HAL
open science

Rôle de SIRT1 dans la régulation du stress du réticulum endoplasmique induit par une carence en donneurs de méthyle au cours des maladies inflammatoires chroniques intestinales

Hassan Melhem

To cite this version:

Hassan Melhem. Rôle de SIRT1 dans la régulation du stress du réticulum endoplasmique induit par une carence en donneurs de méthyle au cours des maladies inflammatoires chroniques intestinales. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0061 . tel-01750769

HAL Id: tel-01750769

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750769v1

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

THESE

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

Hassan MELHEM

Rôle de SIRT1 dans la régulation du stress du réticulum endoplasmique induit par une carence en donneurs de méthyle au cours des maladies inflammatoires chroniques intestinales

Le 24 Avril 2014

Membres du jury

Rapporteurs:

M. Philippe MARTEAU	PU-PH, Unité de Gastroentérologie Hôpital Lariboisière, Paris
M. Jean-Marie REIMUND	PU-PH, Service d'H.G.E, CHU Hautepierre, Strasbourg

Examinateurs:

M. Jean-Louis GUEANT	PU-PH, UMR 954 Inserm, Nancy,
M. Laurent PEYRIN-BIROULET	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 Vandœuvre-lès-Nancy

Sommaire

Sommaire

Remerciements 11

Liste des publications et des communications 15

Liste des abréviations 19

Introduction 27

Données bibliographiques 31

Partie I : LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES 33

1) Généralités, historique 35
2) Epidémiologie 35
3) Les facteurs impliqués dans la pathogénie des MICI 35
   a) Les facteurs génétiques 36
   b) Les facteurs environnementaux 39
   c) Les facteurs immunitaires 40

Partie II : DONNEURS DE METHYLE ET CYCLE DE MONOCARBONES 43

Métabolisme des monocarbones et cycle de l'homocystéine - de la méthionine 45

1) Les substrats 45
   a) La méthionine 45
   b) La S-adénosylméthionine 45
   c) La S-adénosylhomocystéine 47
   d) L'homocystéine 47
2) Les vois métaboliques de l'homocystéine 48
   a) La voie de méthylation de l'Hcy en méthionine et cycle de la méthionine 48
   b) La transsulfuration 48
3) Classifications des hyperhomocystéinémies 49
   a) Hyperhomocystéinémie sévère 49
   b) L'hyperhomocystéinémie modérée 50
   c) Carence vitaminique et hyperhomocystéinémie 50
   d) Autres facteurs contrôlant le taux plasmatique de l'homocystéine 51
4) Les donneurs de méthyle alimentaire 52

4.1) Les folates (vitamine B9) 52

   a) Définition 52

b) Structure chimique 52
c) Histoire 54
d) Nutrition 54
e) Absorption 55
f) Transport des folates 56
g) Stockage et élimination 57
h) Rôles des folates 57
i) Carence en folates 59
4.2) la vitamine B12 ou cobalamine 59
a) Définition 59
b) Histoire 59
c) Nutrition 60
d) Structure chimique 60
e) Absorption 62
f) Transport 65
g) Métabolisme cellulaire de la cobalamine 66
h) Les troubles du métabolisme de la vitamine B12 66
i) Stockage et élimination 67
j) Carence en vitamine B12 67
k) Conséquences de la carence en vitamine B12 68
l) Perturbation de l'interaction entre la vitamine B12 et les folates 68
Parties III : MALADIES INFLAMAMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES ET CARENCE EN DONNEURS DE METHYLE 71
1) Implication du métabolisme des monocarbones dans la pathogénie des MICI 73
a) Hyperhomocystéinémie et MICI 73
b) Stress oxydant 74
c) Inflammation 74
d) Hypométhylation 75
2) Association des déterminants de l'homocystéine avec les MICI 76
a) Déterminants nutritionnels 76
b) Déterminants génétiques 77
c) Pharmacogénétique 78

Partie IV : STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES 79
1) Physiologie du réticulum endoplasmique 81
2) Stress du réticulum endoplasmique 82
2.1) Origines du stress du réticulum endoplasmique 82
a) Influence du calcium 83
b) Environnement redox 83
c) Glycosylation 83
d) Altération des mécanismes de contrôle de qualité et du repliement protéique 84
2.2) L'UPR 84
2.2.1) Les composantes de l'UPR 86
a) Activation de la kinase PERK, la voie traductionnelle 86
b) Activation d'IRE-1 et d'ATF6, la voie transcriptionnelle 87
2.2.2) UPR et apoptose 89
3) Le stress du RE en pathologie humaine 90
a) Maladie neurodégénérative 91
b) Diabète 91
c) Ischémie-reperfusion (IR) 91
d) Cancer 92
e) Inflammation 92
4) Stress du réticulum endoplasmique et SIRT1 94
a) Généralité, fonctions 94
b) Régulation de SIRT1 par l'état nutritionnel 95
c) Implication de SIRT1 dans le stress du RE 96
d) SIRT1 et balance méthylation/acétylation des régulateurs et co-régulateurs de l'expression génique 96
5) Stress du réticulum endoplasmique et MICI 98
6) SIRT1, inflammation et MICI 99
Objectifs d'étude 101
Approche expérimentale et méthodologie 105
1) Modèle animale 107

2) Modèle cellulaire 111
2.1) Matériels
a) Réactifs de biologie cellulaire 111
b) Réactifs de biologie moléculaire 111
c) Réactifs biochimiques 111
2.2) Méthodes
a) Culture en monocouche 112
b) Transfection stable de cellules TC7 par le pcDNA3-TCII-oléosine, pcDNA3-oléosine-TCII 112
c) Congélation des cellules 113
d) Décongélation des cellules 113
e) Liaison de la TCII à la vitamine B12 radiomarquée 113
f) Extraction des protéines 114
g) Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) 114
h) Western Blotting 115
i) Immunoprécipitation des protéines 116
j) Analyse de l'expression des gènes au niveau transcriptionel 116
k) Analyse qualitative de l'ARN/ADN sur gel d'agarose 118
l) Marquage Immunohistologique 119
m) Différents traitements effectués *in* vitro 120
n) Dosage de l'homocystéine, MMA, SAM et SAH, folates, vitamine B12 121
o) Analyses statistiques 123
Résultats 125
1) Confirmation de la carence en donneurs de méthyle – dosage sanguin 127
2) Impact de la carence en donneurs de méthyle sur l'inflammation intestinale chez le rat 127
3) Impact d'une carence en donneurs de méthyle sur la mise en place de l'UPR chez le rat 131
4) Impact de la carence cellulaire en vitamine B12 sur le stress du RE 133

5) Etude des mécanismes conduisant à la mise en place de l'UPR chez le rat carencé : implication de HSF1 et SIRT1 136
6) Impact de l'activation pharmacologique de SIRT1 *in vitro* et *in vivo* 138
7) Diminution de l'expression de SIRT1 chez les patients avec MICI 142

Discussion 145

Références bibliographiques 161

Publications 183

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, c'est avec émotion que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Jean-Louis Guéant**, directeur de l'unité INSERM U954 et chef de service du laboratoire de biochimie du CHU Nancy-Brabois de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de l'intérêt qui l'a porté à ce travail. Je le remercie également de son soutien et de sa confiance. Qu'il trouve ici l'expression de mon plus profond respect.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Laurent Peyrin-Biroulet** qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Elles ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur. J'ai vraiment de la chance d'avoir un directeur de thèse comme vous !!

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur le Docteur **Franck Hansmannel**, co-directeur de thèse, pour m'avoir guidé, conseillé et enseigné les réflexes du bon chercheur.

Pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir acceptés d'être rapporteur de ce mémoire, je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Philippe Marteau,** et Monsieur le Professeur **Jean-Marie REIMUND**. Je tiens à leur témoigner ma reconnaissance la plus sincère.

Un merci tout particulier à Madame le Docteur **Aude Bressenot** pour l'aide inconditionnelle qu'elle m'a apportée durant la phase de ce travail, mais aussi pour ses encouragements et ses conseils.

Mes vifs remerciements s'adressent conjointement à Monsieur le Professeur **Farès Namour** pour sa gentillesse, son soutien. Vous êtes le grand frère de tous les libanais.

Un IMMENSE MERCI à mon ami le plus intelligent **Jean Marc Alberto.** Merci pour les discussions enrichissantes, pour ta disponibilité et ta sympathie tout au long de cette thèse.

Je remercie également Monsieur le docteur **Vincent Billioud** et Monsieur le docteur **Jean-Baptiste Chevaux** pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

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

Sincèrement, je remercie profondément mes amies **Rose**, **Rania, Racha et Christine** mes compatriotes, pour les moments inoubliables que j'ai vécus avec vous à Nancy.

Un grand merci pour tous mes amis au labo **Fereshteh**, **Anaïs**, **Soufiane**, **Gaili**, **Lu**, **Andréa**, **Eva**, **Pierre**, **Deborah, Sophie, Philippe, Aurélie, David, Suzie, Justine, Céline**, **Elise**, **Brigitte, Natacha, Véronique, Florence** et surtout mon ami **Remy** pour tous les bons moments passés ensemble, leur bonne humeur et leur soutien.

Enfin, ce travail de thèse ne voudrait rien dire sans remercier mes parents **Ahmad** et **Amira** pour leur inégalable dévouement, qui m'ont toujours soutenu et poussé à donner le meilleur de moi-même malgré notre éloignement, mes sœurs **Basbous** et **Coucou,** mes nièces **Lanloun** et **Mamroush** et mon frère **Zizoo**, je vous adore ! Mes beaux-parents **Hussein** et **Sonia** je vous aime.

Bien sûr, un grand merci à ma femme **Hadia**, pour son amour sans limite, qui a su être là à chaque instant, pour me soutenir, m'écouter, me conseiller et me donner confiance en moi. Je t'aime !

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Publications:

Melhem H, Hansmannel F, Bressenot **A,** Battaglia-Hsu S**,** Billioud V, Alberto J-M, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. **Methyl deficient diet promotes colitis though SIRT1-mediated endoplasmic reticulum stress.** *En révision pour publication dans GUT en février 2014.*

Elakoum R, **Melhem H**[§], Mrabet N[§], Ghemrawi R, Clément-Duchêne C**,** Guéant JL, Namour F. **Phosphorylation at serine 228 prevents formation of CARM1/PRMT1 heterodimer in H1299 and Caco-2/TC7 cells.** *Soumis à PNAS en février 2014.*
[§] equal contribution

Communication affichées

Melhem H, Billioud V, Hansmannel F, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. **Carence en donneurs de méthyles et stress du réticulum endoplasmique dans un modèle de colite expérimentale chez le rat.** *VIIIème journée Claude Huriet de la recherche médicale, Nancy, 24 Mai 2013* **(Prix Bernard Fortier : 2éme prix).**

Melhem H, Billioud V, Hansmannel F, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. **Carence en donneurs de méthyles et stress du réticulum endoplasmique dans un modèle de colite expérimentale chez le rat.** *Symposium de la vitamine B12, Nancy, 20-22 Septembre 2012.*

Melhem H, Billioud V, Hansmannel F, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. **Carence en donneurs de méthyles et stress du réticulum endoplasmique dans un modèle de colite expérimentale chez le rat.** *Doctoriales, Ventron, 7-12 Avril 2013.*

Communication orales

Melhem H, Hansmannel F, Battaglia-Hsu S**,** Bressenot **A,** Billioud V, Alberto J-M, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. **Carence en donneurs de méthyles et stress du réticulum endoplasmique dans un modèle de colite expérimentale chez le rat.** *JFHOD, Paris, 20 Mars 2014.*

Melhem H, Hansmannel F, Bressenot A**,** Battaglia-Hsu S**,** Billioud V, Alberto J-M, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. **SIRT1 protège de la colite en modulant le stress du réticulum endoplasmique induit par une carence en donneurs de méthyles.** *IXème journée Claude Huriet de la recherche médicale, Nancy, 24 Mai 2014.* **(Prix Bernard Fortier : 2éme prix).**

LISTE DES ABREVIATIONS

5’d Ado : 5’- désoxyadénosyl

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

ABCD4 : ATP-binding cassette (ABC) transporter D4

ADN : Acide désoxyribonucléique

AdoCbl : Adénosylcobalamine

Adox : Adenosine dialdehyde

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

Ca2+: Calcium

Caco-2 : Colon carcinoma

Cbl : Cobalamine

Cbl-IF : Complexe cobalamine-facteur intrinsèque

CBS: Cystathionine β-synthase

CD: Crohn's Disease

CD320: Cluster of differentiation 320

CDM: Carence en donneurs de méthyle

CH3: Groupement méthyle

CHOP : CEBP HOmologous Protein

CNCbl : Cyanocobalamine

CPA: Cellules présentatrices d’antigènes

DAI: Disease Activity Index

DHF: Dihydrofolate

DHFR : Dihydrofolate reductase

DMB : diméthylbenzimidazole

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DSS: Dextran Sulfate Sodium

dTMP: désoxytymidine-monophosphate

dUMP: Désoxyuracile-monophosphate

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

FAD: Flavine-adénosine dinucleotide

FGCP: folylpolyglutamate carboxypeptidase

FOXO3: Forkhead box family protein 3

FR: Folate receptor

GCN2: General Control Nonderepressible 2

GH: γ-glutamyl hydrolase

GLUT2: Glucose transporter 2

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

GRP94: Glucose-regulated protein 94

GSH: Glutathion

GSSG: Glutathion oxydé

H: Haptocorrine

Hcy: Homocystéine

HIC1: Hypermethylated in cancer 1

HRI: Heme Regulated Inhibitor

HSF1: Heat Shock Factor 1

HSP27: Heat Shock Protein 27

HSP90: Heat Shock Protein 90

IBD: Inflammatory Bowel Disease

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

MeCbl: Méthylcobalamine

MEF: Mouse Embryonic Fibroblast

Méthylmalonyl CoA mutase : Méthylmalonyl Coenzyme A mutase

MMC : Métabolisme des monocarbones

MS: Méthionine synthase

MSR : Méthionine synthase réductase

MTHFR : Méthylène tétra-hydrofolate réductase

MTR: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase

MTRR : 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase

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

N5-MeTHF : N5-méthyltétrahydrofolate

NAD : Nicotinamide-adénine-dinucléotide

NADP: Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate

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

PAF : Paraformaldehyde

PAS : Structure pré – autophagosomique

PBS: Phosphate- Buffered Saline

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

RIDD: Regulated Ire1-dependent degradation

ROS : Radicaux libres oxygénés

S1P: Site-1 Protease

S2P: Site-2 Protease

SAH: S-adénosylhomocystéine

SAHH: S-adénosylhomocystéine hydrolase

SAM: S-adénosylméthionine

SERCA: Sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-transport ATPase

S-FBP: Folate binding proteins solubles

SHMT: Sérine hydroxyméthyltransférase

SIR2: Silent information regulator 2

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

SRP: Signal recognition particule

SW48: Human colon adenocarcinoma

TCII: Transcobalamine II

TG: Thapsigargine

THF: Tétrahydrofolate

TO: Transcobalamine-oléosine

TRAF2: TNF receptor-associated factor 2

TS: Thymidylate synthase

UC: Ulcerative Colitis;

uORFs: Upstream open reading frames

UPR: Unfolded protein response

XBP1: X-box-binding protein 1

INTRODUCTION

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont un groupe d'affections idiopathiques incluant la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC). Ces maladies représentent un véritable problème de santé publique compte tenu de leur fréquence (3 millions en Europe et 200.000 en France) (Kappelman, Rifas-Shiman et al. 2007; Loftus, Loftus et al. 2007), leur coût de prise en charge (Nguyen, Tuskey et al. 2007; Sonnenberg and Chang 2008), leur pronostic à court et à long termes (Faubion, Loftus et al. 2001; Bernstein and Nabalamba 2006), leur retentissement sur la qualité de vie, et du handicap fonctionnel qu'elles engendrent (Peyrin-Biroulet, Cieza et al. 2012).

Les concepts actuels de la pathogénie des MICI suggèrent une interaction complexe entre des facteurs génétiques, nutritionnels et environnementaux, et le microbiote intestinal qui pourrait être modulé en fonction des déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones (MMC) (Peyrin-Biroulet, Rodriguez-Gueant et al. 2007; Xavier and Podolsky 2007). Le MMC est un réseau métabolique complexe, régi par un certain nombre de gènes, et qui nécessite des micronutriments tels que l'acide folique (vitamine B9) et la cobalamine (vitamine B12) pour fonctionner correctement. Un rôle essentiel du MMC est la synthèse de la S-adénosylméthionine (SAM), le donneur universel de groupements méthyle nécessaires pour des mécanismes épigénomiques qui régulent l'expression des gènes et déclenchent un stress cellulaire (Gueant, Caillerez-Fofou et al. 2013; Gueant, Namour et al. 2013). **Un dérèglement au niveau nutritionnel, métabolique ou génétique du MMC peut influencer la gravité de la pathogénie des MICI** (Peyrin-Biroulet, Rodriguez-Gueant et al. 2007). Des travaux antérieurs réalisés à l'INSERM U954 ont montré qu'une carence en donneurs de méthyle (CDM) aggrave les lésions gastriques et l'inflammation intestinale et conduit à des altérations de la barrière intestinale chez le rat (Bossenmeyer-Pourie, Blaise et al. 2010; Chen, Peyrin-Biroulet et al. 2011; Bressenot, Pooya et al. 2012; Bossenmeyer-Pourie, Pourie et al. 2013).

Il a été documenté que **le stress du réticulum endoplasmique (RE) joue un rôle important dans la pathogénie des MICI** (Bogaert, De Vos et al. 2011; Kaser, Flak et al. 2011). L'inflammation intestinale est liée à l'incapacité des trois voies de l' « Unfolded protein response » (UPR) (PERK, ATF6α, IRE-1α) à restaurer l'homéostasie dans l'épithélium intestinal. Certaines études mettent en évidence **l'implication de la carence en donneurs de méthyle dans la mise en place d'un stress du réticulum endoplasmique**.

La sirtuine 1 (SIRT1) est une désacétylase identifiée comme un facteur de répression transcriptionnelle au niveau des télomères et de l'ADN ribosomal (Ivy, Klar et al. 1986; Brachmann, Sherman et al. 1995; Smith and Boeke 1997) et sa surexpression prolonge la durée de vie des levures (Kaeberlein, McVey et al. 1999) et du ver *Caenohabditis elegans* (Tissenbaum and Guarente 2001). **Des études ont montré l'implication de SIRT1 dans l'homéostasie intestinale** (Cui, Jin et al. 2010; Singh, Singh et al. 2010). En outre, plusieurs études menées dans notre laboratoire ont montré **le rôle majeur de SIRT1 dans le stress du RE** : en effet il a été démontré qu'une CDM dans le cœur et le cerveau induit un stress du RE via une diminution de l'expression et de l'activité de SIRT1 provoquant une hyperacétylation du facteur de transcription HSF1 ("Heat Shock Factor Protein 1") et une diminution de l'expression des molécules chaperonnes (Garcia, Gueant-Rodriguez et al. 2011; Pooya, Blaise et al. 2012; Ghemrawi, Pooya et al. 2013).

Le projet que j'ai mené au cours de ma thèse repose sur l'hypothèse que l'aggravation de l'inflammation intestinale produite par la carence en donneurs de méthyles résulte en partie d'un stress du réticulum endoplasmique en réponse aux modifications épigénomiques via une dérégulation de l'expression de la désacétylase SIRT1.

J'ai prolongé mon travail de thèse en étudiant le rôle de deux arginines méthyle transférases, CARM1 et PRMT1, dans les cellules de carcinome colique Caco-2, compte tenu de l'implication de ces 2 protéines dans la régulation de l'expression de SIRT1 et de gènes impliqués dans l'inflammation et la prolifération cellulaire.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

PARTIE I

LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)

1) **Généralités, historique**

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) désignent des affections caractérisées par des lésions inflammatoires chroniques au niveau du tractus digestif. La maladie de Crohn (MC), la recto-colite hémorragique (RCH) sont les deux formes principales des MICI.

Selon la théorie actuellement admise, la pathogénie des MICI implique une dérégulation dans la muqueuse intestinale de la réponse immunitaire dirigée contre des éléments de la flore intestinale, chez des patients génétiquement prédisposés. Bien que la MC et la RCH présentent des phénotypes clinico-pathologiques similaires, ces deux pathologies diffèrent par la localisation de l'inflammation dans le tube digestif, et la nature des atteintes histologiques.

La MC fut découverte par Fabry en 1623 et décrite pour la première fois par Antoni Lesniowski en 1904. En 1932, après avoir décrit 14 cas d'une affection appelée « iléite terminale ou régionale » et localisée au niveau de la moitié terminale de l'iléon, le gastro-entérologue Burrill Crohn, donna son nom à cette pathologie. La RCH fut, elle, différenciée de la dysenterie bactérienne en 1859 par Samuel Wilks puis décrite par Arthur Hirst en 1931.

2) **Epidémiologie**

L'incidence des MICI varie de manière importante selon les pays (Shivananda, Lennard-Jones et al. 1996). Elle est plus élevée dans les pays du nord de l'Europe et en Amérique du Nord. Les incidences des MICI sont estimées à 0,5~17/100 000 dans les pays occidentaux (Bernstein and Nabalamba 2006). Les MICI sont moins fréquentes dans les pays asiatiques que dans les pays développés. L'incidence de la RCH (Jiang and Cui 2002; Ouyang, Tandon et al. 2005; Jiang, Xia et al. 2006; Lok, Hung et al. 2008) et de la MC (Leong, Lau et al. 2004) est toutefois en forte augmentation dans les pays asiatiques. Les MICI touchent aussi bien les hommes que les femmes. Cependant, la prévalence de la MC montre une discrète prépondérance chez la femme alors qu'aucune différence n'est observée suivant le sexe dans le développement d'une RCH.

3) **Les facteurs impliqués dans la pathogénie des MICI**

La pathogénie des MICI reste encore mal connue. Elle est complexe et probablement multifactorielle, faisant intervenir des facteurs génétiques, des anomalies de la réponse immunitaire et des facteurs environnementaux. Pour expliquer le développement des MICI, l'hypothèse communément admise serait une dérégulation de la réponse immunitaire muqueuse

dirigée contre des éléments de la flore intestinale, survenant chez des patients génétiquement prédisposés. Une dérégulation de la barrière intestinale est incriminée également dans la pathogénie des MICI. Celle-ci est composée de l'épithélium et de la couche de mucus qui forment une barrière physique entre les agents potentiellement pathogènes dans la lumière intestinale et les tissus de la paroi intestinale (Van der Sluis, De Koning et al. 2006).

a) Les facteurs génétiques

Des études épidémiologiques, portant sur des jumeaux, et sur les différences raciales et ethniques de la prévalence de la maladie, soulignent l'implication de facteurs génétiques dans la pathogénie des MICI. Récemment, des études d'association ont identifié de nombreux variants génétiques impliqués dans la prédisposition aux maladies inflammatoires de l'intestin (Tableau 1).

Chr	Position (hg19 (Mb))	SNP	Key Genes (+N additional in locus)
		Crohn's Disease	
1	78.62	rs17391694	(5)
1	114.3	**rs6679677**[§]	**PTPN22**[‖],**(8)**
1	120.45	rs3897478	ADAM30,(5)
1	172.85	**rs9286879**	**FASLG,TNFSF18,(0)**
2	27.63	**rs1728918**	UCN,(23)
2	62.55	rs10865331	(3)
2	231.09	**rs6716753**	SP140,(5)
2	234.15	**rs12994997**	**ATG16L1**[‖], **(8)**
4	48.36	rs6837335	(6)
4	102.86	rs13126505	(1)
5	55.43	rs10065637	**IL6ST,IL31RA,(1)**
5	72.54	rs7702331	(4)
5	173.34	rs17695092	CPEB4,(2)
6	21.42	rs12663356	(3)
6	31.27	**rs9264942**	(22)
6	127.45	rs9491697	(3)
6	128.24	**rs13204742**	(2)
6	159.49	**rs212388**	TAGAP,(5)
7	26.88[‡]	rs10486483	(2)
7	28.17	rs864745	CREB5,JAZF1,(1)
8	90.87	rs7015630	RIPK2,(4)
8	129.56	**rs6651252**	0
13	44.45	**rs3764147**	LACC1,(3)
15	38.89	rs16967103	**RASGRP1,SPRED1,(2)**
16	50.66[**]	**rs2066847**[§]	**NOD2**[‖], **(6)**
17	25.84	**rs2945412**	**LGALS9,NOS2,(3)**
19	1.12	**rs2024092**	GPX4,HMHA1,(20)
19	46.85[‡]	rs4802307	(9)
19	49.2	**rs516246**	FUT2, (25)
21	34.77	**rs2284553**	**IFNGR2,IFNAR1, (10)**

Chr	Position (hg19 (Mb))	SNP	Key Genes (+N additional in locus)
		Ulcerative Colitis	
1	2.5	rs10797432	**TNFRSF14, (10)**
1	20.15[**]	**rs6426833**	(9)
1	200.09	**rs2816958**	(3)
2	198.65	rs1016883	RFTN2,PLCL1,(7)
2	199.70[‡]	**rs17229285**	0
3	53.05	rs9847710	PRKCD,ITIH4,(8)
4	103.51	rs3774959	**NFKB1,MANBA,(2)**
5	0.59	rs11739663	SLC9A3,(8)
5	134.44	rs254560	(6)
6	32.595	**rs6927022**	(15)
7	2.78	**rs798502**	**CARD11, GNA12, (5)**
7	27.22[‡]	rs4722672	(14)
7	107.45[*]	**rs4380874**	DLD,(9)
7	128.57	**rs4728142**	**IRF5**[‖], **(13)**
11	96.02	rs483905	JRKL,MAML2,(2)
11	114.38	**rs561722**	FAM55A,FAM55D,(5)
15	41.55	rs28374715	(11)
16	30.47	rs11150589	**ITGAL,(20)**
16	68.58	rs1728785	ZFP90,(6)
17	70.64	rs7210086	(3)
19	47.12[‡]	rs1126510	CALM3,(14)
20	33.8	rs6088765	(11)
20	43.06	**rs6017342**	ADA,HNF4A,(9)

Tableau 1: Gènes de susceptibilité aux MICI (Jostins, Ripke et al. 2012).

Les modifications dans les gènes du système immunitaire inné, comme NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain protein 2, également connu sous le nom de CARD15), ATG16L1 (autophagy related 16-like protein 1), IRGM (immunity-related GTPase family, M) et LLRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) sont spécifiques de la maladie de Crohn et ne sont pas associés à la RCH. En revanche, plusieurs gènes impliqués dans la voie de l'IL-23, y compris IL23R (qui code une sous-unité essentielle de récepteur de IL-23), IL-12B (qui code la sous-unité p40 de IL-12 et IL-23) et STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) ont été associés à la fois à la maladie de Crohn et à la RCH. Le NKX2-3 (NK2 transcription factor related, locus 3) et HLA (Human leucocyte antigen) montrent également une association avec les deux maladies (Franke, Balschun et al. 2008). Enfin, un nouveau locus de susceptibilité ECM1 (Extracellular matrix protein 1) a été identifié récemment comme facteur de risque associé avec la RCH (Fisher, Tremelling et al. 2008).

En 2001, le premier gène de prédisposition à la maladie de Crohn, baptisé Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2 (NOD2) puis renommé Caspase activation recruitment domains 15 (CARD15) a été découvert (Hugot, Chamaillard et al. 2001). Environ 25-30% des gènes de susceptibilité de la MC peuvent être expliqués par les mutations du gène NOD2/CARD15, mais ces études n'ont pas trouvé d'association entre les mutations du gène NOD2/CARD15 et la RCH (Lesage, Zouali et al. 2002; Rosenstiel, Fantini et al. 2003).

La protéine NOD2 est un récepteur intracellulaire pour un composé de la paroi bactérienne, le muramyl-dipeptide, et est exprimé par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Paneth (Lesage, Zouali et al. 2002; Rosenstiel, Fantini et al. 2003). NOD2/CARD15 est impliqué dans l'identification d'un produit bactérien, le peptidoglycan- derived muramyl dipeptide (MDP). L'activation de NOD2 par le MDP met en jeu les voies du NF-κB (facteur nucléaire-κB) et des MAPKs (mitogenactivated- proteins-kinases) (Kobayashi, Chamaillard et al. 2005). Trois variants de type SNPs rares dans NOD2, Arg702Trp, Gly908Arg et Leu1007fsinsC (insertion de cytosine provoquant une rupture du cadre de lecture –frameshift- au niveau du résidu Leu1007) sont fortement associés à la susceptibilité à la maladie de Crohn. Dans les cellules mononuclées humaines primaires, chacun des trois principaux variants de NOD2 est associée à une diminution de l'activation de NF-κB en réponse à la stimulation MDP (Abraham and Cho 2006).

Les mécanismes qui sous-tendent la relation entre NOD2 et la maladie de Crohn restent mal connus. Une diminution significative de l'expression des α-défensines a été observée chez les patients atteints de la maladie de Crohn qui sont porteurs du variant de NOD2 (Wehkamp, Schmid et al. 2005; Yamamoto-Furusho, Barnich et al. 2006). La diminution de la clairance microbienne des muqueuses résultant d'une diminution de l'expression des défensines pourrait provoquer des changements dans la flore intraluminale et induire une vulnérabilité tout au long de la barrière épithéliale à l'infection par des agents pathogènes tels que *E. coli* adhérent-invasif et Mycobacterium paratuberculosis (Peyrin-Biroulet, Vignal et al. 2006).

Dans le gène ATG16L1, un SNP (Ala281Thr) est très significativement associé à la maladie de Crohn (Naser, Arce et al. 2012). ATG16L1 est membre d'une famille de gènes impliqués dans l'autophagie. Une mutation d'ATG16L1 aurait pour conséquence la réduction de la clairance des agents pathogènes. Il a été rapporté que l'expression de ATG16L1 par les cellules épithéliales intestinales est essentielle à l'efficacité de l'autophagie de *S. typhimurium* (Rioux, Xavier et al. 2007). Une observation intéressante a été celle de l'association de variants génétiques dans le gène IRGM avec la maladie de Crohn (Parkes, Barrett et al. 2007). Des expériences de knockdown de IRGM ont permis de montrer son rôle dans l'autophagie, et le contrôle de la charge en mycobactéries intracellulaires (Singh, Davis et al. 2006). Une étude récente a montré l'induction de l'autophagie par un mutant LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2), qui est fortement associé à la maladie de Crohn et aux gènes d'autophagie ATG16L1 et IRGM2-5 (Plowey, Cherra et al. 2008). Dans l'ensemble, les associations de SNPs dans NOD2, ATG16L1, IRGM et LRRK2 avec la maladie de Crohn, mais pas avec la RCH, indiquent que les modifications du devenir intracellulaire des bactéries constituent un élément central de la pathogenèse de la maladie de Crohn.

Plus récemment un nouveau gène IL23R associé aux MICI a été mis en évidence (Duerr, Taylor et al. 2006) en analysant plus de 300 000 polymorphismes génétiques dans une population d'Amérique du Nord. Le gène codant pour IL23R, le récepteur de l'IL-23, a été identifié comme étant associé à un moindre risque de MC et de RCH. IL-23 est composé des sous-unités p19 (IL23A, chromosome 12q13) et p40 (IL12B, chromosome 5q33). Le blocage par des anticorps spécifiques de p40 inhibe les voies de signalisation liées à IL-23 et IL-12, alors que des anticorps spécifiques de p19 inhibent seulement les voies liées à l'IL-23. Suite à l'engagement de l'IL-23R par IL-23, Janus kinase 2 (JAK2) est activé, ce qui conduit à l'autophosphorylation de JAK2 et la phosphorylation de l'IL-23R. Cela se traduit par l'homodimérisation et la translocation nucléaire

de STAT3. STAT3 joue un rôle central dans la différenciation des cellules Th17 (Parham, Chirica et al. 2002). Dans une méta-analyse des GWA (études d'association pangénomique) sur des cohortes européennes et nord-américaines, il a été montré une association de plus de 30 régions génomiques avec la maladie de Crohn (Barrett, Hansoul et al. 2008). Sur les trente régions, quatre (IL23R, IL12B, STAT3 et JAK2) ont un rôle dans la signalisation IL-23R. De plus, d'importantes associations de IL23R, IL12B et STAT3 ont été signalés dans la RCH (Fisher, Tremelling et al. 2008; Franke, Balschun et al. 2008). L'IL23 régule l'expression de l'IL17. L'IL17 stimule la sécrétion de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires par des fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules épithéliales et la production locale de IL17 va aboutir à l'activation des cellules inflammatoires (Yen, Cheung et al. 2006). L'IL23 peut contribuer à maintenir une inflammation chronique pathologique (Yen, Cheung et al. 2006).

Les gènes du HLA, situés dans la région MICI3 joue un rôle important dans l'immunité adaptative. Le lymphocyte T ne reconnaît que l'antigène associé aux produits du gène HLA. ECM1 est un gène candidat plausible pour la RCH: il code pour la protéine 1, une glycoprotéine exprimée dans le petit et le gros intestin, et il interagit avec la membrane basale et inhibe la matrix metalloproteinase 9 (Chan, Liu et al. 2007). ECM1 active fortement la voie de signalisation NF-κB. Une forte association entre le locus ECM1 et la RCH a été identifiée (Fisher, Tremelling et al. 2008).

b) Les facteurs environnementaux

L'augmentation du risque de MICI pour les Asiatiques migrant en Europe et inversement la diminution du risque chez les Européens migrant dans ce pays sont en faveur de l'existence de facteurs environnementaux impliqués dans la pathogénie des MICI (Yang, Loftus et al. 2001). L'absence de concordance totale chez les jumeaux monozygotes (Halfvarson, Bodin et al. 2003), l'agrégation familiale dans les MICI (Hugot, Alberti et al. 2003) sont autant d'éléments en faveur de l'intervention de facteurs d'environnement comme les microbes dans la genèse des MICI (Baumgart, Dogan et al. 2007).

Deux facteurs d'environnement ont un rôle établi: le tabac et l'appendicectomie. De nombreux autres facteurs d'environnement font l'objet de recherches actives. Il s'agit d'agents infectieux, alimentaires, du stress et de facteurs socio-économiques.

La consommation de tabac a un effet protecteur bien établi sur l'évolution de la RCH et un effet délétère sur l'évolution de la MC (Russel, Volovics et al. 1998).

Plusieurs études concordantes ont démontré qu'un antécédent d'appendicectomie avait un effet "protecteur" vis-à-vis de la RCH en réduisant le risque d'environ 70%. Cet effet "protecteur" ne s'observe que chez les malades opérés avant l'âge de 20 ans pour une authentique appendicite (Andersson and Sjodahl 2001). L'effet bénéfique de l'appendicectomie sur le cours évolutif d'une RCH déjà diagnostiquée n'est pas démontré, mais des observations suggèrent qu'une appendicectomie pourrait permettre d'obtenir une amélioration de l'évolution dans les formes sévères de RCH résistantes au traitement médical (Okazaki, Onodera et al. 2000). La réalisation d'une appendicectomie est associée à un effet protecteur de la MC (Russel, Dorant et al. 1997).

Plusieurs agents infectieux ont été incriminés dans la genèse des MICI : le virus de la rougeole, le CMV, *Listeria monocytogenes, Chlamydia trachomatis, Escherichia coli, Helicobacter pylori, Mycobacterium paratuberculosis, Saccharomyces cerevisiae*. Mais les rôles de *Mycobacterium paratuberculosis* et d'autres agents pathogènes restent très discutés.

Les aliments ont également été proposés comme potentiellement impliqués dans la pathogénie des MICI. Il a été rapporté que les légumes, les fruits, le poisson, les fibres et les acides gras ω-3 à longues chaînes protègent contre la MC (Amre, D'Souza et al. 2007). Les acides gras saturés augmentent l'activation de NF-κB par Toll-like receptor (TLR), et cette activation est inhibée par acide gras ω-3 (Lee, Zhao et al. 2004). Les ω-3 acides gras polyinsaturés produisent les médiateurs anti-inflammatoires comme LTB-5 et Prostaglandine 3 (Plat and Mensink 2005). Ces pistes n'ont pour l'instant pas été confirmées.

L'hypothèse de l'hygiène permet d'intégrer les facteurs d'environnement aux données connues de la physiopathologie des MICI. Une amélioration des conditions d'hygiène, notamment au cours de l'enfance, est souvent émise pour expliquer l'augmentation de l'incidence des MICI dans les pays en voie de développement et l'augmentation de l'incidence des MICI depuis la dernière guerre (Klement, Lysy et al. 2008).

c) Les facteurs immunitaires

Le système immunitaire inné représente une défense non spécifique contre les pathogènes. L'implication d'un déficit immunitaire inné au cours de la MC a été soulignée par l'identification

de NOD2 et TLR comme des gènes de susceptibilité de la MC (Lesage, Zouali et al. 2002; Rosenstiel, Fantini et al. 2003; Pierik, Joossens et al. 2006).

Jusqu'à présent, plus de 11 TLRs, 23 NODs, quelques ''C-type lectin-like molecules'' et ''β - glucan receptors'' ont été identifiés. Il a été montré que NOD2 régule l'expression de certains peptides antimicrobiens comme les défensines dont l'expression est diminuée au cours de la MC, ce qui contribuerait au défaut d'élimination des microbes (Wehkamp, Schmid et al. 2005).

Ces anomalies du système immunitaire inné sont associées à une rupture de tolérance et donc à une inflammation intestinale qui entraînera une activation excessive du système adaptatif qui va être responsable des lésions intestinales. Cette réponse immunitaire spécifique est médiée par différents types cellulaires résidant dans la paroi intestinale ou recrutés lors du développement d'une inflammation : les lymphocytes B muqueux produisant des immunoglobulines G et A, différentes sous-populations de lymphocytes T de phénotype Th1, Th2 ou Th17, et les lymphocytes T/B régulateurs (Xavier and Podolsky 2007). Classiquement, la MC est considérée comme étant de phénotype Th1, et la RCH comme étant de phénotype Th2.

Récemment, des études suggèrent un chevauchement plus complexe et plus significatif entre RCH et MC. Une nouvelle lignée de lymphocytes T CD4 au phénotype Th17 a été mise en évidence et impliquée dans la pathogénie des MICI. Le développement du phénotype Th17 est favorisé par IL23 et est inhibé par des cytokines favorisant les phénotypes Th1 et Th2 (Kastelein, Hunter et al. 2007). Enfin, d'autres types cellulaires que sont les lymphocytes T régulateurs produisant IL-10 et/ou le ''transforming growth factor-beta'' (TGF-β) sont également nécessaires au maintien d'une homéostasie intestinale chez l'homme.

PARTIE II

DONNEURS DE METHYLE ET CYCLE DES MONOCARBONES

Métabolisme des monocarbones et cycle de l'homocystéine - de la méthionine

1) **Les substrats**

a) **La méthionine**

La méthionine (Figure 1) est un acide-α-aminé soufré non polaire. Elle est caractérisée par la présence d'un groupement méthyle attaché à un atome de soufre situé dans sa chaîne latérale. Son atome de soufre participe à une fonction thioester (-SCH3).

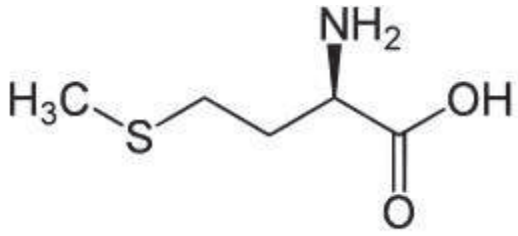


Figure 1 : Structure chimique de la méthionine.

La méthionine joue un rôle essentiel dans la synthèse des protéines. Des grandes quantités de cet acide aminé sont utilisées pour la synthèse de la SAM qui est catalysée par la méthionine adénosyltransférase (MAT) (Kotb and Geller 1993; Mato, Alvarez et al. 1997).

b) **La S-adénosylméthionine**

La SAM (Figure 2) est le donneur de méthyle biologique universel libéré dans le cytosol de chaque cellule. Le foie joue un rôle central dans l'homéostasie de la SAM. En effet, le foie est le site majeur de sa synthèse et de sa dégradation (Mato and Lu 2007).

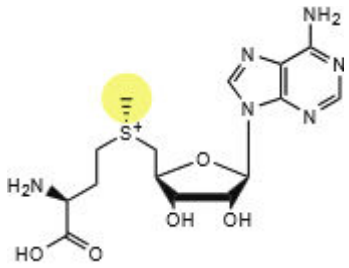


Figure 2 : Structure chimique de la SAM.

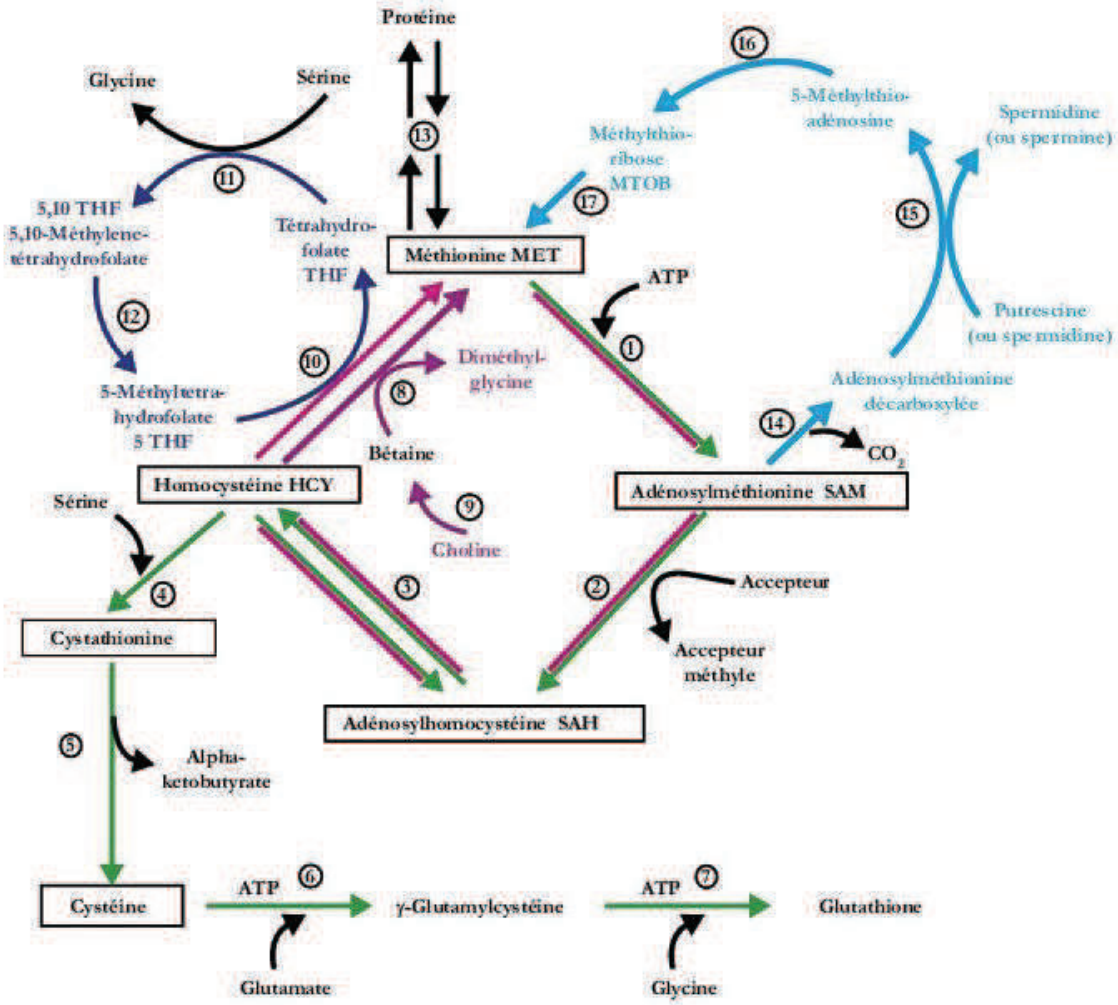


Figure 3 : Voies métaboliques de la méthionine et de l'homocystéine (Durando, Thivat et al. 2008). *Les chiffres représentent les réactions et séquences suivantes : **1)** méthionine adénosyltransférase, **2)** réactions de transméthylations dépendantes de l'adénosylméthionine, **3)** adénosylhomocystéinase, **4)** cystathionine- b-synthase, **5)** g-cystathionase, **6)** g-glutamylcystéine, 7) GSH synthétase, **8)** bétaïne-homocystéine méthyltransférase BHMT, **9)** choline dehydrogénase plus bétaïne aldéhyde déhydrogénase, **10)** méthylfolate-homocystéine méthyltransférase (méthionine synthase), **11)** sérine-hydroxyméthylase, **12)** méthylènetétrahydrofolate réductase MTHFR, **13)** équilibre entre méthionine libre et liée aux protéines, **14)** adénosylméthionine décarboxylase, **15)** spermidine (et spermine) synthases, **16)** méthylthioadénosine phosphorylase (MATP) et **17)** conversion de méthylthioribose-1-phosphate en méthionine. Les fonctions biologiques de la méthionine et de l'homocystéine sont illustrées dans le schéma : a) maintien du taux de méthionine, b) conversion de la cystéine et de ses dérivés via la voie de transsulfuration, c) recyclage des folates à partir du méthyltetrahydrofolate, d) catabolisme de la choline qui requiert la bétaïne homocystéine méthyltransférase, e) synthèse des polyamines et voie de sauvegarde de la méthionine.*

Environ 50 % des apports quotidiens de la méthionine sont convertis en SAM dans le foie et près de 85% de toutes les réactions de méthylations y prennent place (Mudd and Poole 1975). Les méthyltransférases catalysent les réactions de transméthylations durant lesquelles la SAM donne son groupement méthyle à une grande variété de molécules (ADN, lipides, protéines…) formant ainsi la S-adénosylhomocystéine.

c) La S-adénosylhomocystéine

La transméthylation génère de la S-adénosylhomocyctéine (SAH) qui est ensuite hydrolysée pour former l'Homocystéine (Hcy) et l'adénosine. Cette réaction est catalysée par la SAH-hydrolase (SAHH). 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.

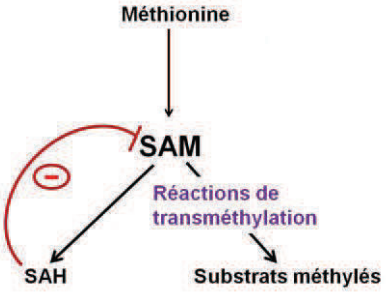


Figure 4 : La SAH est un inhibiteur des réactions de méthylation.

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 défauts de méthylations impliqués dans la formation de cancers (Poirier, Grantham et al. 1977; Shivapurkar and Poirier 1983). De plus, cette diminution pourrait accélérer le processus de neurodégénérescence (Liu, Wilson et al. 2000; Duan, Ladenheim et al. 2002).

d) L'homocystéine

L'homocystéine (Hcy) (Figure 5) est un acide aminé soufré formé après la déméthylation de la méthionine. L'Hcy est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. L'Hcy est un acide aminé non protéinogène, c'est-à-dire qu'il n'est pas incorporé dans la synthèse des protéines. Son rôle est de servir d'intermédiaire dans le métabolisme de la méthionine.

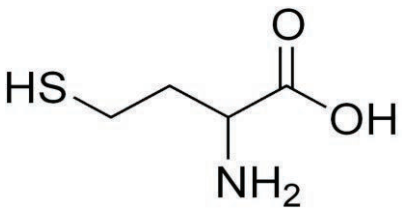


Figure 5 : Structure chimique de l'homocystéine.

2) Les voies métaboliques de l'homocystéine

L'Hcy est située à un carrefour métabolique car elle peut être prise en charge d'une part par des voies de méthylation pour former de la méthionine et d'autre part, par la voie de la transsulfuration pour former la cystathionine.

Ces deux voies sont coordonnées par la S-adénosylméthionine (SAM) qui agit comme un inhibiteur allostérique de la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) et comme un activateur de la cystathionine-β- synthase (CBS) (Selhub 1999).

a) La voie de méthylation de Hcy en Méthionine et cycle de la méthionine

Au cours de la méthylation, l'homocystéine acquiert un groupement méthyl à partir du N-5-méthyltétrahydrofolate (MTHF) ou de la bétaïne pour former la méthionine. La réaction avec le N-5- MTHF se déroule dans tous les tissus. Elle est catalysée par la méthionine synthase. Cette voie de méthylation dépend de la biodisponibilité de deux classes de donneurs de méthyles : les folates (dont le N-5-MTHF) et la vitamine B12 qui constitue un cofacteur indispensable à l'action de la méthionine synthase. La réaction de méthylation utilisant comme substrat la bétaïne a lieu essentiellement dans le foie et ne dépend pas de la vitamine B12 (Selhub 1999).

Une proportion considérable de méthionine est par la suite activée par l'ATP pour former la SAM qui est le donneur de méthyle universel pour une variété d'accepteurs. Cette réaction s'accompagne de la formation de la SAH qui sera ensuite hydrolysée pour régénérer de l'homocystéine qui devient de nouveau disponible pour un nouveau cycle de transfert du groupement méthyl. Il est important de noter que cette hydrolyse est une réaction réversible qui favorise la synthèse de la SAH et que des concentrations intracellulaires élevées de ce métabolite accompagnent souvent toutes les formes d'hyperhomocystéinémie (Selhub 1999).

b) La transsulfuration

L'Hcy a tendance à s'accumuler dans le sang et les tissus (Franken, Blom et al. 1996). Afin de dégrader cet acide aminé toxique, la cellule a besoin d'une réaction catalytique irréversible : « la transsulfuration ». Dans cette voie, l'homocystéine s'associe à la sérine pour former la cystathionine au cours d'une réaction irréversible catalysée par la Cystathionine β-synthase (CBS), puis 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 qui est la forme active de la vitamine B6. Sachant que la cystéine formée donnera le

glutathion (régulateur intracellulaire du statut redox), la voie de la transsulfuration est surtout active dans les tissus nécessitant une forte concentration de glutathion (comme les neurones) (Dringen and Hamprecht 1999).

3) Classifications des hyperhomocystéinémies

Un excès d'Hcy dans le sang constitue un facteur de risque pour certaines pathologies. L'organisme humain synthétise environ 20 mmoles d'Hcy par jour. Trois classes d'Hyperhomocystéinémie (hHcy) sont distinguées en fonction du niveau plasmatique d'Hcy (Tableau 2).

Hyperhomocystéinémie sévère (Taux plasmatique >100 µM)

- Taux élevés d'homocystéine en permanence ;
- Causes : Déficit des enzymes CBS, MTHFR, ou des enzymes impliquées dans le métabolisme des vitamines B12.

Hyperhomocystéinémie modérée (16 < [Hcy] <30 µM) & intermédiaire (31<[Hcy]<100µM)

- Hyperhomocystéinémie à jeun modérément élevée ;
- Reflète une altération de la méthylation de l'homocystéine ;
- Causes : déficit en folate, en B12 ou déficit enzymatique modéré : ex. MTHFR thermolabile.

Hyperhomocystéinémie après test de charge en méthionine

- Augmentation anormale de l'homocystéine après test de charge de méthionine ;
- Altération de la voie de la transsulfuration de l'homocystéine (statut hétérozygote pour la CBS, déficit en vitamine B6).

Tableau 2 : Classification des hyperhomocystéinémies (d'après Cheng et al., 2009).

a) Hyperhomocystéinémie sévère

Les cas les plus sévères d'hyperhomocystéinémie sont dus, dans la plupart des cas, à des mutations homozygotes des gènes codant pour les enzymes du métabolisme de l'homocystéine (Tableau 2). Dans ces cas, le déficit impliquant une enzyme de la voie de la reméthylation ou de la transsulfuration entraine une augmentation majeure de l'homocystéinémie et de l'homocystéinurie. La forme classique de ce désordre — l'homocystéinurie congénitale— est causée par une mutation dans le gène codant pour la CBS (Selhub 1999). Chez ces patients, l'homocystéinémie plasmatique à jeun peut atteindre 400 µmol/L. Des déficits homozygotes sur d'autres gènes peuvent entraîner des élévations similaires et incluent les mutations du gène codant pour MTHFR ou toute autre enzyme participant à la synthèse de la méthylcobalamine (Kang, Zhou et al. 1988; Takenaka, Shimomura et al. 1993).

b) Hyperhomocystéinémie modérée

Les causes les plus fréquentes d'hyperhomocystéinémie, responsables des formes modérées, sont les résultats d'altération du métabolisme de l'Hcy, soit par des déficits qui ne suppriment pas totalement l'activité enzymatique, soit par apport inadéquat des vitamines impliquées dans ces métabolismes (Vitamines B6, B9 et B12) (Tableau 2).

L'impact sur l'homocystéine plasmatique chez les patients dépend de la voie métabolique perturbée (Selhub and Miller 1992).

Une altération de la voie de la reméthylation, même si elle est minime, entraînera une augmentation substantielle de l'homocystéinémie. Une telle altération peut être causée par un statut déficient en folates ou en vitamine B12 ou à un déficit sur l'enzyme MTHFR (Stabler, Marcell et al. 1988; Selhub and Miller 1992; Dudman, Wilcken et al. 1993).

En cas d'altération de la voie de transsulfuration, l'augmentation de l'homocystéine plasmatique sera au contraire modérée. Cette altération peut être provoquée par un déficit hétérozygote de l'enzyme CBS ou par un apport inadéquat en vitamine B6 et elle sera identifiée par une augmentation anormale de l'homocystéine après un test de charge en méthionine ou en postprandial (Park and Linkswiler 1970; Miller, Ribaya-Mercado et al. 1992; Miller, Nadeau et al. 1994).

c) Carences vitaminiques et hyperhomocystéinémie

L'association indépendante entre les nutriments et la concentration plasmatique d'homocystéine a été étudiée dans une cohorte bien établie, la Framingham Heart Study (Selhub, Jacques et al. 1993). Après ajustement pour l'âge, le sexe, et les autres vitamines, le taux plasmatique d'homocystéine était significativement associé et de façon non linéaire au taux de folates plasmatiques. Les taux les plus bas d'homocystéine étaient observés pour des concentrations de folate autour de 10 nmol/L ou plus. La concentration plasmatique d'homocystéine était faiblement associée à la concentration en vitamine B12 et au pyridoxine 5'-phosphate (Selhub, Jacques et al. 1993).

Carences en vitamines B9 et B12

Les données relatives à la relation entre le statut vitaminique et le taux plasmatique de l'homocystéine étaient rapportées initialement par Kang et al. qui ont démontré une relation inverse entre les taux d'homocystéine et de folate (Kang, Zhou et al. 1988). D'autres études ont

démontré une relation inverse entre les taux d'homocystéine et de vitamine B12 et ont rapporté l'efficacité de la supplémentation vitaminique sur la réduction et la normalisation du taux plasmatique de l'homocystéine (Naurath, Joosten et al. 1995; Joosten, Lesaffre et al. 1997; Kostulas, Crisby et al. 1998). Dans ces dernières études, la supplémentation en folate et en vitamine B12 réduit l'homocystéinémie plasmatique à jeun.

Dans des modèles animaux, l'homocystéinémie augmente chez le rat carencé en folate (x8 à 10 fois) et chez le rat carencé en vitamine B12 (x2,5) (Selhub 1999). Chez le rat carencé en folate, on retrouve la relation inverse entre la concentration plasmatique de l'homocystéine et la concentration intracellulaire de la SAM (Miller, Nadeau et al. 1994). Par ailleurs, une diminution et une normalisation du taux plasmatique d'homocystéine sont observées chez les rats carencés en folate suite à une injection intra-péritonéale d'ethionine (un analogue de la méthionine). Cette diminution est probablement liée à la S-adénosylethionine, qui comme la SAM est un activateur puissant de la CBS mais qui est moins déméthylée et métabolisée en homocystéine (Finkelstein and Martin 1984). L'activation par la S-adénosylethionine a réintroduit la coordination entre les deux voies de méthylation et de transsulfuration initialement interrompue par la carence en folate du fait de la diminution de la synthèse de la SAM.

Carences en vitamine B6

La vitamine B6 n'est efficace que dans la réduction du taux plasmatique d'homocystéine après un test de charge en méthionine (Selhub 1999). La supplémentation en vitamine B6 ne réduits l'homocystéinémie plasmatique à jeun.

L'utilisation de modèles animaux montre que l'homocystéinémie n'est pas augmentée chez le rat carencé en vitamine B6 (Miller, Ribaya-Mercado et al. 1992). Ceci contraste avec ce qui est observé chez le rat carencé en folate (Miller, Nadeau et al. 1994). Toutefois, un gavage par voie orale en méthionine provoque une augmentation de la concentration en homocystéine plasmatique avec une élévation significative de la concentration hépatique en SAM chez le rat carencé en vitamine B6.

d) Autres facteurs contrôlant le taux plasmatique de l'homocystéine

Chez les hommes, le taux plasmatique de l'homocystéine est plus élevé que chez les femmes. Des altérations de la fonction rénale, un tabagisme actif, la consommation de café, d'alcool, et de certaines drogues incluant les antagonistes des folates, le monoxyde d'azote, et la L-DOPA ont été associés des taux élevés d'homocystéinémie (Refsum, Ueland et al. 1998).

4) Les donneurs de méthyle alimentaires

4.1) Les folates (vitamine B9)

a) Définition

L'acide folique, nommé aussi acide ptéroylmonoglutamique, est une vitamine hydrosoluble. Le terme « folique » tire sa racine du mot feuillage, à cause de l'abondance de la vitamine B9 dans les végétaux foliacés. Les folates facilitent le transfert des unités mono-carbonées à partir de multiples biomolécules vers des nombreuses réactions biosynthétiques telles que la synthèse de purine et de pyrimidine, la synthèse de la méthionine à partir de l'Hcy (Bottiglieri 2005).

b) Structure chimique

Chimiquement, l'acide folique est composé de trois structures chimiques distinctes : le 6-méthylptérine et l'acide para-aminobenzoïque (PABA) s'associent pour former l'acide ptéroïque qui interagit avec l'acide glutamique (Figure 6).

