***Cellular and molecular life sciences : CMLS*** **61: 470-487**

Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Lu D, Hai T, Harding HP, Wang X, Ron D, Cavener DR, Wek RC (2004) Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. ***Molecular and cellular biology*** **24: 1365-1377**

Jiang W, Nakayama Y, Sequeira JM, Quadros EV (2013) Mapping the functional domains of TCblR/CD320, the receptor for cellular uptake of transcobalamin-bound

cobalamin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*

Jung TW, Lee KT, Lee MW, Ka KH (2012) SIRT1 attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in HepG2 cells via induction of oxygen-regulated protein 150. *Biochemical and biophysical research communications* 422: 229-232

Kaeberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms. *Genes & development* 13: 2570-2580

Kane MA, Elwood PC, Portillo RM, Antony AC, Kolhouse JF (1986) The interrelationship of the soluble and membrane-associated folate-binding proteins in human KB cells. *The Journal of biological chemistry* 261: 15625-15631

Kapadia CR (1995) Vitamin B12 in health and disease: part I--inherited disorders of function, absorption, and transport. *The Gastroenterologist* 3: 329-344

Karnaze DS, Carmel R (1987) Low serum cobalamin levels in primary degenerative dementia. Do some patients harbor atypical cobalamin deficiency states? *Archives of internal medicine* 147: 429-431

Kaufman RJ (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of clinical investigation* 110: 1389-1398

Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM (2002) The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nature reviews Molecular cell biology* 3: 411-421

Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL (2004) Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145: 5087-5096

Kim G, Meriin AB, Gabai VL, Christians E, Benjamin I, Wilson A, Wolozin B, Sherman MY (2012a) The heat shock transcription factor Hsf1 is downregulated in DNA damage-associated senescence, contributing to the maintenance of senescence phenotype. *Aging cell* 11: 617-627

Kim I, Xu W, Reed JC (2008a) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery* 7: 1013-1030

Kim J, Gherasim C, Banerjee R (2008b) Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 14551-14554

Kim JC, Lee NC, Hwu PW, Chien YH, Fahiminiya S, Majewski J, Watkins D, Rosenblatt DS (2012b) Late onset of symptoms in an atypical patient with the cblJ inborn error of vitamin B12 metabolism: diagnosis and novel mutation revealed by exome sequencing. *Molecular genetics and metabolism* 107: 664-668

Kim KC, Friso S, Choi SW (2009) DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. ***The Journal of nutritional biochemistry*** **20: 917-926**

Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T (2000) Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. ***The Journal of biological chemistry*** **275: 32846-32853**

Kokame K, Kato H, Miyata T (1996) Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. ***The Journal of biological chemistry*** **271: 29659-29665**

Kokame K, Kato H, Miyata T (2001) Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. ***The Journal of biological chemistry*** **276: 9199-9205**

Korennykh AV, Egea PF, Korostelev AA, Finer-Moore J, Zhang C, Shokat KM, Stroud RM, Walter P (2009) The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. ***Nature*** **457: 687-693**

Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. ***Annual review of biochemistry*** **54: 631-664**

Koshy AS, Kumari SJ, Ayyar V, Kumar P (2012) Evaluation of serum vitamin B12 levels in type 1 diabetics attending a tertiary care hospital: A preliminary cross - sectional study. ***Indian journal of endocrinology and metabolism*** **16 Suppl 1: S79-82**

Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J (1988) The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. ***Nature*** **332: 462-464**

Krautler B (2005) Vitamin B12: chemistry and biochemistry. ***Biochemical Society transactions*** **33: 806-810**

Kruman, II, Mouton PR, Emokpae R, Jr., Cutler RG, Mattson MP (2005) Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. ***Neuroreport*** **16: 1055-1059**

Kubova H, Folbergrova J, Mares P (1995) Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis. ***Epilepsia*** **36: 750-756**

Kuhn W, Roebroek R, Blom H, van Oppenraaij D, Przuntek H, Kretschmer A, Buttner T, Woitalla D, Muller T (1998) Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. ***European neurology*** **40: 225-227**

Kumar A, Tikoo S, Maity S, Sengupta S, Sengupta S, Kaur A, Bachhawat AK (2012) Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as gamma-glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. ***EMBO reports*** **13: 1095-1101**

Kumthekar AA, Gidwani HV, Kumthekar AB (2012) Metformin associated B12 deficiency. *The Journal of the Association of Physicians of India* 60: 58-60

Kwok JB (2010) Role of epigenetics in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Epigenomics* 2: 671-682

Kwon HS, Ott M (2008) The ups and downs of SIRT1. *Trends in biochemical sciences* 33: 517-525

Lagace TA, Ridgway ND (2013) The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum. *Biochimica et biophysica acta*

Lai SC, Nakayama Y, Sequeira JM, Quadros EV (2011) Down-regulation of transcobalamin receptor TCblR/CD320 by siRNA inhibits cobalamin uptake and proliferation of cells in culture. *Experimental cell research* 317: 1603-1607

Lamberti P, Zoccolella S, Armenise E, Lamberti SV, Fraddosio A, de Mari M, Iliceto G, Livrea P (2005) Hyperhomocysteinemia in L-dopa treated Parkinson's disease patients: effect of cobalamin and folate administration. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 12: 365-368

Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH (2003) XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and cellular biology* 23: 7448-7459

Lee AS (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 35: 373-381

Lentz SR, Sadler JE (1993) Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood* 81: 683-689

Levin J, Botzel K, Giese A, Vogeser M, Lorenzl S (2010) Elevated levels of methylmalonate and homocysteine in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and amyotrophic lateral sclerosis. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 29: 553-559

Li L, Yoon SO, Fu DD, Zhang X, Choi YS (2004) Novel follicular dendritic cell molecule, 8D6, collaborates with CD44 in supporting lymphomagenesis by a Burkitt lymphoma cell line, L3055. *Blood* 104: 815-821

Li Y, Xu S, Giles A, Nakamura K, Lee JW, Hou X, Donmez G, Li J, Luo Z, Walsh K, Guarente L, Zang M (2011) Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25: 1664-1679

Lildballe DL, Mutti E, Birn H, Nexo E (2012) Maximal load of the vitamin B12 transport system: a study on mice treated for four weeks with high-dose vitamin B12 or cobinamide. *PloS one* 7: e46657

Lin W, Popko B (2009) Endoplasmic reticulum stress in disorders of myelinating cells. *Nature neuroscience* 12: 379-385

Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, Marcell PD, Stabler SP, Allen RH (1988) Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *The New England journal of medicine* 318: 1720-1728

Liu W, Zhu X, Wang Q, Wang L (2013) Hyperglycemia induces endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP expression in osteoblasts. *Experimental and therapeutic medicine* 5: 1289-1292

Liu XX, Wilson K, Charlton CG (2000) Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa. *Life sciences* 66: 2277-2288

Lu SC (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13: 1169-1183

Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107: 137-148

Ma Y, Hendershot LM (2001) The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* 107: 827-830

Ma Y, Hendershot LM (2003) Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry* 278: 34864-34873

Malhi H, Kaufman RJ (2011) Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *Journal of hepatology* 54: 795-809

Mandl J, Meszaros T, Banhegyi G, Csala M (2013) Minireview: endoplasmic reticulum stress: control in protein, lipid, and signal homeostasis. *Molecular endocrinology* 27: 384-393

Marjon PL, Bobrovnikova-Marjon EV, Abcouwer SF (2004) Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress. *Molecular cancer* 3: 4

Maron BJ, Edwards JE, Ferrans VJ, Clark CE, Lebowitz EA, Henry WL, Epstein SE (1975) Congenital heart malformations associated with disproportionate ventricular septal thickening. *Circulation* 52: 926-932

Martin DC, Francis J, Protetch J, Huff FJ (1992) Time dependency of cognitive recovery with cobalamin replacement: report of a pilot study. *Journal of the American Geriatrics Society* 40: 168-172

Massa SM, Swanson RA, Sharp FR (1996) The stress gene response in brain. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews* 8: 95-158

Matthews RG, Ross J, Baugh CM, Cook JD, Davis L (1982) Interactions of pig liver serine hydroxymethyltransferase with methyltetrahydropteroylpolyglutamate inhibitors and with tetrahydropteroylpolyglutamate substrates. *Biochemistry* 21: 1230-1238

Matus S, Glimcher LH, Hetz C (2011) Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER. *Current opinion in cell biology* 23: 239-252

McCaddon A (2006) Homocysteine and cognition--a historical perspective. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 9: 361-380

McCaddon A (2013) Vitamin B12 in neurology and ageing; clinical and genetic aspects. *Biochimie* 95: 1066-1076

McCaddon A, Davies G, Hudson P, Tandy S, Cattell H (1998) Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. *International journal of geriatric psychiatry* 13: 235-239

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology* 21: 1249-1259

McCully KS (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *The American journal of pathology* 56: 111-128

McLean GR, Quadros EV, Rothenberg SP, Morgan AC, Schrader JW, Ziltener HJ (1997) Antibodies to transcobalamin II block in vitro proliferation of leukemic cells. *Blood* 89: 235-242

McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP (2004) Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *The New England journal of medicine* 350: 2042-2049

Melton ME, Kochman ML (1994) Reversal of severe osteoporosis with vitamin B12 and etidronate therapy in a patient with pernicious anemia. *Metabolism: clinical and experimental* 43: 468-469

Milhavet O, Martindale JL, Camandola S, Chan SL, Gary DS, Cheng A, Holbrook NJ, Mattson MP (2002) Involvement of Gadd153 in the pathogenic action of presenilin-1 mutations. *Journal of neurochemistry* 83: 673-681

Miller JW, Selhub J, Nadeau MR, Thomas CA, Feldman RG, Wolf PA (2003) Effect of L-dopa on plasma homocysteine in PD patients: relationship to B-vitamin status. *Neurology* 60: 1125-1129

Miller JW, Shukitt-Hale B, Villalobos-Molina R, Nadeau MR, Selhub J, Joseph JA (1997) Effect of L-Dopa and the catechol-O-methyltransferase inhibitor Ro 41-0960 on sulfur amino acid metabolites in rats. *Clinical neuropharmacology* 20: 55-66

Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM (1995) Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 345: 149-151

Minamino T, Kitakaze M (2010) ER stress in cardiovascular disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48: 1105-1110

Mitchell HK, Snell EE, Williams RJ (1988) Journal of the American Chemical Society, Vol. 63, 1941: The concentration of "folic acid" by Herschel K. Mitchell, Esmond E. Snell, and Roger J. Williams. *Nutrition reviews* 46: 324-325

Miyamoto N, Izumi H, Miyamoto R, Bin H, Kondo H, Tawara A, Sasaguri Y, Kohno K (2011) Transcriptional regulation of activating transcription factor 4 under oxidative stress in retinal pigment epithelial ARPE-19/HPV-16 cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 52: 1226-1234

Mori K (2000) Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101: 451-454

Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *The Journal of biological chemistry* 277: 34287-34294

Morris MS, Jacques PF, Selhub J (2005) Relation between homocysteine and B-vitamin status indicators and bone mineral density in older Americans. *Bone* 37: 234-242

Mudd SH, Poole JR (1975) Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism: clinical and experimental* 24: 721-735

Muller T, Werne B, Fowler B, Kuhn W (1999) Nigral endothelial dysfunction, homocysteine, and Parkinson's disease. *Lancet* 354: 126-127

Muoio DM, Newgard CB (2004) Biomedicine. Insulin resistance takes a trip through the ER. *Science* 306: 425-426

Muratore CR, Hodgson NW, Trivedi MS, Abdolmaleky HM, Persico AM, Lintas C, De la Monte S, Deth RC (2013) Age-dependent decrease and alternative splicing of methionine synthase mRNA in human cerebral cortex and an accelerated decrease in autism. *PloS one* 8: e56927

Murray JA (1999) The widening spectrum of celiac disease. *The American journal of clinical nutrition* 69: 354-365

Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M (2007) Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 116: 1226-1233

Naharci I, Bozoglu E, Karadurmus N, Emer O, Kocak N, Kilic S, Doruk H, Serdar M (2012) Vitamin B(12) and folic acid levels as therapeutic target in preserving bone mineral density (BMD) of older men. ***Archives of gerontology and geriatrics*** **54: 469-472**

Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. ***The Journal of cell biology*** **150: 887-894**

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. ***Nature*** **403: 98-103**

Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Gueant J (2001) Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. ***Blood*** **97: 1092-1098**

Narasimhan P, Swanson RA, Sagar SM, Sharp FR (1996) Astrocyte survival and HSP70 heat shock protein induction following heat shock and acidosis. ***Glia*** **17: 147-159**

Nervo M, Lubini A, Raimundo FV, Faulhaber GA, Leite C, Fischer LM, Furlanetto TW (2011) Vitamin B12 in metformin-treated diabetic patients: a cross-sectional study in Brazil. ***Revista da Associacao Medica Brasileira*** **57: 46-49**

Nicolas JP, Gueant JL (1994) [Absorption, distribution and excretion of vitamin B12]. ***Annales de gastroenterologie et d'hepatologie*** **30: 270-276, 281; discussion 281-272**

Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CB, Nexo E, Moestrup SK (2012) Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. ***Nature reviews Gastroenterology & hepatology*** **9: 345-354**

Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. ***Genes & development*** **16: 1345-1355**

O'Suilleabhain PE, Sung V, Hernandez C, Lacritz L, Dewey RB, Jr., Bottiglieri T, Diaz-Arrastia R (2004) Elevated plasma homocysteine level in patients with Parkinson disease: motor, affective, and cognitive associations. ***Archives of neurology*** **61: 865-868**

Okle O, Stemmer K, Deschl U, Dietrich DR (2013) L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low nonexcitotoxic concentrations. ***Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*** **131: 217-224**

Okun JG, Horster F, Farkas LM, Feyh P, Hinz A, Sauer S, Hoffmann GF, Unsicker K, Mayatepek E, Kolker S (2002) Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. ***The Journal of biological chemistry*** **277: 14674-14680**

Oltean S, Banerjee R (2005) A B12-responsive internal ribosome entry site (IRES) element in human methionine synthase. *The Journal of biological chemistry* 280: 32662-32668

Orozco-Barrios CE, Battaglia-Hsu SF, Arango-Rodriguez ML, Ayala-Davila J, Chery C, Alberto JM, Schroeder H, Daval JL, Martinez-Fong D, Gueant JL (2009) Vitamin B12-impaired metabolism produces apoptosis and Parkinson phenotype in rats expressing the transcobalamin-oleosin chimera in substantia nigra. *PloS one* 4: e8268

