



HAL
open science

Effets cellulaires et moléculaires de l'invalidation conditionnelle du gène MTR au niveau du foie et du cerveau de souris

Peng Lu

► **To cite this version:**

Peng Lu. Effets cellulaires et moléculaires de l'invalidation conditionnelle du gène MTR au niveau du foie et du cerveau de souris. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0333 . tel-02167327

HAL Id: tel-02167327

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02167327>

Submitted on 27 Jun 2019

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par Lu PENG

**Effets cellulaires et moléculaires de l'invalidation conditionnelle
du gène MTR au niveau du foie et du cerveau de souris**

12 Décembre 2016

Membres du jury :

Rapporteurs :

**M. Jean-Michel CAMADRO
Université Paris Diderot, Paris**

Directeur de recherche CNRS, Institut Jacques Monod,

M. Hervé PUY

PU-PH, Unité Inserm 1149, Paris

Examineurs :

M. Ahmet AYAV

PU-PH, Université de Lorraine, Nancy

**Mme Isabelle DULUC
Strasbourg**

Chargée de de recherche-HDR, UMR1113 INSERM,

**Mme Carole ARNOLD
(co-directrice de thèse)**

MCU, Unité Inserm 954, Université de Lorraine, Nancy

**M. Jean-Louis GUEANT
Nancy (directeur de thèse)**

PU-PH, Unité Inserm 954, Université de Lorraine,

Membres invités:

Mme Shyue-Fang BATTAGLIA-HSU PU-PH, Unité Inserm 954, Université de Lorraine, Nancy

UMR 954 Inserm, Laboratoire de Nutrition, génétique et exposition aux risques environnementaux,

9 avenue de la Forêt de Haye -Faculté de Médecine 54500 Vandoeuvre -lès-Nancy

REMERCIEMENTS

Je transmets mes sincères remerciements :

A Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant, directeur du laboratoire et directeur de thèse, de m'avoir accueilli au laboratoire INSERM U954 NGERE. Pour votre soutien, votre patience, votre disponibilité et vos précieux conseils pendant ces années de thèse. C'est d'abord grâce à vous que j'ai pu être formée à la recherche. Je le remercie de m'avoir soutenue et encouragée tout au long de cette thèse avec patience. Veuillez trouver le témoin de ma profonde gratitude.

A Madame le Docteur Carole Arnold, co-directrice de thèse, pour m'avoir guidée, conseillée et enseignée les réflexes du bon chercheur. L'intérêt et l'enthousiasme que vous avez témoigné, ainsi que le temps que vous m'a consacré. Vous m'avez soutenu en 1ère ligne, permis de m'affirmer et de confirmer mes objectifs professionnels. C'est vous qui m'avez permis de tomber dans cette potion magique qui vous transforme, sur un plan professionnel et personnel.

A Monsieur le Professeur Jean-Michel CAMADRO et Hervé PUY, pour avoir accepté d'être rapporteurs pour ma soutenance de thèse. Merci pour le temps et l'intérêt que vous avez porté à l'évaluation de ce travail.

A Monsieur le Professeur Ahmet AYAV, chirurgien digestive, d'avoir accepté d'être examinateur pour ma soutenance de thèse, pour les soutiens techniques sur hépatectomie.

A Madame le Docteur Mme Isabelle DULUC, d'avoir accepté d'être examinateur, pour votre participation au jury de comité de thèse, ma soutenance de thèse et son évaluation.

A Madame le Professeur Shyue-Fang Battaglia-Hsu, pour votre gentillesse et les bons conseils, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

A Madame le Docteur Natacha Dreumont-Schuller Arnold et Monsieur David Coelho pour vos conseils, vos patience.

Aux techniciens Jean-Marc Alberto, Céline Chéry, Florence Coste, Sophie Lorentz, Justine Flayac, Deborah Helle et Rémy Umoret pour votre patience, votre aide et vos conseils.

A Dominique Guillaume et Catherine Tavera, secrétaires du labo, pour votre gentillesse et votre patience.

A tous les doctorants de l'unité : Rose Ghemrawi, Hassan Mehem, Anaïs Bison, Jérémy Willekens, Gaili Chen, Christine Bassila, Racha Zgheib et Racha Kerek tous les autres ... pour tous ces bons moments ...

Merci à tous les membres de l'unité, Merci à tous les Professeurs et Docteurs de l'unité.

Un très grand merci pour tou(te)s mes ami(e)s chinois (es), pour l'affectueuse amitié, pour les excellents moments partagés ensemble. Mon séjour à Nancy ne pouvait pas être pareil sans vous.

Merci à mes parents, pour m'avoir inspiré, motivé et accompagné. Vous êtes toujours à mes côtés pour me soutenir et m'aider à avancer avec tous vos efforts Je ne vous remercierai jamais assez. C'est à vous que je dédie cette thèse.

Publications et Communications

Articles publiés

- Peng, L., Dreumont, N., Coelho, D., Guéant, J.-L., and Arnold, C. (2016). Genetic animal models to decipher the pathogenic effects of vitamin B12 and folate deficiency. *Biochimie* 126, 43–51.

Communications orales

- Journée scientifique de l'ED BioSE 11/2013
- Journée scientifique de l'ED BioSE 25/03/2015
- FR 3209 « Ingénierie du vivant » du 01/10/2015
- FR 3209 « Epigénétique, génomique et génomique intégrative » du 07/06/2017

Communications affichées

- 10th International Conference 'One Carbon Metabolism, vitamins B and Homocysteine' (Nancy, 07/07/2015-11/07/2015)

Table des matières

TABLE DES MATIERES	2
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	12
ABRÉVIATIONS	13
RESUME	21
ABSTRACT	22
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
PARTIE 1 : LE METABOLISME DES MONOCARBONES: LE ROLE DE LA METHIONINE SYNTHASE	24
1. Les déterminants nutritionnels de la reméthylation de l'homocystéine par la méthionine synthase.	25
1.1 Les folates (vitamine B9)	25
1.2 La vitamine B12 ou cobalamine	29
2. La reméthylation de l'homocystéine par la méthionine synthase	34
2.1 Le cycle des folates	34
2.2 Le cycle de l'homocystéine/ Méthionine	34
2.3 La voie de transméthylation	35
2.4 La voie de transsulfuration	35
2.5 La voie de reméthylation	36
2.6 La méthionine synthase	37

PARTIE 2 : LES EFFETS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE DEREGULATIONS NUTRITIONNELLES OU GENETIQUES DE LA REMETHYLATION DE L'HOMOCYSTEINE41

1. Effets cellulaires et moléculaires de la carence nutritionnelle en donneurs de méthyle	41
1.1 Carence en folates	41
1.2 Carence en vitamine B12	42
2. Effets cellulaires et moléculaires de la dérégulation de la reméthylation par invalidation génétique (Modèles génétiques)	42
2.1 Knockout de la 5,10-Methylene tetrahydrofolate reductase (Mthfr, Gene ID: Homo sapiens 4524, Mus musculus 17769)	43
2.2 Knock-down de la Methionine synthase reductase (Mtrr, Gene ID: Homo sapiens 4552, Mus musculus 210009)	43
2.3 Knockout de la Betaine-homocysteine methyltransferase (Bhmt, Gene ID: Homo sapiens 635, Mus musculus 12116)	45
2.4 Knockout de la Methylmalonyl-CoA mutase (Mut, Gene ID: Homo sapiens 4594, Mus musculus 17850) ..	46
2.5 Knockout de la Methylmalonic aciduria cblC type with homocystinuria (Mmachc, Gene ID: Homo sapiens 25974, Mus musculus 67096)	46

PARTIE 3 : CONSEQUENCES PATHOLOGIQUES DES CARENCES EN VITAMINE B12 ET FOLATES ET DES MALADIES HEREDITAIRES DU METABOLISME DE LA VITAMINE B12 ET DE LA REMETHYLATION DE L'HOMOCYSTEINE.49

1. Maladies cardiovasculaires.....	49
2. Stéatose hépatique et stéatohépatite, relation avec le métabolisme des monocarbones.	49
3. Maladies osseuses.....	51
4. Diabète.....	51
5. Maladies neurodégénératives	52
5.1 Maladie d'Alzheimer	52

5.2 Epilepsie.....	52
5.3 Sclérose en plaques.....	53
5.4 Maladie de Parkinson.....	53
5.5 Paralysie supranucléaire progressive/ sclérose latérale amyotrophique.....	53
6. Les maladies héréditaires du métabolisme de la vitamine B12 et de la reméthylation de l'homocystéine	55
6.1 Le groupe de complémentation cbIC.....	56
6.2 Le groupe de complémentation cbIG.....	58
6.3 Le groupe de complémentation cbIE.....	61

PARTIE 4 : L'ANATOMIE DU FOIE ET MECANISMES DE REGENERATION

.....	63
1. Anatomie et histologie du foie	63
2. Physiologie, lobules et acinus	65
3. Zonation métabolique du foie (Colnot and Perret, 2011)	66
4. Différents types cellulaires	68
5. REGENERATION	70
5.1 Foie normal.....	70
5.2 Régénération post-hépatectomie partielle.....	70

OBJECTIFS.....78

RESULTATS.....75

RESULTATS I : CONSEQUENCES PATHOLOGIQUES HEPATIQUES DE LA DEFICIENCE EN METHIONINE SYNTHASE.....82

Partie 1 : La méthionine synthase est essentielle à l'organogenèse hépatique pendant l'embryogenèse	82
1. L'invalidation homozygote du gène MTR dans le foie est létale in utero.....	82
2. Analyse des embryons MTR-/- à différents stades.....	83

3. Invalidation inductible du gène MTR dans le foie embryonnaire	86
Partie 2 : Conséquences de la délétion du gène MTR dans le foie adulte	90
1. Conséquences de l'invalidation constitutive du gène MTR dans le foie adulte	90
2. Conséquences de l'invalidation inductible du gène MTR dans le foie adulte	93
Partie 3 : Conséquences de l'invalidation du gène MTR dans un modèle de régénération hépatique	100
1. La régénération du foie est inhibée chez les souris knockout du gène MTR dans le foie après hépatectomie partielle.....	100
2. La régénération du foie a été bloquée chez les souris knockout du gène MTR dans le foie 48h après l'hépatectomie partielle	109

RESULTATS II : CONSEQUENCES PATHOLOGIQUES NEURONALES DE LA DEFICIENCE EN METHIONINE SYNTHASE.125

Partie 1 : Invalidation de MTR dans le cerveau : aspects biochimiques et neurocognitifs	125
1. Analyse morphométrique	125
2. Evaluation de l'efficacité de l'extinction de MTR dans différentes régions du cerveau	126
3. Impact de la délétion de la méthionine synthase sur le métabolisme des donneurs de méthyle	127
4. Etude comportementale : aspects neurofonctionnels et cognitifs	128
Partie 2 : Conséquences pathologiques de la déficience en méthionine synthase lors du vieillissement neuronal : perturbations des RNA binding proteins régulant la réponse anti-oxydante	130
1. Evaluation de l'efficacité de la délétion de MTR par dosage biochimique	131
2. Etude fonctionnelle du cerveau des souris KO MTR: analyse des capacités d'apprentissage.....	134
3. Etude de la localisation et de l'expression des RBPs dans l'hippocampe et le cervelet par immunofluorescence	136
4. Etude des marqueurs du stress oxydant et de la réponse anti-oxydante par immunofluorescence	142

DISCUSSION ET CONCLUSION

1. Conséquences biochimiques sur le métabolisme des donneurs de méthyle	147
2. Etude comportementale : aspects neurofonctionnels et cognitifs	149
3. Les effets du modèle KO conditionnel hépatique sur l'organogénèse	149
4. Les effets du modèle KO conditionnel hépatique sur la régénération post hépatectomie chez la souris adulte.....	151

5. Comparaison du modèle génétique cKO mtr par rapport au modèle nutritionnel de carence gestationnelle en donneur de méthyles.....	153
6. Conclusion générale.....	155

BIBLIOGRAPHIE79

MATERIELS ET METHODES153

Fiche 1 : Modèle murin d'invalidation de la méthionine synthase..... 175

1. Système Cre/Lox	175
2. Lignées de souris.....	177
3. Modèle d'invalidation	180
4. Injection d'inducteurs :	180
5. Embryons	181
6. Protocole de Knockout MTR dans le cerveau traité par SRT1720	183
7. Etude comportementale : test du labyrinthe aquatique multi-T	183

Fiche 2 : Modèle 2/3 hépatectomie partielle (Mitchell and Willenbring, 2008) 185

Fiche 3 : Prélèvement et gestion des échantillons 188

Fiche 4 : Dosages plasmatiques / sériques et tissulaires 190

1. Dosage de l'homocystéine, acide méthylmalonique et acide succinique par LCMS/MS (COLONNE UPLC HSST3).....	190
2. Analyse de molécules adénylées (SAM/SAH) par dérivation fluorescente à l'aide du chloroacétaldéhyde	193
3. Concentration en méthionine.....	194
4. Métabolisme lipidique : Triglycérides, cholestérol et acides gras libres	195
5. Marqueurs du stress cellulaire (ALAT/ASAT)	196
6. Dosages enzymatiques : Mesure de l'activité méthionine synthase, MTR	197

Fiche 5 : Génotypage des souris 199

Fiche 6 : Extraction de l'ARN par TRIzol (Invitrogen)..... 203

Fiche 7 : Quantification de l'ARN et Contrôle de qualité de l'ARN 205

1. Quantification de l'ARN par Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Desjardins and Conklin, 2010)	205
2. Vérification de qualité des ARN avec le Bioanalyzer Agilent	206
Fiche 8 : Transcription inverse des ARN (RT)	210
Fiche 9 : PCR quantitative en temps réel	211
Fiche 10 : Extraction des protéines pour l'étude par Western-Blot.....	213
Fiche 11 : Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)	214
Fiche 12 : Western Blot	215
Fiche 13 : Déshybridation des membranes (STRIPPING)	220
Fiche 14 : Analyses histologiques	221
1. Traitement des échantillons tissulaires pour l'analyse histologique	221
2. Réalisation de la coloration HES	221
3. Marquages immunofluorescents	222
4. Marquage immunohistochimiques	223
Fiche 15 : Liste des anticorps	224
Fiche 16 : Etude transcriptomique.....	227
Fiche 17 : Analyses Densitométrique et Statistiques	229

Liste des figures

Figure 1 : Le rôle du métabolisme des monocarbones	24
Figure 2 : Les inter-relations entre le cycle de folates, le cycle de la méthionine et la voie de transsulfuration.....	25
Figure 3: Structure des folates.	26
Figure 4 : Absorption des folates et distribution dans le foie et les tissus périphériques	28
Figure 5 : Structure de la vitamine B12.	30
Figure 6: Absorption, transport et métabolisme de vitamine B12 et folates.	32
Figure 7 : Cycle des folates et cycle de la méthionine.	35
Figure 8 : Schéma structural de la méthionine synthase.	39
Figure 9: Métabolisme intracellulaire de la cobalamine et ses défauts.	56
Figure 10 : Lobes du foie de souris.....	63
Figure 11 Structure du tissu hépatique	65
Figure 12 Acinus du foie	66
Figure 13 : Zonation métabolique du foie.....	68
Figure 14 : Signalisation de l'IL-6 pendant la régénération du foie	74
Figure 15: Analyse de la protéine MTR par immunofluorescence dans les embryons MTR ^{-/-} , MTR ^{+/-} et contrôles au stade E13.5.....	85

Figure 16: Schéma de protocole d'induction de l'invalidation de MTR.	87
Figure 17: Examen macroscopique d'un embryon contrôle au stade E15.5 après injection d'une dose unique de raloxifène	88
Figure 18: L'expression de méthionine synthase diminue chez les souris KO MTR.....	89
Figure 19: Une diminution de l'activité enzymatique chez les souris hétérozygotes	91
Figure 20: Analyse histo-pathologique du foie des souris hétérozygotes.	93
Figure 21 : Diminution de l'expression de la méthionine synthase chez les souris adultes KO MTR induit par le tamoxifène dans le foie	94
Figure 22: La délétion inductible du gène MTR dans le foie induit une diminution du taux d'hépatocytes positifs pour Ki67.....	98
Figure 23: Le knockout inductible du gène MTR dans le foie induit un stress du réticulum endoplasmique (RE) mais n'induit pas une surexpression de Sirt 1..	99
Figure 24: L'initiation de la prolifération du foie après hépatectomie.	100
Figure 25: Protocole de l'hépatectomie.....	101
Figure 26: Diminution de l'expression de la protéine méthionine synthase chez les souris knockout du gène MTR dans le foie, pendant ou après hépatectomie partielle, analysée par Western Blot.	102
Figure 27: Analyse histopathologique du foie chez les souris adultes ayant une invalidation inductible de MTR	104
Figure 28 : Inhibition de la prolifération des hépatocytes et de la restauration du poids du foie après PH chez les souris adultes KO MTR.	105

Figure 29: Analyse par western-blot de l'expression de protéines-clés du cycle cellulaire dans le foie des souris KO MTR.....	107
Figure 30 : Activation du stress du réticulum endoplasmique dans le foie des souris Knockout du gène MTR 48h et 72h après l'hépatectomie partielle.....	108
Figure 31: Analyse par Western Blot des niveaux d'expression protéique des marqueurs d'autophagie Atg5 et Atg16L1.....	109
Figure 32: Protocole animal n°3 pour l'induction du KO de MTR suivie d'une hépatectomie.	110
Figure 33: Une diminution de l'expression de la méthionine synthase chez les souris KO.	112
Figure 34: Analyse histopathologique du foie chez les souris adultes ayant une invalidation inducible de MTR.	114
Figure 35: Inhibition de la prolifération des hépatocytes et de la restauration du poids du foie après PH chez les souris adultes KO MTR.	115
Figure 36: Analyse par western-blot de l'expression de protéines-clés du cycle cellulaire dans le foie des souris KO MTR 48h après hépatectomie (protocole n°3).....	116
Figure 37: Les annotations fonctionnelles de gènes analysés par le logiciel PANTHER.....	118
Figure 38: Analyse par western-blot de l'expression des marqueurs du cycle cellulaire..	120
Figure 39: Analyse par western-blot de l'expression des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique.....	121
Figure 40 : Analyse par western-blot de l'expression des marqueurs de nécrose..	122
Figure 41: Analyse par western-blot de l'expression des marqueurs de l'autophagie.....	123

Figure 42: Analyse par western-blot de l'expression des marqueurs de la voie signalisation MAPK.	124
Figure 43: Profil d'expression protéique et quantification de la méthionine synthase (A,B)	126
Figure 44: quantification de l'expression de MTR par RT-qPCR dans le cortex et l'hippocampe.	127
Figure 45: Dosage tissulaire (hippocampe) des métabolites	128
Figure 46: Étude comportementale (labyrinthe aquatique multi-T)	129
Figure 47: Profils d'expression des protéines MTR et Cre dans le cortex des souris MTR.	132
Figure 48 : Dosage biochimique de l'activité méthionine synthase dans le cortex cérébral.	133
Figure 49 : Etude comportementale via le test du labyrinthe aquatique multi-T.	135
Figure 50: Etude de la localisation et de l'expression HuR et méthyl-HuR dans l'hippocampe et le cervelet.Hippocampe	137
Figure 51: Etude de la localisation et de l'expression de EIF4A3 dans l'hippocampe et le cervelet...	139
Figure 52: Localisation de U2AF65 et FUS au niveau de l'hippocampe et du cervelet des souris MTR.	141
Figure 53: Localisation de Nrf2 et 8-OHG au niveau de l'hippocampe et du cervelet des souris MTR. A et E : région CA2 de l'hippocampe. C et G : cervelet	144

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des lignées de souris génétiques invalidées mises en œuvre des modèles des pathologies humaines liées à la carence en B12 et folate.	48
Tableau 2 : Tableau des effectifs de souris nées de croisements entre la lignée « MTR LoxP» (ML) et la lignée Albumine-Cre (AC).	83
Tableau 3: Tableau des effectifs d'embryons MTR-/- trouvés dans les portées AC ;MTRWT/lox X MTRlox/lox aux stades embryonnaires E11.5 à E17.5.	84
Tableau 4: Dosage des métabolites plasmatiques du métabolisme des donneurs de méthyle.	91
Tableau 5: Dosage des métabolites hépatiques du métabolisme des donneurs de méthyle.	93
Tableau 6: Paramètres biologiques et métaboliques dans le plasma des souris adultes (5 mois) ayant une invalidation hépatique de MTR induite par le tamoxifène.	96
Tableau 7: Dosage des métabolites hépatiques du métabolisme des donneurs de méthyle.	97
Tableau 8: Paramètres biologiques et métaboliques dans du plasma des souris à invalidation hépatique de MTR.	103
Tableau 9 : Paramètres biologiques et métaboliques dans le plasma des souris ayant une invalidation hépatique de MTR induite, 48h après hépatectomie.	113
Tableau 10 : Poids du corps et du cerveau des souris témoins et homozygotes (Jour de la mise à mort)	126

Abréviations

PERK: PKR-like ER-associated protein kinase

PG: Polyglutamates

PGC1 α : Proximal proliferator activator receptor gamma coactivator alpha

DHF: Dihydrofolate

DHFR : Dihydrofolate reductase

MTHFR : Méthylène tétrahydrofolate réductase

N5-MeTHF : N5-méthyltétrahydrofolate

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

THF : Tétrahydrofolate

FPG : Polyglutamates de folate

FMG : Monoglutamates de folate

GCPII : Glutamate carboxypeptidase

FGCP : Intestinale folylpolyglutamate carboxypeptidase

GH : γ -glutamyl hydrolase

PCFT : Proton-coupled folate transporter

S-FBP : Soluble Folate Binding Proteins

FR : Folate receptor

RFC : Récepteur des folates réduits

PCFT : Proton-coupled folate transporter

Cbl : Cobalamine

DMB : Pseudo-nucléotidique diméthylbenzimidazole

CNCbl : Cyanocobalamine

OHCbl : Hydroxocobalamine

MeCbl : Méthylcobalamine

5'd Ado : 5'- désoxyadénosylcobalamine

Méthylmalonyl CoA mutase : Méthylmalonyl Coenzyme A mutase

IF : Facteur intrinsèque

ABCD4 : ATP-binding cassette (ABC) transporter D4

TCII : Transcobalamine II

AdoCbl : Adénosylcobalamine

MS : Méthionine synthase

Met : Méthionine

Hcy : Homocystéine

FGPS : Folypolyglutamate synthase

DHFR : Dihydrofolate réductase

SHMT : Sérine hydroxyméthyltransférase

MAT : Méthionine adénosyltransférase

SAM : S-adénosylméthionine

SAH : S-adénosylhomocystéine

SAHH : SAH hydrolase

CBS : Cystathionine β -synthase

CTH : Cystathionine γ -lyase

CYL : Cystathionine γ -lyase

BHMT : Bétaïne-homocystéine méthyltransférase

Mut : Méthylmalonylcoenzyme A mutase

NTD : Fermeture du tube neural

MTRR : 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase

MMACHC : Methylmalonic aciduria and homocystinuria type C protein

SIRT1 : NAD-dependent deacetylase sirtuin-1

PGC1 α : Proxisol proliferator activator receptor gamma coactivator alpha

NASH : Stéatose hépatique non alcoolique

LMBD1 : Lysosomal membrane transporter 1

MMA : Acide méthylmalonique

MMADHC : Methylmalonic aciduria and homocystinuria type D protein

ABCD4 : ATP-binding cassette (ABC) transporter D4

RCIU : Retard de croissance intra-utérin

HUS : Yndrome urémique hémolytique

ATN : Anomalie du tube neural

AD : Alzheimer's disease

TGF β : Transforming Growth Factor β

HGF : Hepatocyte Growth Factor

IL-6 : Interleukine 6

PH : Hépatectomie partielle

FAH : Hydrolase fumarylacétoacétate

TNF : Facteur de nécrose tumorale

NF κ B : Nuclear factor-kappa B

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

JAK : Janus-kinase

gp130 : Glycoprotein 130

Tyr : Tyrosine

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

GRB2-SOS : Growth-factor-receptor-bound protein2/son-of-sevenless

MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

AKT : Protéine kinase B

Rb : Protéine du rétinoblastome

CDK : Kinases dépendantes des cyclines

EGF : Facteur de croissance épidermique

HGF : Facteur de croissance des hépatocytes

HBEGF : Heparin-binding EGF-like growth factor

AR : Amphiréguline

VEGF : Fcteur de croissance de l'endothélium vasculaire

FGF : Facteurs de croissance des fibroblaste

5-HT : 5-hydroxytryptamine

IGFBP : Insulin-like growth factor-binding protein

MMP : Métalloprotéases matricielle

TGF : Facteur de croissance transformant

mTOR : Mammalian target of rapamycin

RBP : RNA binding protein

ATF6: Activating transcription factor-6

PERK: PKR-like ER-associated protein kinase

IRE1: Inositol-requiring enzyme-1

TG : Triglycéride

ALAT: Alanine aminotransférase

ASAT : Aspartate aminotransférase

HDL : Lipoprotéines de haute densité

LDL : Lipoprotéines de basse densité

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

Atg16L1 : Autophagy-related protein 16-1

Atg5 : Autophagy protein 5

Cdc 2 : Cyclin-dependent kinase 1

Cdc : Cell division cycle

RIP3 : receptor-interacting serine-threonine kinase 3

MLKL : mixed lineage kinase domain-like protein

Ripk1 : Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1

Bnip3 : BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3

SAPK : Stress-activated protein kinases

JNK : Jun amino-terminal kinases

MEK3 : Mitogen-Activated Protein Kinase kinase 3

HuR : ELAV-like protein 1

CD320 : récepteur de la transcobalamine

eIF4A : eukaryotic initiation factor-4A

EJC : Exon Junction Complex

ARC : activity-regulated cytoskeleton-associated protein

U2AF : U2 auxiliary factor

FUS : fused in sarcoma

8-OHG : 8-hydroxyguanosine

Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2

Keap1 : kelch-like ECH associated protein 1

GSTA2 : glutathione S-transferase A2

NQO1 : NADPH:quinone oxidoreductase 1

ER stress : stress du réticulum endoplasmique

YFP : Yellow Fluorescent Protein

HES : Hématéine-Eosine-Safran

Résumé

L'enzyme méthionine synthase (MTR) catalyse la reméthylation de l'homocystéine en méthionine, le précurseur du donneur universel de groupe méthyle S-Adenosylmethionine (SAM), impliqué dans des mécanismes de régulations épigénétiques. Des polymorphismes de MTR sont associés à des défauts métaboliques et des défauts de développement embryonnaire. Afin d'étudier les conséquences d'une déficience en MTR, nous avons généré des modèles murins d'inactivation conditionnelle du gène *mtr* de manière constitutive ou inductible dans le foie et dans le cerveau.

L'inactivation constitutive ou inductible ciblée dans le foie pendant l'embryogenèse n'est pas viable, suggérant un rôle limitant de la méthionine synthase sur le développement précoce et l'organogenèse en lien probable avec les conséquences sur la prolifération cellulaire. Dans les périodes post-natales, nous avons utilisé le modèle inductible complété par une hépatectomie pour étudier les altérations de la régénération hépatique liée aux effets sur le stress cellulaire ainsi que l'expression et l'activation des cyclines. Le KO dans le cerveau induit principalement une perte des fonctions de mémorisation de l'apprentissage hippocampo-dépendant.

Au total, nos résultats illustrent les effets différents de l'inactivation de MTR en fonction de l'organe considéré. Le foie est un organe très plastique avec une capacité de régénération très importante. Les effets sur les étapes de l'organogénèse et sur l'inhibition de la régénération confirment l'hypothèse du rôle majeur et limitant de la méthionine synthase dans la régulation du cycle cellulaire. Le modèle d'inactivation au niveau du cerveau confirme le rôle très important de la voie de reméthylation de l'homocystéine catalysée par la méthionine synthase, rôle qui a déjà été illustré par d'autres travaux sur les rats carencés en donneur de méthyle et sur la souris transgénique KO *cd320*.

Mots-clés : Vitamine B12, Méthionine Synthase, Inactivation génique conditionnelle, Régénération hépatique, Prolifération cellulaire, Cerveau, Stress Oxydant, SIRT1, RNA Binding Proteins.

Abstract

The enzyme methionine synthase (MTR) catalyzes the remethylation of homocysteine to methionine, the precursor of the methyl donor S-universal Adenosylmethionine (SAM), involved in epigenetic regulation mechanisms. We generated mouse models with conditional invalidation of the *mtr* gene in a constitutive or inducible manner to delete the gene expression specifically in the liver and brain.

Constitutive invalidation during embryonic life is not sustainable when targeted to the liver, suggesting a limiting role of methionine synthase in early organogenesis and probably on cell proliferation. We performed hepatectomy to study regeneration-related effects on the cellular stress and found dramatic effects on cell proliferation through altered expression and activation of cyclins. The constitutive model in brain highlighted the behavioral anomalies related to a loss of learning and memory. This suggested major effects in the hippocampus.

Overall, our findings highlighted the specific effects of the invalidation of methionine synthase in both organs. The liver is a plastic member with a very high regenerative capacity. The effects on organogenesis and inhibition of regeneration confirm the hypothesis for a major role of methionine synthase in cell cycle regulation. The invalidation model in the brain confirms the important role of the remethylation pathway catalysed by methionine synthase, a role which has been shown by other studies in rats deprived in methyl donors and in *cd320* KO transgenic mice.