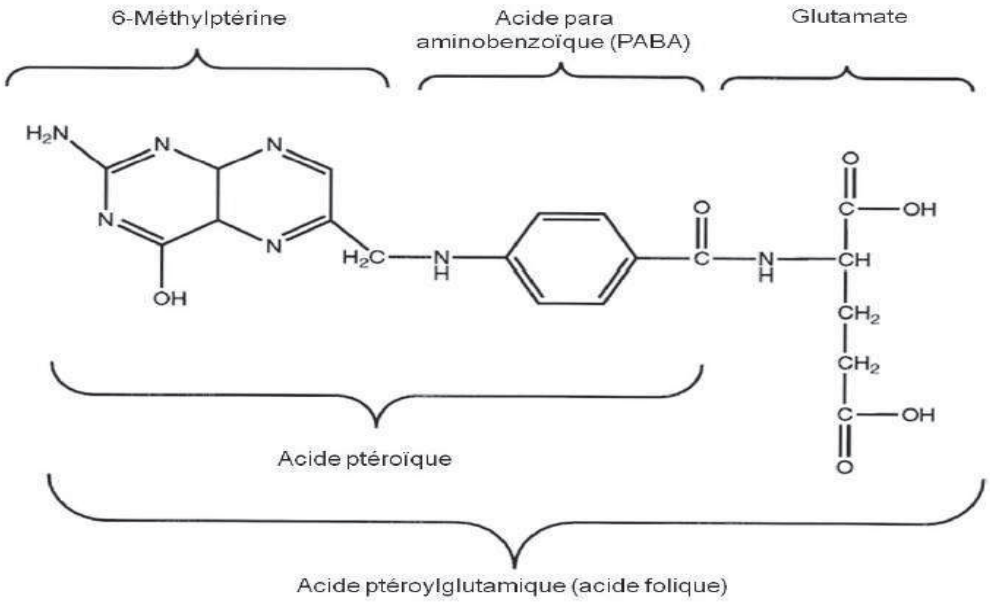


Figure 6 : Structure chimique de la vitamine B9.

La majorité des folates présents dans l'alimentation sont sous forme de ptéroylpolyglutamates contenant un enchaînement de plusieurs acides glutamiques. Afin d'être métaboliquement actif, l'acide folique doit être réduit par la dihydrofolate réductase, une enzyme qui fixe d'abord 2, puis 4 atomes d'hydrogène sur la molécule pour former le tétrahydrofolate (THF) et ses dérivés.

Ils sont les formes biologiquement actives de l'acide folique. Ces dérivés sont des co-substrats de nombreuses enzymes dont certaines impliquées dans le métabolisme des monocarbones. Les principaux dérivés méthylés de folates sont le N10-formyl tétrahydrofolate et le N5, N10-méthyléne tétrahydrofolate (5,10-MTHF). Ils sont des donneurs de groupements méthyles pour la synthèse des nucléotides. Un autre dérivé important biologiquement actif de l'acide folique est le N5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) produit à partir de 5,10-MTHF, la réaction étant catalysée par la méthylènetétrahydrofolate réductase (Bhaskar, Murthy et al. 2011), ainsi la méthionine synthase (MS) utilise le groupement méthyl pour la reméthylation de l'Hcy en méthionine.

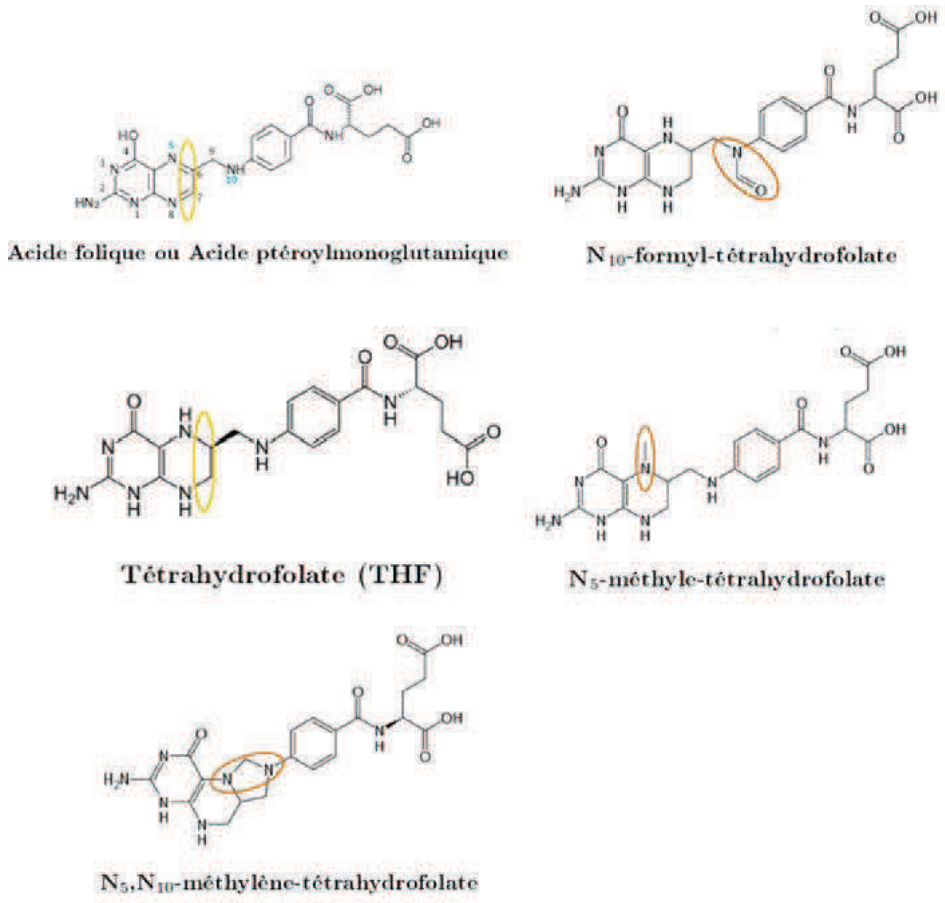


Figure 7: Les différentes structures chimiques de la vitamine B9. *Les cercles orange soulignent les modifications sur les atomes 5 et/ou 10. Le cercle jaune souligne la différence entre la forme oxydée et la forme réduite de l'acide folique.*

c) Histoire

C'est en 1930 que les propriétés physiologiques de l'acide folique ont été découvertes, quand une équipe des chercheurs ont observé que l'anémie mégaloblastique pouvait être traitée par l'ajout d'extraits de levures ou de foie au régime des patients (Wills 1931). Le développement d'essais biologiques basés sur la croissance des *Lactobacillus casei et Streptococcus faecalis* a permis l'isolement et, finalement, l'identification structurale de l'acide folique (Angier, Boothe et al. 1945).

d) Nutrition

L'apport en folates est exclusivement alimentaire. En effet, l'organisme est dans l'incapacité de synthétiser les folates, pour cela leur apport alimentaire est nécessaire. Ils sont synthétisés par les microorganismes et les plantes. Les légumes à feuilles (épinards, laitue, le brocoli), les haricots, les fruits (par exemple, bananes, melons, citrons), la levure, les champignons, et des protéines animales (par exemple, des protéines présentes dans le foie et les reins) sont de riches sources d'acide folique. Cependant, la teneur de cette vitamine diminue au cours d'une cuisson dépassant 15 min (la dégradation pouvant atteindre une proportion de 95 %).

Les besoins en folates varient en fonction de l'âge, du sexe et de l'état physiologique. Le Tableau 3 donne recommandations journalières en folates.

Catégorie	ANC 2001 (µg/jours)
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
Personnes âgée de plus de 75 ans	330-400
Femmes enceintes	400
Femmes qui allaitent	400

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

e) Absorption

Les folates contenus dans l'alimentation, qui sont sous forme de ptéroylpolyglutamate (PteGlun), sont moins bien absorbés que le ptéroylmonoglutamate (PteGlu ; acide folique). Chez l'homme, la déconjugaison des polyglutamates se fait grâce à l'enzyme Folyl-γ-Glutamyl Carboxypeptidase (FGCP) (EC 3.4.19.9) qui est présente dans la bordure en brosse de l'intestin grêle. Cette enzyme a une activité maximale à un pH de 5,5 en présence du zinc. Au niveau du jéjunum, les folates transformés en monoglutamates, sont absorbés par un processus de transport saturable pH dépendant (Rosenberg 1990). Ils sont ensuite transformés en N5-méthylTHF qui traverse la barrière intestinale grâce à un système de transporteurs spécifiques et passe dans le sang portal (Rosenberg 1990).

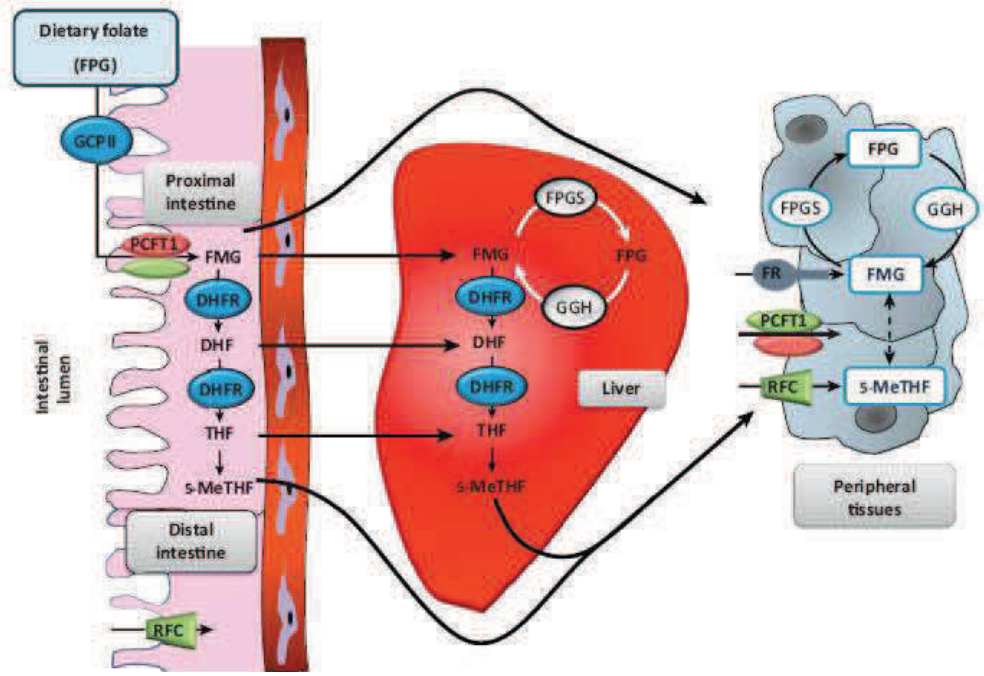


Figure 8 : Absorption et distribution des folates dans le foie et les tissus périphériques (Gueant, Namour et al. 2013). *L'absorption des folates se fait au niveau du jéjunum, après hydrolyse en monoglutamate. C'est sous cette forme qu'ils traversent la barrière intestinale pour être acheminés vers 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.*

f) Transport des folates

o Transport plasmatique

Le taux plasmatique normal en folates est maintenu par l'apport alimentaire. On les retrouve principalement sous la forme de N5-méthylTHF monoglutamate. Les folates plasmatiques sont liés soit à des protéines de faible affinité (principalement l'albumine (Picciano, Stokstad et Gregory 1990)) soit à une protéine ayant une plus haute affinité : la « Folate Binding Protein » (FBP). Cette protéine est identique à la protéine ancrée dans la membrane cellulaire par un résidu glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Fernandes-Costa and Metz 1979). Fixés sur l'albumine, les folates sont transportés vers certains tissus comme le placenta et le fœtus, alors que fixés sur le FBP, ils sont transportés vers le foie, qui forme une réserve majoritaire de la quantité totale de folate de l'organisme (50% du stock de l'organisme).

o Transport cellulaire

Le transport des folates implique la translocation du ligand dans la cellule à partir du compartiment extracellulaire (mécanismes de capture cellulaire) ou à travers les barrières cellulaires d'un compartiment vers l'autre (mécanismes transcellulaires) (Antony 1996). Ceux-ci impliquent 3 types de transporteurs.

Reduced folate carrier (RFC) - transporteur des folates réduits

RFC facilite le passage transmembranaire de composés anioniques, dont les folates, qui diffuseraient très lentement à travers la membrane lipidique. C'est un transporteur qui a une faible affinité pour l'acide folique mais il a une affinité élevée pour les folates réduits. Ce mécanisme de capture cellulaire des folates implique un processus de transport pH et énergie-dépendant qui transporte les folates réduits (Sirotnak and Tolner 1999).

RFC est exprimé dans les reins, dans la surface apicale du compartiment sanguin du plexus choroïde, dans les axones et les dendrites et dans la membrane apicale des cellules bordant le canal rachidien (Wang, Zhao et al. 2001). Au niveau de l'intestin grêle et du colon, RFC est exprimé dans les membranes apicales de la bordure en brosse (Wang, Zhao et al. 2001).

Folate receptors (FRs) - récepteurs des folates

Ces transporteurs permettent l'internalisation des folates dans des nombreux tissus : cortex, placenta, glandes salivaires, utérus, pancréas, glandes bronchiques, alvéoles pulmonaires. Ils ont été également retrouvés dans certaines lignées de cellules tumorales, Caco-2 (colon carcinoma),

les cellules KB (epidermoid carcinoma) (Antony, Kane et al. 1985; Kane, Elwood et al. 1986), et IGROV1 (ovarian carcinoma) (Weitman, Weinberg et al. 1992). La capacité de liaison des folates aux FRs est diminuée lorsque le stock d'ATP n'est pas régénéré ou en l'absence d'ions Cl^- ou lorsque le pH est inférieur à 5 (Spinella, Brigle et al. 1995).

Proton-coupled folate transporter (PCFT)

Après l'entrée des folates dans la cellule par endocytose, le transporteur PCFT aide à exporter les folates du milieu acidifié de l'endosome vers le cytoplasme des cellules ainsi que vers le liquide céphalo-rachidien (Zhao, Diop-Bove et al. 2011). 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, Jansen et al. 2006; Zhao, Matherly et al. 2009). PCFT permet lui aussi le transport des folates avec, une activité optimale à pH bas (Qiu, Jansen et al. 2006).

g) Stockage et élimination

Les folates sont principalement stockés dans le foie qui contient la moitié des réserves de l'organisme. Le reste est essentiellement contenu dans les globules rouges, n'est pas échangeable mais peut être récupéré lors de leur destruction (Herbert 1962). Une proportion importante des folates intracellulaires est associée à la mitochondrie. Les autres organes contenant des folates sont les tissus à renouvellement rapide, essentiellement la moelle osseuse et les épithéliums, buccal, digestif, vaginal. Les réserves de folates sont relativement faibles, estimées entre 5 et 15 mg compte tenu des besoins quotidiens et s'épuisent en 4 mois en moyenne (Herbert 1962). Les folates sont ensuite filtrés par le glomérule et finalement réabsorbés au niveau du tubule proximal. Les folates en excès sont éliminés dans les urines.

h) Rôles des folates

Les dérivés monoglutamiques des folates sont impliqués dans plusieurs fonctions dans l'organisme :

Synthèse de la méthionine : la vitamine B9 a une fonction importante de détoxification de l'homocystéine en méthionine. Cette réaction est catalysée par la méthionine synthase qui assure le transfert du groupement méthyle du N5-MeTHF vers l'homocystéine. Cette réaction aboutit à la régénération du THF et à la formation de la méthionine.

La synthèse des acides nucléiques : la synthèse de la thymidylate et donc de l'ADN est une réaction catalysée par la thymidylate synthase ayant le N5,10-MeTHF comme coenzyme

(Carreras and Santi 1995). Egalement le N5,10-MeTHF et le N10-formylTHF forment les 2ème et 8ème atomes de carbone du noyau purine.

La synthèse des acides aminés : la transformation du THF en N5,10-MeTHF est une réaction nécessaire pour la conversion de l'histidine en acide glutamique.

La conversion sérine-glycine : c'est une réaction catalysée par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) pour donner la glycine et le 5-formylTHF à partir de la sérine (Matthews, Ross et al. 1982).

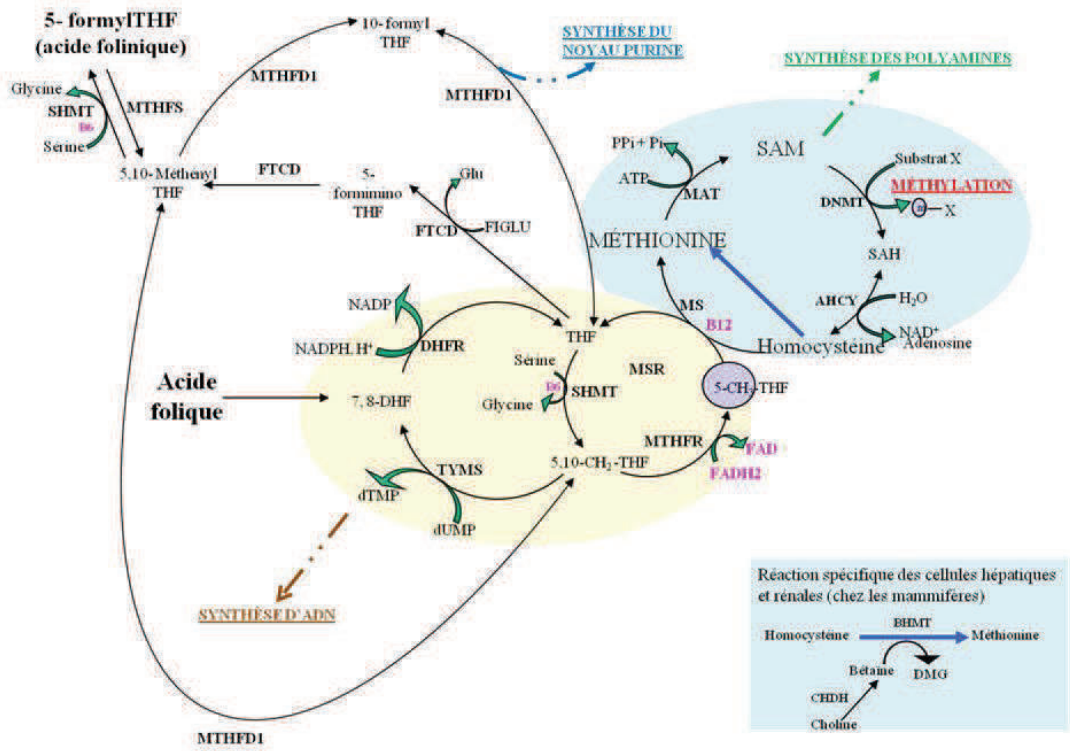


Figure 9 : Métabolisme des monocarbones et métabolisme de la méthionine. *Enzymes impliquées dans le métabolisme de la méthionine : MAT, méthionine adénosyltransférase ; DNMT, DNA méthyltransférases ; AHCY, S-adénosylhomocystéine hydrolase ; MS, méthionine synthase et MSR, méthionine synthase réductase. Enzymes impliquées dans le métabolisme des monocarbones : SHMT, sérine hydroxyméthyltransférase; MTHFD1, 5, 10-méthylèneTHF déshydrogénase, 5, 10-méthénylTHF cyclohydrolase et 10-formylTHF synthétase ; FTCD, Formiminotransférase et formiminocyclodésaminase ; DHFR, DHF réductase ; TYMS, thymidylate synthase ; MTHFR, 5, 10-méthylèneTHF réductase. Vitamines impliquées comme cofacteurs de ces métabolismes : B12, vitamine B12 ; B6, pyridoxine ; vitamine B2 sous la forme de FAD complètement réduit, FADH2. Autre molécule : FIGLU, formiminoglutamate.*

i) Carence en folates

La carence en folates entraîne de nombreux troubles comme l'anémie mégaloblastique, des malformations congénitales (*Spina Bifida* (van der Put and Blom 2000; Scott 2001), des troubles neurologiques, des maladies cardiovasculaires (Gerhard and Duell 1999; Ueland, Refsum 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.

Une nutrition occidentale équilibrée apporte des quantités adéquates en folates. A l'inverse l'apport en folates dans certains pays en voie de développement peut être insuffisant (Chakravarty and Sinha 2002; Misra, Vikram et al. 2002).

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

4.2) La vitamine B12 ou cobalamine

a) Définition

La vitamine B12, également appelée cobalamine (Cbl), est une vitamine hydrosoluble essentielle pour le maintien des fonctions hématologiques et neurologiques. A l'état naturel, elle existe sous forme de cristaux ou de poudre cristalline de couleur rouge foncé, due au cobalt. La vitamine B12 est un nutriment essentiel qui fonctionne comme une coenzyme dans deux processus métaboliques : la conversion de la méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA par la méthylmalonyl-CoA mutase (MCM) au niveau de la mitochondrie et la reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase (MS) (Rafnsson, Saravanan et al. 2011), au niveau du cytosol des cellules (Rosenberg 2008).

b) Histoire

L'existence de la vitamine B12 a été décelée dès 1926 lorsque George Whipple, George Minot et William Murphy (prix Nobel de médecine en 1934) ont montré que des extraits de foie sous forme de compléments alimentaires sont susceptibles de corriger certaines anémies (Minot et Murphy 2001). Mais ce n'est qu'en 1948 que Karl Folker du laboratoire Merck et Lester Smith du laboratoire Glaxo ont isolé sous forme micro-cristalline la vitamine B12. Ceci va complètement changer la thérapie de l'anémie pernicieuse par la prise de quelques

microgrammes d'un composé cristallin rouge (Rickes, Brink et al. 1948; Smith 1948) à la place de l'ingestion de plusieurs grammes de foie cru.

Désormais, les protéines qui lient la B12 sont recherchées. Parmi ces protéines, le facteur intrinsèque (FI), décrit par Castle et purifié en 1965 par R. Gräsbeck (Grasbeck, Simons et al. 1965), est un accepteur de la B12 indispensable à l'absorption de la B12.

c) Nutrition

La vitamine B12 est présente principalement dans les aliments dérivés des animaux mais elle n'est synthétisée que par certains micro-organismes. Elle est absente du règne végétal. Ainsi, les aliments riches en vitamine B12 sont les abats (foie, rognons), la volaille, la viande, le poisson, les crustacés et le jaune d'œuf. D'infimes quantités de vitamine B12 sont retrouvées dans certaines algues (la spiruline), dans la levure alimentaire et dans certaines céréales (blé, avoine, orge). Les apports conseillés en vitamine B12 sont très faibles, environ 3 microgrammes par jour. Ces besoins sont variables selon l'âge. Dans le tableau 4, un récapitulatif des apports nutritionnels conseillés pour les différentes parties d'âge.

Age	ANC 2001 (µg/jours)
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
Personnes âgée de plus de 75 ans	3
Femmes enceintes	2,6
Femmes qui allaitent	2,8

Tableau 4: Apports nutritionnels conseillés (ANC) en vitamine B12 pour la population française (µg/jour). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 3ème édition, Ed. Tec & Doc.

d) Structure chimique

La vitamine B12, est une molécule organométallique volumineuse. Sa structure tridimensionnelle a été déterminée par Dorothy Crowfoot Hodgkin en 1956, en utilisant

cristallographie aux rayons X (Hodgkin, Kamper et al. 1956). Chimiquement, les cobalamines ont une structure proche de l'hème mais l'atome central de fer y est remplacé par un atome de cobalt, d'où le nom de la cobalamine. La cobalamine appartient à la famille des corrinoïdes. L'atome central : le cobalt peut être tri-, bi- ou monovalent (correspondant à 3 niveaux d'oxydation). En focntion de ces 3 niveaux d'oxydation du cobalt, la cobalamine est qualifiée de Cob(I)alamine, Cob(II)alamine ou Cob(III)alamine. La vitamine B12 est une molécule de 1355 Da constituée d'un noyau central appelé corrine et deux chaînes axiales, l'une en position α (en bleu) avec un groupement pseudo-nucléotidique diméthylbenzimidazole (DMB) et l'autre un radical anionique variable R en position β (en jaune). La nature du radical en β détermine le nom du composé vitaminique (Figure 10).

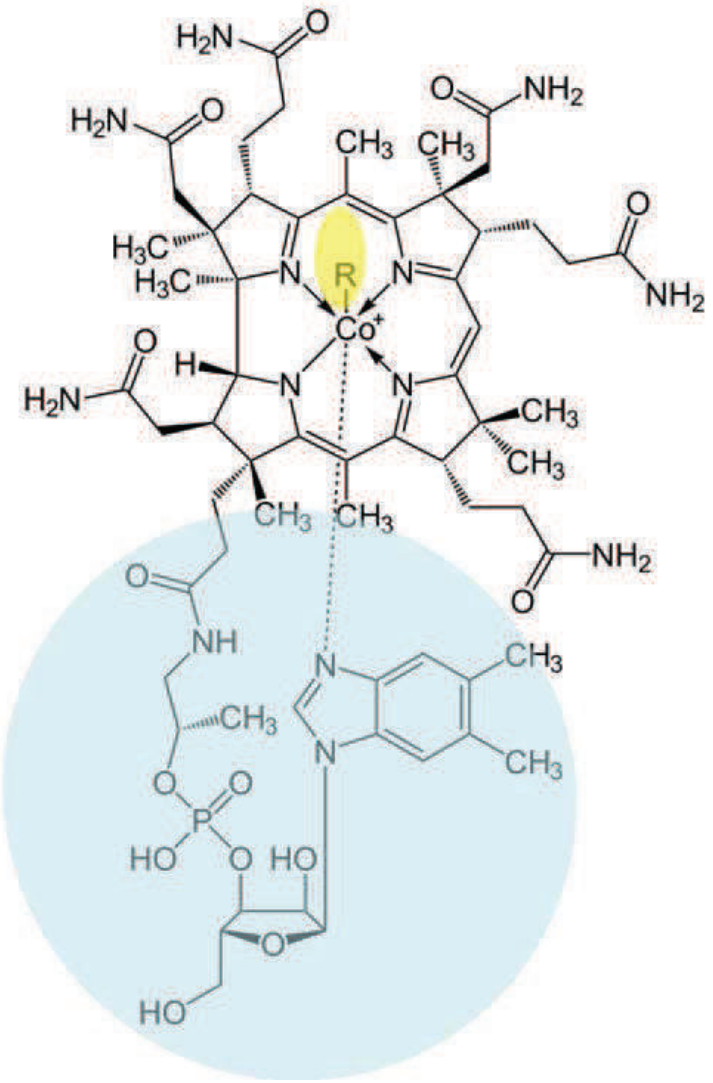


Figure 10 : La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl) et ses différentes formes.

Le noyau corrine est formé d'un atome de Co central relié à 4 noyaux pyrroles ainsi qu'à un ligand anionique (- R), dont la nature permettra de définir :

- R = - CN cyanocobalamine

- R = -OH hydroxocobalamine

- R = - CH3 méthylcobalamine

- R = -5'd Ado 5'-désoxyadenosyl cobalamine

e) Absorption

Le processus d'absorption de la cobalamine alimentaire est un processus complexe et nécessite l'intervention d'une série de protéines capable de lier la vitamine B12. (Figure11).

Généralement la cobalamine alimentaire se trouve principalement liée aux protéines. Pour la libération de la cobalamine à partir des protéines alimentaires, une digestion peptique à faible pH est nécessaire dans l'estomac (Antony et al., 2009). Suite à sa libération par la protéolyse, la cobalamine se lie préférentiellement à une protéine de 150-kd, la « cobalamine binding protein » (appelée aussi protéine R, haptocorrine (HC) ou transcobalamine 1), au niveau de la salive et du suc gastrique et qui présente une affinité supérieure à celle du facteur intrinsèque (FI) sécrété par les cellules pariétales de l'estomac. La sécrétion du FI est déclenchée par l'arrivée d'aliments dans l'estomac de façon analogue à la sécrétion acide gastrique (par stimulation vagale et hormonale). Le FI est produit largement en excès par rapport à la quantité requise pour l'absorption.

Le complexe 'cobalamine–haptocorrine' (protéine holo–R), l'apo–haptocorrine en excès et que le FI traversent la seconde portion du duodénum. A ce niveau, les haptocorrines sont dégradées par les enzymes pancréatiques exocrines (Russell-Jones and Alpers 1999). Ceci permet le transfert de la cobalamine vers le FI, une glycoprotéine de 45-kd avec une haute affinité qui va permettre à la cobalamine de franchir la barrière intestinale au niveau iléal grâce à un récepteur spécifique du complexe cobalamine–FI :le récepteur Cubam (Ganesan, Khadra et al. 2002). L'échec de la dégradation de la protéine R par les protéases pancréatiques empêche la fixation de la cobalamine sur le FI et par voie de conséquence empêche l'absorption de la cobalamine car le récepteur cubam ne permet pas l'absorption de la cobalamine libre ou fixée à l'haptocorrine.

Le complexe stable FI-cobalamine traverse le jéjunum vers l'iléon où il va se fixer sur un récepteur spécifique de la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'iléon appelé cubam (Gueant, Gerard et al. 1988). Ce récepteur est formé de l'association de la cubiline (codée par le gène CUBN, chromosome 6) et de la protéine amnionless (codée par le gène AMN, chromosome 7). Le récepteur cubam nécessite le Ca2+ pour sa liaison avec le complexe FI-cobalamine, ainsi qu'un pH supérieur à 5,4 (Antony et al., 2009). Une fois internalisé, le complexe subit une transcytose à partir du pôle apicale en direction du pôle basal et l'FI 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 (Rutsch, Gailus et al. 2009; Coelho, Kim et al. 2012).

Après un délai de 3 à 5 heures, la cobalamine apparait dans le sang sous une forme liée à une protéine : la transcobalamine II (TCII) (Nicolas and Gueant 1994; Seetharam, Bose et al. 1999; Seetharam and Li 2000). Seulement 10-30% de la cobalamine se lie à la TCII, alors que la majorité se lie à l'haptocorrine. A forte dose, la cobalamine peut diffuser de façon passive à travers les muqueuses buccale, gastrique, jéjunale et moins de 1 % de la dose ingérée peut donc apparaître dans la circulation après quelques minutes.

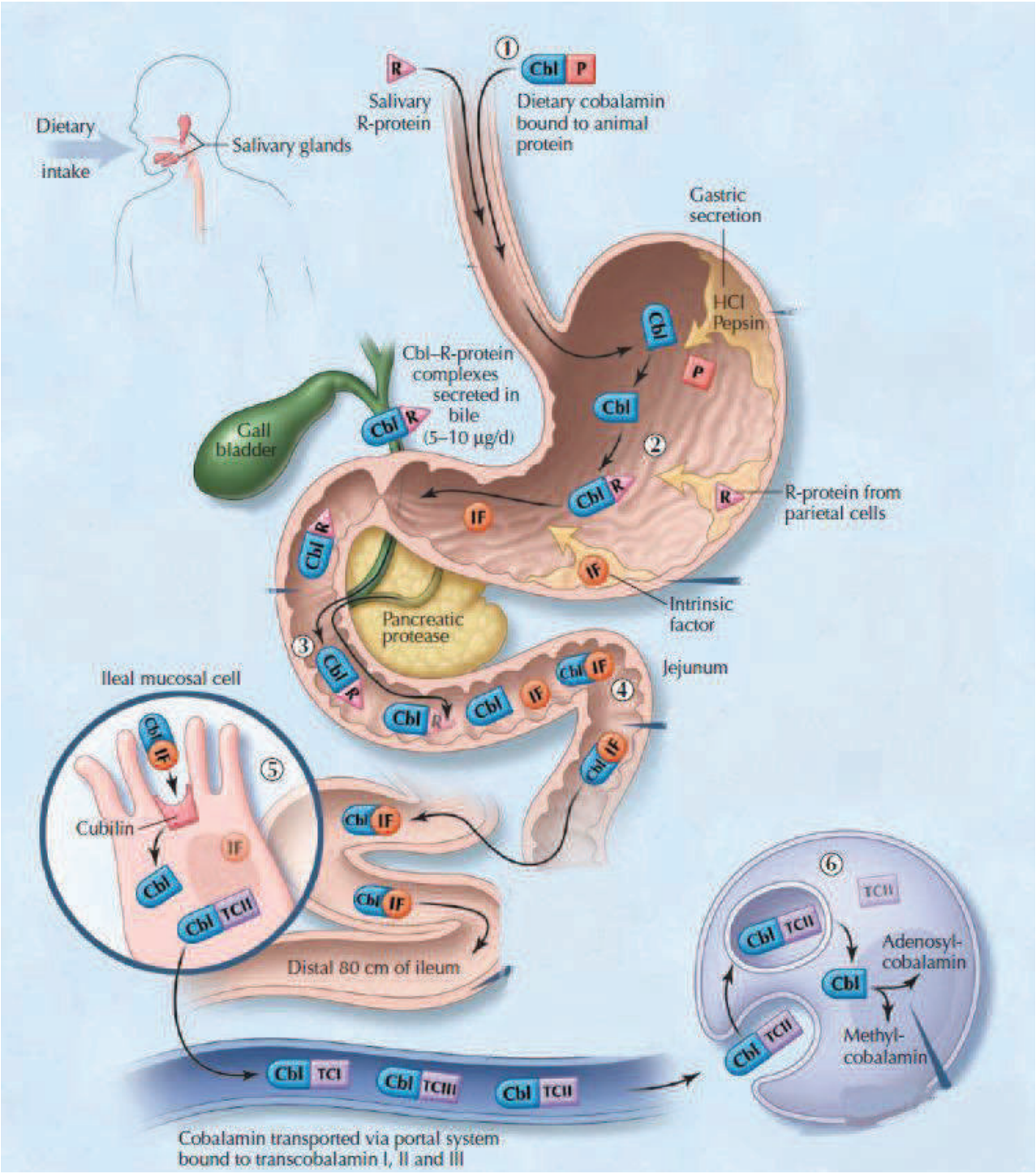


Figure 11 : Mécanisme d'absorption de la vitamine B12 modifié (d'après (Andres, Loukili et al. 2004).

R : 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 TC II ou l'haptocorrine, qui assurent l'internalisation dans les cellules grâce à un phénomène d'endo-cytose qui s'opère au niveau des récepteurs membranaires (Seetharam, Bose et al. 1999). La Cbl liée à l'haptocorrine est absorbée par les hépatocytes via le récepteur de l'asialoglycoprotéine. Dans ce cas la cobalamine n'est pas disponible aux autres cellules. Seulement 10-30% de la cobalamine est liée à la TC II, qui est une protéine de transport spécifique permettant de délivrer la cobalamine aux différents tissus. La TC II, un polypeptide de 38-kd synthétisé dans plusieurs tissus, fixe la cobalamine avec une haute affinité. Le complexe 'cobalamine–TC II' est rapidement lié à des récepteurs protéiques de surface pour la TC II, présents sur plusieurs cellules (Antony et al., 2009). La haute affinité de la liaison du complexe 'cobalamine–TC II' avec les récepteurs TC II est spécifique pour holo– et apo–TC II. Une fois fixé sur les récepteurs spécifiques de la TC II (le récepteur mégaline pour les reins et le CD320 pour le foie et les autres tissus (Cho, Choi et al. 2008; Nielsen, Rasmussen et al. 2012; Jiang, Nakayama et al. 2013), le complexe 'cobalamine–TC II' est internalisé par un mécanisme d'endocytose. A faible pH, au sein des lysosomes, la TC II se dissocie de la cobalamine (Lildballe, Mutti et al. 2012). La TC II est par la suite dégradée et la cobalamine réduite et convertie en coenzyme actifs (Figure 12) :

(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.

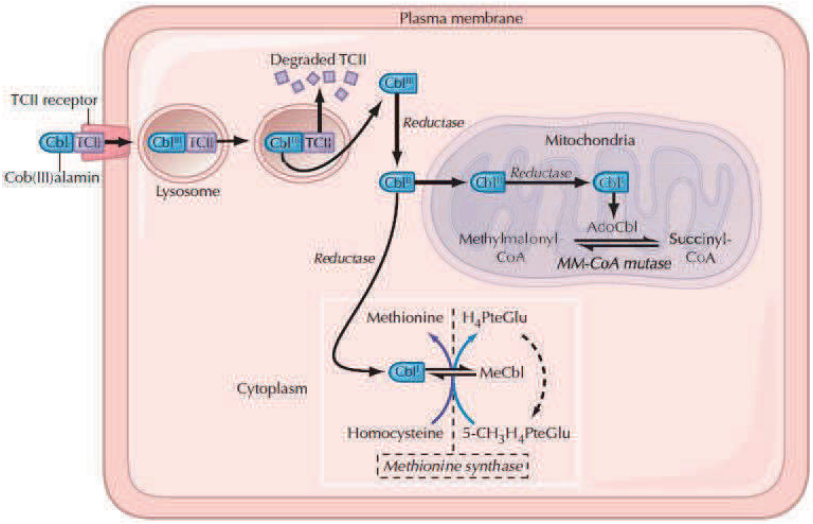


Figure 12 : Métabolisme de la vitamine B12 (Andres, Loukili et al. 2004).

L'importance de la fonction de transport de la TC II est soulignée par le fait qu'un déficit en TC II entraîne un déficit cellulaire grave en cobalamine. La protéine TC II peut aussi être synthétisée par une variété de cellules incluant les cellules rénales, les entérocytes et les hépatocytes. La protéine TC II agit comme une protéine de la phase aiguë de l'inflammation et son taux augmente au cours des conditions inflammatoires ou infectieuses (Carmel 1999).

g) Métabolisme cellulaire de la cobalamine

Après l'endocytose médiée par la TC II dans le lysosome, la libération de la cobalamine par la dégradation lysosomale de la TC II est une étape obligatoire pour le métabolisme intracellulaire de la cobalamine. Après son transport par le lysosome dans le cytoplasme par un système de transport spécifique, plus de 95 % de la cobalamine intracellulaire est liée à deux enzymes intracellulaires : la méthylmalonyl-CoA mutase (dans la mitochondrie) et la méthionine synthase (dans le cytoplasme) (Antony et al., 2009).

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. AdoCbl est un coenzyme de la méthylmalonyl-CoA mutase et 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, Heilmann et al. 2013).

Dans le cytoplasme, la MeCbl fonctionne comme une coenzyme dans la réaction impliquant la méthionine synthase (MS), qui catalyse le transfert d'un groupement méthyl de la MeCbl vers l'homocystéine pour former la méthionine et le groupement méthyl entre ainsi dans le cycle de la méthionine décrit précédemment. Dans ce processus, la MeCbl est convertie en cob(I)alamine. Le groupement méthyl du 5 MTHF (5- méthyl-H4PteGlu, 5-méthyltétrahydrofolate) est fourni à la cob(I)alamine afin de régénérer la méthylcobalamine et le 5-MTHF est converti en tétrahydrofolate. Les folates et la cobalamine sont donc tous deux nécessaires pour le métabolisme des monocarbones.

h) Les troubles du métabolisme de la vitamine B12

Le métabolisme cellulaire de la vitamine B12 peut être perturbé à différents niveaux et affecter la synthèse d'AdoCbl, la synthèse de MeCbl, ou la synthèse des 2 coenzymes.

- défauts génétiques affectant uniquement la synthèse de l'AdoCbl : défauts de 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.
- défauts génétiques affectant uniquement la synthèse de la MeCbl : Les troubles affectant la synthèse de MeCbl entraînent une hyperhomocystéinémie et une homocystéinurie. C'est le cas dans la CblE et la CblG.
- défauts génétiques affectant la synthèse de la MeCbl et de l'AdoCbl : les troubles affectant les 2 coenzymes entraînent une acidurie méthylmalonique combinée à une homocystéinurie. C'est le cas dans la CblC ou Acidurie méthylmalonique de type C avec une homocystéinurie (MMACHC), la CblD ou Acidurie méthylmalonique de type D avec une homocystéinurie (MMADHC) et la CblF (Watkins and Rosenblatt 2011).

i) Stockage et élimination

La cobalamine est exceptionnellement bien conservée dans les tissus sous sa forme de coenzyme. Le contenu total en cobalamine chez l'adulte varie entre 2 et 5 mg dont 1 mg contenu dans le foie. La perte obligatoire en cobalamine est de 0,1 % par jour (1,3 µg). Trois à quatre ans sont nécessaires pour dépléter les stocks en cobalamine de l'organisme lorsque l'apport en cobalamine cesse brutalement (exemple : gastrectomie).

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

j) Carence en vitamine B12

- **Déficit d'apport**

Une carence en vitamine B12 est plus souvent rencontrée dans les pays sous-développés. Elle est causée par une alimentation omnivore qui ne comprend pas suffisamment d'aliments d'origine animale pour satisfaire le besoin en vitamine B12 (Stabler and Allen 2004). Dans les pays développés, une carence d'apport est principalement trouvée chez les sujets végétaliens.

- **Déficit d'absorption**

Une malabsorption de la vitamine B12 ou des maladies digestives peuvent être à l'origine d'une carence en vitamine B12. Par exemple, la maladie de Biermer (encore appelée l'anémie

pernicieuse) est une maladie auto-immune dans laquelle des auto-anticorps sont dirigés contre les cellules pariétales gastriques produisant le facteur intrinsèque (62% des patients) ou contre le facteur intrinsèque lui-même (87,5% des patients), conduisant à une incapacité d'absorption de la cobalamine alimentaire.

Une carence est également observée dans des maladies chroniques intestinales (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique, maladie cœliaque) (Akbulut et al, 2010; Headstrom et al, 2008; Murray, 1999), chez les personnes ayant des gastrectomies totales ou partielles, dans des maladies parasitaires (Stabler and Allen 2004) comme par exemple la *Giardia lamblia* qui provoque des diarrhées chroniques et des syndromes de malabsorption (Stabler and 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, Li et al. 2004).

k) Conséquences de la carence en vitamine B12

Une carence en vitamine B12 se traduit par une diminution de l'activité des enzymes Cbl-dépendante : la méthionine synthase et la méthylmalonyl-CoA mutase (Allen, Stabler et al. 1990). Par conséquence l'acide méthylmalonique (MMA) et de l'Hcy s'accumulent et sont éliminés dans les urines.

Les conséquences cliniques d'une carence en vitamine B12 sont des troubles digestifs (glossite de Hunter), des troubles neurologiques (polynévrites sensitives, ataxie, sclérose combinée de la moelle), et hématologiques (macrocytose, anémie mégaloblastique). Il faut noter que la plupart de ces pathologies peuvent être associées à des carences en folates combinées ou non avec une carence en vitamine B12.

l) 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 (Méthylène 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 métabolisé en THF après le transfert du groupement méthyl vers la cobalamine lors de la synthèse de MeCbl (catalysé par la méthionine synthase). La carence en vitamine B12 empêche cette réaction de régénération du THF et peut impacter la production de N5,10-MeTHF. Et par voie de conséquence limiter 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.

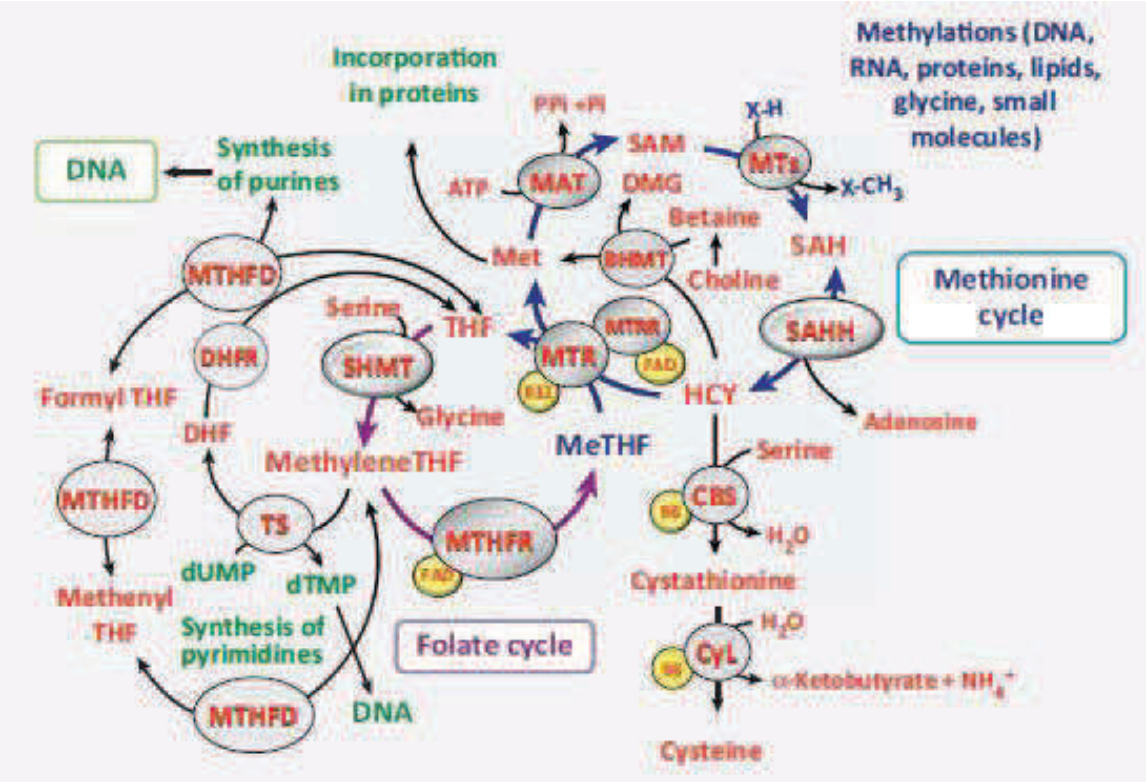


Figure 13 : Lien entre cycle de folates et cycle de la méthionine (Gueant, Namour et al. 2013).

PARTIE III

MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES ET CARENCE EN DONNEURS DE METHYLE

MICI et carence en donneurs de méthyles

1) Implication du métabolisme des monocarbones dans la pathogénie des MICI

a) Hyperhomocystéinémie et MICI

Une hyperhomocystéinémie modérée est fréquente chez les sujets atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Etant donné qu'une hyperhomocystéinémie est un facteur de risque de thromboses dans la population générale et que les patients avec MICI présentent un risque accru de maladie thrombotique, plusieurs équipes ont cherché à expliquer ce risque accru par une hyperhomocystéinémie. D'après des données de la littérature, l'homocystéine pourrait promouvoir une inflammation muqueuse chronique par le biais d'un stress oxydant, d'un stress du réticulum endoplasmique (RE), et d'une activation de facteurs pro-inflammatoires (Roybal, Yang et al. 2004). Les anomalies épigénétiques (méthylation de l'ADN) associées à une hyperhomocystéinémie et à une carence en folates pourraient quant à elles expliquer, au moins en partie, l'augmentation du risque de cancer colorectal observée chez les malades souffrant de MICI. Une autre étude montre que le niveau d'homocystéine plasmatique est corrélé à l'activité, au nombre de poussées, à la sévérité et à la durée de la RCH (Drzewoski, Gasiorowska et al. 2006).

L'ensemble de ces éléments pourrait permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie des MICI.

En 2001, l'équipe de Papa décrivait l'existence d'une hyperhomocystéinémie chez 26,5% des patients atteints de MICI contre 3,3% chez les sujets sains (Papa, De Stefano et al. 2001). Cette tendance a été retrouvée chez des patients souffrants de rectocolite hémorragique chez lesquels la prévalence de l'homocystéinémie est de 30% contre 10 % chez les contrôles (Zezos, Papaioannou et al. 2005).

Depuis 1998, onze autres études ont étudié la concentration de l'homocystéine plasmatique chez les patients atteints de MC ou de RCH. Parmi eux, dix études ont retrouvé que le taux d'homocystéine est plus élevé chez les patients atteints de MICI que chez les sujets sains (Tableau 5). Deux études ont également étudié la concentration de l'homocystéine sur des prélèvements de muqueuse colique chez des sujets atteints de MICI : les taux intra-muqueux s'avèrent nettement plus élevés que chez les sujets sains (Danese, Sgambato et al. 2005), suggérant l'implication de l'hyperhomocystéinémie dans la pathogénie des MICI.

Case Number (UC/CD)	Homocysteine (μmol/L, Mean ± SD or Median [Range])		
	IBD Patients	Controls	*P* Value
61 (29/32)	12.2 ± 7.7	10.5 ± 4.6	0.045
68 (37/31)	13.2 ± 7.8	7.4 ± 2.8	<0.01
171 (0/171)	14.8 (4.1–51)	4.4–12.4	ND
65 (9/56)	8.7 ± 1	6.6 ± 0.4	<0.05
108 (53/55)	15.9 ± 10.3 (UC) and 13.6 ± 6.5 (CD)	9.6 ± 3.4	<0.05
231 (89/142)	12.3 (4.6–51.3)	11.1 (3.9–27.6)	0.001
105 (0/105)	10.9 ± 5.1	7.5 ± 1.5	0.0001
21 (0/21)	13.24 ± 5.53	10.2 ± 3.6	<0.01
106 (52/54)	10.7 (not reported)	ND	ND
64 (39/25)	11.7 ± 5.7	7.8 ± 2.5	0.001
174 (91/83)	10.85 (3.25–39.24)	8.99 (4.13–16.16)	0.0001

Tableau 5 : Le niveau de l'homocystéinémie chez les sujets atteints de MICI et les sujets sains (Peyrin-Biroulet, Rodriguez-Gueant et al. 2007).

b) Stress oxydant

L'homocystéine provoque une production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et par conséquent un stress oxydant. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur joué par les espèces réactives de l'oxygène dans la survenue des lésions de la muqueuse colique au cours des MICI (Kruidenier, Kuiper et al. 2003). De plus, l'homocystéine sensibilise les cellules au stress oxydant en diminuant l'expression de nombreuses enzymes anti-oxydantes dont la glutathion peroxydase (GPX) et l'hème oxygénase-1 (HO-1) (Outinen, Sood et al. 1999). Une diminution du pouvoir antioxydant a ainsi été rapportée chez les sujets atteints de MICI (Dincer, Erzin et al. 2007).

c) Inflammation

Il a été montré in vitro que l'homocystéine pouvait stimuler la production de plusieurs facteurs pro-inflammatoires tels que MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), une chémokine pour les monocytes, et l'interleukine IL-8, une chémokine pour les lymphocytes T et les neutrophiles, ceci via l'activation du Necrosis Factor kappa B (NF-kB). Par ailleurs, l'homocystéine est capable de moduler la réponse inflammatoire en régulant la synthèse de molécules d'adhésion comme VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) et PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) (Wang, Woo et al. 2002).

L'expression de ces 3 molécules étant augmentée chez les patients atteints de MICI (Jones, Banks et al. 1995). L'homocystéine pourrait également provoquer des lésions de la muqueuse intestinale par un effet cytotoxique médié par le tumor necrosis factor-α (TNF-α). En effet, l'homocystéine induirait une mort cellulaire en augmentant la capacité du TNF-α à détruire les potentiels membranaires mitochondriaux (Ratter, Gassner et al. 1999). L'homocystéine induit ainsi une inflammation sur l'endothélium microvasculaire d'intestin humain en stimulant l'expression de VCAM-1, MCP-1 et la phosphorylation de p38 (Danese, Sgambato et al. 2005).

Au total, les lésions induites par l'homocystéine via une augmentation de molécules d'adhésion, de cytokines et de chémokines pourraient participer au maintien d'une inflammation chronique de la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MICI.

d) Hypométhylation

La méthylation des régions promotrices du génome joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes. Une hyperméthylation entraîne une répression, alors qu'une hypométhylation est associée à une activation de gènes (Peyrin-Biroulet, Barraud et al. 2004).

L'homocystéine influence le niveau de méthylation de l'ADN car :

1) la reméthylation de l'homocystéine produit de la méthionine, le précurseur de la S-adénosylméthionine (SAM), qui est un donneur de groupes méthyles impliqués dans plus de cent réactions de méthylations dans notre organisme;

2) SAH, est un puissant inhibiteur des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN, les méthyltransférases; l'inhibition de ces dernières par une hyperhomocystéinémie est donc responsable d'un état d'hypométhylation dans la cellule. Cette hypométhylation pourrait alors avoir comme conséquence d'activer certains gènes pro-inflammatoires chez les sujets atteints de MICI.

Par ailleurs, une hypométhylation globale de l'ADN associée à une hyperméthylation spécifique de gènes suppresseurs de tumeurs est un trait caractéristique des cellules tumorales, comme cela été rapporté avec une hyperméthylation spécifique des promoteurs des gènes p16 et hMLH1 (human mutL homologue 1) dans les tumeurs colorectales (Peyrin-Biroulet, Barraud et al. 2004). Une hypométhylation globale de l'ADN, peut-être secondaire à une hyperhomocystéinémie par carence en folates, a été mise en évidence dans les formes sévères de RCH (Gloria, Cravo et al. 1996). Ces données pourraient donc expliquer, au moins en partie, le risque accru de cancer

colorectal chez les sujets souffrant de MICI. Plus récemment, une hyperméthylation du récepteur aux œstrogènes a été proposée comme un marqueur du risque de néoplasie colorectal dans la RCH, soulignant l'implication possible d'anomalies épigénétiques dans la carcinogénèse colorectale au cours des MICI (Fujii, Tominaga et al. 2005).

2) Association des déterminants de l'homocystéine avec les MICI

a) Déterminants nutritionnels

Les patients atteints de MICI présentent une prédisposition aux carences nutritionnelles qui peuvent être causées par:

1) Réduction des apports alimentaires secondaire à l'anorexie, aux nausées et aux douleurs abdominales liées à la maladie ;

2) La malabsorption secondaire aux résections de l'iléon (Vasilopoulos, Saiean et al. 2001) ou aux lésions causées par l'inflammation muqueuse chronique;

3) Entéropathie exsudative;

4) Hypermétabolisme secondaire au processus inflammatoire, aux complications infectieuses ou encore au stress chirurgical et aux complications postopératoires ;

5) L'inhibition d'absorption des folates à cause de la prise d'aminosalycilés (Halsted, Gandhi et al. 1981).

Plusieurs études ont exploré l'influence des déterminants nutritionnels de l'hyperhomocystéinémie chez les patients atteints de MICI. Globalement, une carence en folates est la principale cause des hyperhomocystéinémies constatées chez les patients atteints de MICI (Oldenburg, Fijnheer et al. 2000; Zezos, Papaioannou et al. 2005). C'est ainsi que certains auteurs ont trouvé que le taux de folates est le seul facteur indépendant significativement associé à une hyperhomocystéinémie (Papa, De Stefano et al. 2001).

Le lien entre vitamine B12 et homocystéinémie semble moins évident au cours des MICI. Des travaux ont mis en évidence la corrélation entre la carence en vitamine B12 et les hyperhomocystéinémies (Oldenburg, Fijnheer et al. 2000; Zezos, Papaioannou et al. 2005; Peyrin-Biroulet, Rodriguez-Gueant et al. 2007).

Par rapport aux folates et à la vitamine B12, l'influence du taux de vitamine B6 et vitamine B2 sur celui de l'homocystéine dans les MICI serait nulle. A notre connaissance, il n'y a

qu'Oldenbrug et al. (Oldenburg, Fijnheer et al. 2000) qui ont montré une association significative entre le taux de vitamine B6 et le taux de l'homocystéine. Dans une autre étude, l'hyperhomocystéinémie a été trouvée plus fréquemment chez les patients atteints de MICI, mais aucune association significative n'a été observée entre le taux de vitamine B6 et le taux de homocystéine (Saibeni, Cattaneo et al. 2003).

b) Déterminants génétiques

Les données disponibles concernant la prévalence du variant de la MTHFR restent discordantes. Deux études réalisées en Europe du Nord montrent une augmentation significative de la fréquence du génotype homozygote MTHFR 677TT. Mahmud et al. (Mahmud, Molloy et al. 1999) ont été les premiers à retrouver une prévalence accrue de l'hyperhomocystéinémie et du variant MTHFR 677T dans une série de patients irlandais atteints de MICI: les auteurs montrent que 17,2% de patients atteints de MICI présentant ce génotype contre 7,3% de sujets témoins (P=0.01). Une étude Danoise a confirmé ces résultats, avec 15,1% de patients atteints de MICI présentant une homozygotie 677TT contre 8,3% dans la population générale (P<0.01) (Bjerregaard, Nederby et al. 2002). Cinq études réalisées en Europe de sud (deux en Italie, une en France, une en Espagne, et une au Portugal) et une série chinoise ne retrouvaient pas de différence significative pour ce variant (Cattaneo, Vecchi et al. 1998; Vecchi, Sacchi et al. 2000; Guedon, Le Cam-Duchez et al. 2001; Magro, Dinis-Ribeiro et al. 2003).

Ces résultats sont cependant difficilement interprétables car la fréquence des polymorphismes de la MTHFR varie selon des facteurs géographiques et ethniques. Le faible effectif ainsi que l'absence de données sur le statut en folates dans ces études pourraient également expliquer ces résultats discordants.

Peu d'études ont porté sur les polymorphismes des autres enzymes du métabolisme de l'homocystéine. Une seule étude a porté sur l'association du polymorphisme de la CBS (864ins68) aux MICI (Papa, De Stefano et al. 2001). Les conclusions sont que la prévalence de la mutation hétérozygote de CBS était identique chez les patients atteints de MICI et chez les sujets sains. Cependant, il a été montré que le variant A66G de la MTRR est plus fréquent chez les patients français atteints de MICI que chez les sujets contrôles (OR=4,0, 95% C.I.=1,7-9,2) (Peyrin-Biroulet, Gueant-Rodriguez et al. 2008).

c) Pharmacogénétique

Parmi les traitements incriminés, les aminosalicylés ont longtemps été considérés comme une cause potentielle d'hyperhomocystéinémie dans les MICI: on pensait en effet que l'absorption des folates était inhibée par la sulfasalazine (Halsted, Gandhi et al. 1981). Cependant, aucune association n'a été observée entre l'utilisation des aminosalicylés et le taux d'homocystéine plasmatique dans les études les plus récentes (Mahmud, Molloy et al. 1999; Papa, De Stefano et al. 2001).