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology* 4: 552-565

Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn KE, Amore AM, Volk CB, Maxwell MM, Rochet JC, McLean PJ, Young AB, Abagyan R, Feany MB, Hyman BT, Kazantsev AG (2007) Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* 317: 516-519

Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC (1999) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* 94: 959-967

Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M (2002) Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *The Journal of clinical investigation* 109: 525-532

Oyadomari S, Mori M (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and differentiation* 11: 381-389

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306: 457-461

Pablo J, Banack SA, Cox PA, Johnson TE, Papapetropoulos S, Bradley WG, Buck A, Mash DC (2009) Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica* 120: 216-225

Padovani D, Labunska T, Palfey BA, Ballou DP, Banerjee R (2008) Adenosyltransferase tailors and delivers coenzyme B12. *Nature chemical biology* 4: 194-196

Paschen W, Frandsen A (2001) Endoplasmic reticulum dysfunction--a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain? *Journal of neurochemistry* 79: 719-725

Peters LR, Raghavan M (2011) Endoplasmic reticulum calcium depletion impacts chaperone secretion, innate immunity, and phagocytic uptake of cells. *Journal of immunology* 187: 919-931

Pflipsen MC, Oh RC, Saguil A, Seehusen DA, Seaquist D, Topolski R (2009) The prevalence of vitamin B(12) deficiency in patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Journal of the American Board of Family Medicine : JABFM* 22: 528-534

Poirier LA, Grantham PH, Rogers AE (1977) The effects of a marginally lipotrope-deficient diet on the hepatic levels of S-adenosylmethionine and on the urinary metabolites of 2-acetylaminofluorene in rats. ***Cancer research*** **37: 744-748**

Pons L, Battaglia-Hsu SF, Orozco-Barrios CE, Ortiou S, Chery C, Alberto JM, Arango-Rodriguez ML, Dumas D, Martinez-Fong D, Freund JN, Gueant JL (2009) Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin. ***PloS one*** **4: e6325**

Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, Giudicelli J, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Jeannesson E, Gueguen N, Bressenot A, Nicolas B, Malthiery Y, Daval JL, Peyrin-Biroulet L, Bronowicki JP, Gueant JL (2012) Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1alpha hypomethylation and decreased ER-alpha, ERR-alpha, and HNF-4alpha in the rat liver. ***Journal of hepatology*** **57: 344-351**

Prasad S, Yadav VR, Ravindran J, Aggarwal BB (2011) ROS and CHOP are critical for dibenzylideneacetone to sensitize tumor cells to TRAIL through induction of death receptors and downregulation of cell survival proteins. ***Cancer research*** **71: 538-549**

Putcha GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, Alix S, Youle RJ, LaMarche A, Maroney AC, Johnson EM, Jr. (2003) JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. ***Neuron*** **38: 899-914**

Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. ***Cell*** **129: 1337-1349**

Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. ***Cell*** **127: 917-928**

Que X, Debonera F, Xie J, Furth EE, Aldeguer X, Gelman AE, Olthoff KM (2004) Pattern of ischemia reperfusion injury in a mouse orthotopic liver transplant model. ***The Journal of surgical research*** **116: 262-268**

Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. ***Nature*** **450: 663-669**

Refsum H, Ueland PM (1998) Recent data are not in conflict with homocysteine as a cardiovascular risk factor. ***Current opinion in lipidology*** **9: 533-539**

Reggiori F, Shintani T, Nair U, Klionsky DJ (2005) Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. ***Autophagy*** **1: 101-109**

Reynolds EH (1992) Multiple sclerosis and vitamin B12 metabolism. ***Journal of neuroimmunology*** **40: 225-230**

Reynolds EH, Bottiglieri T, Laundy M, Crellin RF, Kirker SG (1992) Vitamin B12 metabolism in multiple sclerosis. ***Archives of neurology*** **49: 649-652**

Rickes EL, Brink NG, Koniuszy FR, Wood TR, Folkers K (1948) Crystalline Vitamin B12. ***Science*** **107: 396-397**

Riek AE, Oh J, Sprague JE, Timpson A, de las Fuentes L, Bernal-Mizrachi L, Schechtman KB, Bernal-Mizrachi C (2012) Vitamin D suppression of endoplasmic reticulum stress promotes an antiatherogenic monocyte/macrophage phenotype in type 2 diabetic patients. ***The Journal of biological chemistry*** **287: 38482-38494**

Rieusset J, Chauvin MA, Durand A, Bravard A, Laugerette F, Michalski MC, Vidal H (2012) Reduction of endoplasmic reticulum stress using chemical chaperones or Grp78 overexpression does not protect muscle cells from palmitate-induced insulin resistance. ***Biochemical and biophysical research communications*** **417: 439-445**

Roblin X, Phelip JM, Genevois M, Ducros V, Bonaz B (2007a) Hyperhomocysteinaemia is associated with osteoporosis in patients with Crohn's disease. ***Alimentary pharmacology & therapeutics*** **25: 797-804**

Roblin X, Pofelski J, Zarski JP (2007b) [Steatosis, chronic hepatitis virus C infection and homocysteine]. ***Gastroenterologie clinique et biologique*** **31: 415-420**

Ron D (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. ***The Journal of clinical investigation*** **110: 1383-1388**

Rosenberg IH (1990) 1989 Herman Award lecture. Folate absorption: clinical questions and metabolic answers. ***The American journal of clinical nutrition*** **51: 531-534**

Rosengren V, Johansson H, Lehtio J, Fransson L, Sjoholm A, Ortsater H (2012) Thapsigargin down-regulates protein levels of GRP78/BiP in INS-1E cells. ***Journal of cellular biochemistry*** **113: 1635-1644**

Russell-Jones GJ, Alpers DH (1999) Vitamin B12 transporters. ***Pharmaceutical biotechnology*** **12: 493-520**

Russo C, Morabito F, Luise F, Piromalli A, Battaglia L, Vinci A, Trapani Lombardo V, de Marco V, Morabito P, Condino F, Quattrone A, Aguglia U (2008) Hyperhomocysteinemia is associated with cognitive impairment in multiple sclerosis. ***Journal of neurology*** **255: 64-69**

Rutkowski DT, Kaufman RJ (2004) A trip to the ER: coping with stress. ***Trends in cell biology*** **14: 20-28**

Rutsch F, Gailus S, Miousse IR, Suormala T, Sagne C, Toliat MR, Nurnberg G, Wittkampf T, Buers I, Sharifi A, Stucki M, Becker C, Baumgartner M, Robenek H, Marquardt T, Hohne W, Gasnier B, Rosenblatt DS, Fowler B, Nurnberg P (2009) Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. ***Nature genetics*** **41: 234-239**

Samuel VT, Shulman GI (2012) Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. ***Cell*** **148: 852-871**

Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ (2001) Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. ***Molecular cell*** **7: 1165-1176**

Schmidt RJ, Tancredi DJ, Ozonoff S, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, Schmidt LC, Tassone F, Hertz-Picciotto I (2012) Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. ***The American journal of clinical nutrition*** **96: 80-89**

Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM (2002) Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention: the Swiss Heart study: a randomized controlled trial. ***JAMA : the journal of the American Medical Association*** **288: 973-979**

Schnyder G, Roffi M, Pin R, Flammer Y, Lange H, Eberli FR, Meier B, Turi ZG, Hess OM (2001) Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. ***The New England journal of medicine*** **345: 1593-1600**

Schonthal AH (2012) Targeting endoplasmic reticulum stress for cancer therapy. ***Frontiers in bioscience*** **4: 412-431**

Schroder M, Kaufman RJ (2005) ER stress and the unfolded protein response. ***Mutation research*** **569: 29-63**

Scott JM (1999) Folate and vitamin B12. ***The Proceedings of the Nutrition Society*** **58: 441-448**

Scott JM (2001) Evidence of folic acid and folate in the prevention of neural tube defects. ***Bibliotheca nutritio et dieta*****: 192-195**

Seetharam B, Bose S, Li N (1999) Cellular import of cobalamin (Vitamin B-12). ***The Journal of nutrition*** **129: 1761-1764**

Seetharam B, Li N (2000) Transcobalamin II and its cell surface receptor. ***Vitamins and hormones*** **59: 337-366**

Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. ***Developmental cell*** **3: 99-111**

Shen J, Prywes R (2005) ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6. ***Methods*** **35: 382-389**

Sheridan AM, Bonventre JV (2000) Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. ***Current opinion in nephrology and hypertension*** **9: 427-434**

Shiu RP, Pouyssegur J, Pastan I (1977) Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteinsin Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*** **74: 3840-3844**

Shivapurkar N, Poirier LA (1983) Tissue levels of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets for one to five weeks. *Carcinogenesis* 4: 1051-1057

Sikalidis AK, Stipanuk MH (2010) Growing rats respond to a sulfur amino acid-deficient diet by phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 heterotrimeric complex and induction of adaptive components of the integrated stress response. *The Journal of nutrition* 140: 1080-1085

Simonsen A, Stenmark H (2008) Self-eating from an ER-associated cup. *The Journal of cell biology* 182: 621-622

Sitia R, Braakman I (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426: 891-894

Smith AD (2008) The worldwide challenge of the dementias: a role for B vitamins and homocysteine? *Food and nutrition bulletin* 29: S143-172

Smith AD, Kim YI, Refsum H (2008) Is folic acid good for everyone? *The American journal of clinical nutrition* 87: 517-533

Smith AD, Smith SM, de Jager CA, Whitbread P, Johnston C, Agacinski G, Oulhaj A, Bradley KM, Jacoby R, Refsum H (2010) Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PloS one* 5: e12244

Smith EL (1948) Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver. *Nature* 161: 638

Smith JS, Boeke JD (1997) An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes & development* 11: 241-254

Solovyova N, Veselovsky N, Toescu EC, Verkhratsky A (2002) Ca(2+) dynamics in the lumen of the endoplasmic reticulum in sensory neurons: direct visualization of Ca(2+)-induced Ca(2+) release triggered by physiological Ca(2+) entry. *The EMBO journal* 21: 622-630

Soujanya S, Lakshman M, Kumar AA, Reddy AG (2013) Evaluation of the protective role of vitamin C in imidacloprid-induced hepatotoxicity in male Albino rats. *Journal of natural science, biology, and medicine* 4: 63-67

Spence JD, Bang H, Chambless LE, Stampfer MJ (2005) Vitamin Intervention For Stroke Prevention trial: an efficacy analysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36: 2404-2409

Spriggs KA, Bushell M, Willis AE (2010) Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Molecular cell* 40: 228-237

Sprince H, Parker CM, Josephs JA, Jr. (1969) Homocysteine-induced convulsions in the rat: protection by homoserine, serine, betaine, glycine and glucose. ***Agents and actions*** **1: 9-13**

Stabler SP, Allen RH (2004) Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. ***Annual review of nutrition*** **24: 299-326**

Stadtman ER, Levine RL (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. ***Amino acids*** **25: 207-218**

Stevens FJ, Argon Y (1999) Protein folding in the ER. ***Seminars in cell & developmental biology*** **10: 443-454**

Stone KL, Bauer DC, Sellmeyer D, Cummings SR (2004) Low serum vitamin B-12 levels are associated with increased hip bone loss in older women: a prospective study. ***The Journal of clinical endocrinology and metabolism*** **89: 1217-1221**

Stover PJ (2011) Polymorphisms in 1-carbon metabolism, epigenetics and folate-related pathologies. ***Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*** **4: 293-305**

Strum JC, Johnson JH, Ward J, Xie H, Feild J, Hester A, Alford A, Waters KM (2009) MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. ***Molecular endocrinology*** **23: 1876-1884**

Sundar Rajan S, Srinivasan V, Balasubramanyam M, Tatu U (2007) Endoplasmic reticulum (ER) stress & diabetes. ***The Indian journal of medical research*** **125: 411-424**

Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA (1997) Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. ***Archives of biochemistry and biophysics*** **345: 171-174**

Tang Y, Xu J, Qu W, Peng X, Xin P, Yang X, Ying C, Sun X, Hao L (2012) Resveratrol reduces vascular cell senescence through attenuation of oxidative stress by SIRT1/NADPH oxidase-dependent mechanisms. ***The Journal of nutritional biochemistry*** **23: 1410-1416**

Tanner SM, Li Z, Bisson R, Acar C, Oner C, Oner R, Cetin M, Abdelaal MA, Ismail EA, Lissens W, Krahe R, Broch H, Grasbeck R, de la Chapelle A (2004) Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B12: founder effects, consanguinity, and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East. ***Human mutation*** **23: 327-333**

Tanner SM, Sturm AC, Baack EC, Liyanarachchi S, de la Chapelle A (2012) Inherited cobalamin malabsorption. Mutations in three genes reveal functional and ethnic patterns. ***Orphanet journal of rare diseases*** **7: 56**

Teunissen CE, Killestein J, Kragt JJ, Polman CH, Dijkstra CD, Blom HJ (2008) Serum homocysteine levels in relation to clinical progression in multiple sclerosis. ***Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*** **79: 1349-1353**

Teunissen CE, van Boxtel MP, Jolles J, de Vente J, Vreeling F, Verhey F, Polman CH, Dijkstra CD, Blom HJ (2005) Homocysteine in relation to cognitive performance in pathological and non-pathological conditions. ***Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*** **43: 1089-1095**

Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ (1998) A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. ***Genes & development*** **12: 1812-1824**

Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans. ***Nature*** **410: 227-230**

Toth C, Breithaupt K, Ge S, Duan Y, Terris JM, Thiessen A, Wiebe S, Zochodne DW, Suchowersky O (2010) Levodopa, methylmalonic acid, and neuropathy in idiopathic Parkinson disease. ***Annals of neurology*** **68: 28-36**

Tsai YC, Weissman AM (2010) The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. ***Genes & cancer*** **1: 764-778**

Tsiotra PC, Tsigos C (2006) Stress, the endoplasmic reticulum, and insulin resistance. ***Annals of the New York Academy of Sciences*** **1083: 63-76**

Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS (2000) Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. ***Science*** **290: 1571-1574**

Tucker KL, Hannan MT, Qiao N, Jacques PF, Selhub J, Cupples LA, Kiel DP (2005) Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. ***Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*** **20: 152-158**

Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE (2000) The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. ***The American journal of clinical nutrition*** **72: 324-332**

Unterberger U, Hoftberger R, Gelpi E, Flicker H, Budka H, Voigtlander T (2006) Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo. ***Journal of neuropathology and experimental neurology*** **65: 348-357**