Keywords : Methyl donors, Vitamin B12, Methionine Synthase, Conditional Gene Knockout, Liver, Regeneration, Cell Proliferation, Brain, Oxydative stress, SIRT1, RNA Binding Proteins.

Introduction Bibliographique

Partie 1 : Le métabolisme des monocarbone: le rôle de la méthionine synthase

Dans le métabolisme des monocarbone, les unités monocarbone proviennent d'acides aminés spécifiques, comme la sérine et la glycine. Ces unités de carbone sont les substrats pour le métabolisme des monocarbone et après intégration par des réactions chimiques, elles sont impliquées dans des processus cellulaires divers, tels que la biosynthèse des lipides, la régulation des processus d'oxydoréduction, des régulations épigénétiques et les réactions de méthylation. Le métabolisme des monocarbone est considéré comme un processus de «ménagement» et il fonctionne comme un intégrateur métabolique des nutriments. Les apports sont le glucose et les acides aminés qui rentrent dans les deux cycles et après avoir été traités par des réactions chimiques, ils sont alors utilisés pour diverses fonctions biologiques (figure 1) (Locasale, 2013).

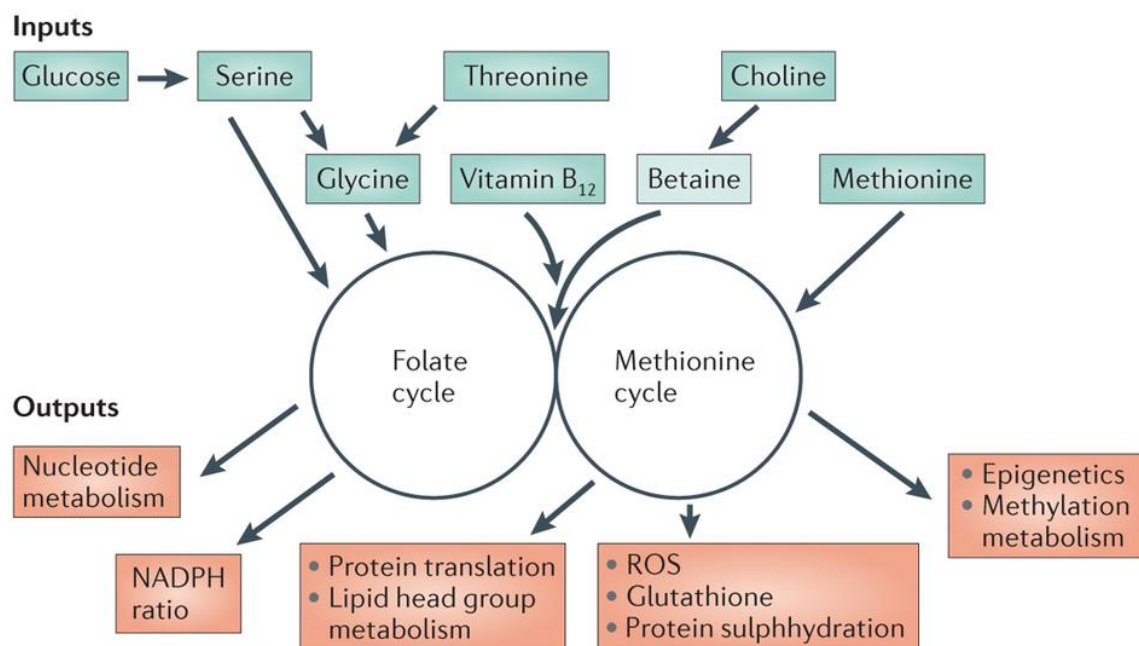


Figure 1 : Le rôle du métabolisme des monocarbone en tant qu'intégrateur métabolique des nutriments et senseur de l'état nutritionnel, et en tant que fournisseur de substrats pour diverses fonctions biologiques (Locasale, 2013)

Le métabolisme des monocarbone comprend trois voies: le cycle des folates, le cycle de la méthionine et la voie de transsulfuration (Figure 2). Les mutations et la perte de fonction dans les enzymes impliquées dans ces voies conduisent à des défauts de croissance chez les animaux et les humains, ce qui souligne le rôle du métabolisme des monocarbone sur la croissance cellulaire.

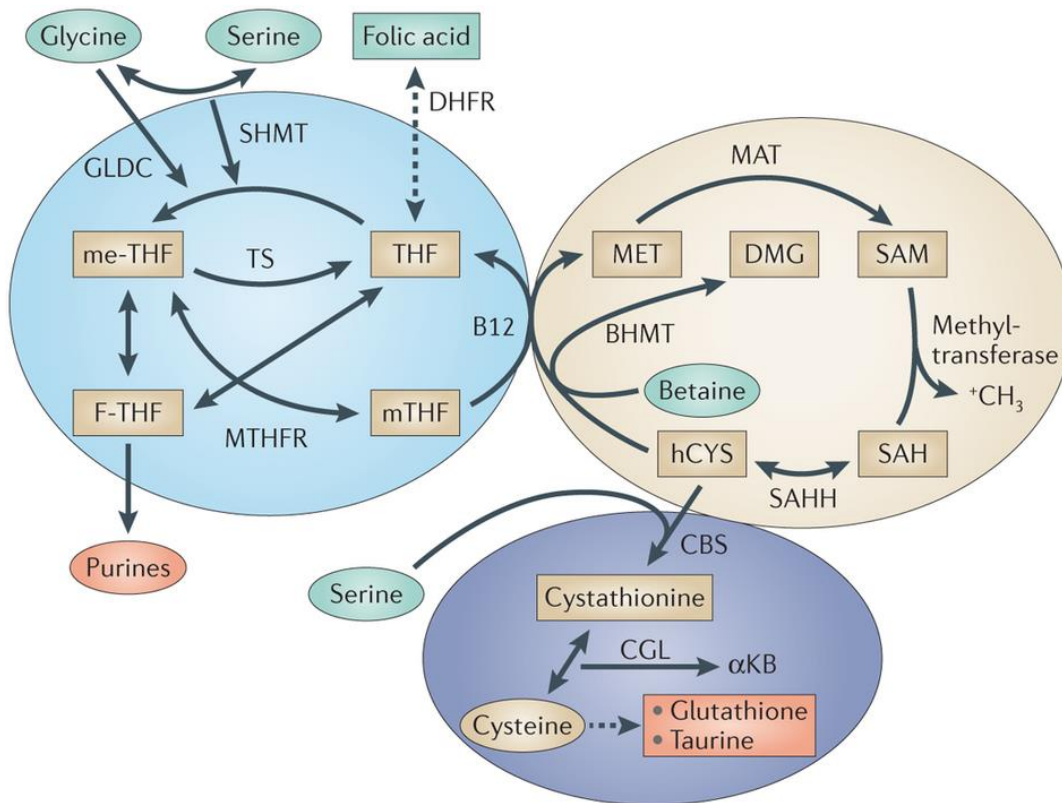


Figure 2 : Les inter-relations entre le cycle de folates, le cycle de la méthionine et la voie de transsulfuration. (Locasale, 2013)

1. Les déterminants nutritionnels de la reméthylation de l'homocystéine par la méthionine synthase.

1.1 Les folates (vitamine B9)

1.1.1 Structure des folates

L'acide folique, vitamine B9 ou acide ptéroylglutamique est une vitamine hydrosoluble. L'origine du nom folate provient du latin folium qui signifie feuille car ces substances ont été isolées à partir de feuilles d'épinard en 1941 par Mitchell et ses collaborateurs.

Il est composé d'un noyau ptérine, d'un acide para-aminobenzoïque et d'une molécule d'acide glutamique (Figure 3)(Guéant et al., 2013a). Déclinés sous la forme de plusieurs dérivés, ils sont principalement sous forme de polyglutamates (PG) liés à des protéines. L'acide folique ne correspond pas à la forme biologiquement active, ce sont les dérivés réduits non oxydés qui constituent les formes biologiquement actives, comme dihydrofolates ou DHF, tétrahydrofolates ou THF et les dérivés THF (méthylés (CH₃) ou formylés (CHO)). Par leur rôle de co-substrats pour le transfert de groupes monocarbonés (Balaghi and Wagner, 1995), ils sont les acteurs importants du cycle des folates.

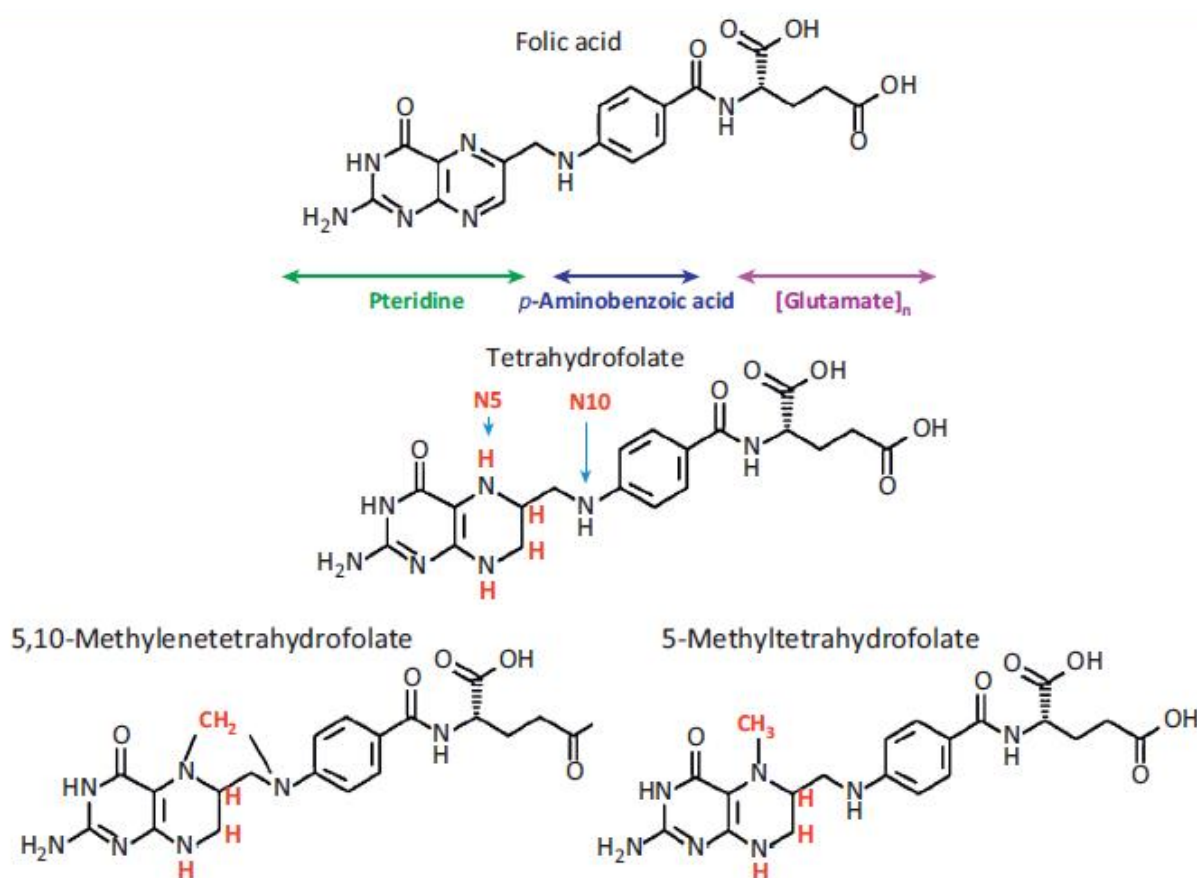


Figure 3: Structure des folates (Guéant et al., 2013a).

1.1.2 Apports, absorption, transport et stockage des folates

Puisque les folates ne peuvent pas être synthétisés par les mammifères, les sources principales d'acide folique proviennent de l'alimentation. La quantité nécessaire est de 0,3mg/jour chez les

humains. Les sources riches en folates sont les abats (foies, rognons), les céréales et graines (blé, tournesol), les fruits (agrumes, abricots), les légumes verts et féculents (asperges, lentilles), le lait et les fromages fermentés (Iyer et al., 2010). Une nourriture équilibrée est suffisante pour combler les besoins quotidiens et fournit à 90% des apports, tandis que 10% sont synthétisés par la flore intestinale.

Les polyglutamates de folate (FPG), qui constituent les formes naturellement présentes dans les aliments (~90%), doivent être hydrolysés en monoglutamates de folate (FMG) par la glutamate carboxypeptidase II (GCPII) avant leur absorption par la muqueuse intestinale.

Dans les aliments, les folates existent sous forme de polyglutamates. L'enzyme intestinale folylpolyglutamate carboxypeptidase (FGCP) ou γ -glutamyl hydrolase (GH) les hydrolyse en monoglutamates (Yao et al., 1996) pour qu'ils soient absorbés par la muqueuse intestinale (Figure 4). Les monoglutamates sont absorbés par le récepteur : « proton-coupled folate transporter » (PCFT) (Zhao et al., 2009) de forte affinité pour l'acide folique.

Le transport du folate est pH-dépendant, ces récepteurs sont également exprimés dans le rein, le foie, le placenta, la rétine et le cerveau (Qiu et al., 2006; Zhao et al., 2009). Une partie des folates doit être méthylée et réduite en 5-MeTHF qui passe dans la veine porte grâce à un système de transporteurs spécifiques (Rosenberg, 1990). Le transport des folates peut être plasmatique ou cellulaire.

L'albumine est un ligand de faible affinité de 5-MeTHF, forme active des folates dans le plasma, qui transporte les folates vers certains tissus comme le placenta et le fœtus, cependant le transporteur « Soluble Folate Binding Proteins » (S-FBP) est un ligand de haute affinité. Ce ligand sert à transporter les folates vers le foie qui contient la moitié des folates de l'organisme. Le transport cellulaire est réalisé par 3 systèmes de transport :

Les « folate receptors » (FR), qui utilisent un mécanisme d'endocytose, sont exprimés dans le cortex, le placenta, les glandes salivaires, l'utérus, le pancréas, les glandes bronchiques et les alvéoles pulmonaires, et sont de forte affinité pour l'acide folique et le 5-MeTHF. Ils sont présents dans un certain nombre de lignées tumorales, notamment IGROV1 (ovarian carcinoma, (Weitman et al.,

1992)), Caco-2 (colon carcinoma) et KB (epidermoid carcinoma) (Antony et al., 1985; Kane et al., 1986). Dans le cadre d'un excès de folates, il peut exister un gradient passif (Galivan et al., 2000; Rosenberg, 1990).

Récepteur des folates réduits (RFC) : il est exprimé au niveau de l'intestin, du rein, dans les axones et les dendrites ainsi que dans la membrane apicale des cellules bordant le canal rachidien (Wang et al, 2001). Ce transporteur a une haute affinité pour les folates réduits (Assaraf and Goldman, 1997).

Proton-coupled folate transporter » (PCFT) : il est exprimé dans les membranes apicales des cellules intestinales au niveau de jéjunum proximal, dans le rein, le foie, le placenta, la rétine et le cerveau (Qiu et al., 2006; Zhao et al., 2009). Il a une haute affinité pour l'acide folique.

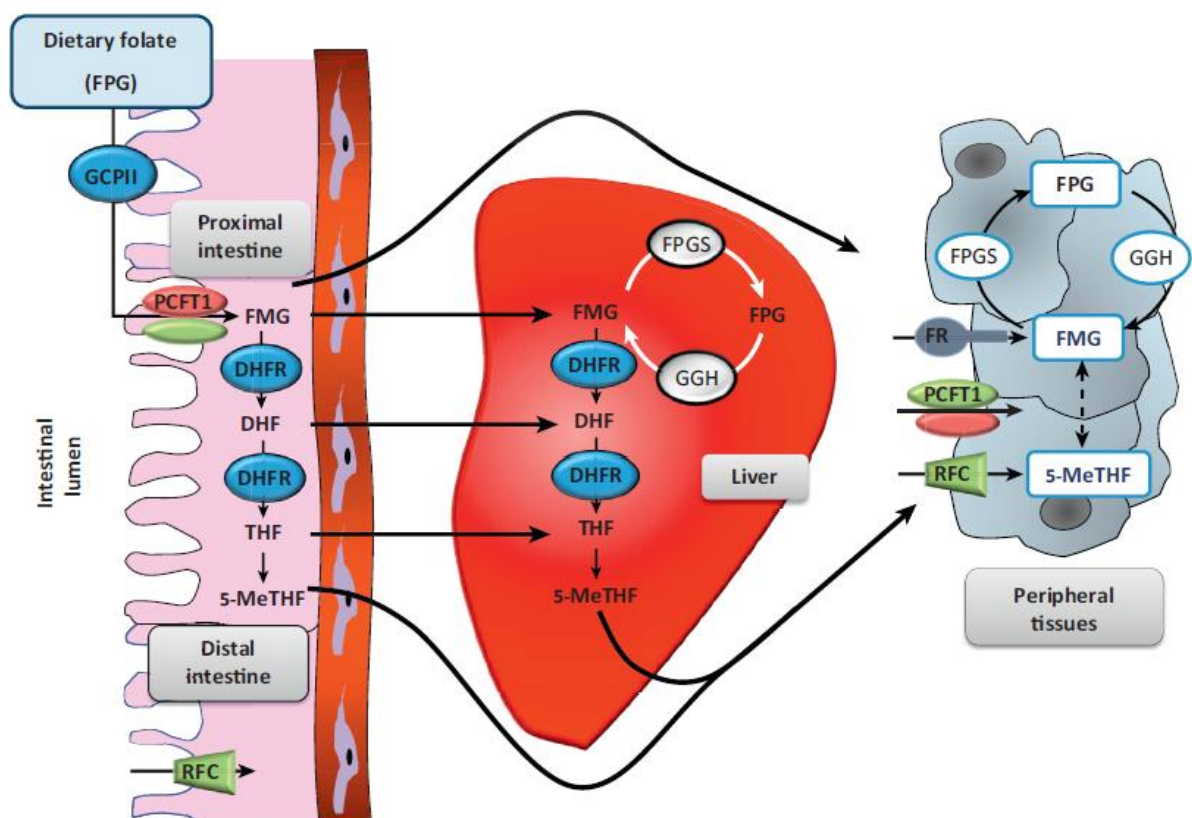


Figure 4 : Absorption et distribution des folates dans le foie et les tissus périphériques (Guéant et al., 2013a)

Les folates sont principalement stockés dans le foie, qui contient environ la moitié du stock de l'organisme (10 à 15 mg) surtout sous forme de 5-MeTHF. Néanmoins le foie maintient 10 à 20% des

folates (principalement 5-MeTHF), le reste est distribué aux autres tissus. Les réserves en folates permettent de subvenir aux besoins de l'organisme pendant quelques mois. Les folates sont éliminés dans les selles et dans les urines.

1.1.3 Rôle des folates

Les folates jouent plusieurs rôles importants :

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

(B) La synthèse des acides nucléiques : la synthèse de la thymine, base pyrimidique nécessaire à la synthèse d'ADN, nécessite l'action de l'enzyme thymidylate synthase ayant le 5, 10-méthylène THF comme coenzyme (Carreras and Santi, 1995). De plus, au niveau de la synthèse des bases puriques, le 5, 10-méthylène THF et le N10-formylTHF forment les 2ème et 8ème atomes de carbone du noyau purine.

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

(D) La synthèse de la méthionine : la méthionine synthase transfère le groupement méthyle du 5-MeTHF vers l'homocystéine. Cette réaction aboutit à la régénération du THF et à la formation de la méthionine (Bailey and Gregory, 1999).

1.2 La vitamine B12 ou cobalamine

1.2.1 Structure de la vitamine B12

La vitamine B12 nommée aussi Cobalamine (Cbl) est une vitamine hydrosoluble.

La vitamine B12 est une molécule organométallique volumineuse. Elle a une structure chimique proche de l'hème mais l'atome central de fer y est remplacé par un atome de cobalt. Il existe 3

formes selon que l'atome de cobalt est tri-, bi- ou monovalent correspondant respectivement à 3 niveaux d'oxydation : Cob(I)alamine, Cob(II)alamine, Cob(III)alamine. La cobalamine appartient à la famille des corrinoïdes. La molécule de corrinoïde est constituée de trois parties : un noyau tétrapyrrolique central appelé noyau corrine et deux chaînes axiales, l'une en position α avec un groupement pseudo-nucléotidique diméthylbenzimidazole (DMB) et l'autre un radical anionique variable X en position β qui détermine le nom du composé vitaminique CNCbl pour cyanocobalamine (forme circulante), OHcbl pour hydroxocobalamine (forme circulante), MeCbl pour méthylcobalamine (cofacteur de réactions de reméthylation en particulier dans la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine) et 5'd Ado pour 5'- désoxyadénylcobalamine (cofacteur de la méthylmalonyl CoA mutase (Figure 5).

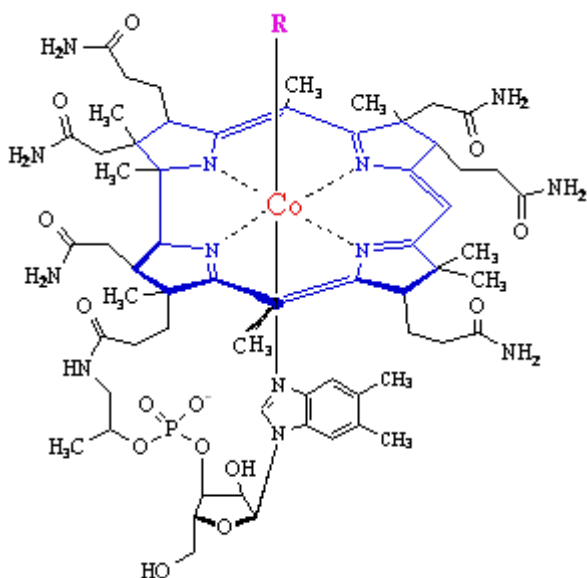


Figure 5 : Structure de la vitamine B12 (Iconographie Inserm U954).

1.2.2 Apports, absorption, transport et stockage de la vitamine B12

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

Les apports conseillés en vitamine B12 sont très faibles, environ 2 microgrammes par jour chez l'adulte. Les besoins sont variables selon les périodes de la vie.

L'absorption et le métabolisme de la cobalamine (Cbl) sont compliqués (Figure 6). Tout d'abord, la majorité des Cbl reste attachée aux protéines alimentaires, principalement sous forme d'AdoCbl et de MeCbl. Dans la bouche, les Cbl libres sont liées avec les haptocorrines salivaires. Ensuite, les sécrétions chlorohydropeptiques de l'estomac libèrent la Cbl des protéines alimentaires. Grâce au pH acide du suc gastrique, la Cbl se lie à l'haptocorrine et elle passe au duodénum sous cette forme (Scott, 1999). Cependant dans le duodénum, les haptocorrines sont dégradées par les enzymes pancréatiques exocrines. De nouveau libre dans un environnement plus alcalin, la Cbl se combine avec le facteur intrinsèque (IF) (Wuerges et al., 2007). L'IF est une glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales de l'estomac, qui va permettre à la cobalamine de franchir la barrière intestinale au niveau iléal (Ganesan et al., 2002). En se liant à la vitamine B12, l'IF se dimérise ce qui lui confère une meilleure résistance à la protéolyse et en même temps protège la vitamine B12 du catabolisme par les bactéries intestinales. Le complexe IF-vitamine B12 se fixe sur un récepteur spécifique de la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'iléon appelé cubam formé de la cubiline associée à la protéine amnionless (Fyfe et al., 2004). Une fois internalisé, le complexe traverse la paroi du tube digestif par endocytose et l'IF est dégradé dans l'entérocyte libérant ainsi la vitamine B12. Pour pénétrer dans le cytoplasme, la B12 traverse la membrane lysosomale par un processus impliquant les protéines LMBD1 et ABCD4 (ATP-binding cassette (ABC) transporter D4), localisée au niveau de la membrane du lysosome (Coelho et al., 2012; Rutsch et al., 2009).

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

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

Le complexe Cbl/ TCII qui circule dans le sang, se fixe par sa partie protéique à un récepteur d'endocytose membranaire spécifique (le récepteur mégaline pour les reins et le CD320 pour le foie et les autres tissus (Nielsen et al., 2012) et pénètre vers la cellule. La partie protéique (transcobalamine) est dégradée dans le lysosome et la vitamine B12 est libérée (Lildballe et al., 2012). Elle quitte alors les lysosomes et est transformée en coenzymes actifs :

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

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

La vitamine B12 est essentiellement stockée dans le foie, le coeur et la rate. Environ 50% du stock de la vitamine B12 est dans le foie humain (Le Grusse et Watier, 1993) correspondant à 2 à 3 mg. Ce stock peut suffire à l'organisme pendant 3 à 5 ans puisque la consommation de la vitamine B12 ne constitue que 3 à 4 µg/jour. Chez l'homme, l'élimination quotidienne de la vitamine B12 est de 2 à 5 µg (McDowell, 2000). Elle est assurée par la bile, la voie fécale et les urines.

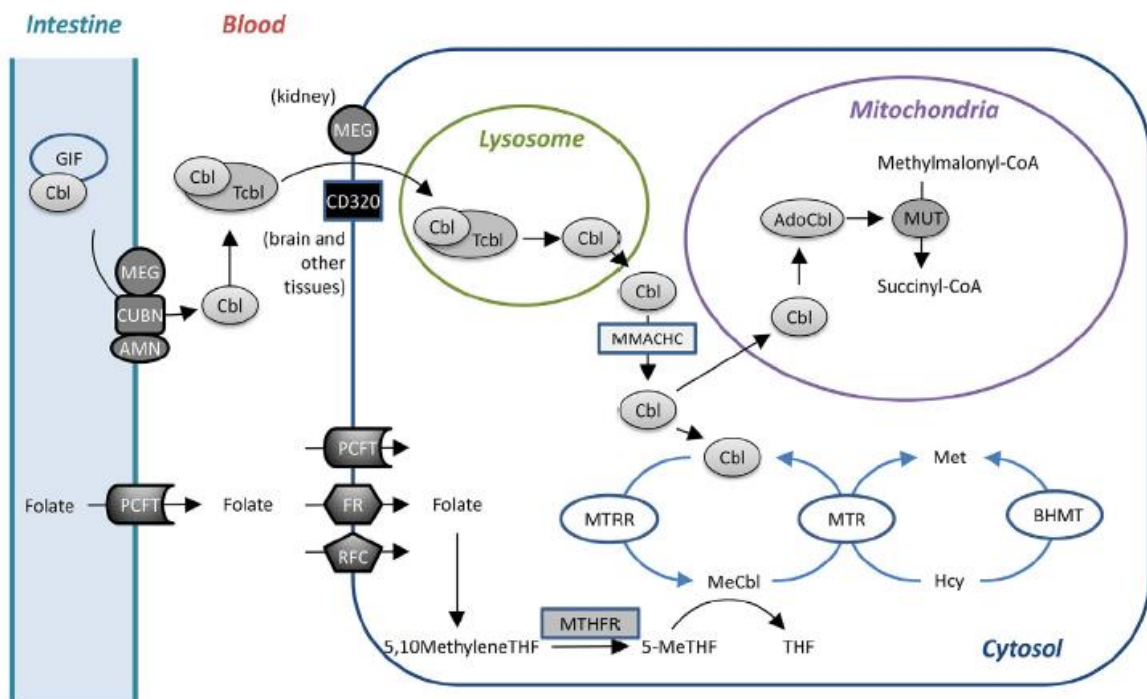


Figure 6: Absorption, transport et métabolisme de la vitamine B12 et des folates (Peng et al., 2016).

1.2.3 Rôle de la vitamine B12

La vitamine B12 peut être convertie en deux dérivés biologiquement actifs, AdoCbl et MeCbl. Une fois la cobalamine libérée de la TCII, elle est délivrée à la cobalamine adénosyltransférase dans la mitochondrie (Yamanishi et al., 2005) ou à la méthionine synthase dans le cytoplasme (Cr, 1995). Au niveau mitochondrial, la cobalamine adénosyltransférase en conjonction avec une cobalamine réductase non identifiée à l'heure actuelle, catalyse la réduction de la cobalamine en AdoCbl. Cette dernière, étant un coenzyme de la méthylmalonyl-CoA mutase, intervient dans la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA (Kräutler, 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 (Grützner et al., 2013) .

Au niveau cytoplasmique, grâce à la méthionine synthase (MS), le groupement méthyle du N5-méthyltétrahydrofolate (5-MeTHF) est transféré à la Cbl pour donner la MeCbl et le tétrahydrofolate (THF). Ensuite, la MeCbl transfère son groupement méthyle à l'homocystéine pour former la méthionine. La carence en vitamine B12 entraîne une accumulation du 5-MeTHF ce qui induit une diminution du THF et donc une réduction de la synthèse de thymidylate nécessaire à la synthèse d'ADN.

La cobalamine intracellulaire sert de coenzyme dans 2 processus métaboliques importantes situées dans des compartiments cellulaires distincts : la méthylcobalamine pour l'enzyme méthionine synthase dans le cytoplasme, et l'adénosylcobalamine pour l'enzyme méthylmalonyl-CoA-mutase dans la mitochondrie.

Dans la mitochondrie, l'adénosylcobalamine sert de coenzyme à la méthylmalonyl-CoA-mutase, responsable de la conversion l'acide méthylmalonique en acide succinique, qui entrera dans le cycle de Krebs. Dans le cas d'une carence en vitamine B12, les concentrations sériques et urinaires en acide méthylmalonique sont augmentées ce qui entraîne des complications neurologiques.