Les effets du méthotrexate, un antagoniste de l'acide folique, sur l'homocystéinémie n'avaient jamais été évalués dans les MICI, alors que cette molécule est une cause reconnue d'hyperhomocystéinémie chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (van Ede, Laan et al. 2002). Le traitement par méthotrexate ne semble pas influencer le taux d'homocystéine au cours des MICI. Par ailleurs, les polymorphismes du gène MTHFR ne semblent pas influencer l'efficacité du méthotrexate. En revanche, ils pourraient moduler la toxicité liée à ce traitement. En effet, les effets secondaires sous méthotrexate seraient plus fréquents chez les individus homozygotes pour l'allèle 1298C de la MTHFR (Herrlinger, Cummings et al. 2005).

PARTIE IV

STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES INTESTINALES

1) Physiologie du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) (Figure 14) est un organite intracellulaire se situant aux pourtours du noyau cellulaire et s'étendant jusqu'à la membrane cellulaire. Il est formé d'un réseau de tubules membranaires qui communiquent entre eux. Ce compartiment cellulaire est dispersé dans tout le cytoplasme des cellules eucaryotes, représentant 50% des membranes cellulaires totales et sa taille varie d'une cellule à l'autre selon l'activité et les besoins de la cellule en protéines.

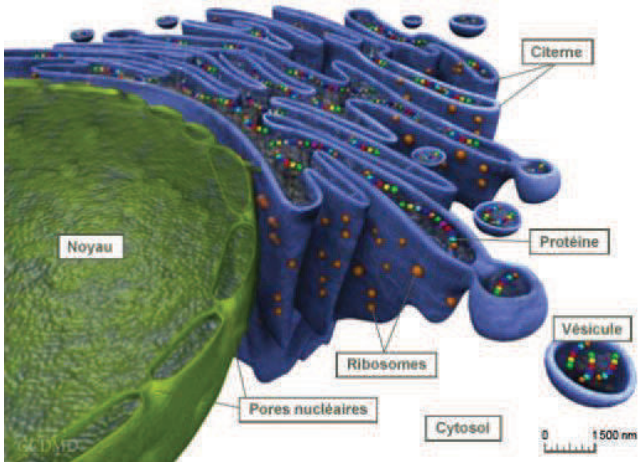


Figure 14 : structure du RE encyclopédie Larousse 2006. *Le réticulum endoplasmique est un organite cellulaire voisin de l'appareil de Golgi. Cet ensemble complexe de saccules communiquant entre eux est composé d'un réticulum rugueux, d'un réticulum lisse et d'une enveloppe nucléaire. Le premier réticulum fabrique les protéines et les stocke, alors que le second intervient dans l'élaboration des lipides.*

Un certain nombre de fonctions cruciales pour l'homéostasie et la survie cellulaire sont assurés par le RE ; en effet le RE est le principal site de réserve du calcium (Ca^{2+}) dans la cellule, 2-5mM dans le RE pour 1µM dans le cytosol (Orrenius, Zhivotovsky et al. 2003). Suite à différents stimulus ce Ca^{2+} peut être libéré dans le cytoplasme et servir de messager intracellulaire (Burdakov, Petersen et al. 2005). Le RE est également le site principal de synthèse du cholestérol, des stérols et d'autres lipides (Cox, Chapman et al. 1997). La diversité dans la structure du RE 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. Ces processus de maturation protéique requièrent plusieurs facteurs dont un environnement oxydant permettant la création de ponts disulfures, notamment par la Protein Disulfide Isomerase (PDI) et la conformation correcte des protéines (Hatahet and Ruddock 2009), des concentrations adéquates en ATP et en calcium ainsi que la présence des

protéines résidentes du RE (chaperonnes). Les principales protéines impliquées dans la maturation des protéines sont l'« immunoglobulin binding protein », BiP (ou glucose-related protein 78, GRP78), la GRP94, la calnexine et la calréticuline (Hetz, Martinon et al. 2011). Finalement, c'est dans le RE que les protéines subiront des modifications post-traductionnelles (N-glycosylation, oligomérisation,…). Après avoir passé les différents contrôles de qualité, les protéines correctement repliées sont ensuite dirigées vers les organelles, la surface cellulaire ou l'espace extracellulaire. Si ces contrôles qualité échouent, les protéines incorrectement repliées ou modifiées seront dirigées vers le protéasome par une rétrotranslocation dans le cytosol qui s'appelle la voie « ER-associated degradation » (ERAD) afin d'être dégradées (Smith, Ploegh et al. 2011).

2) Stress du réticulum endoplasmique

2.1) Origines du stress du réticulum endoplasmique

Toute situation (Figure 15) conduisant à une altération de la fonction du RE et par conséquent une accumulation de protéines de conformations anormales, produisent alors une situation de stress appelée stress du RE (Lee 2001). Cette accumulation oblige la cellule à déclencher une réponse adaptative appelée « *Unfolded Protein Response* » (UPR) dont l'objectif est de diminuer la quantité de protéines dans la lumière du RE.

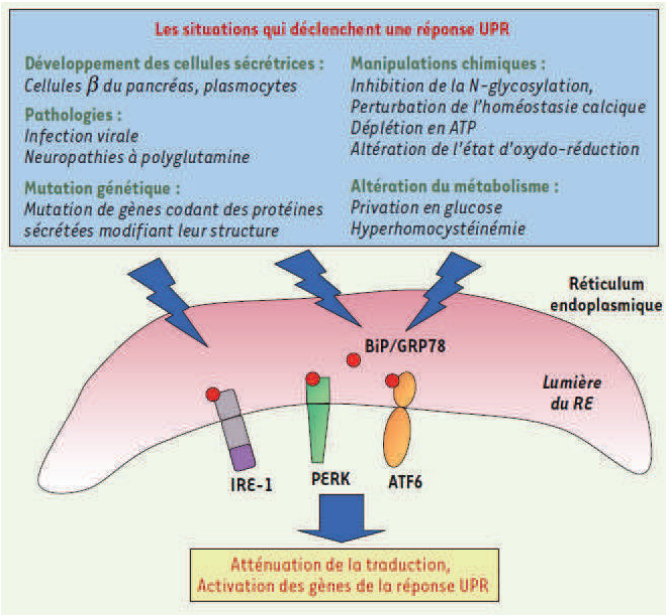


Figure 15 : Situations physiologiques, physiopathologiques ou pharmacologiques conduisant à l'activation de l'UPR (Foufelle and Ferre 2007).

a) Influence du calcium

Comme nous l'avons vu précédemment, le RE est le site principal de stockage de calcium (5 mM contre 0,1 μM dans le cytosol approximativement) (Orrenius, Zhivotovsky et al. 2003). Lors de la signalisation cellulaire, la concentration du calcium varie rapidement quand la réserve de calcium est utilisé (Webb and Miller 2003). Le RE est par ailleurs particulièrement riche en protéines chaperonnes et en enzymes spécialisées dans le repliement des protéines dépendantes pour la plupart du Ca^{2+} pour leur activité catalytique. Des variations en concentration de Ca^{2+} peuvent donc affecter l'activité de ces protéines (Zhang, Braakman et al. 1997) et peuvent être à l'origine d'un stress du RE.

b) Environnement redox

Dans le RE, la formation de ponts disulfures est un des événements majeurs conduisant au repliement correct des protéines. Ce mécanisme nécessite un environnement oxydatif tel que le glutathion et des oxydoréductases tel que la PDI. En plus la PDI permet la réduction et le réarrangement de ponts disulfures incorrects en se fixant sur son substrat permettant ainsi une modification de la liaison par une réaction d'isomérisation (Wilkinson and Gilbert 2004). La protéine ERO1 (ER oxydation 1) permet de réoxyder la PDI suite à sa réduction lors de la formation de ponts disulfures, en transférant les électrons directement à l'oxygène par une réaction flavine dépendante, produisant ainsi des radicaux libres oxygénés (ROS) et du glutathion oxydé (GSSG) (Frand and Kaiser 1998; Tu, Ho-Schleyer et al. 2000).

L'accumulation de ROS et de glutathion oxydé peut constituer une source de stress oxydant et par conséquence un stress du RE.

c) Glycosylation

La glycosylation est un mécanisme post-traductionnel dans les cellules eucaryotes. C'est une réaction enzymatique consistant à lier de façon covalente un oligosaccharide sur le groupement NH2 des chaines latérales des résidus asparagines accessibles des protéines en cours de synthèse (Hubbard and Ivatt 1981; Kornfeld and Kornfeld 1985). La fixation de ces oligosaccharides sur les protéines par glycosylation, est un phénomène très important puisqu'ils interviennent dans le bon repliement des protéines sur lesquelles ils se sont fixés ce qui empêche leur agrégation (Stevens and Argon 1999). Egalement ils peuvent rendre le processus de translocation vers le cytoplasme irréversible (Wormald and Dwek 1999) et finalement ces sucres augmentent la solubilité des glycoprotéines vu leur nature hydrophile.

d) Altération des mécanismes de contrôle de qualité et du repliement protéique

Une fois que les protéines sont synthétisées, elles subissent un test de contrôle qualité qui a pour but de discriminer les protéines mal conformées des protéines correctement repliées. Dans le cas contraire, les protéines vont être dégradées par le mécanisme de dégradation cellulaire ERAD (Schroder and Kaufman 2005). Deux groupes de protéines composent la machinerie cellulaire de contrôle de la qualité protéique : le premier comprend les protéines chaperonnes (BIP, GRP94, calnexine, calréticuline) et le second est représenté par des enzymes de modification des glycanes. Ainsi, toute condition altérant le processus de conformation où l'ERAD va provoquer une accumulation de protéines mal conformées qui induiront un stress du RE.

2.2) L'UPR

Suite à un stress, les cellules eucaryotes vont déclencher l'UPR (Figure 16) qui exerce trois fonctions principales : l'adaptation, l'alarme et l'induction de la mort cellulaire dans les cas d'un stress prolongé.

En résumé, cette réponse possède deux composantes :

1) La première composante (traductionnelle) de l'UPR est une répression rapide et intense de la synthèse protéique afin d'empêcher l'arrivée d'autres protéines dans le RE et d'éviter ainsi la surcharge de cet organite (Kaufman, Scheuner et al. 2002; Schroder and Kaufman 2005).

2) La seconde (transcriptionnelle) consiste à synthétiser de nouvelles protéines chaperons ou des « foldases » pour stimuler les processus de repliement et entraîner vers la dégradation les protéines mal repliées.

Dans les cas où la situation de stress est trop intense ou de trop longue durée et que ces deux composantes ne peuvent y remédier, la réponse UPR déclenche des signaux d'alarme avec la génération d'une réaction inflammatoire médiée par les voies NF-κB et JNK et la diminution d'expression de facteurs anti-apoptotiques comme la protéine Bcl2. Après cette phase d'alarme, la cellule peut rentrer en l'apoptose (Chakrabarti et al., 2011).

Tout d'abord, nous commençons par décrire les transducteurs de cette réponse UPR, ensuite les différents processus mis en route lors des phases d'adaptation, d'alarme et de mort cellulaire.

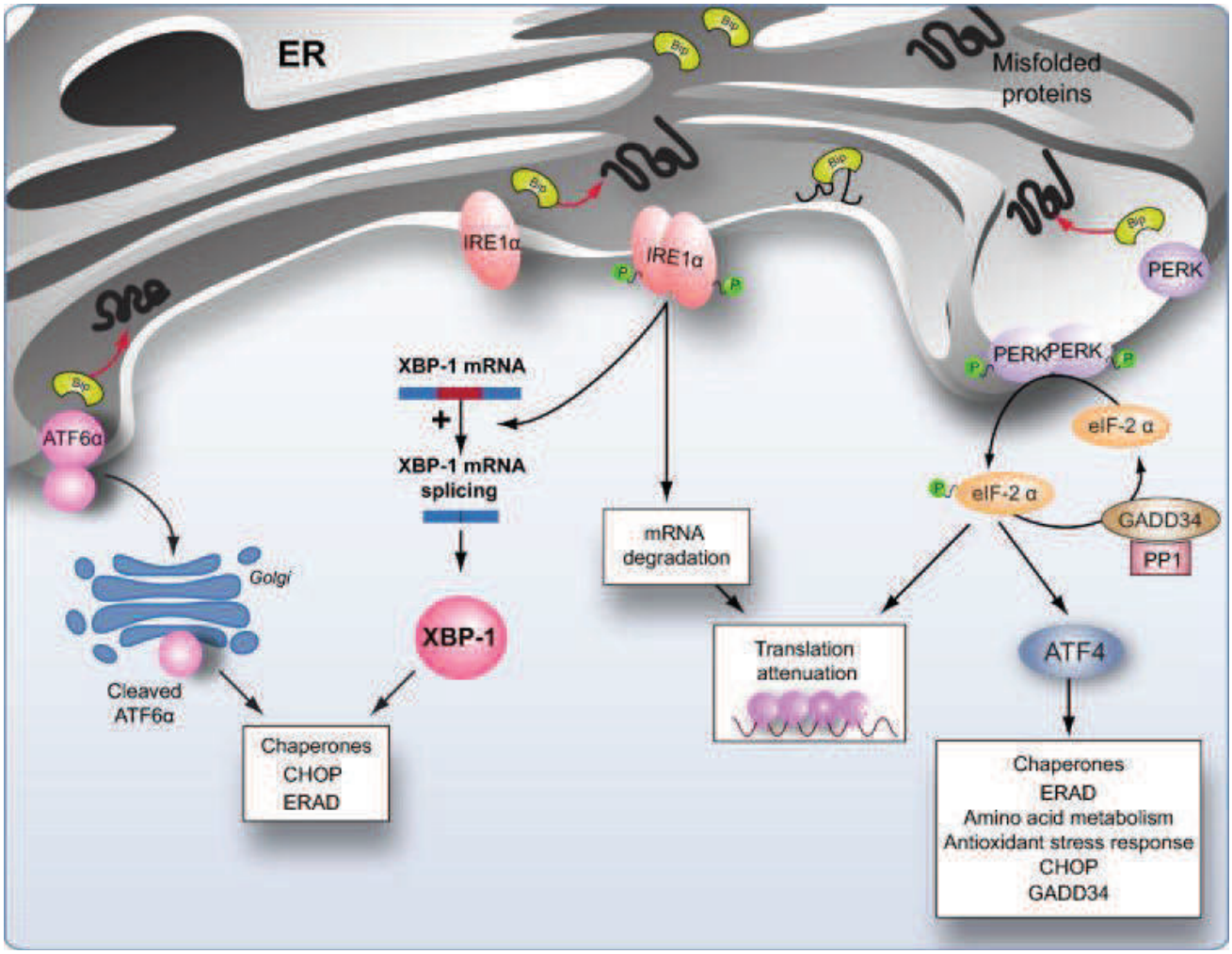


Figure 16 : Représentation schématique de l'UPR (Malhi and Kaufman 2011).

La réponse UPR est médiée par trois protéines du RE : PKR-like ER kinase (PERK), Inositol requis 1 (IRE1) et activating transcription factor 6 (ATF6). A l'état normal, ces trois protéines sont associées à la protéine chaperonne BIP/GRP78 qui les maintient à leur état inactif. En revanche, la dissociation de BIP/GRP78, suite à une accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE, va entraîner l'activation des trois acteurs de l'UPR PERk, IRE-1α, ATF6. PERK s'oligomérise ce qui entraine une stimulation de son activité kinase ce qui permet la phosphorylation de la sous-unité a du facteur d'initiation de la traduction (eIF2α) entraînant une inhibition de la traduction. La protéine IRE1 possède une activité endoribonucléasique dans son domaine cytoplasmique. Son activation entraîne son oligomérisation et l'induction de son activité kinase ce qui provoque l'excision d'un intron situé au niveau de l'ARNm du gène codant pour la X-BOX binding protein 1 (XBP1).ATF6 est un facteur transcriptionnel qui sera clivé dans l'appareil de Golgi, puis migrera dans le noyau pour transcrire les gènes codant les protéines chaperonnes comme BIP, GRP94 ou la calnexine.

2.2.1) Les composantes de l'UPR

a) Activation de la kinase PERK, la voie traductionnelle

C'est la première voie qui se met en place. Elle a pour but de ralentir la synthèse protéique afin d'éviter un afflux supplémentaire de protéines dans le RE. C'est la protéine Kinase PERK qui est responsable de cette inhibition de la traduction.

C'est une protéine transmembranaire de type 1 de 120 KDa formé par une partie N-terminale luminale contenant un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à la chaperonne Bip et une partie C-terminale cytoplasmique présentant une activité Ser/Thr kinase (Figure 16A). La dissociation de Bip du domaine situé dans la lumière du RE, suite à un stress, permet l'activation de PERK via son oligomérisation suivie de son autophosphorylation en trans (Bertolotti, Zhang et al. 2000). Une fois active, la kinase PERK phosphoryle le résidu Ser51 de la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF-2α *(eukaryotic translation initiation factor 2 α).* Cette phosphorylation empêche la formation du complexe d'initiation de la traduction ce qui atténue la synthèse des protéines et réduit l'apport supplémentaire des protéines dans le RE (Harding, Zhang et al. 1999; Ron and Walter 2007). Toutefois, certains ARNm sont sélectivement traduits dans ces conditions de stress et cela grâce à la présence dans leurs parties 5' non traduites de séquences uORF (upstream open reading frame) permettant ainsi leur expression lors de l'inhibition de la synthèse protéique. C'est le cas de l'ARNm codant le facteur de transcription ATF4 qui est suite à son activation, impliqué dans la survie cellulaire et en induisant la transcription des gènes impliqués dans la réponse au stress (GRP78, GRP94), le métabolisme des acides aminés, et la réponse antioxydante (Harding *et al.,* 2003). Egalement, ATF4 joue un rôle pro-apoptotique en induisant l'expression de la protéine CHOP (CEBP homologous protein) qui est un facteur de transcription activant l'expression des facteurs pro –apoptotiques et inhibe la transcription des facteurs anti-apoptotiques, comme Bcl-2 (Zhang and Kaufman 2008).

A noter qu'en réponse à des stress cellulaires, plusieurs kinases sont capables de phosphoryler eiF-2a et par conséquence activer ATF4. Ce sont les kinases PKR (Double-strand RNA-dependent protein kinase), HRI (Heme Regulated Inhibitor) et GCN2 (General Control Nonderepressible 2), qui sont respectivement activées lors d'une infection virale par l'ARN double brin et par la carence nutritionnelle (en hème et en acides aminés)

b) Activation d'IRE-1 et d'ATF6, la voie transcriptionnelle

Lors d'un stress, l'induction des gènes codant des protéines chaperonnes et des protéines impliquées dans la dégradation sont faites grâce à la voie transcriptionnelle de l'UPR. Cette voie est composée par deux acteurs IRE-1 et ATF6.

IRE1 est une protéine transmembranaire de 110KDa, contenant dans sa partie N-terminale luminale un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à la chaperonne Bip et dans sa partie C-terminale cytoplasmique un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine à activité endoribonucléase (Figure 17A). Chez les mammifères, contrairement à la levure, il existe deux isoformes α et β de la protéine IRE1, la forme β étant exclusivement exprimée dans le tissu épithélial intestinal (Tirasophon, Welihinda et al. 1998; Wang, Harding et al. 1998). L'activation d'IRE-1, après son dissociation de Bip, se fait par autophosphorylation, dimérisation puis oligomérisation (Walter and Ron 2011). Après activation, IRE-1α réalise un épissage non conventionnel de 26 nucléotides de l'ARNm codant pour le facteur de transcription XBP1 (X-box Binding Protein 1) (Yoshida 2007). La protéine XBP1s synthétisée à partir de cet ARNm est transloquée dans le noyau où elle se fixe sur les éléments de réponse aux stress du RE (ER stress Response Element [ERSE]) induisant ainsi la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans la réponse UPR comme Bip, GRP94, PDI et ORP150 (Oxygen Regulated Protein 150 kD) ainsi que des enzymes intervenant dans la maturation et la dégradation protéique telles que la protéine EDEM (Hosokawa, Wada et al. 2001).

ATF6 est une protéine transmembranaire du RE orientée de manière opposée à IRE1 et PERK. Sa partie N-terminale cytoplasmique contient un domaine d'activation de la transcription et un motif leucine-zipper. Sa partie C-terminale liminale, comporte deux séquences de localisation golgienne (GLS) et un domaine de fixation à la protéine Bip. Chez les mammifères, il existe deux isoformes ATF6α (90 kDa) et ATF6β (110 kDa) (Figure 17B) (Haze, Okada et al. 2001) qui diffèrent notamment par la présence d'une ou de deux séquences GLS, respectivement. D'une façon similaire, l'activation d'ATF6 est régulée par la chaperonne Bip. En condition de stress, Bip se dissocie des séquences GLS ce qui permet ainsi la translocation d'ATF6 au niveau de l'appareil de Golgi où elle subit un double clivage protéolytique par les protéases S1P et S2P qui vont respectivement cliver le domaine luminal et la partie transmembranaire. Ainsi le fragment N-terminal néo-synthétisé va migrer dans le noyau et activer la transcription des gènes de la réponse UPR en se fixant sur les ERSE (Walter and Ron 2011).

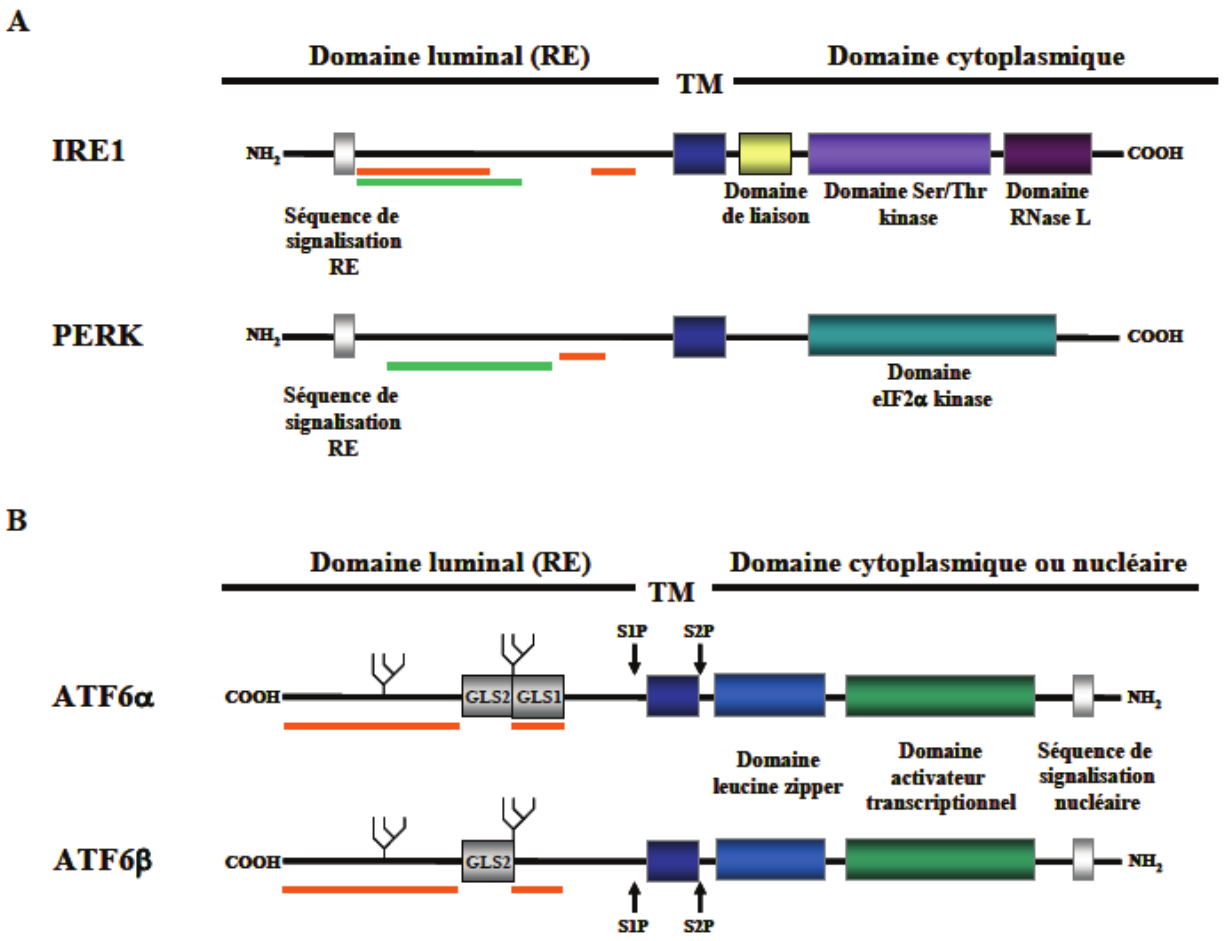


Figure 17 : Structures principales des protéines transductrices du signal UPR.

La localisation cellulaire des différents domaines ainsi que la présence de domaines transmembranaires (TM) sont indiquées. Les barres oranges représentent les domaines de liaison avec la protéine chaperonne BIP. (A) Protéines membranaires du RE, IRE1 et PERK.

Les barres vertes représentent les régions suffisantes pour leur dimérisation et la transduction du signal. (B) Isoformes de la protéine transmembranaire du RE, ATF6α et ATF6β. Les séquences de localisation Golgienne (GLS1 et GLS2) sont représentées. Les flèches noires représentent les sites de coupure protéasiques S1P et S2P (protéase spécifique des sites 1 et 2) (Schroder and Kaufman 2005).

2.2.2) UPR et apoptose

Lorsque l'intensité et la durée du stress sont prolongées, l'UPR induit un programme de mort cellulaire par apoptose. En effet, les signaux émanant de PERK, IRE1 et ATF6 peuvent être pro-apoptotiques. Le facteur de transcription CHOP/GADD153 est impliqué dans une des voies apoptotiques les plus décrites lors d'un stress du RE. Ce facteur de transcription est régulé principalement par ATF4, mais probablement aussi par ATF6 (Oyadomari and Mori 2004) et XBP1 (Tabas and Ron 2011). Il a été démontré chez la souris que la délétion de CHOP les protège contre la mort cellulaire induite par le stress du RE dans l'épithélium tubulaire rénal après une induction par la tunicamycine. Egalement dans des modèles murins de diabète la suppression de l'expression de CHOP dans des cellules B pancréatiques protège contre l'apoptose. Les effets pro-apoptotiques de CHOP peuvent être induits en activant la transcription de gènes des protéines régulant positivement l'apoptose tels que DR5 (Death Receptor 5), Bim et TRB3 (Tribbles-Related Protein 3) (Yamaguchi and Wang 2004; Puthalakath, O'Reilly et al. 2007), ou en réprimant la transcription de gènes protecteurs.

La voie IRE-1α peut être également impliquée dans l'activation de l'apoptose (Figure 18). En effet son domaine cytosolique interagit avec la protéine adaptatrice TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2). Cette association permet l'activation de JNK suite au recrutement de ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) (Nishitoh, Matsuzawa et al. 2002). Ainsi, l'activation de JNK induit l'apoptose en activant les protéines pro-apoptotiques telles que Bim et en inhibant les protéines anti-apoptotique comme Bcl-2 (Kim, Xu et al. 2008). Également JNK, active permet le relargage du cytochrome C permettant ainsi l'activation de la cascade apoptotique initiée par la caspase 9 (Dhanasekaran and Reddy 2008).

Un autre mécanisme passe par l'activation de la caspase 12 clivée par des calpaines activées elles-mêmes par IRE-1α mais son rôle exact fait débat car elle n'est pas présente chez l'homme (Nakagawa, Zhu et al. 2000; Saleh, Mathison et al. 2006).

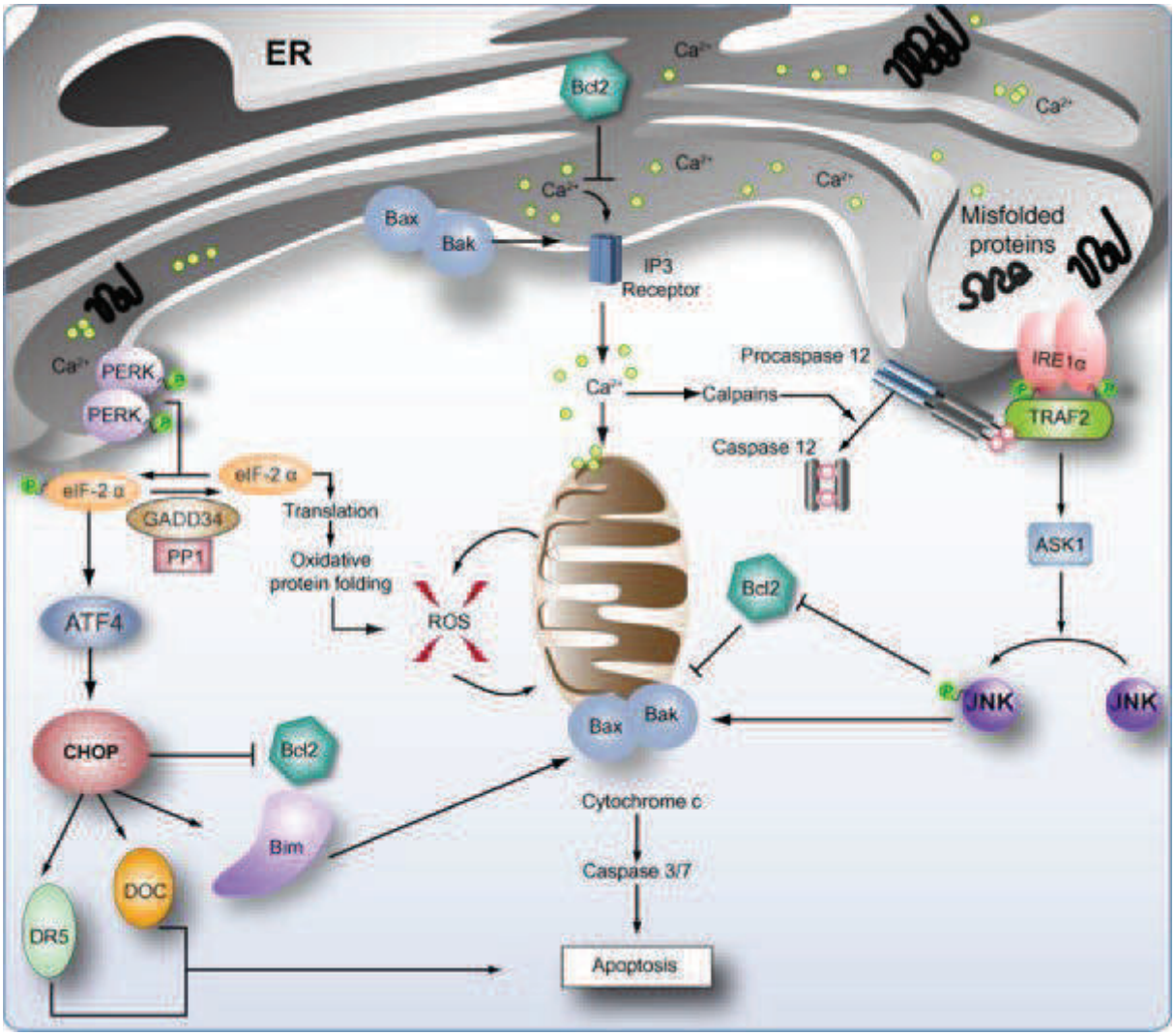


Figure 18 : Relations entre l'UPR et les voies de la mort cellulaire (Malhi and Kaufman 2011).

3) Le stress du RE en pathologie humaine

En association avec la voie de dégradation ERAD, l'UPR joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ce rôle est particulièrement important dans les cellules sécrétrices comme les cellules β du pancréas ou les hépatocytes. Un dysfonctionnement de la voie UPR ou de la voie ERAD peut être à l'origine de nombreuses pathologies. La mise en évidence de marqueurs du stress du RE en pathologie permettrait de développer des stratégies thérapeutiques ciblant la réponse UPR.

a) Maladie neurodégénérative

L'accumulation des protéines mal repliées est associée à des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington. La maladie d'Alzheimer est caractérisée par un dépôt extracellulaire de substance amyloïde. Les présénilines 1 & 2 (PS-1 & PS-2) assurent le clivage de l'APP (amyloïd precursor protein) pour donner la protéine β-amyloïde. Il a été observé dans des souris Knock in pour la protéine mutée PS-1 une augmentation de la mort des cellules neuronales via CHOP (Yoshida 2007). Il a été montré que PS-1 se lie directement dur IRE-1 provoquant ainsi son inhibition ce qui augmente la vulnérabilité face au stress du RE (Lindholm, Wootz et al. 2006).

b) Diabète

Vue leur grande capacité de sécrétion de l'insuline, les cellules β du pancréas possèdent un RE très développé. Lors d'une synthèse protéique accrue, un stress du RE est déclenché par des ERO suite à la formation de nombreux ponts disulfures. Dans ce cas, l'activation de la voie PERK/eiF2a permet une adaptation cellulaire en ralentissant la synthèse protéique globale et par conséquence une diminution des ERO (Eizirik, Cardozo et al. 2008; Scheuner and Kaufman 2008). Des études réalisées chez la souris invalidée pour le gène PERk ($PERk^{-/-}$) montrent qu'elle développe dans les premières semaines de vie un diabète dû à une destruction des cellules β (Harding, Zeng et al. 2001).

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 diminution du nombre de cellules β ainsi qu'une augmentation des marqueurs de stress notamment BIP et CHOP (Wang, Takeuchi et al. 1999). Il a été suggéré que le repliement incorrect de la pro-insuline serait dû au stress du RE (Sundar Rajan, Srinivasan et al. 2007).

c) Ischémie-reperfusion (IR)

Des études ont mis en évidence l'implication du stress de RE dans la survenue des lésions d'IR (Xu, Bailly-Maitre et al. 2005). Une hypoxie tissulaire et une carence en nutriments, notamment en glucose, sont la résultante de l'ischémie ce qui provoque un déficit en ATP, une altération de l'activité de Bip et une diminution de la concentration intraréticulaire de calcium. Un stress oxydatif est provoqué par l'ischémie suivie par une reperfusion, conduisant à la formation de protéines mal repliées (Sheridan and Bonventre 2000).

d) Cancer

Au cours de la croissance tumorale, les cellules cancéreuses doivent résister à des conditions de survies très complexes notamment une hypoxie et une carence en nutriments. Des nombreuses études *in vivo* et *in vitro* sur différents types de cancer, montrent une activation du stress du RE et la mise en place d'une réponse UPR afin de maintenir la survie des cellules cancéreuses (Tsai and Weissman 2010; Li, Zhang et al. 2011). Romero-Ramirez et al., ont démontré que la déficience du gène XPB1 dans des fibroblastes embryonnaires murins induit une augmentation de la mort cellulaire causée par un stress du RE empêchant ainsi la croissance tumorale chez la souris transplantée par une tumeur (Romero-Ramirez, Cao et al. 2004).

e) Inflammation

Dans la littérature, des nombreuses études suggèrent une relation entre l'inflammation et le stress du RE dans plusieurs pathologies (Zhang and Kaufman 2008). Comme nous avons vu précédemment, la formation des ponts disulfures peut induire des ERO, or celles-ci peuvent induire une réaction inflammatoire (Raha and Robinson 2000). Face à ce stress, la cellule va activer la réponse UPR qui via la voies PERK va limiter la réaction inflammatoire en induisant la transcription des gènes anti oxydants (Zhang and Kaufman 2008).

Une autre participation du stress du RE à la réaction inflammatoire se déroule via l'activation par différentes voies, du facteur de transcription NF-κB et la transcription des gènes de l'inflammation. En absence de stimuli inflammatoire, NF-κB est maintenu sous forme inactive dans le cytoplasme par interaction avec l'inhibiteur (IκB) exprimé de façon constitutive.

En réponse au stress du RE, le domaine cytoplasmique de IRE-1α se complexe avec l'IκB kinase (Iκκ) grâce à la protéine adaptatrice TRAF2. Cette interaction entraine la phosphorylation activatrice de Iκκ qui va elle-même induire la phosphorylation inhibitrice de Iκβα. Iκβα 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 (Figure 19) (Hasnain, Lourie et al. 2012). Le complexe IRE1α/TRAF2 permet également le recrutement de la kinase JNK, l'activation de la voie Akt et la translocation de NF-κB suite à la phosphorylation de IκB (Urano, Wang et al. 2000). De plus l'activation de PERK entraine la diminution de la traduction des ARNm et réduit donc la synthèse de IκB. Le ratio NF-κB/IκB est augmenté et NF-κB libre peut migrer dans le noyau (Zhang and Kaufman, 2008).

En dehors de la voie NFκB, le stress du RE contribue à la génération de l'inflammation en augmentant la phagocytose des cellules par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et la production de cytokines inflammatoires par les CPA, suite à une induction du stress du RE par la thapsigargine (Peters and Raghavan 2011).

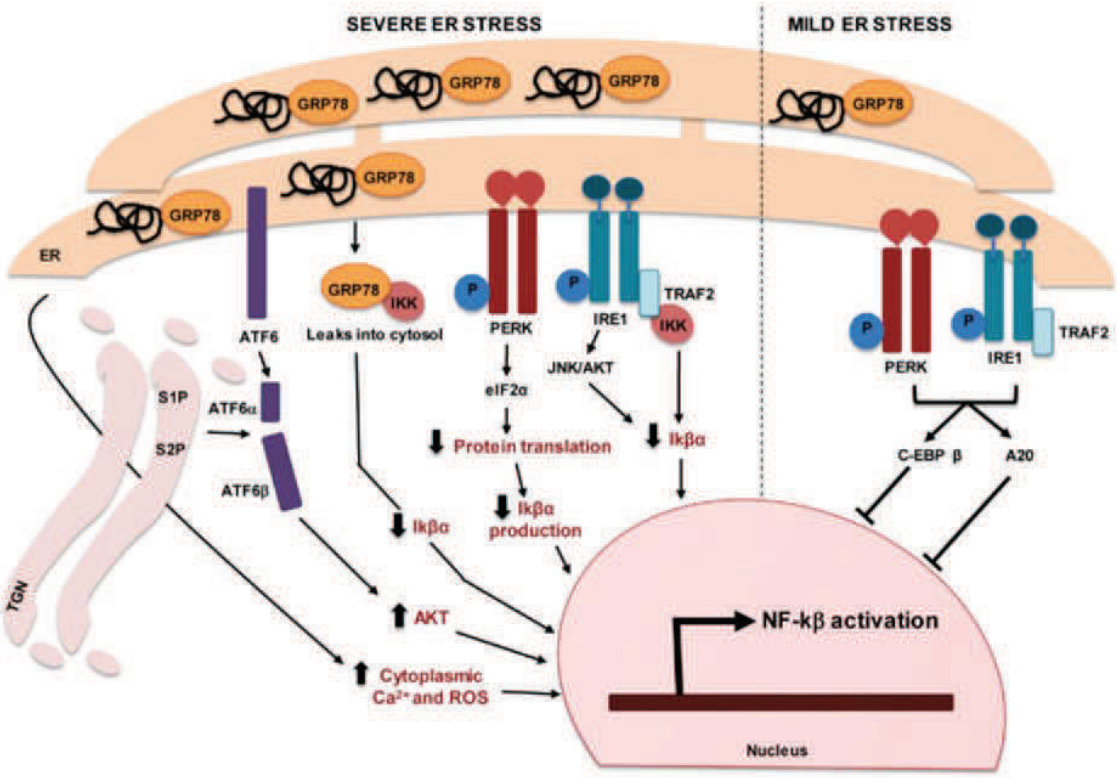


Figure 19 : La réponse UPR et l'activation de NF-κB (Hasnain, Lourie et al. 2012).

L'activation d'ATF6 entraine son interaction avec Akt pour activer le facteur de transcription NF-κB. L'autophosphorylation de PERK conduit à l'inhibition de la traduction des protéines et donc à la diminution de la production de IκB ce qui permet l'activation de NF-κB. L'oligodimérisation activatrice de IRE1 permet sa liaison avec TRAF2, puis le recrutement de JNK et l'activation de la voie Akt ainsi que le recrutement et la phosphorylation activatrice de l'IκB kinase (IKK). Ces deux voies conduisent à la dégradation de IκB, inhibiteur de NF-κB et donc à l'activation de NF-κB.

4) Stress du réticulum endoplasmique et SIRT1

a) Généralité, fonctions

Lors de cette dernière décennie, des études ont mis en évidence une nouvelle classe de protéines appelés « *Silent information 2 regulator* » (SIR) qui sont impliquées dans la régulation du vieillissement de plusieurs organismes tels que la levure, le ver *Caenohabditis elegans* et la drosophile, dont la longévité est accrue par la restriction calorique. Chez les mammifères, les homologues de SIR sont appelés (sirtuines). Les sirtuines catalysent la désacétylation d'histones et des protéines de façon NAD-dépendante, et régulent ainsi un grand nombre de fonctions cellulaires.

La famille de sirtuines chez les mammifères se compose de sept sirtuines découvertes chez l'homme jusqu'à présent (SIRT1-7). Tous ces éléments ont un domaine catalytique NAD^+ dépendant et peuvent agir préférentiellement comme une désacétylase NAD^+ dépendant (DAC) et / ou mono-ADP-ribose transférase (ART). Les séquences N-terminale et C-terminale qui flanquent la base catalytique varient en longueur entre les différentes sirtuines. Les SIRT étaient connues pour être des protéines nucléaires, mais plus récemment, il a été constaté que ces protéines se déplaçaient entre le compartiment nucléaire et cytoplasmique et que leurs fonctions dans le cytoplasme de la cellule était très importante. Parmi les 7 sirtuines mammifères, SIRT1 est la plus étudiée, possédant plus d'une douzaine substrats connus à ce jour et des rôles impliqués dans un large éventail de processus cellulaires, y compris la survie cellulaire et les voies apoptotiques (Michan and Sinclair 2007).

La sirtuine 1 (SIRT1) est un homologue de SIR2 (silent information regulator 2) présent chez les levures. Elle a été identifiée comme un facteur de répression transcriptionnelle au niveau des télomères et de l'ADN ribosomal (Ivy, Klar et al. 1986; Brachmann, Sherman et al. 1995; Smith and Boeke 1997) et sa surexpression prolonge la durée de vie des levures (Kaeberlein, McVey et al. 1999) et du ver *Caenohabditis elegans* (Tissenbaum and Guarente 2001). Bien que les modalités précises du rôle de SIRT1 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. Les différents rôles physiologiques de SIRT1 sont résumés dans la figure 20.

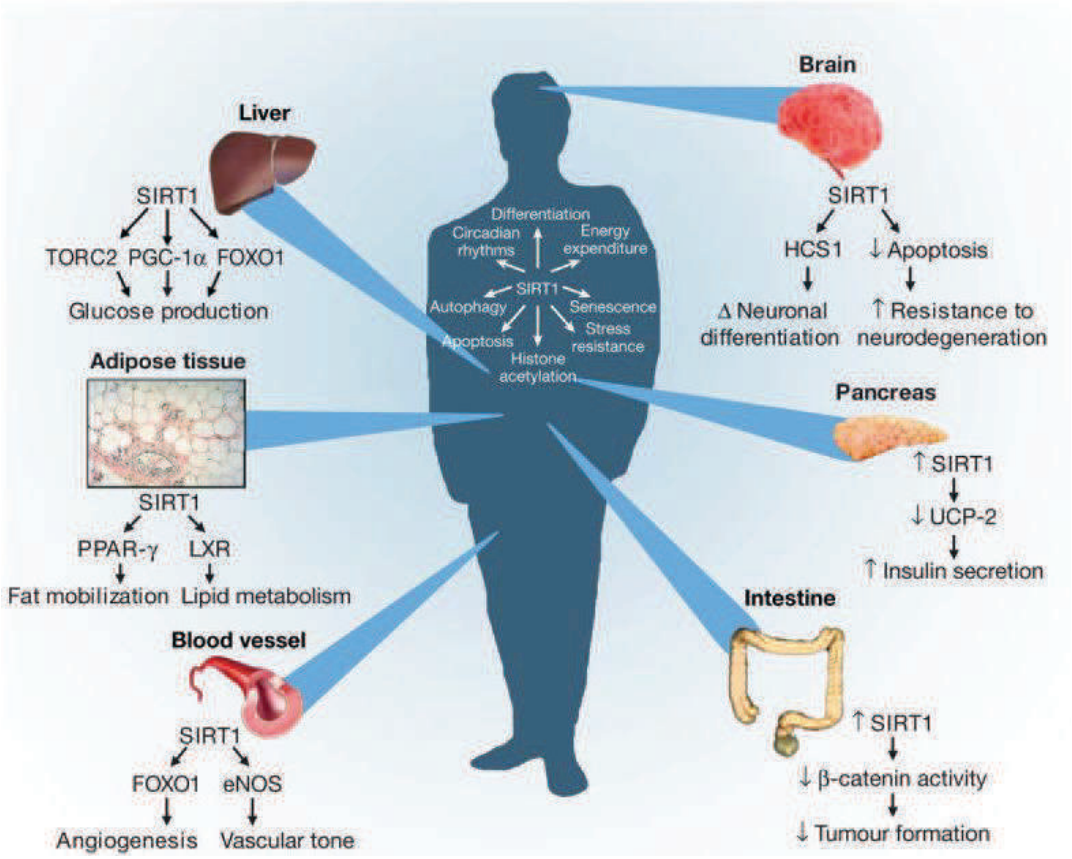


Figure 20 : Différents rôles physiologiques de SIRT1 (Finkel, Deng et al. 2009).

b) Régulation de SIRT1 par l'état nutritionnel

La restriction calorique et le jeûne stimulent la surexpression de SIRT1 chez les mammifères dans plusieurs tissus, y compris le foie, le muscle squelettique et de la graisse (Nemoto, Fergusson et al. 2004). Des résultats discordants ont été rapportés par deux études dans lesquelles la restriction calorique ne produit aucun changement de l'expression ou de la teneur en protéines SIRT1 dans les tissus musculaire et hépatique (Civitarese, Carling et al. 2007; Chen, Bruno et al. 2008).

Rodgers et al. (Rodgers, Lerin et al. 2005) ont montré que l'expression de protéines SIRT1 dans le foie est spécifiquement régulée par le glucose et le pyruvate et non pas par les hormones liées à l'alimentation comme l'insuline ou le glucagon. Le glucose réduit les concentrations de protéines SIRT1, alors que le pyruvate augmente les concentrations de protéines SIRT1 dans les hépatocytes en culture. Le jeûne augmentant les concentrations de pyruvate dans le foie de la souris, ceci est compatible avec une surexpression des protéines SIRT1 induite par le pyruvate (Rodgers, Lerin et al. 2005). Le jeûne augmente également les niveaux de NAD^+, un cofacteur

indispensable pour l'activité de sirtuines (Gerhart-Hines, Rodgers et al. 2007). L'expression de SIRT1 pendant le jeûne semble être régulée positivement par un complexe protéique constitué du facteur de transcription FOXO3a et de la protéine p53.

Par exemple, des souris déficientes en p-53 en condition de jeûne ne surexpriment pas de SIRT1 (Nemoto, Fergusson et al. 2004). Au sien de notre laboratoire, nous avons montré que la CDM entraine une baisse de l'expression de SIRT1 dans le foie, le cœur et le cerveau (Garcia, Gueant-Rodriguez et al. 2011; Pooya, Blaise et al. 2012; Ghemrawi, Pooya et al. 2013).

c) Implication de SIRT1 dans le stress du RE

Il existe une relation entre SIRT1 et le stress du RE. Li et al., ont démontré que la surexpression hépatique de SIRT1 atténue le stress du RE en inhibant la réponse UPR (Li, Xu et al. 2011). Wang et al. ont démontré que XBP1 est désacétylé par SIRT1 (Wang, Chen et al. 2011). Dans les cellules HepG2, SIRT1 a amélioré la résistance à l'insuline induite par le palmitate via la régulation du stress du RE (Jung, Lee et al. 2012).

SIRT1 protège aussi la cellule contre le stress provoqué par une insuffisance nutritionnelle (Grimm et al, 2011; Strum et al, 2009). Une alimentation déficiente en donneurs de méthyles ou riche en graisses ou en glucose (saccharose) induit une diminution de l'expression de SIRT1 chez les rongeurs (Deng, Chen et al. 2007; Chen, Fang et al. 2010; Heyward, Walton et al. 2012; Tang, Xu et al. 2012).

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 désacétyle HSF1 et potentialise sa liaison au promoteur des gènes des chaperonnes moléculaires (Chen, Wang et al. 2005). Récemment, nous avons montré au laboratoire qu'une carence en donneurs de méthyles induit un stress du RE suite à une diminution de l'expression de SIRT1 et une augmentation de la forme acétylée de HSF1 (Ghemrawi, Pooya et al. 2013).

d) SIRT1 et balance méthylation/acétylation des régulateurs et co-régulateurs de l'expression génique

Les récepteurs nucléaires, dont PPAR-α, PPAR-γ, ERR-α, ER-α, HNF4 impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique sont régulés par des mécanismes épigénomiques qui mettent en jeu SIRT1. Les récepteurs nucléaires sont méthylés par les arginine

méthyltransférases CARM1 et PRMT1. L'activation de leur co-régulateur, le récepteur co-activateur 1-alpha de PPAR-γ (PGC-1α), est modulée par phosphorylation et aussi méthylation par PRMT1. La désactivation de PGC-1α est produite par une hypométhylation secondaire à la diminution de l'expression et de l'activité de PRMT1 et une hyperacétylation secondaire à la diminution de SIRT1, selon le schéma ci-dessous.

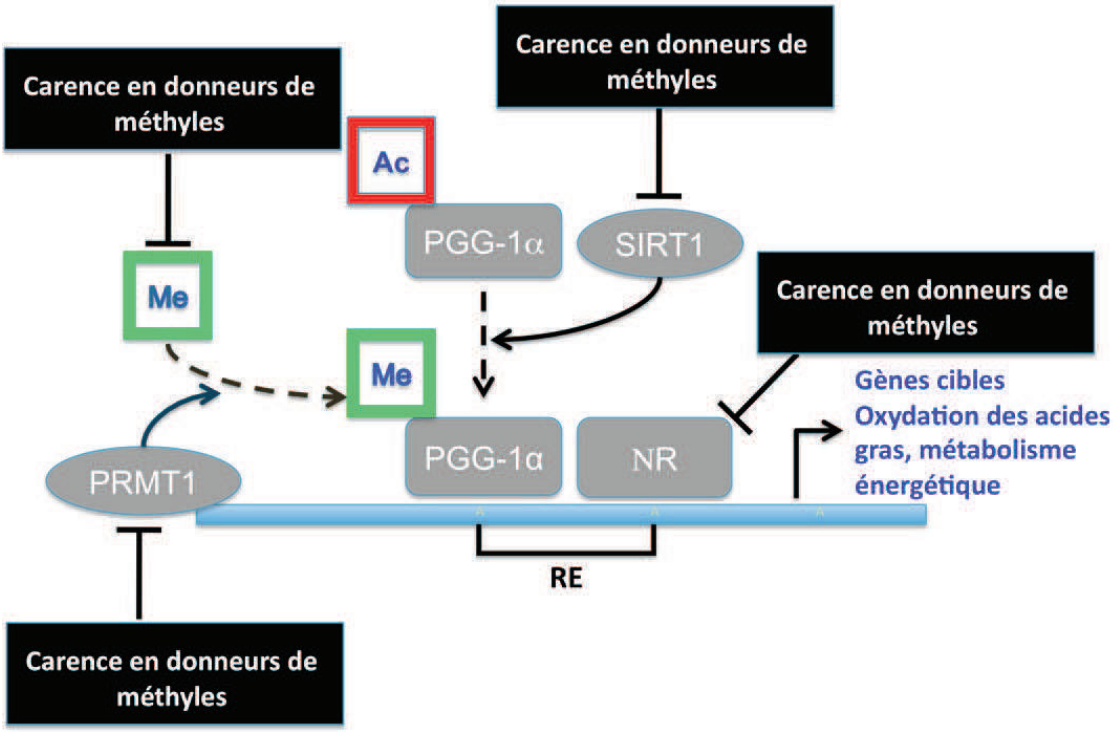


Figure 21 : SIRT1 et balance méthylation/acétylation *La carence en acide folique et en vitamine B12 du modèle du rat "mère gestante et allaitante-progéniture» altère l'oxydation des acides gras et l'activité des complexes 1 et 2 de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette altération est due à une diminution de l'expression des récepteurs des proliférateurs de peroxysomes alpha (PPARα), du récepteur apparenté aux récepteurs des œstrogènes (ERRα), du facteur nucléaire hépatique 4 (HNF-4) et à une inhibition de la co-activation de ces récepteurs nucléaires par PGC-1α qui est le co-activateur de PPAR. L'activité de PGC-1α est diminuée parce que sa méthylation est diminuée et/ou son acétylation est augmentée. Le changement du statut de méthylation/acétylation de PGC-1α est la conséquence de la diminution de l'expression de l'arginine méthyl-transférase PRMT1, de l'augmentation de la concentration cellulaire en S-adénosylhomocystéine (qui agit comme un inhibiteur puissant de l'activité PRMT1) et de la diminution de l'expression de SIRT1 (adapté de (Garcia, Gueant-Rodriguez et al. 2011).*

Le lien entre le déficit en groupements méthyle et la dérégulation de PGC-1α, qui conduit à une diminution de l'oxydation mitochondriale des acides gras, ont été mis en évidence, dans notre modèle animal, sous forme de deux manifestations du syndrome métabolique, la stéatose myocardique et la stéato-hépatite.

5) Stress du réticulum endoplasmique et MICI

Nous avons vu précédemment que les MICI sont la résultante d'une réponse immunitaire inadaptée de la muqueuse intestinale, dirigée contre des éléments de la flore, survenant chez des patients génétiquement déterminés. Une question importante est de savoir si des mécanismes communs de régulation et de maintien de l'homéostasie pourraient jouer un rôle dans les anomalies de réponses inflammatoire et immunitaire observées chez les MICI. En outre, l'importance de l'intégrité physique et fonctionnelle de la barrière épithéliale dans la régulation de l'inflammation apparaît capitale. La perte de l'homéostasie épithéliale lors de modifications environnementales pourrait être due à un déficit de régulation des mécanismes de défense cellulaire comme l'UPR en cas de stress du réticulum endoplasmique.

Des études récentes mettent en lien le stress du RE avec la pathogenèse des MICI. Par exemple les patients ayant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique présentent des signes du stress du RE dans leurs cellules épithéliales du colon et/ou de l'iléon. Le dysfonctionnement de ces cellules peut être dû à un stress du RE. Les études génétiques chez l'homme ont identifié des anomalies génétiques primaires dans plusieurs gènes dont XBP1, AGR2 et ORMDL3 qui codent pour des protéines associées au stress du RE. Il a notamment été démontré d'une part, que des souris déficientes pour le gène XBP-1 développent spontanément des signes rappelant ceux observés chez les patients atteints de MICI, et d'autre part, des études mécanistiques chez ces souris révèlent un impact majeur sur les cellules de Paneth associé à des altérations dans les interactions hôte – pathogènes dans l'intestin, ainsi que l'activation des principales voies pro-inflammatoires chez l'hôte. Le stress du RE est donc considéré comme un facteur majeur du processus inflammatoire impliqué dans les MICI (Kaser, Lee et al. 2008). En outre, l'absence de IRE-1α chez la souris conduit à une sensibilité accrue à la colite expérimentale (Bertolotti, Wang et al. 2001).

6) SIRT1, inflammation et MICI

SIRT1 joue un rôle crucial dans l'inflammation. Il a été démontré que la surexpression de SIRT1 diminue l'expression hépatique de TNF-α et IL-6 chez les souris soumises à un régime riche en graisse (Pfluger, Herranz et al. 2008). Une autre étude a montré qu'une délétion spécifique de SIRT1 augmente l'activité hépatique de NFκB (Purushotham, Schug et al. 2009). Dans les cellules 3T3-L1, la diminution de l'expression de SIRT1 diminue l'acétylation de la sous-unité p65 de NFκB et augmente par conséquence l'activité transcriptionnelle de NFκB sur les promoteurs de IL-6, MCP-1, KC and IL-1β (Ghosh, Spencer et al. 2007). Yoshizaki et al. ont émis l'hypothèse qu'une régulation négative de SIRT1 dans les tissus adipeux des souris et des humains obèses contribue à l'aggravation du statut inflammatoire dans ces tissus adipeux (Yoshizaki, Schenk et al. 2010).

Au niveau de l'intestin, SIRT1 joue un rôle critique dans le contrôle de l'homéostasie intestinale (Kaser, Flak et al. 2011). Le KO SIRT1 chez les souris montre l'implication de SIRT1 dans le contrôle de l'homéostasie intestinale (en favorisant l'apoptose et en inhibant la prolifération) et de la motilité gastro-intestinale (en réduisant la vidange gastrique et l'activité contractile intestinale) (Wang, Shi et al. 2012). Récemment, deux études suggèrent que SIRT1 traite la colite induite par le DSS chez les souris (Cui, Jin et al. 2010; Singh, Singh et al. 2010).

OBJECTIFS D’ETUDE

Le travail que j'ai réalisé au cours de ma thèse s'inscrit dans le cadre des recherches visant à mieux comprendre les mécanismes de mise en place des MICI et à proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Il est important d'identifier les mécanismes moléculaires par lesquels une carence en donneurs de méthyle pourrait influencer l'inflammation intestinale chez les patients souffrants de MICI.

Compte tenu des liens entre la carence en donneurs de méthyle, le stress du réticulum endoplasmique et les MICI et compte tenu de l'impact de la carence en donneurs de méthyle sur l'expression de SIRT1 dans différents tissus et du rôle de SIRT1 dans la mise en place du stress du RE, il est possible d'envisager l'implication de SIRT1 dans le processus pathologique des MICI. L'objectif général de mon travail de thèse était d'aborder cette question en étudiant l'impact des carences en donneurs de méthyle sur l'inflammation intestinale.

Nous avons cherché à répondre à 3 questions :

1- Une CDM induit-elle un stress du RE dans l'intestin ?

2- L'activation de SIRT1 protège-t-elle de la colite en diminuant le stress du RE causé par la CDM ?

3- L'expression de SIRT1 est-elle diminuée dans les MICI chez l'homme ?