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. ***Science*** **287: 664-666**

van der Put NM, Blom HJ (2000) Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. ***European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*** **92: 57-61**

Venugopal R, Jaiswal AK (1996) Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*** **93: 14960-14965**

Voehringer DW (1999) BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. ***Free radical biology & medicine*** **27: 945-950**

von dem Bussche A, Machida R, Li K, Loevinsohn G, Khander A, Wang J, Wakita T, Wands JR, Li J (2010) Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication. ***Journal of hepatology*** **53: 797-804**

Wald DS, Kasturiratne A, Simmonds M (2011) Serum homocysteine and dementia: meta-analysis of eight cohort studies including 8669 participants. ***Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*** **7: 412-417**

Wald DS, Law M, Morris JK (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. ***Bmj*** **325: 1202**

Wang AY, Wang M, Woo J, Lam CW, Lui SF, Li PK, Sanderson JE (2004) Inflammation, residual kidney function, and cardiac hypertrophy are interrelated and combine adversely to enhance mortality and cardiovascular death risk of peritoneal dialysis patients. ***Journal of the American Society of Nephrology : JASN*** **15: 2186-2194**

Wang FM, Chen YJ, Ouyang HJ (2011a) Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation. ***The Biochemical journal*** **433: 245-252**

Wang FM, Galson DL, Roodman GD, Ouyang H (2011b) Resveratrol triggers the pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress response and represses pro-survival XBP1 signaling in human multiple myeloma cells. ***Experimental hematology*** **39: 999-1006**

Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, Takata K, Koizumi A, Izumi T (1999) A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. ***The Journal of clinical investigation*** **103: 27-37**

Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D (1998) Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. ***The EMBO journal*** **17: 5708-5717**

Wang Y, Zhao R, Russell RG, Goldman ID (2001) Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. ***Biochimica et biophysica acta*** **1513: 49-54**

Watkins D, Rosenblatt DS (1989) Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. ***American journal of medical genetics*** **34: 427-434**

Watkins D, Rosenblatt DS (2011) Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. ***American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics*** **157: 33-44**

Weidberg H, Shvets E, Elazar Z (2011) Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. ***Annual review of biochemistry*** **80: 125-156**

Weingartner J, Lotz K, Fanghanel J, Gedrange T, Bienengraber V, Proff P (2007) Induction and prevention of cleft lip, alveolus and palate and neural tube defects with special consideration of B vitamins and the methylation cycle. *Journal of orofacial orthopedics = Fortschritte der Kieferorthopadie : Organ/official journal Deutsche Gesellschaft fur Kieferorthopadie* 68: 266-277

Weitman SD, Weinberg AG, Coney LR, Zurawski VR, Jennings DS, Kamen BA (1992) Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis. *Cancer research* 52: 6708-6711

Welch GN, Loscalzo J (1998) Homocysteine and atherothrombosis. *The New England journal of medicine* 338: 1042-1050

Weng S, Sprague JE, Oh J, Riek AE, Chin K, Garcia M, Bernal-Mizrachi C (2013) Vitamin D deficiency induces high blood pressure and accelerates atherosclerosis in mice. *PloS one* 8: e54625

Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC (2001) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *The Journal of clinical investigation* 107: 1263-1273

Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM, Jr., Sistonen L, Morimoto RI (2009) Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323: 1063-1066

Wild AC, Moinova HR, Mulcahy RT (1999) Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *The Journal of biological chemistry* 274: 33627-33636

Wilkemeyer MF, Andrews ER, Ledley FD (1993) Genomic structure of murine methylmalonyl-CoA mutase: evidence for genetic and epigenetic mechanisms determining enzyme activity. *The Biochemical journal* 296 (Pt 3): 663-670

Wills L (1931) Treatment of "Pernicious Anaemia of Pregnancy" and "Tropical Anaemia". *Br Med J* 1: 1059-1064

Wolosker H, Rocha JB, Engelender S, Panizzutti R, De Miranda J, de Meis L (1997) Sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase isoforms: diverse responses to acidosis. *The Biochemical journal* 321 (Pt 2): 545-550

Wormald MR, Dwek RA (1999) Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure* 7: R155-160

Xiong A, Yu W, Tiwary R, Sanders BG, Kline K (2012) Distinct roles of different forms of vitamin E in DHA-induced apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Molecular nutrition & food research* 56: 923-934

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of clinical investigation* 115: 2656-2664

Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Molecular and cellular biology* 19: 8469-8478

Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K (2007) Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Developmental cell* 13: 365-376

Yamanishi M, Vlasie M, Banerjee R (2005) Adenosyltransferase: an enzyme and an escort for coenzyme B12? *Trends in biochemical sciences* 30: 304-308

Yanagitani K, Imagawa Y, Iwawaki T, Hosoda A, Saito M, Kimata Y, Kohno K (2009) Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Molecular cell* 34: 191-200

Yao R, Schneider E, Ryan TJ, Galivan J (1996) Human gamma-glutamyl hydrolase: cloning and characterization of the enzyme expressed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 10134-10138

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular cell* 6: 1355-1364

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M (2001) Activation of caspase-12, an endoplastic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *The Journal of biological chemistry* 276: 13935-13940

Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 273: 33741-33749

Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and cellular biology* 20: 6755-6767

Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of cell science* 119: 3888-3900

Zhang C, Cai Y, Adachi MT, Oshiro S, Aso T, Kaufman RJ, Kitajima S (2001) Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *The Journal of biological chemistry* 276: 35867-35874

Zhang JX, Braakman I, Matlack KE, Helenius A (1997) Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. *Molecular biology of the cell* 8: 1943-1954

Zhang K, Kaufman RJ (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454: 455-462

Zhang XM, Huang GW, Tian ZH, Ren DL, Wilson JX (2009) Folate stimulates ERK1/2 phosphorylation and cell proliferation in fetal neural stem cells. *Nutritional neuroscience* 12: 226-232

Zhao R, Matherly LH, Goldman ID (2009) Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert reviews in molecular medicine* 11: e4

Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development* 12: 982-995

Zoccolella S, Lamberti SV, Iliceto G, Santamato A, Lamberti P, Logroscino G (2010) Hyperhomocysteinemia in L-dopa treated patients with Parkinson's disease: potential implications in cognitive dysfunction and dementia? *Current medicinal chemistry* 17: 3253-3261

Zoccolella S, Simone IL, Lamberti P, Samarelli V, Tortelli R, Serlenga L, Logroscino G (2008) Elevated plasma homocysteine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70: 222-225

Citation: Cell Death and Disease (2013) 4, e553; doi:10.1038/cddis.2013.69
© 2013 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/13
www.nature.com/cddis

Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1

R Ghemrawi[1], S Pooya[1], S Lorentz[1], G Gauchotte[1], C Arnold[1], J-L Gueant*[1,2] and S-F Battaglia-Hsu*[1,2]

Vitamin B12 (cobalamin) is a key determinant of S-adenosyl methionine (SAM)-dependent epigenomic cellular regulations related to methylation/acetylation and its deficiency produces neurodegenerative disorders by elusive mechanisms. Sirtuin 1 deacetylase (SIRT1) triggers cell response to nutritional stress through endoplasmic reticulum (ER) stress. Recently, we have established a N1E115 dopaminergic cell model by stable expression of a transcobalamin–oleosin chimera (TO), which impairs cellular availability of vitamin B12, decreases methionine synthase activity and SAM level, and reduces cell proliferation. In contrast, oleosin-transcobalamin chimera (OT) does not modify the phenotype of transfected cells. Presently, the impaired cellular availability of vitamin B12 in TO cells activated irreversible ER stress pathways, with increased P-eIF-2α, P-PERK, P-IRE1α, ATF6, ATF4, decreased chaperon proteins and increased pro-apoptotic markers, CHOP and cleaved caspase 3, through reduced SIRT1 expression and consequently greater acetylation of heat-shock factor protein 1 (HSF1). Adding either B12, SIRT1, or HSF1 activators as well as overexpressing SIRT1 or HSF1 dramatically reduced the activation of ER stress pathways in TO cells. Conversely, impairing SIRT1 and HSF1 by siRNA, expressing a dominant negative form of HSF1, or adding a SIRT1 inhibitor led to B12-dependent ER stress in OT cells. Addition of B12 abolished the activation of stress transducers and apoptosis, and increased the expression of protein chaperons in OT cells subjected to thapsigargin, a strong ER stress stimulator. AdoX, an inhibitor of methyltransferase activities, produced similar effects than decreased B12 availability on SIRT1 and ER stress by a mechanism related to increased expression of hypermethylated in cancer 1 (HIC1). Taken together, these data show that cellular vitamin B12 has a strong modulating influence on ER stress in N1E115 dopaminergic cells. The impaired cellular availability in vitamin B12 induces irreversible ER stress by greater acetylation of HSF1 through decreased SIRT1 expression, whereas adding vitamin B12 produces protective effects in cells subjected to ER stress stimulation.
Cell Death and Disease (2013) **4,** e553; doi:10.1038/cddis.2013.69; published online 21 March 2013
Subject Category: Neuroscience

Cells are constantly exposed to environmental stresses including the abundance or lack of key nutrients and may respond rapidly by decreasing cellular key protein contents, as well as proliferation rate to ensure their survival.[1] One of these nutrients is vitamin B12, whose deficiency produces neurodegenerative and cognitive disorders by molecular mechanisms that remain elusive. The dissection of these mechanisms is of great importance, considering the key role of vitamin B12 during perinatal and aging processes when vitamin B12 deficiency is independently associated with abnormal cognitive development,[2] and with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease.[3–5] To impair cellular availability for vitamin B12, we have developed a NIE-115 dopaminergic cell model by anchoring transcobalamin, a high-affinity binding protein of vitamin B12, to endoplasmic reticulum (ER) through its fusion with oleosin.[6,7] The chimeric protein diminishes the bioavailable vitamin B12 destined towards the cytoplasm and the mitochondria. Interestingly, whereas transcobalamin–oleosin (TO) chimera behaves as a very efficient chelator for cobalamin, oleosin–transcobalamin (OT) chimera shows no cobalamin-binding activity. In agreement with the role of vitamin B12 as a cofactor of methionine synthase, a reduced SAM level is only associated with TO cells; the phenotype of the OT-transfected cells is not different from either the wild-type non-transfected cells or the cells expressing

[1]INSERM U954, Nutrition Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, Vandœuvre les Nancy, France
*Corresponding author: J-L Gueant or S-F Battaglia-Hsu, INSERM U954, Nutrition Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, 9 Avenue de la Foret de Haye, Vandœuvre les Nancy, Cedex 54505, France. Tel: +(33) 0383683292; Fax: +(33) 0383683279; E-mail: jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr or shyue-fang.battaglia@univ-lorraine.fr
[2]These authors contributed equally to this work.
Keywords: SIRT1; HSF1; vitamin B12; ER stress; methylation; acetylation
Abbreviations: TO, transcobalamin-oleosin; OT, oleosin-transcobalamin; B12, vitamin B12, cobalamin; ER, endoplasmic reticulum; TCII, transcobalamin II; SAM, s-adenosyl methionine; SAH, s-adenosyl homocysteine; PP2A, protein phosphatase 2A; NGF, nerve growth factor; TACE, tumor necrosis factor (TNF)-converting enzyme; SIR2, silent information regulator 2; SIRT1, sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1; HSF1, heat-shock factor protein 1; BiP, binding immunoglobulin protein; HSP70s, heat-shock protein-70 family proteins; AdoX, adenosine-2′,3′-dialdehyde; IGF-1, insulin growth factor 1; FOXO, forkhead box family proteins; P53, tumor protein 53; GCN2, general control nonrepressed 2; PERK, protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; PKR, double-stranded RNA-activated protein kinase; HRI, heme-regulated eIF2α kinase; CreP, constitutive repressor of eIF2α phosphorylation; GADD34, growth arrest and DNA damage protein 34; PGC-1α, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α; eIF2α, eukaryotic initiation factor 2 α; P-eIF2α, phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α; RNA, ribonucleic acid; DNA, deoxyribonucleic acid; HSR, heat-shock response
Received 23.8.12; revised 22.12.12; accepted 17.1.13; Edited by A Verkhratsky

transcobalamin alone.[6,7] The most discernible consequences found in TO cells include reduced proliferation, accelerated differentiation and augmented apoptosis.[7,8] Reduced proliferation has also been observed in other vitamin B12-deficient non-neuronal cell models, including that created by the downregulation of transcobalamin receptor TCblR/CD320.[9] These B12 deficiency-relevant changes are among the signs known to associate with early aging and death, and they bear certain resemblances to those observed in cells under stress. Vitamin B12 deficiency has never been documented to evoke any stress response directly prior to the current study, despite the fact that it can theoretically provoke ER stress indirectly through the accumulation of homocysteine. Exogenous homocysteine was first shown to increase significantly the expression of molecular chaperon GRP78/BiP (binding immunoglobulin protein) (a member of heat-shock protein (HSP) 70 family) and activating transcription factor 4 (ATF4).[10] Presumably, these upregulations are related to the activation of the ER unfolded protein response (UPR), as ER stress proteins, such as X-box-binding protein (XBP), are activated after the addition of exogenous homocysteine.[11–13]

Sirtuin 1 deacetylase (SIRT1), the closest mammalian homolog of the yeast silent information regulator 2 (SIR2) protein, was originally identified as a transcriptional silencing factor at the silent mating loci, telomeres and ribosomal DNA.[14–16] Its overexpression was later found to extend the lifespan of yeast[17] and *Caenorhabditis elegans*.[18] Although the exact details of how SIR2 extends the lifespan remain still obscure, its role in maintaining genomic stability and repairing DNA, as well as its involvement in antioxidative stress response and insulin/IGF-I signaling probably are all relevant to the lengthening of lifespans. In mammalian cells, SIRT1 downregulation has further been linked with cell differentiation, aging, senescence and various pathological events such as insulin resistance and severe oxidative stress.[19] Its broader role as a stress-response protein was first brought to light by the discoveries that it interacts with both tumor protein 53 (p53) and forkhead box family protein 3 (FOXO3), and as a result blocks DNA damages as well as oxidative stress.[20,21] Facilitated by its association with p53 and FOXO3, SIRT1 deacetylates these protein partners. Whereas SIRT deacetylation renders p53 less active in inducing apoptosis and senescence, the deacetylation of FOXO3 by SIRT1 potentiates its transcriptional activity, leading to the upregulation of genes for cell cycle arrest and DNA damage repair. Another key player of the SIRT1-dependent stress response is heat-shock factor 1 (HSF1), whose activation increases the transcription of molecular chaperones such as HSP70 and HSP90. SIRT1 deacetylates HSF1 and potentiates its binding to the heat-shock promoter of the molecular chaperone genes.[22] Activation of SIRT1 thus participates in protecting cells from stresses related to damaged, misfolded or aggregated proteins. Besides its roles in DNA damage stress, oxidative stress and misfolded protein stress, SIRT1 participates in the stress response consequent to inadequate nutrients uptake.[23,24] SIRT1 expression is reduced in rodents fed with either diet deficient in methyl donors[25] or a high-fat/glucose (sucrose) diet.[26–29] The imbalanced acetylation/methylation of PGC-1α due to the reduction of SIRT1 expression produced an impaired fatty acid oxidation with myocardium hypertrophy in methyl donor-deficient young rodents.[25]

Taken these data together, we thus asked whether vitamin B12 deficiency induces cellular stress through an altered expression of SIRT1. This article reports that cellular vitamin B12 availability, by controlling SIRT1expression, modulates the severity of ER stress by influencing the extent of HSF1 expression and acetylation in N1E115 dopaminergic cells.