Dans le cytoplasme, la méthionine synthase transfère le groupement méthyle du N5-méthylTHF sur la Cbl pour donner la méthyl-Cbl, puis transfère ce groupement méthyle sur l'homocystéine pour former la méthionine. Lors d'une carence en vitamine B12, le N5-méthylTHF s'accumule et le THF

diminue, ce qui provoque une réduction de la synthèse de thymidylate nécessaire à la fabrication de l'ADN.

2. La reméthylation de l'homocystéine par la méthionine synthase

2.1 Le cycle des folates

Ce cycle (Figure 7) est étroitement lié au cycle de la méthionine, avec le 5-méthylTHF fonctionnant comme donneur de méthyles pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine, qui intervient dans les réactions de méthylation cellulaire (Bertolo and McBreaity, 2013; Blom et al., 2006). Suite au transport dans les cellules, les folates sont polyglutamylés par la folypolyglutamate synthase (FGPS) pour donner le dihydrofolate (DHF) qui sera converti par la dihydrofolate réductase (DHFR) en tétrahydrofolate. Le tétrahydrofolate résultant est directement converti en 5,10-méthylèneTHF sous l'action de la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT), enzyme B6-dépendante utilisant la sérine comme donneur de carbone, et le convertissant en glycine. Le 5,10-méthylèneTHF est réduit en 5-MeTHF sous l'action de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), enzyme vitamine B2-dépendante. La MTHFR est ainsi une enzyme clé et d'une grande importance pour la régulation du 5-MeTHF disponible pour la reméthylation de l'Hcy.

2.2 Le cycle de l'homocystéine/ Méthionine

La méthionine est un acide- α -aminé essentiel possédant une fonction thioéther (-SCH₃). Elle est essentielle pour les réactions de synthèse protéique mais aussi celles de méthylation cellulaire. En effet, elle est capable de transférer le groupement méthyle qui est lié à l'atome de soufre et ce transfert nécessite l'utilisation d'une grande quantité d'énergie. Ainsi, elle sera couplée à l'adénosine fournie par l'adénosine triphosphate (ATP) grâce à la méthionine adénosyltransférase (MAT) pour former la S-adénosylméthionine (SAM) (Figure 7).

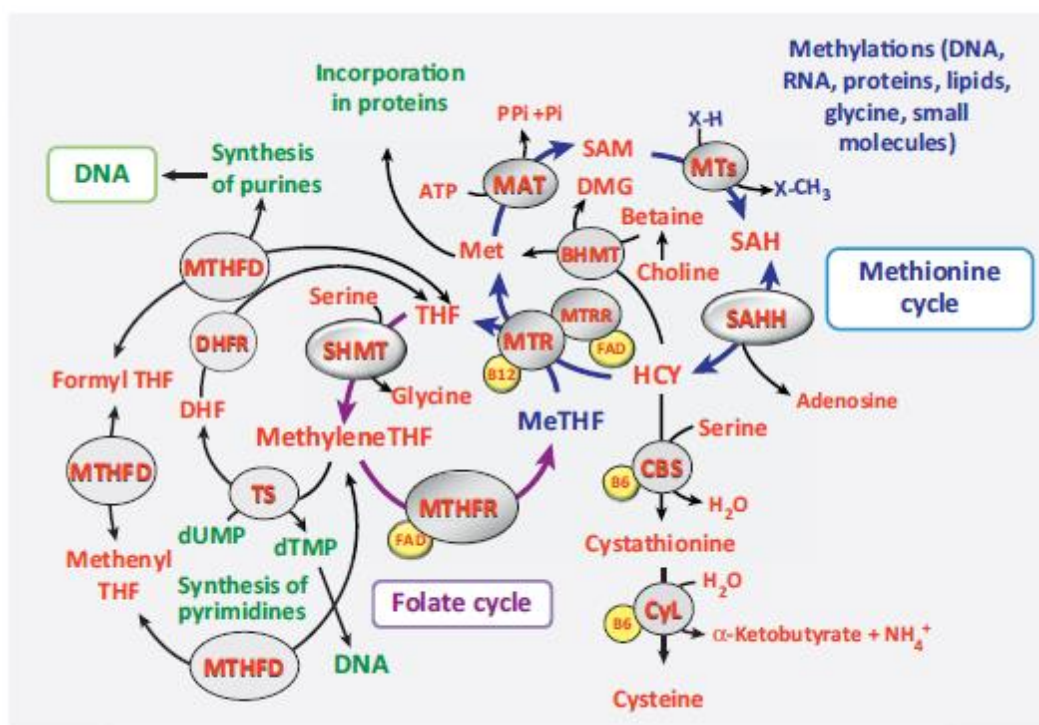


Figure 7: Métabolisme des monocarbone, cycle des folates et cycle de la méthionine (Guéant et al., 2013a).

2.3 La voie de transméthylation

La méthionine adénosyl transférase catalyse la biosynthèse de la S-adénosylméthionine à partir de la méthionine et en présence d'ATP (Trolin et al., 1994). Tous les organismes possèdent une ou deux des trois isoformes de la MAT : MATI/III exprimées uniquement par le foie adulte, et MATII présente dans presque tous les tissus (Chamberlin et al., 2000). La SAM joue le rôle de donneur de méthyle pour différentes molécules : ADN, ARN, protéines et neurotransmetteurs. En tout, plus de 130 méthyltransférases peuvent exister, et chacune de ces réactions produit la S-adénosylhomocystéine (SAH), qui à son tour, est un inhibiteur de la plupart de ces méthyltransférases. La SAH hydrolase (SAHH) hydrolyse la SAH pour donner de l'adénosine et de l'homocystéine selon une réaction réversible. Ainsi, étant donné que l'équilibre de SAHH favorise la formation de la SAH, l'Hcy et l'adénosine doivent être métabolisés ou transportés hors de la cellule pour prévenir l'accumulation de la SAH et de l'homocystéine.

2.4 La voie de transsulfuration

Dans la voie de transsulfuration, l'Hcy est irréversiblement dégradée en cystéine. Suite aux perturbations des cycles des monocarbone (méthionine et folates), le recyclage de l'homocystéine n'est plus correctement assuré et celle-ci est exportée dans le sang où elle aura tendance à s'accumuler, d'où le rôle important de la voie de transsulfuration pour sa dégradation.

La voie de transsulfuration est assurée par l'action de deux enzymes vitamine B6-dépendantes : la cystathionine β -synthase (CBS) et la cystathionine γ -lyase (CTH ou CYL). La CBS catalyse la réaction de condensation de la sérine et de l'homocystéine pour former la cystathionine. Par la suite la CTH catalyse l'hydrolyse de la cystathionine en cystéine et α -cétobutyrate. La CBS humaine est exprimée dans le foie, les reins, le muscle, le cerveau et les ovaires et aussi durant l'embryogenèse précoce dans les systèmes neural et cardiaque (Quéré et al., 1999).

Contrairement aux voies métaboliques déjà citées, la voie de transsulfuration est irréversible, ce qui explique le fait que la cystéine ne peut pas intervenir en tant que précurseur pour la synthèse de méthionine. Par contre, et outre son rôle dans la synthèse des protéines, la cystéine est un précurseur du glutathion, antioxydant essentiel pour la détoxification de plusieurs xénobiotiques.

2.5 La voie de reméthylation

La reméthylation de l'homocystéine en méthionine se fait selon deux réactions enzymatiques distinctes. La réaction principale est catalysée par la méthionine synthase (MS ou MTR) et fait aussi intervenir la 5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR), liant ainsi le cycle des folates au métabolisme de l'homocystéine. La MTR est une enzyme cobalamine-dépendante (Gueant et al., 2013a), ubiquitaire chez les mammifères et dont l'expression varie selon les tissus. Elle requiert pour son activité la cobalamine (Cbl) comme cofacteur, et le complexe résultant, Cbl(I)MTR, va lier un groupement méthyle provenant du 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-MeTHF) pour former la méthylcbl(III)MTR. Ainsi, la méthylcobalamine (MeCbl), forme active de la vitamine B12, assure le transfert d'un groupement méthyle vers l'homocystéine, permettant la formation de la méthionine et régénérant la Cbl(I)MTR pour accepter à nouveau un groupement méthyle (Oltean and Banerjee, 2005).

En conclusion, la réaction catalysée par la MTR se fait par trois réactions distinctes de transfert de méthyle et sert ainsi pour trois fonctions physiologiques importantes : 1- la régénération du

cofacteur tétrahydrofolate (THF), 2- la synthèse de la méthionine, et 3- l'élimination de l'homocystéine cellulaire. Ces réactions se déroulent chacune dans un domaine différent de liaison à la MTR formé de quatre modules fonctionnels : 1- module de liaison et d'activation du 5-méthylTHF, 2- module C-terminal de liaison à la SAM, requis pour la réactivation réductrice du cofacteur cobalamine, 3- module N-terminal de liaison à l'homocystéine, 4- module liant la cobalamine (Blom and Smulders, 2011; Obeid, 2013).

La deuxième réaction a lieu essentiellement dans le foie et dans les reins, et requiert la bétaine comme donneur de méthyle (Sunden et al., 1997). Celle-ci ne dépend pas de la vitamine B12 et fait intervenir une enzyme hépatique, la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT).

2.6 La méthionine synthase

La méthionine synthase est l'une des 2 enzymes chez les mammifères qui ont la vitamine B12 ou cobalamine (Cbl) pour cofacteur ; la deuxième enzyme étant la méthylmalonylcoenzyme A mutase (mut). La MS est une enzyme cytoplasmique et la mut une enzyme mitochondriale.

La MS catalyse la réaction de transméthylation dans laquelle un méthyle du 5-méthylTHF est transféré à l'homocystéine générant ainsi la méthionine et le tétrahydrofolate. Chez les mammifères, cette réaction dépend de la cobalamine pour le maintien de son activité. Les produits de cette réaction entrent dans 2 cycles métaboliques très importants : le cycle des folates et celui de la méthionine.

Le gène humain de la méthionine synthase (MTR) se situe sur le chromosome 1 en position 1q43 (Li et al., 1996) et correspond au transcrit MTR-001. La région codante du gène MTR est composée de 33 exons et de 32 introns. En général, les exons suivent la règle d'épissage GTAG (Breathnach and Chambon, 1981). Dans la MS tous les exons suivent cette règle d'épissage à l'exception de l'exon 21 qui est épissé en GCAG. Le premier ATG (+1) est dans l'exon 1. Le gène MTR code pour une protéine de 1265 acides aminés de longueur. Avec un cadre de lecture de 3798 pb, la protéine a un poids moléculaire prédit à 140 kDa. Les régions non codantes sont très grandes dans le transcrit MTR-001.

La plupart des connaissances structurales et fonctionnelles concernant la méthionine synthase découlent de la recherche sur la MetH de E.coli (Drennan et al., 1994) et de l'homme (Ludwig and

Matthews, 1997). La méthionine synthase est une enzyme composée de 5 domaines modulaires (Figure 8) (Dixon et al., 1996; Evans et al., 2004). De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, le produit du gène MetH est constitué des deux domaines de liaison pour l'homocystéine et le 5-méthylTHF, le cap, et des deux domaines de liaisons pour la cobalamine et la SAM (Koutmos et al., 2009).

Les deux premiers domaines de liaison, pour l'homocystéine et le méthyltétrahydrofolate, se trouvent sur le fragment N-terminal de 70 kDa. Le domaine de liaison de l'homocystéine comporte les acides aminés 2 à 353 et celui de la 5-méthylTHF est composé des résidus 354-649 (Goulding et al., 1997). L'analyse cristallographique de la méthionine synthase de la bactérie *Thermotoga maritima* ont montré que ces deux domaines de liaisons sont constitués de deux barils ($\beta\alpha$)₈, intimement associés l'un à l'autre même durant le processus catalytique. Les sites actifs des domaines de liaison de l'Hcy et de la 5-méthylTHF sont situés sur l'extrémité de la partie C-terminale des brins des deux barils et séparés d'une distance égale à 50 Å (Angström) (Evans et al., 2004).

Le troisième site de liaison avec la cobalamine est situé sur un fragment de 28 kDa et est constitué des résidus 650-896 (Banerjee et al., 1989 ; Drennan et al., 1994). Ce module de liaison est formé de deux domaines. Le premier est le domaine Cap, formé de quatre hélices situées sur la partie supérieure (β) de la cobalamine. Le deuxième domaine est le domaine de Cob ou de Rossmann α/β et interagit avec la face intérieure du groupe prosthétique de l'enzyme. Pour compléter le processus catalytique, ce domaine doit faire des allers-retours entre les sites actifs des domaines de liaisons de l'Hcy et de la 5-méthylTHF (Evans et al., 2004).

Le quatrième domaine de la MS se trouve sur l'extrémité C-terminale de 38 kDa et comporte les acides aminés 897-1227 (Drennan et al., 1994). Ce domaine est essentiel à la réactivation de la forme oxydée de la cobalamine (cob(II)alamine) de la MS ((Goulding et al., 1997) .

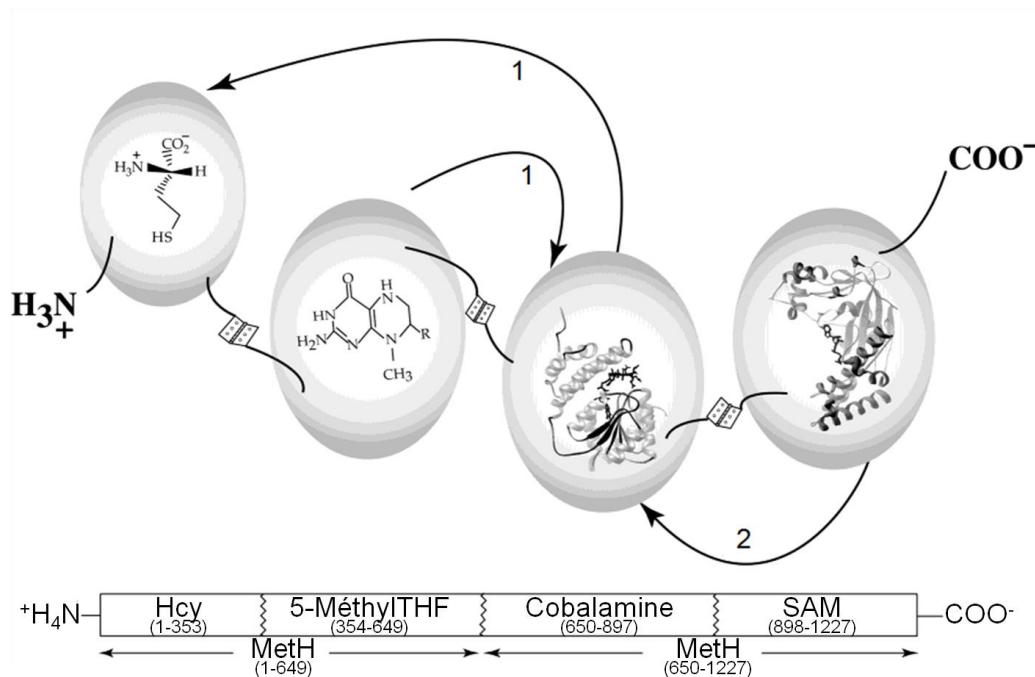


Figure 8 : Schéma structural de la méthionine synthase (Bandarian and Matthews, 2001).

1 : demi-réaction catalytique, 2 : méthylation réductrice. Les quatre domaines sont liés entre eux par des boucles flexibles illustrées par des charnières. Ces boucles permettent aux trois domaines de liaison de chaque substrat d'interagir avec le domaine de liaison de la cobalamine pour transférer un méthyle à la cobalamine. La région et la séquence d'acides aminés de chaque domaine sont illustrées sous le schéma.

La MS est une enzyme ubiquitaire chez les mammifères avec une expression variable entre les tissus. La MS est principalement exprimée dans le cœur, le pancréas, les muscles squelettiques, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires et l'intestin grêle. Elle est moyennement exprimée dans la rate, le placenta, le cerveau et faiblement dans les poumons, le foie, les reins et le colon (Chen et al., 1997). Il est important de noter que l'ARNm de la MS possède au niveau de son extrémité 5'UTR une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site, site d'entrée interne du ribosome). Au niveau de cette séquence, la vitamine B12 peut se fixer et diminuer la traduction de la MS (Oltean and Banerjee, 2005). L'activité de la MS dépend également d'éléments agissant en cis sur son ARNm provenant du cycle de l'homocystéine qui sont la méthionine et la SAM. La SAM peut inhiber la MTHFR et activer la CBS. Ainsi, la SAM empêche la synthèse du 5-Me-THF et favorise la réaction catalysée par la CBS. La synthèse de SAM est fonction de la teneur intracellulaire en méthionine. Lorsque l'apport en méthionine est élevé, la MAT catalyse rapidement la transformation de méthionine en SAM qui va bloquer MTHFR, inhiber la synthèse du 5-Me-THF et activer la CBS. L'activité de la MS est faible dans cette situation. En cas d'apport réduit en méthionine, la concentration intracellulaire de SAM est

insuffisante pour inhiber la MTHFR. De ce fait la concentration en 5-Me-THF augmente. La voie de la reméthylation est donc favorisée via la MS, d'autant plus que la concentration en SAM est trop basse pour stimuler la CBS (Nijhout et al., 2006). Le protoxyde d'azote est un autre élément régulateur de l'activité de la méthionine synthase. Il inhibe son activité par oxydation de l'atome de Cobalt de la vitamine B12.

Partie 2 : Les effets cellulaires et moléculaires de dérégulations nutritionnelles ou génétiques de la reméthylation de l'homocystéine

1. Effets cellulaires et moléculaires de la carence nutritionnelle en donneurs de méthyle

1.1 Carence en folates

Comme toute les carences vitaminiques, la carence en vitamine B9 s'observe principalement dans les pays en voie de développement, où elle est associée à une mal- ou dé-nutrition, mais c'est l'une des carences que l'on rencontre le plus fréquemment dans les pays développés : 10 à 20% de la population seraient concernés. Les causes principales de déficience en vitamine B9 résulte de la malnutrition, de la cuisson prolongée des aliments, des régimes amaigrissants, et de l'utilisation de certains médicaments dits « anti-foliques », notamment la pilule contraceptive et les anti-inflammatoires. Pourtant, l'une des causes principales reste surtout un déséquilibre entre les apports et les besoins (accrus chez les femmes enceintes et allaitantes, les nouveau-nés ou les personnes âgées), ainsi que dans certains cas de pathologies digestives (maladie de Crohn, gastrite atrophique..), d'anémies et de proliférations cellulaires malignes... La carence en folates a été surtout impliquée dans la survenue de certains troubles du développement , principalement les défauts de fermeture du tube neural (NTD) ou spina bifida (Smithells et al., 1976). C'est pour cette raison que certains pays occidentaux ont eu recours à un système de supplémentation des farines et céréales alimentaires en acide folique. De plus, une supplémentation périconceptionnelle systématique des femmes enceintes en acide folique a été mise en place (De Regil et al., 2010) pendant le premier trimestre de la grossesse, réduisant considérablement le risque de malformations congénitales (malformations cranio-faciales, cardiaques, et les anomalies type NTD (Czeizel and Dudas, 1992; Shaw et al., 1994; Werler et al., 1993). Ceci s'avère très important au regard du rôle essentiel des folates dans le processus de programmation foetale (Gueant et al., 2013b). En effet les études montrent qu'une susceptibilité accrue aux maladies est en partie déterminée lors de la programmation foetale par des liens entre la nutrition, dont la vitamine B9, et les mécanismes épigénétiques et épigénomiques (Faulk and Dolinoy, 2011; Gabory et al., 2011).

1.2 Carence en vitamine B12

Comme pour les folates, la carence en vitamine B12 est rencontrée dans les pays en voie de développement, principalement par défauts d'apports adéquats en cette vitamine, surtout présente dans les aliments d'origine animale (Stabler and Allen, 2004), mais aussi, plus rarement dans les pays industriels. Dans ce dernier cas, la carence peut survenir en raison de malnutrition surtout chez les sujets végétariens ou suite à un alcoolisme chronique, mais surtout en raison de certaines maladies digestives et de phénomènes de malabsorption, comme dans le cas des déficits congénitaux liés à un déficit en TCII ou en récepteurs du FI (Cylwik et al., 2011).

En plus des anémies et du dysfonctionnement gastro-intestinal, les signes cliniques d'une carence en B12 se manifestent par des troubles neurologiques tels que l'ataxie, la sclérose combinée de la moelle et l'apparition des foyers de démyélinisation au niveau de la moelle épinière et du cerveau (de Lau et al., 2009; Kalita et al., 2013; Savage and Lindenbaum, 1995). Bien que les carences en vitamine B9 et B12 soient les mieux caractérisées, l'interaction entre les différentes vitamines appartenant à la famille des vitamines B est à considérer pour mieux comprendre la survenue de certaines pathologies. La déficience en vitamine B6 a été liée à des défauts d'absorption de la vitamine B12 et à une diminution de son stockage dans le foie (Ranke et al., 1960; Yeh and Chow, 1959). La carence en riboflavine (Vitamine B2) entraîne à son tour une déficience en vitamine B6 et est associée à une hyperhomocystéinémie (Jacques et al., 2001). De plus, la choline, la bétaine et les folates sont des sources d'unités monocarbonées interchangeable entre elles, ceci s'expliquant surtout par le fait que lors d'une déficience en folates, les groupements méthyles apportés par la bétaine sont épuisés pour la reméthylation de l'Hcy, augmentant ainsi les besoins en choline (Holm et al., 2007; Kim et al., 1994; Ueland, 2011).

2. Effets cellulaires et moléculaires de la dérégulation de la reméthylation par invalidation génétique (Modèles génétiques)

Des modèles génétiques du métabolisme cellulaire des folates et de la vitamine B12 ont été développés chez la souris. Les principales enzymes de ce métabolisme ont été invalidées par plusieurs laboratoires.

2.1 Knockout de la 5,10-Méthylène tetrahydrofolate reductase (Mthfr, Gene ID: Homo sapiens 4524, Mus musculus 17769)

L'invalidation totale de Mthfr a été réalisée en ciblant l'exon 3 (Chen et al., 2001). Les embryons KO homozygotes sont viables malgré que le transcrit et l'activité enzymatique soient indétectables. La létalité atteint 23% dans les 5 premières semaines de vie postnatale, mais après cette période sensible, la viabilité des survivants est normale. Les souris présentent une déplétion de 5-méthyl-THF dans le foie et le cerveau, une hyperhomocystéinémie ainsi qu'un ratio SAM/SAH diminué. Ce ratio étant considéré comme un indicateur du pouvoir de méthylation cellulaire, la méthylation globale de l'ADN a été mesurée et elle était significativement diminuée chez les mutants. Un retard développemental accompagné d'une réduction de la taille du cervelet a été rapporté. Les queues des embryons sont tordues, ce qui est un marqueur d'anomalies de la fermeture du tube neural. Les individus KO présentent par ailleurs des dépôts lipidiques dans l'aorte (Jakubowski et al., 2009).

Ce modèle génétique a été utilisé pour évaluer l'impact neurologique de la déficience génétique maternelle en Mthfr sur la progéniture sauvage âgée de 3 semaines (Jadavji et al., 2015). Les mères hétérozygotes Mthfr+/- ont une hyperhomocystéinémie. Leur descendance de génotype sauvage, malgré une homocystéinémie normale, est atteinte d'un déficit de la mémoire à court terme et présente une augmentation de l'apoptose et de la prolifération dans l'hippocampe.

Le KO de Mthfr est un bon modèle en pathologie humaine, car la diminution de 35-40% de l'activité enzymatique retrouvée chez les KO hétérozygotes est similaire à celle observée chez les patients porteurs du polymorphisme le plus répandu de Mthfr, le polymorphisme 677C > T. De plus, ce modèle a permis de mimer les effets in utero de la déficience génétique maternelle de Mthfr sur la descendance de génotype sauvage. En revanche, les souris KO homozygotes ne présentent pas toutes les caractéristiques de la carence en folates chez l'Homme.

2.2 Knock-down de la Methionine synthase reductase (Mtrr, Gene ID: Homo sapiens 4552, Mus musculus 210009)

Dans de nombreuses populations, le polymorphisme de Mtrr est présent à l'état homozygote chez 25% des individus et est lié à une augmentation du niveau d'homocystéine et du risque d'anomalie de fermeture du tube neural (Guéant-Rodriguez et al., 2003). Tout comme Mtr, Mtrr est un gène essentiel à l'embryogenèse précoce, ce qui empêche l'analyse de leur délétion à des étapes plus

tardives de l'embryogenèse. Pour surmonter cet obstacle, un allèle hypomorphe a été généré par le système Genetrap. L'insertion de la cassette Genetrap entre les exons 9 et 10 de Mtrr résulte en une activité réduite de Mtrr dans la plupart des tissus. Les souris sont viables et fertiles. La diminution de l'ARNm de Mtrr est variable selon les tissus, indiquant un effet tissu-spécifique de saut d'exon. L'activité de MTR chute significativement, Mtrr étant absolument nécessaire à l'activité normale de MTR chez les mammifères. Les modèles d'inactivation de Mtrr sont connus pour induire un piège à folates sous la forme de 5-méthyl THF, empêchant la régénération des autres formes de folates par le cycle des folates, et donc mimant une carence en folates. Ces formes étant requises pour la synthèse des précurseurs de l'ADN, la synthèse d'ADN peut être bloquée. Dans le plasma, l'homocystéine augmente tandis que la méthionine et le 5-méthyl-THF diminuent. Le taux de SAM reste stable dans certains tissus et augmente dans d'autres, et le ratio SAM/SAH diminue seulement dans le cœur mais pas dans les autres tissus, comme dans les modèles de carence en vitamine B12. Puisque le taux de folates influence fortement le développement embryonnaire, le phénotype des embryons mutants Mtrr a été étudié (Deng et al., 2008). La déficience maternelle en Mtrr est corrélée à une augmentation de la fréquence de résorption embryonnaire. Un retard de développement et des défauts cardiaques sont associés à la déficience en Mtrr, qu'elle soit d'origine maternelle ou embryonnaire, les embryons mutants provenant de mères mutantes étant les plus sévèrement affectés. Mtrr est fortement exprimé à E9.5 dans le placenta, qui est d'origine à la fois maternelle et fœtale. Les génotypes maternel et embryonnaire influencent le poids du placenta, et le poids de l'embryon est corrélé à celui du placenta.

C'est dans le cœur que la diminution de l'activité de Mtrr est la plus marquée. Les défauts cardiaques incluent des anomalies des parois ventriculaires et sont plus prononcés que ceux observés dans le modèle KO Mthfr. Ces affections cardiaques n'ont pas été retrouvées chez les patients ayant un polymorphisme de Mtrr, ces données incitent donc à faire des investigations plus approfondies dans les populations porteuses du polymorphisme de Mtrr le plus répandu mais également des polymorphismes plus rares.

Ce phénotype cardiaque a été récemment confirmé par une étude utilisant le même modèle génétique, cependant de manière étonnante, il a été corrélé au génotype des grands-parents maternels, pas au génotype de la mère (Padmanabhan et al., 2013). Le génotype de chacun des deux grands-parents maternels détermine le phénotype des embryons. Les anomalies trouvées chez les

embryons concernent un retard de croissance, diverses malformations du cœur et du tube neural ainsi que des défauts placentaires. Ces anomalies sont retrouvées chez les embryons indépendamment de leur génotype (wild-type, hétérozygote ou homozygote muté), et sont corrélées uniquement au génotype des deux grands-parents maternels (Padmanabhan et al., 2013). Les placentas des embryons sauvages sont épigénétiquement altérés, d'après les résultats d'analyse de la méthylation de l'ADN de loci soumis à empreinte épigénétique. Ceci pourrait être dû à la déficience en donneurs de méthyle causée par le knock-down de Mtrr. Ces placentas présentent une hyperméthylation sur certains loci, dans le contexte d'une hypométhylation globale de l'ADN. De plus, les défauts embryonnaires persistent pendant au moins 4 générations après l'ancêtre mutant initial, y compris après transfert d'embryon. Les résultats suggèrent la possibilité que les polymorphismes des grands-parents continuent d'exercer leurs effets délétères même sur la santé de leurs petits-enfants.

Ce modèle génétique est donc un modèle de choix pour l'étude des mécanismes de transmission transgénérationnelle d'anomalies développementales. Les résultats montrent un impact épigénétique important de la voie MTR/MTRR de reméthylation de l'homocystéine sur le développement embryonnaire.

2.3 Knockout de la Betaine-homocystéine methyltransferase (Bhmt, Gene ID: Homo sapiens 635, Mus musculus 12116)

La BHMT catalyse une réaction alternative de production de la méthionine, en transférant le groupe méthyle de la bétaine à l'homocystéine. Un polymorphisme de Bhmt entraîne des anomalies de fermeture du tube neural (Boyles et al., 2006) et un risque accru de maladie cardiovasculaire (Weisberg et al., 2003). Chez l'Homme, la BHMT est fortement exprimée dans le foie et le rein et faiblement exprimée dans le cerveau, alors que chez les rongeurs, seul le foie présente une forte activité de la BHMT, qui est responsable du maintien d'un niveau correct de SAM en cas de carence en folates.

Le KO complet de la Bhmt a été réalisé par la délétion des exons 6 et 7 codant les domaines de liaison au zinc de la protéine, aboutissant à la perte complète de la protéine BHMT et de son activité. Consécutivement, les concentrations de Hcy, SAM, SAH et le ratio SAM/SAH sont altérés (Teng et al.,

2011). Les souris KO Bhmt sont viables et fertiles, mais développent une stéatose hépatique à 5 semaines, qui conduit à des tumeurs hépatiques vers l'âge d'un an.