APPROCHE EXPERIMENTALE & METHODOLOGIE

1) Modèle animal

1.1) Conditions d'élevage

Les expérimentations ont été réalisées sur 50 rates femelles Wistar adultes (Charles River, l'Arbresle, France). Les animaux ont été maintenus dans une animalerie à une température ambiante de 22-23°C, un cycle lumière/obscurité de 12 h, avec un libre accès à la nourriture et à l'eau. Les manipulations ont été effectuées selon les recommandations du Comité National de Réflexion d'Ethique sur l'Expérimentation (décrites dans le « Guide for care and use of laboratory animals » NIH, MD, 1985)

1.2) Carence alimentaire

Les femelles ont été réparties en 2 groupes distincts : un groupe carencé recevant une alimentation dépourvue de donneurs de groupements méthyles (n=13) : vitamines B12, folates et choline (Special Diet Service, France) et un groupe contrôle recevant une alimentation normale (n=7) (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, France). Ces régimes ont été maintenus pendant 4 mois.

1.3) Modèle de colite, endoscopie et analyse anatomie pathologique

Quatre mois après le début de la carence, la colite a été induite chimiquement par l'administration du DSS (5%) dans l'eau de boisson pendant 7 jours (Figure 22). Les rats ont été séparés dans 4 groupes distincts groupe:

1. Rates nourries avec le régime standard et sans traitement DSS utilisées comme groupe contrôle (nommées C DSS-, n = 5)

2. Rates nourries avec le régime carencé en donneurs de méthyles et non traitées avec le DSS (nommées D DSS-, n = 10)

3. Rates nourries avec le régime standard et traitées avec le DSS (nommées C DSS+, n = 10)

4. Rates nourries avec le régime carencé en donneurs de méthyles et traitées avec le DSS (nommées D DSS+, n = 10)

La colite a été évaluée cliniquement en calculant le score de colite « disease activity index » (DAI). Ce score a été calculé selon les paramètres suivants : perte de poids, consistance des selles et sang dans les selles (Tableau 6) (Murthy, Cooper et al. 1993).

Score	Perte de poids	Consistance des selles	Saignement rectal
0	**Aucune**	**Normale**	**Aucun**
1	**1%-5%**		
2	**5%-10%**	**Molles**	
3	**10%-20%**		
4	**> 20%**	**Diarrhée**	**Saignement sévère**

Tableau 6 : Score « disease activity index » (DAI) (Murthy, Cooper et al. 1993).

Avant sacrifice, la colite a été évaluée par endoscopie à J7, chez un rat par groupe ne recevant pas de DSS et chez deux rats par groupe recevant du DSS. Les rats ont été mis à jeun 12 heures avant l'examen. Durant la procédure, les rats sont anesthésiés par inhalation d'isofurane. Le dispositif expérimental de coloscopie (Karl Storz, Tuttlingen, Allemagne) est un endoscope miniature (diamètre 2 mm), muni d'une source de lumière de type xénon, d'une caméra, et d'une pompe à air à débit réglable permettant une insufflation régulière du colon des rats. Ainsi, le mini endoscope est introduit par l'anus (préalablement traité avec un agent lubrifiant) et le colon est insufflé avec la pompe à air. L'acquisition vidéo de l'examen endoscopique est affichée sur un écran couleur (Telepack VetX Endoscopic video) et enregistrée numériquement sur le disque dur de l'ordinateur (Dell Vstro 3350), grâce à un logiciel d'acquisition vidéo (Pinnacle « Studio Movie Board Plus »). Des photos peuvent également être prises.

Des coupes de colon de 3 µm d'épaisseur et sont colorées à l'Hematoxyline-Eosine-Safran (HES).

Les scores endoscopiques et histologiques ont été calculés selon les critères décrits dans (Becker, Fantini et al. 2005) (Riley, Mani et al. 1991) respectivement.

1.4) Prélèvement des échantillons tissulaires, de selles et sanguins

Les selles ont été prélevées avant le début du traitement DSS chez tous les rats et ont été stockées à -80°C en vue d'analyse de flore intestinale. Les rates sont sacrifiées 7 jours après le début du traitement DSS par décapitation.

Le sang est prélevé au moment du sacrifice dans un tube contenant de l'EDTA. Le sérum est récupéré après centrifugation du sang total.

Quatre sites tissulaires ont été prélevés : colon, intestin grêle proximal, intestin grêle distal et graisse mésentérique. Les prélèvements destinés aux études histologiques sont récupérés par dissection et conservés dans du formol (4% contenant 10% de méthanol et tamponné à pH 7,2 avec un tampon phosphate 0,1 M) en vue d'être inclus en paraffine. Ceux destinés aux extractions d'ARN et protéines sont congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C. Les prélèvements pour immunofluorescence sont congelés dans du méthylbutane maintenu entre -20 et -30°C puis stockés à -80°C.

1.5) Traitement SRT

Le SRT1720 a été dissout dans un mélange PEG (20% polyéthylène-glycol, 5% triton). Il a été administré par gavage quotidiennement durant 7 jours avant le traitement avec le DSS et 7 jours pendant le traitement avec le DSS pour 3 groupes distincts :

1. Rates nourries avec le régime standard et traitées avec le DSS (nommées C DSS+ SRT+, n = 5)

2. Rates nourries avec le régime carencé en donneurs de méthyles et traitées avec le DSS (nommées D DSS+ SRT+ n = 5)

3. Rates nourries avec le régime carencé en donneurs de méthyles et non traitées avec le DSS (nommées D DSS- SRT+, n = 5)

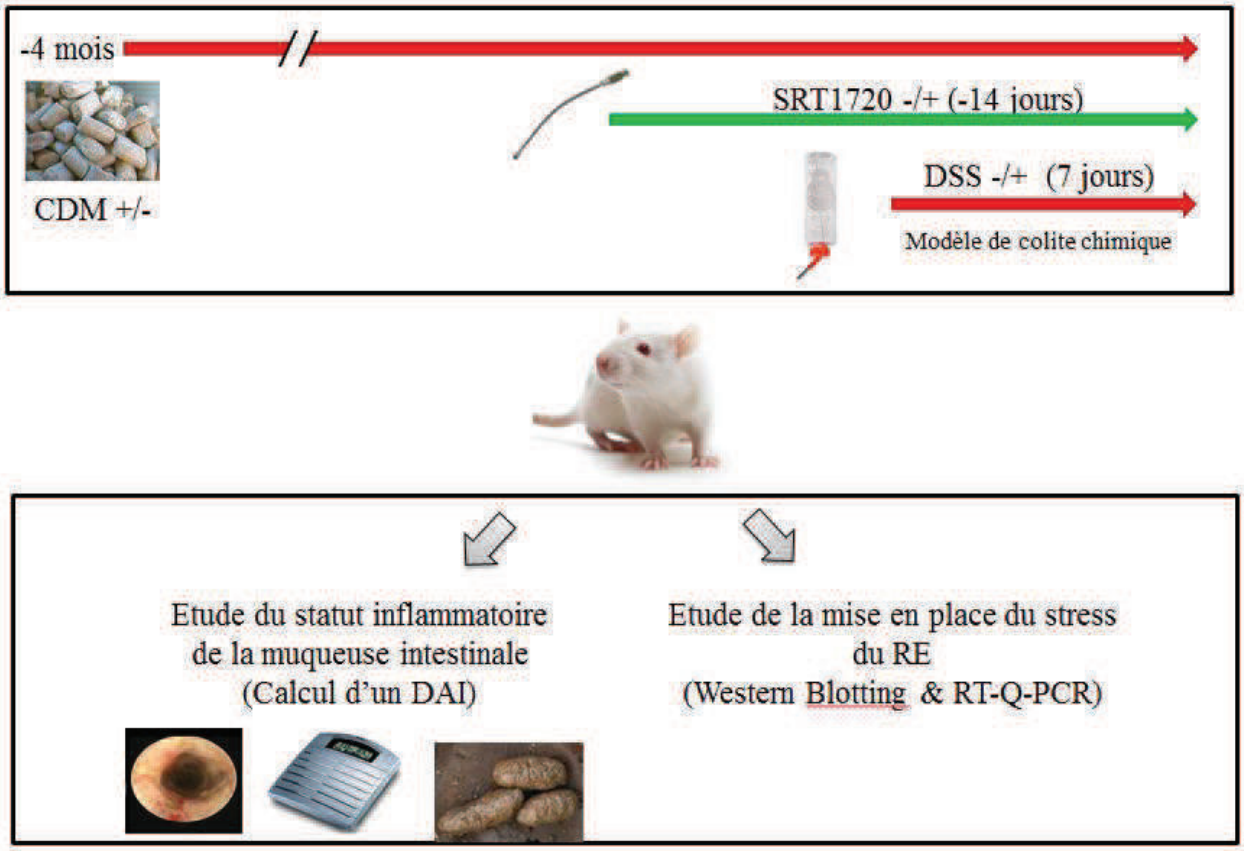


Figure 22 : Protocole d'étude *in vivo*.

2) Modèle cellulaire

2.1) Matériels

a) Lignées cellulaires

La lignée cellulaire utilisée est la lignée TC7, un sous-clone de cellules Caco-2, issues de carcinomes de colon humain provenant de la banque « European Collection of Cell Culture » (ECACC, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

b) Réactifs de biologie cellulaire

Le milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), le sérum de veau fœtal (SVF), les solutions de Pénicilline-Streptomycine (10000 U/ml), de sodium pyruvate, de trypsine-EDTA, le tampon phosphate (PBS) proviennent de Life Technologies-Gibco BRL (Gaitherburg, MD, USA) et l'agent de transfection ExGen 500 provient de chez Euromedex (Souffelweyersheim, France).

c) Réactifs de biologie moléculaire

Le SYBR Green, le kit RNAeasy et le kit QuantiTect Reverse Transcription sont fournis par Qiagen (Cologne, Germany), Le plasmide pcDNA3 utilisé pour le clonage de la protéine TCII oléosine est fourni par Invitrogen (France).

d) Réactifs biochimiques

La membrane de transfert polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) est fournie par Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). L'albumine sérique bovine (BSA) est fournie par SIGMA-ALDRICH (St-Quentin, France). Les anticorps primaires HSF1, BiP, IRE-1α, PERK, phospho-PERK, eIF-2 α, phospho-eIF-2 α, acetyl-lysine, HSP27, HSP90 sont fournis par Cell Signaling (Saint Quentin en Yvelines, France), ATF-6 α, SIRT1 sont fournis par Santa Cruz (Nanterre, France), phospho-IRE-1α Novus Biologicals (Montluçon, France), XBP1 Biodesign (Memphis, TN, USA), ATF4 Abnova (Le Perray en Yvelines, France). La B12 radiomarquée au [57Co] est fournie par MP BIO (Strasbourg, France). L'hydroxycobalamine, la SAM, la TG, l'EX527 sont fournies par Sigma (Lyon, France). L'agoniste de SIRT1 SRT1720 est fournie par Euromedex (Strasbourg, France).

2.2) Méthodes

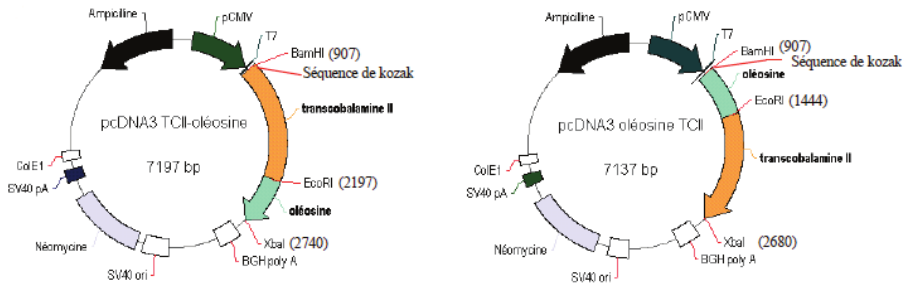
a) Culture en monocouche

Les Caco-2 sont mis en culture dans du milieu complet DMEM (1/1) (Invitrogen-Gibco, Cergy-Pontoise, France) supplémenté en sodium pyruvate (1 mM), en pénicilline (100 IU/ml), en streptomycine (100 µg/ml), en et en sérum de veau fœtal (SVF) (10%, v/v) (Invitrogen). Elles sont cultivées à 37°C et en atmosphère humide contenant 5% de CO_2. Lorsque la confluence est atteinte, le passage des cellules s'effectue après utilisation d'une solution de trypsine-EDTA (0,02%) (Invitrogen). Le tapis cellulaire est préalablement rincé au PBS (sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}) et mis en présence de trypsine. L'action enzymatique est ensuite neutralisée à l'aide du milieu complet. Les cellules sont récupérées après centrifugation à 500 tours/min pendant 5 min et ensemencées à raison de 1,5 millions de cellules par flasque de 75 cm2 ou dans des plaques six puits (Falcon, Dutscher, Brumath, France) à raison de $5x10^5$ cellules par puits.

b) Transfection stable de cellules TC7 par le pcDNA3-TCII-oléosine, pcDNA3-oléosine-TCII

Afin d'avoir des cellules carencées ou non en vitamine B12, une transfection stable a été réalisée sur les Caco-2 par :

- ✓ Un plasmide Transcobalamine-Oléosine (**TO**), capable de séquestrer la vitamine B12 pour donner des cellules TO carencées en vitamine B12.
- ✓ Un plasmide Oléosine-Transcobalamine (**OT**), incapable de séquestrer la vitamine B12 pour donner des cellules OT contrôle.



L'ADNc codant TCII-oléosine, oléosine-TCII a été cloné au niveau des sites de restriction *BamH* I et *Xba* I du polylinker. 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 une origine de réplication d'*E. coli*.

Les Caco-2 ensemencées à 5.10^5 dans une plaque de 6 puits, dans 2 mL de milieu de culture et ont été cultivés dans le milieu DMEM contenant 10% (v/v) de SVF jusqu'à 80% de confluence. Une heure avant la transfection le milieu de culture a été remplacé par 3 mL de milieu sans SVF. La transfection des Caco-2 est réalisée au moyen d'ExGen 500 (Euromedex).

Pour chaque transfection nous avons préparé les solutions suivantes :

- ✓ 2µg du plasmide d'intérêt dans du NaCl 150 mM filtré pour un volume final de 50 µL. Cette solution a été homogénéisée au vortex et centrifugée brièvement.
- ✓ 6µL d'Exgen dans du NaCl 150 mM filtré pour un volume final de 50 µL. Cette solution a été homogénéisée au vortex et centrifugée brièvement.

La solution d'Exgen a été ajoutée à la solution d'ADN et incubée 10 min à température ambiante avant dépôt sur les cellules. Après 2h, le milieu est remplacé par du DMEM contenant 10% de SVF. 48h après la transfection, la sélection des clones a été réalisée en ajoutant dans le milieu de culture classique de la G418 à 1,1mg/mL. Environ 10 jours après le début de la sélection, des clones cellulaires commencent à apparaître. Au bout d'environ trois semaines les clones contiennent suffisamment de cellules pour pouvoir les isoler par la méthode des anneaux de clonage en ayant un bon pourcentage de survie des clones.

c) Congélation des cellules

Les cellules sont congelées dans leur milieu de culture contenant du DMSO (10%). Avant d'être stockées dans l'azote liquide, elles sont incubées une nuit à -80°C dans une boîte de cryo congélation (Nalgene) contenant de l'isopropanol.

d) Décongélation des cellules

Après décongélation de l'aliquote de cellules dans un bain-marie préalablement chauffé à 37°C, la suspension cellulaire est récupérée de façon stérile et lavée deux fois avec du milieu de culture ajouté goutte-à-goutte afin de ne pas soumettre les cellules à un choc osmotique. A ce terme, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 500 g durant 8 minutes et suspendues dans du milieu de culture.

e) Liaison de la TCII à la vitamine B12 radiomarquée

Afin de tester la capacité des cellules transfectées par le plasmide à séquestrer la vitamine B12, un test de liaison de la TCII à la vitamine B12 radiomarquée a été effectué avant et après chaque traitement. Les cellules ont été décollées de la manière habituelle puis laver dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}. Puis les cellules ont été re-suspendues dans du tampon TBS (Tris 200mM, NaCl 1.5M, ph 7.4 ajusté avec HCL) contenant un cocktail d'antiprotéase. Par la suite les cellules ont été lysées avec une seringue puis incubées avec 5µl de B12 radiomarquée au [57Co] sous agitation rotative pendant 30 min à 4°C. Après incubation, les cellules ont été centrifugées pendant 30 min à 12000g à 4°C, et un comptage a été effectué sur le surnageant et le culot avec le compteur multi-puits (Compteur Gamma multi-puits, MultiGamma 1261 (LKB-Wallac)).

f) Extraction des protéines

- ✓ Extraction protéique tissulaire

Les tissus ont été broyés manuellement sur carboglace et dans l'azote liquide afin d'éviter la dégradation protéique. Les différentes structures tissulaires sont lysées par du tampon de lyse (kit d'immunoprécipitation (Protéine A), Roche Diagnostics, Allemagne). Suite à 3 cycles de congélation/décongélation, les tubes sont centrifugés à 12000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé à -80°C.

- ✓ Extraction protéique cellulaire

Les boîtes de Pétri sont incubées avec 600 µL de tampon d'extraction RIPA (1 % Triton X-100, 1 % de sodium deoxycholate, 0,1 % de sodium dodecyl sulfate (SDS), 0,2 M de sodium orthovanadate, 0,5 mM de dithiothreitol, 200 mM de béta-glycerol phosphate et 20 mM d'inhibiteur de protéase) pendant 10 min sur glace, puis les cellules sont grattées à l'aide d'un râteau et transférées dans des micro-tubes. Suite à 3 cycles de congélation/décongélation, les tubes sont centrifugés 30 mn à 12000g à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est conservé à -20°C.

g) Dosage protéique par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

Le dosage des protéines totales s'effectue avec le kit BCA Protein Assay® Reagen (Uptima). C'est une méthode colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique (BCA). En milieu alcalin, les

protéines réduisent proportionnellement les ions cuivriques (Cu2+) en ions cuivreux (Cu+). Le BCA est un réactif chromogène réagissant avec les ions cuivreux pour former un complexe violet avec un pic d'absorbance à 562 nm. La concentration en protéines est déterminée à l'aide d'une gamme étalon préparée à partir d'une solution de BSA (Bovine serum albumin) à 2 mg/ml.

h) Western Blot: immunodétection sur membrane

Le Western blot est une méthode de détection de l'expression des protéines, comportant trois étapes : une séparation des protéines sur gel (SDS-PAGE), un transfert des protéines sur un support solide et une immunodétéction rendue possible grâce au couplage à une enzyme peroxydase.

1. Électrophorèse

L'électrophorèse est basée sur une méthode de séparation des protéines en fonction de leur taille au travers d'un gel de polyacrylamide. Le pH élevé du gel ainsi que la présence de SDS dans le tampon de charge assure une charge négative à toutes les protéines qui peuvent alors migrer uniformément sous un champ électrique. La séparation des protéines en conditions dénaturantes, grâce à la présence de beta mercaptoethanol, permet ainsi la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire.

L'électrophorèse est réalisée dans un système de migration verticale (Mini Protean III, BioRad, USA). Les échantillons sont dénaturés dans le tampon de charge (v/v) (5 à 8 mn à 100°C) puis sont déposés, ainsi que le marqueur de poids moléculaire, dans les puits du gel de concentration. Les protéines migrent à voltage constant de 80 V pendant 30 mn puis de 110 V, dans le tampon de migration dilué à T° ambiante. La migration se fait sur gel de polyacrylamide Tris-glycine de 8 à 12% selon le poids moléculaire de la protéine d'intérêt.

Pour le cas particulier des défensines, la migration se fait sur un gel de polyacrylamide Tris-Tricine. Dans ce cas, deux tampons de migration différents (anode et cathode) sont utilisés.

2. Transfert

Les protéines séparées sont transférées sur une membrane de nitrocellulose hydratée dans une solution de transfert. Le transfert se fait à l'aide d'un système de transfert en milieu liquide (Bio-Rad, USA) pendant 45min à 350 mA.

3. Immunoblot

La membrane est placée dans la solution de blocage (TBST-BSA 5%) pendant 1 h sous agitation lente à T° ambiante, pour saturer les sites aspécifiques de la membrane, puis incubée pendant une nuit à 4°C sous agitation lente avec un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt. Suite à 4 lavages de 10 min avec du TBST, la membrane est incubée pendant 1 h sous agitation lente avec un anticorps secondaire, spécifique au premier, et couplé à l'HRP (HorseRadish Peroxydase) à T° ambiante. Les anticorps sont dilués dans la solution de blocage. Après 4 lavages avec du TBST, la révélation est réalisée par chimiluminescence (ECL, Bio rad, USA). La peroxydase, en présence de son substrat, le luminol, émet de la lumière détectée par l'appareil Fusion FX7 (ThermoFisher).

i) Immunoprécipitation des protéines

Après extractions dans le tampon de lyse spécifique (kit d'immunoprécipitation (Protéine A), Roche Diagnostics, Allemagne) et dosage protéique, 800µg de protéines de chaque échantillon ont été prélevés en vue de l'immunoprécipitation dirigée respectivement contre les protéines acétylées. Un prélavage est réalisé par incubation des échantillons avec la suspension protéine A-agarose (kit d'immunoprécipitation (Protéine A), Roche Diagnostics, Allemagne) sur une nuit. Après centrifugation 20 secondes à 12000g, le surnageant est récupéré. L'immunoprécipitation est réalisée par ajout de l'anticorps HSF1 et de la protéineA-agarose (kit d'immunoprécipitation (Protéine A), Roche Diagnostics, Allemagne) à l'échantillon qui est incubé sur une nuit. Après centrifugation 20 secondes à 12000g, le culot est récupéré et est soumis à trois tampons de lavage spécifiques (kit d'immunoprécipitation (Protéine A), Roche Diagnostics, Allemagne). Enfin, le culot est resuspendu dans un tampon de dépôt spécifique du Kit.

j) Analyse de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel

- ✓ Extraction d'ARN total, quantification et test de qualité

L'extraction est réalisée à l'aide du RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen) pour les cellules. Les extractions d'ARN à partir des cellules HT29 ont été effectuées partir de 2 expériences indépendantes.

Les ARN sont libérés par lyse cellulaire puis séparés sur membrane de silice. Pour éviter toute contamination avec de l'ADN génomique (ADNg), les lysats sont d'abord passés sur une colonne d'élimination d'ADNg. Les ARN extraits sont quantifiés par lecture de la densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre (Biophotometer, Eppendorf), après dilution au 60ème des échantillons, leurs concentrations sont déterminées à 260 nm (1 unité de DO correspond à 40 µg/mL d'ARN). Les échantillons sont ensuite stockés à -80ºC.

- ✓ Transcription inverse et Amplification par Réaction en Chaîne (RT-PCR)

La transcription inverse est réalisée à l'aide du QuantiTect-Reverse transcription Kit (QIAGEN) contenant une étape d'élimination d'ADNg. Il a été optimisé pour la réaction d'amplification en chaîne avec le kit Quanti-Tect-SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN). 1 µg d'ARN totaux extraits est d'abord mélangé au tampon d'élimination d'ADNg puis la synthèse d'ADNc est réalisée grâce à un bloc thermostaté (Techne) à l'aide de la transcriptase inverse et un mix contenant un mélange d'amorces poly-dT et le tampon de rétro-transcription. Les ADNc obtenus sont ensuite conservés à -80ºC. Il a été procédé à 3 RT indépendante pour l'analyse de l'expression de chaque gène.

- ✓ PCR Quantitative

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la répétition de trois processus : la dénaturation des 2 brins d'ADN, l'hybridation d'oligonucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence cible d'ADN monocaténaire; et la réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable à partir des oligonucléotides. La mesure de l'expression des ARNm, est basée sur l'utilisation d'un agent intercalant fluorescent, le SYBR Green dont la fluorescence est mesurée par le thermocycleur ICycler (Bio-Rad) à la fin de la phase d'élongation de chaque cycle; permettant le suivi de l'amplification en temps réel. L'enregistrement de la fluorescence permet de définir une valeur de Ct (cycle threshold ou cycle seuil) correspondant au nombre de cycles d'amplification à partir duquel la valeur de l'intensité de fluorescence est significativement différente du bruit de fond. Cette valeur est à la base des calculs pour quantifier l'ADN d'une façon absolue ou relative. Plus le Ct est élevé (>35), moins l'ARNm détecté est présent, car il faut plus de cycles PCR pour pouvoir détecter l'amplification fluorescente. Pour finir, une courbe de fusion a été réalisée en augmentant graduellement la température à 85ºC. Ceci permet d'évaluer la température de fusion

de l'amplicon afin d'en apprécier sa pureté et son efficacité. Cette technique permet de faire une quantification relative de gènes d'intérêt dans les échantillons par rapport à un gène de référence dont l'expression varie peu dans les conditions expérimentales.

Les échantillons sont analysés dans des plaques destinés au l'ICycler. La réaction de PCR est réalisée avec 1 µL d'ADNc (dilué au ¼) comme matrice mélangé avec le SYBR Green qPCR Master Mix complémenté avec les amorces (Eurogentec) spécifiques du gène de référence (ARN polymérase 2) ou des gènes d'intérêt (Tableau 7). Deux puits sont destinés aux blancs pour le contrôle de contamination par l'ADNg et deux puits sont destinés au calibrateur. L'analyse des résultats se fait grâce au logiciel "ICycler" (Bio-Rad).

Les paramètres utilisés pour la qPCR ont été déterminés sur une gamme de dilution, grâce à une mise au point de la concentration d'amorces, puis de la T° d'hybridation.

Gène	Amorces	Conditions Animaux	Conditions Cellules
ATF4	Sens : 5'- CCT ACTCTGCTGCTTAACTCTAAC-3' Anti-sens : 5'- ACTCCAGGTGGGTCATAAGGTTTG3-3'	0,5µM/56°C	1µM/56°C
PolII	Sens : 5'-GCATTAACATCAGGAACAATAAAGGC-3' Anti-sens : 5'- GATCTCTCTAAAGTTGACCTCATTGG-3'	0,75µM/ 56°C / 3,5mM $MgCl_2$	1µM/ 56°C / 3,5mM $MgCl_2$

Tableau 7 : Séquences des amorces sens et anti-sens permettant d'amplifier les cDNA d'intérêts aux températures d'hybridation et conditions d'amplification sur le LightCycler correspondantes.

k) Analyse qualitative de l'ARN/ADN sur gel d'agarose

L'intégrité des ARN totaux extraits est visualisée après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. Le principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose repose sur la migration des molécules d'acides nucléiques et de leurs séparations selon leur taille. A potentiel Hydrogène (pH) basique, l'ARN est chargé négativement due aux charges négatives portées par les groupements phosphates. Dans du tampon Tris, acide borique, EDTA (TBE) 1X (pH 8) et sous l'impulsion d'un champ électrique, l'ARN va migrer vers l'anode en fonction de sa taille. Le gel contient 1,5% d'agarose et est coulé avec du bromure d'éthidium (BET) dilué au 1/20 000. Le BET, agent intercalant de l'ADN, est une molécule qui va s'intercaler entre les bases des nucléotides de l'ADN et émettre

une fluorescence une fois excitée par les rayons UV. Le marqueur de poids moléculaire Benchtop 100bp DNA Ladder (Promega Corporation, Madison, WI, USA) est déposé afin de contrôler la taille des fragments d'ARN. La migration s'effectue dans du tampon TBE 1X sous un champ électrique de 130 Volts durant 45 minutes. Le gel est visualisé sur une plaque UV (312 nm) par Image Master™ VDS (Pharmacia Biotech). D'après la photographie du gel, on observe la présence des deux bandes correspondant aux ARN ribosomaux 28S et 18S ; aucun signe de dégradation n'est visible (« smeare »), par conséquent cela indique une bonne qualité des ARN totaux.

l) Marquage immunohistologique

Le but de l'IHC est la mise en évidence d'antigènes sur une coupe de tissu qu'il soit préalablement fixé ou congelé. L'antigène est d'abord reconnu par un anticorps primaire spécifique, celui-ci étant ensuite révélé par un anticorps secondaire couplé soit à un fluorochrome ou par une réaction colorimétrique. Au sein du laboratoire d'Anatomie pathologique du CHRU Hôpital Central de Nancy, le système d'amplification et de révélation utilisé est celui de la technique « Flex+ lapin » EnVision™ FLEX (Dako, Carpinteria, CA, USA). Cette technique utilise un kit commercialisé par Dako et est réalisée sur l'automate Autostainer Plus Link® Dako (Glopstrup, Denmark). Ce système permet une amplification du signal de 2 à 3 fois par rapport à une technique streptavidine-biotine standard et permet d'éviter un signal non spécifique généré par les biotines endogènes.
Schématiquement l'antigène est détecté par un anticorps primaire de lapin. Celui-ci se lie à un anticorps secondaire anti-lapin. Ce dernier se fixe à un polymère composé d'un dextrane lié à des anticorps de chèvre se fixant aux immunoglobulines de lapin et à de multiples molécules de péroxydase. Le montage est ensuite révélé par un système chromogène-substrat avec l'ajout de péroxyde d'hydrogène et de diaminobenzidine (DAB).

Les tissus sont fixés dans du formol à 10% (v/v) pendant 24H. Ils sont ensuite mis en cassette, déshydratés et imprégnés de paraffine dans un automate de type VIP ™ (Excelsior, Dako) par passages successifs dans des bains de formol, d'alcool, de toluène et de paraffine. Les blocs de paraffine ainsi obtenus, sont ensuite débités en coupes de 3 µM d'épaisseur. Les coupes sont ensuite étalées sur des lames de verre traitées à la Polysine™ (Dako), séchées pendant 5 min sur une platine chauffante à 58°C puis placées à l'étuve à 56°C pendant 1 à 2 heures. Le déparaffinage et le

démasquage des sites antigéniques sont réalisés dans le même temps dans un bain-marie PTLink™ DAKO en tampon citrate pH 6,0 pendant 20 min à 97°C.

Les coupes sont ensuite rincées avec une solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 (±0,1) pendant 5 min. Les péroxydases endogènes sont bloquées par incubation pendant 5 minutes avec le réactif EnVision™ FLEX Peroxidase-BlockingReagent (SM 801) puis lavées 2 fois pendant 5 minutes avec le tampon Tris. Les lames sont incubées pendant 1h avec l'anticorps primaire (SIRT1, 1:200 ; Santa Cruz Biotechnology), dilué à l'avance avec le diluant EnVision™ FLEX Antibody Diluent (DM 830) (soit un tampon Tris, pH 7,2, NaN3 15mmol/L). Puis deux lavages sont effectués pendant 5min dans une solution de tampon Tris. Les coupes sont ensuite incubées avec le réactif EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (SM 805) (soit une solution tampon contenant une protéine stabilisante et un agent antimicrobien) pendant 15 min. Les lames sont lavées deux fois pendant 5 minutes dans une solution Tampon Tris. Les coupes sont ensuite incubées pendant 20 minutes avec le réactif EnVision FLEX/HRP (SM802). Deux rinçages de 5 minutes dans une solution tampon Tris sont effectués. Les coupes sont ensuite incubées pendant 10 minutes avec le substrat Chromogène (SM 803). Un rinçage de 5 minutes avec une solution de Tampon Tris est réalisé. Les coupes sont ensuite contre-colorées avec de l'hématoxyline (EnVision FLEX Hematoxylin / SM806) pendant 5 minutes. Deux rinçages de 5 minutes dans une solution tampon Tris sont effectués, puis les coupes sont rincées dans l'eau distillée. Après déshydratation dans l'éthanol et passage dans le toluène, les lamelles sont montées à l'Eukitt^{R}. A noter qu'un témoin négatif est réalisé en omettant l'anticorps primaire afin de vérifier que les signaux observés ne sont pas liés au système de révélation de l'anticorps primaire.

m) Différents traitements effectués *in vitro*

Produit	Concentration	Durée de traitement
B12 (Hydroxycobalamine)	20µM	7 jours
SAM	75 µM	5 jours
TG	1µM	5 heures
EX527	1µM	7 heures
SRT1720	5µM	8 heures

n) Dosage de l'homocystéine, MMA, SAM et SAH, folates, vitamine B12

✓ Dosage des vitamines B12 et B9 (folates)

Les dosages ont été effectués sur des échantillons de plasma après centrifugation (1000g/4°C/10min) à l'aide du coffret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals).
Il s'agit d'un dosage radio-isotopique. La vitamine B12 et les folates non marqués entrent en compétition avec leurs homologues marqués (vitamine B12 [57Co] et folates [125 I]) vis-à-vis d'un nombre restreint et constant de sites de fixation. Par conséquent, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon. Grâce à cette technique, les taux de vitamine B12 et de folates sont déterminés simultanément dans un seul tube, et la radioactivité de rayonnement gamma est mesurée par un compteur COBRA-IIrTM autogamma(Packard) à double canal.
Le coffret SimulTRAC-SNB renferme du facteur intrinsèque de porc purifié, disponible pour la liaison avec la vitamine B12, et fixé de manière covalente sur un support solide. Le même principe est appliqué pour les folates, en fixant sur un support un réactif de liaison lacté produit à partir du lait de vache. Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant :une droite d'étalonnage en 6 points est faite pour la vitamine B12 (0, 74, 148, 296, 740 et 1480pM) et pour les folates (0, 2.3, 4.5, 9.1, 23 et 45 nM).

✓ Dosage de l'homocystéine

La concentration plasmatique en HCY a été mesurée au Service de Biochimie du CHU de Nancy-Brabois par une technique de chromatographie liquide à ultra-haute performance (Acquity UPLC HSS T3 (1.8 µm ; 2.1 x 50 mm, Waters)) couplée à la détection par spectrométrie de masse (4000 QTrap Applied Biosystems / MDS Sciex).

Préparation des réactifs

- Préparation d'aliquots de solutions mères de standards non deutérés et deutérés à 1 mmol/

	Homocystine①	**Homocystine d8**② **(98%)**
Poudre (mg) *	13,27	13,8
HCl 0,1 N *(T° amb, hormones)*	50 mL	50 mL
	Vortexer, Soniquer	
NaOH 10 M (+ 4°C, hormones)	1 mL	1 mL
Dithiotréitol (DTT)	132,7 mg	132,7 mg
HCl 0,1 N	qsp 100 mL	
	Vortexer, Soniquer	
Concentration solution mère	1 mM d'homocystéine	1 mM d'homocystéine d4
Aliquoter par fraction de 0,7 mL Congeler à – 20°C.		

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

Préparation de la gamme d'étalonnage

- Diluer S8 au ½ jusque S1 dans le pool de plasma :

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

Préparer le mélange de standards internes

- 150 µL de **HCYd4** à 1 mmol/L
- 150 µL d'**ac succinique d6** à 1 mmol/L
- 10 µL d'Ac. Méthylmalonique (**MMA) d3** à 2 mmol/L
- 4,5 mL de DTT 2200 mmol/L

Préparation des contrôles d'homocystéine

- Plasma Control Level I (n°0072) + II (n°0073) lyophilizé③
- Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée HPLC grade, laisser reposer 10 à 15 min et agiter jusqu'à dissolution totale. Faire des aliquots de 200 µL à conserver à -20°C

Préparer une solution d'extraction de méthanol contenant 0,1% (v/v) d'acide formique④

Préparation des échantillons

- Décongeler les plasmas, les vortexer et les centrifuger (10 min, 2300 *g* à 4°C)
- Allumer la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffe)

Dans un tube de 1,5 mL en polypropylène :

	Double blanc	**Standards S0**	**Standards S1 à S8**	**Contrôles (pool, levels 1 et 2)**	**Plasma**
Echantillon	50 µL pool	50 µL Pool	50 µL	50 µL	50 µL
Standard interne	0	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
DTT 200 mM	50 µL	0	0	0	0
Vortexer ATTENDRE 15' à température ambiante					
meOH 0,1% ac. formique	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

- Vortexer et incuber 30 min à 4°C
- Vortexer et centrifuger à 20 000 *g* pendant 10 min à 4°C
- Reprendre 100 µL de surnageant dans un microtube de 1,5 mL (congeler éventuellement si nécessaire de faire ultérieurement l'étape LCMS/MS) par 400 µL d'eau 0,1% (v/v) ac formique (= dilution au 1/5ème)
- Vortexer et centrifuger à 20 000 *g* pendant 10 min à 4°C
- Transférer sur microplaque Waters 350 µL ou 1 mL (ne pas remplir les puits à plus d'1/3)
- Sceller les plaques avec un film plastique à l'aide de la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffage)
- Passer sur LC/MSMS selon la technique ci-après

Méthodes

- Lancement de la méthode LCMSMS *via* Analyst®:
- Méthode UPLC Acquity: &ISO_2.80 MIN_95-5_ FL.method
- Méthode d'acquisition : \&T3_HCY_MMA_AC SUCC_ISO_FL_H6.dam
- Méthode de quantification : HCY –AC SUCC-MMA.qmf

o) 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).

RESULTATS

1) Confirmation de la carence en donneurs de méthyle – dosage sanguin

Au moment du sacrifice, des échantillons sanguins ont été collectés. Afin de confirmer la CDM un dosage plasmatique pour la vitamine B12, folate, homocystéine, SAM et SAH a été effectué. Chez le groupe carencé, les résultats montrent une diminution significative de la concentration des vitamines B12 et B9 et une augmentation significative de la concentration de l'HCY, et de la SAH (Figure 23). Ces résultats confirment que le régime suivi par les rats induit une carence en donneurs de méthyle.

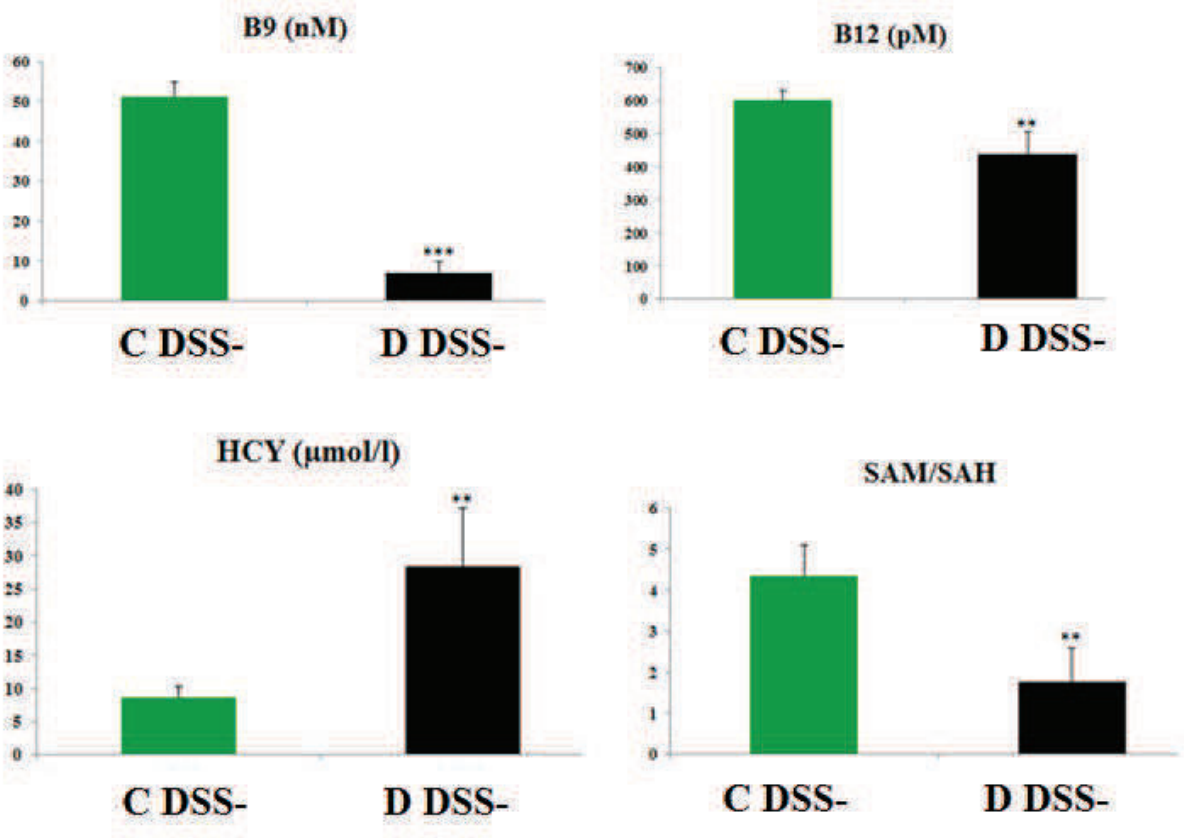


Figure 23 : Concentration plasmatique de la vitamine B12, B9, HCY et SAH/SAM.
***C DSS- vs. D DSS-, P<0,01, ***C DSS- vs D DSS-, P < 0,001 ANOVA, test de Fisher.*

2) Impact de la carence en donneurs de méthyle sur l'inflammation intestinale chez le rat

a) Index d'activité de la maladie (DAI)

Après l'administration du DSS et afin d'évaluer la colite inflammatoire, des signes cliniques (le poids, la consistance des selles et la présence de sang dans les selles) ont été observés quotidiennement pour chaque rate. Une moyenne de DAI était calculée pour chacun des groupes.

Dès le troisième jour de traitement, les animaux traités par DSS montraient des signes de souffrance, une colite inflammatoire avec anorexie, rectorragie ou présence de sang dans les selles. Ces symptômes de colite inflammatoire s'aggravaient avec le temps. Les rats du groupe D DSS+ présentent un DAI supérieur à celui des rats du groupe C DSS+ au troisième jour (1,66 ± 0,19 vs. 0,933 ± 0,14, P<0,0001), cinquième jour (2,86 ± 0,38 vs. 1.26 ± 0,14, P<0,0001) (Figure 24A). Sept jours après induction de la colite par le DSS, les rates recevant un régime CDM présentent un score de DAI plus importante (3 ± 0,40 vs. 1,33 ± 0,33, P=0,0001). Comme attendu, il n'y a aucun signe de colite dans les groupes qui ne reçoivent pas de DSS (C DSS- et D DSS-). Leurs selles de ces rats sont de consistance normale sans présence, il n'y a pas de sang et leur prise de poids est satisfaisante, le DAI est à 0 (Figure 24A).

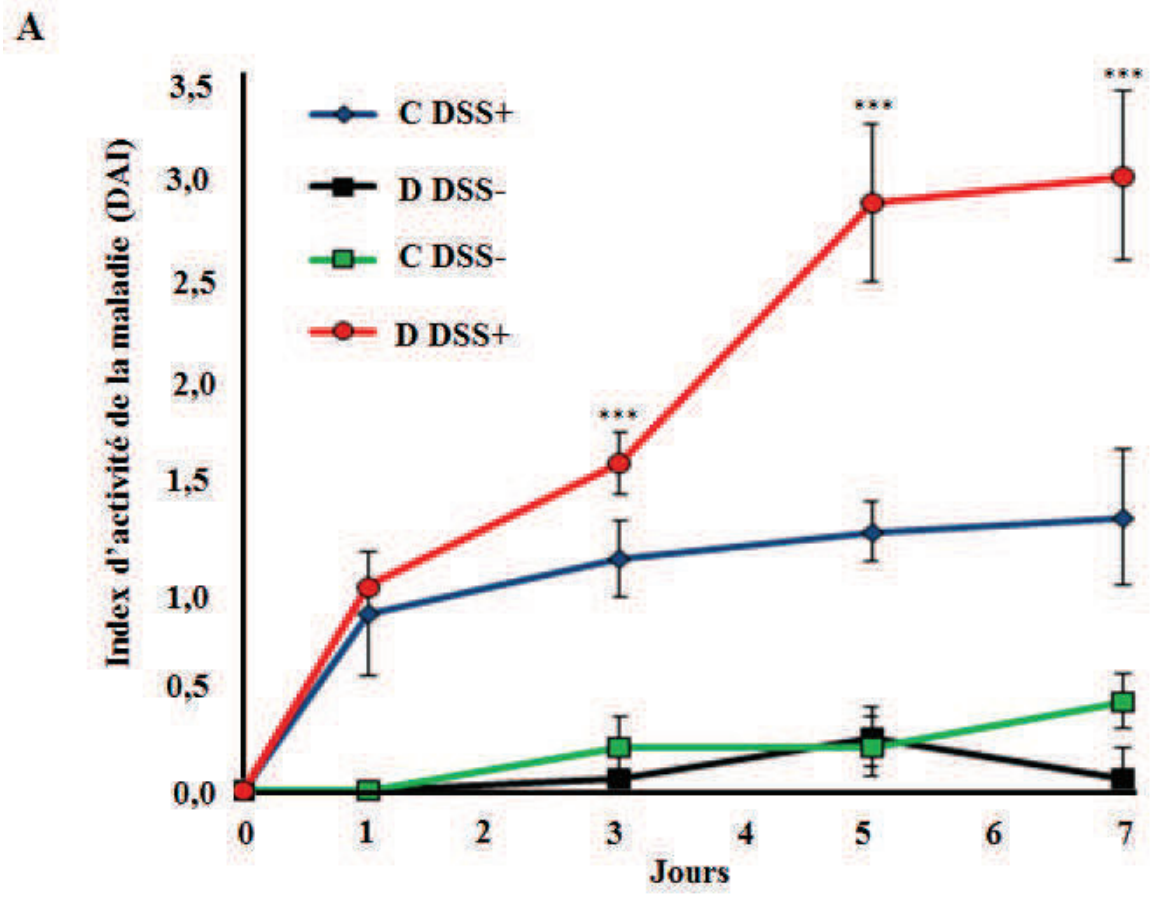
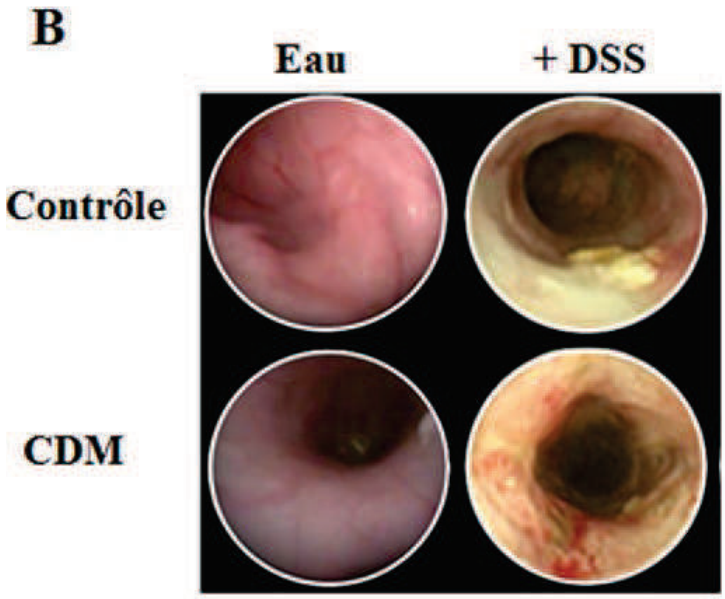


Figure 24A: Représentation graphique de l'index d'activité de la maladie (DAI) moyen quotidien des rats. *Différence statistiquement significative, * D DSS+ (Carencé traité par DSS) vs. C DSS+ (Non carencé traité par DSS), P < 0,5 ; **D DSS+ vs C DSS+, P < 0,01, ANOVA, test de Fisher.*

b) Endoscopie

Les endoscopies ont été réalisées sur les rates au 7ème jour du DSS avant sacrifices. Le score endoscopique a été calculé à l'aveugle en prenant en compte les paramètres suivants : perte de la vascularisation, aspect granuleux, saignement, dépôts de fibrine (Figure 24B).



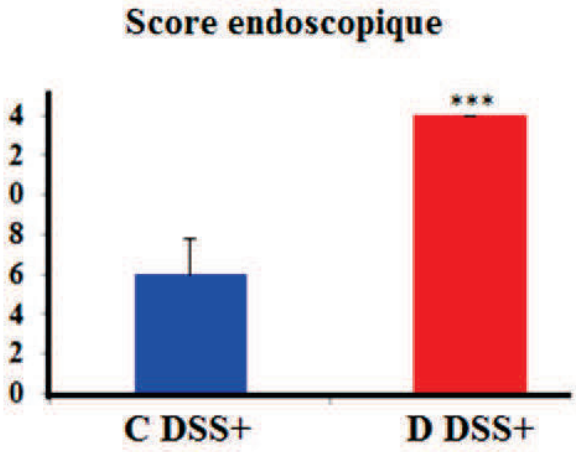


Figure 24B: Représentation graphique du score endoscopique. *Différence statistiquement significative, * D DSS+ (Carencé traité par DSS) vs. C DSS+ (Non carencé traité par DSS), ***D DSS+ vs C DSS+, P < 0,001, ANOVA, test de Fisher.*

c) Histologie

Les analyses histologiques ont été effectuées sur un échantillon de côlon pour chacun des groupes. Il existe une colite inflammatoire chez les animaux DSS+ par rapport aux animaux DSS- (Figure 24C). La muqueuse colique est ulcérée, les glandes sont remplacées par un exsudat fibrino-leucocytaire. La sous-muqueuse est le siège de remaniements œdémateux avec un infiltrat inflammatoire fait de cellules polymorphes. Il existe une congestion vasculaire. En revanche, la carence en donneurs de méthyle ne semble pas avoir d'effet inflammatoire sur le colon en l'absence d'inflammation induite par le DSS.

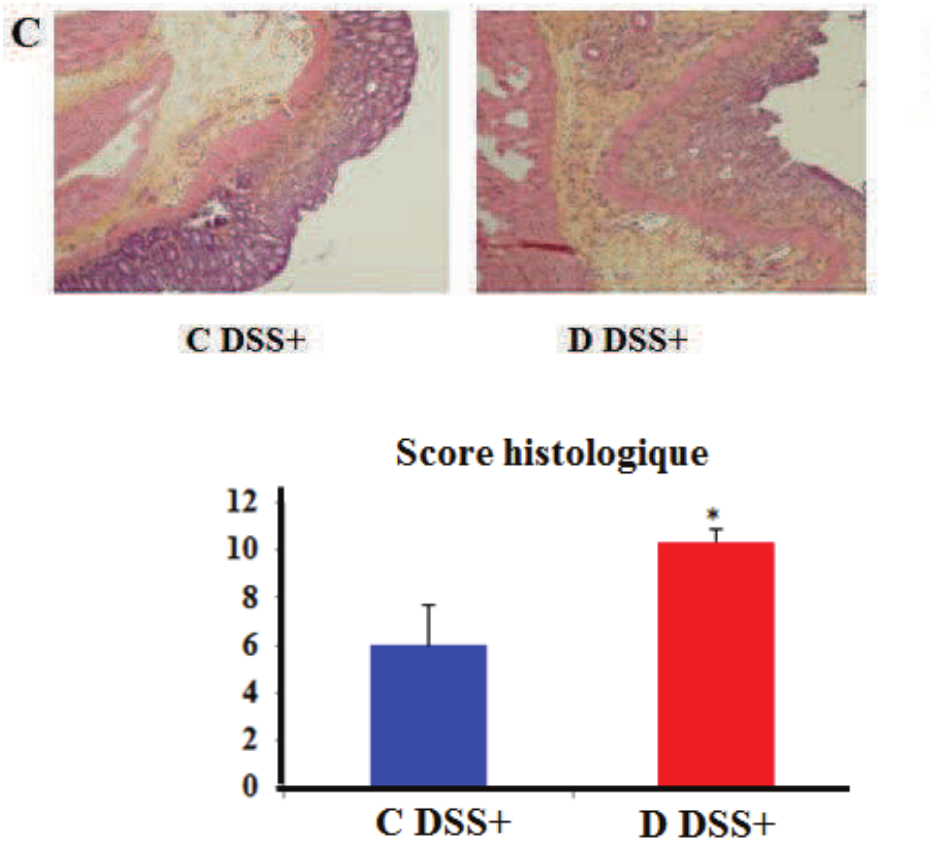


Figure 24C: Représentation graphique du score histologique. *Différence statistiquement significative, * D DSS+ (Carencé traité par DSS) vs. C DSS+ (Non carencé traité par DSS), *P < 0,5, ANOVA, test de Fisher.*

Ainsi, nos résultats montrent que la carence en donneurs de méthyle aggrave la sévérité de la colite induite chimiquement par le DSS cliniquement, endoscopiquement et histologiquement.

3) Impact d'une carence en donneurs de méthyle sur la mise en place de l'UPR chez le rat

a) Induction du stress du RE par la carence en donneurs de méthyle

Pour explorer l'influence de la CDM sur le stress du RE, nous avons mesuré le niveau protéique des transducteurs de stress du RE, PERK, IRE-1α et ATF6 (Figure 25A) ainsi que par la phosphorylation élevée du facteur d'initiation de la traduction (P-eIF-2α) (Figure 25A). L'analyse par western blot montre une augmentation significative des formes actives des effecteurs de l'UPR (P-PERK, P-IRE-1α et ATF6-p50) chez le groupe carencé (D DSS-) et ceci en les comparant avec le groupe témoin (C DSS-).

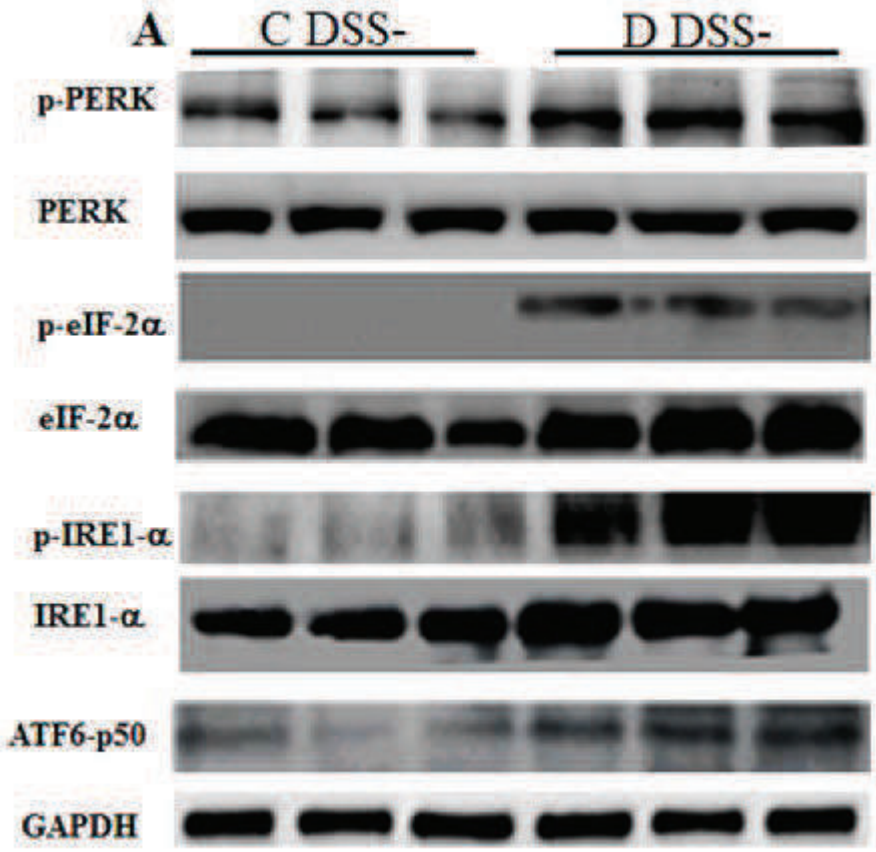


Figure 25A : Etude de l'expression de PERK, phospho-PERK [p-PERK], IRE-1α, phospho-IRE-1α [p-IRE-1α] eIF-2α, phospho-eIF-2α [p-eIF-2α], et ATF6 par Western blotting dans la muqueuse colique des rats. *Dans le groupe D DSS-, le niveau d'expression protéique de p-PERK/PERK, p-IREE-1α/IRE- 1α, p-eIF-2α/eIF-2α et ATF6 est significativement élevé en comparaison avec le groupe contrôle (**P < 0.01, **P < 0.01, ***P < 0.001, *P < 0.05 respectivement).*

b) Activation de XBP1 et ATF4 par le stress du RE chez les rats carencé

Afin d'évaluer les conséquences du stress du RE induit par la carence, nous avons analysé le niveau d'expression de ATF4 et XBP1 (Figure 25B), deux principaux effecteurs situés immédiatement en aval des trois transducteurs de stress. Le niveau de l'ARNm d'ATF4 augmente chez les rats carencés. L'épissage de XBP1 par IRE-1α de la forme (U) inactive vers la forme (S) active est plus important chez les rats carencés confirmant ainsi l'activation de la réponse UPR.