Results

Impaired cellular availability of B12 induces ER stress. The presence of an important cell stress in B12-deficient TO N1E115 cells was first identified by the increase in level of the ER stress transducers, P-PERK, P-IRE1α and ATF6 (Figure 1a and Supplementary Figure 1) and the increased phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2α (P-eIF2α) in TO *versus* control OT cells. As the high P-eIF2α level in TO cells could be reversed upon the addition of vitamin B12 and SAM, we suggest this stress response to be vitamin B12- and methylation-dependent (Figure 1a and Supplementary Figure 1). As eIF2α phosphorylation on serine 51 is the convergent response to a multiplicity of cellular stresses including those induced by nutritional means, we investigated subsequently the kinases involved in this upregulation. The large increase in P-eIF2α level observed in TO cells was concluded as being mainly related to ER stress, considering the increased expression of PKR-like ER kinase (PERK) (Figure 1a) and the unchanged expression of the other eIF2α kinases, namely double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR), general control non-repressed 2 (GCN2) and heme-regulated eIF2α kinase (HRI) (Supplementary Figure 2). As ATF6 activation during ER stress involves its translocation from ER to nucleus via Golgi apparatus,[30] we examined further the translocation of ATF6 using immunofluorescence approach and found that whereas in control OT cells nuclear ATF6 stain occurred in only $\sim$10% cells, in TO cells it occurred in $\sim$20% of cells ($P<0.001$) (Figure 1b). These results suggested that the activation of ATF6 indeed occurred after the regulated intra-membranous proteolysis (RIP) taking place in Golgi.[31]

XBP, ATF4 and pro-apoptotic markers are activated by ER stress in TO cells. ATF4 and XBP, two main immediate downstream effectors of the three stress transducers, as well as two pro-apoptotic proteins, CHOP and caspase 3, were subsequently investigated in TO and OT cells to evaluate the consequences of the ER stress produced by the impaired cellular availability of B12. ATF4 level was upregulated in TO cells (Figure 2a, upper panel) most likely as a result of integrated stress response related to the increased eIF2α phosphorylation. The ATF4 activation could be reversed only by B12, but not by SAM. IRE1α splicing of the XBP transcript from 1U$\rightarrow$1S appeared also more important in TO cells (Figure 2a, lower panel), confirming further the activation of ER stress response in TO cells. The higher expression of the pro-apoptotic markers, CHOP and cleaved caspase 3, showed that TO cells were tuned towards irreversible stress and thus resulted in a compromised proliferation marked by

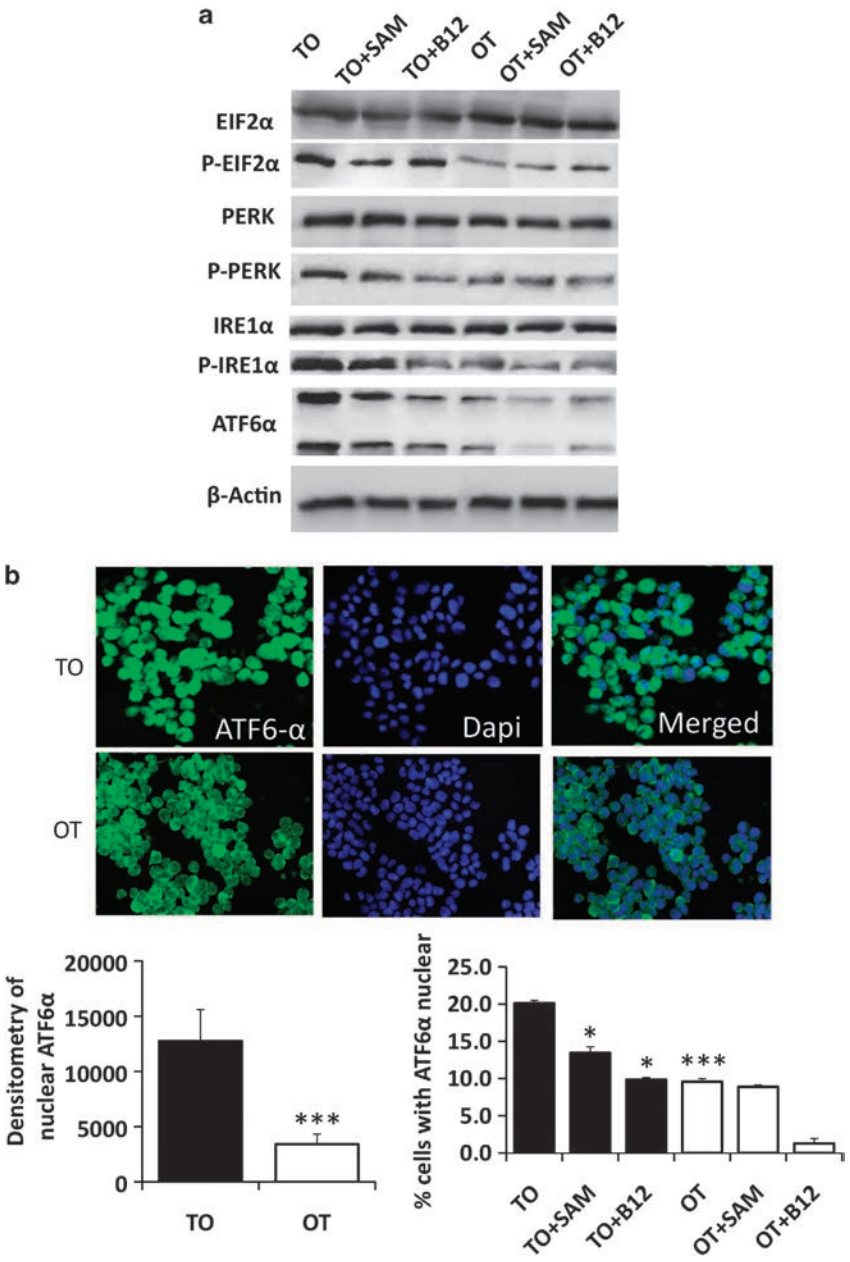


Figure 1 Impaired cellular availability of B12 induces ER stress. (**a**) Representative western blots of eIF-2α, phosphorylated eIF-2α (p-eIF-2α), PERK, phosphorylated PERK (p-PERK), IRE-1α, phosphorylated IRE-1α (p-IRE-1α), and ATF6 obtained from B12-deficient TO cells and control OT cells before and after treatment with B12 at 20 μM and with SAM at 75 μM, respectively. Densitometry analyses are presented in Supplementary Figure 2; (**b**) B12-deficient TO and non-deficient OT cells were stained with anti-ATF6 antibody coupled to Alexa 488 (green) and with DAPI (blue). The immunofluorescence density in the nuclei of the two types of cells were compared in more than 300 cells and found to be significantly different at $P<0.0001$. Furthermore, the percentage of cells with nuclear ATF staining was compared in TO *versus* OT cells before and after B12 and SAM treatment. Before treatment, ATF6 nuclear localization was found in an average of 20% (TO) *versus* 10% (OT) cell population (***$P<0.001$); after SAM and B12 treatment, this level reduced to about 13 and 10% in TO cells, respectively (*$P<0.05$).

the decrease in Ki67 (Figure 2b and Supplementary Figure 3A). This maladaptation to stress was consistent with the greatly reduced expression of molecular chaperons including BiP, HSP70, HSP90 and HSP27 in TO *versus* OT cells (Figure 2c and Supplementary Figure 3B). As reduced molecular chaperon expression could be related to the state of acetylation in HSF1 by SIRT1, we tested subsequently the idea that SIRT1 may be responsible for the ER stress induced by B12 deficiency.

Increased acetylation of HSF1 through decreased SIRT1 expression is responsible for ER stress in TO cells. SIRT1-dependent stress response involves HSF-1, a key stress-activated transcription factor capable of activating genes encoding HSPs. SIRT1 deacetylation of HSF-1 potentiates its transcriptional activity.[22] Given the evidence that HSPs were significantly reduced in TO cells (Figure 2c and Supplementary Figure 3B), we asked whether the acetylation of HSF1 was associated to SIRT1 expression.

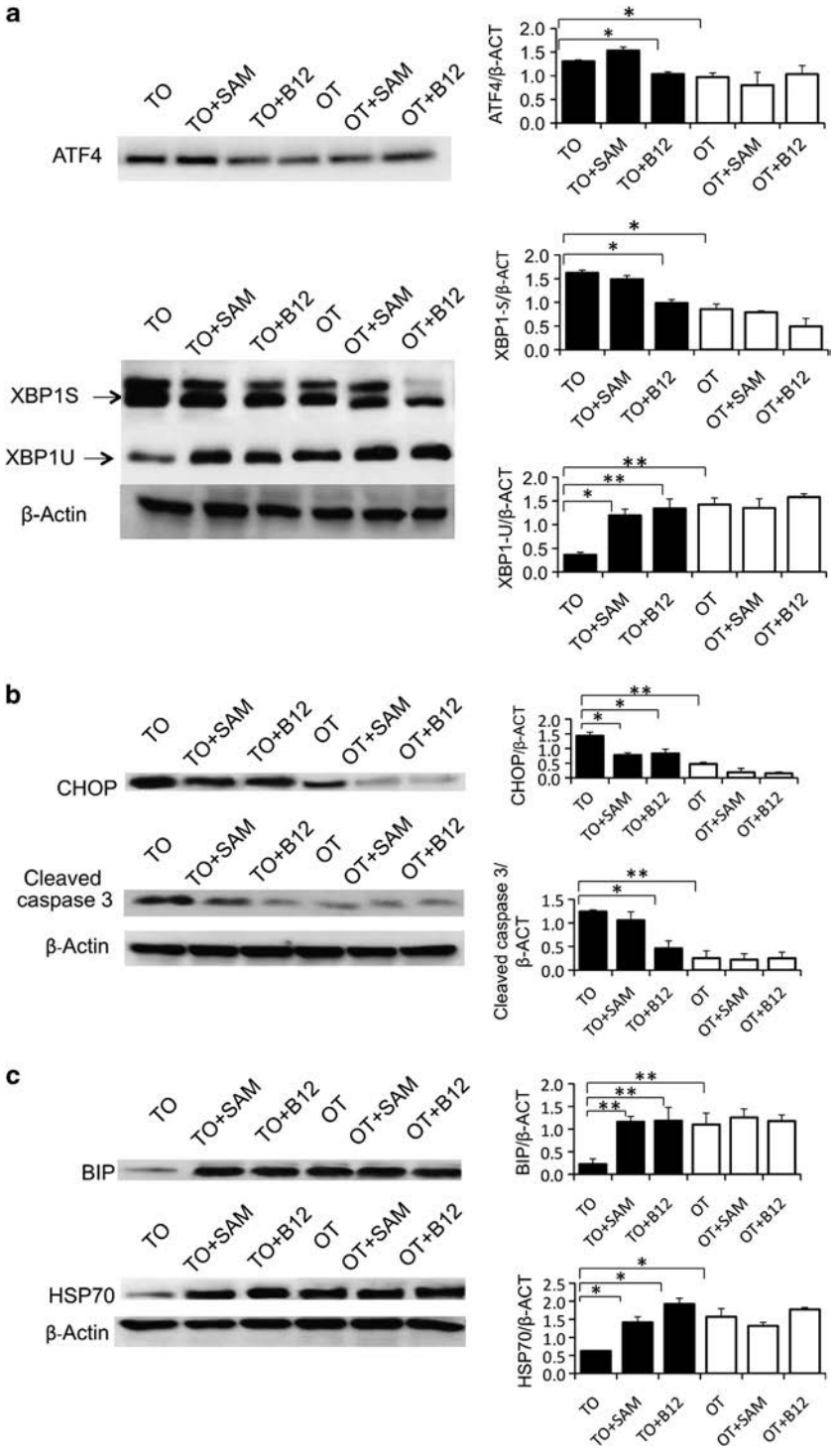


Figure 2 In B12-deficient cells, XBP, ATF4 and apoptosis are activated as results of ER stress. The downstream signaling pathways of ER stress are activated in TO cells. These include increased ATF4 expression and XBP splicing (**a**), as well as increased expression of CHOP and cleaved caspase 3 (**b**). The activation of these ER stress markers was related to the reduced level of molecular chaperons such as HSP 70 family members (**c**). Data were compared by one-way ANOVA with Fisher's test, with $n = 8$ in each group, and presented as means ± S.E. ($^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$)

Western blot analysis using anti-acetyl lysine on the immunoprecipitated HSF1 revealed decreased expression and increased acetylation of HSF1 in TO cells (Figure 3a). This higher acetylation of the HSF1 in TO cells also affected its cellular localization (and thus its activity as a transcription factor), moving HSF1 from the nucleus to the cytoplasm (Figure 3b). Consistent with these results, the level of SIRT1 (both the transcript and the protein) was reduced in TO *versus* OT cells and this reduction was B12-dependent (Figure 4a, $P < 0.001$).