La lignée KO Bhmt est un modèle utile pour l'étude de la stéatose et du carcinome hépatocellulaire, mais ne reproduit pas les anomalies de la fermeture du tube neural et les maladies cardiovasculaires liés au polymorphisme de la Bhmt.

2.4 Knockout de la Methylmalonyl-CoA mutase (Mut, Gene ID: Homo sapiens4594, Mus musculus 17850)

La Méthylmalonyl-CoA mutase est une enzyme mitochondriale qui catalyse la conversion du L-méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA, qui entre dans le cycle de l'acide citrique. Chez l'Homme, des défauts de Mut provoquent l'acidurie méthylmalonique, une maladie héréditaire autosomale récessive. Les souris KO Mut homozygotes meurent peu après la naissance (100% de létalité dans les premières 24h) (Peters et al., 2003). La quantité d'acide méthylmalonique présent dans l'urine est fortement augmentée. Le KO de Mut est un bon modèle pour l'acidurie méthylmalonique humaine, puisque les mutants homozygotes présentent les principales caractéristiques métaboliques et biochimiques de cette pathologie. C'est le premier modèle murin qui a été décrit pour cette maladie, et il a été utilisé pour expliquer la dysfonction mitochondriale (Chandler et al., 2009) ainsi que pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques (Carrillo-Carrasco et al., 2010; Chandler and Venditti, 2008). L'une de ces stratégies consiste en une thérapie génique médiée par les AAV pour restaurer l'expression de Mut, permettant ainsi d'éviter la létalité néonatale des souris Mut-/.

2.5 Knockout de la Methylmalonic aciduria cblC type with homocystinuria (Mmachc, Gene ID: Homo sapiens 25974, Mus musculus 67096)

La protéine MMACHC est un accepteur de la cobalamine. Les patients porteurs de mutations autosomales récessives de Mmachc présentent une augmentation des taux sanguins et urinaires d'homocystéine et d'acide méthylmalonique. Ils sont affectés de troubles neurologiques, hématologiques et cardiaques. Ce syndrome est désigné « CblC » (Lerner-Ellis et al., 2006). Mmachc a été invalidé par la technique de gene trap (Moreno-Garcia et al., 2014). Les mutants homozygotes meurent au moment de l'implantation embryonnaire, entre E3.5 et E5.5. Chez les mutants hétérozygotes, la diminution de MMACHC de 50% résulte en une hyperhomocystéinémie et une acidémie méthylmalonique chez les adultes. Cependant, les adultes ne développent pas les

caractéristiques phénotypiques retrouvées chez les patients CblC. Ainsi, cette lignée n'est pas un bon modèle pour le syndrome CblC.

Pour conclure, depuis 15 ans les modèles génétiques ont beaucoup contribué à la compréhension de la façon dont les enzymes du métabolisme des donneurs de méthyle fonctionnent ensemble, et à l'évaluation de l'importance de chaque étape de ce métabolisme. Ces modèles murins permettent de modéliser une partie du phénotype observé chez les patients, mais pas systématiquement de manière parfaite, par exemple en ce qui concerne la létalité embryonnaire. Les modèles KO décrits ci-dessus présentent généralement un phénotype plus sévère que les mutations ponctuelles retrouvées chez les patients, et souvent une létalité in utero qui n'est pas retrouvée chez l'Homme. Les souris génétiquement modifiées ont été particulièrement utiles pour élucider l'importance au cours du développement embryonnaire de chaque enzyme régulant le métabolisme des donneurs de méthyle.

En plus des systèmes génétiques classiques décrits ci-dessus, un nouveau type de modification génique a été développé récemment, le système CRISPR/Cas9, qui permet l'édition du génome ainsi que l'inactivation génique ou l'insertion de transgène (Jinek et al., 2012). Cet outil génétique révolutionnaire pourrait être utilisé pour modifier n'importe quel gène in vivo, et pourrait donc être appliqué aux gènes du métabolisme des donneurs de méthyl.

Tableau 1 : Résumé des résultats obtenus avec les modèles murins d'inactivation génétique liés à une dérégulation de la reméthylation.

Function	Targeted gene	Tissue of expression in wild type	Type of invalidation	Mouse phenotype	References	Related human pathology
Cellular transport	TCblR/CD320	Ubiquitous	Gene trap	Decreased cerebral B12, SAM/SAH, global DNA methylation. Increased cerebral Hcy and MMA	Lai et al 2013, Fernandez-Roig 2012	None to date
Cellular metabolism	Mthfr	Ubiquitous	Full KO	Perinatal lethal, reduced cerebellar size, lipid deposition in aorta, short-term memory deficits	Chen et al 2001, Jarubowski et al 2015, Jadavji et al 2015	Neurological disorders, cardiovascular disease
	Mtrr	Ubiquitous	Gene trap knock-down	Developmental delay, cardiac defects, NTD at E10.5	Elmore et al 2007, Deng et al 2008, Padmanabhan et al 2013	Developmental disorders inherited transgenerationally
	Bhmt	Liver	Full KO	Hepatic steatosis, hepatocellular carcinoma at 1 year	Teng et al 2011	Hepatic steatosis (NAFLD) and cancer

Partie 3 : Conséquences pathologiques des carences en vitamine B12 et folates et des maladies héréditaires du métabolisme de la vitamine B12 et de la reméthylation de l'homocystéine.

1. Maladies cardiovasculaires

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

Une étude portant sur la supplémentation en vitamine B12 suggère qu'à des doses élevées de B12, le risque d'avoir des perturbations vasculaires est réduit (Spence et al, 2005). De plus, de fortes doses de vitamine B12 provoquent une réduction des maladies cardiovasculaires chez les patients subissant une angioplastie coronarienne (Schnyder et al, 2002; Schnyder et al, 2001).

La combinaison entre vitamines B12 et B9 est associée à une amélioration du flux sanguin coronaire des patients ayant une coronaropathie (Bleie et al, 2011) ainsi qu'une hypertrophie du myocarde liée à une diminution de la déacétylase SIRT1 (Garcia et al, 2011). Des recherches supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre les avantages de la supplémentation en vitamine B12 sur les maladies cardiovasculaires, en particulier chez les personnes atteintes d'une maladie vasculaire préexistante.

2. Stéatose hépatique et stéatohépatite, relation avec le métabolisme des monocarbones.

C'est majoritairement dans le foie qu'a lieu le métabolisme de l'Hcy (80%). Ceci peut être expliqué par le fait que plusieurs enzymes clés du métabolisme de l'Hcy sont essentiellement hépatiques. En effet, la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT) n'est exprimée qu'au niveau du foie et du

rein (Sunden et al, 1997) et MAT1, une méthionine adénosyltransférase (MAT), est une enzyme exclusivement hépatocytaire (Mato et al, 1997; Garcia-Tevijano et al, 2001).

La maladie stéatosique hépatique non alcoolique (NAFLD) se réfère à un large spectre de lésions hépatiques qui vont de la stéatose simple ou accumulation de triglycérides intracellulaires, à l'inflammation et la fibrose (stéato-hépatite) et la cirrhose. La stéato hépatite non alcoolique (NASH) est la cause la plus importante de maladie hépatique chronique et est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique associé au diabète de type 2 (Fracanzani et al, 2008). Les mécanismes impliqués dans l'accumulation de triglycérides dans le foie et les lésions hépatocellulaires ultérieures sont multifactoriels.

Les anomalies du métabolisme des monocarbones responsables d'hyperhomocystéinémie sont associée, au minimum, à une stéatose hépatique de type microvésiculaire. De plus, en cas de cirrhose, la synthèse de SAM est profondément diminuée (Halsted et al, 1996). Les travaux dont le but est de définir le lien entre la stéatose et l'Hcy sont peu nombreux chez l'Homme et portent, en général, uniquement sur des analyses de sous-groupes. Des patients ayant une accumulation hépatique des acides gras présentent une hyperhomocystéinémie (De Carvalho et al, 2013; Roblin et al, 2007b). Des patients ayant une stéatose hépatique présentent une hyperhomocystéinémie (de Carvalho et al, 2013; Roblin et al, 2007b). De plus, la concentration en Hcy semble être plus élevée en cas de NASH qu'en cas de stéatose simple. Les résultats d'une autre étude ont montré une forte corrélation entre la concentration d'Hcy, le score de fibrose et le score nécrotico-inflammatoire (Gulsen et al, 2005).

La stéatose hépatique a été également prouvé chez des jeunes rongeurs issus d'une mère carencée en vitamine B12 et en folates (Pooya et al, 2012). Dans ce modèle, la stéatose hépatique due à une hypométhylation de PGC1- α , une diminution de sa capacité de se lier à ses partenaires et donc une altération de l'oxydation mitochondriale des acides gras (Pooya et al, 2012). La carence maternelle en donneurs de méthyles (Folates et vitamine B12) entraîne l'apparition d'une stéatose hépatique au niveau de la descendance et prédispose au syndrome métabolique (Pooya et al, 2012).

Les souris invalidées pour certaines enzymes régulant le métabolisme de l'Hcy ont aussi une stéatose hépatique sévère. Les souris invalidées en cystathionine β syntase (CBS) ont une stéatose hépatique sde type microvésiculaire (Van Aerts et al, 1995). Les souris déficientes en MAT 1 ont une stéatohépatite avec risque accru de carcinome hépatocellulaire (Martinez-Chantar et al, 2002).

L'alcoolisme chronique est depuis longtemps connu pour compromettre le métabolisme des vitamines et en particulier celles impliquées dans le métabolisme des monocarbone, notamment les folates et la vitamine B12 (Morgan et Levine, 1988; Bonjour et al, 1980). Cette altération du statut vitaminiq ue engendre une élévation du taux d'Hcy. L'accumulation intracellulaire d'Hcy est également associée au développement de différentes altérations hépatiques (stéatose, réactions inflammatoires, fibrose ou encore nécrose) chez les patients alcooliques chroniques (Tsukamoto et Lu, 2001). Chez l'animal, en cas d'alcoolisation aiguë, de nombreux travaux expérimentaux ont montré un stress du réticulum endoplasmique lié à une hyperhomocystéinémie (Roblin et al, 2007).

3. Maladies osseuses

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

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

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

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

4. Diabète

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

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

5. Maladies neurodégénératives

La démence et les troubles cognitifs sont des problèmes de santé publique chez les personnes âgées (Smith, 2008). La comparaison entre adultes âgés en bonne santé et ceux atteints de démence a permis d'établir une association entre homocystéine et / ou vitamines B avec les fonctions cognitives (Herrmann & Obeid, 2011).

Une étude épidémiologique estime qu'une réduction de 3 $\mu\text{mol/L}$ d'homocystéine réduit le risque de démence de 42,3 % à 22% (Wald et al, 2011). De plus, une supplémentation en vitamine B (0,8 mg d'acide folique, 0,5 mg de vitamine B12, 20 mg de vitamine B6) ralentit l'atrophie du cerveau et améliore la performance cognitive chez les patients présentant des troubles cognitifs légers (Smith et al, 2010).

5.1 Maladie d'Alzheimer

En 1984, Cees Van Tiggelen a suggéré que la carence en vitamine B12 peut être associée à la maladie d'Alzheimer. Cole and Prchal (Cole & Prchal, 1984) ont trouvé que la carence en vitamine B12 est fréquente chez les sujets atteints d'Alzheimer. En 1987, Karnaze and Caramel (Karnaze & Carmel, 1987) ont analysé le sérum de 17 patients ayant une démence dégénérative primaire et ils ont trouvé que 29% des patients avaient une diminution de la vitamine B12.

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

5.2 Epilepsie

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

5.3 Sclérose en plaques

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

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

5.4 Maladie de Parkinson

Les patients atteints de la maladie de Parkinson ont des niveaux élevés d'homocystéine (Allain et al, 1995; Kuhn et al, 1998) et de MMA (Levin et al, 2010; Toth et al, 2010). De plus, ces patients sont traités avec la L-dopa, dont le métabolisme nécessite la consommation accrue de SAM, via la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) (Miller et al, 1997), induisant donc une augmentation des niveaux d'homocystéine (Miller et al, 2003; Muller et al, 1999). Il est intéressant de noter que les patients parkinsoniens hyperhomocystéinémiques sont plus susceptibles d'être déprimés, et ne réussissent pas les tâches neuropsychométriques contrairement aux patients normohomocystéinémiques (O'Suilleabhain et al, 2004).

En 2009, Orozco-Barrios et al, ont montré qu'un plasmide codant pour une protéine, séquestrant la vitamine B12, transfecté au niveau de la substance noire des rats, induit un phénotype Parkinson-like ainsi qu'une réduction de la prolifération et une augmentation de la différenciation et de l'apoptose des cellules neuronales (Battaglia-Hsu et al, 2009). Enfin, une supplémentation en B12 réduit les niveaux d'homocystéine (Lamberti et al, 2005), ce qui peut avoir des implications thérapeutiques importantes, d'autant plus que ces patients ont un risque accru de développer des troubles cognitifs et une démence (Zoccolella et al, 2010).

5.5 Paralysie supranucléaire progressive/ sclérose latérale amyotrophique

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

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

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

6. Les maladies héréditaires du métabolisme de la vitamine B12 et de la reméthylation de l'homocystéine

Les erreurs innées de la synthèse du cofacteur cobalamine représentent un groupe hétérogène et important de maladies rares. Le métabolisme de la cobalamine intracellulaire implique plusieurs étapes entre la libération lysosomale de la cobalamine, la synthèse de l'adénosylcobalamine dans la mitochondrie et la synthèse de la méthylcobalamine dans le cytosol. À ce jour, neuf défauts de cette voie ont été définis in vitro avec l'utilisation de l'analyse de complémentation somatique. Les groupes de complémentation ainsi identifiés ont été désignés cblA, cblB, cblC, cblD, cblE, cblF, cblG, cblH, cblJ et mut (Figure 9) (Cooper et al., 1990; Suormala et al., 2004). Les gènes responsables sont connus, MMACHC (cblC), MMADHC (cblD et cblD variant), MTRR (cblE), LMBRD1 (cblF), MTR (cblG), et ABCD4 (cblJ) (Carrillo et al., 1993) (Figure 9). Les troubles cblC et cblF provoquent une homocystinurie et une acidurie méthylmalonique combinées; cblA, cblB, cblH, et mut causent une acidurie méthylmalonique isolée; cblE et cblG entraînent une homocystinurie isolée. Le défaut cblD est déroutant car certains patients ont combiné acidurie méthylmalonique et homocystinurie, certains ont seulement une homocystinurie isolée, et d'autres ont seulement une acidurie méthylmalonique (Coelho et al., 2008).

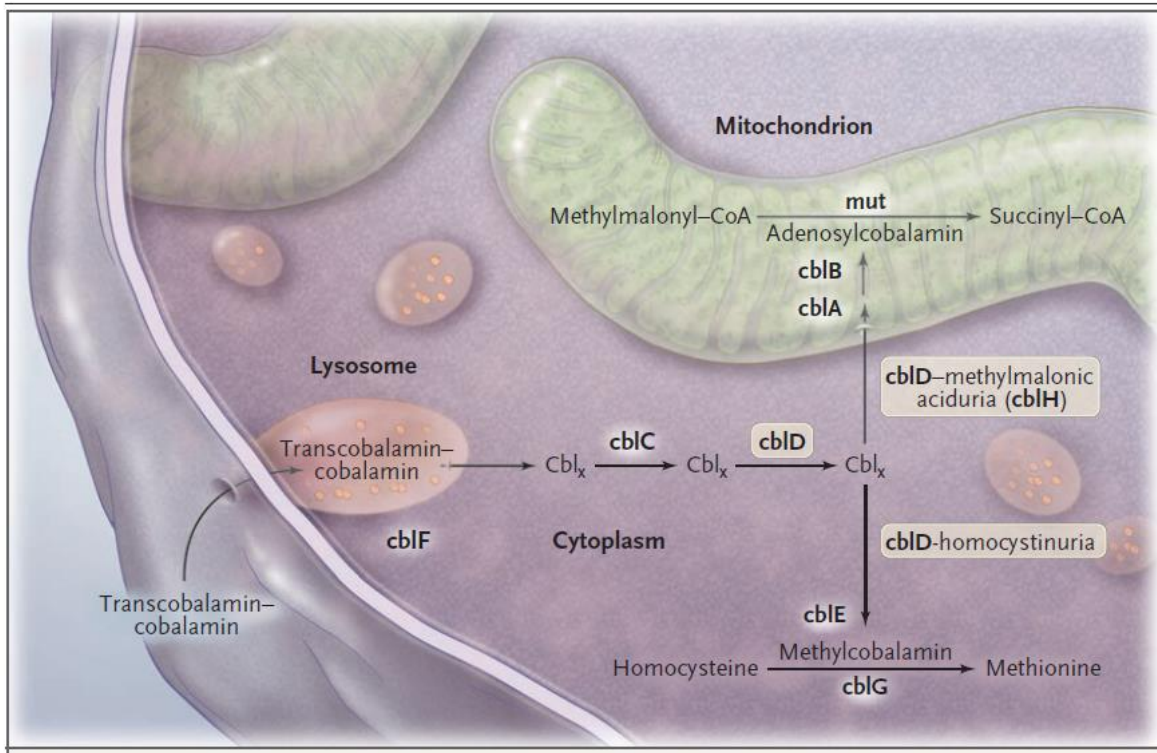


Figure 9: Métabolisme intracellulaire de la cobalamine et des erreurs innées correspondantes (cblA-H). (Coelho et al., 2008)

6.1 Le groupe de complémentation cblC

Le défaut cobalamine C (cblC) est l'erreur innée la plus fréquente du métabolisme des cobalamines, elle provoque une altération de la conversion de la vitamine B12 alimentaire vers ses deux formes métaboliquement actives, méthylcobalamine et adénosylcobalamine. Le défaut cblC provoque l'accumulation de l'acide méthylmalonique, de l'homocystéine et la diminution de la synthèse de la méthionine.

6.1.1 Symptomatologie de la cblC

Les manifestations cliniques de troubles du métabolisme de la cobalamine intracellulaire peuvent être très variables, même dans un seul groupe de complémentation. Le prototype le mieux compris est cblC; il est aussi le plus courant de ces troubles. L'âge de présentation initiale de cblC couvre un large éventail, y compris (Carrillo et al., 1993):

- Les nouveau-nés, qui peuvent avoir un retard de croissance intra-utérin (RCIU) et une microcéphalie;
- Les nourrissons, qui peuvent avoir des problèmes d'alimentation, un retard de croissance, une pâleur, des signes neurologiques, et parfois le syndrome urémique hémolytique (HUS) et / ou des crises, y compris des spasmes infantiles;
- Les tout-petits, qui peuvent avoir un retard de croissance, un défaut de croissance de la tête, une cytopénie (y compris l'anémie mégaloblastique), un retard global de développement, une encéphalopathie, et des signes neurologiques tels que l'hypotonie et des convulsions;
- Les adolescents et les adultes, qui peuvent avoir des symptômes neuropsychiatriques, un déclin cognitif progressif, et / ou la dégénérescence combinée subaiguë de la moelle épinière.

6.1.2 Gène de cblC

Le gène responsable du défaut cblC a été identifié, et plus de 40 mutations ont été rapportées (Lerner-Ellis et al., 2006). Le gène MMACHC est localisé sur le chromosome 1p et code la synthèse de CNCbl décyanase, qui catalyse la réaction de decyanation de CNCbl en utilisant des équivalents réducteurs fournis par l'oxydoréductase diflavine cytosolique, pour la conversion CNCbl en cofacteurs actifs (Kim et al., 2008). Récemment, il a été suggéré que la protéine MMACHC a également une activité alkyltransférase qui catalyse la désalkylation de la méthylcobalamine et de la 5'-désoxyadénylcobalamine, les alkylcobalamines naturellement présentes dans l'alimentation, dans une réaction nécessitant une activité glutathion transférase (Kim et al., 2009; Martinelli et al., 2010).

L'anomalie génétique la plus fréquente est le c.271dupA, ce qui provoque un décalage de cadre de lecture au codon 91 et une terminaison prématurée au codon 105, représentant plus de 40% des allèles mutants (Morel et al., 2006; Nogueira et al., 2008). Des corrélations génotype-phénotype ont été tentées. L'homozygotie pour les mutations c.271dupA et c.331 C> T est presque exclusivement observée dans les cas de présentation précoce, alors que les patients homozygotes pour la mutation c.394 C> T appartiennent généralement au groupe d'apparition tardive.

6.1.3 Traitement

Pour améliorer l'évolution clinique des anomalies métaboliques, le traitement de la déficience en cblC est basé sur une approche combinée consistant en la supplémentation de la vitamine B12, de la

bétaïne et de l'acide folique. Des doses pharmacologiques de vitamine B12, de préférence sous la forme d'hydroxycobalamine (OH-Cbl), sont données afin d'optimiser l'activité enzymatique. La bétaïne et l'acide folique sont utilisés pour réduire l'homocystéine et augmenter le niveau de méthionine. La bétaïne fournit le substrat pour la bétaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT), une autre voie pour la synthèse de la méthionine dans le foie, tandis que l'acide folique active la voie de reméthylation (Smith et al., 2006).

Certains rapports soulignent l'inefficacité des cyanocobalamines *in vivo* et *in vitro*, recommandant l'utilisation d'OH-Cbl (Andersson and Shapira, 1998). Bartholomew et ses collaborateurs (Bartholomew et al., 1988) ont signalé une légère élévation de méthylmalonate chez un patient, et aucun changement significatif dans l'homocystéine plasmatique et des niveaux de méthionine lorsque l'injection quotidienne de 1 mg d'OH-Cbl a été interrompue pendant 3 semaines. Chez un second patient, l'homocystéine a augmenté en 1 mois quand la thérapie intramusculaire de OH-Cbl a été remplacée par une administration perorale. Bien que la plupart des cliniciens qui traitent ce trouble considèrent la thérapie de vitamine B12 inefficace lorsqu'elle est administrée par voie orale, il est prouvé que cette méthode d'administration peut être aussi efficace que des injections intramusculaires pour obtenir une amélioration hématologique et neurologique à court terme chez les patients déficients en vitamine B12 (Butler et al., 2006; Vidal-Alaball et al., 2005). Cependant, d'autres études chez des patients avec un défaut cblC ont rapporté une amélioration des paramètres métaboliques en utilisant des doses très élevées, jusqu'à 20 mg / jour, de OH-Cbl parentéral (Carrillo-Carrasco et al., 2009; Van Hove et al., 2002). Il est donc probable que, pour obtenir un effet pharmacologique par l'OH-Cbl dans les troubles de la cobalamine intracellulaire, les doses nécessaires soient beaucoup plus élevées que celles qui sont utilisées pour corriger un faible taux sanguin de vitamine B12 (Martinelli et al., 2010).

6.2 Le groupe de complémentation cblG

Le défaut cobalamine G (cblG) est une erreur innée rare du métabolisme intracellulaire de la cobalamine, elle provoque une diminution de la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine (Met).

6.1.1 Symptomatologie de la cblG

Les patients ont une hyperhomocystéinémie et une homocystinurie avec hypométhioninémie, en l'absence d'acidurie méthylmalonique. Les patients ont souvent une anémie mégaloblastique et une variété de troubles neurologiques, y compris un retard de développement, une atrophie cérébrale, des anomalies électroencéphalographiques, un nystagmus, une hypotonie, des convulsions et une ataxie (Watkins and Rosenblatt, 1989). Un patient est diagnostiqué cblG à l'âge adulte a reçu un diagnostic de sclérose (Carmel et al., 1988).

6.1.2 Gène de cblG

Le trouble de cblG est le résultat de mutations au locus MTR sur le chromosome 1q43, qui code pour la méthionine synthase (Gulati et al., 1996; Leclerc et al., 1996). Des mutations au niveau du locus MTR ont été identifiées chez des patients cblG (Gulati et al., 1996; Leclerc et al., 1996; Watkins et al., 2002; Wilson et al., 1998). Le plus commun de ceux-ci est c.3518C> T (p.P1173L) qui représente plus de 40% des allèles causant la maladie (Watkins et al., 2002). Cette mutation, bien que commune chez les patients, n'a pas été observée à l'état homozygote, ce qui suggère que l'homozygotie peut être incompatible avec la survie (Watkins and Rosenblatt, 2011).

Les cas de cblG avec activité indétectable de la méthionine synthase sont très rares et sont classés comme 'cblG-variant' (Fofou-Caillierez et al., 2013). Fofou-Caillierez et al ont observé dans les fibroblastes cultivés provenant de 'cblG-variant' un phénomène paradoxal, ils ont trouvé une diminution de la conversion de CNCbl à OHCbl, similaire à ce qu'on retrouve dans les cellules de cblC. Par ailleurs, ils indiquent une interaction entre la MS et MMACHC, ce qui suggère un rôle de régulation de la MS dans le métabolisme intracellulaire de Cbl, par l'épissage de deux transcrits MTR qui codent respectivement pour l'enzyme de pleine taille et pour une protéine tronquée non-fonctionnelle,. Cette interaction a été mise en évidence dans des fibroblastes 'cblG variant' dans lesquels MTR code seulement l'isoforme non fonctionnelle, avec une diminution de OHCbl et une augmentation d'AdoCbl,.

6.1.3 Polymorphismes de MTR

La méthionine synthase (codée par gène MTR sur le chromosome 1q43), catalyse la conversion de l'homocystéine en méthionine, en utilisant un groupe méthyle dérivé du 5-méthyltétrahydrofolate, qui est la forme circulante principale de l'acide folique dans le corps (Datta et al., 2008). Ainsi, le gène de MTR est essentiel pour le maintien du niveau de la S-adosyl méthionine intracellulaire qui est

consécutivement nécessaire pour la méthylation de l'ADN et des effets suppresseurs de tumeurs (Guéant et al., 2013b; Stern et al., 2000).

Concernant MTR, le polymorphisme MTR A2756G provoque la substitution de l'acide aspartique par un résidu glycine, ce qui affecte l'activité de l'enzyme, induisant par conséquent l'hyperhomocystéinémie et l'hypométhylation de l'ADN (Sharp and Little, 2004). MTR 2758 C> G est un autre polymorphisme et il semble avoir des effets rares dans les populations (Zhu et al., 2003). Le polymorphisme MTR 2756A > G affecte la disposition formyltétrahydroptéoylglutamic acide (H4PteGlu) des érythrocytes et le génotype MTR 2756AG est associé à une augmentation du formyl-H4PteGlu, par rapport au 5-méthyl-H4PteGlu trouvé chez les personnes ayant des allèles de type sauvage. Cette relation n'a pas été retrouvée dans les globules rouges des personnes ayant une anomalie du tube neural (ATN) (Lucock, 2000). Une association a été observée entre MTR 2756a> G , une augmentation des niveaux d'homocystéine totale et une réduction de la méthionine qui peut être compatible avec l'hypométhylation de l'ADN (Silaste et al., 2001), alors qu'une telle association n'a pas été confirmée dans d'autres études (Lucock, 2000; Morrison et al., 1997). En outre, une association entre MTR 2756a> G et de faibles niveaux plasmatiques d'homocystéine a été observée (Wang et al., 1999). Les humains ayant une déficience de l'activité MTR ont des conséquences cliniques graves. Chez les souris, la perte complète de l'activité MTR conduit à une létalité embryonnaire précoce (Swanson et al., 2001). Le polymorphisme MTR 2756a> G ainsi que le génotype hétérozygote MTR 2756AG ont été associés à la gravité de la maladie de l'artère coronaire (Wang et al., 1998) et considérés comme facteur de risque élevé pour cette maladie. L'association du polymorphisme MTR A2756G et de la carcinogenèse a été largement étudiée; cependant, les résultats sont contradictoires. L'allèle homozygote MTR 2756GG a toutefois été lié à une plus grande sensibilité au lymphome malin (Matsuo et al., 2001).

Les résultats n'ont montré aucune association entre ces deux polymorphismes examinés et l'augmentation du risque maternel de donner naissance à des enfants porteurs de NTD (Al Farra, 2010).

Lima et al. ont mis en évidence une association entre le polymorphisme A2756G de MTR et la sensibilité au rétinoblastome dans une population du Nord-Est du Brésil (de Lima et al., 2010). Par la suite, Akbari et al. ont trouvé la même association, c'est-à-dire que le polymorphisme MTR A2756G a été associé au risque de rétinoblastome chez les patients iraniens (Akbari et al., 2015).

Yamaji et al. ont trouvé que l'allèle G peut conférer une protection contre l'adénome colorectal en présence de niveaux corrects de folates(Yamaji et al., 2009).

Des résultats contradictoires ont été signalés sur l'association entre le polymorphisme A2756G de MTR et la maladie d'Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) . Certaines études ont rapporté une association entre le génotype MTR 2756 AA et la maladie d'Alzheimer, cependant d'autres études n'ont révélé aucune association entre le polymorphisme MTR A2756G et cette maladie (Beyer et al., 2003; Bosco et al., 2004; Dorszewska et al., 2007; Linnebank et al., 2004; Zhao et al., 2008). Puis une méta-analyse a été effectuée sur des études existantes qui ont examiné les fréquences alléliques et génotypiques du gène MTR chez les patients atteints de la AD. En conclusion, la méta-analyse suggère que le polymorphisme MTR A2756G n'est pas un déterminant génétique de AD (Yun, 2013).