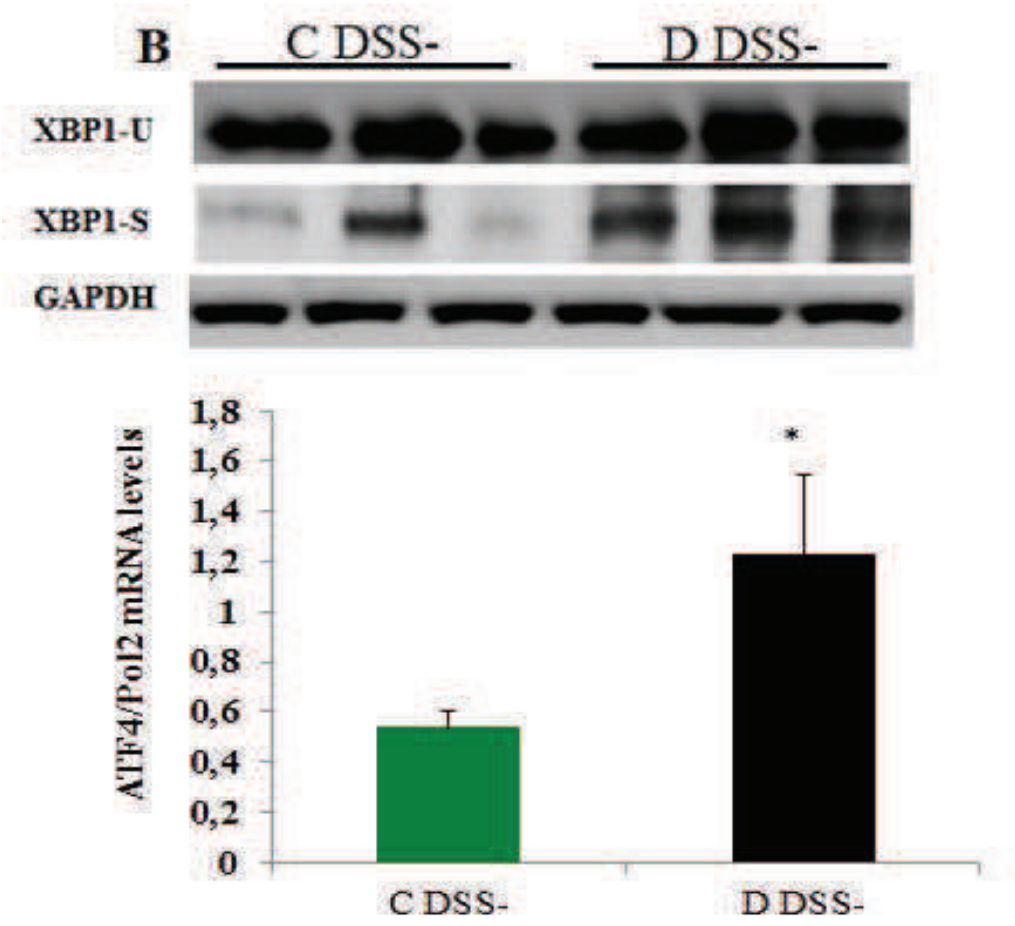


Figure 25B : Etude de l'expression de l'ARNm d'ATF4 et de l'expression protéique de XBP1 dans la muqueuse colique des rats. *Chez les rats carencés, les voies de signalisation en aval de stress du RE sont activées. Cette activation a été évalué par l'augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de ATF4 (*P < 0.05) et par l'augmentation de l'expression de XBP1-S (*P < 0.05).*

c) Diminution de l'expression des molécules chaperonnes par la CDM

Chez les rats carencés, la réponse au stress du RE causé par la CDM est corrélée avec une diminution dramatique des molécules chaperonnes BIP, HSP27, HSP90 comparativement aux rats contrôles (Figure 25C).

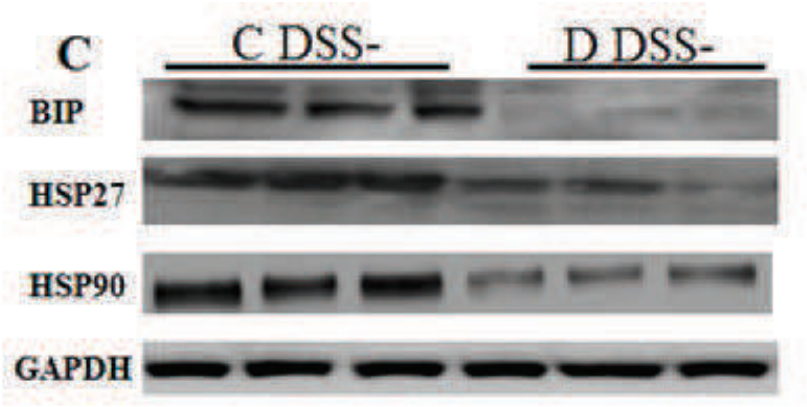


Figure 25C : Etude de l'expression de BIP, HSP27 et HSP90 par Western blotting dans la muqueuse colique des rats. *L'activation de la réponse UPR est accompagné par une diminution de l'expression des molécules chaperonnes BIP, HSP27, HSP90 (*P < 0.05). Test Fisher, n = 5.*

Ainsi, la carence en donneurs de méthyle déclenche un stress du RE et active la réponse UPR dans les cellules de la muqueuse intestinale.

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

Avant de réaliser ce travail *in vivo*, nous avons utilisé une modèle cellulaire permettant de vérifier cette hypothèse de façon rapide est standardisée.

4) Impact de la carence cellulaire en vitamine B12 sur le stress du RE

a) Induction du stress du RE par la carence en vitamine B12

Comme il est difficile de carencer les modèles cellulaires classiques par simple carence d'apport dans le milieu de culture, nous avons créé un modèle d'adénocarcinome humain modifié de façon stable (Caco-2-TO) permettant l'expression d'une protéine chimère fusionnant le récepteur de la vitamine B12 (transcobalamine (T)) à l'oléosine (O) permettant la rétention de cette

protéine de fusion dans la membrane du RE et empêchant la libération de la vitamine B12 par la transcobalamine au niveau du lysosome pour son utilisation dans le cadre du métabolisme cellulaire. Ainsi ce modèle s'apparente à un modèle efficace de « carence cellulaire en vitamine B12 », nous avons également créé une lignée cellulaire exprimant une forme de la protéine de fusion de la transcobalamine et l'oléosine non retenue au niveau du RE (Caco-2-OT) que nous utilisons comme « lignée contrôle non carencé » (Battaglia-Hsu, Akchiche et al. 2009; Pons, Battaglia-Hsu et al. 2009).

La présence d'un important stress cellulaire dans les cellules TO carencées en B12 est tout d'abord identifié par l'augmentation du niveau protéique des transducteurs de stress du RE, P-PERK et P-IRE-1α (Figure 26A) et ceci en les comparant avec les cellules contrôles OT. L'ajout de la vitamine B12 ou de la SAM dans le milieu de culture réverse cette situation de stress.

Etant donné que les niveaux élevés de P-PERK et P-IRE-1α 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 (Figure 26A).

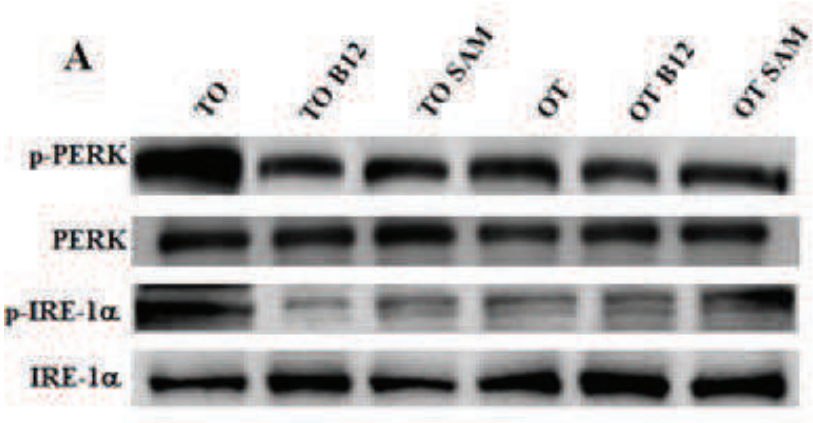


Figure 26A : Etude de l'expression de PERK, phospho-PERK [p-PERK], IRE-1α, phospho-IRE-1α [p-IRE-1α] par Western blotting. *Les lysats cellulaires sont obtenus à partir des cellules TO déficients en B12 et des cellules contrôles OT avant et après traitement avec la vitamine B12 (20 µM pendant 7 jours) et avec la S-adénosyl méthionine (SAM) (75 µM pendant 5 jours). Dans les cellules carencés en vitamine B12, le niveau d'expression protéique de p-PERK/PERK, p-IREE-1α/IRE- 1α est augmenté en comparaison avec le groupe contrôle OT.*

b) Diminution de l'expression de SIRT1 et des molécules chaperonnes suite à une carence cellulaire en vitamine B12

Cette réponse des cellules TO au stress est corrélée avec une diminution de l'expression de SIRT1 et des molécules chaperonnes BIP, HSP27, HSP90 comparativement aux cellules OT (Figure 26B). L'addition de la vitamine B12 ou de la SAM restaure l'expression de SIRT1, HSF1 et de ces molécules chaperonnes.

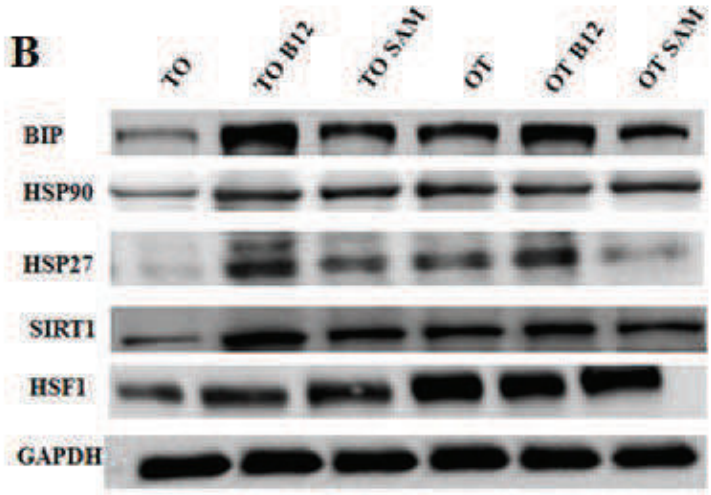


Figure 26B : Etude de l'expression de BIP, HSP27, HSP90, SIRT1 et HSF1 par Western blotting. *Les lysats cellulaires sont obtenus à partir des cellules TO déficients en B12 et des cellules contrôles OT avant et après traitement avec la vitamine B12 (20 µM pendant 7 jours) et avec la S-adénosyl méthionine (SAM) (75 µM pendant 5 jours). Dans les cellules carencées en vitamine B12 (TO), le niveau d'expression protéique des molécules chaperonnes, HSF1 et SIRT1 diminue comparativement aux cellules OT. Cette diminution est reversée par l'ajout de la vitamine B12 ou de la SAM.*

c) La vitamine B12 réduit l'activation de stress du RE induit pat la thapsigargine

Afin d'évaluer l'effet modulateur de la vitamine B12 sur l'UPR, nous avons étudié l'effet de son ajout sur les cellules TO et OT traitées avec la Thapsigargine (TG), un inhibiteur de la pompe calcique du RE et un puissant stimulateur de stress du RE.

Le traitement avec la TG réduit le niveau protéique de BIP, HSP27 et HSP90 dans les cellules OT. 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, Johansson et al. 2012).

La vitamine B12 est un remarquable protecteur contre le stress induit par la TG. En effet, l'ajout de la vitamine B12, sur les cellules OT traitées avec la TG, réverse la diminution de l'expression des protéines chaperonnes (Figure 26C) et de SIRT1.

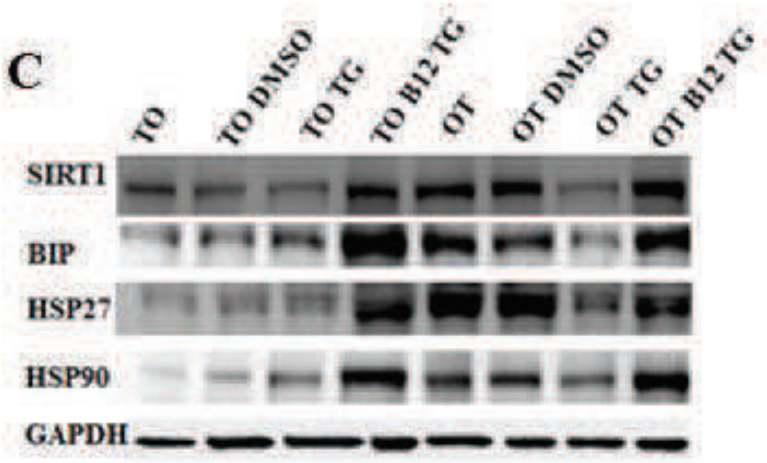


Figure 26C : Etude de l'expression de SIRT, BIP, HSP27 et HSP90 par Western blotting. *Le traitement par la TG réduit à la fois l'expression de Bip et de HSP70 dans les cellules TO et OT. L'ajout de la vitamine B12 précédée par un traitement à la TG restaure l'expression de SIRT1 et des molécules chaperonnes dans les cellules TO.*

5) Etude des mécanismes conduisant à la mise en place de l'UPR chez le rat carencé : implication de HSF1 et SIRT1

Suite à l'induction de la réponse UPR par la CDM, nous avons cherché à identifier le mécanisme responsable de cet évènement. La réponse au stress dépendante de SIRT1 implique HSF1, un facteur de transcription clé capable d'activer les gènes codant pour les protéines chaperonnes. Il est connu que la désacétylation de HSF1 par SIRT1 induit son activation (Westerheide et al, 2009). Etant donné que les protéines chaperonnes sont significativement réduites en cas d'une CDM (Figure 25C, 26B), 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 la diminution de la quantité de la protéine HSF1 (indépendamment de son état d'acétylation) (Figure 27). L'analyse par western blot chez le groupe carencé montre une diminution significative de SIRT1 (Figure 27). De plus, l'immunoprécipitation de HSF1 suivie d'un western blot où nous avons utilisé un anticorps anti-acétyl-lysine montre une augmentation d'acétyl-HSF1 chez le groupe carencé par rapport au groupe non carencé (Figure 27).

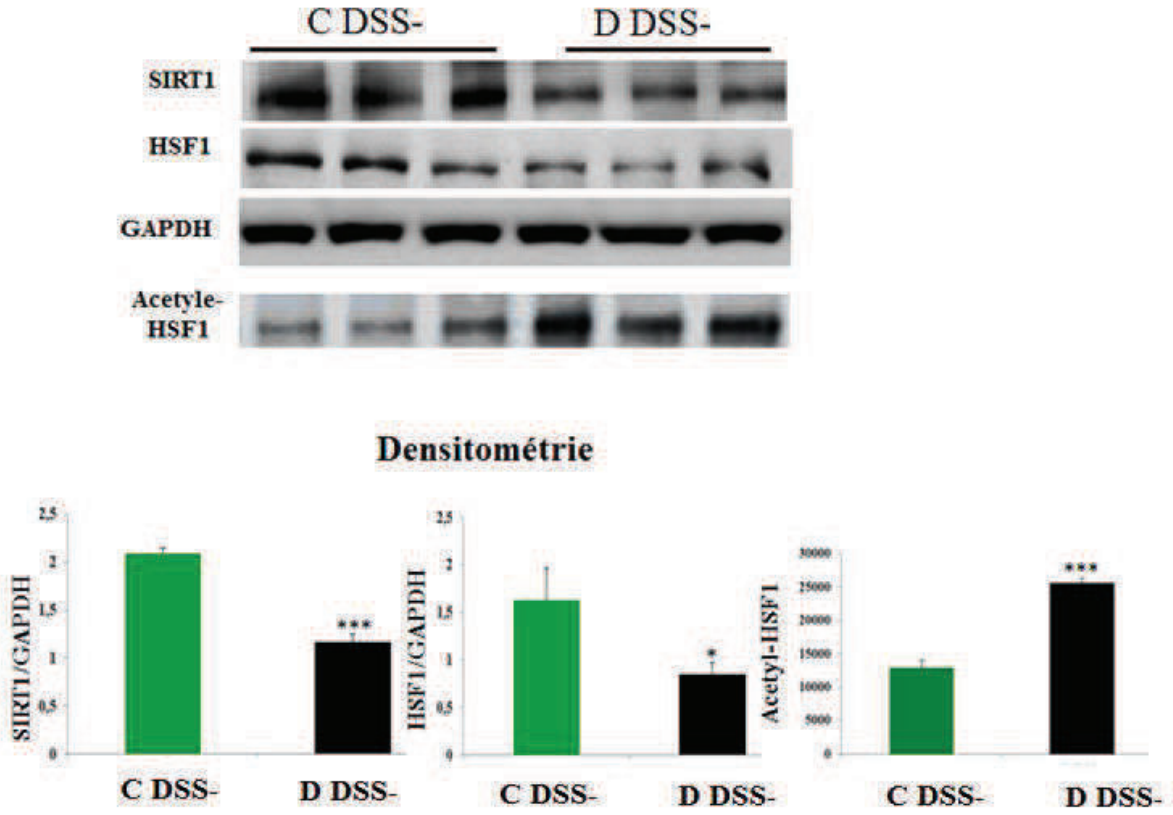


Figure 27 : Etude de l'expression de SIRT1, HSF1 et Acétyl-HSF1 par Western blotting dans la muqueuse colique des rats. *Dans le groupe D DSS-, l'expression protéique de SIRT1 et de acétyle-HSF1 est significativement augmenté en comparaison avec le groupe contrôle (***P < 0.001). Test Fisher, n= 5.*

Ainsi, nos résultats montrent que SIRT1 pourrait être impliqué dans le stress du RE causé par la CDM en diminuant la quantité de la forme active (non-acétylée) de HSF1.

6) Impact de l'activation pharmacologique de SIRT1 *in vitro* et *in vivo*

a) Effet du traitement par l'agoniste de SIRT1 sur les effecteurs de l'UPR *in vitro*

Pour confirmer le lien entre SIRT1 et le stress du RE causé par la CDM, nous avons évalué les effets de son activation pharmacologique *in vitro* et *in vivo*. Nous avons utilisé un activateur de SIRT1, SRT1720 (Milne, Lambert et al. 2007) et un inhibiteur de SIRT1, EX527 (Wu, Zhou et al. 2012).

In vitro, nous avons d'une part, traité les cellules TO avec SRT1720 afin de booster l'activité de SIRT1, et d'autre part nous avons traité les cellules OT avec EX527 dans le but de diminuer l'activité de SIRT1. Comme le montre la figure 28A, l'activation de SIRT1 entraine une augmentation de l'expression des molécules chaperonnes (BIP, HSP27, HSP90) dans les cellules TO, alors que la répression de l'activité de SIRT1 dans les cellules TO par EX527 conduit à une diminution de l'expression de ces molécules chaperonnes (Figure 28A).

L'agoniste de SIRT1 (SRT1720) est un remarquable protecteur contre le stress induit par la TG. La figure 26C nous montre que l'expression des molécules chaperonnes est diminuée après traitement avec la TG, or cette diminution est reversée quand les cellules ont été prétraitées par l'agoniste de SIRT1 (SRT1720). Ces effets protecteurs ont été également observés dans les cellules OT prétraitée avec la vitamine B12 suivie d'un traitement avec EX527 (Figure 28A).

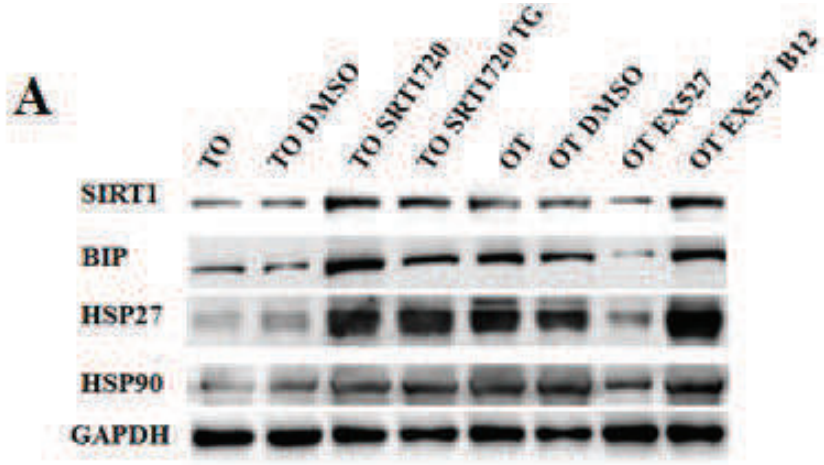


Figure 28A : Etude de l'expression de SIRT, BIP, HSP27 et HSP90 par Western blotting. *L'Addition de SRT1720 dans le milieu de culture des cellules TO augmente le niveau de leurs expressions. Dans les cellules OT, l'ajout de la vitamine B12 réverse l'effet du l'inhibiteur de SIRT1(EX527) sur l'expression des molécules chaperonnes.*

b) Effet du traitement par l'agoniste de SIRT1 sur la colite induite par le DSS

1) Index d'activité de la maladie (DAI)

Dans un second temps, nous avons analysé *in vivo* les effets de l'activation de SIRT1 sur la colite induite par le DSS. Pour ce faire nous avons traité les rats carencés ou non par SRT1720 durant 7 jours avec le DSS et durant 7 jours pendant le traitement avec du DSS. Après l'administration du DSS l'index d'activité de la maladie (DAI) a été calculé comme décrits précédemment. Nous avons déjà confirmé que la carence en donneurs de méthyle aggrave l'inflammation intestinale. L'effet maximal de cette aggravation est significativement diminué après le traitement avec l'agoniste de SIRT1 dans le cas d'une CDM. Au cinquième jour de traitement avec SRT1720, les signes de colite inflammatoire diminuent d'une façon significative chez le groupe D DSS+ SRT+ en comparaison avec le groupe D DSS+ (2,86 ± 0,38 vs. 2,08 ± 0,5, P<0,5). Ces signes de colite inflammatoire continuent à diminuer avec le temps (Figure 29B). Sept jours après induction de la colite par le DSS, le groupe de rat D DSS+ présentent un score de DAI plus important (3 ± 0,40 vs. 1,9 ± 0,5, P<0,01) (Figure 29B). Cependant, le score de DAI ne montre pas une différence significative entre le groupe C DSS+ et C DSS+ SRT+ (Figure 29B).

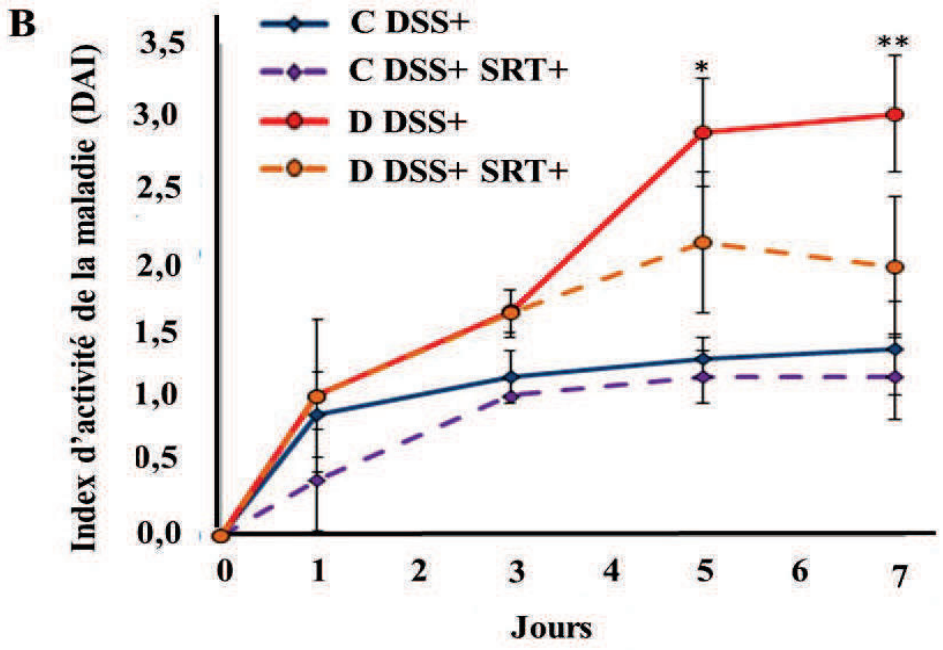


Figure 29B: Représentation graphique de l'index d'activité de la maladie (DAI) moyen quotidien des rats. *Différence statistiquement significative, * D DSS+ (Carencé traité par DSS) vs. C DSS+ (Non carencé traité par DSS), P < 0,5 ; **D DSS+ vs C DSS+, P < 0,01, ANOVA, test de Fisher.*

2) Endoscopie

Comme décrit précédemment, les endoscopies ont été effectuées au 7ème jour du traitement avec le DSS avant le sacrifice. Le score endoscopique a été calculé comme précédemment. Le score endoscopique est significativement diminué chez le groupe traité par le SRT1720 (D DSS+ SRT+) en comparaison avec le groupe D DSS+ (Figure 29C).

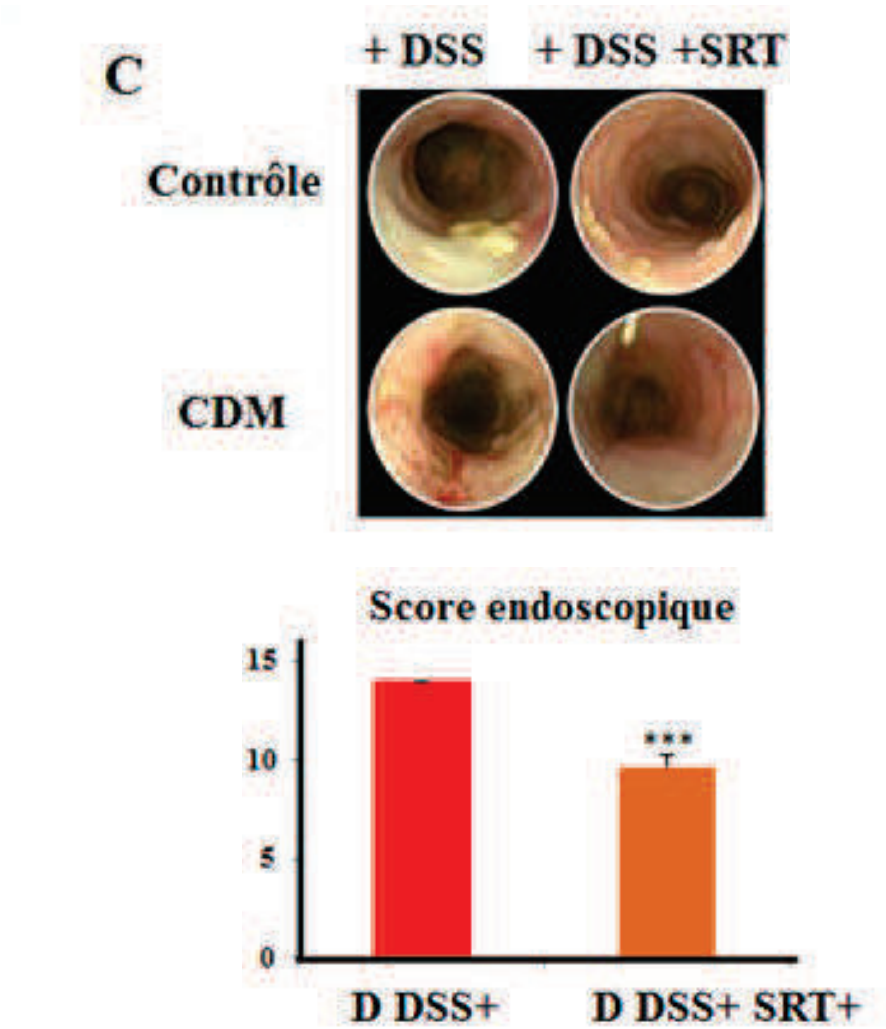


Figure 29C: Représentation graphique du score endoscopique. *Différence statistiquement significative, * D DSS+ (Carencé traité par DSS) vs. C DSS+ (Non carencé traité par DSS), P < 0,5 ; **D DSS+ vs C DSS+, P < 0,01, ***D DSS+ vs C DSS+, P < 0,001, ANOVA, test de Fisher.*

3) Histologie

Les analyses histologiques ont été effectuées sur un échantillon de colon pour chacun des groupes. Il existe une colite inflammatoire moins sévère chez les animaux DSS+ traités avec le SRT1720 par rapport aux animaux DSS+ non traités avec le SRT1720 (Figure 29D).

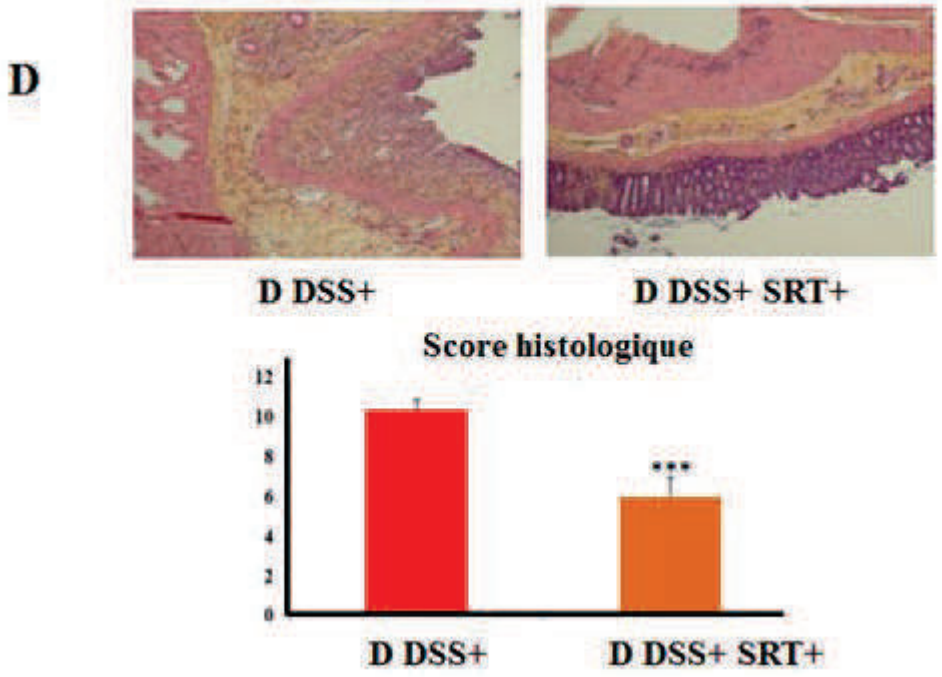


Figure 29D: Représentation graphique du score histologique. *Différence statistiquement significative, * D DSS+ (Carencé traité par DSS) vs. C DSS+ (Non carencé traité par DSS), P < 0,5 ; **D DSS+ vs C DSS+, P < 0,01, ***D DSS+ vs C DSS+, P < 0,001, ANOVA, test de Fisher.*

Ainsi, nos résultats montrent que l'activation de SIRT1 par son agoniste est capable de s'opposer l'effet de la carence en donneurs de méthyle sur l'inflammation de la muqueuse intestinale chez le rat.

c) Effet du traitement par l'agoniste de SIRT1 sur les effecteurs de l'UPR *in vivo*

Pour confirmer le lien entre SIRT1 et le stress du RE chez les rats carencés, nous avons étudié la réponse au stress du RE chez les rats carencés et traités par l'agoniste de SIRT1. L'analyse par western blot montre que le traitement avec le SRT1720 induit une diminution de l'expression d'ATF4 indiquant une diminution du stress du RE et une augmentation de l'expression des molécules chaperonnes (BIP, HSP27, HSP90) et (Figure 29E) dans le groupe carencé.

L'immunoprécipitation de la forme acétylé de HSF1 révèle une diminution d'Ac-HSF1 après traitement avec SRT1720 chez le groupe D DSS- SRT en comparaison avec le groupe D DSS- (Figure 29E).

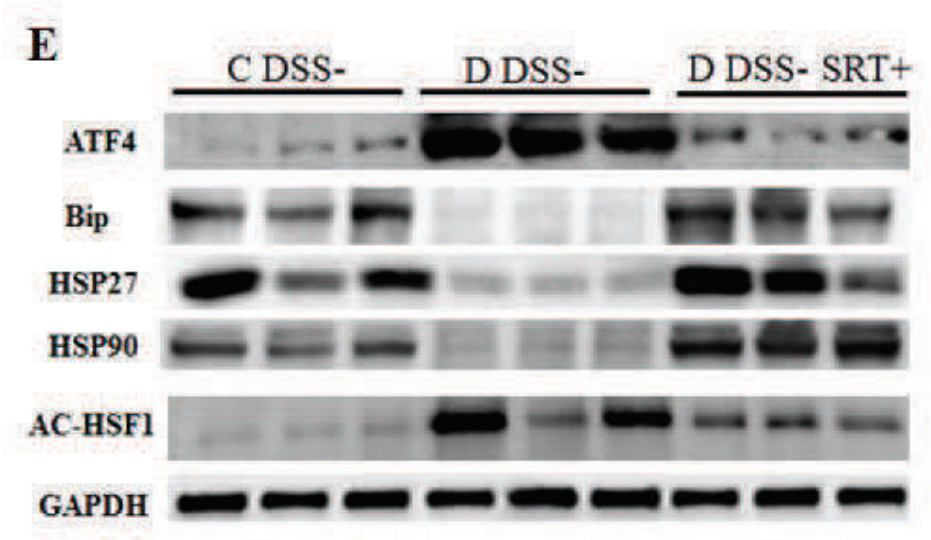


Figure 29E : Etude de l'expression d'ATF4, BIP, HSP27, HSP90 et Acétyle-HSF1 par Western blotting dans la muqueuse colique des rats. *Chez le groupe de rats carencé le traitement par SRT1720 augmente l'expression de ces protéines. SRT1720 reverse le niveau élevé de l'acéthyl-HSF1. (*P < 0.05). Test Fisher, n = 5.*

7) Diminution de l'expression de SIRT1 chez les patients avec MICI

Le stress du RE joue un rôle majeur dans la photogénie des MICI, mais le rôle de SIRT1 reste inconnu dans le contexte de la physiopathologie des MICI. Notre modèle de rat DSS / MDD peut être considéré comme un modèle expérimental de colite, dans lequel la diminution de l'expression de SIRT1 pourrait contribuer à la pathogénie des MICI. Donc, nous avons cherché à savoir si une telle diminution de l'expression de SIRT1 se produit également chez l'homme par l'étude de son expression par immunohistochimie dans l'épithélium du côlon de 14 patients atteints d'une MICI (Figure 30A). Les résultats ont montré une diminution de l'expression de SIRT1 chez 11 patients dans la muqueuse intestinale voisine de la muqueuse lésée par rapport à une muqueuse macroscopiquement normale obtenue à partir des prélèvements des côlons effectués chez des patients (n=10) opérés pour cancer du côlon (Figure 30A). Les niveaux d'expression d'ATF6 et de BIP ont augmenté chez les patients avec MICI par rapport aux témoins sains (Figure 30B).

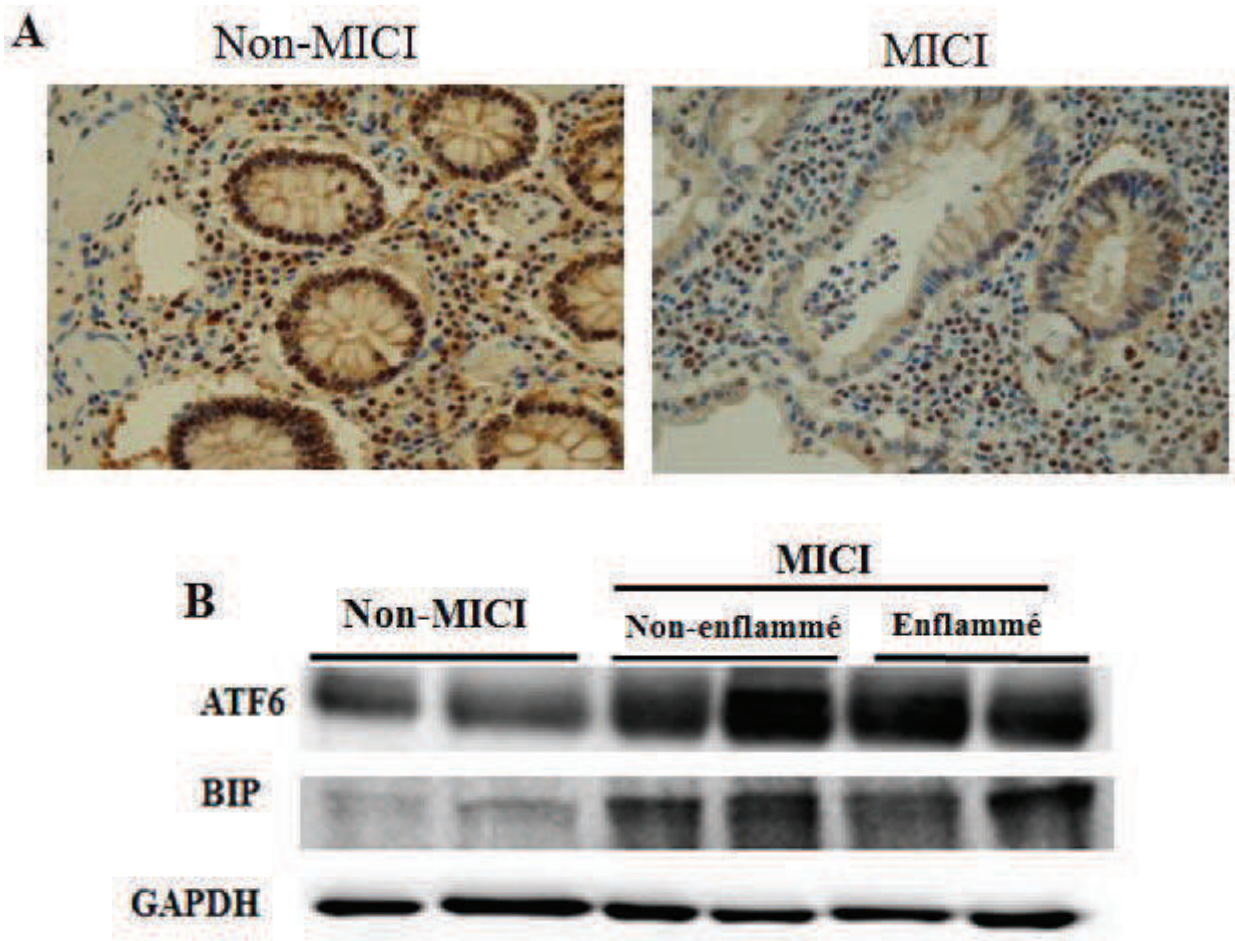


Figure 30: Diminution de l'expression de SIRT1 chez les patients avec MICI.

(A) *Analyse par immunohistochimie de l'expression de SIRT1 dans l'épithélium colique des patients avec MICI en comparaison avec un des patients contrôle (cancer colorectale).* ***(B)*** *analyse par western blot de l'expression de l'expression de ATF6 et de BIP sur des prélèvements colique.*

DISCUSSION GENERALE

Sur la base de données bibliographiques et de résultats antérieurs obtenus au sein du laboratoire, nous avons envisagé que la carence en donneurs de méthyle puisse moduler l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale des patients MICI en dérégulant l'expression de SIRT1 de façon à provoquer un stress du RE (Peyrin-Biroulet, Gueant-Rodriguez et al. 2008; Kaser, Flak et al. 2011; Ghemrawi, Pooya et al. 2013).

Notre étude avait pour buts i-) de mettre en évidence l'impact de la carence en donneurs de méthyle sur l'inflammation de la muqueuse intestinale de rats, ii-) vérifier l'implication de SIRT1 et dans la mise en place du stress du RE et l'inflammation de la muqueuse intestinale de rats, iii-) d'évaluer pour la première fois l'impact d'une activation pharmacologique de SIRT1 sur l'inflammation intestinale et sur le stress du RE et l'UPR et iv-) de déterminer si une dérégulation de l'expression de SIRT1 pouvait être impliquée dans la pathogénie des MICI chez l'Homme et si ce facteur peut constituer une cible thérapeutique pour ces patients.

1) Pertinence des modèles animaux et cellulaires

Pour réaliser les études *in vivo*, des régimes carencés en vitamine B12 et en folates ont été employés sur des rats adultes afin d'induire une carence en donneurs de méthyle (Burke, Robinson et al. 1992). De tels régimes ne contiennent pas de choline et contiennent de faibles concentrations de vitamine B12, folates et méthionine (Brunaud, Alberto et al. 2003). Dans les conditions utilisées, le pouvoir de méthylation (SAM/SAH) a significativement diminué chez les rats nourris avec le régime carencé en vitamine B12 et folate (4,3±0,7 pour le groupe contrôle ; 1,7±0,8 pour le groupe carencé). Ce résultats s'apparente à celui d'une autre étude réalisée sur des ratons nés de mères carencées en donneurs en méthyle pendant la gestation (1,6±0,3 pour le groupe contrôle ; 0,6±0,1 pour le groupe carencé) (Blaise, Alberto et al. 2005). Le DSS a été utilisé sur les rats pour générer une colite expérimentale. Cette approche expérimentale est commenté page suivante.

L'utilisation de modèles cellulaires a permis de réaliser une étude plus spécifique du dysfonctionnement du cycle de la méthionine. Ainsi, ce modèle s'apparente à un modèle efficace de « carence cellulaire en vitamine B12 » (Battaglia-Hsu, Akchiche et al. 2009; Pons, Battaglia-Hsu et al. 2009). Si cette approche ne permet pas d'obtenir des résultats *in vivo*, elle est toutefois d'un grand intérêt pour deux raisons : D'une part, elle permet de mieux cibler les perturbations du métabolisme des monocarbones sur le cycle de la méthionine. D'autre part la lignée Caco-2

est une lignée intestinale humaine permettant l'étude de voie de régulations et de mécanismes pouvant être observés chez les patients de MICI.

En outre, l'utilisation en parallèle des deux approches expérimentales a permis de renforcer la pertinence des résultats obtenus.

2) Impact de la carence en donneurs de méthyle sur l'inflammation intestinale induite chimiquement par le DSS

a) Le protocole

De nombreux modèles animaux sont maintenant disponibles et largement utilisés pour étudier la pathogénèse des MICI. Parmi les plus couramment utilisés, les modèles de colite chimio-induite par des administrations de DSS ou du Trinitrobenzene sulfonate TNBS et/ou DNBS sont largement décrits (Hibi, Ogata et al. 2002).

Dans notre étude, les animaux traités par DSS présentent des signes cliniques d'inflammation digestive avec une prédominance des signes digestifs, diarrhées et rectorragies. L'analyse histologique effectuée par un anatomo-pathologiste expérimenté a ainsi révélé l'existence d'une colite inflammatoire chez les animaux traités par DSS.

Le protocole d'induction de la colite inflammatoire par le DSS comporte des paramètres variables (durée de traitement, poids moléculaire et dose de DSS) suivant les auteurs. Le protocole que nous avons choisi est le plus fréquemment utilisé (5% DSS pendant 7 jours) (Tham, Whitin et al. 2002; Kihara, de la Fuente et al. 2003; Melgar, Karlsson et al. 2005). Ce protocole a été déjà testé par notre équipe au préalable chez des rats adultes non carencés (Chen, Peyrin-Biroulet et al. 2011). Il a induit une colite inflammatoire sans mortalité, ce qui nous a conduits à renouveler ce même protocole.

b) Impact d'une carence en donneurs de méthyle sur l'inflammation intestinale chez le rat

L'index d'activité de la maladie (DAI) est un bon indice pour quantifier la sévérité de la maladie et correspond bien à l'inflammation mise en évidence par l'analyse histologique (Murthy et al.1993). Dans notre étude, le DAI des rats non traités pas DSS est à 0. Comme attendu, une carence en groupements méthyle ne peut pas induire à elle seule une inflammation chez le côlon des rats. En revanche, la carence en donneurs de méthyle induit un stress du RE (détailler dans les paragraphes suivants). C'est probablement pour cette raison que la carence en groupements

méthyle aggrave l'inflammation colique induite par le DSS, comme ceci est montré par le DAI du groupe D DSS+, significativement plus élevé que celui du groupe C DSS+. Les mécanismes cellulaires possibles par lesquels la carence en donneurs de méthyle aggrave l'inflammation colique peuvent potentiellement être de différentes natures, dans notre cas nous nous sommes intéressés à un mécanisme cellulaire très impliqué dans la pathogénie des MICI, le stress du RE.

3) Impact d'une carence en donneurs de méthyle sur le stress du RE et sur la mise en place de la réponse UPR chez le rat

Le dysfonctionnement des cellules de l'épithélium intestinal peut être dû à un stress du RE fréquemment observé chez les patients souffrant de MICI (Kaser, Flak et al. 2011). De plus, des études génétiques ont révélés plusieurs gènes en lien avec le stress du RE et/ou la réponse UPR, comme étant des facteurs de risque pour les MICI. L'implication du stress du RE dans le processus physiopathologique des MICI a notamment été mis en évidence (Kaser, Lee et al. 2008).

Afin de mettre en évidence l'impact de la carence en donneurs de méthyle sur l'UPR, nous avons mesuré le niveau protéique des transducteurs de stress du RE. Notre travail montre clairement que la carence en donneurs de méthyles produit un stress du RE chez le rat ; en effet un important stress cellulaire dans l'épithélium des rates soumises à régime carencé a été identifié par l'augmentation du niveau protéique des transducteurs de stress du RE, P-PERK, P-IRE-1α, ATf6-p50 et P-eif-2α et ceci en les comparant avec le groupe témoin.

Nous avons évalué les conséquences du stress du RE induit par la carence en donneurs de méthyle en analysant le niveau d'expression d'ATF4 et XBP1, deux principaux effecteurs situés immédiatement en aval des trois transducteurs de stress. L'ARNm d'ATF4 augmente dans chez les rates carencées. L'épissage de XBP-1U en XBP-1S par IRE-1α est plus important chez les rates carencées confirmant ainsi l'activation de la réponse UPR. L'activation de l'UPR est corrélée avec une diminution dramatique des molécules chaperonnes BIP, HSP27, HSP90.

Ces résultats ont été confirmés *in vitro* ; en effet nos résultats montrent que dans les cellules TO déficientes en B12, il y a une augmentation de l'expression des formes actives l'UPR P-PERK et P-IRE-1α. Cette augmentation est accompagnée d'une diminution dramatique des molécules chaperonnes. L'ajout de la vitamine B12 ou de SAM sur ces cellules carencées réverse le niveau élevé P-PERK et P-IRE-1α et restaure le niveau basal d'expression des molécules chaperonnes. Ce résultats confirme nos résultats précédents (Ghemrawi, Pooya et al. 2013).

Nous avons également mis en évidence l'effet modulateur de la vitamine B12 sur le stress du RE en utilisant la TG comme un agent d'activation de stress du RE. Dans les cellules TO, ce traitement n'induit pas une augmentation de l'expression des molécules chaperonnes. Dans les cellules OT, la TG induit un stress du RE. La supplémentation en B12 dans les deux types cellulaires rétablit le niveau de l'expression de BIP, HSP27 et HSP90.

4) Etude des mécanismes conduisant à la mise en place de la réponse UPR *in vitro* et *in vivo*: implication de SIRT1 et de HSF1

L'existence d'une relation entre SIRT1 et le stress du RE été montrée dans la littérature. Li et al., ont démontré que la surexpression hépatique de SIRT1 atténue le stress du RE en inhibant la réponse UPR (Li, Xu et al. 2011). Wang et al. ont démontré que XBP1 est désacétylé par SIRT1 (Wang, Chen et al. 2011). Dans les cellules HepG2, SIRT1 a amélioré la résistance à l'insuline induite par le palmitate via la régulation du stress du RE (Jung, Lee et al. 2012). SIRT1 protège aussi la cellule contre le stress provoqué par une insuffisance nutritionnelle (Deng, Chen et al. 2007; Heyward, Walton et al. 2012; Tang, Xu et al. 2012). Une alimentation déficiente en donneurs de méthyle ou riche en graisses ou en glucose induit une diminution de l'expression de SIRT1 chez les rongeurs et par conséquent induit un stress du RE (Garcia, Gueant-Rodriguez et al. 2011; Pooya, Blaise et al. 2012; Ghemrawi, Pooya et al. 2013).

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

Nos résultats montrent que la carence en donneurs de méthyle chez les rats induit une diminution de l'expression de SIRT1 entraînant par conséquence une augmentation de l'acétylation du facteur de transcription des molécules chaperonnes HSF1. L'hyperacétylation de HSF1 explique la diminution dramatique de l'expression des molécules chaperonnes. Ce résultat a été confirmé *in vitro*. Cependant, dans les cellules TO « carencées en vitamine B12 », l'ajout de la vitamine B12 ou de la SAM restaure le niveau d'expression de SIRT1.

Il faut noter que l'expression protéique de HSF1 est significativement réduite dans le colon des rates carencées et *in vitro*. Bien que la raison exacte de cette diminution ne soit pas claire, la baisse de niveau protéique de SIRT1 pourrait négativement réguler HSF1 (Kim, Meriin et al. 2012). Dans les cellules en senescence, la réponse au choc thermique est associée à une réduction de niveau protéique/activité de HSF1 causée par SIRT1 (Kim, Meriin et al. 2012). 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.

5) Impact de l'activation pharmacologique de SIRT1 sur l'inflammation intestinale et l'UPR

Plusieurs études dans la littérature mettent en évidence le rôle curial de SIRT1 dans l'inflammation. Il a été démontré que la surexpression de SIRT1 diminue l'expression hépatique de TNF-α et IL-6 chez des souris soumises à un régime riche en graisse (Pfluger, Herranz et al. 2008). Une autre étude a montré une augmentation de l'activité hépatique de NFκB suite à une délétion spécifique de SIRT1 (Purushotham, Schug et al. 2009). Dans les cellules 3T3-L1, la diminution de l'expression de SIRT1 diminue l'acétylation de la sous-unité p65 de NFκB et augmente par conséquent l'activité transcriptionnelle de NFκB sur les promoteurs de IL-6, MCP-1, KC and IL-1β (Ghosh, Spencer et al. 2007). Une hypothèse émis par Yoshizaki et al., montre qu'une régulation négative de SIRT1 dans les tissus adipeux des souris et des humains obèses contribue à l'aggravation du statut inflammatoire dans ces tissus adipeux (Yoshizaki, Schenk et al. 2010).

Au niveau de l'intestin, SIRT1 joue un rôle critique dans le contrôle de l'homéostasie intestinale (Kaser, Flak et al. 2011). Le KO SIRT1 chez les souris montre l'implication de SIRT1 dans le contrôle de l'homéostasie intestinale (en favorisant l'apoptose et en inhibant la prolifération) et de la motilité gastro-intestinale (en réduisant la vidange gastrique et l'activité contractile intestinale) (Wang, Shi et al. 2012). Récemment deux études suggèrent que SIRT1 protège de la colite induite par le DSS chez les souris (Cui, Jin et al. 2010; Singh, Singh et al. 2010). Cependant, les mécanismes sous-jacents restent mal compris.

Dans ce travail nous avons évalué pour la première fois l'impact de SIRT1 sur la colite induite par le DSS sur la colite et sur le stress du RE et l'UPR dans le cas d'une CDM.

Pour explorer l'impact de SIRT1 sur la colite induite par le DSS, nous avons évalué les effets de son activation pharmacologique *in vivo* et *in vitro*. Nos résultats montrent clairement que l'aggravation de la colite par le DSS est significativement diminuée cliniquement, endoscopiquement et histologiquement après le traitement avec SRT1720 dans le cas d'une CDM. Cependant, le score de la DAI ne montre pas une différence significative entre le groupe C DSS+ et C DSS+ SRT+.

Cependant l'activation de SIRT1 n'a pas diminué la colite chez les rats soumis à un régime alimentaire normal. Ce résultat suggère que la diminution de l'expression de SIRT1 est un acteur majeur de l'aggravation de la colite par la CDM.

Deux études montent que l'activation de SIRT1 par un autre agoniste, le Resveratrol peut être un traitement curatif contre la colite expérimentale chez la souris avec une alimentation normale (Cui, Jin et al. 2010; Singh, Singh et al. 2010). La contradiction entre nos résultats et ces deux études peut s'expliquer par le fait que nous avons testé l'effet de prévention mais pas les effets curatifs de l'agoniste de SIRT1.

L'analyse par western blot montre que le traitement avec le SRT1720 restaure l'expression des molécules chaperonnes (BIP, HSP27, HSP90) et diminue l'expression d'ATF4 dans le groupe carencé. L'immunoprécipitation de la forme acétylée de HSF1 révèle une diminution d'Ac-HSF1 après traitement avec SRT1720 chez le groupe D DSS-SRT+. Ceci montre l'implication de SIRT1 dans le stress du RE et l'UPR.

In vitro, l'activation de SIRT1 par SRT1720 dans les cellules TO entraîne une augmentation de l'expression des molécules chaperonnes (BIP, HSP27, HSP90) alors que la répression de l'activité de SIRT1 dans les cellules TO par EX527 conduit à une diminution de l'expression de ces molécules chaperonnes.

6) Implication de SIRT1 dans la pathogénie des MICI chez l'Homme

Un des points fort de ce travail est que l'expression de SIRT1 diminue dans l'épithélium du côlon des patients atteints d'une MICI. L'analyse par immunohistochimie montre une diminution dramatique de SIRT1 au niveau épithélial dans le colon des patients atteints d'une MICI. Ce résultat montre clairement l'implication de SIRT1 dans la pathogénie des MICI.

7) Mécanisme de régulation de la SIRT1

Il est important de déterminer comment la carence en donneurs de méthyles régule l'expression de SIRT1. La carence en donneurs de méthyle et en particulier en vitamine B12 provoque d'une part l'augmentation de l'homocystéinémie et d'autre part une baisse du pouvoir de méthylation de la cellule (exprimé par le rapport SAM/SAH). Par conséquent, la dérégulation de l'expression de SIRT1 dans les conditions carencées pourrait résulter de l'un ou l'autre de ces évènements. Quel que soit l'évènement déclenchant, le mécanisme conduisant à la dérégulation de l'expression de SIRT1 en condition carencée reste à identifier.

a) Hypothèse d'une expression SIRT1 homocystéine (Hcy) dépendante

Pour tester l'hypothèse selon laquelle l'expression de SIRT1 pourrait être médiée par l'accumulation d'Hcy, nous pourrions étudier l'impact d'un traitement des cellules Caco-2 OT avec Hcy pour vérifier si nous retrouvons des résultats comparables aux cellules TO. Pour ce faire, il faut évaluer le niveau d'expression de SIRT1 dans les cellules OT après un traitement avec différentes concentrations d'homocystéine et pendant plusieurs jours et comparer ces résultats avec ceux obtenus avec les cellules TO.

D'après des résultats obtenus dans des neuroblastomes, cette hypothèse ne semble pas être la plus prometteuse puisque dans ces cellules l'expression de SIRT1 est Hcy indépendante (Ghemrawi, Pooya et al. 2013). Toutefois, cette hypothèse doit être vérifiée dans notre modèle intestinal.

b) Hypothèse d'une expression SIRT1 méthyl-dépendante

Pour tester l'hypothèse selon laquelle l'expression de SIRT1 pourrait être médiée par un mécanisme méthyl-dépendant, nous pourrions traiter les cellules carencées en vitamine B12 avec un inhibiteur des méthyltransférases (adénosine dialdéhyde (Adox)) et évaluer par la suite le niveau d'expression de SIRT1 ainsi que le niveau d'expression des molécules chaperonnes (BIP, HSP27 et HSP90) et les acteurs de l'UPR (PERK, IRE-1α et ATF6) et ses transducteurs (eiF-2α, XBP1 et ATF4).

D'après des résultats obtenus dans des neuroblastomes, cette hypothèse semble être plus prometteuse puisque dans ces cellules l'expression de SIRT1 diminue quand on les traite avec un inhibiteur des méthyltransférases (Ghemrawi, Pooya et al. 2013).

8) Modèle MTR -/-

Finalement, il serait intéressant de vérifier l'effet d'un KO conditionnel du gène SIRT1 dans le colon sur le statut inflammatoire et sur la mise en place de l'UPR. Actuellement, nous sommes en train de générer au laboratoire un modèle murin KO conditionnel du gène de la méthionine synthase dans l'intestin (MTR-/-). MTR étant l'enzyme dont l'activité est conditionnée par la présence de vitamine B12, l'invalidation de ce gène devrait mimer la carence en vitamine B12 *in vivo* et empêcher la production de SAM. Lorsque ce modèle sera disponible (courant 2014), nous envisagerons de voir si nous retrouvons avec ces souris les résultats obtenus sur les rats carencés et les modèles cellulaires. Cette seconde approche permettra d'une part de vérifier dans un

second modèle animal la vraisemblance de nos résultats et d'autre part de cibler spécifiquement l'effet *in vivo* de la carence en vitamine B12.

9) Mécanismes de dérégulation de SIRT1 et rôle de PRMT1 et CARM1

Plusieurs mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer la régulation de l'expression de SIRT1, impliquant HIC1, HuR, CARM1 et PRMT1.

9.1) HIC1 (hypermethylated in cancer 1) est inhibiteur transcriptionnel de l'expression de Sirt1

L'expression de HIC1 est régulée au niveau transcriptionnel par méthylation de son promoteur (Chen, Wang et al. 2005).

HIC1 est impliqué dans la régulation de l'expression de SIRT1 au niveau transcriptionnel (Chen, Wang et al. 2005). En effet, SIRT1 interagit avec le domaine BTB / POZ de HIC1 pour former un complexe de répression de sa propre transcription selon un mécanisme de rétrocontrôle négatif (Chen, Wang et al. 2005).

Ainsi, en impactant la production de SAM, la carence en donneurs de méthyle pourrait entrainer une levée de répression de l'expression de HIC1 qui pourrait alors jouer son rôle d'inhibiteur de l'expression de SIRT1.

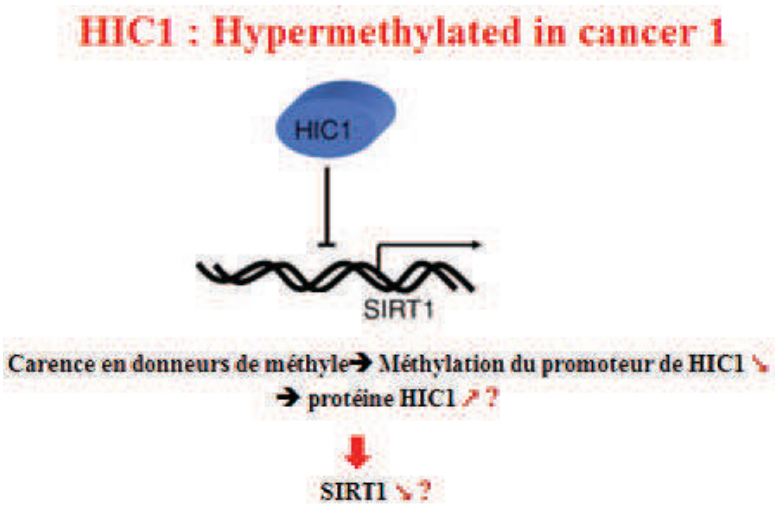


Figure 31 : mécanisme de régulation de SIRT1 par HIC1.

9.2) HuR (human antigen R) : stabilise l'ARNm de SIRT1

L'activité de HuR peut été impactée par la carence en donneurs de méthyle car elle est activée par méthylation.