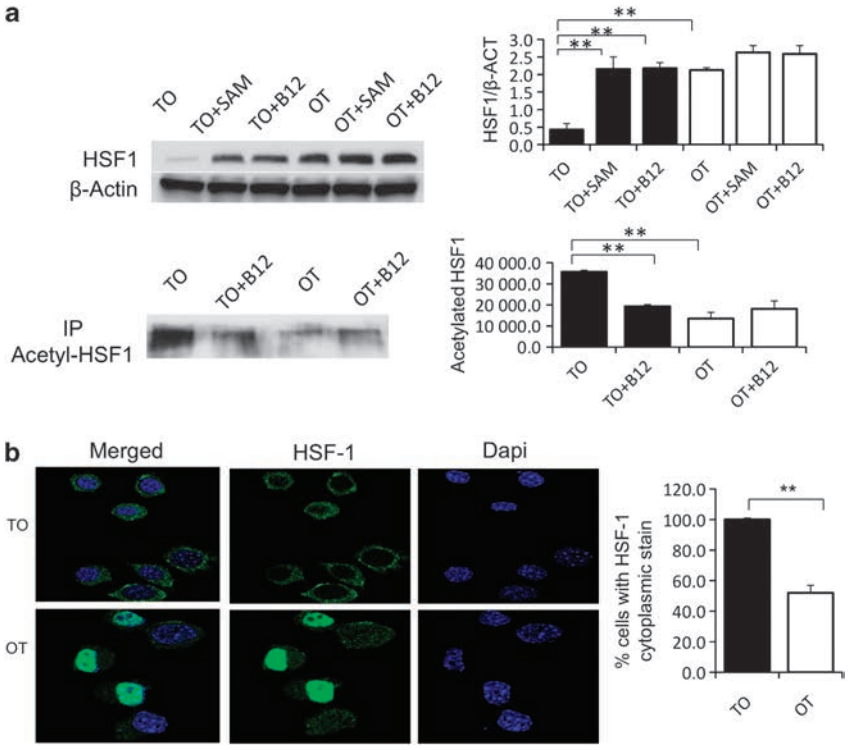


Figure 3 HSF1 expression is decreased in TO cells with impaired cellular availability of B12. In TO cells, the HSF1 protein level is significantly reduced compared with that in control cells ($P<0.01$). In addition, the HSF1 protein present in TO cells is overwhelmingly acetylated ($P<0.01$) (**a**). Immunofluorescence staining of the HSF1 protein (green) in TO and OT cells reveals more TO than OT cells with weak nuclear HSF1 staining ($P<0.0001$) (**b**). Data were compared by one-way ANOVA with Fisher's test, with $n=8$ in each group, and presented as means ± S.E. (*$P<0.05$; **$P<0.01$)

To confirm the link between SIRT1 and ER stress in these cells, we further investigated the ER stress response in cells treated with known SIRT1 activator and inhibitor. We applied on one hand SRT1720, a SIRT1 activator, to TO cells to restore their diminished SIRT1 activity, and on the other hand EX527, a SIRT1 inhibitor, to OT control cells to decrease their SIRT1 activity. As shown in Figure 4b, boosting SIRT1 activity with SRT1720 in TO cells resulted in increased BiP and decreased ATF4 and CHOP expression, whereas depressing SIRT1 activity by EX527 in OT cells led to reduced BiP and increased ATF4 and CHOP expression. Expression of the two independent siRNA in control OT cells against SIRT1 both reduced the expression of HSP70 and BiP ($P<0.01$), and increased the expression of the ER stress transducers ($P<0.05$) (Figure 4c). The addition of B12 reduced the expression of ER stress transducers despite the inhibition of SIRT1 expression, suggesting a protective effect of B12 on ER stress (Figure 4c).

SIRT1 was also overexpressed to rescue the ER stress of the TO cells. Transient transfection with the SIRT1 plasmid increased SIRT1 protein level in TO ($P<0.001$), but not in OT cells ($P>0.05$); this led to a significant reduction of the ER stress in TO cells, and therefore higher cellular proliferation evidenced by the extensively reduced P-IRE1α ($P<0.05$), p-PERK level ($P<0.05$) and Ki67 ($P<0.05$). These changes were most likely due to the increased HSPs expression ($P<0.05$) in TO cells (Supplementary Figures 4A and B), consequent to the augmented HSF1 protein level after SIRT1 overexpression.

Taken together, all these data suggest that the ER stress in B12-deficient cells is caused by a decreased SIRT1 expression and a subsequently increased acetylation of HSF1.

Overexpression in TO cells or knockdown of the HSF1 function in OT cells can either rescue or aggravate the B12-associated ER stress. To evaluate further the direct role of HSF1 in B12-associated ER stress, we independently knocked down and overexpressed HSF1 in TO and OT cells. First, siRNA against HSF1 was used to knockdown the HSF1 expression in both cells (Figure 5a and Supplementary Figures 5A and B). In TO cells, no effect of this knockdown could be discerned based on either the HSPs' expression or the ER stress markers. This lack-of-effect could be accounted for by the fact that no further reduction in HSF1 protein could be detected in TO cells. On the contrary, in OT cells, the same siRNA effectively knocked down HSF1 expression ($P<0.01$), causing large increases in ER stress makers ($P<0.05$), presumably due to the significant consequential decrease of HSPs' expression ($P<0.05$). Secondly, we overexpressed independently a constitutively active form of HSF1 (Hsf1-act) and a dominant-negative mutant form of HSF1 (Hsf1-inact) in both TO and OT cells via transient transfection (Figure 5b and Supplementary Figures 5C–E). In TO cells, Hsf1-act transfection led to a higher HSF1 protein level ($P<0.05$) and as a result, increased HSPs' expression ($P<0.05$), and reduced ER stress ($P<0.05$) and apoptosis ($P<0.05$) were observed along with an increased cellular proliferation ($P<0.05$). No effect,

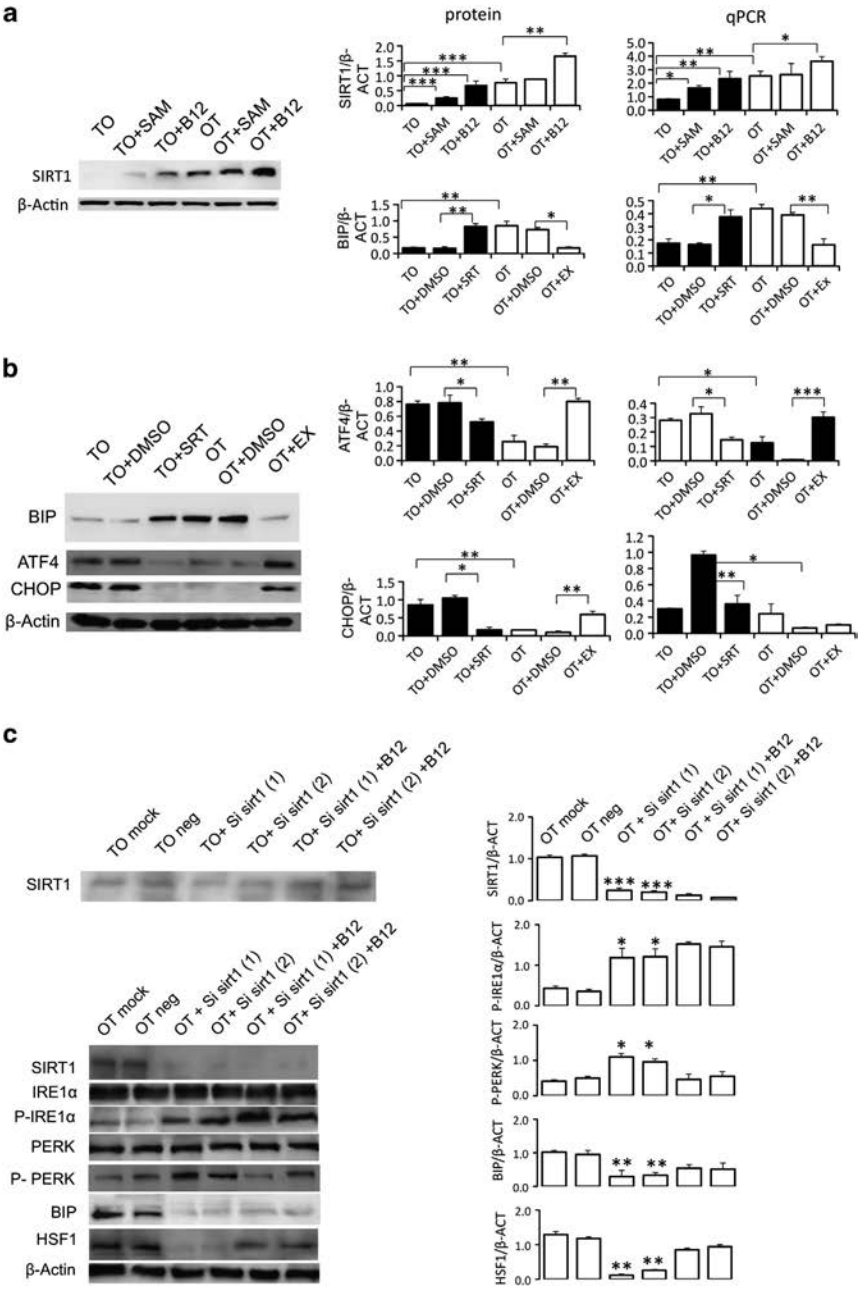


Figure 4 ER stress in B12-deficient cells stems from SIRT1 decreased expression. The levels of SIRT1 protein and transcript are lower in TO than in OT cells, respectively. Supplement with either B12 or SAM significantly increases SIRT1 level in TO cells ($P<0.001$) (**a**). Modulation of the activity of SIRT1 via either an activator (SRT1720, denoted as SRT here) in TO cells or an inhibitor (EX527, denoted as EX here) in OT cells alters the expression of ER stress markers: SRT in TO cells increases BiP expression and attenuates ATF4 and CHOP expression ($P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.01$, respectively) (**b**); EX in OT cells decreases BiP expression and leads to increased ATF4 and CHOP expression ($P<0.01$, $P<0.01$ and $P<0.05$, respectively) (**b**). Reduced SIRT1 expression in control OT cells using two different siRNA against SIRT1 ($P<0.001$); both leads to decreased HSF1 and BiP expression ($P<0.01$ and $P<0.01$), as well as increased p-IRE1α and p-PERK expression ($P<0.05$ and $P<0.05$) (**c**). Data were compared by one-way ANOVA with Fisher's test, with $n=8$ in each group, and presented as means ± S.D. (*$P<0.05$; **$P<0.01$; ***$P<0.001$)

however, could be detected when TO cells were transfected with the dominant negative Hsf1-inact construct. In OT cells, inverse effects were observed; no difference in ER stress was detected with the expression of the constitutively active Hsf1-act, whereas adverse effects were noted in OT cells transfected with Hsf1-inact construct. These included the reduction in HSPs' expression, increase in ER stress markers and the corresponding increase in apoptosis and decrease in cellular proliferation. Thirdly, we applied a pharmacological activator, celastrol, to increase the activity of the HSF1 protein and observed consistent results as cells transfected with Hsf1 constructs (Figure 5c and Supplementary Figures 6A and B). In TO cells, celastrol caused a significant increase in HSF1 protein level ($P<0.05$). This increase led to lower ER stress (all $P<0.05$), lower apoptosis (all $P<0.05$) and higher

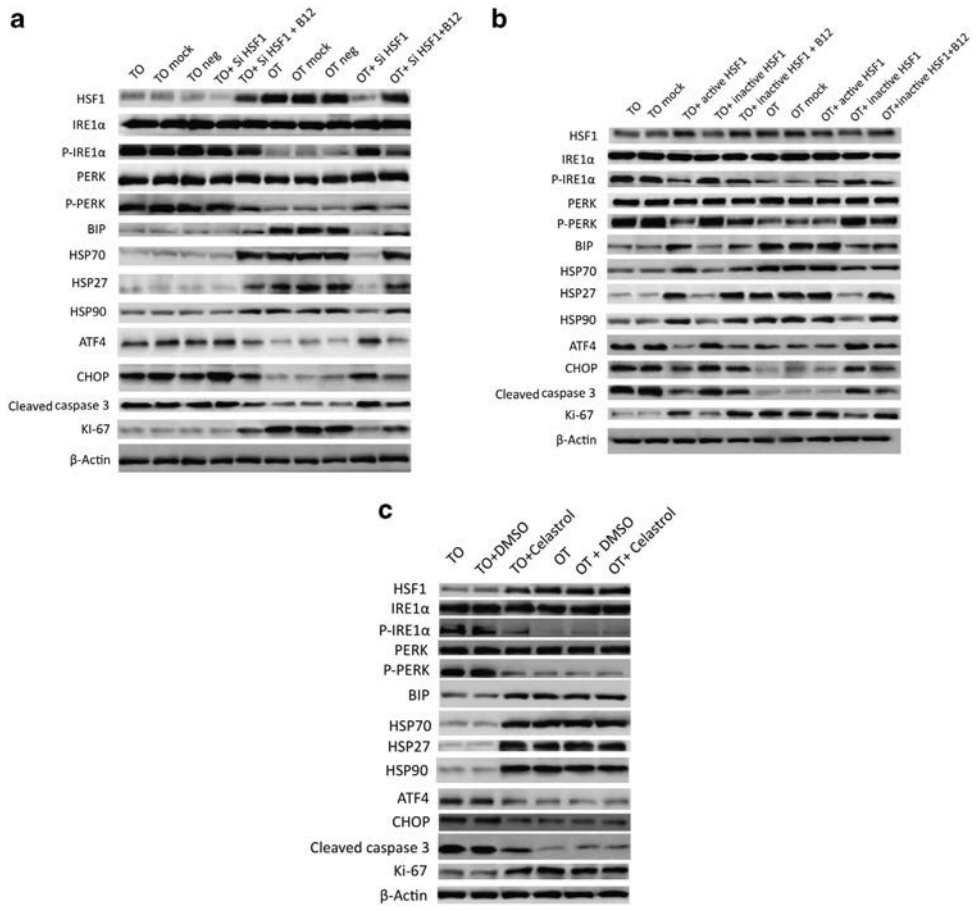


Figure 5 Overexpression in TO cells or knockdown of the HSF1 protein in OT cells can either rescue or aggravate the B12-associated ER stress. (**a**) Whereas transfecting TO cells with siRNA against HSF1 results in no significant changes to either the ER stress or the apoptosis, the same transfection in OT cells leads to lowered HSPs expressions (all $P<0.05$) and consequently higher ER stress and apoptosis (all $P<0.05$), as well as lowed proliferation ($P<0.001$). (**b**) Transfection with either a constitutively activated Hsf1 (Hsf1-act) or a dominant negative Hsf1 (Hsf1-inactive) construct shows similar results. In TO cells, positive effects are seen with the transfection of the Hsf1-act on HSPs expressions, ER stress reductions, apoptosis and proliferation, whereas no effect can be discerned when Hsf1-inactive construct is transfected into the same cells. In OT cells, adverse effects are seen only when the Hsf1-inactive construct is transfected into the cells and no difference can be detected with the transfection of the Hsf1-act construct. (**c**) Equally, the positive effects of celastrol, an activator for HSF1, on HSPs expression, ER stress and apoptosis can only be seen in TO cells, but not in OT cells

proliferation (Ki67, $P<0.05$). Moreover in OT cells, no difference could be found in either HSF1 protein expression or the downstream events including the HSPs' expression, level of ER stress, apoptosis and cellular proliferation.