Biselli et al. ont remarqué que le génotype hétérozygote MTR 2756 AG est associé à l'augmentation des concentrations de Hcy plasmatique dans un groupe de patients du Brésil atteints du syndrome de Down (DS) (Biselli et al., 2008)

6.1.3 Traitement

Le trouble cblG a été traité par OHCbl administrée par voie intramusculaire. Il en résulte une amélioration rapide des anomalies biochimiques et hématologiques; les problèmes neurologiques s'améliorent plus lentement et il peut y avoir des défauts résiduels, même après le traitement (Watkins and Rosenblatt, 2011). Dans certains cas, des médicaments supplémentaires ont été inclus dans les protocoles de traitement. Parmi ceux-ci, la bétaine, qui agit en tant que substrat pour la méthylation de l'homocystéine par la bétaine homocystéine méthyltransférase, une homocystéine méthyltransférase indépendante de la cobalamine présente dans le foie, apparaît le plus bénéfique. Un patient avec un défaut cblE a été diagnostiqué avant la naissance et traité par supplémentation de la mère pendant la grossesse, ainsi qu'une supplémentation du nourrisson peu après la naissance; ce patient a bien survécu, avec un minimum de problèmes neurologiques (Rosenblatt et al., 1985). Ceci suggère que le diagnostic précoce et l'instauration rapide du traitement sont importants pour la prévention des dommages neurologiques irréversibles dans ces maladies.

6.3 Le groupe de complémentation cblE

Le trouble cblE a été identifié comme le résultat de mutations au niveau du locus MTRR sur le chromosome 5p15.3-p15.2, qui code pour la méthionine synthase réductase et il est responsable de l'activation de la méthionine synthase (Leclerc et al., 1996; Zavadáková et al., 2005). La plus fréquente d'entre elles, soit 25% des allèles pathogènes, est une mutation intronique (c.903+469T>C) qui crée un nouveau site accepteur d'épissage dans l'exon 6 entraînant l'inclusion de 140 bases de séquence intronique dans l'ARNm. Une autre mutation, c.1361C> T (p.S545L) a été identifiée chez les patients d'origine ibérique et peut être associée à une forme légère de trouble neurologique (Watkins and Rosenblatt, 2011).

Partie 4 : L'anatomie du foie et mécanismes de régénération

1. Anatomie et histologie du foie

Le foie murin, à la différence du foie humain est anatomiquement plurilobé: celui de l'homme pèse en moyenne 1500g, contre environ 3 à 5g chez la souris (soit environ 4.5% de la masse corporelle chez le murin et 2,5% chez l'homme) (Koniaris et al., 2003) et est constitué de 5 lobes: le lobe gauche, le lobe médian, le lobe droit et les deux lobes caudaux (ou de Spiegel) (Figure 10).

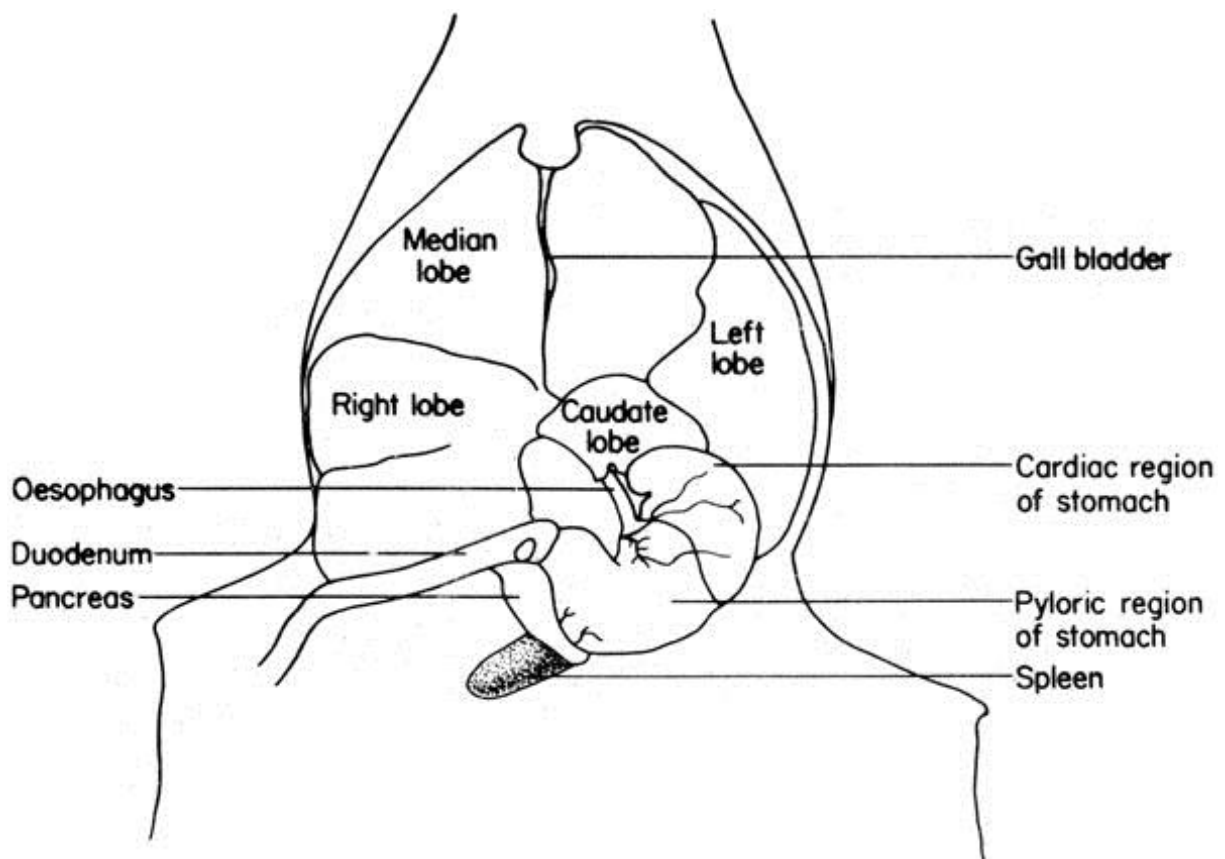


Figure 10 : Lobes du foie de souris (The Anatomy of the Laboratory Mouse ; Margaret J. Cook; JAX)

La vascularisation de chacun des lobes hépatiques est majoritairement assurée par une branche de la veine porte et minoritairement par une branche de l'artère hépatique, apportant du sang oxygéné. Le foie utilise 25-30% de l'oxygène consommé par un organisme.

Sur le plan histologique, le foie est constitué d'unités fonctionnelles appelées lobules (Lamers et al., 1997). L'unité fonctionnelle d'un organe donné peut être définie comme étant la plus petite

structure distincte se suffisant à elle-même et qui peut de façon indépendante réaliser toutes les fonctions connues de cet organe (Saxena et al., 1999).

Les lobules hépatiques sont organisés autour d'une veine centrale, et séparés entre eux par des espaces portes contenant des canaux biliaires, des petites branches de la veine porte et de l'artère hépatique. Les lobules ont une forme hexagonale et sont constitués de travées cellulaires de 20 à 25 hépatocytes, reliées entre elles en délimitant des lacunes hépatiques à l'intérieur desquelles cheminent les sinusoides hépatiques. Chaque lacune est ainsi divisée en un sinusoides et un espace péri-sinusoidal (ou de Disse): la surface basale des hépatocytes des hépatocytes est donc séparée des cellules endothéliales sinusoidales adjacentes par l'espace de Disse, lieu des échanges de substances entre le sérum et les hépatocytes (Figure 11).

Le flux sanguin se fait de façon unidirectionnelle, de la veine porte aux veines hépatiques. La lymphe est formée dans le foie par filtration du plasma vers les espaces de Disse lorsque le sang passe par les sinusoides.

L'innervation du foie se fait surtout par le système sympathique (via des fibres nerveuses adrénériques) mais le système parasympathique (via des fibres nerveuses cholinériques) entre également en jeu (Saxena et al., 1999).

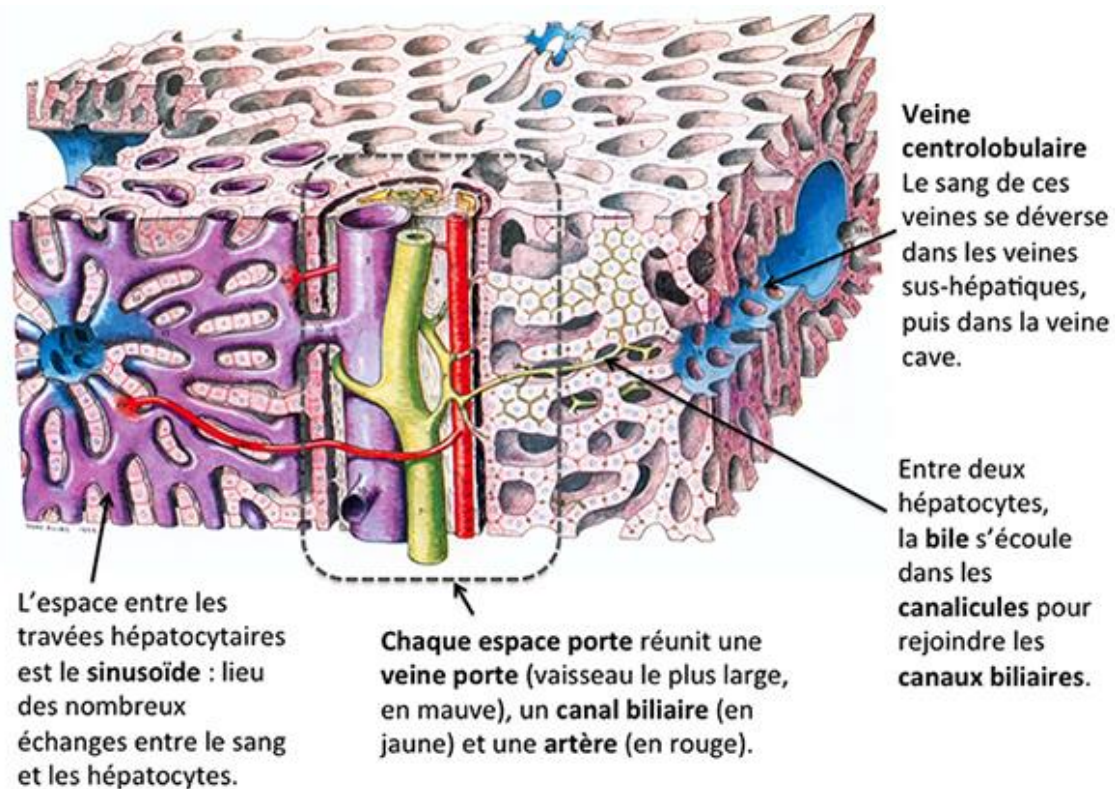


Figure 11 Structure du tissu hépatique (www.centre-hepato-biliaire.org)

2. Physiologie, lobules et acinus

On peut étudier la physiologie hépatique selon deux modes d'organisation différents : un mode déduit de la description anatomique microscopique, dont l'unité de base est le lobule hépatique ; et d'autre part un mode fonctionnel dont l'élément de base est l'acinus hépatique. Le lobule hépatique est l'unité anatomique du parenchyme hépatique. Il se présente comme une structure hexagonale, centrée par une veine centrolobulaire et limitée en périphérie par les espaces portes voisins. Mais le lobule hépatique ne reflète pas l'organisation fonctionnelle du tissu hépatique qui, elle, est calquée sur l'architecture de la microcirculation hépatique. Les lobules hépatiques sont en effet vascularisés par des capillaires spécialisés, les sinusoides, qui circulent entre les travées hépatocytaires et confluent dans la veine centrolobulaire. C'est sur cette description physiologique que Rappaport a proposé une conception de l'organisation fonctionnelle du tissu hépatique à laquelle son nom est resté attaché : celle de l'acinus. L'acinus est organisé autour des branches terminales des veines portes. Dans cet espace, deux zones fonctionnelles peuvent être facilement définies grâce à des repères anatomiques : la zone périportale, centrée par l'espace porte, et la zone périveineuse, centrée par la veine centrolobulaire. La zone périportale correspond approximativement à la zone

centrale de l'acinus, tandis que la zone périveineuse correspond approximativement à la zone périphérique de l'acinus (Figure 12).

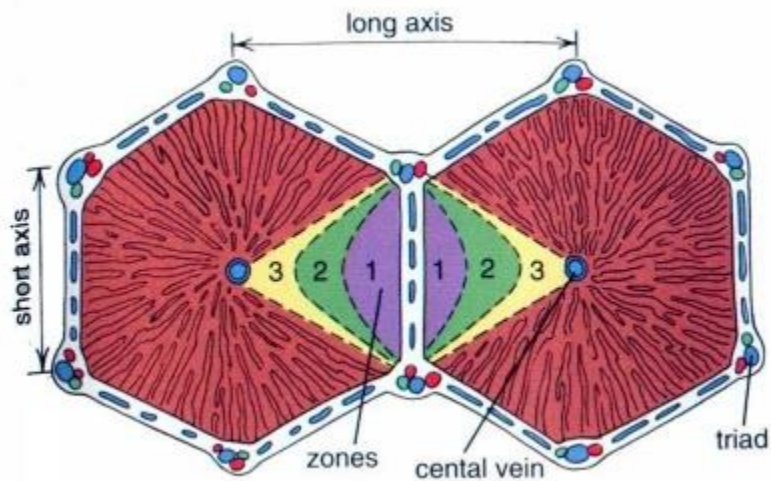


Figure 12 Acinus du foie (www.studydroid.com)

3. Zonation métabolique du foie (Colnot and Perret, 2011)

La zone périportale est spécialisée dans le métabolisme oxydatif, la néoglucogenèse, le catabolisme des acides gras et des acides aminés, la synthèse de cholestérol, la synthèse d'urée à partir de NH_3 . La zone périveineuse assure préférentiellement la glycolyse, la synthèse des acides gras et la céto-genèse. Elle est responsable de la synthèse de glutamine à partir de NH_3 . Elle assure également l'essentiel des fonctions de biotransformation des xénobiotiques : c'est là notamment que prédominent les activités de la plupart des cytochromes et des enzymes de détoxification. C'est également la région périveineuse qui contient les plus fortes activités des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'alcool, comme l'alcool-déshydrogénase et l'acétaldéhyde-déshydrogénase (Figure 13).

Une autre activité métabolique fondamentale des hépatocytes est également distribuée de façon hétérogène dans le lobule hépatique : c'est la capacité de synthèse des protéines plasmatiques.

Tous les hépatocytes sont capables de synthétiser et de sécréter l'ensemble des protéines plasmatiques. Toutefois, l'activité de synthèse des protéines plasmatiques est distribuée en gradients.

Pour la plupart d'entre elles, la synthèse prédomine en région périportale : c'est le cas notamment de l'albumine, du fibrinogène ou de l'haptoglobine. Pour quelques autres, comme l'alpha-fœtoprotéine et l'alpha-1-antitrypsine, la synthèse prédomine en région périveineuse.

La zonation métabolique du lobule hépatique est capable de se modifier de manière extrêmement rapide en réponse à des variations physiologiques. Elle est une propriété dynamique. Un exemple particulièrement étudié est celui des modifications de la zonation métabolique induites par le jeûne et la réalimentation chez l'animal.

Une conséquence importante de la zonation métabolique du lobule hépatique est de rendre certaines zones du lobule hépatique plus sensibles à certains types d'agressions. Ce n'est pas un hasard si de nombreuses atteintes médicamenteuses touchent électivement la zone périveineuse : c'est là que se trouvent les plus fortes concentrations d'enzymes susceptibles de produire des métabolites réactifs à partir des xénobiotiques. De même, les fortes concentrations d'alcool-déshydrogénase dans la zone périveineuse expliquent probablement la topographie centrolobulaire préférentielle de certaines lésions hépatiques dues à l'alcool. Enfin, il est habituel d'attribuer les effets prédominants de l'ischémie hépatique sur la région centrolobulaire à la pression partielle en oxygène plus basse existant normalement dans cette zone ; d'autres facteurs pourraient également y contribuer, comme la plus forte activité de la xanthine oxydase, l'une des principales sources intrahépatocytaires de radicaux libres au cours de la reperfusion qui suit une ischémie

En retour, les modifications de l'architecture hépatique sont susceptibles de perturber la zonation métabolique du foie. Les études histoenzymologiques effectuées chez le rat et chez l'homme montrent une relative conservation de l'organisation fonctionnelle du tissu hépatique en cas de fibrose sans cirrhose . Ce n'est qu'au stade de cirrhose qu'apparaissent des remaniements majeurs de l'organisation fonctionnelle du parenchyme hépatique . Les nodules cirrhotiques sont caractérisés par une diminution de la plupart des activités enzymatiques normales, une perte de l'organisation zonale de la plupart des fonctions métaboliques et une perte de la complémentarité métabolique des hépatocytes . Le métabolisme de l'ammoniaque est particulièrement altéré, en raison notamment de la perte habituelle de l'expression de la glutamine synthétase. Chez le rat, cette perte d'expression a pu être corrélée avec l'augmentation de l'ammoniémie périphérique. Il est donc vraisemblable que les anomalies de la zonation métabolique du foie contribuent à l'aggravation des troubles métaboliques associés au développement de la cirrhose.

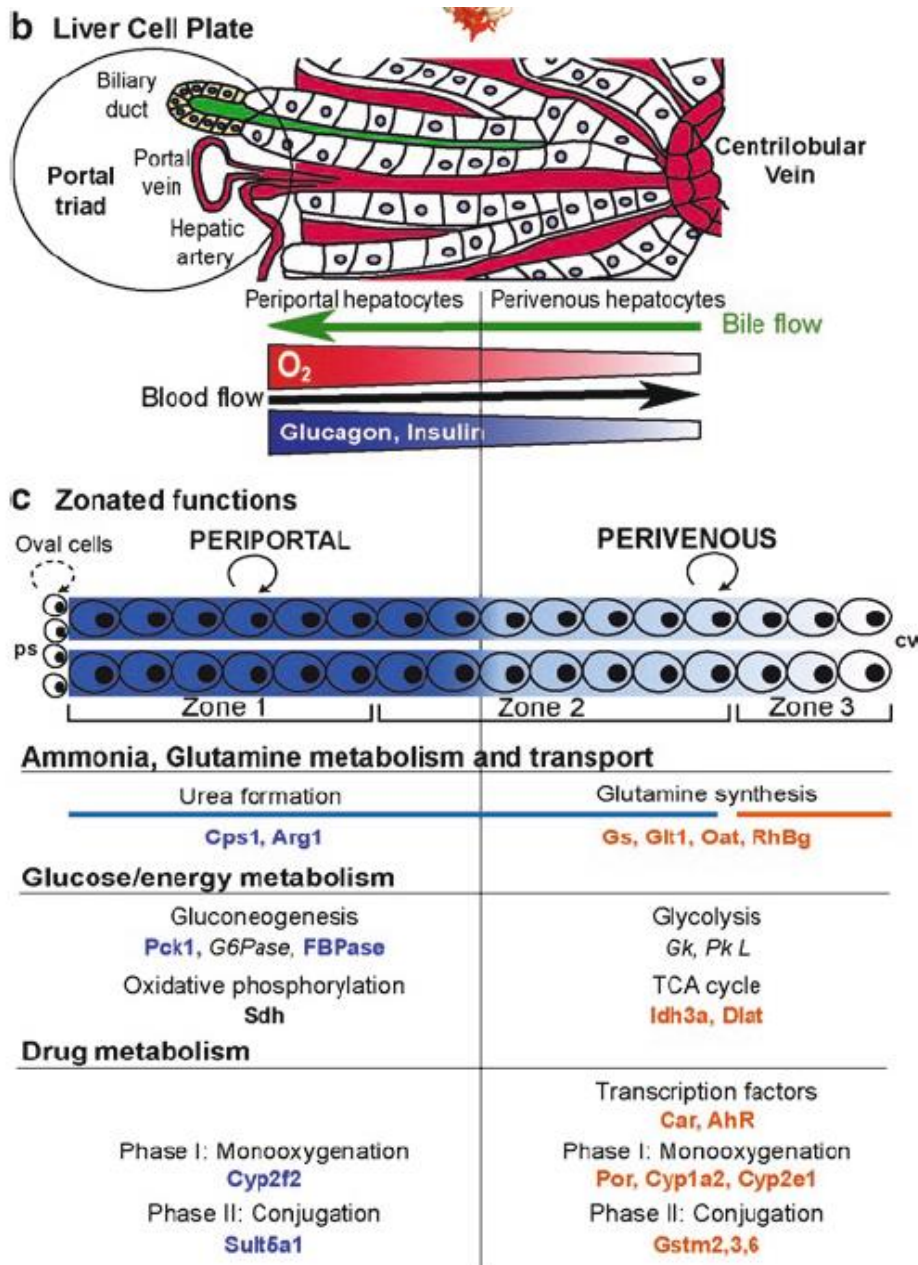


Figure 13 : Zonation métabolique du foie (Colnot and Perret, 2011).

4. Différents types cellulaires

Les différents types cellulaires présents dans le foie sont très organisés d'un point de vue architectural et coopèrent pour assurer les différentes fonctions métaboliques et excrétrices de cet organe.

Les cellules parenchymateuses ou hépatocytes Ces cellules sont de loin le type cellulaire le plus abondant dans le foie (environ 60%) et sont le site majeur du métabolisme intermédiaire et du métabolisme des xénobiotiques, ainsi que de stockage. De taille et de forme hétérogène, les hépatocytes présentent du point de vue ultra-structural d'une part une face vasculaire faisant face aux sinusoides et assurant ainsi les échanges avec la circulation sanguine, et d'autre part une face biliaire, apicale, qui contribue à la formation du canalicule biliaire, structure dépourvue de paroi propre puisque formée de l'accolement des membranes de plusieurs hépatocytes contigus (David and Richert, 2000).

De façon quelque peu arbitraire, les 6-8 hépatocytes de chaque travée situés à la périphérie du lobule hépatique sont dits périportaux tandis que ceux qui sont localisés à proximité de la veine centrale sont dits périveineux (ou péricentraux ou centrolobulaires (Gebhardt, 1992).

Les cellules endothéliales Ces cellules impliquées dans la modulation de la prolifération hépatocytaire (par le Transforming Growth Factor β (TGF β), l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) et l'interleukine 6 (IL-6)) bordent les sinusoides et présentent la particularité d'être fenestrées et dépourvues de membrane basale, ce qui favorise les échanges entre les hépatocytes sous-jacents à la barrière endothéliale et les hépatocytes (Malik et al., 2002).

Les cellules de Kupffer Localisées dans la lumière des sinusoides, ces cellules sont au contact, grâce à leurs prolongements, des cellules endothéliales et des hépatocytes. Ce sont des cellules littorales (= présentes en bordure de capillaire) de type macrophage hépatique qui vont intervenir lors des réactions immunitaires et au cours des processus de sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance et d'inhibiteurs de la réplication notamment TGF β 1 (Malik et al., 2002).

Les cellules étoilées (ou de Ito) Juxtaposées dans l'espace de Disse entre les hépatocytes et les sinusoides hépatiques, ces cellules stockent de nombreux globules lipidiques riches en vitamine A. Elles jouent un rôle majeur dans le développement de fibroses hépatiques et sont plus généralement impliquées dans la régulation de la croissance hépatique (remaniement de la matrice extra-cellulaire, synthèse de facteurs de croissance, production de cytokines) (Malik et al., 2002).

Les cellules «natural killer» (ou pit cells) Ce sont des lymphocytes intrahépatiques donc résidents, visibles dans la lumière des capillaires sinusoidaux. Ils interviennent au cours de mécanismes de défense immunitaire.

Les fibroblastes Les fibroblastes ne sont pas des cellules spécialisées du foie; ils possèdent un rôle structural et architectural très important avec tous les composants de la matrice extra-cellulaire, intervenant également dans le remodelage et la plasticité du foie en tant qu'organe.

5. REGENERATION

5.1 Foie normal

La régénération hépatique permet au foie, après un stress aigu (résection chirurgicale, exposition à un agent toxique ou infectieux ...) de rétablir sa masse cellulaire ; c'est le résultat d'un équilibre complexe entre facteurs stimulant et inhibant la prolifération hépatocytaire. Après hépatectomie ou hépatite aiguë, l'architecture générale du parenchyme hépatique est conservée. La régénération hépatique intéresse non seulement les hépatocytes mais aussi les cellules sinusoidales. Les cellules constituant la barrière sinusoidale sont également modifiées : les cellules endothéliales projettent dans la lumière et dans les espaces interhépatocytaires des bourgeonnements avec formation de « néolumières » (angiogenèse).

Il est à noter qu'en conditions normales, c'est-à-dire sans stimulus de régénération on estime à moins de 0,1% la proportion d'hépatocytes en division (Fausto and Campbell, 2003; Koniaris et al., 2003). La majorité des hépatocytes sont donc dans une phase de quiescence du cycle cellulaire (G0) c'est-à-dire qu'à l'état normal ils ne poursuivent pas un cycle mitotique. Les autres cellules parcourent un cycle de division, habituellement divisé en 4 phases successives: G1, S (phase de synthèse d'ADN), G2 et M (phase de division). Par opposition à la phase M, Les autres phases du cycle cellulaire constituent l'interphase. Il est à noter que les cellules en phase G0 peuvent entrer en phase G1 sous l'influence de signaux déclenchant la mitose (facteurs de croissance, virus tumorigènes) et poursuivre le cycle en phase S.

Le cycle cellulaire est finement régulé principalement par des cyclines et des kinases dépendantes de cyclines (CDK) qui peuvent se combiner de différentes façons pour contrôler non seulement l'entrée en phase en M ainsi que la sortie de la phase G1 mais également la transition au-delà du point de restriction (gap) G1/S entre la phase G1 et le début de la réplication du matériel génétique en phase S. Ce gap est contrôlée notamment par les couples cycline D/CDK4 et cycline E/CDK2 (Fausto et al., 2006; Nelsen et al., 2001).

5.2 Régénération post-hépatectomie partielle

La régénération du foie peut être plus correctement définie comme une hyperplasie compensatoire où le foie restant se dilate pour répondre aux besoins métaboliques de l'organisme. Contrairement à la vraie régénération anatomique, le foie en expansion ne retrouve pas de structure anatomique brute d'origine. Il est également important de noter l'origine des cellules utilisées pour remplacer les hépatocytes disparus. Contrairement à la régénération véritable, dans le cas d'une hépatectomie partielle et certaines lésions hépatiques chimio-induites, la masse du foie est remplacée par la réplication des hépatocytes existants sans activation de cellules progénitrices (Farber and Gerson, 1984).

Certains aspects de la régénération du foie varient en fonction des rythmes circadiens. Matsuo et ses collègues ont démontré que suite à une hépatectomie partielle chez la souris, le passage de G2 à la mitose a eu lieu à la même période du cycle circadien, malgré la variabilité du moment dans la journée où l'hépatectomie partielle a été effectuée (Matsuo et al., 2003). Cependant la synthèse de l'ADN atteint le pic à 36 heures après l'intervention chirurgicale, quelque soit le cycle d'obscurité/lumière. Ces données soutiennent fortement que la transition G2/M est contrôlée, au moins en partie, par les gènes dépendants du cycle circadien. Ces gènes modulent l'expression de la cycline B1-kinase cdc2, un régulateur important de la mitose. Wee1 est impliqué dans la régulation circadienne de la division des hépatocytes. À des concentrations élevées, wee1 phosphoryle la kinase cdc2, ce qui inhibe l'activité du complexe cycline B1-kinase cdc2 (Schibler, 2003). Par conséquent, l'entrée des hépatocytes en mitose est reportée jusqu'à ce que le niveau de wee1 soit faible.

Contrairement à la mitose, la réplication de l'ADN est indépendante du rythme circadien, mais semble être une propriété intrinsèque des hépatocytes. Il existe une variation de pic de la synthèse d'ADN suivant une hépatectomie partielle, selon les espèces : la synthèse d'ADN chez le rat présente un pic 12-16 heures plus tôt par rapport aux souris. Weglarz et Sandgren ont démontré que le moment de l'entrée des hépatocytes dans la synthèse d'ADN après hépatectomie partielle est déterminé de manière autonome dans la cellule (« cell autonomous ») (Weglarz and Sandgren, 2000). Ils ont transplanté des hépatocytes de rats dans le foie des souris après hépatectomie partielle et ont constaté que les hépatocytes de rats se répliquent plus tôt que les hépatocytes de souris dans le foie chimérique. Ce résultat définit la synthèse d'ADN comme « cell autonomous » et suggère que les cytokines ou les facteurs de croissance peuvent avoir un rôle permissif, mais pas instructif, dans la progression de la phase S des hépatocytes.

Plusieurs modèles ont été proposés pour l'étude de la régénération du foie. Le modèle le plus étudié est celui de la régénération du foie suite à une hépatectomie partielle. Un modèle d'hépatectomie des deux tiers chez le rongeur a été proposé par Higgins et al en 1931 (Higgins et al, 1931). Le foie de rongeur est multilobé, permettant la suppression de 3 lobes parmi les 5 lobes du foie ($\frac{2}{3}$ de la masse du foie). En 5 - 7 jours après l'ablation chirurgicale, le foie restant a régénéré pour atteindre une taille équivalente à la masse initiale. Les capacités de régénération du foie ont été observées et étudiées par de nombreux auteurs dans des modèles expérimentaux d'hépatite ou suite à une hépatectomie dans un modèle «petit animal» ou chez le primate non-humain. Higgins et Anderson (Higgins et al., 1931) ont ainsi les premiers rapporté, en 1931, qu'après hépatectomie partielle à 70% chez le rat (c'est-à-dire excision des lobes gauche et médian) les lobes résiduels augmentaient de volume et le foie reprenait sa taille initiale en 7 à 10 jours après l'intervention. Suite à une hépatectomie, toutes les cellules matures du foie participent à la régénération hépatique par multiplication cellulaire, sans sollicitation des cellules souches (Riehle et al., 2011; Taub, 2004). Environ 40% des cellules hépatocytaires se divisent après hépatectomie 2/3 (Miyaoaka and Miyajima, 2013).