HuR est une protéine ubiquitaire qui régule l'expression génique au niveau post transcriptionnel en se fixant sur l'extrémité 3' des ARNm pour augmenter leur stabilité. En particulier, ce mécanisme est responsable d'une stabilisation de l'ARNm SIRT1 (Pang, Tian et al. 2013). Toutefois, le rôle de HuR ne se limite pas à cela comme le montre des récentes études indiquant que HuR est également capable de stabiliser la protéine SIRT1 par interaction protéine-protéine (Yang, Zheng et al. 2013). Ainsi, compte tenu de ces éléments, HuR apparait comme un bon candidat pour expliquer nos résultats car en diminuant l'activité de HuR, la carence en donneurs de méthyle pourrait entraîner une baisse d'expression de SIRT1.

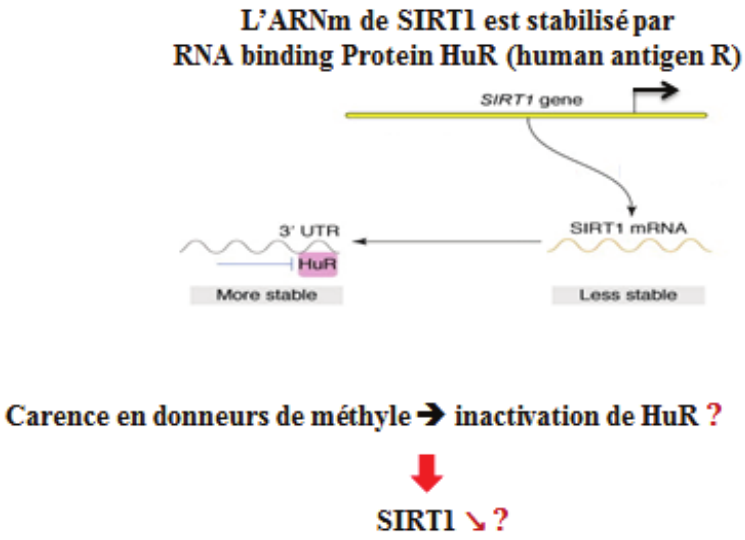


Figure 32 : mécanisme de régulation de SIRT1 par Hur.

9.3) CARM1 méthyle HuR et pourrait jouer un rôle régulateur sur l'expression de SIRT1

Il faut mentionner que HuR présente 2 effets sur les ARNm de SIRT1: il les stabilise et influence leur épissage alternatif. Cependant les conséquences de cet épissage au niveau de l'activité de SIRT1 ne sont pas documentées (Zhao, Zhao et al. 2014).

Hur est régulée par méthylation par CARM1. CARM1 et PRMT1 jouent également un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'inflammation, et sont potentiellement impliquées dans les altérations muqueuses et le risque augmenté de cancérogénèse observés dans les MICI. On peut en particulier supposer que la carence en donneurs de méthyle modifie la méthylation de la protéine HuR et sa localisation cytoplasmique, ce qui conduirait à une baisse de stabilité de

l'ARNm de SIRT1 et par conséquent à la baisse d'expression de SIRT1 que nous avons observée lors de notre étude.

En complément de notre travail de thèse et pour apporter des éléments de réponse préliminaires à cette hypothèse, nous avons donc étudié le rôle respectif et combiné de CARM1 et PRMT1 dans l'activité et la compartimentation nucléo-cytoplasmique de CARM1 et les conséquences sur la prolifération dans notre modèle cellulaire Caco-2/TC7, comparé à deux autres modèles de cellules épithéliales, A549 et H1299.

9.3.1) L'activité et la compartimentation nucléo-cytoplamique de CARM1 est régulée par sa dimérisation avec PRMT1, dans les cellules d'adénocarcinome colique Caco-2/TC7 mais aussi dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire H1299.

CARM1 et PRMT1 ont de nombreux substrats, notamment les histones, mais aussi des protéines impliquées dans la régulation de l'expression génique comme HuR (Li, Park et al. 2002) et HuD (Fujiwara, Mori et al. 2006) qui ont un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes permettant de stabiliser l'ARN (Wolf 2009). CARM1 est impliquée dans la régulation des gènes cibles de STAT 5 et NF-κB et dans la modulation de l'activation transcriptionnelle initié par P53, (Wolf, 2009), wnt/béta caténine (Ou et al., 2011), NF-κB, c-Fos et LEF1/TCF4 (O'Brien, Alberich-Jorda et al. 2010).

La dimérisation est une caractéristique commune aux PRMTs. PRMT1 et CARM1 coopèrent dans la régulation des gènes mais il n'existe pas de données concernant un hétérodimère CARM1/PRMT1. Chez la souris, CARM1 est phosphorylée sur plusieurs résidus serine. Les phosphorylations des résidus serine 217 (Feng, He et al. 2009) et Ser229 (Higashimoto, Kuhn et al. 2007) sont effectuées par des kinases inconnues jusqu'à l'heure actuelle. Ces phosphorylations se produisent pendant la mitose, induisant une translocation de CARM1 dans le cytoplasme et une inhibition de son activité méthyltransférase. La phosphorylation de la ser217 n'inhibe pas la dimérisation de CARM1 et n'affecte pas la formation du complexe avec P300 et SRC-3, 2 coactivateurs des récepteurs nucléaires.

La phosphorylation de la ser229 inhibe la dimérisation de CARM1 mais son effet sur l'interaction de CARM1 avec des protéines partenaires n'a pas été testé. L'équivalent de CARM1 ser229 chez la souris est CARM1 ser228 chez l'être humain. D'un autre côté, la PKA phosphoryle CARM1 sur la sérine 448 (Carascossa, Dudek et al. 2010). La phosphorylation de la ser448 n'inhibe pas l'activité méthyltransférase mais elle est nécessaire et suffisante pour la

liaison directe de CARM1 à ER alpha et cette liaison entraîne l'activation AMPc-dépendante d'ERα. Ainsi CARM1 est-elle assujettie à des stimuli régulatoires variés qui conduisent à des réponses spécifiques du signal initiateur.

Nous avons posé la question de savoir si la phosphorylation de CARM1 ser228 chez l'être humain affecte l'interaction entre CARM1 et PRMT1. Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis (Manuscrit ci-joint en Annexe)

Les résultats du Duolink et de l'immunoprécipitation montrent que l'interaction CARM1/PRMT1 a lieu dans les cellules A549 plus fréquemment que dans les cellules H1299 et que CARM1 phospho-Ser228 n'interagit pas avec PRMT1. CARM1 phospho-Ser228 est détectée dans les cellules H1299 mais pas dans les cellules A549 et elle est localisée dans le cytoplasme. Curieusement, PRMT1 est localisée principalement dans le noyau dans les cellules A549 et dans le cytoplasme dans les cellules H1299. Puisque PRMT1 est un coactivateur transcriptionnel, sa fonction dans le cytoplasme reste à identifier. La localisation subcellulaire de CARM1 et PRMT1 et l'état de phosphorylation de CARM1 incitent à supposer que CARM1 est plus active dans les cellules A549 que dans les cellules H1299. En effet, CARM1 méthyle le promoteur de SOX2 et NANOG dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299 alors que la modification de PRMT1 (H4R3me2) est détectée sur les promoteurs de SOX2 et NANOG dans les 2 lignées cellulaires.

Deux mécanismes entrecroisés pourraient expliquer pourquoi CARM1 est inactive dans les cellules H1299. Le premier est qu'une fraction de CARM1 présente dans les cellules H1299 est phosphorylée sur la sérine 228 et donc elle a perdu son activité méthyltransférase. Le deuxième est que la concentration de PRMT1 dans le noyau est faible ce qui ne favorise pas l'interaction CARM1/PRMT1. Ce résultat renforce l'hypothèse que l'interaction de CARM1 avec PRMT1 est requise pour que CARM1 soit active (Kleinschmidt, Streubel et al. 2008). Par contre, PRMT1 est active dans les cellules H1299 même si elle n'interagit pas avec CARM1. Dans les cellules H1299, la concentration nucléaire de PRMT1 est faible mais elle est suffisante pour méthylé les promoteurs de SOX2 et de NANOG. Cependant, l'expression de SOX2 reste inchangée alors que NANOG est surexprimé. Ce résultat suggère que l'expression de NANOG est moins dépendante de CARM1 que celle de SOX2. L'activation de NANOG pourrait être liée majoritairement à l'activité de PRMT1 ou à des mécanismes mettant en jeu d'autres voies de signalisation. En se basant sur un programme de prédiction des kinases spécifiques, nous avons sélectionné 3 kinases

putatives (MAP2K3, CAMK1 et MLK3) susceptibles de phosphoryler la ser228 de CARM1. Seul l'inhibiteur de MAP2K3 (PD184352) est efficace pour empêcher la phosphorylation de CARM1 Ser228. De plus, l'expression de MAP2K3 est élevée dans les cellules H1299 en comparaison avec les cellules A549 fournissant ainsi un mécanisme direct qui explique pourquoi CARM1-phospho- Ser228 est détectée dans les cellules HT1299 et pas A549. D'ailleurs, l'inhibition de la phosphorylation de CARM1 Ser228 avec l'inhibiteur de MAP2K3 restaure l'interaction CARM1/ PRMT1 dans les cellules H1299. Ce résultat renforce l'hypothèse que la phosphorylation de CARM1 sur la ser228 altère la formation du complexe entre CARM1 et PRMT1.

Ce mécanisme est également observé dans la lignée Caco-2/TC7. Dans ces cellules la phosphorylation de CARM1 sur Ser228 a été inhibée par PD184352. Le duolink a montré un signal avec la combinaison des anticorps anti-CARM1 et anti-PRMT1 et ce signal a été considérablement renforcé lorsque les cellules ont été traitées avec PD184352. Ce résultat dans des cellules Caco-2/TC7 et H1299 suggère fortement que la déphosphorylation de CARM1 Ser228 est un mécanisme général qui favorise l'interaction CARM1 / de PRMT1.

Les études d'assemblage des protéines montrent que la phosphorylation en sérine 229 perturbe l'interaction entre l'asparagine 230 de CARM1 et l'aspartate 205 de PRMT1 et empêche par conséquence la dimérization de CARM1/PRMT1. De plus, la sérine 229 est enfermée dans les structures homodimériques et hétérodimériques ce qui suggère que seuls les monomères sont disponibles pour la phosphorylation.

Conclusion générale

Le sujet de recherche abordé dans ce travail concerne les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'objectif de ce travail consistait à identifier, dans un modèle expérimental de rat, les mécanismes impliqués dans l'aggravation et l'évolution de la colite induite par agent chimique lors d'une carence en donneurs de méthyle (vitamine B12, folates) en considérant le rôle de SIRT1 dans le stress du réticulum endoplasmique. Cette question a été étudiée au moyen de modèles *in vivo* et *in vitro*, ainsi que dans la muqueuse intestinale de patients souffrant de MICI.

Les résultats montrent que la carence en donneurs de méthyles aggrave la colite et induit un stress du RE via une diminution de l'expression de SIRT1 qui provoque une hyperacétylation du facteur de transcription HSF1 et une diminution de l'expression des molécules chaperonnes. Le traitement par un activateur de SIRT1 (SRT1720) réduit la pathologie inflammatoire et diminue

le stress du RE. Le travail mécanistique a été confirmé *in vitro* en utilisant un modèle cellulaire reproduisant les conditions d'une carence en vitamine B12 par l'expression stable d'une protéine chimère : la transcobalamineoléosine (TO) réduisant la disponibilité cellulaire en B12.

Ces résultats ont été validés chez l'homme par une étude réalisée chez des patients souffrants de MICI et montrant une expression de SIRT1 altérée dans les zones inflammatoires de la muqueuse colique. L'ensemble de ces résultats montre le rôle majeur de SIRT1 dans le processus pathologique des MICI. Ces résultats participent d'une part à la validation du concept général proposé par l'ensemble des recherches menées dans cette unité Inserm, suggérant que la voie métabolique des monocarbones est intimement associée à la voie du stress du réticulum. Ceci conduit à la régulation de l'expression de nombreux gènes par l'intermédiaire du facteur SIRT1 et du taux d'acétylation de protéines liées à l'ADN.

L'identification d'une voie de régulation de la réponse UPR en cas d'une carence en donneurs de méthyle, ainsi que la mise en évidence d'une possibilité de reverser ou de prévenir l'effet de cette carence par une approche pharmacologique laisse entrevoir de nouvelles possibilités de prises en charges des patients atteints de MICI. La compréhension complète du mécanisme conduisant à la mise en place du stress du RE en conditions de carence en donneurs de méthyle permettra peut-être d'identifier d'autres approches pharmacologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abraham, C. and J. H. Cho (2006). "Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations." Inflamm Bowel Dis **12**(7): 641-650.

Allen, R. H., S. P. Stabler, et al. (1990). "Diagnosis of cobalamin deficiency I: usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations." Am J Hematol **34**(2): 90-98.

Amre, D. K., S. D'Souza, et al. (2007). "Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children." Am J Gastroenterol **102**(9): 2016-2025.

Andersson, P. and R. Sjodahl (2001). "Controversies in surgical treatment of inflammatory bowel disease." Eur J Surg Suppl(586): 73-77.

Andres, E., N. H. Loukili, et al. (2004). "Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients." CMAJ **171**(3): 251-259.

Angier, R. B., J. H. Boothe, et al. (1945). "Synthesis of a Compound Identical with the L. Casei Factor Isolated from Liver." Science **102**(2644): 227-228.

Antony, A. C. (1996). "Folate receptors." Annu Rev Nutr **16**: 501-521.

Antony, A. C., M. A. Kane, et al. (1985). "Studies of the role of a particulate folate-binding protein in the uptake of 5-methyltetrahydrofolate by cultured human KB cells." J Biol Chem **260**(28): 14911-14917.

Barrett, J. C., S. Hansoul, et al. (2008). "Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease." Nat Genet **40**(8): 955-962.

Battaglia-Hsu, S. F., N. Akchiche, et al. (2009). "Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(51): 21930-21935.

Baumgart, M., B. Dogan, et al. (2007). "Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive Escherichia coli of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum." ISME J **1**(5): 403-418.

Becker, C., M. C. Fantini, et al. (2005). "In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy." Gut **54**(7): 950-954.

Bernstein, C. N. and A. Nabalamba (2006). "Hospitalization, surgery, and readmission rates of IBD in Canada: a population-based study." Am J Gastroenterol **101**(1): 110-118.

Bertolotti, A., X. Wang, et al. (2001). "Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice." J Clin Invest **107**(5): 585-593.

Bertolotti, A., Y. Zhang, et al. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(6): 326-332.

Bhaskar, L. V., J. Murthy, et al. (2011). "Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts." Arch Oral Biol **56**(8): 723-737.

Bjerregaard, L. T., N. J. Nederby, et al. (2002). "Hyperhomocysteinaemia, coagulation pathway activation and thrombophilia in patients with inflammatory bowel disease." Scand J Gastroenterol **37**(1): 62-67.

Blaise, S., J. M. Alberto, et al. (2005). "Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats." Pediatr Res **57**(6): 777-782.

Bogaert, S., M. De Vos, et al. (2011). "Involvement of endoplasmic reticulum stress in inflammatory bowel disease: a different implication for colonic and ileal disease?" PLoS One **6**(10): e25589.

Bossenmeyer-Pourie, C., S. Blaise, et al. (2010). "Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat." Am J Pathol **176**(1): 270-277.

Bossenmeyer-Pourie, C., G. Pourie, et al. (2013). "Early methyl donor deficiency produces severe gastritis in mothers and offspring through N-homocysteinylation of cytoskeleton proteins, cellular stress, and inflammation." FASEB J **27**(6): 2185-2197.

Bottiglieri, T. (2005). "Homocysteine and folate metabolism in depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **29**(7): 1103-1112.

Brachmann, C. B., J. M. Sherman, et al. (1995). "The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability." Genes Dev **9**(23): 2888-2902.

Bressenot, A., S. Pooya, et al. (2012). "Methyl donor deficiency affects small-intestinal differentiation and barrier function in rats." Br J Nutr: 1-11.

Brunaud, L., J. M. Alberto, et al. (2003). "Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats." Digestion **68**(2-3): 133-140.

Burdakov, D., O. H. Petersen, et al. (2005). "Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function." Cell Calcium **38**(3-4): 303-310.

Burke, G., K. Robinson, et al. (1992). "Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels." N Engl J Med **326**(1): 69-70.

Carascossa, S., P. Dudek, et al. (2010). "CARM1 mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP." Genes Dev **24**(7): 708-719.

Carmel, R. (1999). "Ethnic and racial factors in cobalamin metabolism and its disorders." Semin Hematol **36**(1): 88-100.

Carreras, C. W. and D. V. Santi (1995). "The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase." Annu Rev Biochem **64**: 721-762.

Cattaneo, M., M. Vecchi, et al. (1998). "High prevalence of hyperchomocysteinemia in patients with inflammatory bowel disease: a pathogenic link with thromboembolic complications?" Thromb Haemost **80**(4): 542-545.

Chakravarty, I. and R. K. Sinha (2002). "Prevalence of micronutrient deficiency based on results obtained from the national pilot program on control of micronutrient malnutrition." Nutr Rev **60**(5 Pt 2): S53-58.

Chan, I., L. Liu, et al. (2007). "The molecular basis of lipoid proteinosis: mutations in extracellular matrix protein 1." Exp Dermatol **16**(11): 881-890.

Chen, D., J. Bruno, et al. (2008). "Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction." Genes Dev **22**(13): 1753-1757.

Chen, M., L. Peyrin-Biroulet, et al. (2011). "Methyl deficient diet aggravates experimental colitis in rats." J Cell Mol Med **15**(11): 2486-2497.

Chen, W. Y., D. H. Wang, et al. (2005). "Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses." Cell **123**(3): 437-448.

Chen, Y. R., S. R. Fang, et al. (2010). "Calorie restriction on insulin resistance and expression of SIRT1 and SIRT4 in rats." Biochem Cell Biol **88**(4): 715-722.

Cho, W., J. Choi, et al. (2008). "Expression of CD320 in human B cells in addition to follicular dendritic cells." BMB Rep **41**(12): 863-867.

Civitarese, A. E., S. Carling, et al. (2007). "Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans." PLoS Med **4**(3): e76.

Coelho, D., J. C. Kim, et al. (2012). "Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism." Nat Genet **44**(10): 1152-1155.

Cox, J. S., R. E. Chapman, et al. (1997). "The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane." Mol Biol Cell **8**(9): 1805-1814.

Cui, X., Y. Jin, et al. (2010). "Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis." Cancer Prev Res (Phila) **3**(4): 549-559.

Danese, S., A. Sgambato, et al. (2005). "Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease." Am J Gastroenterol **100**(4): 886-895.

Deng, X. Q., L. L. Chen, et al. (2007). "The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats." Liver Int **27**(5): 708-715.

Dhanasekaran, D. N. and E. P. Reddy (2008). "JNK signaling in apoptosis." Oncogene **27**(48): 6245-6251.

Dincer, Y., Y. Erzin, et al. (2007). "Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease." Dig Dis Sci **52**(7): 1636-1641.

Dringen, R. and B. Hamprecht (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." Neurosci Lett **259**(2): 79-82.

Drzewoski, J., A. Gasiorowska, et al. (2006). "Plasma total homocysteine in the active stage of ulcerative colitis." J Gastroenterol Hepatol **21**(4): 739-743.

Duan, W., B. Ladenheim, et al. (2002). "Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease." J Neurochem **80**(1): 101-110.

Dudman, N. P., D. E. Wilcken, et al. (1993). "Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease. Its occurrence, cofactor therapy, and enzymology." Arterioscler Thromb **13**(9): 1253-1260.

Duerr, R. H., K. D. Taylor, et al. (2006). "A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene." Science **314**(5804): 1461-1463.

Durando, X., E. Thivat, et al. (2008). "[Methionine dependency of cancer cells: a new therapeutic approach?]." Bull Cancer **95**(1): 69-76.

Eizirik, D. L., A. K. Cardozo, et al. (2008). "The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus." Endocr Rev **29**(1): 42-61.

Faubion, W. A., Jr., E. V. Loftus, Jr., et al. (2001). "The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study." Gastroenterology **121**(2): 255-260.

Feng, Q., B. He, et al. (2009). "Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation." J Biol Chem **284**(52): 36167-36174.

Fernandes-Costa, F. and J. Metz (1979). "Binding of methylfolate and pteroylglutamic acid by the specific serum folate binder." J Lab Clin Med **93**(2): 181-188.

Finkel, T., C. X. Deng, et al. (2009). "Recent progress in the biology and physiology of sirtuins." Nature **460**(7255): 587-591.

Finkelstein, J. D. and J. J. Martin (1984). "Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways." J Biol Chem **259**(15): 9508-9513.

Fisher, S. A., M. Tremelling, et al. (2008). "Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease." Nat Genet **40**(6): 710-712.

Foufelle, F. and P. Ferre (2007). "[Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]." Med Sci (Paris) **23**(3): 291-296.

Frand, A. R. and C. A. Kaiser (1998). "The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum." Mol Cell **1**(2): 161-170.

Franke, A., T. Balschun, et al. (2008). "Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis." Nat Genet **40**(6): 713-715.

Franken, D. G., H. J. Blom, et al. (1996). "Thiamine (vitamin B1) supplementation does not reduce fasting blood homocysteine concentration in most homozygotes for homocystinuria." Biochim Biophys Acta **1317**(2): 101-104.

Fujii, S., K. Tominaga, et al. (2005). "Methylation of the oestrogen receptor gene in non-neoplastic epithelium as a marker of colorectal neoplasia risk in longstanding and extensive ulcerative colitis." Gut **54**(9): 1287-1292.

Fujiwara, T., Y. Mori, et al. (2006). "CARM1 regulates proliferation of PC12 cells by methylating HuD." Mol Cell Biol **26**(6): 2273-2285.

Ganesan, T., M. H. Khadra, et al. (2002). "Vitamin B12 malabsorption following bladder reconstruction or diversion with bowel segments." ANZ J Surg **72**(7): 479-482.

Garcia, M. M., R. M. Gueant-Rodriguez, et al. (2011). "Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1." J Pathol **225**(3): 324-335.

Gerhard, G. T. and P. B. Duell (1999). "Homocysteine and atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **10**(5): 417-428.

Gerhart-Hines, Z., J. T. Rodgers, et al. (2007). "Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha." EMBO J **26**(7): 1913-1923.

Ghemrawi, R., S. Pooya, et al. (2013). "Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1." Cell Death Dis **4**: e553.

Ghosh, H. S., J. V. Spencer, et al. (2007). "Sirt1 interacts with transducin-like enhancer of split-1 to inhibit nuclear factor kappaB-mediated transcription." Biochem J **408**(1): 105-111.

Gloria, L., M. Cravo, et al. (1996). "DNA hypomethylation and proliferative activity are increased in the rectal mucosa of patients with long-standing ulcerative colitis." Cancer **78**(11): 2300-2306.

Grasbeck, R., K. Simons, et al. (1965). "Isolation of intrinsic factors from human gastric juice." Acta Chem Scand **19**(7): 1777-1778.

Grutzner, N., R. M. Heilmann, et al. (2013). "Serum homocysteine and methylmalonic acid concentrations in Chinese Shar-Pei dogs with cobalamin deficiency." Vet J **197**(2): 420-426.

Gueant, J. L., M. Caillerez-Fofou, et al. (2013). "Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase." Biochimie **95**(5): 1033-1040.

Gueant, J. L., A. Gerard, et al. (1988). "Radioautographic localisation of iodinated human intrinsic factor in the guinea pig ileum using electron microscopy." Gut **29**(10): 1370-1378.

Gueant, J. L., F. Namour, et al. (2013). "Folate and fetal programming: a play in epigenomics?" Trends Endocrinol Metab **24**(6): 279-289.

Guedon, C., V. Le Cam-Duchez, et al. (2001). "Prothrombotic inherited abnormalities other than factor V Leiden mutation do not play a role in venous thrombosis in inflammatory bowel disease." Am J Gastroenterol **96**(5): 1448-1454.

Halfvarson, J., L. Bodin, et al. (2003). "Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics." Gastroenterology **124**(7): 1767-1773.

Halsted, C. H., G. Gandhi, et al. (1981). "Sulfasalazine inhibits the absorption of folates in ulcerative colitis." N Engl J Med **305**(25): 1513-1517.

Harding, H. P., H. Zeng, et al. (2001). "Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival." Mol Cell **7**(6): 1153-1163.

Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." Nature **397**(6716): 271-274.

Hasnain, S. Z., R. Lourie, et al. (2012). "The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation." Immunol Cell Biol **90**(3): 260-270.

Hatahet, F. and L. W. Ruddock (2009). "Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation." Antioxid Redox Signal **11**(11): 2807-2850.

Haze, K., T. Okada, et al. (2001). "Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response." Biochem J **355**(Pt 1): 19-28.

Herbert, V. (1962). "Experimental nutritional folate deficiency in man." Trans Assoc Am Physicians **75**: 307-320.

Herrlinger, K. R., J. R. Cummings, et al. (2005). "The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease." Pharmacogenet Genomics **15**(10): 705-711.

Hetz, C., F. Martinon, et al. (2011). "The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha." Physiol Rev **91**(4): 1219-1243.

Heyward, F. D., R. G. Walton, et al. (2012). "Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression." Neurobiol Learn Mem **98**(1): 25-32.

Hibi, T., H. Ogata, et al. (2002). "Animal models of inflammatory bowel disease." J Gastroenterol **37**(6): 409-417.

Higashimoto, K., P. Kuhn, et al. (2007). "Phosphorylation-mediated inactivation of coactivator-associated arginine methyltransferase 1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(30): 12318-12323.

Hodgkin, D. C., J. Kamper, et al. (1956). "Structure of vitamin B12." Nature **178**(4524): 64-66.

Hosokawa, N., I. Wada, et al. (2001). "A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation." EMBO Rep **2**(5): 415-422.

Hubbard, S. C. and R. J. Ivatt (1981). "Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides." Annu Rev Biochem **50**: 555-583.

Hugot, J. P., C. Alberti, et al. (2003). "Crohn's disease: the cold chain hypothesis." Lancet **362**(9400): 2012-2015.

Hugot, J. P., M. Chamaillard, et al. (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 599-603.

Ivy, J. M., A. J. Klar, et al. (1986). "Cloning and characterization of four SIR genes of Saccharomyces cerevisiae." Mol Cell Biol **6**(2): 688-702.

Jiang, L., B. Xia, et al. (2006). "Retrospective survey of 452 patients with inflammatory bowel disease in Wuhan city, central China." Inflamm Bowel Dis **12**(3): 212-217.

Jiang, W., Y. Nakayama, et al. (2013). "Mapping the functional domains of TCblR/CD320, the receptor for cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin." FASEB J **27**(8): 2988-2994.

Jiang, X. L. and H. F. Cui (2002). "An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China." World J Gastroenterol **8**(1): 158-161.

Jones, S. C., R. E. Banks, et al. (1995). "Adhesion molecules in inflammatory bowel disease." Gut **36**(5): 724-730.

Joosten, E., E. Lesaffre, et al. (1997). "Is metabolic evidence for vitamin B-12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease?" J Gerontol A Biol Sci Med Sci **52**(2): M76-79.

Jostins, L., S. Ripke, et al. (2012). "Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease." Nature **491**(7422): 119-124.

Jung, T. W., K. T. Lee, et al. (2012). "SIRT1 attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in HepG2 cells via induction of oxygen-regulated protein 150." Biochem Biophys Res Commun **422**(2): 229-232.

Kaeberlein, M., M. McVey, et al. (1999). "The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms." Genes Dev **13**(19): 2570-2580.

Kane, M. A., P. C. Elwood, et al. (1986). "The interrelationship of the soluble and membrane-associated folate-binding proteins in human KB cells." J Biol Chem **261**(33): 15625-15631.

Kang, S. S., J. Zhou, et al. (1988). "Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase." Am J Hum Genet **43**(4): 414-421.

Kappelman, M. D., S. L. Rifas-Shiman, et al. (2007). "The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States." Clin Gastroenterol Hepatol **5**(12): 1424-1429.

Kaser, A., M. B. Flak, et al. (2011). "The unfolded protein response and its role in intestinal homeostasis and inflammation." Exp Cell Res **317**(19): 2772-2779.

Kaser, A., A. H. Lee, et al. (2008). "XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease." Cell **134**(5): 743-756.

Kastelein, R. A., C. A. Hunter, et al. (2007). "Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation." Annu Rev Immunol **25**: 221-242.

Kaufman, R. J., D. Scheuner, et al. (2002). "The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 411-421.

Kihara, N., S. G. de la Fuente, et al. (2003). "Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats." Gut **52**(5): 713-719.

Kim, G., A. B. Meriin, et al. (2012). "The heat shock transcription factor Hsf1 is downregulated in DNA damage-associated senescence, contributing to the maintenance of senescence phenotype." Aging Cell **11**(4): 617-627.

Kim, I., W. Xu, et al. (2008). "Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities." Nat Rev Drug Discov **7**(12): 1013-1030.

Kleinschmidt, M. A., G. Streubel, et al. (2008). "The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation." Nucleic Acids Res **36**(10): 3202-3213.

Klement, E., J. Lysy, et al. (2008). "Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: a population-based study." Am J Gastroenterol **103**(7): 1775-1782.

Kobayashi, K. S., M. Chamaillard, et al. (2005). "Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract." Science **307**(5710): 731-734.

Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." Annu Rev Biochem **54**: 631-664.

Kostulas, K., M. Crisby, et al. (1998). "A methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in ischaemic stroke and in carotid artery stenosis." Eur J Clin Invest **28**(4): 285-289.

Kotb, M. and A. M. Geller (1993). "Methionine adenosyltransferase: structure and function." Pharmacol Ther **59**(2): 125-143.

Krautler, B. (2005). "Vitamin B12: chemistry and biochemistry." Biochem Soc Trans **33**(Pt 4): 806-810.

Kruidenier, L., I. Kuiper, et al. (2003). "Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants." J Pathol **201**(1): 28-36.

Lee, A. S. (2001). "The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications." Trends Biochem Sci **26**(8): 504-510.

Lee, J. Y., L. Zhao, et al. (2004). "Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1." J Biol Chem **279**(17): 16971-16979.

Leong, R. W., J. Y. Lau, et al. (2004). "The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population." Inflamm Bowel Dis **10**(5): 646-651.

Lesage, S., H. Zouali, et al. (2002). "CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease." Am J Hum Genet **70**(4): 845-857.

Li, H., S. Park, et al. (2002). "Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase." J Biol Chem **277**(47): 44623-44630.

Li, X., K. Zhang, et al. (2011). "Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective." J Hematol Oncol **4**: 8.

Li, Y., S. Xu, et al. (2011). "Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver." FASEB J **25**(5): 1664-1679.

Lildballe, D. L., E. Mutti, et al. (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**(10): e46657.

Lindholm, D., H. Wootz, et al. (2006). "ER stress and neurodegenerative diseases." Cell Death Differ **13**(3): 385-392.

Liu, X. X., K. Wilson, et al. (2000). "Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa." Life Sci **66**(23): 2277-2288.

Loftus, C. G., E. V. Loftus, Jr., et al. (2007). "Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000." Inflamm Bowel Dis **13**(3): 254-261.

Lok, K. H., H. G. Hung, et al. (2008). "Epidemiology and clinical characteristics of ulcerative colitis in Chinese population: experience from a single center in Hong Kong." J Gastroenterol Hepatol **23**(3): 406-410.

Magro, F., M. Dinis-Ribeiro, et al. (2003). "High prevalence of combined thrombophilic abnormalities in patients with inflammatory bowel disease." Eur J Gastroenterol Hepatol **15**(11): 1157-1163.

Mahmud, N., A. Molloy, et al. (1999). "Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with inflammatory bowel disease, and its clinical implications." Gut **45**(3): 389-394.

Malhi, H. and R. J. Kaufman (2011). "Endoplasmic reticulum stress in liver disease." J Hepatol **54**(4): 795-809.

Mato, J. M., L. Alvarez, et al. (1997). "S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications." Pharmacol Ther **73**(3): 265-280.

Mato, J. M. and S. C. Lu (2007). "Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury." Hepatology **45**(5): 1306-1312.

Matthews, R. G., J. Ross, et al. (1982). "Interactions of pig liver serine hydroxymethyltransferase with methyltetrahydropteroylpolyglutamate inhibitors and with tetrahydropteroylpolyglutamate substrates." Biochemistry **21**(6): 1230-1238.

Melgar, S., A. Karlsson, et al. (2005). "Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(6): G1328-1338.

Michan, S. and D. Sinclair (2007). "Sirtuins in mammals: insights into their biological function." Biochem J **404**(1): 1-13.

Miller, J. W., M. R. Nadeau, et al. (1994). "Vitamin B-6 deficiency vs folate deficiency: comparison of responses to methionine loading in rats." Am J Clin Nutr **59**(5): 1033-1039.

Miller, J. W., M. R. Nadeau, et al. (1994). "Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism." Biochem J **298 (Pt 2)**: 415-419.

Miller, J. W., J. D. Ribaya-Mercado, et al. (1992). "Effect of vitamin B-6 deficiency on fasting plasma homocysteine concentrations." Am J Clin Nutr **55**(6): 1154-1160.

Milne, J. C., P. D. Lambert, et al. (2007). "Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes." Nature **450**(7170): 712-716.

Misra, A., N. K. Vikram, et al. (2002). "Hyperhomocysteinemia, and low intakes of folic acid and vitamin B12 in urban North India." Eur J Nutr **41**(2): 68-77.

Mudd, S. H. and J. R. Poole (1975). "Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens." Metabolism **24**(6): 721-735.

Murthy, S. N., H. S. Cooper, et al. (1993). "Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin." Dig Dis Sci **38**(9): 1722-1734.

Nakagawa, T., H. Zhu, et al. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." Nature **403**(6765): 98-103.

Naser, S. A., M. Arce, et al. (2012). "Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis." World J Gastroenterol **18**(5): 412-424.

Naurath, H. J., E. Joosten, et al. (1995). "Effects of vitamin B12, folate, and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations." Lancet **346**(8967): 85-89.

Nemoto, S., M. M. Fergusson, et al. (2004). "Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway." Science **306**(5704): 2105-2108.

Nguyen, G. C., A. Tuskey, et al. (2007). "Rising hospitalization rates for inflammatory bowel disease in the United States between 1998 and 2004." Inflamm Bowel Dis **13**(12): 1529-1535.

Nicolas, J. P. and J. L. Gueant (1994). "[Absorption, distribution and excretion of vitamin B12]." Ann Gastroenterol Hepatol (Paris) **30**(6): 270-276, 281; discussion 281-272.

Nielsen, M. J., M. R. Rasmussen, et al. (2012). "Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **9**(6): 345-354.

Nishitoh, H., A. Matsuzawa, et al. (2002). "ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats." Genes Dev **16**(11): 1345-1355.

O'Brien, K. B., M. Alberich-Jorda, et al. (2010). "CARM1 is required for proper control of proliferation and differentiation of pulmonary epithelial cells." Development **137**(13): 2147-2156.

Okazaki, K., H. Onodera, et al. (2000). "A patient with improvement of ulcerative colitis after appendectomy." Gastroenterology **119**(2): 502-506.

Oldenburg, B., R. Fijnheer, et al. (2000). "Homocysteine in inflammatory bowel disease: a risk factor for thromboembolic complications?" Am J Gastroenterol **95**(10): 2825-2830.

Orrenius, S., B. Zhivotovsky, et al. (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 552-565.

Outinen, P. A., S. K. Sood, et al. (1999). "Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells." Blood **94**(3): 959-967.

Ouyang, Q., R. Tandon, et al. (2005). "The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region." Curr Opin Gastroenterol **21**(4): 408-413.

Oyadomari, S. and M. Mori (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." Cell Death Differ **11**(4): 381-389.

Pang, L., H. Tian, et al. (2013). "Loss of CARM1 is linked to reduced HuR function in replicative senescence." BMC Mol Biol **14**: 15.

Papa, A., V. De Stefano, et al. (2001). "Hyperhomocysteinemia and prevalence of polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in patients with inflammatory bowel disease." Am J Gastroenterol **96**(9): 2677-2682.

Parham, C., M. Chirica, et al. (2002). "A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R." J Immunol **168**(11): 5699-5708.

Park, Y. K. and H. Linkswiler (1970). "Effect of vitamin B6 depletion in adult man on the excretion of cystathionine and other methionine metabolites." J Nutr **100**(1): 110-116.

Parkes, M., J. C. Barrett, et al. (2007). "Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility." Nat Genet **39**(7): 830-832.

Peters, L. R. and M. Raghavan (2011). "Endoplasmic reticulum calcium depletion impacts chaperone secretion, innate immunity, and phagocytic uptake of cells." J Immunol **187**(2): 919-931.

Peyrin-Biroulet, L., H. Barraud, et al. (2004). "[Folate metabolism and colorectal carcinogenesis]." Gastroenterol Clin Biol **28**(6-7 Pt 1): 582-592.

Peyrin-Biroulet, L., A. Cieza, et al. (2012). "Development of the first disability index for inflammatory bowel disease based on the international classification of functioning, disability and health." Gut **61**(2): 241-247.

Peyrin-Biroulet, L., R. M. Gueant-Rodriguez, et al. (2008). "Association of MTRR 66A>G polymorphism with superoxide dismutase and disease activity in patients with Crohn's disease." Am J Gastroenterol **103**(2): 399-406.

Peyrin-Biroulet, L., R. M. Rodriguez-Gueant, et al. (2007). "Vascular and cellular stress in inflammatory bowel disease: revisiting the role of homocysteine." Am J Gastroenterol **102**(5): 1108-1115.

Peyrin-Biroulet, L., C. Vignal, et al. (2006). "NODs in defence: from vulnerable antimicrobial peptides to chronic inflammation." Trends Microbiol **14**(10): 432-438.

Pfluger, P. T., D. Herranz, et al. (2008). "Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(28): 9793-9798.

Pierik, M., S. Joossens, et al. (2006). "Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases." Inflamm Bowel Dis **12**(1): 1-8.

Plat, J. and R. P. Mensink (2005). "Food components and immune function." Curr Opin Lipidol **16**(1): 31-37.

Plowey, E. D., S. J. Cherra, 3rd, et al. (2008). "Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells." J Neurochem **105**(3): 1048-1056.

Poirier, L. A., P. H. Grantham, et al. (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 Res **37**(3): 744-748.

Pons, L., S. F. Battaglia-Hsu, et al. (2009). "Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin." PLoS One **4**(7): e6325.

Pooya, S., S. Blaise, et al. (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." J Hepatol **57**(2): 344-351.

Purushotham, A., T. T. Schug, et al. (2009). "Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation." Cell Metab **9**(4): 327-338.

Puthalakath, H., L. A. O'Reilly, et al. (2007). "ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim." Cell **129**(7): 1337-1349.

Qiu, A., M. Jansen, et al. (2006). "Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption." Cell **127**(5): 917-928.

Rafnsson, S. B., P. Saravanan, et al. (2011). "Is a low blood level of vitamin B12 a cardiovascular and diabetes risk factor? A systematic review of cohort studies." Eur J Nutr **50**(2): 97-106.

Raha, S. and B. H. Robinson (2000). "Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing." Trends Biochem Sci **25**(10): 502-508.

Ratter, F., C. Gassner, et al. (1999). "Modulation of tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity by changes of the cellular methylation state: mechanism and in vivo relevance." Int Immunol **11**(4): 519-527.

Refsum, H., P. M. Ueland, et al. (1998). "Homocysteine and cardiovascular disease." Annu Rev Med **49**: 31-62.

Rickes, E. L., N. G. Brink, et al. (1948). "Crystalline Vitamin B12." Science **107**(2781): 396-397.

Riley, S. A., V. Mani, et al. (1991). "Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean?" Gut **32**(2): 174-178.

Rioux, J. D., R. J. Xavier, et al. (2007). "Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis." Nat Genet **39**(5): 596-604.

Rodgers, J. T., C. Lerin, et al. (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." Nature **434**(7029): 113-118.

Romero-Ramirez, L., H. Cao, et al. (2004). "XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth." Cancer Res **64**(17): 5943-5947.

Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 519-529.

Rosenberg, I. H. (1990). "1989 Herman Award lecture. Folate absorption: clinical questions and metabolic answers." Am J Clin Nutr **51**(4): 531-534.

Rosenberg, I. H. (2008). "Metabolic programming of offspring by vitamin B12/folate imbalance during pregnancy." Diabetologia **51**(1): 6-7.

Rosengren, V., H. Johansson, et al. (2012). "Thapsigargin down-regulates protein levels of GRP78/BiP in INS-1E cells." J Cell Biochem **113**(5): 1635-1644.

Rosenstiel, P., M. Fantini, et al. (2003). "TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells." Gastroenterology **124**(4): 1001-1009.

Roybal, C. N., S. Yang, et al. (2004). "Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4." J Biol Chem **279**(15): 14844-14852.

Russel, M. G., E. Dorant, et al. (1997). "Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group." Gastroenterology **113**(2): 377-382.

Russel, M. G., A. Volovics, et al. (1998). "Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group." Inflamm Bowel Dis **4**(3): 182-186.

Russell-Jones, G. J. and D. H. Alpers (1999). "Vitamin B12 transporters." Pharm Biotechnol **12**: 493-520.

Rutsch, F., S. Gailus, et al. (2009). "Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism." Nat Genet **41**(2): 234-239.

Saibeni, S., M. Cattaneo, et al. (2003). "Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants." Am J Gastroenterol **98**(1): 112-117.

Saleh, M., J. C. Mathison, et al. (2006). "Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice." Nature **440**(7087): 1064-1068.

Scheuner, D. and R. J. Kaufman (2008). "The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes." Endocr Rev **29**(3): 317-333.

Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "ER stress and the unfolded protein response." Mutat Res **569**(1-2): 29-63.

Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "The mammalian unfolded protein response." Annu Rev Biochem **74**: 739-789.

Scott, J. M. (2001). "Evidence of folic acid and folate in the prevention of neural tube defects." Bibl Nutr Dieta(55): 192-195.

Seetharam, B., S. Bose, et al. (1999). "Cellular import of cobalamin (Vitamin B-12)." J Nutr **129**(10): 1761-1764.

Seetharam, B. and N. Li (2000). "Transcobalamin II and its cell surface receptor." Vitam Horm **59**: 337-366.

Selhub, J. (1999). "Homocysteine metabolism." Annu Rev Nutr **19**: 217-246.

Selhub, J., P. F. Jacques, et al. (1993). "Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population." JAMA **270**(22): 2693-2698.

Selhub, J. and J. W. Miller (1992). "The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine." Am J Clin Nutr **55**(1): 131-138.

Sheridan, A. M. and J. V. Bonventre (2000). "Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure." Curr Opin Nephrol Hypertens **9**(4): 427-434.

Shivananda, S., J. Lennard-Jones, et al. (1996). "Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)." Gut **39**(5): 690-697.

Shivapurkar, N. and L. A. Poirier (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**(8): 1051-1057.

Singh, S. B., A. S. Davis, et al. (2006). "Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria." Science **313**(5792): 1438-1441.

Singh, U. P., N. P. Singh, et al. (2010). "Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kappaB activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis." J Pharmacol Exp Ther **332**(3): 829-839.

Sirotnak, F. M. and B. Tolner (1999). "Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells." Annu Rev Nutr **19**: 91-122.

Smith, E. L. (1948). "Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver." Nature **161**(4095): 638.

Smith, J. S. and J. D. Boeke (1997). "An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA." Genes Dev **11**(2): 241-254.

Smith, M. H., H. L. Ploegh, et al. (2011). "Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum." Science **334**(6059): 1086-1090.

Sonnenberg, A. and J. Chang (2008). "Time trends of physician visits for Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States, 1960-2006." Inflamm Bowel Dis **14**(2): 249-252.

Spinella, M. J., K. E. Brigle, et al. (1995). "Distinguishing between folate receptor-alpha-mediated transport and reduced folate carrier-mediated transport in L1210 leukemia cells." J Biol Chem **270**(14): 7842-7849.

Stabler, S. P. and R. H. Allen (2004). "Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem." Annu Rev Nutr **24**: 299-326.

Stabler, S. P., P. D. Marcell, et al. (1988). "Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry." J Clin Invest **81**(2): 466-474.

Stevens, F. J. and Y. Argon (1999). "Protein folding in the ER." Semin Cell Dev Biol **10**(5): 443-454.

Sundar Rajan, S., V. Srinivasan, et al. (2007). "Endoplasmic reticulum (ER) stress & diabetes." Indian J Med Res **125**(3): 411-424.

Tabas, I. and D. Ron (2011). "Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress." Nat Cell Biol **13**(3): 184-190.

Takenaka, T., T. Shimomura, et al. (1993). "[Effect of folic acid for treatment of homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency]." Rinsho Shinkeigaku **33**(11): 1140-1145.

Tang, Y., J. Xu, et al. (2012). "Resveratrol reduces vascular cell senescence through attenuation of oxidative stress by SIRT1/NADPH oxidase-dependent mechanisms." J Nutr Biochem **23**(11): 1410-1416.

Tanner, S. M., Z. Li, et al. (2004). "Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B12: founder effects, consanguinity, and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East." Hum Mutat **23**(4): 327-333.

Tham, D. M., J. C. Whitin, et al. (2002). "Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis." Pediatr Res **51**(5): 641-646.

Tirasophon, W., A. A. Welihinda, et al. (1998). "A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells." Genes Dev **12**(12): 1812-1824.

Tissenbaum, H. A. and L. Guarente (2001). "Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans." Nature **410**(6825): 227-230.

Tsai, Y. C. and A. M. Weissman (2010). "The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer." Genes Cancer **1**(7): 764-778.

Tu, B. P., S. C. Ho-Schleyer, et al. (2000). "Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum." Science **290**(5496): 1571-1574.

Ueland, P. M., H. Refsum, et al. (2000). "The controversy over homocysteine and cardiovascular risk." Am J Clin Nutr **72**(2): 324-332.

Urano, F., X. Wang, et al. (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." Science **287**(5453): 664-666.

van der Put, N. M. and H. J. Blom (2000). "Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **92**(1): 57-61.

Van der Sluis, M., B. A. De Koning, et al. (2006). "Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection." Gastroenterology **131**(1): 117-129.

van Ede, A. E., R. F. Laan, et al. (2002). "Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **41**(6): 658-665.

Vasilopoulos, S., K. Saiean, et al. (2001). "Terminal ileum resection is associated with higher plasma homocysteine levels in Crohn's disease." J Clin Gastroenterol **33**(2): 132-136.

Vecchi, M., E. Sacchi, et al. (2000). "Inflammatory bowel diseases are not associated with major hereditary conditions predisposing to thrombosis." Dig Dis Sci **45**(7): 1465-1469.

Walter, P. and D. Ron (2011). "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." Science **334**(6059): 1081-1086.

Wang, F. M., Y. J. Chen, et al. (2011). "Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation." Biochem J **433**(1): 245-252.

Wang, G., C. W. Woo, et al. (2002). "Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of chemokine and adhesion molecules." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(11): 1777-1783.

Wang, J., T. Takeuchi, et al. (1999). "A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse." J Clin Invest **103**(1): 27-37.

Wang, X. Z., H. P. Harding, et al. (1998). "Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses." EMBO J **17**(19): 5708-5717.

Wang, Y., X. Shi, et al. (2012). "SIRT1 inhibits the mouse intestinal motility and epithelial proliferation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **302**(2): G207-217.

Wang, Y., R. Zhao, et al. (2001). "Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis." Biochim Biophys Acta **1513**(1): 49-54.

Watkins, D. and D. S. Rosenblatt (2011). "Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism." Am J Med Genet C Semin Med Genet **157C**(1): 33-44.

Webb, S. E. and A. L. Miller (2003). "Calcium signalling during embryonic development." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 539-551.

Wehkamp, J., M. Schmid, et al. (2005). "Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease." J Leukoc Biol **77**(4): 460-465.

Weitman, S. D., A. G. Weinberg, et al. (1992). "Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis." Cancer Res **52**(23): 6708-6711.

Wilkinson, B. and H. F. Gilbert (2004). "Protein disulfide isomerase." Biochim Biophys Acta **1699**(1-2): 35-44.

Wills, L. (1931). "Treatment of "Pernicious Anaemia of Pregnancy" and "Tropical Anaemia"." Br Med J **1**(3676): 1059-1064.

Wolf, S. S. (2009). "The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans." Cell Mol Life Sci **66**(13): 2109-2121.

Wormald, M. R. and R. A. Dwek (1999). "Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability." Structure **7**(7): R155-160.

Wu, L., L. Zhou, et al. (2012). "Activation of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against palmitate-induced dysfunction." Biochim Biophys Acta **1822**(11): 1815-1825.

Xavier, R. J. and D. K. Podolsky (2007). "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease." Nature **448**(7152): 427-434.

Xu, C., B. Bailly-Maitre, et al. (2005). "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions." J Clin Invest **115**(10): 2656-2664.

Yamaguchi, H. and H. G. Wang (2004). "CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells." J Biol Chem **279**(44): 45495-45502.

Yamamoto-Furusho, J. K., N. Barnich, et al. (2006). "Centaurin beta1 down-regulates nucleotide-binding oligomerization domains 1- and 2-dependent NF-kappaB activation." J Biol Chem **281**(47): 36060-36070.

Yang, H., Y. Zheng, et al. (2013). "Methionine adenosyltransferase 2B, HuR, and sirtuin 1 protein cross-talk impacts on the effect of resveratrol on apoptosis and growth in liver cancer cells." J Biol Chem **288**(32): 23161-23170.

Yang, S. K., E. V. Loftus, Jr., et al. (2001). "Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia." Inflamm Bowel Dis **7**(3): 260-270.

Yen, D., J. Cheung, et al. (2006). "IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6." J Clin Invest **116**(5): 1310-1316.

Yoshida, H. (2007). "ER stress and diseases." FEBS J **274**(3): 630-658.

Yoshida, H. (2007). "Unconventional splicing of XBP-1 mRNA in the unfolded protein response." Antioxid Redox Signal **9**(12): 2323-2333.

Yoshizaki, T., S. Schenk, et al. (2010). "SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(3): E419-428.

Zezos, P., G. Papaioannou, et al. (2005). "Hyperhomocysteinemia in ulcerative colitis is related to folate levels." World J Gastroenterol **11**(38): 6038-6042.

Zhang, J. X., I. Braakman, et al. (1997). "Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations." Mol Biol Cell **8**(10): 1943-1954.

Zhang, K. and R. J. Kaufman (2008). "From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response." Nature **454**(7203): 455-462.

Zhao, R., N. Diop-Bove, et al. (2011). "Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia." Annu Rev Nutr **31**: 177-201.

Zhao, R., L. H. Matherly, et al. (2009). "Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues." Expert Rev Mol Med **11**: e4.

Zhao, W., J. Zhao, et al. (2014). "HuR and TIA1/TIAL1 are involved in regulation of alternative splicing of SIRT1 pre-mRNA." Int J Mol Sci **15**(2): 2946-2958.

PUBLICATIONS

GUT
An International Journal of Gastroenterology and Hepatology

Confidential Review Only

Methyl deficient diet promotes colitis though SIRT1-mediated endoplasmic reticulum stress

Journal:	*Gut*
Manuscript ID:	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Melhem, Hassan Hansmannel, Franck Bressenot, Aude; Institut national de la santé et de la recherhce médicale, fang, shyue billioud, vincent alberto, jean-marc gueant, jean-louis Peyrin-Biroulet, Laurent; University Hospital of Nancy-Brabois, Inserm U954 and Department of Hepato-Gastroenterology; Université Henri Poincaré 1,
Keywords:	IBD BASIC RESEARCH

SCHOLARONE™
Manuscripts

Methyl deficient diet promotes colitis though SIRT1-mediated endoplasmic reticulum stress

Hassan Melhem, Franck Hansmannel*, Aude Bressenot, Syue-Fang Battaglia-Hsu, Vincent Billioud, Jean Marc Alberto, Jean Louis Gueant*[§], Laurent Peyrin-Biroulet*[§]

INSERM U954, Nutrition Génétique et exposition aux risques environnementaux, Université de Lorrain, Faculté de Médecine, Vandœuvre-Lès-Nancy cedex, 545050, France

*These authors share equal senior authorship and contribution

Body text word count: 3909

Abstract word count: 248

Confidential: For Review Only

Abbreviations used in this paper:

IBD, Inflammatory Bowel Disease; CD, Crohn's Disease; UC, Ulcerative Colitis; MDD, Methyl Donor Deficiency; ER, Endoplasmic Reticulum; DSS, Dextran Sulfate Sodium; DAI, Disease Activity Index; UPR, Unfolded Protein Response; 1CM, One Carbon Metabolism; SAM, S-adenosylmethionine; PERK, PKR -like ER kinase; ATF6, Activating Transcription Factor 6; IRE1, Inositol Required; SIRT1, Sirtuin 1; HSF1, Heat Shock Factor Protein 1; TO, Transcobalamin-Oleosin; OT, Oleosin-Transcobalamin; TG, Thapsigargin; PBS, Phosphate-Buffered Saline; PAF, Paraformaldehyde.

§To whom correspondence should be addressed:

Laurent Peyrin-Biroulet, MD, PhD and Jean-Louis Guéant, MD, PhD, AGAF

INSERM U954 and Department of Hepatogastroenterology,

University Hospital of Nancy-Brabois,

University of Lorraine

Allée du Morvan,

54511 Vandoeuvre-lès-Nancy

France

Phone: + 33 3 83 15 36 31/ Fax: + 33 3 83 15 36 33

E-mail: peyrinbiroulet@gmail.com and jean-louis.gueant@univ-nancy.fr

Confidential: For Review Only

Authors contributions:

HM, design of the study, performed the research, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript; FH, AB, SFB, VB, JMA, analysis of data; LPB, JLG, conception and design of the study, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript.

Keywords: Methyl donor deficiency, inflammatory bowel diseases, endoplasmic reticulum stress, SIRT1

Writing assistance: none

Confidential: For Review Only

ABSTRACT

Background: Methyl donor deficiency (MDD) aggravates experimental colitis in rats and decreases SIRT1 activity in cell models. Endoplasmic reticulum (ER) stress plays a key role in inflammatory bowel disease (IBD) pathogenesis.

Aim: We investigated whether the influence of MDD on colitis resulted from an ER stress response triggered by decreased SIRT1 expression.

Design: The Unfolded protein response (UPR), chaperone proteins, heat-shock factor protein 1 (HSF1) and SIRT1 were examined in rats with MDD and dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis, in a Caco-2 cell model with stable expression of transcobalamin-oleosin chimera (TO), which impairs cellular availability of vitamin B12, and in human IBD. The effects of SIRT1 activation were studied both *in vitro* and *in vivo*.

Results: MDD aggravated DSS-induced colitis clinically, endoscopically and histologically. MDD activated ER stress pathways, with increased p-PERK, p-eiF-2α, p-IRE-1α, ATF6, XBP1-S protein and ATF4 mRNA expression levels in rats. This was accompanied by reduced SIRT1 expression level and greater acetylation of HSF1, in relation with a dramatic decrease of chaperons (BIP, HSP27 and HSP90). Adding either vitamin B12, S-adenosylmethionine, or a SIRT1 activator (SRT1720) reduced the UPR *in vitro*. In rats, SIRT1 activation by SRT1720 prevented colitis by reducing acetylation of HSF1 and increasing the expression of BIP, HSP27 and HSP90. Immunohistochemistry showed impaired expression of SIRT1 in the colonic epithelium of IBD patients.

Conclusion: SIRT1 is a master regulator of ER stress and severity of experimental colitis in case of MDD. It could deserve further interest as a therapeutic target of IBD.

Confidential: For Review Only

SUMMARY BOX

What is already known

- Methyl donor deficiency is frequent in patients with inflammatory bowel disease (IBD) and promotes endoplasmic stress (ER)
- ER stress contributes to IBD pathogenesis
- SIRT1 may promote colitis in animals

What are the new findings

- Methyl donor deficiency aggravates colitis by reducing SIRT1 expression in rats
- SIRT1 expression level is impaired in colonic epithelium of IBD patients
- SIRT1 relieves experimental colitis by modulating the ER stress induced by methyl donor deficiency

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

Our findings indicate that SIRT1 activation may be a new therapeutic approach for human IBD.

Confidential: For Review Only

INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD) encompassing Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are chronic, disabling, incurable inflammatory conditions of the gastrointestinal tract [1]. Current concepts of IBD pathogenesis suggest a complex interplay between genetic, nutritional and environmental factors, and gut microbiota, in which the nutritional and genetic determinants of the one carbon metabolism (1CM) could produce modulating effects [2, 3]. The 1CM is a complex metabolic network, regulated by a number of genes, which requires micronutrients such as folate and vitamins B12 to function properly. This network synthesizes SAM (S-adenosylmethionine), the universal donor of methyl groups needed for epigenomic mechanisms that regulate gene expression and trigger cellular stress, differentiation and proliferation [4, 5]. Dysregulation in any of the regulatory components (nutritional, metabolic or genetic) of 1CM or environmental effects can alter the 1CM-epigenome axis and may influence IBD pathogenesis and severity [3]. Methyl donor deficiency (MDD) aggravates gastric and intestinal lesions and inflammation and weakens the intestinal barrier in rats [6-9]. MDD is frequent in patients with IBD and may contribute to CD pathogenesis [3, 10]. Endoplasmic reticulum (ER) stress plays a key role in IBD pathogenesis [11]. Gut inflammation may be linked to an inability to manage the unfolded protein response (UPR) in the epithelial barrier [12]. The UPR is mediated by three pathways that involve PKR -like ER kinase (PERK), Activating Transcription Factor 6 (ATF6) and Inositol Required 1 (IRE-1), respectively [13].

Sirtuin 1 (SIRT1), a transcriptional silencing factor at the silent mating loci [14-16], participates in the ER stress response related to inadequate nutrients uptake [16, 17]. Recently, we demonstrated that MDD in heart and brain, leads to ER stress through decreased expression and activity of the SIRT1 deacetylase ("Sirtuin (Silent mating-type Information

Confidential: For Review Only

Regulation 2 homolog) 1") and the subsequent hyperacetylation of transcription factor HSF1 ("Heat Shock Factor Protein 1") and decreased expression of UPR [5, 18-21].