B12 reversed the activation of ER stress induced by thapsigargin. To evaluate the modulating effect of B12 on ER stress, we investigated its addition to cells subjected to thapsigargin (TG), an ER calcium pump inhibitor, which is a strong stimulator of ER stress. TG induced the activation of ER stress transducers, namely P-IRE and P-PERK, in control non-deficient OT cells, ($P<0.05$), but not in TO cells (Figures 6a, b and Supplementary Figure 7). Despite so, TG appeared to trigger further apoptosis in TO cells (Figure 6c). TG also reduced the protein expression of HSP70s in both TO and OT cells (Figure 6d), even though their transcription were actually elevated (Supplementary Figure 7). Similar reductions after TG treatment had been reported recently in cultured pancreatic β cells and attributed to increased protein degradation by proteasome.[32] Vitamin B12 had a remarkable protecting effect against the ER stress induced by TG. The addition of B12 reversed both the activation of ER stress transducers (Figures 6a and b) and apoptosis (Figure 6c), and increased the expression of protein chaperons after TG treatment (Figure 6d). These protective effects of B12 were also observed in TO and OT cells treated with EX527, a SIRT1 inhibitor (Figure 7).

The reduced SIRT1 expression is homocysteine-independent and is under the influence of methylation-dependent mechanisms. To address here whether homocysteine had a part in the ER stress triggered by the impaired cellular availability of B12, we evaluated the effects of homocysteine itself on SIRT1 expression. SIRT1 expression was increased in N1E115 cells after a relatively long-term homocysteine treatment (6–7 days at 15 μM) (Figure 8a). This result allowed us to conclude that the low/moderate level of homocysteine produced in TO cells has no significant role in the SIRT1-related ER stress response of the TO cells. In addition, no modification in ER stress markers was

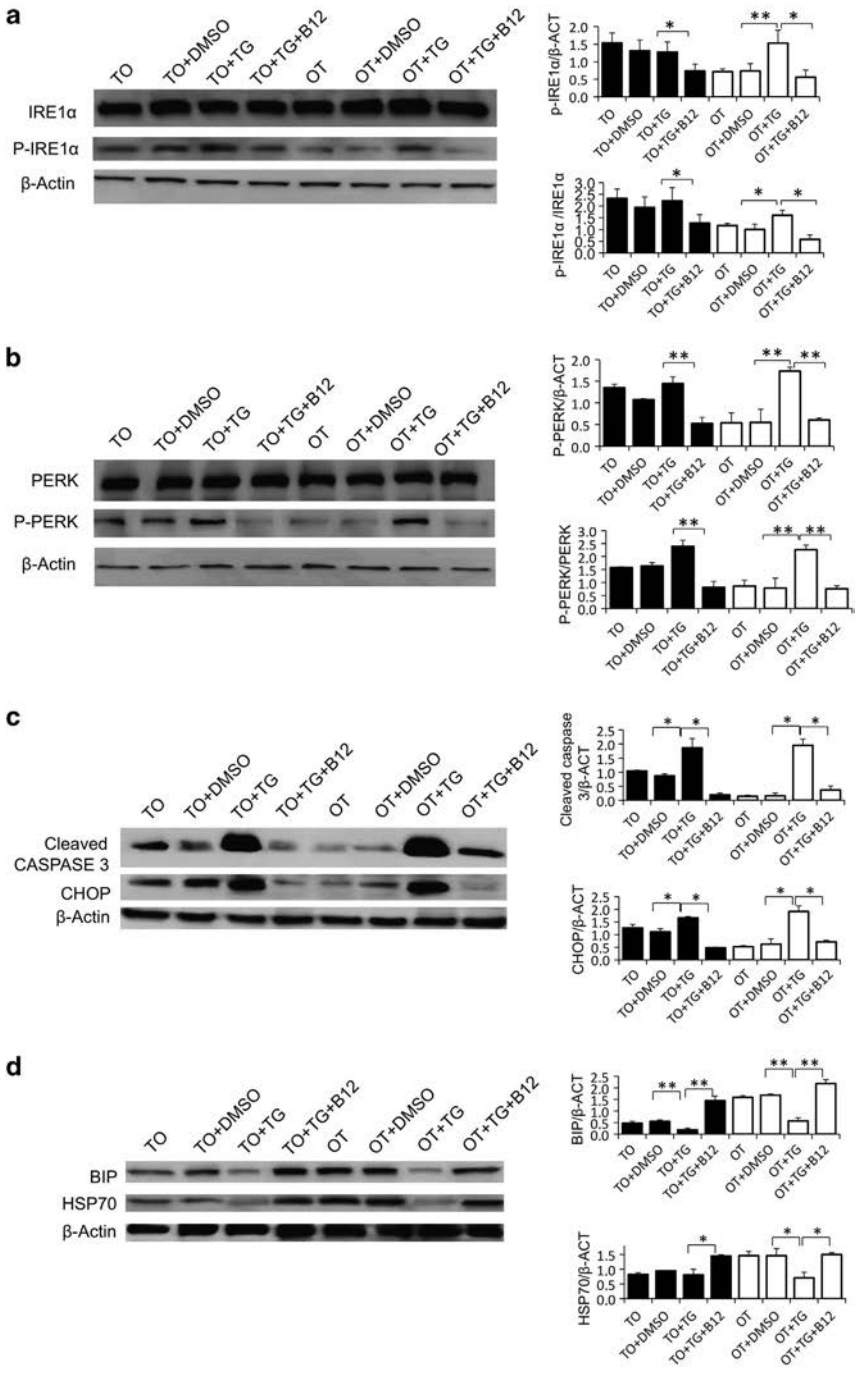


Figure 6 TG elicits further activation on ER stress transducers in N1E115 TO cells and shifts these cells toward apoptosis. P-IRE1α increases in control OT cells after TG treatment ($P<0.01$). Addition of B12 in the culture medium reduces this activation in both cell types (**a**, $P<0.05$). More significant P-PERK activation is observed in control OT *versus* TO cells after TG treatment, whereas B12 reduces this activation in both cell types ($P<0.01$) (**b**). TG at 1 μM for 5 h induces significant increases in CHOP and cleaved caspase 3 expression in both cell types, and B12 reduces these expressions ($P<0.05$ for all comparisons) (**c**). TG treatment reduces both the expression of BiP and HSP70 in both cell types (**d**). The same TG treatment induces significantly more BiP and HSP70 expression in TO cells ($P<0.01$). Data were compared by one-way ANOVA with Fisher's test, with $n=8$ in each group, and presented as means ± S.E. (*$P<0.05$ and **$P<0.01$)

observed in presence of methylmalonic acid (MMA) (Supplementary Figures 8A and B). We also tested the hypothesis that SIRT1 expression is mediated by a methylation-dependent mechanism using adenosine-2′,3′-dialdehyde (AdoX) as a methyltransferase inhibitor.[33] AdoX decreased SIRT1 transcription and translation in control cells, reduced the protein level of HSF1, HSP70, BiP and increased the protein level of ER stress transducers, as well as the transcription level of 'hypermethylated in cancer 1' (HIC1) (Figures 8b and c).

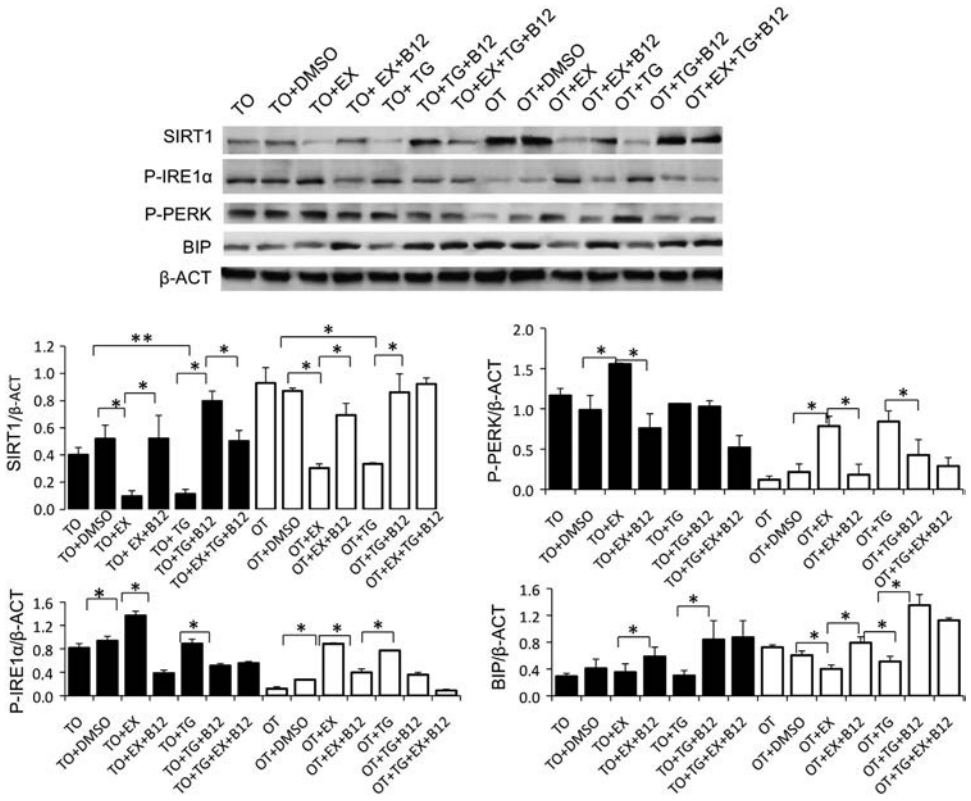


Figure 7 The effect of the activator and inhibitor of SIRT1 on the expression of ER stress markers is modulated by vitamin B12 in TO and OT cells. SIRT1 inhibitor, EX527, reduces the SIRT1 protein expression in both cell types ($P<0.01$) and B12 supplement reverses its effects on ER stress transducers, including P-PERK ($P<0.05$) and P-IRE1α ($P<0.05$ for all comparisons). B12 reverses also the expression of BiP after EX527 treatment in TO and OT cells ($P<0.05$ for both cell types). Data were compared by one-way ANOVA with Fisher's test, with $n=8$ in each group, and presented as means ± S.E. (*$P<0.05$ and **$P<0.01$)

Discussion

Previous studies in cells have demonstrated that the cellular availability of vitamin B12 is relevant to cellular proliferation.[6–9] Evidences here show that ER stress participates in this process. Our data clearly show that impaired cellular availability of vitamin B12 produces this stress through an impaired expression of SIRT1 and a subsequent increased acetylation of HSF1. Indeed, the effect of B12 on ER stress was influenced by the different conditions of activity and expression of SIRT1 and HSF1. Consistently, reduced SIRT1 expression resulted in increased HSF1 acetylation in B12-deficient TO cells. Adding either vitamin B12 or SAM to TO cells restored the level of SIRT1 expression. The fact that a reduced SIRT1 expression occurred concurrently with an increased HIC1 expression in TO cells and that similar scenario to the B12 deficiency (i.e., reduced SIRT1, HSF1 and HSP70s as well as increased ER stress) can be reproduced in control OT cells using the methylation inhibitor AdoX suggest the involvement of methylation. Indeed, SIRT1 interacts with the BTB/POZ domain of HIC1 to form a transcriptional repression complex that prevents the transcription of SIRT1 itself[34]. Westerheide *et al.*[22] have demonstrated that SIRT1 affects the attenuation phase of heat shock response by deacetylating HSF1, and as a consequence potentiates the binding between HSF1 and heat shock promoter. Consequent to the reduced SIRT1 expression in TO cells, the increased acetylation of HSF1 accelerates the attenuation of heat shock response and leads to less than optimal amount of molecular chaperon needed for assuring proper cellular growth (Supplementary Figure 5). This in turn triggers the integrated stress response epitomized by the phosphorylation of eIF2α in the B12-deficient TO cells. This increased P-PERK-dependent phosphorylation of eIF2α is under the influence of vitamin B12. It is consistent with the increased expression of ATF4 observed in TO cells and is known to inhibit ER protein translation.[35] It is worth noting that the total HSF1 protein expression is significantly reduced in the TO cells. Although the exact reason for this decrease is not clear, the drop in SIRT1 protein level may also account for the downregulation of HSF1.[36] Our own overexpression experiment using SIRT1 constructs (Supplementary Figure 4) certainly supports this idea. Heat shock response in senescent cells is associated to a reduced HSF1 protein level/activity caused by SIRT1 depletion and p53 activation.[36] HSF1-mediated heat shock response is an integral part of the network crucial for the health of the cellular proteome. A dysfunctional heat shock response logically triggers UPR of the ER attributable to the accumulation of misfolded proteins. In TO cells, these stress responses most likely culminate in apoptosis reflected by the increased expression of CHOP and cleaved caspase 3. Previous studies had established that high doses of homocysteine (ranging from 1 to 10 mM) could rapidly induce ER stress response with the upregulation of molecular