La blessure hépatotoxique médiée par des produits chimiques, y compris le tétrachlorure de carbone (CCL4), a également servi comme un modèle commun de lésion hépatique. Le CCL4 déclenche une nécrose des zones lobulaires du foie conduisant à une réponse inflammatoire aiguë. La réponse inflammatoire est dominée par les leucocytes et les macrophages polynucléaires infiltrant le foie pour éliminer les hépatocytes nécrotiques. La réponse inflammatoire intense est connue pour affecter à la fois l'initiation et la durée de la réponse de la régénération du foie.

Les animaux génétiquement modifiés avec des erreurs innées du métabolisme ont également été proposés pour servir de modèles de régénération du foie. Le plus efficace est le modèle de souris déficiente en hydrolase fumarylacétoacétate (FAH) (Azuma et al., 2007). Le foie des souris KO présente une capacité à la repopulation avec des hépatocytes humains matures après transplantation xénogénique. Nyberg et al a produit un modèle de porc FAH-déficient pour augmenter la production des hépatocytes humains de bonne qualité (Hickey et al., 2011). Cet environnement in vivo permet de multiplier les hépatocytes primaires lorsqu'ils sont incorporés dans l'architecture tridimensionnelle du foie et exposés aux voies de signalisation complexes nécessaires pour la régénération du foie, ce qui ne peut être réalisé dans un environnement in vitro (Mao et al., 2014).

La majorité des données définissant les mécanismes moléculaires associés à la régénération du foie est dérivée à partir de modèles de rongeurs suivant une hépatectomie partielle. Les nombreuses voies de signalisation impliquées dans la régénération du foie sont complexes et interconnectées. Les modifications génétiques conduisant à des défauts dans une voie de signalisation unique donnent souvent lieu à un retard de régénération du foie, mais n'empêchent pas complètement le processus de régénération. Les retards résultant de l'interruption d'une seule voie indiquent que le réseau de voies de signalisation, complexe et souvent redondant, est essentiel à la régénération optimale du foie résultant en une masse hépatique adéquate (Michalopoulos, 2007). Les voies impliquées dans la régénération du foie comprennent des cytokines, des facteurs de croissance et des réseaux métaboliques (Fausto et al., 2006).

Immédiatement après une hépatectomie partielle, plus de 100 gènes précoces sont activés par des facteurs de transcription qui sont latents dans foie quiescent (Arai et al., 2003; Haber et al., 1993). L'IL-6 est responsable de l'activation d'environ 40% de ces gènes (Li et al., 2001). L'activation des gènes précoces immédiats entraîne une série d'événements, y compris la synthèse de l'ADN, la réplication cellulaire, et une augmentation de la taille des cellules pendant plusieurs jours. Ces gènes précoces immédiats permettent également au foie de maintenir ses fonctions métaboliques essentielles pendant le processus de régénération (Michalopoulos, 2007). Ce processus se produit dans les hépatocytes, ainsi que les cellules hépatiques non parenchymateuses, et la réplication des hépatocytes se produit plus tôt que dans d'autres types de cellules. Parmi les hépatocytes, la synthèse d'ADN progresse de manière organisée, en commençant par les hépatocytes près de la veine porte, en direction des cellules adjacentes à la veine centrale (Grisham, 1962).

L'initiation de la régénération du foie est entraînée par le système immunitaire inné et la libération de cytokines. TNF, NFkB et IL-6 sont des médiateurs importants qui se traduisent par l'activation de STAT3 dans les hépatocytes (FitzGerald et al., 1995). Suite à une hépatectomie partielle, le TNF se lie au récepteur de TNF 1 dans les cellules non parenchymateuses, principalement des cellules de Kupffer. Cela conduit à l'activation de NFkB et la production d'IL-6. De nombreuses études ont fourni des données concernant la voie de signalisation de l'IL-6 pendant la régénération du foie et le déclenchement de la régénération du foie.

Des études de souris Knockout ont établi qu'après hépatectomie partielle, la régénération du foie normal – qui comprend l'hépatoprotection - requiert IL-6. Mais l'IL-6 ne suffit pas pour l'induction de ce processus, puisque la reconstitution de la masse du foie est seulement retardée en l'absence d'IL-

6. IL-6 est une cytokine effectrice importante dans plusieurs processus qui sont impliqués en physiologie hépatique, y compris l'hépatoprotection, la réponse de phase aiguë et la mitogenèse.

La liaison de l'IL-6 à son récepteur IL-6R, qui est associé à deux sous-unités de gp130, stimule l'activité tyrosine-kinase de protéines de la famille des Janus-kinase (JAK) — habituellement JAK1. JAK ainsi activée phosphoryle gp130 et STAT3 sur un résidu Tyr, ce qui conduit à la dimérisation de STAT3. STAT3 dimérisée est transloquée vers le noyau et active la transcription de gènes cibles. La stimulation de gp130 active également la cascade de signalisation MAPK, bien que le mécanisme exact reste à confirmer. JAK1 active le -domaine SH2 de la tyrosine phosphatase SHP2 et recrute GRB2-SOS (growth-factor-receptor-bound protein2/son-of-sevenless). GRB2-SOS active Ras, ce qui conduit à l'activation de Raf-MEK-ERK. La signalisation MAPK est cruciale pour la prolifération cellulaire. Des données récentes indiquent que l'IL-6 peut également activer directement les kinases qui sont impliquées dans la survie de la cellule, y compris la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et AKT (Böhm et al., 2010; Taub, 2004).

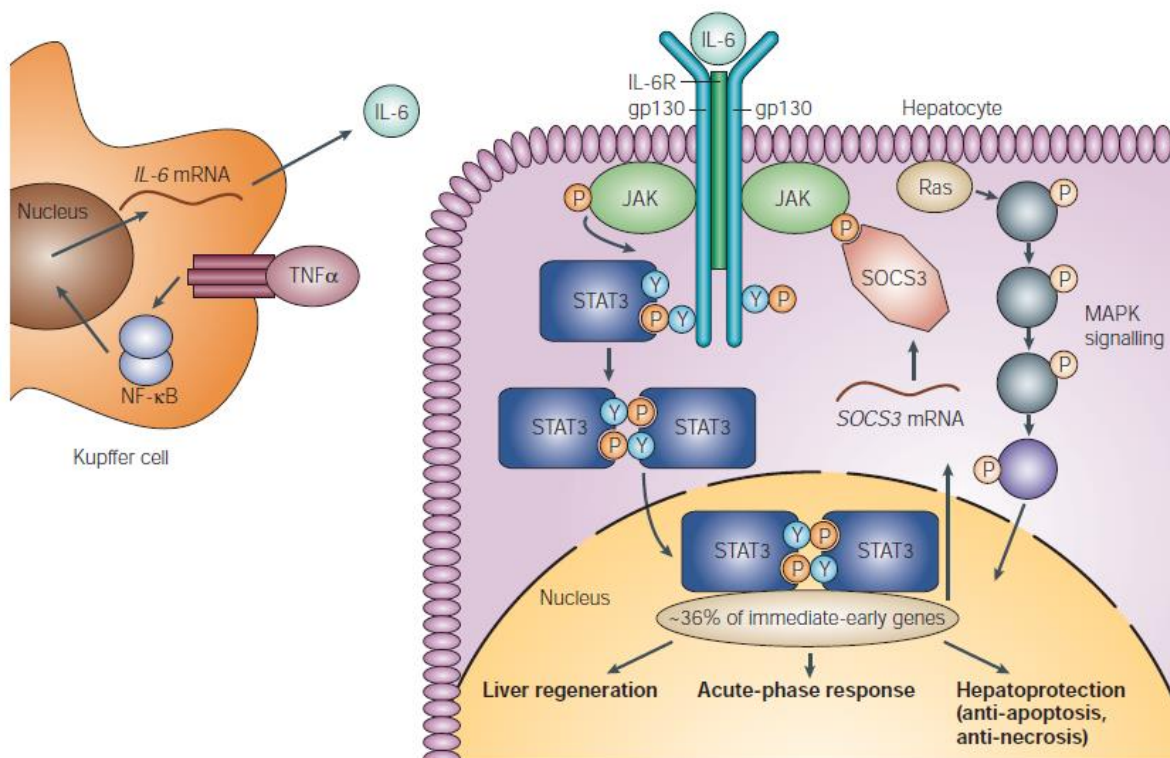


Figure 14 : Signalisation de l'IL-6 pendant la régénération du foie (Taub, 2004).

Après hépatectomie partielle à 70%, sous l'influence de facteurs mitogènes et co-mitogènes (comme l'insuline et l'épinéphrine) les hépatocytes sortent de leur état de quiescence (phase G0 du cycle cellulaire) pour entrer en phase G1 puis S (phase de synthèse d'ADN) avant cytokinèse. Les hépatocytes périportaux sont les premiers à se répliquer après PH, probablement en raison de la durée peu élevée de leur phase G1 du cycle cellulaire (Corlu and Loyer, 2012; Weglarz and Sandgren, 2000).

Les hépatocytes progressent dans le cycle cellulaire en réponse à un ensemble de facteurs de croissance mitogéniques. Ces facteurs de croissance induisent le dépassement du point de restriction G1, permettant aux hépatocytes de passer dans la phase S. Ce passage implique la phosphorylation de Rb, l'augmentation de l'expression de p107 et des cyclines D, E et A (Albrecht et al., 1993; Menjo et al., 1998). En outre, les complexes cdk4/cycline D et cdk2/cycline E sont formés. La sous-unité du récepteur gp130 est impliquée dans la production en aval des cyclines requises par la progression du cycle cellulaire (Mao et al., 2014).

La famille des ligands du récepteur de facteur de croissance épidermique (EGF et facteur de croissance des hépatocytes (HGF) sont des facteurs de croissance importants au cours de la régénération du foie (Michalopoulos and Khan, 2005). HGF est produit par les cellules étoilées et agit dans un mode paracrine et endocrine sur les hépatocytes. Pro-HGF est activé dans la matrice extracellulaire par uPA (Shimizu et al., 2001). HGF et c-met, le gène du récepteur HGF, sont essentiels pour la régénération du foie (Huh et al., 2004). La signalisation HGF/c-met produit l'activation de ERK1/2 (Borowiak et al., 2004). ERK1/2 a été impliqué dans la prolifération des hépatocytes in vitro et dans la réplication de l'ADN in vivo. D'autres études ont suggéré que la voie HGF/c-met joue un rôle important dans l'hépatoprotection en augmentant l'expression des kinases impliquées dans la survie des cellules, en particulier PI3K et AKT (Ozaki et al., 2003). La famille des ligands du récepteur EGF comprend EGF, TGF α , HBEGF (heparin-binding EGF-like growth factor) et amphiréguline (AR). Ces différents ligands ont des fonctions différentes, mais qui se recoupent souvent. EGF est produit par la glande de Brunner dans le duodénum (Skov Olsen et al., 1988). TGF α est produit par les hépatocytes en réponse à la prolifération cellulaire et les fonctions autocrines (Mead and Fausto, 1989). L'augmentation de TGF α induit la prolifération des hépatocytes constitutifs (Webber et al., 1994). Le modèle knockout de TGF α combiné à la régénération du foie normal après une hépatectomie partielle met en évidence le chevauchement des rôles des différents ligands du récepteur de l'EGF (Russell et al., 1996). HBEGF est exprimé au début de la régénération du foie (Kiso et al., 1995). Un modèle knockout HBEGF conduit à un retard de la régénération du foie avec

l'expression de TGF α comme mécanisme de compensation (Mitchell et al., 2005). Le récepteur de l'EGF et la voie HGF /c-met peuvent compenser leurs rôles respectifs dans la régénération.

Les mitogènes auxiliaires comprennent le TNF, l'IL-6, la norépinéphrine, Notch et Jagged, le VEGF, l'insuline, les acides biliaires, la sérotonine, le complément, la leptine, les oestrogènes, et les FGF1, 2 (Michalopoulos, 2010). Les modèles knockout impliquant ces mitogènes conduisent à retarder mais pas éliminer la régénération du foie. La sérotonine dérivée des plaquettes a été impliquée dans la régénération du foie. L'expression des récepteurs de la sérotonine 5-HT_{2A} et 2B augmentent dans le foie après une hépatectomie partielle. Dans une série d'expériences par Lesurtel et al, la déficience de l'activité plaquettaire (thrombocytopenie) mène à l'échec de l'initiation de la prolifération des hépatocytes dans un modèle de souris (Lesurtel et al., 2006). L'administration d'un agoniste de la sérotonine chez les souris thrombocytopeniques a entraîné une prolifération normale du foie alors que l'administration d'un antagoniste des récepteurs de sérotonine conduit à l'inhibition de la régénération.

Il existe une interconnexion entre la voie de signalisation des facteurs de croissance et la voie de signalisation des cytokines. L'IL-6, le HGF et certains ligands du récepteur EGF ont été identifiés comme favorisant l'expression de ERK1/2. L'activation de ERK1/2 aboutit à la réplication de l'ADN in vivo et la prolifération in vitro (Coutant et al., 2002). En outre, l'IGFBP (insulin-like growth-factor-binding protein) peut activer l'IL-6 et le HGF. IGFBP est une protéine mitogénique et hépatoprotectrice régulée positivement pendant la régénération (Leu et al., 2001). Le modèle de knock-out IGFBP présente une régénération anormale du foie accompagnée par un retard de synthèse d'ADN, une nécrose et une réduction de l'expression des cyclines importantes pour la phase S du cycle cellulaire. IGFBP est un hépatoprotecteur contre les blessures médiées par Fas, et elle régule les protéines apoptotiques MMP9 et TGF β (Leu et al., 2003).

Après une hépatectomie partielle, la demande métabolique du foie pendant la régénération est maintenue. Le foie doit continuer à jouer son rôle métabolique systémique tout en essayant de répondre à ses besoins propres en énergie et pour la réplication de l'ADN et la division cellulaire. Les acides aminés régulent la prolifération des hépatocytes par la modulation de l'expression de cycline D1 (Nelsen et al., 2001). Des études chez le rat indiquent que l'administration d'acides aminés conduit à la réplication des hépatocytes, tandis que la restriction des protéines altère la régénération (Mead et al., 1990). La plupart des protéines impliquées sont en aval de mTOR (mammalian target of rapamycin). Le complexe mTOR peut réguler la régénération par la modulation de la taille des

cellules et la prolifération basée sur la demande en énergie. L'administration de la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, inhibe la réplication de l'ADN suivant une hépatectomie partielle (Mao et al., 2014).

De façon schématique, on distingue classiquement deux phases successives lors du processus de régénération suite à l'hépatectomie partielle.

Une première phase d'hyperplasie rapide est marquée initialement par l'entrée autonome en division des cellules sous l'influence du TNF α et de l'Il6). Cette entrée en division est suivie dans un second temps du contrôle par HGF, EGF, FGF, TGF α et β , qui aboutit pour 95% des hépatocytes à une synthèse d'ADN 20 heures après PH chez le rat et 40h après PH chez la souris contre 72 à 96 h chez le chien et 7 à 10 jours chez le primate. L'intervalle entre l'hépatectomie partielle et le pic de réplication d'ADN est variable et peut être raccourci d'environ 10 heures chez un rat soumis à des stimuli de stress.

Une seconde phase d'hypertrophie est marquée par la polyploïdisation des cellules. La réplication d'ADN est apparemment coordonnée avec l'expression de protéines impliquées dans la régulation de la taille cellulaire et de la ploïdie: des souris ayant une sous-unité ribosomale 40S déficiente ne peuvent répliquer leur ADN après PH, tandis qu'au contraire une injection de dexaméthasone dans un foie en régénération provoquera une hypertrophie hépatocytaire mais sans réplication. Les cellules non-parenchymateuses jouent également un rôle dans la régénération post-PH, avec un pic de prolifération suivant de 12 heures celui des cellules parenchymateuses chez le murin.

Objectifs

Notre laboratoire a mis en place un modèle d'étude de la carence en donneur de méthyle, folates et vitamine B12 pendant la gestation et l'allaitement sur les effets à long terme au niveau viscéral abdominal et du cerveau. Ce modèle a permis de montrer des effets de type programmation foetale avec une obésité abdominale associée à une stéatose et une stéato-hépatite ainsi que des troubles de la neurogenèse et de la neuro plasticité qui s'accroissent au cours du vieillissement. Le méthyltétrahydrofolate et la vitamine B12 sont pour cible métabolique commune la reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase. D'autres travaux du laboratoire ont également souligné l'importance de la méthionine synthase dans les mécanismes de prolifération cellulaire, notamment au niveau digestif, cutané et cérébral. La méthionine synthase occupe une place centrale dans le métabolisme des donneurs de méthyle, elle est à la croisée du cycle des folates et du cycle de la reméthylation de l'homocystéine. C'est un gène essentiel à l'embryogenèse précoce, son invalidation totale est létale peu après l'implantation de l'embryon (Swanson et al, MCB 2001).

L'objectif de notre thèse a été la mise en place de modèles transgéniques KO conditionnel avec invalidation du gène au niveau du foie et du cerveau pour évaluer la part spécifique de l'activité de la méthionine synthase dans ces manifestations, indépendamment des autres effets de la carence en donneurs de méthyles. Pour ce faire, nous avons mis en place deux modèles murins KO conditionnel, avec invalidation du gène *mtr* respectivement au niveau du foie et du cerveau.

Ces deux organes ont en effet un comportement contrasté lors de la réponse au stress cellulaire. Le foie est l'organe qui a la plus grande plasticité. Le modèle d'hépatectomie partielle permet d'étudier la régénération hépatique, qui est mise en place dans les trois premiers jours qui suivent et qui est complète en quelques jours. Au contraire, au niveau du cerveau, le stress produit des mécanismes de neurogenèse limités. Les conséquences au cours du vieillissement sont de ce fait plus critiques et de nature différente.

Nous avons développé ces modèles KO conditionnel avec le système Cre/Lox chez la souris, en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (Strasbourg-Illkirch).

Dans un premier temps, nous avons étudié les deux modèles au cours du développement embryonnaire, pour examiner l'influence de la délétion de *mtr* sur l'organogenèse et notamment sur la prolifération cellulaire.

Dans un second temps, nous avons étudié les deux organes invalidés dans les périodes post-natales, pour analyser les effets sur le stress cellulaire (notamment stress oxydant et stress du réticulum), les effets métaboliques et les conséquences sur la prolifération cellulaire et les mécanismes de la régénération hépatique :

- Au niveau du foie, nous avons d'une part étudié les conséquences d'une délétion partielle de MTR en analysant le KO constitutif à l'état hétérozygote, et d'autre part utilisé le KO inducible complété par une hépatectomie pour étudier les altérations de la régénération hépatique liée aux effets sur le stress cellulaire. Pour compléter cette étude, les effets au niveau moléculaire ont été appréhendés par une approche transcriptomique.
- Au niveau du cerveau, nous avons étudié les mécanismes du stress cellulaire et les conséquences génomiques et cognitives. Cette étude a comporté :
 - L'évaluation du stress cellulaire.
 - La détermination de la localisation et l'expression, par des marquages immunofluorescents, de plusieurs RNA binding proteins (RBPs) interagissant avec les ARNm impliqués dans la réponse au stress, dans deux régions spécifiques du cerveau (l'hippocampe et le cervelet)
 - L'analyse des capacités d'apprentissage hippocampo-dépendant des souris KO MTR vieillissantes (âgées de plus de 40 semaines) avant et après traitement par l'agoniste de SIRT1 (le SRT1720), à l'aide du test du labyrinthe aquatique multi-T.

Résultats

RESULTATS I : Conséquences pathologiques hépatiques de la déficience en méthionine synthase.

Partie 1 : La méthionine synthase est essentielle à l'organogenèse hépatique pendant l'embryogenèse

1. L'inactivation homozygote du gène MTR dans le foie est létale in utero

Pour réaliser l'inactivation constitutive du gène MTR dans le foie, nous avons réalisé des croisements entre la lignée porteuse de l'allèle MTR conditionnel (lignée MTR lox/lox) et la lignée Albumine-Cre (lignée AC). La lignée AC permet la production de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de l'albumine, qui est actif dans le foie embryonnaire à partir d'environ E8.5 – E9.5 (Schuler et al., 2004). Cette lignée permet donc la délétion du gène cible dans le foie à partir d'E8.5 – E9.5, c'est-à-dire dès le début de l'organogenèse hépatique. Les effectifs des souris nées de ces croisements sont indiqués dans le tableau 1. Aucune souris de génotype MTR homozygote muté n'a été retrouvée dans ces portées. Les résultats montrent une létalité anténatale de l'inactivation hépatique homozygote du gène MTR, en revanche à l'état hétérozygote l'inactivation n'a pas d'incidence sur la viabilité. En l'absence de la population homozygote mutée, les pourcentages attendus des 3 autres classes de génotypes montent à environ 33% (Tableau 1). La létalité prénatale de l'inactivation homozygote confirme l'efficacité de la délétion du gène MTR dans notre modèle murin. Nous montrons ici pour la première fois que l'inactivation homozygote de MTR dans le foie est létale in utero. MTR est donc un gène essentiel au développement embryonnaire hépatique.

Tableau 2 : Tableau des effectifs de souris nées de croisements entre la lignée « MTR LoxP » (ML) et la lignée Albumine-Cre (AC).

Croisement : mâles MTRlox/WT ; Alb-Cre X femelles MTRlox/lox ; WT			
Génotype	Notation	% attendu	% constaté
MTRlox/WT ; WT	WT*	25 %	35 %
MTRlox/lox ; WT	WT	25 %	32 %
MTRlox/WT ; Alb-Cre	+/- ou hétérozygote	25 %	33 %
MTRlox/lox ; Alb-Cre	-/- ou homozygote	25 %	0 %
TOTAL		100 %	100 %

*Conformément à la notation conventionnelle, les deux allèles du gène MTR sont notés « WT » pour l'allèle sauvage et « lox » pour l'allèle conditionnel comportant les sites LoxP

2. Analyse des embryons MTR-/- à différents stades

Nous avons ensuite cherché à déterminer à quel stade embryonnaire se produit la mort in utero des embryons MTR-/-, et par quel mécanisme. Pour cela, nous avons analysé des portées d'embryons à différents stades de développement après la mise en place de la délétion du gène MTR. Partant du principe qu'un délai d'au moins 48h après activation du promoteur de l'albumine (vers E8.5 – E9.5) est sans doute nécessaire pour que la Cre soit produite, transportée dans le noyau, pour qu'elle recombine l'ADN et que les cellules soient déplétées en protéine MTR, nous avons analysé des embryons au stade E11.5 ainsi qu'aux stades ultérieurs.

Par croisements des lignées AC et ML, nous avons obtenu des souris AC ; MTRWT/lox en génération F1. Les mâles AC ;MTRWT/lox ont été croisés avec des femelles MTRlox/lox et les bouchons vaginaux ont été relevés chaque matin pour déterminer le jour de fécondation. Les portées d'embryons ont été disséquées à différents stades embryonnaires entre E11.5 et E17.5. Chaque embryon a été génotypé par PCR sur de l'ADN extrait de queue et nous avons compté les embryons AC ;MTRlox/lox (notés MTR-/-). Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 3: Tableau des effectifs d'embryons MTR^{-/-} trouvés dans les portées AC ;MTRWT/lox X MTRlox/lox aux stades embryonnaires E11.5 à E17.5.

Stade embryonnaire	Nombre total d'embryons testés	Nombre d'embryons MTR ^{-/-} (pourcentage)	Pourcentage attendu d'embryons MTR ^{-/-}
E11.5	9	0 (0,0 %)	(25%)
E12.5	40	1 (2,5 %)	(25%)
E13.5	9	3 (33,3 %)	(25%)
E14.5	28	1 (3,6 %)	(25%)
E15.5	28	2 (7,1 %)	(25%)
E17.5	15	0 (0,0 %)	(25%)

Ces données sont à compléter car les effectifs d'embryons testés sont insuffisants aux stades E11.5, E13.5 et E17.5. Néanmoins nous constatons un pourcentage d'embryons MTR^{-/-} significativement inférieur au pourcentage attendu, indiquant un effet délétère très sévère de la délétion hépatique de MTR. L'effet délétère est très précoce puisque dès E11.5, le pourcentage d'embryons MTR^{-/-} obtenus chute. Des embryons MTR^{-/-} sont présents aux stades ultérieurs à E11.5. A tous les stades étudiés, les embryons de génotype MTR^{-/-} avaient une taille et une morphologie normales, et leur foie également. La détection de la protéine MTR par marquage immunofluorescent sur coupes d'embryons aux stades embryonnaires E13.5 et E15.5 a montré l'absence de diminution de cette protéine chez les individus hétérozygotes ou homozygotes mutés par rapport aux contrôles (Figure 15). La spécificité de l'anticorps anti-MTR a été évaluée par des immunomarquages sur des cellules HepG2 en culture transfectées avec un siRNA-contrôle ou avec un siRNA-MTR (figure 15B). La diminution de la quantité de protéine MTR avec le siRNA-MTR est visible, ce qui atteste de la spécificité de l'anticorps. Nous avons cherché à nous assurer que les embryons qualifiés de mutants à l'issue du génotypage étaient bien de génotype MTR^{-/-}. Les embryons sont génotypés par PCR sur de l'ADN extrait de l'extrémité de la queue, prélevée au moment de la dissection. Nos génotypages auraient pu être faussés par une contamination avec de l'ADN maternel au moment du prélèvement des embryons, aussi nous avons confirmé chaque génotypage en extrayant de l'ADN à partir des coupes d'embryons. Les résultats ont confirmé ceux obtenus sur queue d'embryon.

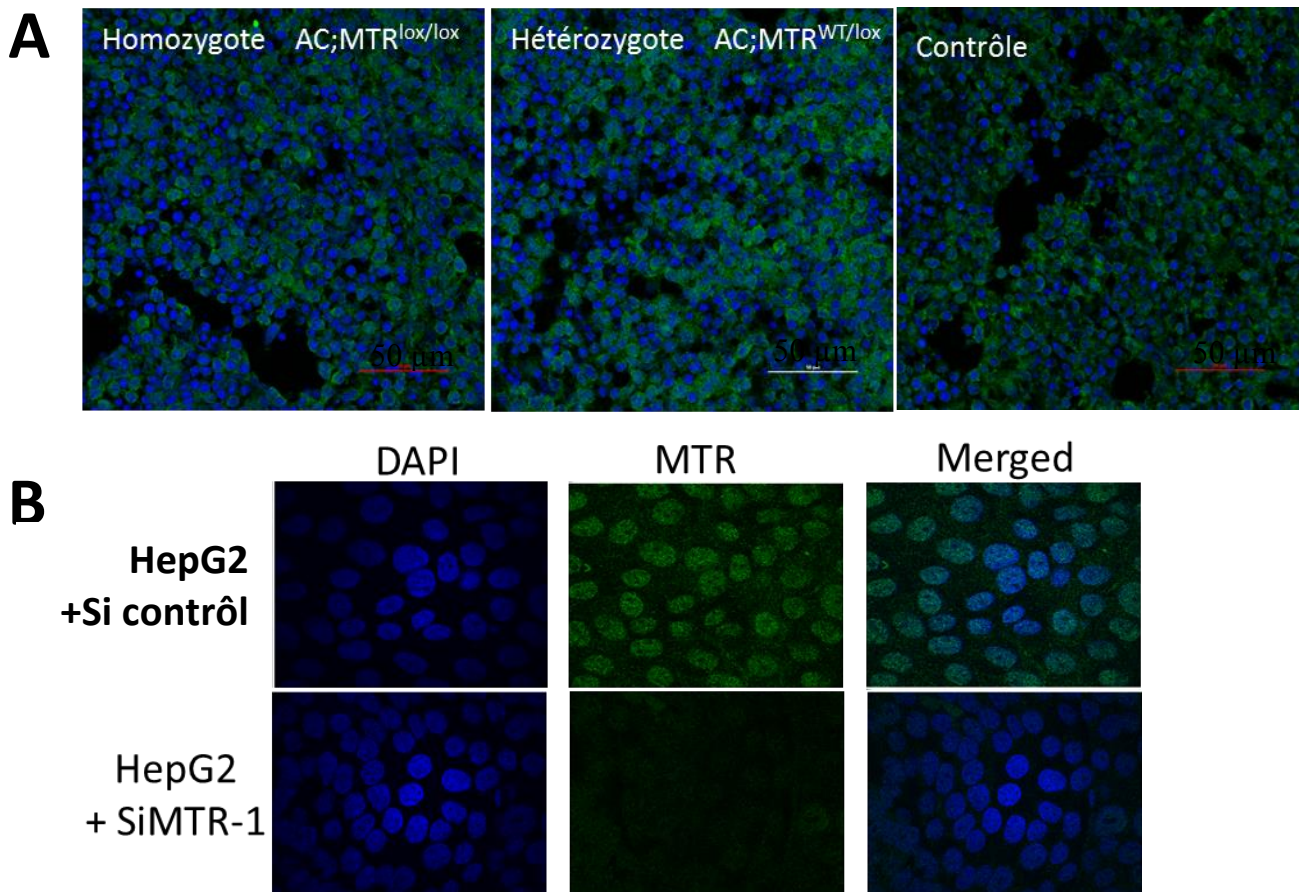


Figure 15: Analyse de la protéine MTR par immunofluorescence dans les embryons MTR^{-/-}, MTR^{+/-} et contrôles au stade E13.5. (A) Des coupes ont été immunomarquées avec des anticorps anti-MTR et le marquage fluorescent vert a été observé au microscope à fluorescence. Aucune différence d'intensité entre les groupes MTR^{-/-}, MTR^{+/-} et contrôle n'a été observée. La barre d'échelle représente 50 µm. (B) La spécificité de l'anticorps anti-MTR a été évaluée par des immunomarquages sur des cellules HepG2 en culture transfectées avec un siRNA-contrôle ou avec un siRNA-MTR

Notre hypothèse est que la délétion de MTR n'est pas synchrone chez tous les embryons, il y a une variabilité du stade embryonnaire auquel elle se met en place, entre E11.5 et E15.5. Dès que la délétion est effective, les effets délétères sur le foie mènent très rapidement à la mort de l'embryon car le foie est en effet un organe essentiel à sa survie.