In the present work, we showed that the dramatic aggravation of intestinal injury resulted from decreased SIRT 1 expression and subsequent ER stress, in experimental colitis in rats subjected to MDD. The molecular mechanisms were dissected in the animal model and in a previously described cell model of the stable expression of a chimer protein that impaired 1CM [22, 23]. The key role of decreased SIRT1 in triggering the intestinal injury was ascertained by preventing the cellular and mucosal effects through activation of SIRT1 by a potent specific agonist.

Confidential: For Review Only

MATERIALS AND METHODS

Animals and diet

In vivo manipulations were performed as recommended by the National Committee on Ethics Reflection Experiment (described in the "Guide for care and use of laboratory animals" NIH, MD, 1985). The experiments were performed on 50 adult females Wistar rats (Charles River, Arbresle, France). The animals are kept at room temperature 22-23 ° C, a light / dark cycle of 12 h, with free access to food and water. Females were divided into two distinct groups: a group receiving a deficient diet without donor methyl (vitamin B12, folate and choline, Special Diet Service, France) and a control group receiving a normal diet (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, France). These diets were maintained for 4 months.

Induction of colitis, disease activity index and endoscopy

Colitis was induced by administration of 5% DSS (Dextran Sulfate Sodium, molecular weight 36,000–50,000, MP Biomedical, Strasbourg, France) dissolved in water for 7 days.

Four months after the beginning of the deficiency, females rats were separated into four groups (1) rats fed with standard diet, not treated with DSS and used as controls (noted C DSS^-, n = 5) (2) rats fed with deficient diet and not treated with DSS (noted D DSS^-, n = 10). (3) rats fed with standard diet, treated with DSS and used as controls (noted C DSS^+, n = 10) and (4) rats fed with deficient diet with DSS (noted D DSS^+, n = 10).

Daily weight, physical condition, stool consistency, water/food consumption and the presence of gross and occult blood in excreta and at the anus were determined. The score of Colitis "disease activity index" (DAI) was also calculated using the following parameters: weight loss, stool consistency, and blood in the stool [24]. The score ranges from 0 to 4 (total score),

Confidential: For Review Only

which represents the sum of scores for weight loss, stool consistency and rectal bleeding divided by three.

Prior to the endoscopic procedure, mice were anesthetized by inhalation of isoflurane. The distal 3 cm of the colon and the rectum were examined using a rigid Storz Hopkins II mini-endoscope (length 30 cm, diameter 2 mm; Storz Inc., Tuttlingen, Germany) coupled to a basic Coloview system (with a xenon 175 light source and an Endovision SLB Telecam; Storz Inc.). Air was insufflated via a 9-French gauge overtube and a custom low-pressure pump with manual flow regulation (Rena Air 200; Rena, Meythet, France). All images were displayed on a computer monitor and recorded with video capture software (Studio Movie Board Plus from Pinnacle (Menlo Park, CA, USA)). Endoscopic score was calculated as described in [25].

Blood samples and colon tissue

Seven days after the beginning of DSS the rats were sacrificed by decapitation. Blood is collected at sacrifice into a tube containing heparin. The serum is recovered after centrifugation of whole blood. The colon was quickly removed, open longitudinally and gently washed in PBS1X (2.7 mmol/l KCl, 140 mmol/l NaCl, 6.8 mmol/l Na2HPO4•2H2O, 1.5 mmol/l KH2PO4, pH 7.4). The sampling for histologic studies were recovered by dissection and kept in paraformaldehyde (PAF) to 4% in order to be included in paraffin. Those for RNA and protein extractions were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 ° C.

Cell cultures

Caco2/TC7 (human colon adenocarcinoma) was cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5% fetal bovine serum (FCS) [23]. For stably transfected TO and OT cells, G418 at 1 mg/ml was included in the culture medium. The B12-binding

Confidential: For Review Only

capacity of the stably transfected cells were verified using radioactive Co57-CNB126 before and right after the experimental manipulations to ensure that TO cells remained B12-deficient and OT cells remained as control. Hydroxycobalamin, SAM and SIRT1 inhibitor, EX527 were purchased from Sigma (Lyon France). For Hydroxycobalamin (20µm) or SAM (75µm) treatment the cells were incubated for 5-7 days. For EX527, cells were treated at 5µm for 7 h. Finally, for Thapsigargin (TG) treatment, the cells were treated for 5 h at 1 µm.

SRT1720 treatment *in vitro* and *in vivo*

SIRT1 activator SRT1720 was obtained from Euromedex (Strasbourg, France). For SRT1720, the cells were treated for 8h at 1 µm. SRT1720 (100 mg/kg, >95% pure by C-13 NMR and LCMS; synthesized from Life Chemicals) [26] was administered through oral gavage for 7 days before the treatment of DSS and 7 seven days during the treatment for three groups: (1) rats fed with standard diet, treated with DSS (noted C DSS^+ SRT^+, n = 5), (2) rats fed with deficient diet with DSS (noted D DSS^+ SRT^+ n = 5) and (3) rats fed with deficient diet and not treated with DSS (noted D DSS^- SRT^+, n = 5).

Immunohistochemistry and immunofluorescence microscopy

For 24 hours colonic sample were fixed in 4% (m/v) formaldehyde pH 7.4 and were routinely processed and embedded in paraffin. Paraffin blocks were used to generate 5-µm-thick haematoxylin- and eosin-stained sections. Experimenters assigned the histological scores in blind condition of sample identity. Histological score was calculated as described in [27].

Patients

A total of 6 biopsy samples from tow patients operated on for colon cancer and tow patients with established UC were obtained during colonoscopy with a Single-Use Biopsy Forceps

Confidential: For Review Only

Radial Jaw3 (Boston Scientific, El Coyol, Costa Rica). The size of a biopsy specimen was between 2 – 4 mm^2 with an average weight of 6.4 mg.

Western blotting

Total protein was extracted from the colon by lysing homogenized tissue in a RIPA buffer (0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% NP-40) supplemented with protease inhibitors (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and then quantified using the BCA method. For each group, a total of 40 µg of protein was transferred to a PVDF membrane after electrophoretic separation. The membrane was pre-hybridized in 5 g/L skim milk or BSA for 1 h. The PVDF membrane was then incubated overnight with various primary antibodies (HSF1, BiP, IRE-1α, PERK, phospho-PERK, eIF-2α, phospho-eIF-2α, acetyl-lysine, HSP27, HSP90 (Cell Signaling, Saint Quentin en Yvelines, France), ATF-6α, SIRT1 (Santa Cruz, Nanterre, France), phospho-IRE-1alpha (Novus Biologicals, Montluc¸on, France), XBP (Biodesign, Memphis, TN, USA), ATF4 (Abnova, Le Perray en Yvelines, France). After washing in TBS, the appropriate secondary antibody conjugated to HRP was added, and the membrane was incubated at ambient temperature for 1 h. after washing in TBST again, the proteins were visualized using an ECL or ECL PLUS detection kit (Amersham, Velizy-Villacoublay, France). GAPDH was used as an internal reference control.

Immunoprecipitation

Protein immunoprecipitation was done using an immunoprecipitation kit (Roche) following the manufacturer's recommendation. After extraction of the specific lysis buffer and protein assay, 800 µg of total protein was incubated with 50 ml G-sepharose beads at 4°C for 1 hour under agitation. Then, 5 ml 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

Confidential: For Review Only

000g for 20 s. The pellet was resuspended in 100 ml laemmli buffer. For repeated run, these 100-ml aliquots were loaded per lane for SDS-PAGE gel electrophoresis followed by an immunoblotting against a primary antibody antiacetyl lysine (Cell Signaling).

Real Time PCR

Total RNA was purified from nitrogen frozen colon samples of control (n = 5) and MDD (n = 5) pups with the RNeasy Lipid Tissue kit following the recommendation of Qiagen (Courtaboeuf, France), which includes treatment with DNase. To check for possible DNA contamination of the RNA samples, reactions were also performed in the absence of Omniscript RT enzyme (Qiagen). The PCR was performed with the Quantitect SYBR Green PCR kit from Qiagen and the Light Cycler instrument from Roche Diagnostics (Manheim, Germany). Specific amplification of ATF4 mRNA was performed with as primers, forward: 5_CCT GAC TCT GCT GCT TAT ACT CTA AC 3_, reverse: 5_ ACT CCA GGT GGG TCA TAA GGT TTG3_. Quantization was performed with RNA polymerase 2 (Pol2) as internal standard with the following primers: forward, 5_GAT CTC TCT AAA GTT GAC CTC ATT GG 3_; reverse: 5_GCA TTA ACA TCA GGA ACA ATA AAg GC 3_. Real-time PCR was carried out using the DNA binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products. Temperature cycling for ATF4 run proceeded such as: 15 min. at 95C to activate the enzyme, followed by 40 cycles consisting of: 90C for 10 sec., 58C for 15 sec. and 72C for 15 sec. Temperature cycling for Pol2 run proceeded as: 15 min. at 95C to activate the enzyme, followed by 50 cycles consisting of: 94C for 10 sec., 55C for 20 sec. and 72C for 15 sec. Then melting curves analyses were performed by increasing temperature from 65 to 95C. Results were expressed as arbitrary units (AU) by calculating the ratio of crossing points of amplification curves of ATf4 mRNA and internal standard, respectively, using the RelQuant software (Roche Diagnostics).

Confidential: For Review Only

Statistical analysis

Data were analysed with Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkley, CA, USA). They were compared by using one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's test. P-value < 0.05 was considered to indicate significance.

Confidential: For Review Only

RESULTS

Confirmation of methyl donor deficiency

In blood samples of rats, levels of folate, vitamin B12, homocysteine (HCY), SAM and SAH were measured to evaluate the influence of MDD diet on these parameters. In groups fed with a MDD diet, folate and vitamin B12 concentrations were significantly decreased and HCY, SAH concentrations were significantly increased, as previously reported [19, 20] (Supplementary Figure 1).

Methyl donor deficiency aggravates DSS-induced colitis

The administration of DSS in drinking water to females' rats induced a colitis characterized by inflammatory cell infiltrations as previously described [28, 29]. Of note, DSS intake was similar in C DSS^+ and D DSS^+ in rats. Signs of acute colitis including diarrhea, bloody stools, weight loss were observed after two days of DSS treatment. As expected, the DAI score was higher in the C DSS^+ group than in the C DSS^- group (**$P < 0.01$) (Fig. 1A). The severity of colitis induced by DSS was aggravated by MDD, as reflected by the dramatically higher DAI score in the D DSS^+ group compared with the C DSS^+ group (*$P < 0.05$) (Fig. 1A). The endoscopic score indicates more severe colonic inflammation in the group D DSS^+ as compared with C DSS^+ group (Fig. 1B). This was confirmed histologically (Fig. 1C). Taken together, these data showed that MDD diet aggravates the severity of DSS-induced colitis clinically, endoscopically and histologically.

Methyl donor deficiency activates UPR *in vivo*

We measured the protein levels of the three ER stress transducers, p-PERK, p-IRE-1α, and ATF6, and the initiation factor translation p-eIF-2α to explore the influence of MDD on UPR, (Fig. 2A) [13]. There was an increase in active forms of the effectors of UPR (p-PERK, p-

Confidential: For Review Only

IRE-1α, and ATF6-p50) in the MDD group as compared with the control group (Fig 2A). To further evaluate the consequences of ER stress produced by MDD, we next measured the expression levels of mRNA ATF4 and XBP1, two main immediate effectors of these three stress transducers [30]. ATF4 level was up regulated in the D DSS$^-$ group as compared with the control group (Fig. 2B). This was accompanied by a dramatic increase in the spliced form of XBP1-S (Fig. 2B). Molecular chaperons, in particular BIP, are a central mediator of ER stress [12]. We showed that UPR activation was correlated with impaired expression of the molecular chaperons BIP, HSP27 and HSP90 (Fig. 2C). These experiments showed that MDD induced ER stress by enhancing UPR expression and related pathways.

Vitamin B12 cellular deficiency induces SIRT1-mediated UPR

To create cellular models deficient in vitamin B12, we previously created the stable expression of a chimeric B12 binding protein, transcobalamin-oleosin (TO) to intracellular endoplasmic membrane, in several neuronal and epithelial cell lines, including a human adenocarcinoma cells (Caco2) [22, 23]. The stable expression of TO chimera 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 [18, 22, 23]. The increased expression level of the activated forms of the two ER stress transducers, namely p-PERK and p-IRE-1α, indicated the presence of an important cell stress in vitamin B12 deficient Caco-2 TO cells (Fig. 4). The decreased expression level of the molecular chaperons (BIP, HSP27 and HSP90) was related to increased acetylation of the transcription factor HSF1 [18], through its decreased SIRT1-dependent deacetylation [31] (Fig. 4). These effects resulted from the vitamin B12 impaired cellular availability, as showed by the higher phosphorylation level of PERK and IRE-1□ in TO cells and the higher expression level of molecular chaperons and SIRT1, and were

Confidential: For Review Only

reversed after the addition of vitamin B12 and SAM (Fig. 4). To further evaluate the modulating effects of vitamin B12 cellular availability on ER stress, we next stimulated Caco-2 cells with Thapsigargin (TG). TG induces ER stress by inhibiting ER calcium pump. Treatment of OT cells with TG reduced the protein expression levels of BIP, HSP27, and HSP90. The addition of vitamin B12 increased the protein expression level of molecular chaperons after TG treatment in OT cells.

Decreased expression of SIRT1 in rats fed with methyl deficient diet

We tested whether the decreased expression and activity of SIRT1 trigger the ER stress induced by MDD in our rat model of experimental colitis. Western blot analysis of MDD rats showed a decrease in the expression level of SIRT1 and immunoprecipitation of mucosal extract with anti-acetyl lysine revealed higher acetyl-HSF1 expression level in the group D DSS^- group (Fig. 3A). Taken together, these data suggested that impaired expression of SIRT1 may promote MDD-induced ER stress *in vivo*.

Effects of the pharmacological activation of SIRT1 *in vitro* and *in vivo*

To further explore the role of SIRT1 in MDD-induced ER stress, we evaluated the effects of its pharmacological activation both *in vitro* and *in vivo*. We used a well-known SIRT1 activator, namely SRT1720 [26] and EX527, a SIRT1 inhibitor [32]. In TO cells expression levels of BIP, HSP27 and HSP90 were increased following SRT1720 stimulation, whereas in OT cells inhibiting SIRT1 activity with EX527 reduced the expression level of these molecular chaperons (Fig. 5A).

We next analyzed *in vivo* the effects of SIRT1activation on UPR in DSS-induced in rats with MDD. DSS-induced intestinal inflammation was significantly decreased after treatment with SRT1720 in case of MDD (Fig. 5B). The DAI score was broadly similar between the C DSS^+

Confidential: For Review Only

group and the C DSS^+ SRT^+ group (Fig. 5B). The changes in DAI score was confirmed endoscopically and histologically (Fig. 5C, 5D). As shown in figure (5E), boosting SIRT1 activity with SRT1720 resulted in increased expression of molecular chaperons (BIP, HSP27 and HSP90) and decreased ATF4 expression level. Consistently, western blot analysis using anti-acetyl lysine on the immuno-precipitaded HSF1 revealed lower acetylation of immunoprecipitated HSF1 in the group D DSS^- SRT^+ as compared with D DSS^- group (Fig. 5E). Importantly, in rats with a normal diet, SIRT1 activation did not relieve colitis.

Impaired expression of SIRT1 in human inflammatory bowel disease

ER stress plays a key role in IBD pathogenesis, but the modulating role of SIRT1 remains unknown [30]. Our DSS/ MDD rat model can be considered as an experimental model of colitis, in which the decreased SIRT1 expression could contribute to IBD pathogenesis. We therefore investigated whether such a decreased expression occurs also in humans by studying the immunohistochemical expression of SIRT1 in the colonic epithelium of IBD patients (Fig. 6A). Results showed impaired expression of SIRT1 in intestinal mucosa neighboring the injured mucosa of IBD patients as compared with macroscopically normal mucosa from resected colon of patients operated on for colon cancer (Fig. 6A). Expression levels of ATF6 and BIP were increased in IBD patients as compared with healthy controls (Fig. 6B).

Confidential: For Review Only

DISCUSSION

Methyl donor deficiency (folate, vitamin B12) is frequent in IBD patients and may contribute to IBD pathogenesis [10]. We first demonstrated that MDD aggravates DSS-induced colitis clinically, endoscopically and histologically in rats. As expected, MDD alone did not promote intestinal inflammation.

Impaired cellular availability in vitamin B12 induces ER stress in neuronal cell models, but its effect is unknown in cancer cells that resemble colon epithelial cells and in intestinal mucosa of MDD rats [18]. Our data show that MDD induced ER stress both *in vivo* and *in vitro*, with an increase in the expression levels of the active forms of the UPR (p-PERK, p-IRE-1α and ATF6). Consistently, p-eif-2α, XBP1-S and ATF4 were also increased in colonic samples in rats with MDD. The effects were related to the impaired 1CM remethylation pathway catalyzed by the B12-dependent methionine synthase and the subsequent decreased synthesis of SAM. Indeed, adding vitamin B12 and SAM to TO cells restored molecular chaperon expression levels at the same level in OT cells and decreased the expression levels of p-PERK and p-IRE-1α, thus confirming our previous findings [18]. The addition of vitamin B12 to Caco-2 cells subjected to a strong stimulator of ER stress, namely TG, reduced the expression levels of BIP, HSP27 and HSP90 in OT cells. We previously observed a similar finding following TG treatment with B12 in neuroblastoma cells [18].

We found that MDD induced ER stress through an impaired expression of SIRT1 and a subsequent increased acetylation of HSF1, as previously reported in neuronal cell models [18-20]. SIRT1 increases the life span of many species tested and is implicated in the regulation of ER stress [33]; Wang et al. demonstrated that the UPR modulator XBP1-S is deacetylated by SIRT1 [34]. Resveratrol, a natural agonist of SIRT1, protects cell form apoptosis by inhibiting ER stress in hepatocytes and pancreatic beta cells, [32, 35]. In HepG2 cells, SIRT1 also improved palmitate-induced insulin resistance via regulation of ER stress [36]. SIRT1

Confidential: For Review Only

potentiates the binding between HSF1 and its promoter, affecting the attenuation phase of heat shock response by deacetylating HSF1 [31]. The increased acetylation of HSF1 accelerates the attenuation of heat shock response. To establish the role of SIRT1 in promoting ER stress, we investigated the effects of its activation or inhibition both *in vitro* and *in vivo*. SRT1720 is a well-known activator of SIRT1 [26]. In TO cells, SRT1720 treatment had a remarkable protecting effect by increasing protein level of molecular chaperons after TG treatment. *In vivo* boosting SIRT1 activity by SRT1720 increased protein levels of molecular chaperons BIP, HSP27 and HSP90 and decreased the acetylated forms of HSF1.

SIRT1 plays a critical role in the control of intestinal homeostasis by promoting apoptosis and by inhibiting proliferation [37]. The SIRT1 KO mice showed enhanced crypt proliferation and suppressed villous apoptosis, resulting in increased intestinal villous height [37]. Furthermore, Youngshim et al. showed the involvement of SIRT1 in the protection against hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet-induced ER stress response and inflammation [38]. SIRT1 can suppress inflammation by repressing of NF-κB activity or transcription [39, 40]. Recently, two studies suggested that SIRT1 may promote colitis [41, 42]. However, the underlying mechanisms remain poorly understood. We evaluated for the first time the impact of SIRT1 in DSS-induced colitis on ER stress and UPR in case of MDD. To explore the impact of SIRT1 on DSS-induced colitis in case of MDD we evaluated the effects of its pharmacological activation in rats. Interestingly, boosting SIRT1 activity by SRT1720 relieves experimental colitis clinically, endoscopically and histologically in rats subjected to MDD. Importantly, SIRT1 activation did not relieve colitis in rats with a normal diet. This result suggest that the decreased of activity SIRT1 is a key actor of the aggravating effect of MDD on experimental colitis. Two previous reports found that SIRT1 activation may be a curative treatment of experimental colitis in mice with a normal diet [41, 42]. Discrepancy

Confidential: For Review Only

between our findings and these two studies may be explained by the fact that we tested the preventive but not the curative effects of the SIRT1 agonist.

In patients with IBD, we observed an impaired expression of SIRT1 in the colonic epithelium, which further underscores the potential contribution of SIRT1 to human IBD pathogenesis. ER stress has a key role in IBD pathogenesis [30]. The UPR is a cellular stress mechanism that allows cells to cope with conditions of ER stress [43, 44]. Studies in humans suggested that ER stress may be a primary cause of intestinal inflammation [45]. In particular, increased BIP mRNA levels were reported in colonic [12, 45, 46] and ileal [45] samples of IBD patients. In line with these findings and our previous reports, we observed a decreased SIRT1 expression and increased expression levels of ATF6 and BIP in the normal colon mucosa in IBD patients. These proteins are master regulators of ER homeostasis [11].

In conclusion, our findings indicate that SIRT1 is a master regulator of ER stress during experimental colitis in rats with MDD. The decreased expression of SIRT1 leads to hyperacetylation of HSF1 and down-regulation of chaperons required for maintaining intestinal homeostasis (Figure 7). The master role of SIRT1 was ascertained by the prevention colitis and reversal of ER stress, using a potent SIRT1 agonist. Interestingly, colonic expression of SIRT1 was impaired in colonic epithelium of IBD patients. Whether SIRT1 pharmacological activation may be used to treat human IBD has yet to be determined.

Confidential: For Review Only

Competing interests: None

Funding sources:

None

Acknowledgments:

We thank Dr. JB Chevaux for his help in performing endoscopy.

The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd and its Licensees to permit this article (if accepted) to be published in Gut editions and any other BMJPGL products to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence.

Confidential: For Review Only

Figure legends

Figure 1: Methyl donor deficiency (MDD) aggravates DSS-induced colitis. **(A)** Disease Activity Index (DAI): Control animals (noted C) DSS^+ *versus* C DSS^-, $^{**}P < 0.01$; MDD (noted D) DSS^+ *versus* C DSS^+, $^{**}P < 0.01$. **(B)** Endoscopic score: C DSS^+ *versus* D DSS^+, $^{***}P < 0.001$. **(C)** Histological score: C DSS^+ *versus* D DSS^+, $^{*}P < 0.05$.

Figure 2: Methyl donor deficiency activates UPR *in vivo.* **(A)** Western blot analysis of PERK, phosphorylate PERK [p-PERK], IRE-1α, phosphorylated IRE-1α [p-IRE-1α] eIF-2α, phosphorylated eIF-2α [p-eIF-2α], and ATF6 obtained from colonic samples of control rats (C) and rats fed with MDD (D). In the D DSS^- group, the p-PERK/PERK, p-IREE-1α/IRE-1α, p-eIF-2α/eIF-2α and ATF6 protein levels are significantly increased as compared to the control group ($^{**}P < 0.01$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{*}P < 0.05$ respectively). **(B)** The downstream signaling pathways of UPR are activated in this group, with increased ATF4 mRNA level ($^{*}P < 0.05$) and expression level of XBP1-S splicing ($^{*}P < 0.05$). **(C)** ER stress activation is associated with reduced expression level of molecular chaperons BIP, HSP27, HSP90 ($^{*}P < 0.05$). Data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's test, with n = 5 in each group, and presented as means ± standard error (*, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$;***, $p < 0.001$).

Figure 3: Vitamin B12 cellular deficiency induces SIRT1-mediated UPR. Representative western blots obtained from B12 deficient TO cells and OT control cells before and after treatment with vitamin B12 a 20 µm and with SAM at 75 µm, respectively. In TO cells, the p-PERK/PERK and p-IRE-1α/IRE-1α protein levels are significantly increased compared to that control cells. This increased p-PERK/PERK and p-IRE-1α/IRE-1α level was reversed following treatment with vitamin B12 and SAM. Vitamin B12 and SAM treatment also

Confidential: For Review Only

reversed protein levels of molecular chaperons (BIP, HSP27 and HSP90), SIRT1 and HSF1 in TO cells. The TG treatment in control OT cells reduced expression levels of BIP, HSP27, HSP90 and SIRT1. Addition of vitamin B12 in the culture medium reversed this impaired expression.

Figure 4: Decreased expression of SIRT1 in rats fed with methyl deficient diet. (A) In the D DSS^- group, the protein levels of SIRT1 and HSF1 acetylated are significantly reduced compared to that in control rats (***$P < 0.001$). Data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with Fishers test, with n = 5 in each group and presented as means ± standard error (*, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$;***, $p < 0.001$).

Figure 5: Effects of the pharmacological activation of SIRT1 *in vitro* and *in vivo*. (A) Western blot analysis of BIP, HSP27, HSP90 and SIRT1. Addition of SRT1720 in the culture medium increased their expression level. Vitamin B12 reversed the effects EX527 treatment in OT cells on the expression level of these molecular chaperons. **(B)** Effects of MDD and SRT1720 on DAI during DSS-induced colitis in rats: D DSS^+ SRT^+ *versus* D DSS^+, (*$P < 0.05$). **(C)** Endoscopic scores: D DSS^+ SRT^+ *versus* D DSS^+, (***$P < 0.001$). **(D)** Histological examination of the mucosa of the MDD rats treated with both DSS and SRT1720 (D DSS^+ SRT^+) as compared with control animals (C DSS^+ SRT^+). **(E)** Western blots analysis of SIRT1, HSF1, BIP, HSP27, and HSP90. The SRT1720 treatment of rats fed with MDD diet increased their protein expression level. SRT1720 reversed the higher level of acetylated HSF1 (*$P < 0.05$). Data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's test, with n= 5 in each group, and presented as means ± standard error (*, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$;***, $p < 0.001$).

Confidential: For Review Only

Figure 6: Impaired expression of SIRT1 in human inflammatory bowel disease. (A) Immunohistochemistry of SIRT1 in the colonic epithelium of control and IBD (injured and non-injured mucosa) patients. **(B)** Western blot analysis of ATF6 and BIP expression in the colonic epithelium of control and IBD patients.

Figure 7: Schematic representation of MDD-induced ER stress trough SIRT1 and HSF1. (A) Physiological conditions without MDD. **(B)** Methyl deficient diet.

Confidential: For Review Only

References

1 Peyrin-Biroulet L, Desreumaux P, Sandborn WJ, Colombel JF. Crohn's disease: beyond antagonists of tumour necrosis factor. Lancet 2008;372:67-81.

2 Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature 2007; 448:427-434.

3 Peyrin-Biroulet L, Rodriguez-Gueant RM, Chamaillard M, et al. Vascular and cellular stress in inflammatory bowel disease: revisiting the role of homocysteine. The American journal of gastroenterology 2007;102:1108-1115.

4 Gueant JL, Caillerez-Fofou M, Battaglia-Hsu S, et al. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. Biochimie 2013;95:1033-1040.

5 Gueant JL, Namour F, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? Trends in endocrinology and metabolism 2013;24:279-289.

6 Chen M, Peyrin-Biroulet L, George A, et al. Methyl deficient diet aggravates experimental colitis in rats. Journal of cellular and molecular medicine 2011;15:2486-2497.

7 Bressenot A, Pooya S, Bossenmeyer-Pourie C, et al. Methyl donor deficiency affects small-intestinal differentiation and barrier function in rats. The British journal of nutrition 2012;16:1-11.

8 Bossenmeyer-Pourie C, Blaise S, Pourie G, et al. Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat. The American journal of pathology 2010;176:270-277.

9 Bossenmeyer-Pourie C, Pourie G, Koziel V, et al. Early methyl donor deficiency produces severe gastritis in mothers and offspring through N-homocysteinylation of cytoskeleton proteins, cellular stress, and inflammation. Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2013;27:2185-2197.

10 Peyrin-Biroulet L, Gueant-Rodriguez RM, Chen M, Bronowicki JP, Bigard MA, Gueant JL. Association of MTRR 66A>G polymorphism with superoxide dismutase and disease activity in patients with Crohn's disease. The American journal of gastroenterology 2008;103:399-406.

11 Bogaert S, De Vos M, Olievier K, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in inflammatory bowel disease: a different implication for colonic and ileal disease? PloS one 2011;6:e25589.

12 Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. PLoS medicine 2008;5:e54.

13 Treton X, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, et al. Altered endoplasmic reticulum stress affects translation in inactive colon tissue from patients with ulcerative colitis. Gastroenterology 2011;141:1024-1035.

Confidential: For Review Only

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 & development 1995;9:2888-2902.

15 Ivy JM, Klar AJ, Hicks JB. Cloning and characterization of four SIR genes of Saccharomyces cerevisiae. Molecular and cellular biology 1986;6:688-702.

16 Strum JC, Johnson JH, Ward J, et al. MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. Molecular endocrinology 2009;23:1876-1884.

17 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.

18 Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, et al. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. Cell death & disease 2013;4:e553.

19 Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, et al. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1alpha hypomethylation and decreased ER-alpha, ERR-alpha, and HNF-4alpha in the rat liver. Journal of hepatology 2012;57:344-351.

20 Garcia MM, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, et al. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. The Journal of pathology 2011;225:324-335.

21 Gueant JL, Elakoum R, Ziegler O, et al. Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in the liver and heart. European journal of physiology 2013.

22 Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, et al. 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 2009;106:21930-21935.

23 Pons L, Battaglia-Hsu SF, Orozco-Barrios CE, 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.

24 Murthy SN, Cooper HS, Shim H, Shah RS, Ibrahim SA, Sedergran DJ. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. Digestive diseases and sciences 1993;38:1722-1734.

25 Becker C, Fantini MC, Wirtz S, et al. In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. Gut 2005;54:950-954.

26 Milne JC, Lambert PD, Schenk S, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. Nature 2007;450:712-716.

27 Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Dutt S, Herd ME. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? Gut 1991;32:174-178.

Confidential: For Review Only

28 Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology 1990;98:694-702.

29 Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2005;288:G1328-1338.

30 Kaser A, Flak MB, Tomczak MF, Blumberg RS. The unfolded protein response and its role in intestinal homeostasis and inflammation. Experimental cell research 2011;317:2772-2779.

31 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.

32 Wu L, Zhou L, Lu Y, et al. Activation of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against palmitate-induced dysfunction. Biochimica et biophysica acta 2012;1822:1815-1825.

33 Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans. Nature 2001;410:227-230.

34 Wang FM, Chen YJ, Ouyang HJ. Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation. The Biochemical journal 2011;433:245-252.

35 Liu L, Fan Z, Tang Y, Ke Z. The Resveratrol Attenuates Ethanol-Induced Hepatocyte Apoptosis Via Inhibiting ER-Related Caspase-12 Activation and PDE Activity In Vitro. Alcoholism, clinical and experimental research 2013.

36 Jung TW, Lee KT, Lee MW, Ka KH. 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 2012;422:229-232.

37 Wang Y, Shi X, Qi J, Li X, Uray K, Guan X. SIRT1 inhibits the mouse intestinal motility and epithelial proliferation. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 2012;302:G207-217.

38 Choi Y, Yanagawa Y, Kim S, Park T. Involvement of SIRT1-AMPK signaling in the protective action of indole-3-carbinol against hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. The Journal of nutritional biochemistry 2013;24:1393-1400.

39 Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. Journal of the european molecular biology organization 2004;23:2369-2380.

40 Ghosh HS, Spencer JV, Ng B, McBurney MW, Robbins PD. Sirt1 interacts with transducin-like enhancer of split-1 to inhibit nuclear factor kappaB-mediated transcription. The Biochemical journal 2007;408:105-111.

41 Cui X, Jin Y, Hofseth AB, et al. Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis. Cancer prevention research 2010;3:549-559.

Confidential: For Review Only

42 Singh UP, Singh NP, Singh B, et al. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kappaB activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 2010;332:829-839.

43 Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. Nature reviews Immunology 2008;8:663-674.

44 Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. Nature 2008;454:455-462.

45 Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. Cell 2008;134:743-756.

46 Shkoda A, Ruiz PA, Daniel H, et al. Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. Gastroenterology 2007;132:190-207.

Confidential: For Review Only

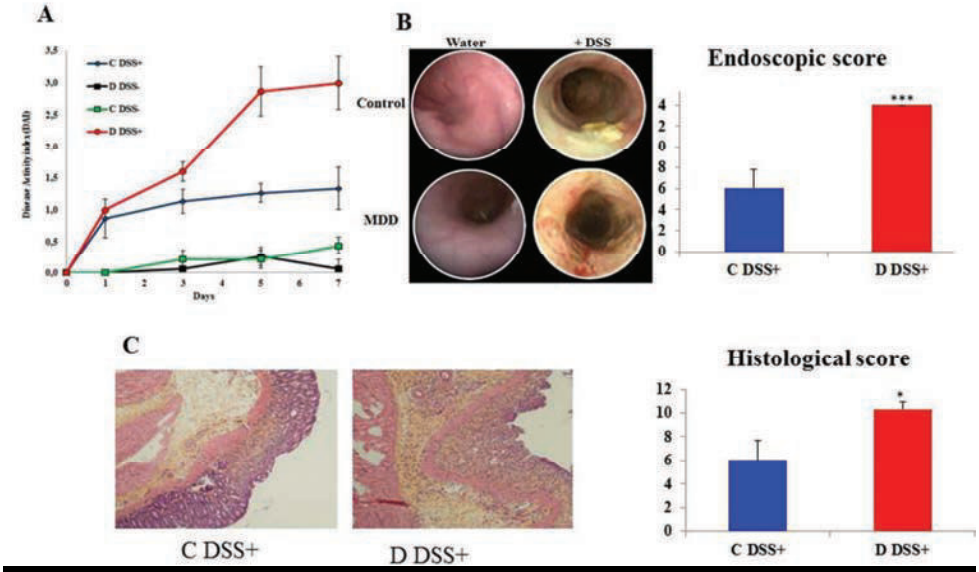


Figure 1

254x190mm (96 x 96 DPI)

Review Only

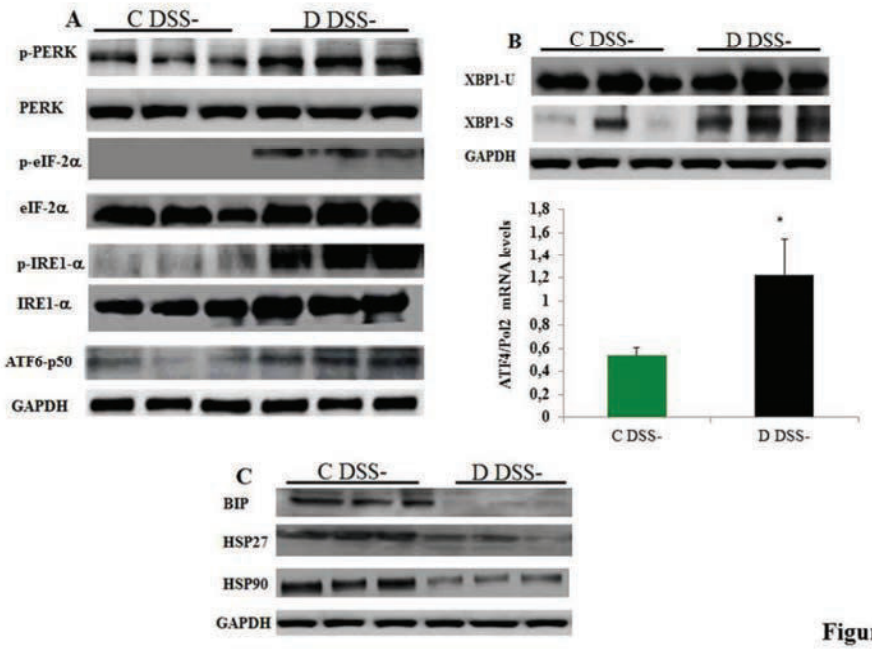


Figure 2

254x190mm (96 x 96 DPI)

Review Only

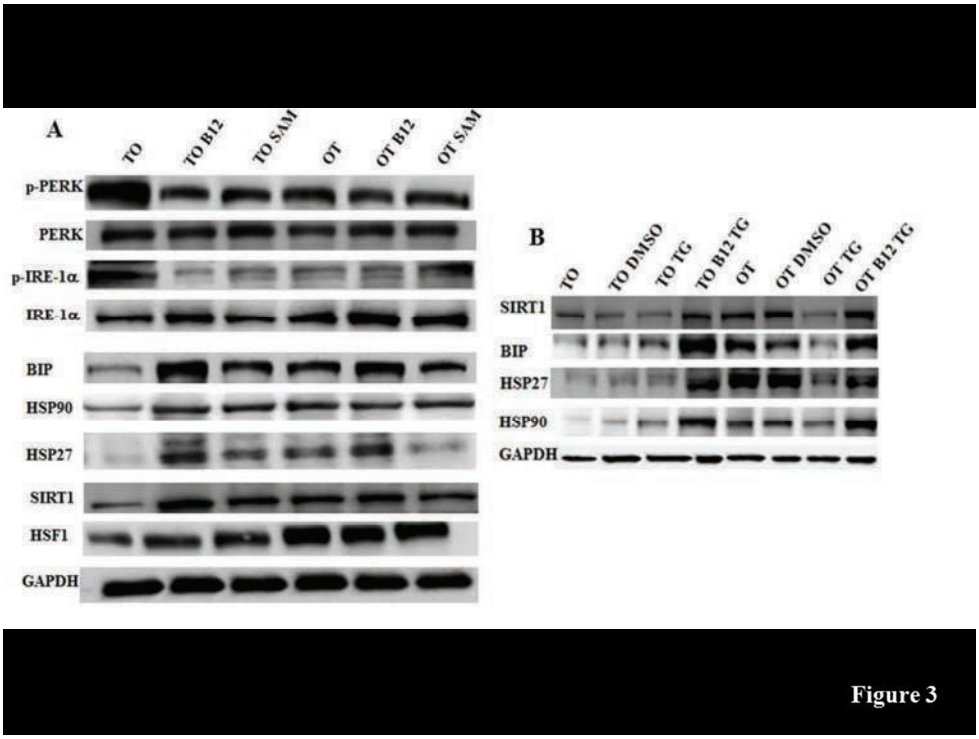


Figure 3

254x190mm (96 x 96 DPI)

Review Only

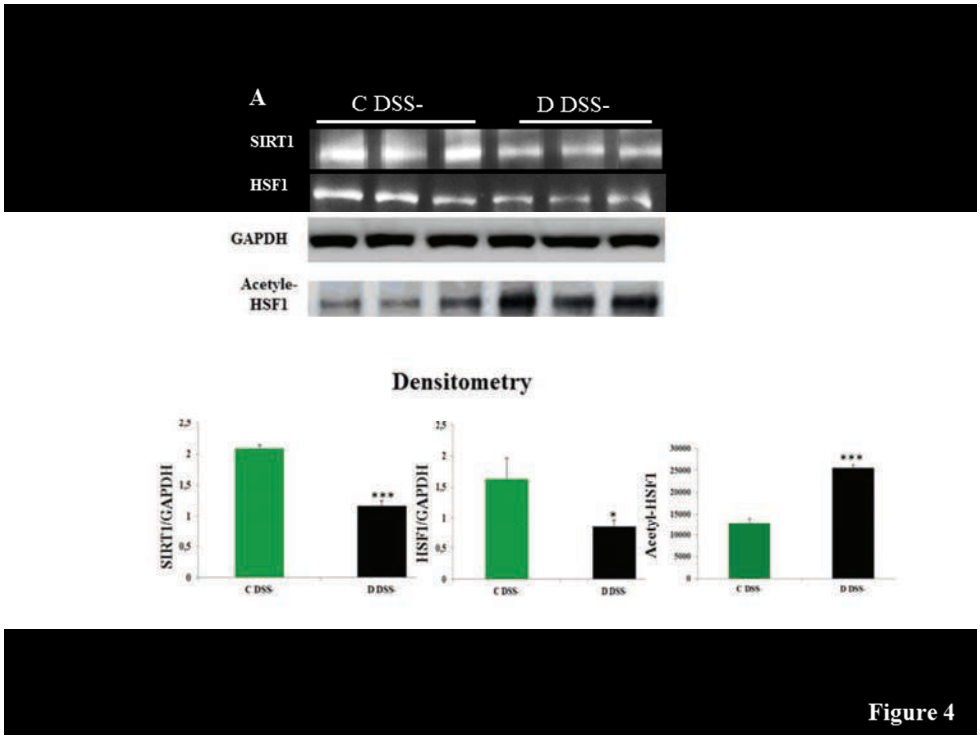


Figure 4

254x190mm (96 x 96 DPI)

Review Only

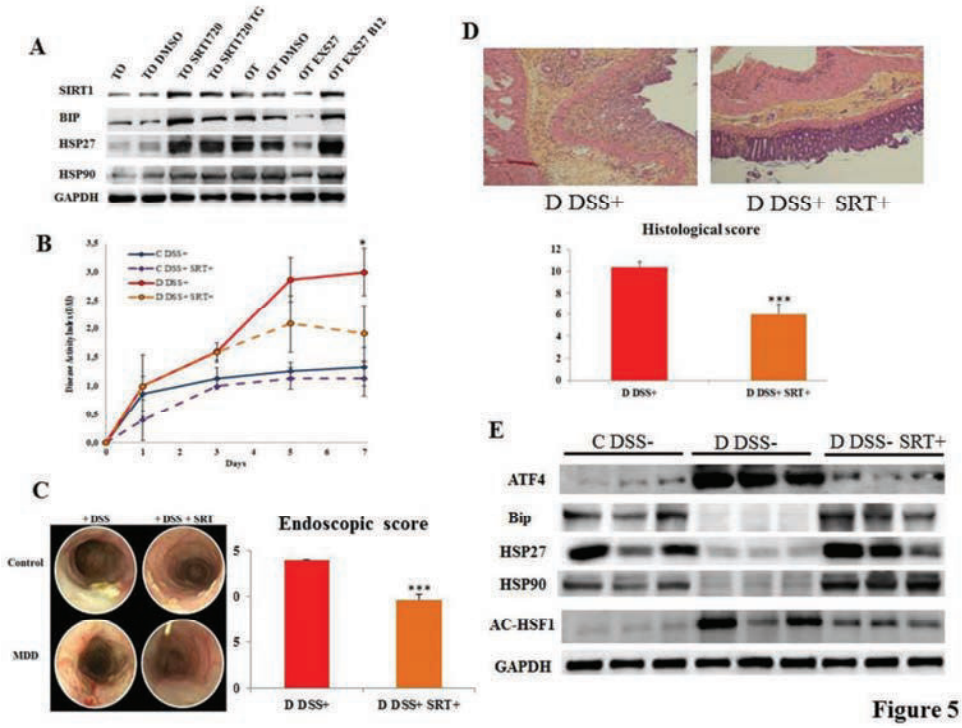


Figure 5

254x190mm (96 x 96 DPI)

Review Only

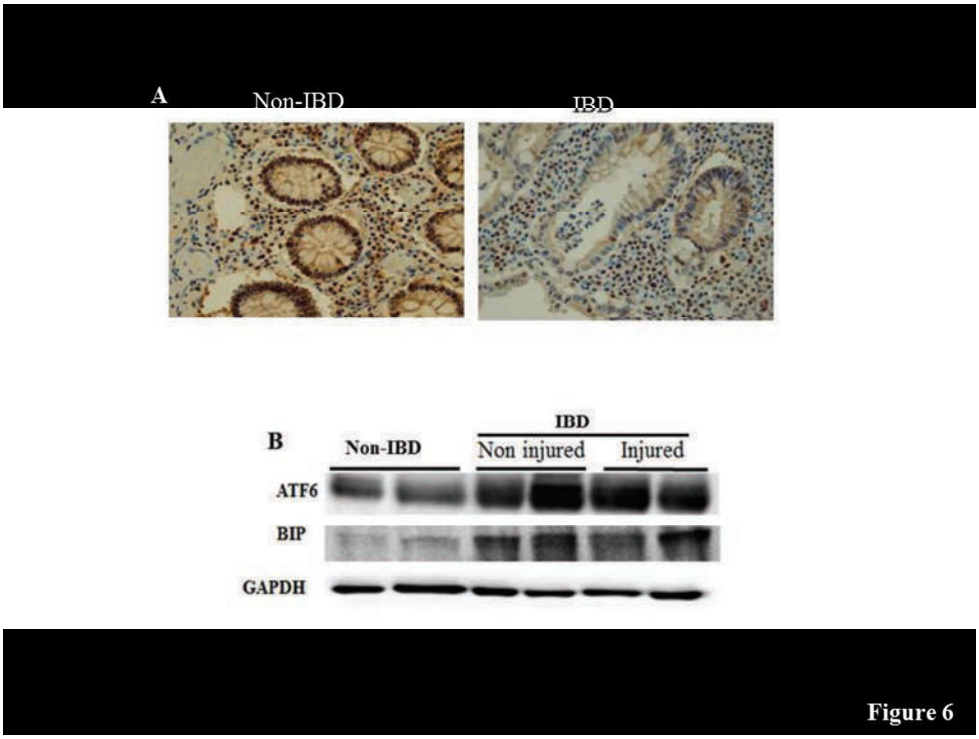


Figure 6

254x190mm (96 x 96 DPI)

Review Only

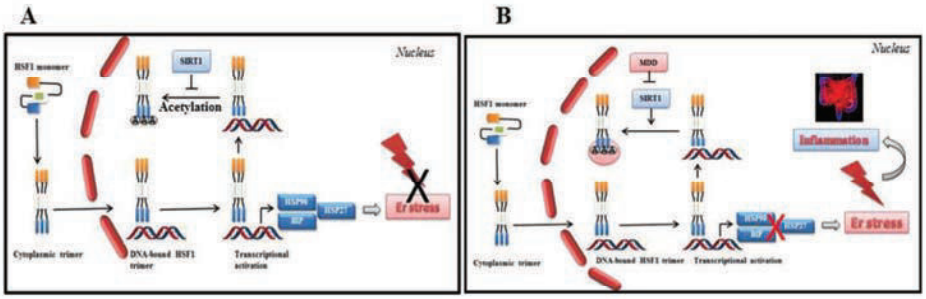
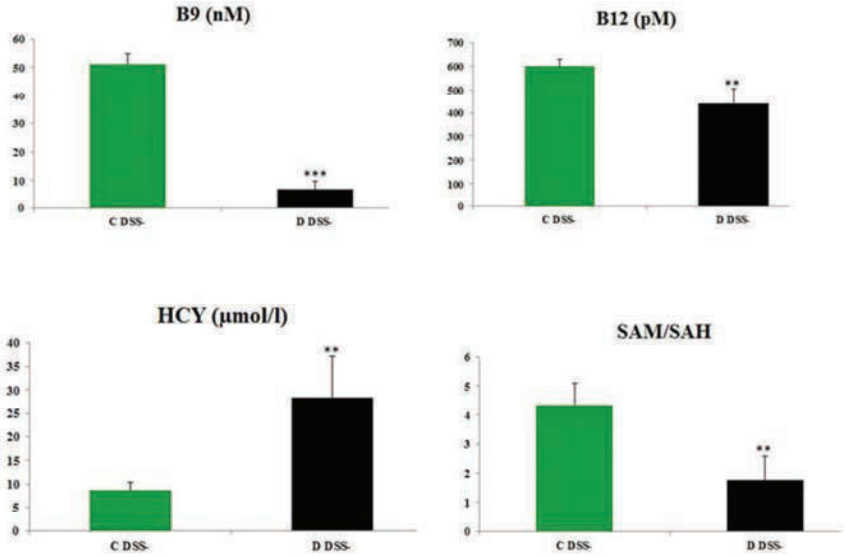


Figure 7

254x190mm (96 x 96 DPI)

Review Only



Supplementary Figure 1

254x190mm (96 x 96 DPI)

Review Only

MANUSCRIT SOUMIS POUR PUBLICATION (*PNAS)*

CARM1/PRMT1 heterodimerization is a mechanism by which active CARM1 is retained in the nucleus in A549 cells

Rania Elakoum, Melhem Hassan[§], Mrabet Nadir[§], Ghemrawi Rose, Christelle Clément-Duchêne, Jean-Louis Guéant, Farès Namour*

Running title: CARM1 and PRMT1 interaction

INSERM NGERE UMR 954 Vandoeuvre F-54500, France

[§] equal contribution

* To whom correspondence should be addressed: INSERM UMR 954, Faculté de Médecine, 9 ave Forêt de Haye, BP 184, 54511 Vandoeuvre France, Tel : 03 83 68 32 92, Fax : 03 83 68 32 79,

e-mail: bernard.namour@medecine.uhp-nancy.fr;

The authors declare no conflict of interest

Financial support was provided by INSERM UMR954

Key words: CARM1, PRMT1, phosphorylation, MAP2K3, non-small cell lung cancer

Word count:

Abstract

CARM1 and PRMT1 are members of the Protein Arginine MethylTransferase family involved in transcriptional co-activation. They form homodimers essential for their enzymatic activity, but heterodimer formation has never been reported. Phosphorylation of rat CARM1 at serine 229 (equivalent to serine 228 in humans) prevents CARM1 dimerization. We found in A549 cells (lung adenocarcinoma) that CARM1 is not phosphorylated at serine 228, localizes in the nucleus and heterodimerizes with PRMT1. In H1299 (lung adenocarcinoma) and Caco2/TC7 (colorectal adenocarcinoma) cells, CARM1 phosphorylated at serine 228 is detected, localizes in the cytoplasm and does not heterodimerize with PRMT1. We found that CARM1 is phosphorylated at serine 228 by MAP2K3 kinase. MAP2K3 inhibition by the compound PD184352 suppresses serine 228 phosphorylation and restores CARM1/PRMT1 interaction in H1299 cells and Caco2/TC7, indicating that unphosphorylated serine 228 is necessary for CARM1 to heterodimerize with PRMT1. CARM1 methylates the promoters of Sox2 and Nanog, only when it forms a

heterodimer with PRMT1. Molecular docking of the rat protein showed that phosphorylation of serine 229 interrupts the interaction between CARM1 asparagine 230 and PRMT1 aspartate 205 and abrogates the CARM1/PRMT1 dimerization. In addition, serine 229 is buried in the homodimer and heterodimer structures, suggesting that only CARM1 monomers are available for phosphorylation. In conclusion, CARM1/PRMT1 heterodimer formation, regulated by CARM1 serine 228 phosphorylation, might be viewed as an addressing mechanism: it retains CARM1 in the nucleus where it is active and methylates target genes.

Introduction

CARM1 (Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1) belongs to the PRMT family (Protein Arginine MethylTransferase) and is classified as a type 1 PRMT that produces asymmetric dimethylated arginine. A common feature of the PRMT family is dimer formation (Cheng et al., 2005). CARM1 activates transcription by nuclear receptors in synergy with two classes of activators: the SRC/p160 family of activators and the acetyltransferases p300 (E1A binding protein) and CBP (cAMP-response element-binding protein-binding protein) (Chen et al., 1999; Feng et al., 2006). CARM1 also functions as a co-repressor in c-AMP signaling (Xu et al., 2001). CARM1 methylates arginine residues 17 and 26 of histones H3 (Stallcup et al., 2000). In addition, CARM1 methylates RNA binding proteins such as PABP1, HuR (Bedford and Richard, 2005) and splicing factors such as CA150, SAP49, SmB and U1C (Bedford and Clarke, 2009). CARM1 cooperates with PRMT1, another member of the PRMT family which methylates arginine residue 3 of histone H4, in regulating gene expression (Kleinschmidt et al., 2008).

Conflicting roles are attributed to CARM1 either in differentiation or proliferation. For instance, CARM1 is necessary for differentiation of adipocytes (Yadav et al., 2008), myocytes (Chen et al., 2002) and early thymocyte progenitors (Kim et al., 2004) but CARM1 enhances breast cell proliferation by activating E2F1 and cyclin E1 (El Messaoudi et al., 2006; Frietze et al., 2008). During lung development, CARM1 was found to inhibit pulmonary cell proliferation and favor differentiation of alveolar cells (O'Brien et al., 2010). In breast cancer CARM1 was depicted as promoting proliferation (Frietze et al., 2008) or inducing differentiation (Al-Dhaheri et al., 2011). Thus the function of CARM1 is context dependent. CARM1 overexpression seems to

be prevalent in colorectal cancer (Ou et al., 2011) while it is detected in only a fraction of tumors from the breast and prostate (Kim et al., 2010).

CARM1 was also found to maintain pluripotency in the early mouse embryo and embryonic stem cells. CARM1 methylates the promoter of the pluripotency genes Sox2 and Nanog and overexpression of CARM1 was found to be associated with the upregulation of Sox2 and Nanog (Torres-Padilla et al., 2007; Wu et al., 2009).

Phosphorylation can occur at Ser217 (Feng et al., 2009) and Ser229 (Higashimoto et al., 2007) in murine CARM1 (NP_067506). Phosphorylation of either Ser217 or Ser229 is detected predominantly during mitosis, promotes CARM1 cytoplasmic localization and inhibits CARM1 methyltransferase activity. Ser217 phosphorylation does not inhibit CARM1 dimerisation but Ser229 phosphorylation does, indicating thus that distinct mechanisms exist for phospho-regulation of CARM1 function. This hypothesis is reinforced by the fact that human CARM1 can also be phosphorylated at Ser448 and this phosphorylation mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP (Carascossa et al., 2010). The equivalent residue of murine CARM1 Ser229 in humans is Ser228 (Higashimoto et al., 2007).

We investigated CARM1 and PRMT1 in 2 lung adenocarcinoma cell lines A549 and HT1299 cells. Pilot experiments indicated that CARM1 and PRMT1 elevations in these cell lines are not similar which might indicate that, in each cell line, they might activate different signaling pathways which leads to the regulation of alternate target genes (Elakoum et al., 2014). In addition, we investigated other types of adenocarcinoma cell lines including Caco2/TC7 cells (colorectal adenocarcinoma). We suggest that CARM1 phosphorylation at ser228 negatively regulates CARM1/PRMT1 heterodimer formation in different type adenocarcinomas and that CARM1/PRMT1 heterodimerization is a mechanism that targets CARM1 to the nucleus where it is active and methylates target genes. In addition MAP2K3 is likely to phosphorylate CARM1 at ser228.

Material and Methods

Detailed methods are provided in SI Materials and Methods. All cell lines were maintained in the appropriate culture medium. Western Blot, Chromatin Immunoprecipitation and real-time polymerase chain reaction were done as previously described (Lu et al., 2008). Sub-cellular

fractions were prepared and used after checking that cross contamination is less than 5%. Duolink Proximity Ligation Assay (DPLA) was performed as instructed by the manufacturer (Olink BioScience). Immunoprecipitations were carried out with a Pierce kit (Thermo Scientific). PD184352, K252a and Akt I-1-2, the respective inhibitors of MAP2K3, CAMK1 and MLK3, were purchased from Sigma-Aldrich. Molecular modeling was done on a Silicon Graphics O2 R10000 station, under IRIX 6.5, using the BRUGEL package than CARM1 and PRMT1 were docked using the ClusPro 2.0 server and total interface was illustrated with 2D-GraLab. ANOVA test was used for statistical analysis and $p<0.05$ considered statistically significant.

Results

CARM1 and PRMT1 co-localize in A549 but not H1299 cells and CARM1 is less phosphorylated in A549 than H1299 cells

The Duolink-Proximity Ligation Aassay (DPLA) detects proteins distant by less than 40 nm. When cells were stained with the combination of CARM1 and PRMT1 antibodies, few DPLA signals were detected in H1299 cells where as significantly elevated number of distinct red spots were detected in A549 cells, $p<0.0001$ (fig1A). No signal was observed with CARM1 antibody or PRMT1 antibody alone used as negative controls. These results indicate that CARM1-PRMT1 colocalization is predominant in A549 cells and less frequent in H1299 cells.

Western Blot on nuclear and cytosolic fractions (fig1B) showed that CARM1 was equally abundant in A549 and H1299 cells and predominantly localized in the nucleus. CARM1-phospho-Ser228 was detected in H1299 cells and localized predominantly in the cytoplasm. Intriguingly, in A549 cells, PRMT1 displayed a stronger expression in the nucleus than in the cytoplasm and inversely, in H1299 cells, PRMT1 expression was much higher in the cytoplasm than in the nucleus. This different subcellular compartmentalization predicts that CARM1 and PRMT1 are likely to form a heterodimer in the nucleus in A549 but not H1299 cells.

Cell lysates were subjected to a Co-IP assay with anti-PRMT1 antibody and then immunoblotted with anti-CARM1 antibody (fig1C). The same blot was stripped and re-probed with antiCARM1-phospho-Ser228. Anti-PRMT1 antibody coprecipitated CARM1 from extracts of A549 but not H1299 cells but did not coprecipitate CARM1-

phospho-Ser228. This result suggests that CARM1 and PRMT1 do not interact if CARM1 Ser228 residue is phosphorylated.

Inhibition of CARM1 phosphorylation at Ser228 enables complex formation between CARM1 and PRMT1 in H1299 cells and also in Caco2/TC7

The kinase that phosphorylates CARM1 Ser228 is not identified yet. By using a phosphorylation prediction program (Xue et al., 2008), 3 kinases, MLK3, CAMK1 and MAP2K3, were identified as candidates to phosphorylate CARM1 ser228. Based on previous reports listing kinase inhibitors specificities (Bain et al., 2007; Roux et al., 2002), we used the compounds PD184352, Akt-I-1-2 and K252a to inhibit MAP2K3, CAMK1 and MLK3, respectively. PD184352 efficiently suppressed CARM1-Phospho-Ser228 expression in H1299 cells (fig2A) suggesting that MAP2K3 is a candidate kinase to phosphorylate CARM1 serine 228 residue. This assumption was reinforced by the fact that MAP2K3 was found to be overexpressed in H1299 cells (fig2B). In addition, immunocytochemistry showed that MAP2K3 localizes in the nucleus and cytoplasm in A549 cells whereas it is detected only in the nucleus in H1299 cells (Fig1 supplemental material). This result suggests that in H1299 cells, MAP2K3 might phosphorylate CARM1 which subsequently enters the cytoplasm.

The antibody anti-PRMT1 coprecipitated CARM1 in H1299 cells treated with PD184352 but not in the untreated cells, neither in cells treated with DMSO only (negative control). Inversely, anti-CARM1 coprecipitated PRMT1 in H1299 cells treated with PD184352 (fig2C).