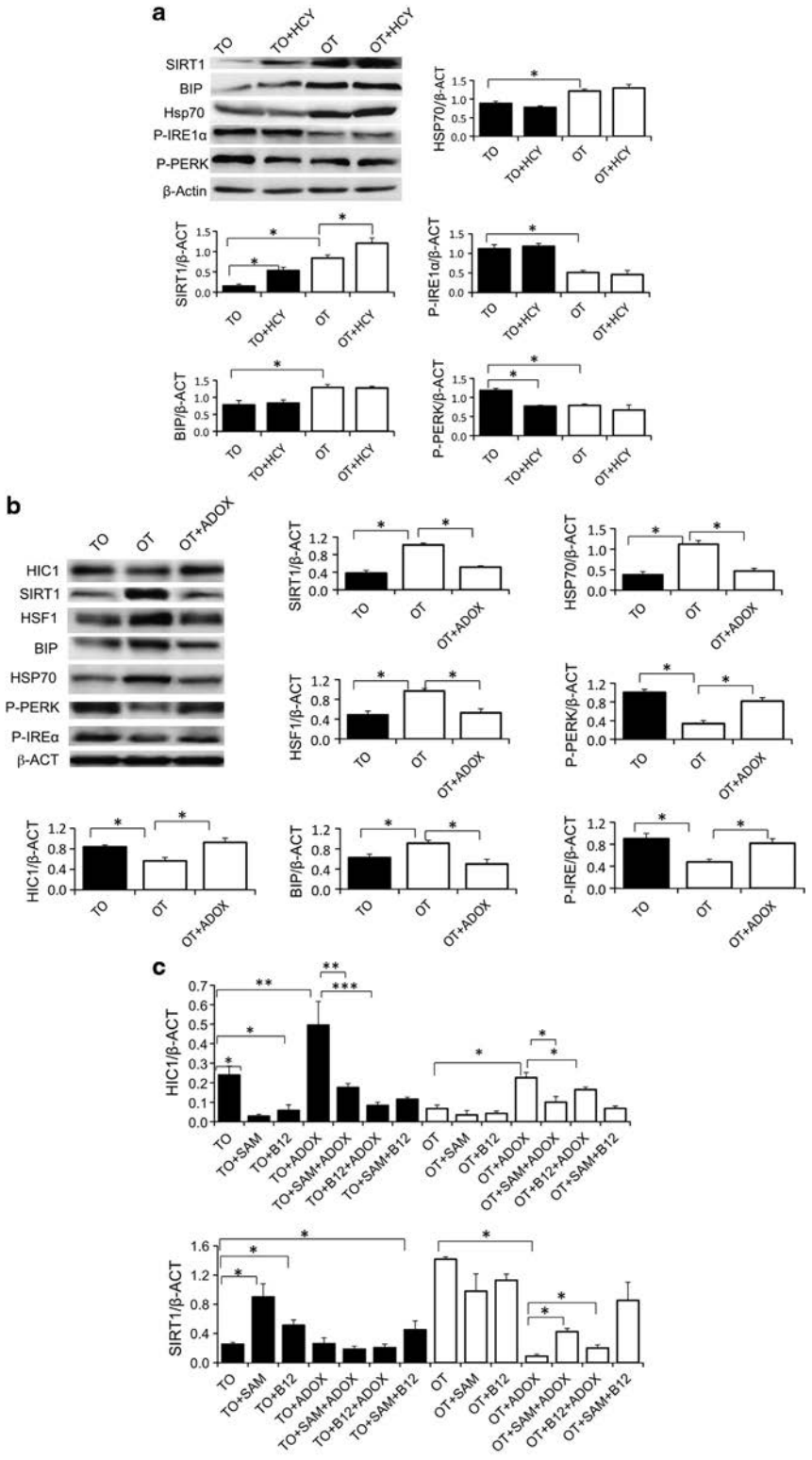


Figure 8 The reduced SIRT1 expression is homocysteine-independent and methylation-dependent. (**a**) SIRT1 expression increases after homocysteine treatment in both TO and OT cells ($P<0.05$ for both), whereas P-PERK activation is reduced in TO cells ($P<0.05$). (**b**) AdoX treatment in OT cells increases the protein expression of HIC1 ($P<0.05$) and decreases the expression of SIRT1, HSF1 and BiP. It increases the expression of the two ER stress transducers, P-IRE1α and P-PERK ($P<0.05$ in both cell types). (**c**) Influence of SAM, vitamin B12 and the methyltransferase inhibitor AdoX on the relative abundance of SIRT1 and HIC1 transcripts in TO and OT cells. AdoX increases significantly the relative abundance of HIC1 transcript in TO cells ($P<0.001$), which can be partially reversed by the addition of either SAM ($P<0.01$) or B12 ($P<0.001$). These same changes occur also in the control OT cells (upper panel). Inversely, AdoX treatment decreases the relative abundance of SIRT1 transcript in control OT cells only, and the addition of either SAM or B12 reverse this reduction in SIRT1 transcript ($P<0.05$ for both comparisons) (lower panel). Data were compared by one-way ANOVA)with Fisher's test, with $n=8$ in each group, and presented as means ± S.E. ($^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$)

chaperons such as BiP.[11,12,37] In contrast, using a homocysteine application at a concentration consistent with the metabolic changes in TO cells, we observed an increased SIRT1 protein expression in both control and B12-deficient cells. The SIRT1 reduction in TO cells was thus not related to homocysteine accumulation. We also ruled out the participation of the MMA, a neurotoxin itself, in ER stress, as no modification in ER stress markers was observed (Supplementary Figure 8).

One important implication drawn from our results is the modulating effect of vitamin B12 on ER stress. Our study here used TG as an activating agent for ER stress. In TO cells, TG treatment exerted no further activation on the ER stress transducers; instead, it swayed the cells towards apoptosis. In OT cells, TG activated significant ER stress and apoptosis. B12 supplement in both cell types restored the level of SIRT1; it thus reduced the activation of the ER stress transducers and apoptosis via increased expression of HSP70s. Interestingly, the beneficial effect of the supplemental B12 on ER stress was still present after decreasing either the expression or the activity of SIRT1. Thus, a reduction in bioavailable B12 sensitizes cells to downstream assaults, and supplementation in B12 can reduce pre-existent ER stress.

These beneficial effects of B12 supplement lend themselves to investigations on possible neuroprotective effects and on the consequences of B12 deficiency in ER stress-related neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease.[38,35] Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease related to aging. The environmental factors and the pathomechanisms that lead to Parkinson's disease are still unclear.[38] Recently, we have shown that in rat's substantia nigra an impaired metabolism of vitamin B12 in dopaminergic neurons can lead to apoptosis and account for the Parkinson-like phenotype in TO target-transfected rats.[8] Our results here indicate that the apoptosis of the TO-transfected dopaminergic cells is consequent to the mal-adapted ER stress response and are consistent with previous findings, suggesting the involvement of SIRT1 and ER stress for the loss of dopaminergic neurons.[39–44] The impact of vitamin B12-cellular deficiency on apoptosis of dopaminergic cells through the activation of ER stress thus highlights the importance of prevention against vitamin B12 insufficiency prior to the incidence of diseases. Finally, our results may help to explain the association of vitamin B12 with Parkinson's disease in clinical studies.[45] Levodopa treatment of Parkinson's disease patients increases the consumption of SAM in the O-methylation of Levodopa catalyzed by catechol-O-methyltransferase (COMT). Consequently, in patients undergoing Levodopa therapy, the cellular deficiency in SAM could exacerbate vitamin B12 deficiency, and thus either escalate an existing ER stress or initiating an ER stress not present previously.[46]

In conclusion, we have presented evidence indicating that a decreased cellular availability of B12 leads to ER stress activation mediated by decreased SIRT1expression. This reduction in turn leads to both lower HSF1 expression and HSF1 hyperacetylation. These result in the precarious reduction of the molecular chaperons needed for a functional proteome in normal cellular growth (Supplementary Figure 9). This molecular mechanism could contribute to the neurodegenerative effects of B12 deficiency in dopaminergic cells. Additionally, we have shown that B12 supplementation protects cells from the downward spiral of the ER stress-associated apoptosis in cells treated with TG. Accordingly, we suggest that adequate status of cellular B12 shall have beneficial/protective effect and thus can safeguard cells against any downstream attacks; on the other hand, in B12-deficient cells, UPR once activated will be shifted from adaptive towards apoptotic maladaptive end point.

Materials and methods

Cell culture and siRNA/plasmid transfections. N1E115 culture protocol was as described previously.[6,7] For stably transfected TO and OT cells, G418 at 1 mg/ml was included in the culture medium. The B12-binding capacity of the stably transfected cells were verified using radioactive Co^{57}-CNB12[6] before and right after the experimental manipulations to ensure that TO cells remained B12-deficient and OT cells remained as control. Hydroxycobalamin, SAM, AdoX, celastrol and SIRT1 inhibitor, EX527, were purchased from Sigma (Lyon, France). SIRT1 activator SRT1720 was obtained from Euromedex (Strasbourg, France). In cases where cells were treated either with hydroxycobalamin (20 μM) or SAM (75 μM), an incubation period of 5–7 days was applied. For TG, cells were treated for 5 h at 1 μM. For AdoX, we treated the cells only for 24 h at a concentration of 20 μM, as the typical 48 h treatment led to cell death in more than 90% of the population. For SRT1720, the cells were treated for 8 h at 1 μM and for EX527, the cells were treated at 5 μM for 7 h. The homocysteine treatment included an application of homocystine for 6 consecutive days at a final concentration of 15 μM in the cell culture medium. For cells treated with celastrol, a concentration of 3 μM was applied in cultured medium during a 24 h period. For the MMA treatment, we incubated the cells in MMA (Sigma, Lyon, France) containing media for 7 days at concentrations of 1, 5 and 25 μM.

In experiments where SIRT1 siRNA transfections were applied, two siRNAs obtained from Life Technologies (Saint Aubin, France) were used to confirm the specificity of the interference targeted to SIRT1. The siRNA sequences are (sense strand indicated): siSIRT1-1: 5′-GCUUGGAAGAUGAUACGGATT-3′, siSIRT1–2: 5′-GAAAACUACUUCGAAAUUATT-3′, and a scrambled siRNA was used as the transfection control and designated as si non-targeting 5′-UUGAUGUGUUUA-GUCGCUA-3′ (Applied Biosystems, Saint Aubin, France s96764 and s96765; 10 nM final concentration). In experiments where HSF-1 and control siRNAs were used, the siRNAs were obtained from both Life technologies and Fisher Scientific (Illkirch, France). The siRNA sequences are (sense strand indicated): siHSF1–1: 5′-AGCAAAAAGUUGUCAACAATT-3′. The siRNA duplexes were transfected with lipofectamine 2000 (Invitrogen, Saint Aubin, France) 24 h after plating the N1E115 cells in 100 mm dishes at a density of 6×10^5 cells per dish. Two days post transfection, N1E115 cells were harvested for protein extraction. The treatment with SAM or B12 was applied 48–72 h prior to transfection.

In the overexpression experiments: SIRT1 and HSF1 plasmids are obtained from Addgene (Cambridge, MA, USA), and the pcDNA3-based plasmids of the active HSF1 and the inactive HSF1 plasmids were gifts from Dr. N Harrison (Columbia University, New York City, NY, USA). *Hsf1-act* has a long deletion of amino acids 203–315 in the regulatory domain of HSF1, whereas the dominant-negative mutant form of HSF1 has a deletion of amino acids 453–523 located in the transcription activation domain.[47]

Western blot. To prepare total cell lysate, live cells were lysed directly with a solution containing sodium phosphate anhydrous dibasic, potassium dihydrogen phosphate, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, sodium dodecyl sulfate and Complete Protease Inhibitors (Roche, Boulogne-Billancourt, France) after washing twice with ice-cold 1X PBS. Lysates were then subjected to a thermal shock followed by a centrifugation at 12 000 r.p.m. for 30 min. The protein concentration of the supernatant was determined using BCA Protein Assay kit (Pierce, Brebieres, France) and BSA as standard protein. In general, 40 μg of the total protein was loaded per lane for SDS-PAGE. Depending on the molecular mass of the protein, the stacking and the separating gel contained 4 and 6–12% of acrylamide, respectively. Proteins were electrotransferred onto PVDF membranes (Millipore, Molsheim, France) in 25 mM Tris buffer containing 192 mM glycine and 20% (vol/vol) methanol. The membranes were then blocked either with 5% non-fat milk or 5% BSA for 1 h at room temperature. The PVDF membrane was then incubated overnight with various primary antibodies (SIRT1, HSF1, BiP, IRE-

1alpha, PERK, phospho-PERK, cleaved caspase 3, eIF2 alpha, phospho-eIF2 alpha, CHOP, acetyl-lysine, GCN2, HSP90, HSP 27 (Cell Signaling, Saint Quentin en Yvelines, France), HRI, PKR, ATF-6 alpha (Santa Cruz, Nanterre, France), phospho-IRE-1alpha (Novus Biologicals, Montluçon, France), XBP (Biodesign, Memphis, TN, USA), HSP70 (Stress marq, Nanterre, France), ATF4 (Abnova, Le Perray en Yvelines, France), Ki-67 (Abcam, Paris, France) and β-actin (US biological, Strasbourg, France). Appropriate secondary antibodies conjugated to HRP were used for detection with ECL or ECL PLUS reagent (Amersham, Velizy-Villacoublay, France).

Immunoprecipitation. Cell lysates were prepared as described previously in the western blot section above. Protein immunoprecipitation was done using an immunoprecipitation kit (Roche) following the manufacturer's recommendation. Briefly, an aliquot of cell lysate containing exactly 800 μg of total protein was incubated with 50 μl G-sepharose beads at 4 °C overnight. Then, 5 μl of anti-HSF1 (Cell Signaling) were incubated with the supernatant at 4 °C overnight. After washing the beads several times, the mixture was centrifuged at 12 000 $\times$ *g* for 20 s. The pellet was resuspended in 100 μl laemmli buffer. For repeated run, these 100-μl aliquots were loaded per lane for SDS-PAGE gel electrophoresis followed by an immunoblotting against a primary antibody antiacetyl lysine (Cell Signaling).

Immunoflorescence. Neuroblastoma cells were grown on slides for 48 h. Then, they were fixed with paraformaldehyde/saccharose for 10 min at 4 °C and blocked with BSA for 1 h. Cells were incubated with various primary antibodies: HSF1, caspase3, Ki67, ATF6α (Imagenex, Port Coquitlam, BC, Canada) overnight in a humid chamber at 4 °C under a gentle agitation. Slides were washed four times in BSA/PBST for 5 min then incubated with the secondary antibody for 1 h at room temperature under a gentle agitation. Detection of the nucleus was done with the nuclear fluorescent dye 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.43 μg/ml in PBS; Sigma, Lyon, France). Finally, slides were washed four times in PBS and mounted using a minimal volume of faramount mounting medium (DAKO, Carpinteria, CA, USA). The immunostained cells were imaged using Nikon C2 equipped with three laser lines (405, 488 and 543). The images were obtained with $\times$ 60 oil immersion lens.