Dans le but d'étudier les conséquences délétères de la délétion de MTR chez ces embryons, notamment une inhibition de la prolifération cellulaire in vivo, nous avons cherché à analyser les foies embryonnaires ayant une quantité de protéine MTR diminuée. Nous souhaitons d'une part étudier la prolifération par des expériences d'immunomarquages sur des coupes d'embryons, d'autre part extraire les ARN de foie pour faire une analyse transcriptomique et trouver les voies altérées. Cependant, de tels échantillons ont été impossibles à obtenir, malgré nos recherches à chaque stade

entre E11.5 et E17.5. Les embryons mutants pour lesquels la déplétion en MTR s'effectue précocement meurent très rapidement. Avant la déplétion effective en protéine MTR, ces embryons mutants ont un phénotype sauvage puisque MTR est encore en quantité suffisante, et dès que la quantité de protéine MTR chute, les embryons meurent. La variabilité du stade auquel la délétion se met en place (entre E11.5 et E15.5) a ajouté encore un degré de complexité à notre recherche.

Pour surmonter ces problèmes de létalité embryonnaire des embryons MTR^{-/-}, nous avons ensuite utilisé le système inducible CreERT2/lox, qui permet de choisir le stade de déclenchement de l'invalidation génique.

3. Invalidation inducible du gène MTR dans le foie embryonnaire

Pour déclencher l'invalidation hépatique du gène MTR dans des fenêtres temporelles précises du développement embryonnaire, nous avons utilisé le système inducible CreERT2/lox (Feil et al., 2009). Contrairement au système avec la Cre constitutive, ce système permet une induction de la délétion contrôlée dans le temps. La séquence de la Cre recombinase est fusionnée à la séquence du récepteur aux oestrogènes dans sa version mutée. Cette version, obtenue par mutagenèse dirigée, ne lie plus les oestrogènes endogènes mais est activée par des agonistes tels que le tamoxifène. L'induction se fait par le tamoxifène, qui provoque le changement de conformation de la protéine de fusion CreERT2 et donc l'activation de la Cre, qui migre dans le noyau et recombine les sites loxP présents dans le génome.

Par croisements des lignées ACT et ML, nous avons obtenu des souris ACT ; MTR^{WT}/lox en génération F1 puis des souris ACT;MTR^{lox}/lox en génération F2. Les mâles ACT;MTR^{lox}/lox ont été croisés avec des femelles MTR^{lox}/lox et les bouchons vaginaux ont été relevés chaque matin pour déterminer le jour de fécondation. Le tamoxifène a été injecté par voie intrapéritonéale aux femelles gestantes aux stades E10.5 et E12.5 (Figure 16). Les portées ont été disséquées le jour de la naissance (noté P0, correspondant à environ à 21 jours après la fécondation).

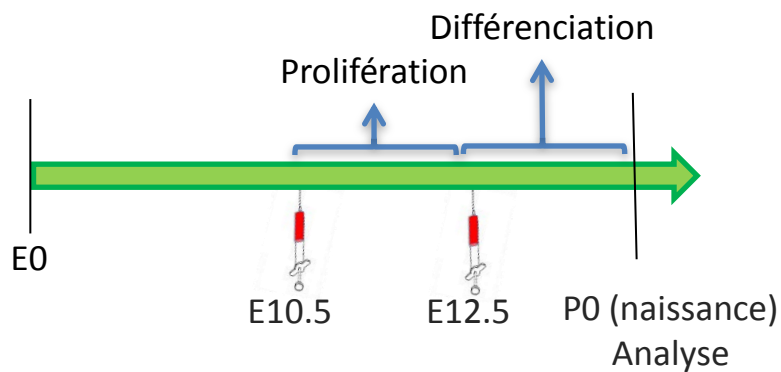


Figure 16: Schéma de protocole d'induction de l'invalidation de MTR.

L'injection de l'inducteur (tamoxifène) a été réalisée soit à E10.5 soit à E12.5. Les périodes de prolifération des hépatoblastes et de différenciation en hépatocytes sont indiquées. L'analyse est faite à P0.

Une dose unique de 1 mg de tamoxifène par femelle gestante, quel que soit son poids corporel et le stade gestationnel (E10.5 ou E12.5) (Park et al., 2008), a entraîné la mort de tous les souriceaux à la naissance, quel que soit leur génotype. L'ingestion des cadavres par la mère (mécanisme naturel de destruction des souriceaux mal formés) n'a pas permis de mesurer l'inhibition de MTR chez les individus mutants. La mort des nouveaux-nés n'est pas due à l'inhibition de MTR, car tous les nouveaux-nés meurent quel que soit leur génotype.

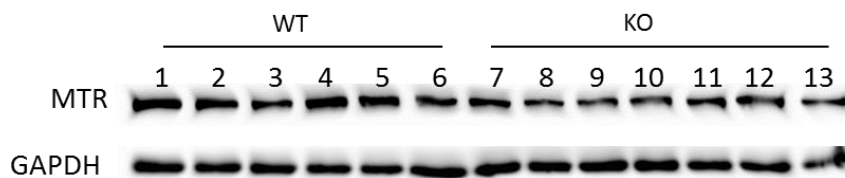
Nous avons donc testé une dose inférieure, même si la dose de 1 mg est couramment utilisée dans d'autres laboratoires. Une dose unique de 0,5 mg de tamoxifène entraîne des effets indésirables moindres qu'avec 1 mg, mais néanmoins encore très marqués, peu d'individus survivent à la naissance, ce qui complique l'analyse des portées. Des souris contrôles (porteuses d'allèle MTR-floxé uniquement) injectées de la même manière par le tamoxifène ont également donné des portées ne survivant pas à la naissance, ce qui indique que l'effet toxique provient du tamoxifène. L'administration du tamoxifène par voie orale est considérée comme plus efficace et moins toxique (Park et al., 2008). Cependant l'administration de tamoxifène par voie orale avec une dose unique de 2mg ou 1mg a donné les mêmes résultats qu'avec l'injection intrapéritonéale. L'administration de 1mg de tamoxifène par voie orale à E14.5 a produit des embryons normaux et viables à E19.5. Des expérimentations sur les rats indiquent l'association du tamoxifène avec le retard de croissance intra-utérin (Sadek and Bell, 1996). Il a aussi été démontré une toxicité du tamoxifène sur des souris portant l'allèle Cre recombinase (Koitabashi et al., 2009).

Nous avons alors testé un autre inducteur, le raloxifène, qui a été rapporté comme étant moins toxique et aurait la même efficacité de recombinaison. Le tamoxifène et le raloxifène appartiennent à la même famille des "modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes" (Koitabashi et al., 2009). Nous avons contrôlé la toxicité embryonnaire du raloxifène en administrant une dose unique (1mg par voie intrapéritonéale) chez des femelles gestantes à E10.5. Après dissection au stade embryonnaire E15.5, les embryons ne présentaient pas d'anomalies macroscopiques externes (Figure 17).



Figure 17: Examen macroscopique d'un embryon contrôlé au stade E15.5 après injection d'une dose unique de raloxifène (1mg par voie intrapéritonéale) à E10.5. Les embryons de la portée ne présentaient pas d'anomalies macroscopiques. L'embryon mesure 11 mm de la tête à la queue.

Pour évaluer l'efficacité de la délétion de la méthionine synthase, nous avons détecté la protéine par Western Blot sur des extraits de foie. Les résultats montrent une diminution d'environ 26,1% de la quantité de MTR (Figure 18). Cependant, il est évident que 26,1% de diminution de l'expression de MTR ne suffit pas pour obtenir des effets mesurables et affecter notablement le métabolisme hépatique et les processus cellulaires.



Analyses densitométriques

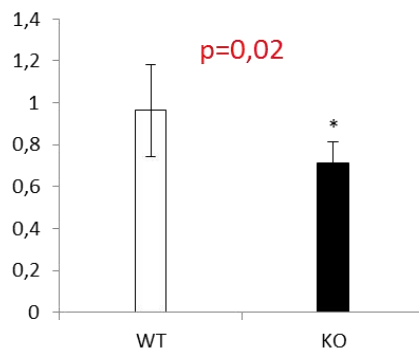


Figure 18: L'expression de méthionine synthase diminue chez les souris KO MTR. Analyse par western-blot de la protéine MTR dans le foie des souris ayant une invalidation hépatique du gène MTR (en haut), et analyse densitométrique correspondante (en bas), normalisée par l'expression de la protéine Gapdh. Les souris sont âgées de E15.5, n=6. WT : wild type ; KO : knockout.

Le système Cre/Lox présente l'avantage d'être très versatile. Il permet soit une invalidation constitutive, qui peut être totale (KO à l'état homozygote) ou partielle (KO à l'état hétérozygote), soit une invalidation inductible, dans laquelle on peut choisir le stade d'induction et la profondeur de la délétion (en testant différentes doses d'inducteur). Malgré toutes ces possibilités, aucune condition n'a permis une étude du KO embryonnaire de MTR. Malgré les très nombreuses mises au point effectuées et tous les tests réalisés avec le tamoxifène, tests portant sur le stade d'injection, les doses injectées, le fractionnement des doses, le mode d'administration (intrapéritonéal ou par gavage), le stade de collecte des embryons, le remplacement du tamoxifène par le raloxifène censé être moins toxique, nous n'avons pas pu obtenir des conditions satisfaisantes pour l'étude. Le choix des conditions testées a été fait en se référant à de nombreuses publications portant sur la mise au point de l'induction embryonnaire par le tamoxifène et ses analogues. Les difficultés que nous avons rencontrées s'expliquent par le fait que MTR est un gène essentiel, pour lequel une invalidation totale entraîne une létalité très rapide, en revanche lorsque l'invalidation est partielle, l'enzyme résiduelle suffit à compenser totalement la diminution et il n'y a aucune conséquence phénotypique.

En conclusion, nous montrons ici pour la première fois que MTR est essentiel à la formation du foie pendant l'embryogenèse, que sa délétion ne permet pas la survie des embryons, qui sont éliminés

très rapidement, avant E11.5 pour ceux qui ont une délétion précoce, avant E17.5 pour ceux qui ont une mise en place tardive de la délétion. Nous montrons également que le tamoxifène a des effets trop délétères sur la survie pour pouvoir être utilisé dans ce modèle, et que son analogue le raloxifène n'est pas assez efficace pour invalider MTR. Pendant l'embryogenèse se produit la formation du foie ainsi qu'une prolifération importante des cellules, or notre hypothèse est que MTR est essentielle à la prolifération. C'est ce qui a motivé le choix de l'embryogenèse comme période d'étude, mais les problèmes mentionnés ci-dessus ont empêché une étude plus approfondie.

Le second volet de ce travail a consisté en l'étude des effets métaboliques de la délétion de MTR dans le foie adulte.

Partie 2 : Conséquences de la délétion du gène MTR dans le foie adulte

Pour mener l'étude des conséquences histopathologiques et métaboliques de l'extinction de MTR, nous avons produit une invalidation de MTR dans le foie de souris adultes grâce à deux approches techniques complémentaires, l'une avec le système d'invalidation constitutive, l'autre avec le système d'invalidation inductible. Le système Cre/Lox permet ces deux approches, réalisées avec une lignée exprimant la Cre constitutivement active et une lignée exprimant la Cre inductible.

1. Conséquences de l'invalidation constitutive du gène MTR dans le foie adulte

L'invalidation hépatique homozygote de MTR étant manifestement létale in utero, nous avons par la suite analysé les souris mâles et femelles ayant une invalidation hétérozygote constitutive (Alb-Cre ; MTR^{WT/lox} ou MTR^{+/-}). Ces souris naissent dans des proportions conformes aux ratios mendéliens, sont viables, fertiles et ne présentent pas d'anomalies macroscopiques.

1.1 Mesure de l'expression et de l'activité de MTR

Nous avons analysé la quantité de protéine MTR dans le foie de ces souris à l'âge adulte par Western Blot. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative de l'expression de la protéine méthionine synthase entre les deux groupes (Figure 19). Nous avons par ailleurs dosé l'activité enzymatique de MTR dans les extraits hépatiques, et mis en évidence une diminution de 35% de cette activité dans le groupe des hétérozygotes par rapport au groupe contrôle (Figure 19). Ceci confirme l'efficacité de la délétion de l'allèle MTR conditionnel. La mesure de l'activité enzymatique est quantitative contrairement au western blot, et l'activité de MTR est pour la cellule un paramètre

plus important que la quantité de protéine MTR. Malgré la persistance d'une activité importante de MTR chez nos mutants, nous avons vérifié l'impact d'une diminution de 35% de l'activité de MTR sur le métabolisme des monocarbone et sur l'histologie du foie.

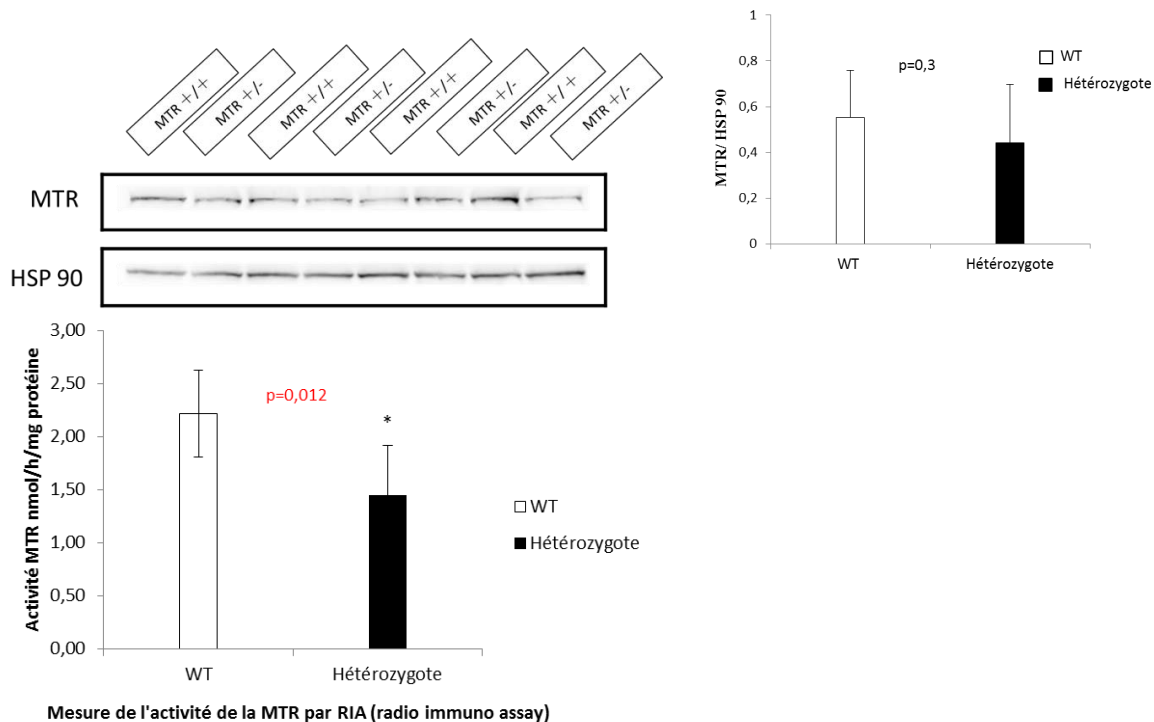


Figure 19: Une diminution de l'activité enzymatique chez les souris hétérozygotes. Analyse par western-blot de la protéine MTR dans le foie des souris ayant une invalidation hépatique hétérozygote du gène MTR (en haut), et analyse densitométrique correspondante (en bas), normalisée par l'expression de la protéine HSP90. Le dosage de l'activité enzymatique MTR dans le foie des souris à invalidation hépatique hétérozygote de MTR a été fait par radio-immunoassay. Les souris testées, mâles et femelles, sont âgées de 5 mois et n=4 par groupe. Les données sont comparées par le test de Student, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

1.2 Impact de l'invalidation hétérozygote sur le métabolisme des monocarbone

Dans le foie des souris adultes MTR+/-, aucun des métabolites plasmatiques ne présente d'altération significative de son taux plasmatique. Le ratio SAM/SAH présente une tendance à la baisse mais qui n'est pas statistiquement significative (Tableau 3,4), ce ratio étant représentatif du « pouvoir de méthylation cellulaire », c'est-à-dire la capacité des cellules à réaliser des réactions de transméthylation. D'une manière générale, le métabolisme des monocarbone ne paraît pas profondément perturbé par une diminution de 35% de l'activité de MTR.

Tableau 4: Dosage des métabolites plasmatiques du métabolisme des donneurs de méthyle.

Paramètre plasmatique	WT	Hétérozygote	p-value
Hcy (μmol/l)	2,83±0,47	2,39±0,5	0,24
MMA (μmol/l)	0,38±0,13	0,32±0,13	0,54
Met (μmol/l)	38,58±13,24	43,08±14,47	0,66
SAM (nmol/l)	376,75±51,72	353,75±22,51	0,45
SAH (nmol/l)	22,73±5,47	27,48±3,15	0,18
SAM/SAH	17,07±3,33	12,96±1,17	0,06
THF (nmol/l)	22,68±4,76	26,05±9,98	0,56
Méthyl-THF (nmol/l)	61,35±11,38	78,18±17,97	0,16
Méthényl-THF (nmol/l)	10,15±2,96	9,18±2,52	0,64

Les souris testées, mâles et femelles, sont âgées de 5 mois et n=4 par groupe. Les données sont comparées par le test de Student, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001)*

Tableau 5: Dosage des métabolites hépatiques du métabolisme des donneurs de méthyle.

Paramètres hépatique	WT	Hétérozygote	p-value
Hcy ($\mu\text{mol/l}$)	9,71 \pm 3,02	10,53 \pm 1,62	0,65
MMA ($\mu\text{mol/l}$)	0,85 \pm 0,24	1,26 \pm 0,56	0,24
Met ($\mu\text{mol/l}$)	86,65 \pm 24,88	99,4 \pm 28,1	0,52
SAM (nmol/l)	328,75 \pm 34,02	481 \pm 47,19	p<0.01
SAH (nmol/l)	2620 \pm 612,26	2257,5 \pm 1022,59	0,57
SAM/SAH	0,13 \pm 0,04	0,24 \pm 0,1	0,08

Les souris testées, mâles et femelles, sont âgées de 5 mois et n=4 par groupe. Les données sont comparées par le test de Student, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001)

1.3 Impact de l'inactivation hétérozygote sur l'histologie du foie

Pour mesurer les conséquences pathologiques de l'inactivation de MTR, nous avons effectué une analyse histo-pathologique du foie des souris hétérozygotes adultes (Figure 20). Aucun signe de stéatose hépatique n'a été détecté.

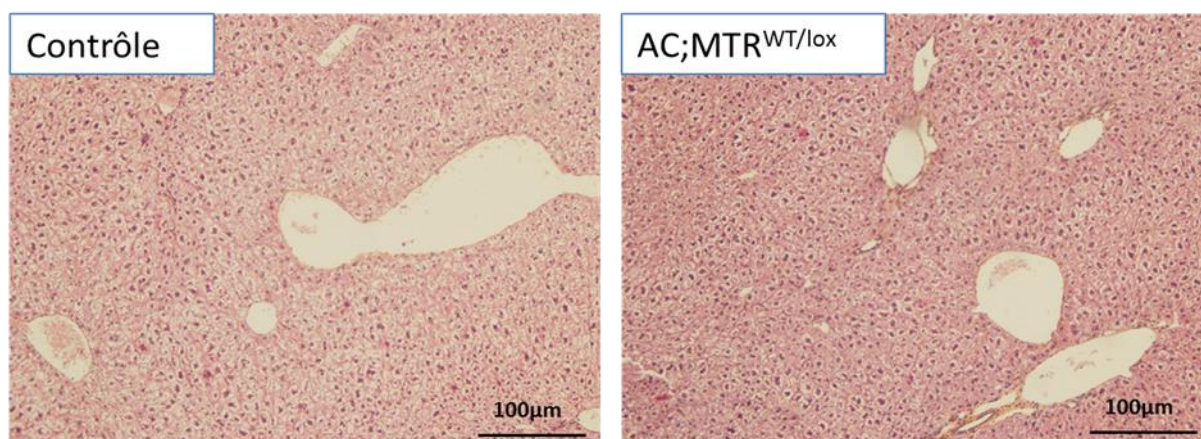


Figure 20: Analyse histo-pathologique du foie des souris hétérozygotes. Une coloration à l'éosine/hématoxyline a été réalisée sur les foies fixés au paraformaldéhyde puis inclus en paraffine et sectionnés au microtome. L'âge des souris est de 5 mois, les mâles et les femelles ont été analysés.

2. Conséquences de l'inactivation inductible du gène MTR dans le foie adulte

Le KO homozygote de MTR étant létal in utero et le KO hétérozygote ne permettant pas une délétion suffisamment marquée de MTR, nous avons testé le système inductible chez l'adulte. Nous avons choisi d'utiliser un protocole d'induction déjà publié et validé par d'autres laboratoires.

2.1 Mesure de l'expression de MTR

Pour valider ce protocole, nous avons pris les souris femelles âgées d'environ 5 mois. Les souris de génotype MTRlox/lox sont utilisées comme témoins et les souris de génotype ACT;MTRlox/lox comme des souris Knockout. Une dose de 2mg de tamoxifène par jour pendant 5 jours consécutifs a été administrée aux souris témoins (notées WT) et aux souris Knockout (KO). Les souris ont été sacrifiées 9 jours après la première injection de tamoxifène (Figure 21).

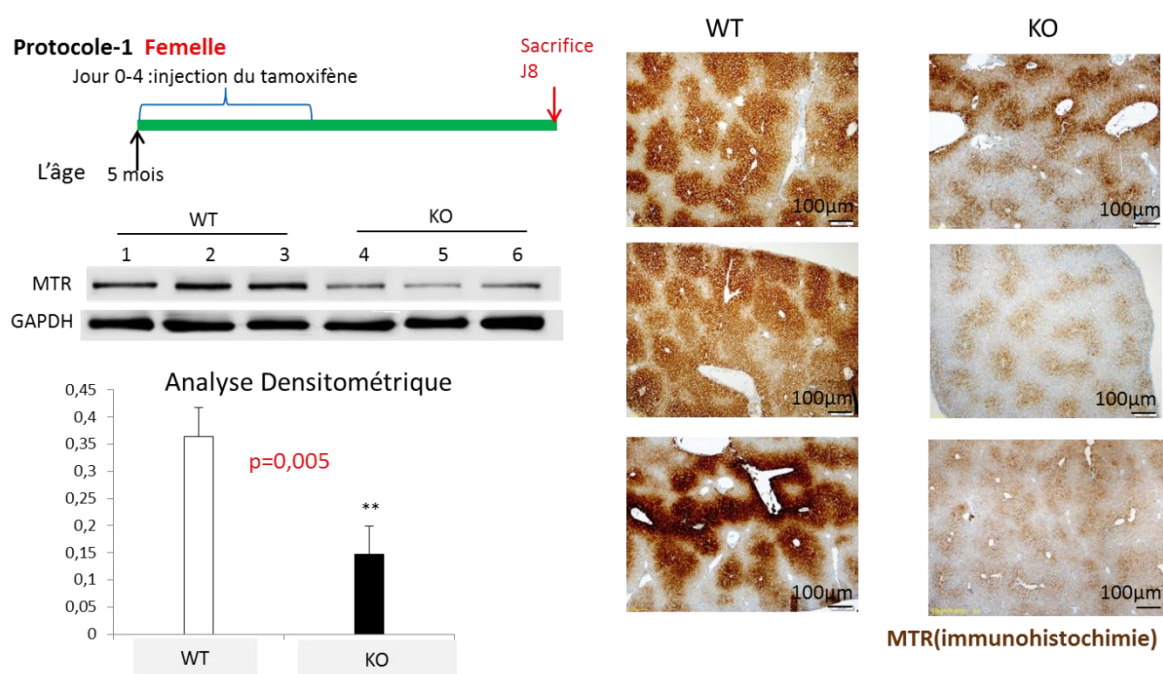


Figure 21 : Diminution de l'expression de la méthionine synthase chez les souris adultes KO MTR induit par le tamoxifène dans le foie. En haut à gauche, protocole d'induction du KO MTR. En dessous, Western-Blot de la méthionine synthase. En dessous, analyse densitométrique du western-blot. A droite, marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-MTR. Les souris testées sont des femelles âgées de 5 mois et n=3 par groupe. Les données sont comparées par le test de Student, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Nous avons analysé la quantité de protéine MTR dans le foie de ces souris à l'âge adulte par Western Blot et mis en évidence une diminution de 60% de la quantité de protéine MTR dans le groupe des Knockout par rapport au groupe Wild type. De plus, les résultats des marquages

immunohistochimiques avec l'anticorps de MTR indiquent une réduction marquée de l'expression de la méthionine synthase dans le foie des souris Knockout en comparaison avec les souris Wild type (Figure 21). Nous constatons que la distribution de l'expression de la méthionine synthase dans le foie n'est pas homogène, elle est plus exprimée dans l'espace périveineux que dans l'espace périportal. Nous montrons ici pour la première fois qu'il y a un effet de zonation du foie de l'expression de la méthionine synthase.

2.2 Impact de l'invalidation inductible sur le métabolisme de monocarbonate

Les dosages plasmatiques et hépatiques des métabolites du cycle des folates et du cycle de la méthionine ont été réalisés dans le plasma et dans le foie des souris adultes. Ils révèlent une augmentation significative de SAM et méthy-THF plasmatique chez les souris Knockout par rapport aux souris Wild type et au niveau tissulaire une diminution significative de 5-formyl-THF des souris Knockout par rapport aux souris Wild type (Tableau 5 et 6). Le ratio SAM/SAH ne présente pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes, ce ratio étant représentatif du « pouvoir de méthylation cellulaire », c'est-à-dire la capacité des cellules à réaliser des réactions de transméthylation. D'une manière générale, le métabolisme des monocarbonnes ne paraît pas profondément perturbé par une diminution de 60% de l'expression de la méthionine synthase pendant 9 jours.

Tableau 6: Paramètres biologiques et métaboliques dans le plasma des souris adultes (5 mois) ayant une invalidation hépatique de MTR induite par le tamoxifène.

Paramètres plasmatique	WT	KO	p-value
Glucose g/L	1,19±0,25	1,39±0,53	0,58
Cholestérol total g/L	0,62±0,03	0,63±0,01	0,62
Triglycérides g/L	0,8±0,19	0,68±0,2	0,49
ALAT UI/L	45±4,58	59,67±13,65	0,15
ASAT UI/L	295±37,27	358±68,23	0,23
Lactate mg/L	458,67±192,46	528,67±91,68	0,74
HDL g/L	0,24±0,02	0,23±0,01	0,37
LDL g/L	0,05±0,02	0,08±0,03	0,19
Acides gras libres µmol/L	837,67±228,14	566,33±266,8	0,25
Hcy (µmol/l)	3.8±2.57	2.61±0.45	0,47
MMA (µmol/l)	0.36±0.12	0.37±0.01	0,94
Met (µmol/l)	72.13±10.89	53.87±7.31	0,07
SAM (nmol/l)	508.67±85.33	754.67±85.45	p<0.05
SAH (nmol/l)	57.90±14.42	73.67±12.51	0,22
SAM/SAH	9.09±2.44	10.32±0.72	0,45
THF (nmol/l)	3,48±1,27	2,73±0,68	0,42
Méthyl-THF (nmol/l)	132,33±11,93	166±16,52	p<0.05
Méthényl-THF (nmol/l)	6,85±2,51	5,62±1,75	0,52
5-Formyl-THF (nmol/l)	0,36±0,03	0,30±0,11	0,45
Ac-Folique (nmol/l)	2,07±0,81	1,13±0,33	0,13

Les souris testées sont des femelles âgées de 5 mois et n=3 par groupe. Les données sont comparées par le test de Student, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (* p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001)

Tableau 7: Dosage des métabolites hépatiques du métabolisme des donneurs de méthyle.