Next, the DPLA showed no signal when H1299 and A549 cells were stained with a combination of CARM1-Phospho-Ser228 and PRMT1 antibodies. However PD184352 treatment restores CARM1-PRMT1 colocalization in H1299 cells. The number of detected red spots is higher in PD184352-treated vs non –treated H1299 cells $p<0.0001$(fig2D). Taken together these results indicate that Ser228 phosphorylation negatively regulates complex formation between CARM1 and PRMT1 in H1299 cells.

We wanted to know if this mechanism is restricted to HT1299 cells or on the contrary valid in other cell lines. Among the following cell lines AGS, KATO III (gastric adenocarcinomas) HEK293 (Embryonic Kidney), HepG2 (liver adenocarcinoma), H460 (lung adenocarcinoma), and HT29, Caco2/TC7 (colorectal adenocarcinomas),

CARM1-Phospho-Ser228 was detected only in Caco2/TC7 cells (Fig3A). In these cells CARM1 phosphorylation at ser228 was inhibited by PD184352 (Fig3B). The DPLA showed a signal with CARM1 and PRMT1 antibodies together that was significantly enhanced when Caco2/TC7 cells were treated with PD184352 (Fig3C). This result replicates in Caco2/TC7 cells what was observed in H1299 cells and strongly suggests that dephosphorylation of CARM1 ser228 is a general mechanism that promotes CARM1/ PRMT1 interaction.

Sox2 and Nanog promoters are enriched with CARM1 histone mark (H3R17me2) when CARM1 heterodimerizes with PRMT1

Chromatin immunoprecipitation show that in A549 cells both Sox2 and Nanog promoter-associated chromatin is enriched with CARM1 and PRMT1 histone marks (for H3R17me2, $p<0.001$ on Sox2 promoter and $p<0.0001$ on Nanog promoter and for H4R3me2, $p< 0.001$ on Sox2 promoter and $p<0.0001$ on Nanog promoter Fig4). However, in H1299 cells, H3R17me2 is marginally detected: H4R3me2 is the predominant mark on Sox2 and Nanog promoter-associated chromatin ($p<0.001$ and $p<0.0001$ respectively). In other words, in H1299 cells, in which the heterodimer CARM1/PRMT1 does not form, PRMT1 retains its methyltransferase activity but CARM1 does not. CARM1 exhibits its methyltransferase activity only when it heterodimerizes with PRMT1, that is, in A549 cells.

Modelisation of CARM1 and PRMT1 heterodimerozation

In the PRMT family, homodimerization is a prerequisite for methyltransferase activity. On this basis, using ClusPro 2.0, we attempted to dock a dimer of CARM1 onto a dimer of PRMT1. The docked interaction models obtained, were unexpectedly non symmetrical. Instead of observing complexes where each monomer of each dimer was predicted to yield symmetrical interactions with its partner, all docked models found involved preference for one subunit over the other.

Interestingly, apart from sequence and structure homology among PRMTs, there exists a common mode of assembly between catalytic subunits to generate homodimers (Troffer-Charlier et al., 2007; Weiss et al., 2000; Yue et al., 2007; Zhang and Cheng, 2003; Zhang et al., 2000). Moreover, the existence of PRMT heterodimers has been previously described (Pak et al., 2011; Thomas et al., 2010). This prompted us to verify whether the interaction between CARM1 and PRMT1,

rather than involving the assembly of homodimers, was instead the result of the association of monomers to form a CARM1/PRMT1 heterodimer. To test this hypothesis, we fed monomers of CARM1 and PRMT1 as docking partners in the ClusPro server. We further reasoned that interface contacts in the heterodimer complex should correspond to a structural alignment so as to preserve PRMTs' common mode of dimerization. For that purpose, we performed a pairwise flexible structure alignment between 1OR8 (PRMT1 PDB entry) and 3B3F (CARM1 PDB Entry) using the FATCAT algorithm16 (Ye and Godzik, 2003). The structures were found to be significantly similar with an overall RMSD (Root Mean Square Deviation) of 1.70 Å. Based on this alignment, we compared homodimers interfaces and aligned contact positions accordingly. We could thereby observe that the Ser229-Asp323 and Asn230-Asp323 contact pairs in the CARM1 homodimer should correspond to the Ala114-Asp205 and Asn115-Asp205 contact pairs in the PRMT1 homodimer, respectively. One such model was found among the docked CARM1/PRMT1 candidates, in which the interface heterodimer contains both the Ser229-Asp205 and Asn230-Asp205 contact pairs (Fig5A and B, structures were drawn using PyMOL, www.pymol.org). Therefore, this heterodimer model is coincident with the CARM1 homodimer interface around positions 229-230 and thereby provides a previously-established rationalization (Higashimoto et al., 2007) to account for the CARM1/PRMT1 interaction blockage upon phosphorylation of Ser228 (switched to position Ser229 in rat CARM1). Accordingly, due to charge repulsion effects, phosphorylation of Ser228 in human CARM1 would prevent assembly with PRMT1 which bears Asp-205 as the tight, direct, interaction partner with CARM1 Ser228. The heterodimeric complex structure of CARM1/PRMT1 clearly conforms to the mode of assembly observed in PRMTs, at least structure wise, to form an open-ring cleft for protein substrate binding (Troffer-Charlier et al., 2007; Weiss et al., 2000; Yue et al., 2007; Zhang and Cheng, 2003; Zhang et al., 2000) involving head-to-tail interactions (Fig.5C, structure was generated with 2D-GraLab (Zhou et al., 2009).

In their homodimer assembly, rat PRMT1 and CARM1 bury 1515 and 1659 $Å^2$ in their respective interfaces, which are of standard size for protein complexes (Lo Conte et al., 1999). However, it must be stressed that these buried surface areas (BSA) must be split in two equal parts, given the mode of assembly of PRMTs, which yields two separate interfaces of 2 x 758 and 2 x 830 $Å^2$ in these homodimers, respectively.

Therefore, it is expected their dissociation occurs spontaneously as attested by their Kd values which are in the 10^{-6}-10^{-9} M range, depending on both PRMT type and cofactor bound (Thomas et al., 2010). As will be discussed below, it is clear that the occurrence of homodimer dissociation is a prerequisite for subunit exchange to generate the CARM1/PRMT1 heterodimer.

If we analyze the interface of our presumed CARM1/PRMT1 heterodimer, the BSA is 1777 $Å^2$, thus a little higher than found for either homodimer. Most interestingly, this interface is found to split in two unequal parts in the heterodimer assembly: 1010 $Å^2$ and 767 $Å^2$, where the Ser229-Asn230 pair belongs to the larger interface and are involved in van der Waals interactions (SI Table 1). Moreover, the hydrogen bond pair CARM1 Asn230.HD21/main carbonyl oxygen of PRMT1 Asp205 is the most stabilizing in the CARM1/PRMT1 interface, with nearly - 3.0 kcal.mol-1 (SI Table 2). Interestingly, this interaction is also observed in the CARM1 homodimer where Asp205 is replaced by Asp323. Note also there is a hydrogen bond between CARM1 Asp323 and PRMT1 Asn115. In the CARM1 homodimer, Asn115 is changed into Asn230 (Fig.4C, where these interactions are highlighted with a red star).

DISCUSSION

Human CARM1 Ser448 is phosphorylated by PKA (Carascossa et al., 2010) but phosphorylation of Ser217 and Ser229 in mice are carried out by unknown kinase(s). What is certain is that phosphorylation of those serine residues triggers a specific response that modulates CARM1 function (Carascossa et al., 2010; Feng et al., 2009; Higashimoto et al., 2007). Particularly, Ser17 phosphorylation is not involved in CARM1 dimerization and does not alter CARM1 complex formation with p300 and SRC-3 (Feng et al., 2009). The fact that Ser229 phosphorylation (the equivalent in human CARM1 is Ser228) inhibits CARM1 dimerization suggests that Ser229 might be critical for CARM1 interaction with partner proteins. The fact that CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation and that PRMTs are assembled in oligomers suggests that CARM1 and PRMT1 can form a heterodimer. We wanted to test this hypothesis by investigating the role of Ser228 phosphorylation in CARM1/PRMT1 heterodimer formation in A549 and H1299 cells.

The Duolink-Proximity Ligation Assay (DPLA) and immunoprecipitation are concordant to indicate that CARM1/PRMT1 interaction takes place significantly more frequently in A549 than H1299 cells (Fig.2A). The reason for this is that CARM1

phosphorylation at ser228 prevents the formation of CARM1/PRMT1 heterodimer. Accordingly, CARM1-phospho-Ser228 is detected in H1299 but not A549 cells. The expression profile of CARM1 and PRMT1 helps to understand how CARM1/PRMT1 interaction occurs. In A549 cells, unphosphorylated CARM1 and PRMT1 localize predominantly in the nucleus. In H1299 cells, unphosphorylated CARM1 still localizes in the nucleus but PRMT1 localizes in the cytoplasm. Sub-cellular localization of CARM1 and PRMT1 and phosphorylation status set up the conditions for CARM1 to interact with PRMT1 in the nucleus in A549 and not H1299 cells. This interaction is critical because CARM1 is active when it interacts with PRMT1. Indeed, CARM1 was found to methylate the promoter of 2 target genes, Sox2 and Nanog, in A549 but not H1299 cells. Thus, CARM1/PRMT1 heterodimerization is a way to confine a functional CARM1 in the nucleus where it methylates its target genes.

By using a kinase–specific prediction program, we selected 3 putative kinases (MAP2K3, CAMK1 and MLK3) that could phosphorylate human CARM1 Ser228. Only MAP2K3 inhibitor prevented CARM1 Ser228 phosphorylation. Interestingly, in H1299 cells MAP2K3 expression is elevated and localizes exclusively to the nucleus (Fig1 Suppl data). Thus MAP2K3 might phosphorylate CARM1 at ser228 and subsequently CARM1-phospho-ser228 is translocated to the cytoplasm. Inhibiting CARM1 Ser228 phosphorylation with MAP2K3 inhibitor restores CARM1/ PRMT1 interaction in H1299 cells. This result provides direct evidence that phosphorylation at Ser228 prevents CARM1/ PRMT1 complex formation.

In Caco2/TC7 cells also CARM1 phopshorylation at ser228 prevents CARM1 from interacting with PRMT1. Inhibition of CARM1 ser228 phosphorylation with MAP2K3 inhibitor restored CARM1/PRMT1 interaction. In colorectal cancer, CARM1 is recruited to Wnt target genes through its interaction with beta-catenin and contribute to activate target genes of the Wnt/beta-catenin pathway (Ou et al., 2011). We collected evidence that CARM1 phosphorylation at ser228 prevents CARM1 from interacting with beta-catenin (data not shown). Thus phosphorylation at ser228 might be a general mechanism preventing CARM1 from interacting with proteins in several adenocarcinomas.

To rationalize experimental data on the inhibition of CARM1/PRMT1 interaction after phosphorylation of Ser228 in human CARM1, we have investigated if molecular docking could provide adequate protein assembly models to substantiate our the

experimental observations. In the first round of docking, we made the assumption that both proteins should dock in their functional state, that is, both as homodimers. Since, we could not observe any docking model displaying symmetrical interactions implying balanced participation of each monomer in each homodimer, as one would have expected, we renounced on docking homodimers. Yet, CARM1 and PRMT1 would still have to interact to fulfill their biological function. There are reports in the literature on the occurrence of heterodimers in the PRMT family (Pak et al., 2011; Thomas et al., 2010). Furthermore, several other protein families have been shown to form both homodimers and heterodimers to resume their function (Hsueh et al., 1987; Lambert et al., 2001; Lu et al., 2006; Wendt et al., 1998). Therefore, we conceived the hypothesis that both homodimers of CARM1 and PRMT1 had to dissociate first to produce a heterodimer of both proteins and analyzed docked complexes of these monomers. Taking into account their sequence alignment based on structural homology and the association mode that characterizes PRMT dimers, we identified a rat CARM1/PRMT1 heterodimer whose assembly structure is coincident with that of CARM1 homodimer. In particular, interactions implying residues Ser229 and Asn230 with Asp323 now take place with PRMT1 Asp205 in the heterodimer. On this basis, we suggest that, here again, phosphorylation of Ser229 impedes CARM1/PRMT1 association due to charge repulsion of the negatively-charged phosphate group towards Asp205. There is a significant difference between CARM1 homodimer and the heterodimer, in that the Ser229/Asp205 interaction occurs only once. It takes place, however, in the largest interaction patch of 1010 Å2 and this is the one to be destabilized upon phosphorylation. The second patch accounts for only 767 Å2 and is therefore not likely sufficient to stabilize the heterodimer. Undoubtedly, the question must be raised whether phosphorylation is required to promote dimer dissociation or only used as a means to prevent monomer reassociation to form new dimers. We analyzed the accessible surface area (ASA) of Ser229.OG in both CARM1 homodimer and in the heterodimer. In the homodimer, ASASer229.OG equals 0.6±0.6 Å2 (mean±SEM), while in the heterodimer we can measure 0.484 Å2; these ASA account for 0.05 and 0.42 % accessibility, respectively, which suggests that the OG of Ser229 is buried, and thereby, not available to phosphorylation in both assemblies. This finding likely suggests dimers dissociation into monomers must take place prior to any phosphorylation event and thus spontaneously. In this regard, we should recall that the occurrence of dissociation of tight dimers has been

demonstrated under physiological conditions (Mrabet et al., 1986). Therefore, PRMTs dimer assemblies should result from close encounters of newly dissociated monomers, eventually yielding heterodimers, as our modeling data suggest.

References

1. Cheng X, Collins RE, & Zhang X (2005) Structural and sequence motifs of protein (histone) methylation enzymes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 34:267-294.
2. Chen D*, et al.* (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284(5423):2174-2177.
3. Feng Q, Yi P, Wong J, & O'Malley BW (2006) Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Molecular and cellular biology* 26(21):7846-7857.
4. Xu W*, et al.* (2001) A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* 294(5551):2507-2511.
5. Stallcup MR*, et al.* (2000) Co-operation between protein-acetylating and protein-methylating co-activators in transcriptional activation. *Biochemical Society transactions* 28(4):415-418.
6. Bedford MT & Richard S (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Molecular cell* 18(3):263-272.
7. Bedford MT & Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Molecular cell* 33(1):1-13.
8. Kleinschmidt MA, Streubel G, Samans B, Krause M, & Bauer UM (2008) The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nucleic acids research* 36(10):3202-3213.
9. Yadav N*, et al.* (2008) CARM1 promotes adipocyte differentiation by coactivating PPARgamma. *EMBO reports* 9(2):193-198.
10. Chen SL, Loffler KA, Chen D, Stallcup MR, & Muscat GE (2002) The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2. *The Journal of biological chemistry* 277(6):4324-4333.
11. Kim J*, et al.* (2004) Loss of CARM1 results in hypomethylation of thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein and deregulated early T cell development. *The Journal of biological chemistry* 279(24):25339-25344.
12. Frietze S, Lupien M, Silver PA, & Brown M (2008) CARM1 regulates estrogen-stimulated breast cancer growth through up-regulation of E2F1. *Cancer research* 68(1):301-306.
13. El Messaoudi S*, et al.* (2006) Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(36):13351-13356.
14. O'Brien KB*, et al.* (2010) CARM1 is required for proper control of proliferation and differentiation of pulmonary epithelial cells. *Development* 137(13):2147-2156.
15. Al-Dhaheri M*, et al.* (2011) CARM1 is an important determinant of ERalpha-dependent breast cancer cell differentiation and proliferation in breast cancer cells. *Cancer research* 71(6):2118-2128.
16. Ou CY*, et al.* (2011) A coactivator role of CARM1 in the dysregulation of beta-catenin activity in colorectal cancer cell growth and gene expression. *Molecular cancer research : MCR* 9(5):660-670.

17. Kim YR, *et al.* (2010) Differential CARM1 expression in prostate and colorectal cancers. *BMC cancer* 10:197.
18. Torres-Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T, & Zernicka-Goetz M (2007) Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 445(7124):214-218.
19. Wu Q, *et al.* (2009) CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation. *Stem cells* 27(11):2637-2645.
20. Feng Q, *et al.* (2009) Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 284(52):36167-36174.
21. Higashimoto K, Kuhn P, Desai D, Cheng X, & Xu W (2007) Phosphorylation-mediated inactivation of coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(30):12318-12323.
22. Carascossa S, Dudek P, Cenni B, Briand PA, & Picard D (2010) CARM1 mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP. *Genes & development* 24(7):708-719.
23. Elakoum R, *et al.* (2014) CARM1 and PRMT1 are dysregulated in lung cancer without hierarchical features. *Biochimie* 97:210-218.
24. Lu X, *et al.* (2008) Differential regulation of CDX1 and CDX2 gene expression by deficiency in methyl group donors. *Biochimie* 90(5):697-704.
25. Xue Y, *et al.* (2008) GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7(9):1598-1608.
26. Bain J, *et al.* (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *The Biochemical journal* 408(3):297-315.
27. Roux PP, *et al.* (2002) K252a and CEP1347 are neuroprotective compounds that inhibit mixed-lineage kinase-3 and induce activation of Akt and ERK. *The Journal of biological chemistry* 277(51):49473-49480.
28. Zhang X, Zhou L, & Cheng X (2000) Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *The EMBO journal* 19(14):3509-3519.
29. Weiss VH, *et al.* (2000) The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nature structural biology* 7(12):1165-1171.
30. Zhang X & Cheng X (2003) Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure* 11(5):509-520.
31. Yue WW, Hassler M, Roe SM, Thompson-Vale V, & Pearl LH (2007) Insights into histone code syntax from structural and biochemical studies of CARM1 methyltransferase. *The EMBO journal* 26(20):4402-4412.
32. Troffer-Charlier N, Cura V, Hassenboehler P, Moras D, & Cavarelli J (2007) Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains. *The EMBO journal* 26(20):4391-4401.
33. Thomas D, Lakowski TM, Pak ML, Kim JJ, & Frankel A (2010) Forster resonance energy transfer measurements of cofactor-dependent effects on protein arginine N-methyltransferase homodimerization. *Protein science : a publication of the Protein Society* 19(11):2141-2151.
34. Pak ML, *et al.* (2011) A protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) and 2 heteromeric interaction increases PRMT1 enzymatic activity. *Biochemistry* 50(38):8226-8240.
35. Ye Y & Godzik A (2003) Flexible structure alignment by chaining aligned fragment pairs allowing twists. *Bioinformatics* 19 Suppl 2:ii246-255.

36. Zhou P, Tian F, & Shang Z (2009) 2D depiction of nonbonding interactions for protein complexes. *Journal of computational chemistry* 30(6):940-951.
37. Lo Conte L, Chothia C, & Janin J (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites. *Journal of molecular biology* 285(5):2177-2198.
38. Hsueh AJ*, et al.* (1987) Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(14):5082-5086.
39. Wendt H, Thomas RM, & Ellenberger T (1998) DNA-mediated folding and assembly of MyoD-E47 heterodimers. *The Journal of biological chemistry* 273(10):5735-5743.
40. Lambert LJ, Schirf V, Demeler B, Cadene M, & Werner MH (2001) Flipping a genetic switch by subunit exchange. *The EMBO journal* 20(24):7149-7159.
41. Lu J*, et al.* (2006) Structural basis for a Munc13-1 homodimer to Munc13-1/RIM heterodimer switch. *PLoS biology* 4(7):e192.
42. Mrabet NT, Shaeffer JR, McDonald MJ, & Bunn HF (1986) Dissociation of dimers of human hemoglobins A and F into monomers. *The Journal of biological chemistry* 261(3):1111-1115.

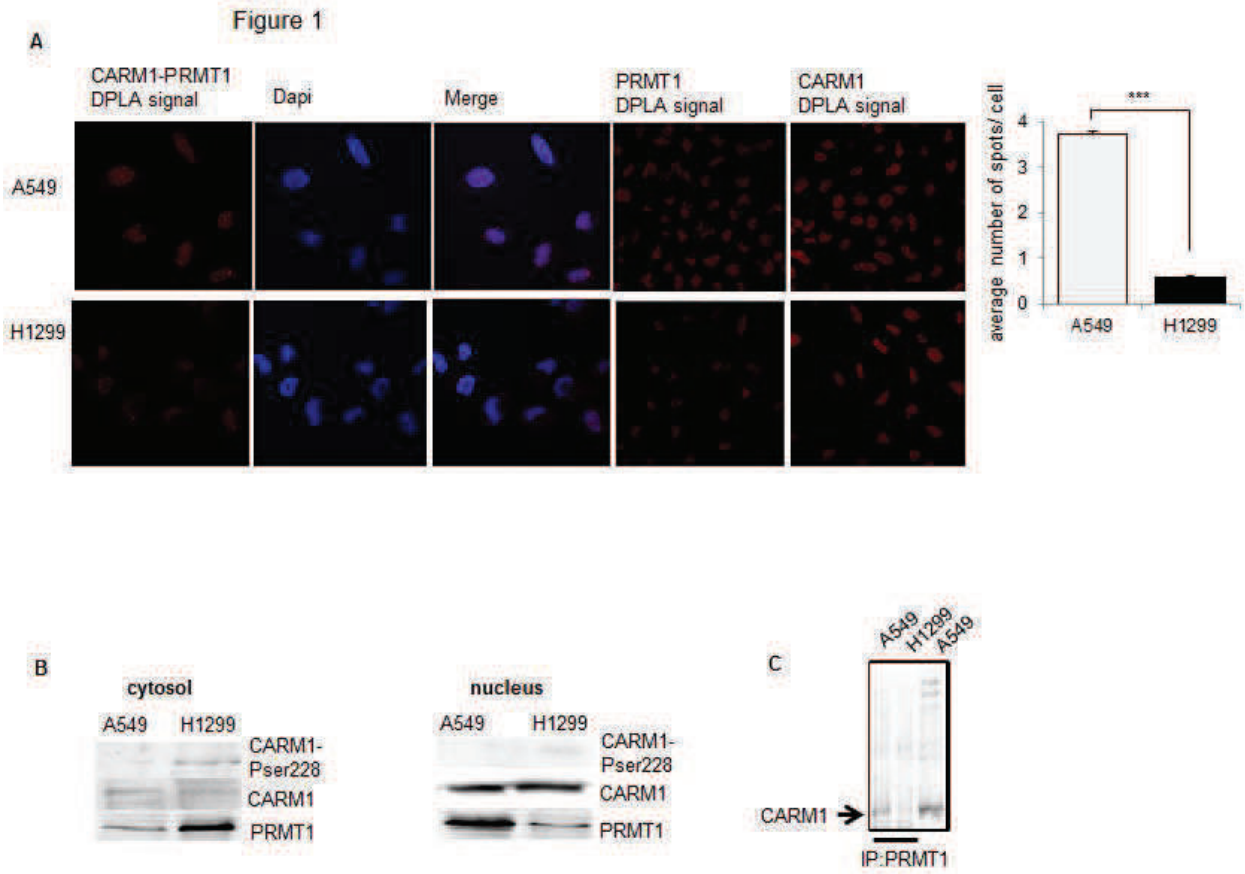


Figure 1. CARM1 and PRMT1 interact in A549 but not H1299 cells. Fig.1A. The Duolink-Proximity Ligation Assay (DPLA) provides evidence that CARM1 and PRMT1 interact in A549 but not H1299 cells. Cells were probed simultaneously with antibodies against CARM1 and PRMT1 using the DPLA protocol. The primary antibodies anti-CARM1 alone and anti-PRMT1 alone were used as controls. The red fluorescence, which indicates proximity (< 40 nm) of the 2 proteins, is detected mainly in A549 as shown in the diagram on the right. Pictures were obtained with a Nikon C2 confocal microscope. **Fig.1B. Subcellular fractionation shows that CARM1 and PRMT1 localize differently in A549 and H1299 cells**. CARM1-phospho-Ser228 (CARM1-Pser228) is only detected in H1299 cells in the cytosol, CARM1 equally localizes in the nucleus in A549 and H1299 cells but PRMT1 predominantly localizes in the cytosol in H1299 cells and in the nucleus in A549 cells. Nuclear and cytosolic fractions were isolated by differential centrifugation. Equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting with specific antibodies against CARM1, CARM1-phospho-Ser228 and PRMT1. **Fig.1C. CARM1 unphosphorylated at Ser228 forms a complex with PRMT1 in A549 but not H1299 cells.** Anti-PRMT1 immunoprecipitates, from A549 and H1299 cells whole-cell extracts, were separated by SDS-PAGE, transferred onto a membrane and probed with an anti-CARM1 antibody. If the same blot is stripped and reprobed with an antibody against CARM1-phospho-Ser228, no signal is detected. All results were reproduced in 3 independent experiments.

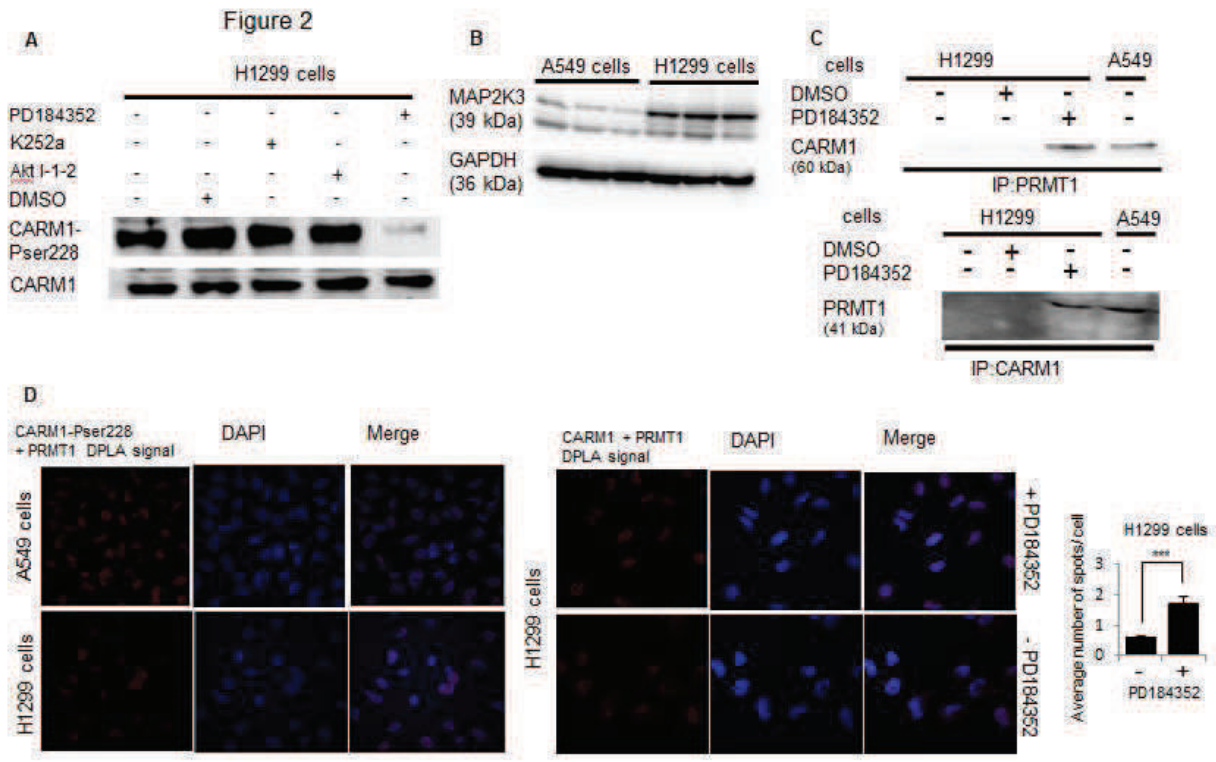


Figure 2. **MAP2K3 is a candidate kinase to phosphorylate CARM1 at Ser228 and phosphorylation of CARM1, prevents complex formation. Fig2A. Only PD184352 which inhibits MAP2K3 prevents CARM1 phosphorylation at Ser228.** H1299 cells were incubated for at least 1 h with PD184352 (10 µM), K252a (100 nM) and Akt I-1-2 (10 µM) intended to inhibit the kinases MAP2K3, CAMK1 and MLK3 respectively and with DMSO vehicle control. Cells extracts were analyzed by SDS-PAGE followed by immunodetection with antibodies against CARM1-Phospho-Ser228 (CARM1-PSer228) and CARM1. **Fig2B. MAP2K3 is overexpressed in A549 cells.** Protein extracts were separated by SDS-PAGE and immunoblotting carried out with specific antibodies against MAP2K3. GAPDH was used to control equal protein loading. **Fig2C. Anti-PRMT1 coprecipitates CARM1 and anti-CARM1 coprecipitates PRMT1 in H1299 cells treated with MAP2K3 inhibitor PD184352**. H1299 cells were used untreated or treated with PD184352 or DMSO. Since phosphorylated CARM1 is not detected in A549 cells, these cells were not treated with kinase inhibitors. Anti-PRMT1 (and anti-CARM1) immunoprecipitates from A549 and H1299 cells were separated by SDS-PAGE, transferred onto a membrane and probed with anti-CARM1 (and anti-PRMT1) antibodies. **Fig3D. The Duolink-Proximity Ligation Assay (DPLA) analysis shows that CARM1-PRMT1 interaction is restored in H1299 cells after treatment with PD184352.** Untreated H1299 and A549 cells were probed simultaneously with antibodies against CARM1-phospho-Ser228 (CARM1-Pser228) and PRMT1 using the DPLA protocol. Then only H1299 cells were incubated with PD184352 and probed with antibodies against CARM1 and PRMT1. The red fluorescence, which indicates protein colocalization, is detected with the combination of CARM1 and PRMT1 antibodies and not CARM1-Pser228 and PRMT1 antibodies. It is significantly higher in H1299 cells treated with

PD184352 then in untreated cells as shown in the diagram. All results were reproduced in 3 independent experiments. ***p<0.0001

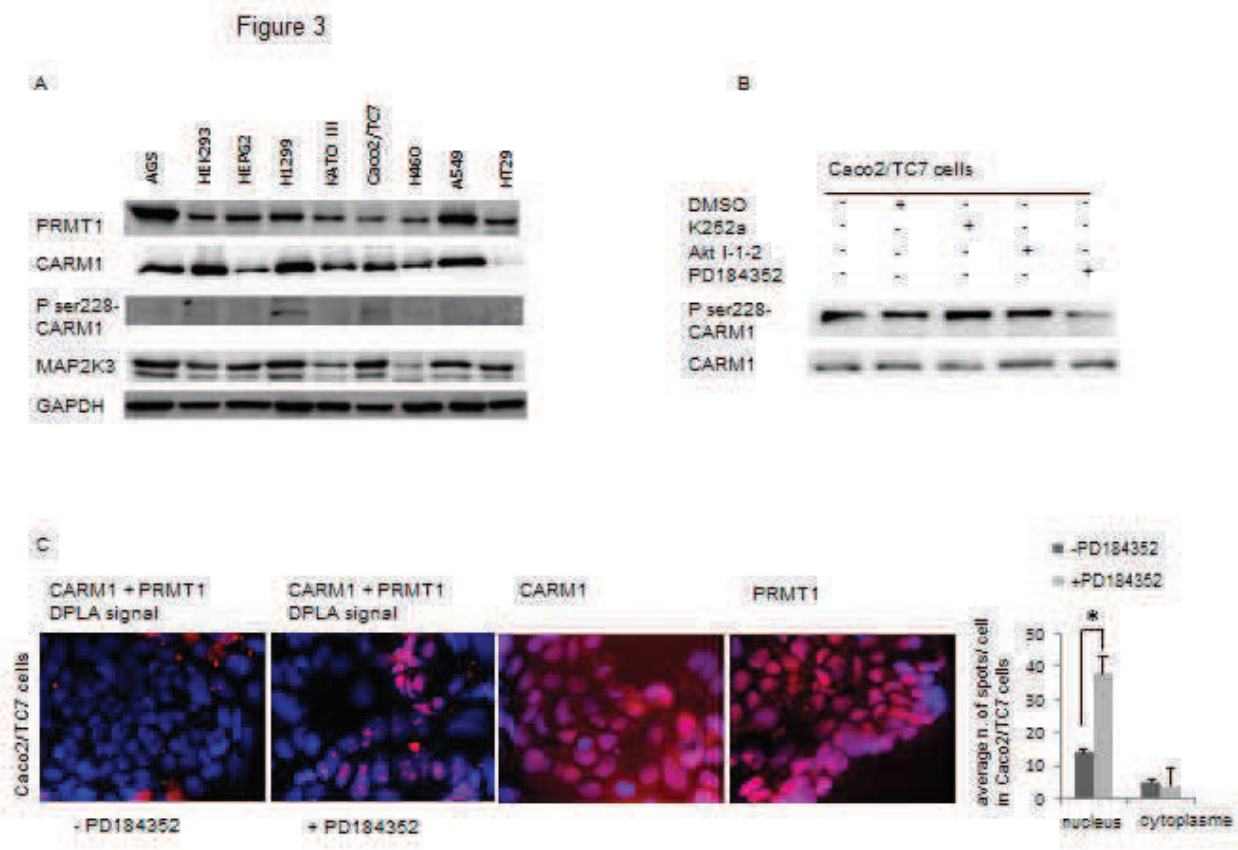


Fig3. In Caco2/TC7 cells, MAP2K3 inhibitor (PD184352) prevents Carm1-phospho-ser228 formation and enhances CARM1/PRMT1 interaction. **Fig.3A.** Among several adenocarcinoma cell lines tested, Carm1-phospho-ser228 was detected only in Caco2/TC7. Protein extracts were separated by SDS-PAGE and immunoblotting was carried out with antibodies against PRMT1, CARM1, Carm1-phospho-ser228 and MAP2K3. GAPDH was used to control eual protein loading. **Fig.3B**. PD184352 suppresses CARM1 phosphorylation at ser228. The experiment was carried out as in fig2A. **Fig.3C**. The Duolink-Proximity Ligation Assay (DPLA) shows that treatment with PD184352 significantly increases CARM1/PRMT1 interaction in Caco2/TC7 cells and this interaction takes place in the nucleus. Antibodies against CARM1 and PRMT1 used separately do not yield any signal. *p<0.05

Figure 4

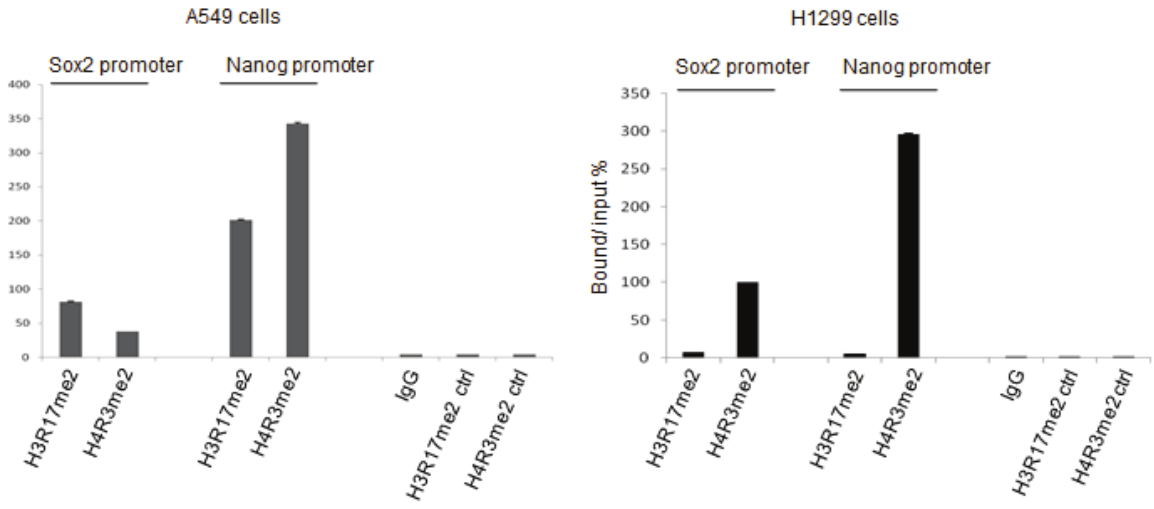


Fig.4. In A549 cells, Sox2 and Nanog promoters are enriched with CARM1 and PRMT1 histone marks (H3R17me2 and H4R3me2), but in H1299 cells they are enriched only with PRMT1 histone mark. ChIP was performed on sonicated chromatin from A549 and H1299 cells using anti-histone H3R17me2 and H4R3me2 antibodies (corresponding control antibody: IgG). Immunoprecipitated DNA was analyzed by quantitative real-time PCR with primers from within 400 bp region of transcriptional start site of the investigated gene.The data are calculated as percentage of input. The control (ctrl) region is an intergenic region. Error bars represent standard deviations.

Figure 5

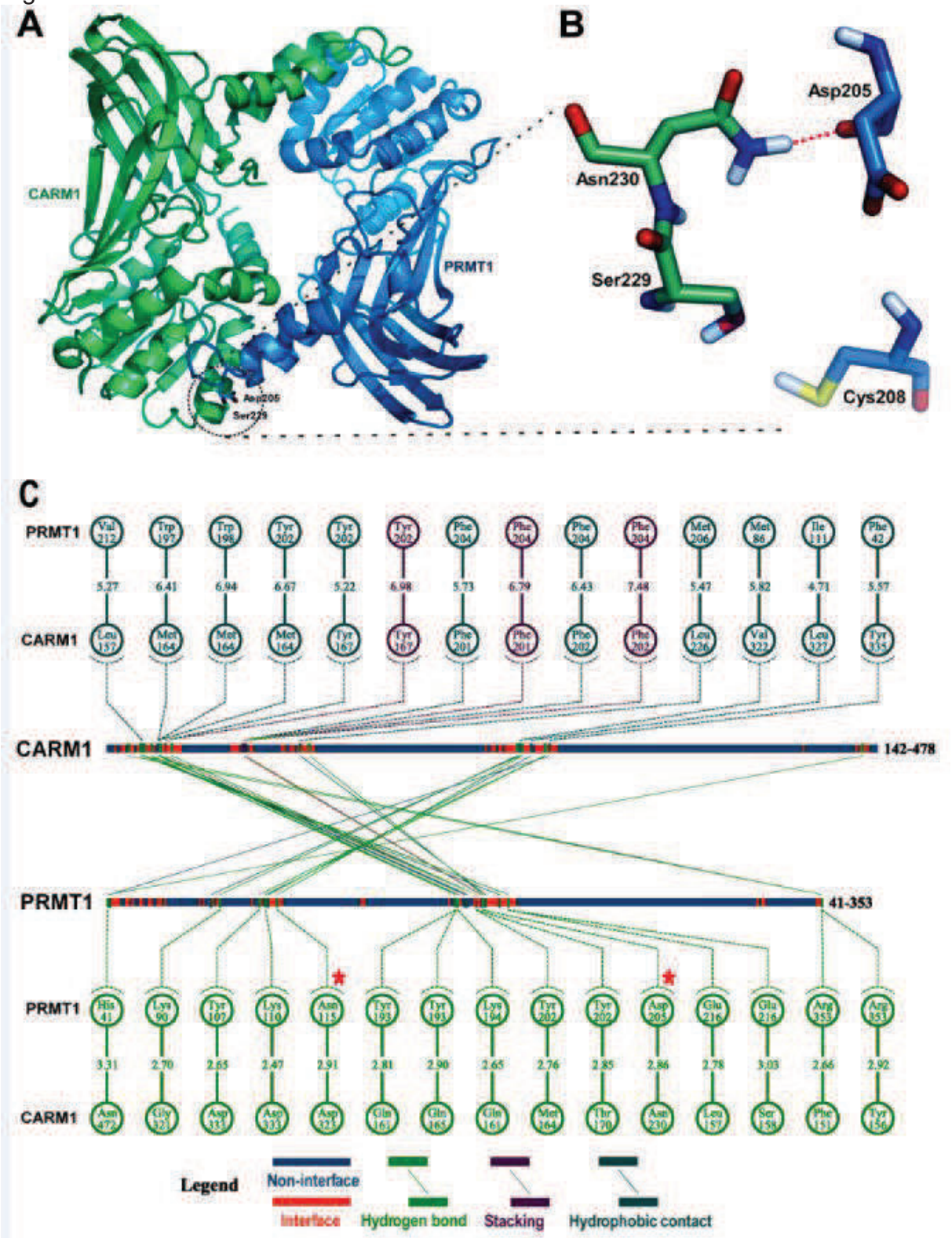


Fig. 5. Assembly of CARM1 and PRMT1 monomers to form a heterodimer. Fig.5A. Heterodimer assembly of rat CARM1 and PRMT1 in the cartoon mode (lime-green for CARM1 and sky-blue for PRMT1) showing that the mode of heterodimerization conforms to rules that prevail in the PRMT family. The CARM1 Ser229/PRMT1 Asp205 pair is emphasized as sticks in the lower part of the cartoon and enlarged in figure 5B. **Fig.5B** is a display of the structure of the heterodimer

interaction involving Ser229 and Asn230 of rat CARM1 (pdb entry 3B3F) and Asp-205 and Cys208 of rat PRMT1 (pdb entry 1OR8) and reveals the hydrogen bond made between Asn230.HD21 and main-chain carbonyl oxygen of Asp205 (see Panel C and Table II). Cys208 is close enough to make van der Waals contacts with Ser229 (see Table I). **Fig.5C** was generated with 2D-GraLab for total interface analysis and illustrates the head-to-tail interactions along both sequences, hydrophobic and stacking contacts and hydrogen bonds. The distance shown are in Angstrom and measured between protein heavy atoms and thus do not involve explicit hydrogen atoms as it is the case with the BRUGEL data of Table II in supplementary material.

Fig1 supplemental material

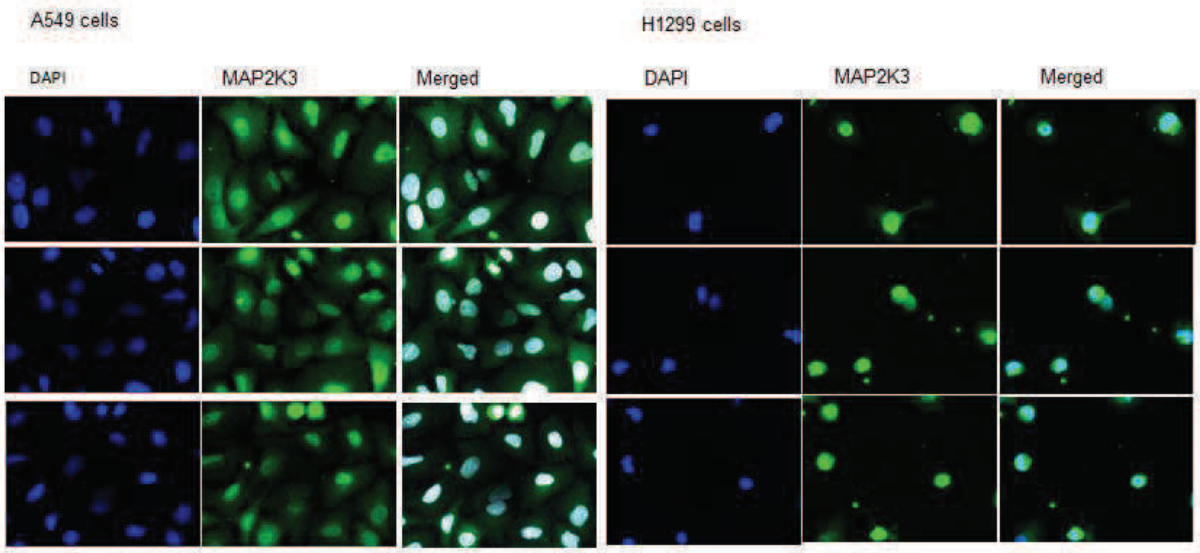


Figure 1. **In A549 cells MAP2K3 localizes in the nucleus and cytoplasm where as in H1299 cells it localizes in the nucleus.** A549 and H1299 cells were used for immunofluorescent staining by MAP2K3 antibody. MAP2K3 protein is shown in green and DNA in blue (DAPI).

Supporting information

Material and Methods

Cell culture

The cell lines A549, H1299, H460 (lung adenocarcinoma), AGS, KATOIII, MKN45 (stomach carcinoma) were maintained in RPMI (Gibco) and HEK293 (embryonic kidney), HepG2 (hepatocellular carcinoma), Caco2/TC7 and HT-29 (colorectal adenocarcinoma) in DMEM (Gibco) at 37°C and 5%CO2 supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio) and 1% antibiotics penicilline, streptomycine (Gibco).

Preparation of sub-cellular fractions

After trypsinization and washing with PBS 1X, 8.106 cells were lysed in 600µl cold lysis buffer (10mM tris HCl, 100mM NaCl, 2.5mM MgCl2, 40µg/ml digitonine, proteases and phosphatase inhibitors). 15µl of NP-40% were added and centrifugation carried out 8 min, 4°C, 2000g to collect the supernatant representing the cytosolic fraction. The pellet was further lysed with 100µl RIPA buffer (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1%SDS, 1% NP-40, proteases and phosphatase inhibitors) and centrifuged at 20000g for 20 minutes to isolate the nuclear fraction. Each fraction was tested for purity through analysis of HSP70 for the cytosol and HSFser326 for the nucleus. Cross contamination in each fraction was less than 5%.

Total protein extraction and Western Blot analysis

Protein were extracted with RIPA buffer (50mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 N, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM NaF, 1mM sodium orthovanate) and protease inhibitor (Roche Applied Science), separated by SDS-PAGE and transferred to 0.22µm nitrocellulose membranes (Biorad). Western Blotting was performed with the following antibodies: anti-CARM1 (1/1000, rabbit polyclonal Millipore 09.818), anti-PRMT1 (1/700, rabbit monoclonal Cell Signalling A33), anti-Sox2 (1/200, mouse monoclonal Millipore MAB4343), anti-Nanog (1/5000, Rabbit polyclonal Millipore Ab9220), anti-CARM1-phospho-Ser228 (1/500, rabbit monoclonal Millipore ABE12), anti-MAP2K3 (1/1000, rabbit polyclonal Gene Tex N1C3). Equal protein loading was confirmed using anti-GAPDH antibody (1/1000, chicken polyclonal Millipore Ab2302). Images were analyzed with the Image J software and are representative of 3 independent immunoblots.

Chromatine immunoprecipitation (ChIP assay)

ChIP was performed using the “red chip kit” (Diagenode) according to the manufacturer’s instructions. For immunoprecipitation 5 µg of antibodies against asymmetric dimethyl arginine 17 in histone H3 (H3R17me2, Millipore), 5 µg of antibodies against asymmetric dimethyl arginine 3 in histone H4 (H4R3me2, Abcam) and 3 µg of normal rabbit IgG (Millipore) were used. Purified immunoprecipitated DNA and total input (from non sonicated chromatin) were amplified by real-time PCR with primers spanning the promoters region of Sox2 (nucleotide -54 to +63 relative to transcription start site, ENSG00000181449) and Nanog genes (nucleotide -1140 to -889 relative to transcription start site, ENSG00000111704). The negative control primers flank an intergenic region between the GAPDH gene and the chromosome condensation-related SMC-associated protein (CNAP1) gene.The sequences are: negative forward 5’-ATGGTTGCCACTGGGGATCT-3 and negative reverse 5’-TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA-3’ (Activemotif). A dissociation curve analysis was performed immediately after amplification to confirm that each reaction produces a single specific product. The ΔΔCT method was used to determine the relative quantity of the amplified region in the immunoprecipitated DNA and input. The ChIP-qPCR results were reported as percent of the Sox2 and Nanog promoter sequences in the immunoprecipitated DNA relative to input DNA. SDs were calculated from samples analyzed in triplicates.

Duolink Proximity Ligation Assay (DPLA)

This assay can detect protein interaction through a pair of antibodies that binds to the 2 interacting proteins distant by less than 40 nm. It can also be used to detect covalent protein modification. DPLA was used to detect CARM1/ PRMT1 co-localization by simultaneously immunolabelling A549 and H1299 cells with a rabbit primary anti-CARM1 antibody (Millipore) or a rabbit primary anti-CARM1-phospho-Ser228 (Millipore) and a mouse primary anti-PRMT1 antibody (Novus Biologicals NBP1-07106).. DPLA was performed as instructed by the manufacturer (Olink BioScience). The secondary antibodies provided with the DPLA kit generate a signal only when CARM1 and PRMT1 are close by less than 40 nm. This signal appears as a discrete red spot observed in a Nikon C2 confocal microscope at x60 magnification.

Co-Immunoprecipitation

Immunoprecipitations were carried out with a Pierce kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Ten micrograms of the primary antibody (anti-CARM1 or anti-PRMT1) were covalently coupled to the resin provided in the kit. The antibody-coupled resin was incubated with 500 µg whole cell lysate overnight at 4°C. The resin was washed and the protein complexes bound to the antibody were eluted and subjected to Western Blotting.

Kinase inhibition

An on-line program predicted that 3 kinases -MAP2K3, CAMK1 and MLK3- are candidates to phosphorylate CARM1 at Ser 228 (Xue Yu Mol Cell Proteomics 2008). PD184352, K252a and Akt I-1-2 are respective inhibitors of MAP2K3, CAMK1 and MLK3 and were purchased from Sigma-Aldrich. PD184352 was assayed at 10µM, K252a at 100 nM and Akt I-1-2 at 10 µM, in 5% dimethylsulfoxyde (DMSO). H1299 cells were plated at 106/mm and 2 days later incubated overnight with PD184352, K252a, Akt I-1-2 or DMSO (vehicle) then collected for protein extraction and Western Blot with CARM1 and CARM1-phospho-Ser228 antibodies. Cells treated with PD184352 were further processed for immunoprecipitation and DPLA with CARM1 and PRMT1 antibodies.

Modeling and docking analyses of the interaction between CARM1 and PRMT1

Molecular modeling was done on a Silicon Graphics O2 R10000 station, under IRIX 6.5, using the BRUGEL package (Delhaise et al.). The 3D structures used for modeling are those of the rat CARM1 catalytic domain, PDB entry 3B3F, (Troffer-Charlier et al., 2007) and of the rat PRMT1, PDB entry 1OR8 (Zhang and Cheng, 2003). Selection was based on best resolution available for S-AdenosylHomocystein-bound proteins. 1OR8 and 3B3F structures were further optimized with the BRUGEL molecular modeling package following 2 successive rounds, each consisting of hydrogen atoms construction/optimization with heavy atoms fully constrained and then 1000 steps of unrestrained steepest-descent energy minimization. Full hydrogen atoms structures of both proteins were subsequently docked using the ClusPro 2.0 server http://cluspro.bu.edu/login.php (Kozakov et al., 2010). The resulting interaction models were then analyzed in BRUGEL. An illustration (Fig.5C) of total interface analysis along protein sequences, as well as hydrophobic contacts and hydrogen-bonds was generated with 2D-GraLab for total interface analysis (Zhou et al., 2009).

Table 1. Van der Waals interactions involving residues Ser229 and Asn230 of rat CARM1 in the heterodimer CARM1/ PRMT1.

CARM1	PRMT1	BSA (Å^2)
L 229 SER	**R 205 ASP**	**9.721**
L 229 SER	**R 208 CYS**	**11.244**
L 230 ASN	**R 204 PHE**	**9.643**
L 230 ASN	**R 205 ASP**	**26.314**

Table 1. CARM1/PRMT1 heterodimer contacts involving Ser229 and Asn230. Ser229 of rat CARM1 makes contacts with both Asp205 and Cys208 of rat PRMT1, while Asn230 interacts with Phe204 and Asp205. L stands for CARM1 chain and R for PRMT1. All data were computed with BRUGEL. BSA: Buried Surface Area.

Table 2. Geometrical parameters and energy of all the hydrogen bonds in the CARM1/PRMT1 interface.

CARM1	PRMT1	d (Å)	θ_1 (°)	θ_2 (°)	Energy (kcal.mol^{-1})
L 151 .PHE.O	R 353 .ARG.HH11	1.90	130.1	126.2	-1.750
L 156 .TYR.OH	R 353 .ARG.H	1.94	159.7	103.4	-2.330
L 157 .LEU.H	R 216 .GLU.OE2	2.04	134.5	127.1	-1.370
L 158 .SER.H	R 216 .GLU.OE2	2.03	91.5	165.7	-1.980
L 158 .SER.HG	R 216 .GLU.OE2	1.97	90.3	167.4	-2.010
L 161 .GLN.HE21	R 193 .TYR.O	2.41	151.5	102.1	-0.286
L 161 .GLN.OE1	R 194 .LYS.HZ3	1.81	136.5	151.5	-2.210
L 164 .MET.O	R 202 .TYR.HH	1.83	156.1	164.6	-2.560
L 165 .GLN.HE22	R 193 .TYR.OH	1.90	112.3	164.5	-2.260
L 170 .THR.HG1	R 202 .TYR.OH	2.20	119.0	122.2	-1.550
L 170 .THR.OG1	R 202 .TYR.HH	2.50	100.7	105.2	-1.510
L 230 .ASN.HD21	R 205 .ASP.O	1.85	142.1	169.5	-2.990
L 321 .GLY.O	R 90 .LYS.HZ2	1.78	146.5	152.9	-2.390
L 323 .ASP.H	R 115 .ASN.OD1	2.05	115.1	142.9	-1.910
L 323 .ASP.OD2	R 116 .LYS.HZ3	1.84	134.3	96.5	-0.092
L 333 .ASP.OD2	R 107 .TYR.HH	1.78	150.1	108.5	-1.280
L 333 .ASP.OD2	R 110 .LYS.HZ3	1.88	113.7	178.9	-0.094
L 472 .ASN.OD1	R 41 .HIS.H	2.34	157.4	159.2	-1.150
L 472 .ASN.OD1	R 43 .GLY.H	2.66	154.1	120.4	-0.637

Table 2. Hydrogen bonds within the CARM1/PRMT1 heterodimer interface. d is the distance between an explicit hydrogen atom and a heavy atom hydrogen-bond acceptor designed A below; θ_1 is the angle formed by the successive atoms N (or O), H and A in the hydrogen bond; θ_2 designates the angle formed by the successive atoms H, A and B, where B designates the protein heavy atom to which A is covalently bound, such as carbon of the carbonyl group. L stands for CARM1 chain and R for PRMT1. All data were computed with BRUGEL. The strong Asn230/Asp205 hydrogen bond is underlined.

Résumé : Une carence en donneurs de méthyle (CDM) est fréquente dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) et induit un stress du réticulum endoplasmique (RE). La désacétylase SIRT1 (Sirtuine1) régule la réponse cellulaire suite à un stress nutritionnel par le biais d'un stress du RE. Nous avons étudié pour la première fois l'impact d'une CDM sur le stress du RE et les effets de l'activation de SIRT1 dans un modèle expérimental de colite chez le rat. Pour restaurer l'homéostasie du réticulum endoplasmique, la cellule met en place la réponse UPR « *Unfolded Protein Response* ». Les quantités de formes actives des acteurs de l'UPR (effecteurs et régulateurs), ainsi que du facteur de transcription (HSF1) et SIRT1 ont été étudiées par western blot, immunoprécipitation et RT-qPCR sur des tissus coliques (rats et humains) et sur des lysats cellulaires. Les effets de l'activation de SIRT1 ont été étudiés *in vitro* et *in vivo*. Une CDM aggrave la colite induite par le DSS cliniquement, endoscopiquement et histologiquement. Une CDM induit un stress du RE en augmentant le niveau d'expression des formes active des acteurs de l'UPR : p-PERK, p-eIF-2α, p-IRE-1α, ATF6, XBP1-S et l'ARNm d'ATF4. Ceci est accompagné d'une diminution dramatique du niveau d'expression des protéines chaperonnes, d'une réduction du niveau d'expression de SIRT1 et d'une hyperacétylation de HSF1. L'ajout de la vitamine B12, de la S-Adénosine Methionine (SAM), ou un activateur de SIRT1 (SRT1720) réduit l'UPR *in vitro*. L'immunohistochimie a montré une diminution de l'expression de SIRT1 dans l'épithélium du côlon de patients atteints de MICI. Chez le rat, l'activation de SIRT1 prévient la colite en réduisant le niveau acétylé de HSF1 et en augmentant le niveau d'expression des molécules chaperonnes. L'activation de SIRT1 prévient la colite en réduisant le stress du RE causé par la CDM. Ces résultats suggèrent que SIRT1 pourrait être une cible thérapeutique dans les MICI où les CDM sont fréquentes.

Mots clé : carence en donneurs de méthyle, maladie inflammatoires chroniques intestinales, stress du réticulum endoplasmique, SIRT1

Summary: Methyl donor deficiency (MDD) aggravates experimental colitis in rats and decreases SIRT1 activity in cell models. Endoplasmic reticulum (ER) stress plays a key role in inflammatory bowel disease (IBD) pathogenesis. We investigated whether the influence of MDD on colitis resulted from an ER stress response triggered by decreased SIRT1 expression. The Unfolded protein response (UPR), chaperone proteins, heat-shock factor protein 1 (HSF1) and SIRT1 were examined in rats with MDD and dextran sulfate sodium (DSS)- induced colitis, in a Caco-2 cell model with stable expression of transcobalamin-oleosin chimera (TO), which impairs cellular availability of vitamin B12, and in human IBD. The effects of SIRT1 activation were studied both *in vitro* and *in vivo*. MDD aggravated DSS-induced colitis clinically, endoscopically and histologically. MDD activated ER stress pathways, with increased p-PERK, p-eiF-2α, p-IRE-1α, ATF6, XBP1-S protein and ATF4 mRNA expression levels in rats. This was accompanied by reduced SIRT1 expression level and greater acetylation of HSF1, in relation with a dramatic decrease of chaperons (BIP, HSP27 and HSP90). Adding either vitamin B12, Sadenosylmethionine, or a SIRT1 activator (SRT1720) reduced the UPR *in vitro*. In rats, SIRT1 activation by SRT1720 prevented colitis by reducing acetylation of HSF1 and increasing the expression of BIP, HSP27 and HSP90. Immunohistochemistry showed impaired expression of SIRT1 in the colonic epithelium of IBD patients. SIRT1 is a master regulator of ER stress and severity of experimental colitis in case of MDD. It could deserve further interest as a therapeutic target of IBD.

Keys words: Methyl donor deficiency, inflammatory bowel diseases, endoplasmic reticulum stress, SIRT1