LCMSMS determination of homocysteine and MMA. For the determination of Hcy and MMA, TO and OT cells (treated or not with SAM or B12) were seeded in 6-well plates. After 48 h of incubation, cells were scraped and centrifuged in the cell-medium suspension for 5 min at 15 000 $\times$ *g* r.p.m. Subsequently, we aspirated the medium and used it for further LCMSMS analysis. Homocysteine and MMA were determined in cell media by LC-MS/MS using an Acquity UPLC (Waters, St. Quentin en Yvelines, France) and a triple quadripole mass spectrometer 4000 QTRAP (AB sciex, Courtaboeuf, France) as described.[7] Quantification was made using calibration curves with correction against internal standard peak area.

Real time PCR. Total RNA was extracted using Rneasy plus Mini Kit (Qiagen), including DNase digestion. Reverse transcription was done by using the iScript cDNA Synthesis System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen, Paris, France). Quantitative PCR was performed using SYBR Green I Master Mix buffer (Applied Biosystems, Saint Aubin, France), Quantitect SYBR Green PCR kit from Qiagen and reactions were run on an iCycler (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) using a three-step standard protocol: activation of HotStartTaq DNA polymerase at 95 °C/15 min; PCR was performed in 40 cycles (one cycle = denaturation at 95 °C/10 s, annealing 56–57 °C/15 s, extension at 72 °C/10 s). Either RPS29 or actin was used as an internal standard, and differences in expression were calculated using the following formula:

$$(1 + \text{efficiency (gene to study)})^{\text{Ct standard} - \text{Ct sample}}$$

$$(1 + \text{efficiency (reference gene)})^{\text{Ct standard} - \text{Ct sample}}$$

The oligonucleotides used are as follows:

SIRT1: forward: 5′-GACGATGACAGAACGTCACAC-3′; reverse: 5′-CGAG GATCGGTGCCAATCA-3′; CHOP: forward: 5′-GTCCCTAGCTTGGCTGACA GA-3′;reverse: 5′-TGGAGAGCGAGGGCTTTG-3′; BiP: forward: 5′-ACTTGG GGACCACCTATTCCT-3′;reverse: 5′-CGAGGATCGGTGCCAATCA-3′; ATF4: forward: 5′-ATGGCGCTCTTCACGAAATC-3′; reverse: 5′-ACTGGTCGAAGGGG TCATCAA-3′.

HSP70: forward: 5′-GCGTGGGGGTATTCCAACAT-3′; reverse: 5′-TGAGAC GCTCGGTGTCAGT-3′.

HIC1: forward: 5′-GGCCATTCGAGGCAGCTAC-3′; reverse: 5′-AGGTTTAGCA GGTTGTCATGC-3′.

Statistics. Data were analyzed with Stata 12.0 software (StataCorp, College Station, TX, USA) and reported as means ± S.E. Data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's test. A *P*-value < 0.05 was considered to indicate statistical significance. Results are denoted by asterisks in figures ($^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This study was supported by fundings from the Region Lorraine and the French National Agency for Research (ANR Nutrivigène). We would like to thank Dr. N Harrison of the Columbia University (New York City, NY, USA) for the HSF-1 active and HSF1-inactive plasmids and advices for their transfection, and Dr. DJ Thiele of the Duke University (Durham, NC, USA) for the suggestion of using celastrol as the pharmacological activator of HSF1.

Author contributions

SB and JLG designed the study, interpreted the data and wrote the paper. RG participated in designing the study, interpreted the data, and participated in the preparation and redaction of the paper. RG, SP, EJ, SL, GG and CM performed the metabolic, cellular and molecular experiments. SB and JLG coordinated the whole study and JLG was the director of the Nutrivigene ANR project. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

1. Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell* 2010; **40**: 228–237.
2. Bhate V, Deshpande S, Bhat D, Joshi N, Ladkat R, Watve S *et al.* Vitamin B12 status of pregnant Indian women and cognitive function in their 9-year-old children. *Food Nutr Bull* 2008; **29**: 249–254.
3. Garrod MG, Green R, Allen LH, Mungas DM, Jagust WJ, Haan MN *et al.* Fraction of total plasma vitamin B12 bound to transcobalamin correlates with cognitive function in elderly Latinos with depressive symptoms. *Clin Chem* 2008; **54**: 1210–1217.
4. Hooshmand B, Solomon A, Kåreholt I, Leiviskä J, Rusanen M, Ahtiluoto S *et al.* Homocysteine and holotranscobalamin and the risk of Alzheimer disease: a longitudinal study. *Neurology* 2010; **75**: 1408–1414.
5. McCaddon A. Homocysteine and cognition–a historical perspective. *J Alzheimers Dis* 2006; **9**: 361–380.
6. Pons L, Battaglia-Hsu SF, Orozco-Barrios CE, Ortiou S, Chery C, Alberto JM *et al.* Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin. *PloS one* 2009; **4**: e6325.
7. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, Daval JL *et al.* Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and upregulates PP2A, proNGF and TACE. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **16**: 21930–21935.
8. Orozco-Barrios CE, Battaglia-Hsu SF, Arango-Rodriguez ML, Ayala-Davila J, Chery C, Alberto JM *et al.* Vitamin B12-impaired metabolism produces apoptosis and Parkinson phenotype in rats expressing the transcobalamin-oleosin chimera in substantia nigra. *PloS One* 2009; **4**: e8268.
9. Lai SC, Nakayama Y, Sequeira JM, Quadros EV. Down-regulation of transcobalamin receptor TCblR/CD320 by siRNA inhibits cobalamin uptake and proliferation of cells in culture. *Exp Cell Res* 2011; **317**: 1603–1607.
10. Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 29659–29665.
11. Althausen S, Paschen W. Homocysteine-induced changes in mRNA levels of genes coding for cytoplasmic- and endoplasmic reticulum-resident stress proteins in neuronal cell cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; **84**: 32–40.
12. Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2000; **275**: 32846–32853.
13. Outinen PA, Sood SK, Liaw PC, Sarge KD, Maeda N, Hirsh J *et al.* Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. *Biochem J* 1998; **332**: 213–221.
14. Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev* 1995; **9**: 2888–2902.
15. Ivy JM, Klar AJ, Hicks JB. Cloning and characterization of four SIR genes of Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* 1986; **6**: 688–702.
16. Smith JS, Boeke JD. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev* 1997; **11**: 241–254.

17. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms. *Genes Dev* 1999; **13**: 2570–2580.
18. Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans. *Nature* 2001; **410**: 227–230.
19. Kwon HS, Ott M. The ups and downs of SIRT1. *Trends Biochem Sci* 2008; **33**: 517–525.
20. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; **303**: 2011–2015.
21. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A *et al.* Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001; **107**: 137–148.
22. Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM Jr., Sistonen L, Morimoto RI. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 2009; **323**: 1063–1066.
23. Grimm AA, Brace CS, Wang T, Stormo GD, Imai S. A nutrient-sensitive interaction between Sirt1 and HNF-1alpha regulates Crp expression. *Aging cell* 2011; **10**: 305–317.
24. Strum JC, Johnson JH, Ward J, Xie H, Feild J, Hester A *et al.* MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. *Mol Endocrinol* 2009; **23**: 1876–1884.
25. Garcia Moreno M, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E *et al.* Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol* 2011; **225**: 324–335.
26. Chen YR, Fang SR, Fu YC, Zhou XH, Xu MY, Xu WC. Calorie restriction on insulin resistance and expression of SIRT1 and SIRT4 in rats. *Biochem Cell Biol* 2010; **88**: 715–722.
27. Deng XQ, Chen LL, Li NX. The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Liver Int* 2007; **27**: 708–715.
28. Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD. Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. *Neurobiol Learn Mem* 2012; **98**: 25–32.
29. Tang Y, Xu J, Qu W, Peng X, Xin P, Yang X *et al.* Resveratrol reduces vascular cell senescence through attenuation of oxidative stress by SIRT1/NADPH oxidase-dependent mechanisms. *J Nutr Biochem* 2012; **23**: 1410–1416.
30. Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 2002; **277**: 13045–13052.
31. Shen J, Prywes R. ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6. *Methods* 2005; **35**: 382–389.
32. Rosengren V, Johansson H, Lehtio J, Fransson L, Sjoholm A, Ortsater H. Thapsigargin down-regulates protein levels of GRP78/BiP in INS-1E cells. *J Cell Biochem* 2012; **113**: 1635–1644.
33. Dolzhanskaya N, Merz G, Denman RB. Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein. *Biochemistry* 2006; **45**: 10385–10393.
34. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 2005; **123**: 437–448.
35. Matus S, Glimcher LH, Hetz C. Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER. *Curr Opin Cell Biol* 2011; **23**: 239–252.
36. Kim G, Meriin AB, Gabai VL, Christians E, Benjamin I, Wilson A *et al.* The heat shock transcription factor Hsf1 is downregulated in DNA damage-associated senescence, contributing to the maintenance of senescence phenotype. *Aging cell* 2012; **11**: 617–627.
37. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY *et al.* Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 2001; **107**: 1263–1273.
38. Huber K, Superti-Furga G. After the grape rush: sirtuins as epigenetic drug targets in neurodegenerative disorders. *Bioorg Med Chem* 2011; **19**: 3616–3624.
39. Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn KE, Amore AM *et al.* Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* 2007; **317**: 516.
40. Holtz WA, O'Malley KL. Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 2003; **278**: 19367–19377.
41. Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2002; **22**: 10690–10698.
42. Silva RM, Ries V, Oo TF, Yarygina O, Jackson-Lewis V, Ryu EJ *et al.* CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an *in vivo* neurotoxin model of Parkinsonism. *J Neurochem* 2005; **95**: 974–986.
43. Sado M, Yamasaki Y, Iwanaga T, Onaka Y, Ibuki T, Nishihara S *et al.* Protective effect against Parkinson's disease-related insultsthrough the activation of XBP1. *Brain Res* 2009; **1257**: 16–24.
44. Egawa N, Yamamoto K, Inoue H, Hikawa R, Nishi K, Mori K *et al.* The endoplasmic reticulum stress sensor. ATF6 (alpha), protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J Biol Chem* 2010; **286**: 7947–7957.
45. De Lau LM, Koudstaal PJ, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. Dietary folate, vitamin B12, and vitamin B6 and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 2006; **67**: 315–318.
46. Miller JW, Shukitt-Hale B, Villalobos-Molina R, Nadeau MR, Selhub J, Joseph JA. Effect of L-dopa and the catechol-O-methyltransferase inhibitor Ro 41-0960 on sulphur amino acid metabolites in rats. *Clin Neuropharmacol* 1997; **20**: 55–66.
47. Zuo J, Rungger D, Voellmy R. Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 4319–4330.

Cell Death and Disease **is an open-access journal published by** ***Nature Publishing Group*****. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/**

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (http://www.nature.com/cddis)

Résumé: La carence en vitamine B12 est fréquente chez les sujets âgés et produit un vieillissement cérébral par des mécanismes malconnus. La vitamine B12 joue un rôle majeur dans les régulations épigénomiques dépendantes de la S-adénosyl méthionine (SAM). Nous avons établi un modèle de cellules neuronales dopaminergiques NIE115 carencé en vitamine B12 par l'expression stable d'une protéine chimère : la transcobalamine-oléosine (TO) réduisant la disponibilité cellulaire en B12, la SAM et la prolifération cellulaire. La protéine chimère oléosine-transcobalamine (OT) ne lie pas la B12 et constitue un contrôle. Les cellules TO ont une diminution B12-dépendante de la déacétylase SIRT1 (sirtuin1) et un stress du réticulum endoplasmique (RE) avec une augmentation des transducteurs transmembranaires, une diminution des protéines chaperonnes et une augmentation des marqueurs pro-apoptotiques. La diminution de l'expression de SIRT1 déclenche le stress du RE en réponse au stress nutritionnel. Cette diminution produit une augmentation de HSF1 acétylé diminuant l'expression des protéines chaperons. L'ajout de B12, des activateurs de SIRT1 et HSF1, la surexpression de SIRT1 et HSF1 réduisent le stress du RE. Dans les cellules contrôles, le traitement par la thapsigargin, l'inhibition de SIRT1 et HSF1 induisent également un stress du RE réversible en présence de B12. Le traitement des cellules OT par Adox (inhibiteur des méthyltransférases) induit les mêmes effets que la carence.
En conclusion, la carence en B12 induit un stress du RE via la diminution de SIRT1 et l'augmentation de HSF1 acétylé, l'ajout de B12 induit des effets neuro-protecteurs sur les cellules soumises à un stress du RE. Ces résultats suggèrent d'évaluer les effets des agonistes de SIRT1 sur les complications cérébrales de la carence.

Mots clés: Vitamine B12, maladies neurodégénératives, cellules neuronales, stress du RE, SIRT1, HSF1

Summary: Vitamin B12 deficiency is common in elderly population and produces neurodegenerative disorders by elusive mechanisms. B12 is a key determinant for the S-adenosyl methionine-dependent epigenomic regulations. We have established a B12-deficient cell model via the stable expression of transcobalamin–oleosin chimera (TO), which impairs cellular availability of vitamin B12, reduces SAM level and cell proliferation. Since the expression of oleosin transcobalamin chimera (OT) does not modify the phenotype of the transfected cells, these cells serve as control cells. TO cells present a B12-dependant decrease of deacetylase SIRT1 (sirtuin1) and an endoplasmic reticulum stress (ER stress) reflected by the increased expression of ER stress tranducers, decreased chaperon proteins and increased pro-apoptotic markers. We propose that the decreased expression of SIRT1 triggers cell response to nutritional stress through ER stress. This decrease results in a greater acetylation of heat-shock factor protein 1 (HSF1) and thus reducing the expression of heat shock proteins (HSP). Adding B12, SIRT1, or HSF1 activators as well as overexpressing SIRT1 or HSF1 reduce ER stress. In OT cells, thapsigargin treatment or impairing SIRT1 and HSF1 leads to B12-reversible ER stress. Treating OT cells with AdoX, an inhibitor of methyltransferase activities, produces effects similar to those observed in cells with decreased B12 availability.
In summary, the impaired cellular availability of vitamin B12 induces ER stress by increasing HSF1 acetylation through a decreased SIRT1 expression and adding vitamin B12 produces neuro-protective effects in cells subjected to prior ER stress. These results suggest evaluating the effects of SIRT1 agonists on cerebral complications due to a B12 deficiency.

Key words: Vitamin B12, neurodegenerative diseases, neuronal cells, ER stress, SIRT1, HSF1