Paramètres hépatique	WT	KO	p-value
Hcy ($\mu\text{mol/l}$)	0,23 \pm 0,07	0,46 \pm 0,24	0,19
MMA ($\mu\text{mol/l}$)	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,68
Met ($\mu\text{mol/l}$)	4,73 \pm 2,40	3,94 \pm 1,85	0,67
SAM (nmol/l)	91,03 \pm 74,56	208,82 \pm 172,87	0,34
SAH (nmol/l)	62,88 \pm 10,42	101,47 \pm 47,21	0,24
SAM/SAH	1,44 \pm 1,14	1,84 \pm 0,72	0,64
THF (nmol/l)	30,61 \pm 6,26	25,35 \pm 4,13	0,29
Méthyl-THF (nmol/l)	52,37 \pm 27,17	67,19 \pm 22,14	0,50
Méthényl-THF (nmol/l)	8,92 \pm 6,41	6,41 \pm 1,35	0,54
5-Formyl-THF (nmol/l)	2,21 \pm 0,09	1,58 \pm 0,25	p<0.05
Ac-Folique (nmol/l)	3,74 \pm 1,04	3,55 \pm 1,10	0,84

Les souris testées sont femelles âgées de 5 mois et n=3 par groupe. Les données sont comparées par le test de Student, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001)

2.3 Impact de l'inactivation inductible sur l'histologie du foie

Pour mesurer les conséquences pathologiques de l'inactivation de MTR, nous avons effectué une analyse histo-pathologique du foie des souris. Des coupes histologiques ont été réalisées dans plusieurs régions du foie pour chaque animal et colorées à l'hématoxyline-éosine, puis les lames ont été analysées par le service d'anatomopathologie. Aucun signe de nécrose, d'inflammation, de fibrose ou de stéatose hépatique (évaluée par la densité de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes) n'a été détecté dans les deux groupes de souris.

2.4 Conséquence de l'inactivation du gène MTR sur la prolifération du foie

L'indice de la prolifération évalué avec l'anticorps Ki-67 est moins élevé dans le groupe Knockout (KO) du gène MTR (0.69% d'hépatocytes positifs pour Ki67) que dans le groupe Wild type (WT) (2.37% d'hépatocytes positifs pour Ki67), mais la différence n'est pas significative à cause de la variance

entre les animaux (Figure 22). Le modèle de Knockout (KO) du gène MTR met en évidence une corrélation entre le taux de cellules Ki-67 positives et le niveau de l'expression de la protéine méthionine synthase.

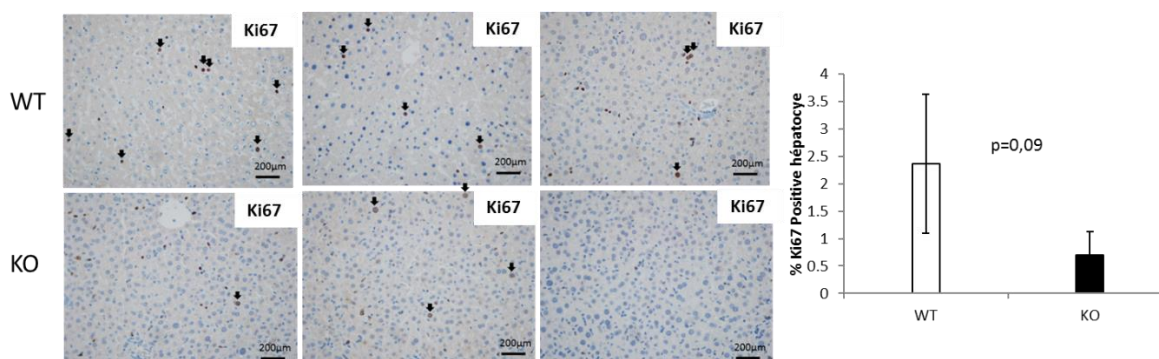


Figure 22: La délétion inducible du gène MTR dans le foie induit une diminution du taux d'hépatocytes positifs pour Ki67. Les marquages immunohistochimiques de la protéine Ki67 (coloration brune) montrent une diminution du taux d'hépatocytes Ki67 positifs dans le groupe Knockout MTR. Cette différence n'est pas significative à cause de la variance intra-groupe trop élevée. Les flèches indiquent les hépatocytes positifs pour Ki67. Les cellules Ki67-positives ont été comptées dans 4 champs aléatoires de la lame. La barre d'échelle représente 200 μ m. Les données sont comparées avec le test de Student, avec $n = 3$ dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Les souris sont des femelles âgées de 5 mois.

2.5 Conséquence de l'invalidation de MTR sur le stress du réticulum

Une carence en vitamine B12 induit la diminution de l'expression de SIRT1. Ceci est corrélé avec une diminution de la prolifération cellulaire (Ghemrawi et al., 2013). La présence d'un stress cellulaire dans les souris knockout du gène MTR est identifié par une augmentation du niveau protéique d'un des transducteurs de stress du réticulum endoplasmique : ATF6 α clivé (Activating transcription factor 6) ($p < 0.05$ Figure 23), en revanche au niveau de l'expression protéique, il n'y a pas de changement de p-PERK, PERK, IRE 1a, p-IRE 1a entre le groupe Wild type et le groupe Knockout. ATF6 α est un récepteur transmembranaire situé sur le réticulum endoplasmique, qui, avec IRE1 et PERK, constitue un senseur de protéines mal repliées. Etant donné le niveau élevé de ATF6 α clivé dans les souris knockout du gène MTR, nous suggérons qu'il existe une réponse au stress du réticulum endoplasmique consécutive à la délétion du gène MTR.

Sirt 1 est très important pour activer le stress du réticulum (Melhem et al., 2015), étant donnée l'augmentation de ATF6 α clivé chez les souris Knockout, nous nous sommes intéressés au niveau de l'expression de Sirt 1. Nous n'avons pas trouvé de différence entre les deux groupes.

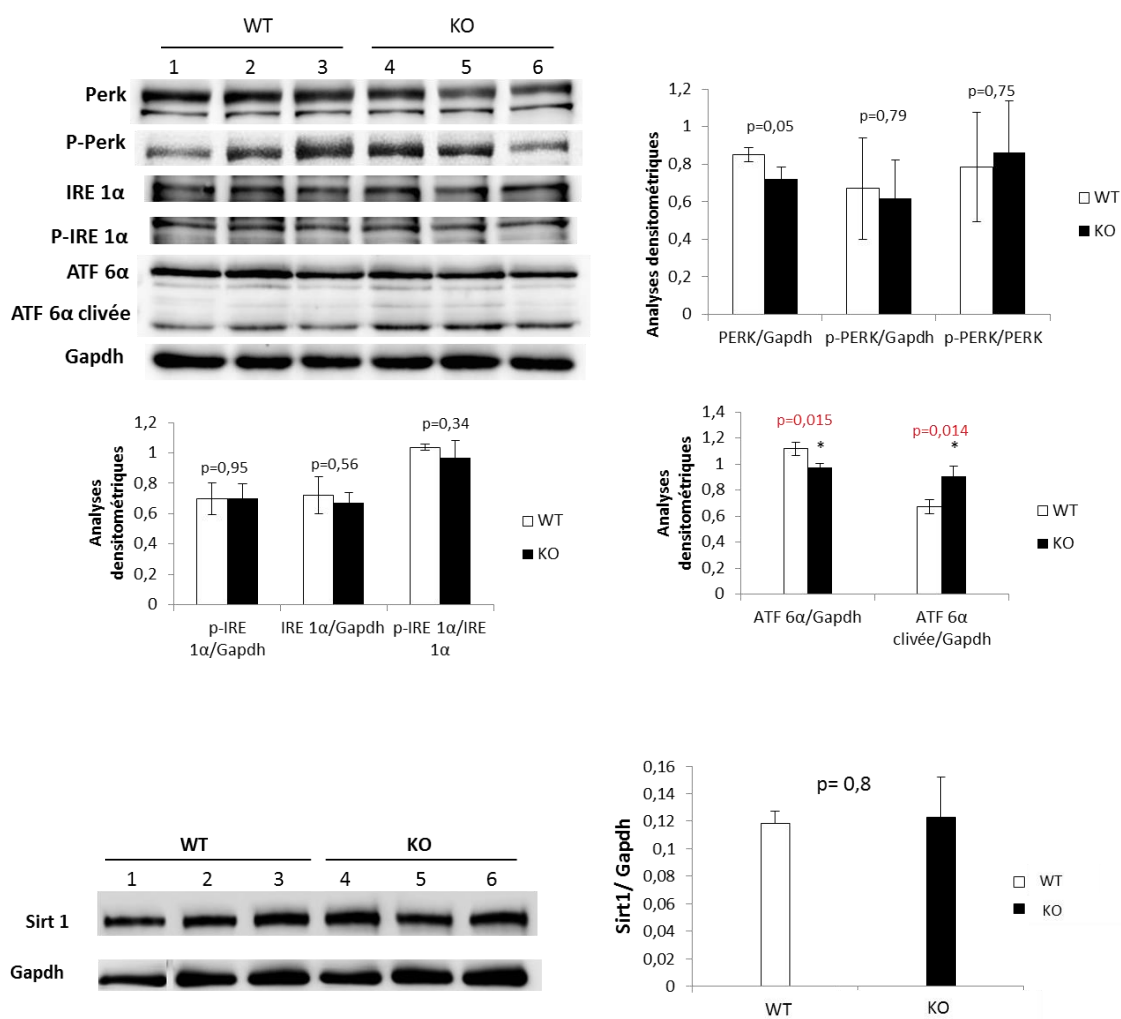


Figure 23: Le knockout inductible du gène MTR dans le foie induit un stress du réticulum endoplasmique (RE) mais n'induit pas une surexpression de Sirt 1. L'expression des protéines p-PERK, PERK, IRE 1α, p-IRE 1α, ATF6α et Sirt 1 a été analysée par Western Blot ($p = \text{phospho}$). Analyses densitométriques des blots : L'intensité des bandes des protéines est normalisée par rapport à l'intensité de la bande de la protéine GAPDH détectée à partir des mêmes blots. Les ratios de p-IRE-1α/IRE-1α, p-PERK/PERK sont calculés en utilisant les résultats de la densitométrie. Les données sont comparées par le Student test, avec $n = 3$ dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Les souris sont des femelles âgées de 5 mois.

Partie 3 : Conséquences de l'inactivation du gène MTR dans un modèle de régénération hépatique

Chez les humains comme chez les rongeurs, Le foie a une capacité de régénération très importante. Le foie peut restaurer pleinement sa masse dans un court laps de temps après une perte tissulaire significative due soit à une résection partielle, soit à une blessure toxique ou virale. La régénération hépatique après hépatectomie partielle (PH) est l'un des modèles les plus étudiés de régénération des organes au niveau cellulaire et tissulaire (Fausto et al., 2006). Le terme « Hépatectomie » désigne l'ablation chirurgicale de la totalité ou d'une partie du foie. La technique de PH 2/3 (hépatectomie partielle des deux tiers de l'organe) pour l'étude de la régénération du foie a été décrite en premier chez le rat. Ce modèle représente une étude historique et est toujours cité jusqu'à aujourd'hui. L'Hépatectomie partielle nous permet de faire les études sur animaux vivants sans que ce soit associé à une nécrose et / ou à une inflammation. La régénération des lobes résiduels est médiée par des processus qui sont spécifiques du tissu hépatique. L'hépatectomie partielle peut être effectuée en quelques minutes et l'initiation du processus de régénération peut être précisément étudiée. Ce modèle a été largement utilisé depuis des années par de nombreux chercheurs.

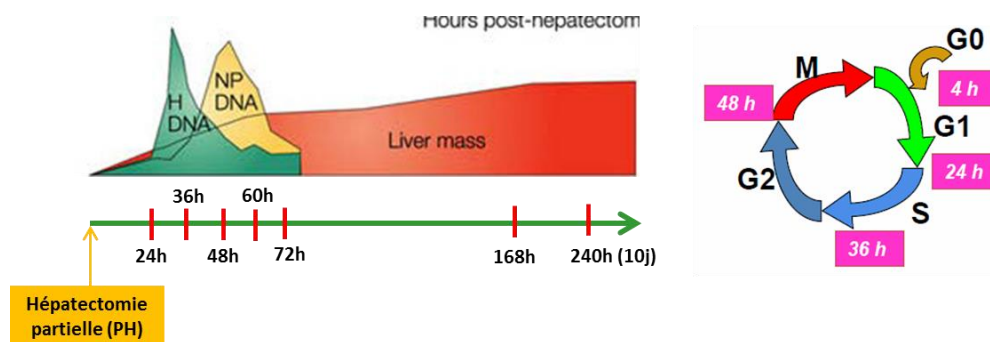


Figure 24: L'initiation de la prolifération du foie après hépatectomie. Le taux de prolifération des hépatocytes commence à augmenter 24 h après hépatectomie et atteint un pic autour de 36 h après hépatectomie. Chez les souris adultes jeunes, le processus de régénération du foie est complet en 7-14 jours.

A l'état physiologique, les hépatocytes sont des cellules quiescentes. L'hépatectomie partielle des deux tiers est le procédé de choix pour étudier le mécanisme de la régénération du foie et la dynamique du cycle cellulaire. Le taux de prolifération des hépatocytes commence à augmenter 24 h après hépatectomie et atteint un pic autour de 36 h après hépatectomie. Chez les souris adultes jeunes, le processus de régénération du foie est complet en 7-14 jours (Figure 24).

1. La régénération du foie est inhibée chez les souris knockout du gène MTR dans le foie après hépatectomie partielle

Afin de déterminer la cinétique de la régénération hépatique post-hépatectomie, nous avons mis en oeuvre l'hépatectomie partielle 2/3 sur les souris femelles sauvages ou KO MTR âgées de 7-9 semaines, 9 jours après la première injection du tamoxifène et nous les avons sacrifiées à 24 heures, 36 heures, 48 heures, 72 heures après l'hépatectomie partielle (Figure 25).

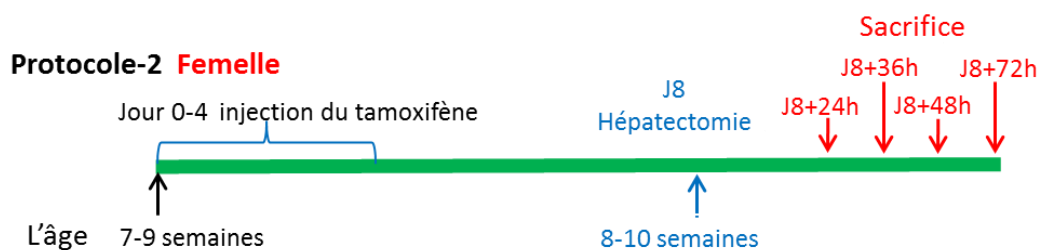


Figure 25: Protocole de l'hépatectomie. Nous avons fait l'hépatectomie partielle 2/3 sur les souris femelles qui ont l'âge de 7-9 semaines à 9 jours après la première injection du tamoxifène, et nous les avons sacrifiées à 24h, 36h, 48h, 72h après l'hépatectomie partielle.

1.1 Mesure de l'expression de MTR

Nous avons analysé la quantité de protéine MTR dans le foie des souris à l'âge adulte par Western Blot et mis en évidence qu'au moment de l'hépatectomie partielle, la quantité de protéine méthionine synthase est bien significativement diminuée dans les groupes des souris Knockout par rapport aux souris Wild type et cet effet de la délétion de la méthionine synthase dure après l'hépatectomie partielle (Figure 26). L'Analyse densitométrique indique une diminution significative de la méthionine synthase ($p < 0.01$) des souris sacrifiées à 48h après l'hépatectomie partielle. A 24h, 36h et 72h après hépatectomie, nous avons bien constaté une diminution de l'expression de la méthionine synthase dans les groupes Knockout, pourtant les effectifs étant insuffisants, c'est impossible de faire les analyses statistiques.

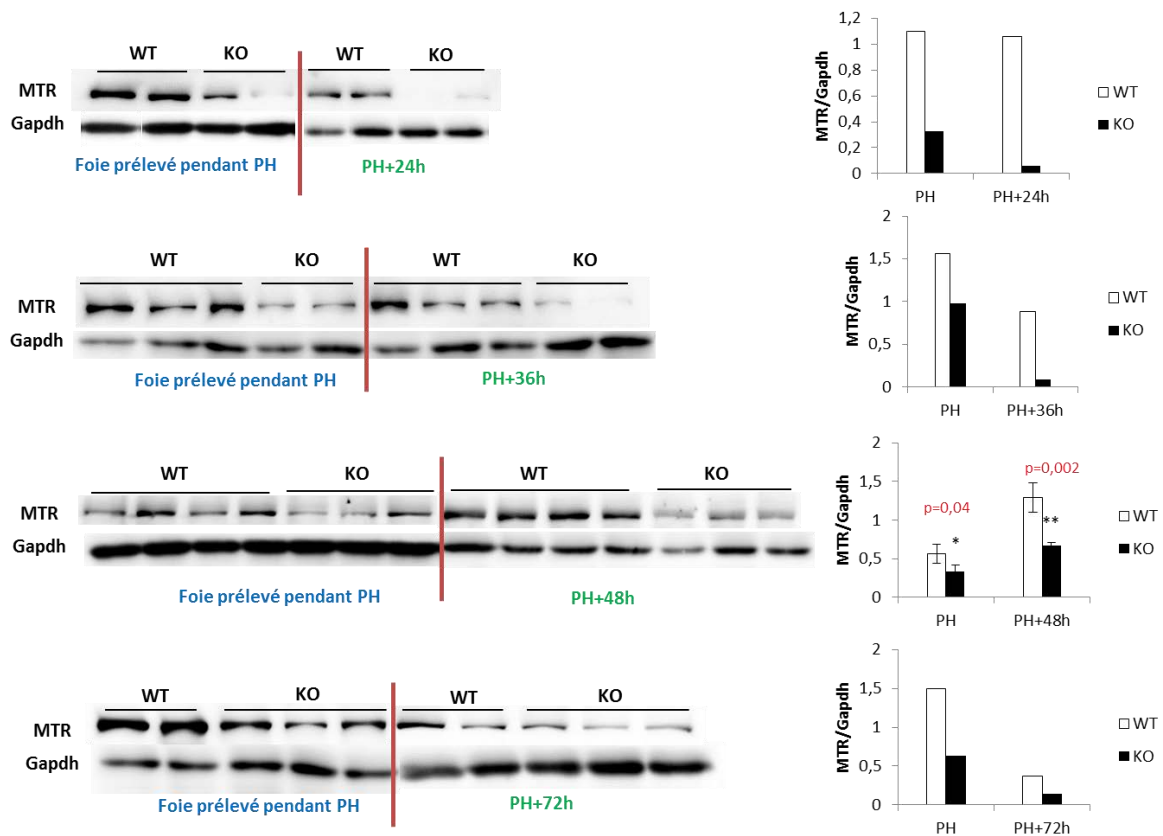


Figure 26: Diminution de l'expression de la protéine méthionine synthase chez les souris knockout du gène MTR dans le foie, pendant ou après hépatectomie partielle, analysée par Western Blot. Les souris ont subi une induction du KO par le tamoxifène, puis une hépatectomie partielle 2/3 (PH), comme indiqué dans le Protocole 2, figure précédente. La partie gauche des Western Blots (« Foie prélevé pendant PH ») représente les échantillons prélevés pendant l'hépatectomie et celle de droite représente les mêmes souris 24h (« PH+24h »), 36h, 48h ou 72h après respectivement. Dans le groupe « PH+48h » il y a une diminution significative de la méthionine synthase chez les souris knockout par rapport aux contrôles correspondants. Dans les autres groupes, il y a une tendance à la diminution de la méthionine synthase, mais les effectifs étant insuffisants, il est impossible de faire les analyses statistiques. Analyse densitométrique des blots : l'intensité des bandes des protéines est normalisée par rapport à la GAPDH obtenue à partir des mêmes blots. PH 24h, 36h, 48h et 72h, n=2, 3, 4 et 2 pour les souris WT respectivement ; n=2, 2, 3 et 3 pour les souris MTR KO respectivement. Les souris sont des femelles âgées de 7-10 semaines. Les données sont comparées par le Student test, présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

1.2 Impact de l'inactivation du gène MTR sur le métabolisme des monocarbone après hépatectomie partielle

Après l'hépatectomie partielle, chez les souris Knockout nous avons observé une diminution significative ($p < 0,05$) de S-adénosyl-homocystéine (SAH) dans le plasma (Tableau 7). Cependant il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes pour les autres métabolites impliqués dans le métabolisme des monocarbone, comme l'homocystéine (Hcy), la méthionine (MET), l'acide méthylmalonique (MMA). Le ratio SAM/SAH ne présente pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes, ce ratio étant représentatif du « pouvoir de méthylation

cellulaire », c'est-à-dire la capacité des cellules à réaliser des réactions de transméthylation. D'une manière générale, le métabolisme des monocarbone ne paraît pas profondément perturbé par une diminution de 60% de l'expression de la méthionine synthase pendant 9 jours.

La carence en donneur de méthyle produit une stéatose hépatique et la perturbation d'oxydation mitochondriale des acides gras (Pooya et al., 2012). Le bilan lipidique plasmatique nous montre les mêmes niveaux de triglycérides (TG), cholestérol et ses fractions LDL et HDL (Tableau 7). Nous suggérons que le métabolisme des acides gras ne paraît pas profondément perturbé par une diminution de 60% de l'expression de la méthionine synthase pendant 9 jours.

Tableau 8: Paramètres biologiques et métaboliques dans du plasma des souris à invalidation hépatique de MTR.

Paramètres plasmatique	WT-PH+48h	KO-PH+48h	p-value
Glucose g/L	1,71±0,22	1,27±0,31	0,11
Cholestérol total g/L	0,52±0,04	1,47±1,3	0,27
Triglycérides g/L	0,57±0,21	0,48±0,29	0,68
ALAT UI/L	64±16	338±449,19	0,35
ASAT UI/L	409,33±23,63	1158,33±1395,74	0,41
Lactate mg/L	633,33±152,92	548,67±195,95	0,59
HDL g/L	0,15±0,01	0,21±0,05	0,09
LDL g/L	0,07±0,03	1,02±1,46	0,32
Acides gras libres µmol/L	417±136,96	329±70,02	0,38
Hcy (µmol/l)	1,02±0,65	1,03±0,2	0,97
MMA (µmol/l)	0,24±0,06	0,33±0,09	0,16
Met (µmol/l)	89,6±6,75	100,17±45,16	0,65
SAM (nmol/l)	372,35±27,16	480,33±247,57	0,41
SAH (nmol/l)	61,41±19,39	26,51±6,01	p<0,05
SAM/SAH	6,46±1,79	20,11±14,61	0,11

Les souris testées sont des femelles âgées de 8-10 semaines et n=3 par groupe. Les données sont comparées par le test de Student, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (* p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001)

1.3 Impact de l'invalidation du gène MTR sur l'histologie du foie après l'hépatectomie partielle

Pour mesurer les conséquences pathologiques de l'invalidation de MTR après l'hépatectomie partielle, nous avons effectué une analyse histo-pathologique du foie des souris. La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des sections hépatiques provenant des souris Wild type et MTR Knockout

après l'hépatectomie partielle a été faite, nous constatons qu'une des souris sacrifiées à 48h après l'hépatectomie partielle présente des lésions nécrotiques dans le foie, par contre nous n'avons pas retrouvé les mêmes lésions à 24h, 36h ou 72h après l'hépatectomie partielle (Figure 27). Aucun signe de stéatose hépatique (accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes) n'a été détecté.

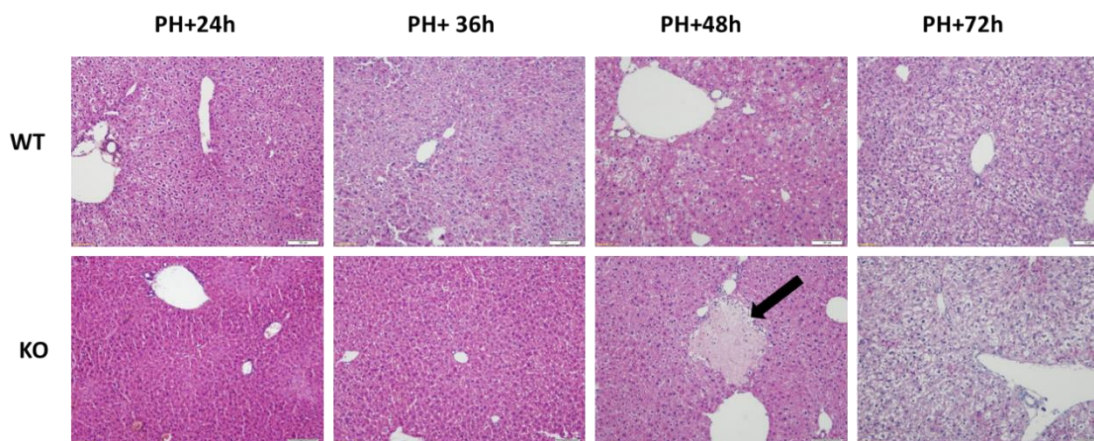


Figure 27: Analyse histopathologique du foie chez les souris adultes ayant une invalidation inducible de MTR. La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine a été réalisée sur des sections hépatiques provenant des souris Wild type et MTR Knockout à différents temps après l'hépatectomie partielle. Une des souris sacrifiées à 48h après l'hépatectomie partielle montre des lésions nécrotiques dans le foie, indiquées par la flèche noire. La barre d'échelle représente 200 μ m.

1.4 L'invalidation du gène MTR a inhibé la prolifération des cellules après l'hépatectomie partielle

Pour déterminer le rôle de la méthionine synthase dans la prolifération du foie, nous avons comparé le nombre des cellules en phase active de cycle cellulaire et la reconstitution du foie des souris WT et KO à 48h après l'hépatectomie partielle. Le nombre des cellules en phase active de cycle cellulaire a été évalué avec l'anticorps dirigé contre Ki-67, la reconstitution du foie a été estimée par le ratio du poids du foie par rapport au poids corporel. Le taux de cellules positives pour Ki 67 chez les souris KO est moins élevé que chez les souris WT, mais la différence n'est pas significative à cause d'une grande variance entre les animaux (Figure 28). Une des souris knockout présente un taux de 0.3% de cellules positives pour Ki67 en comparaison avec le taux de 51% (moyenne) des autres souris KO. Cette souris est celle pour laquelle nous avons trouvé des lésions nécrotiques et elle présente des valeurs plasmatiques de bilirubine totale, cholestérol, ALAT, ASAT et LDL 10 fois plus élevées que les autres souris KO sans nécrose, par ailleurs les taux plasmatiques de Met, MMA et SAM chez cette souris sont beaucoup plus élevés et le taux de SAH moins élevé que les autres souris KO.

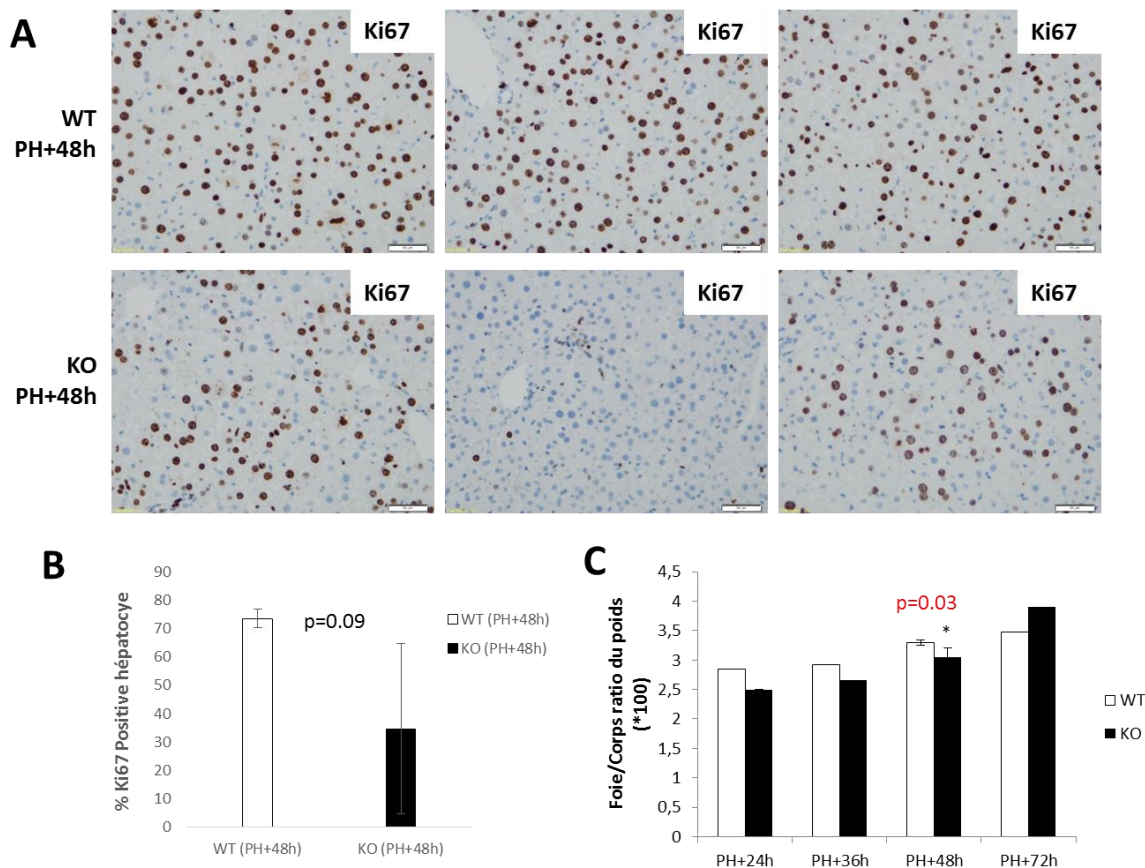
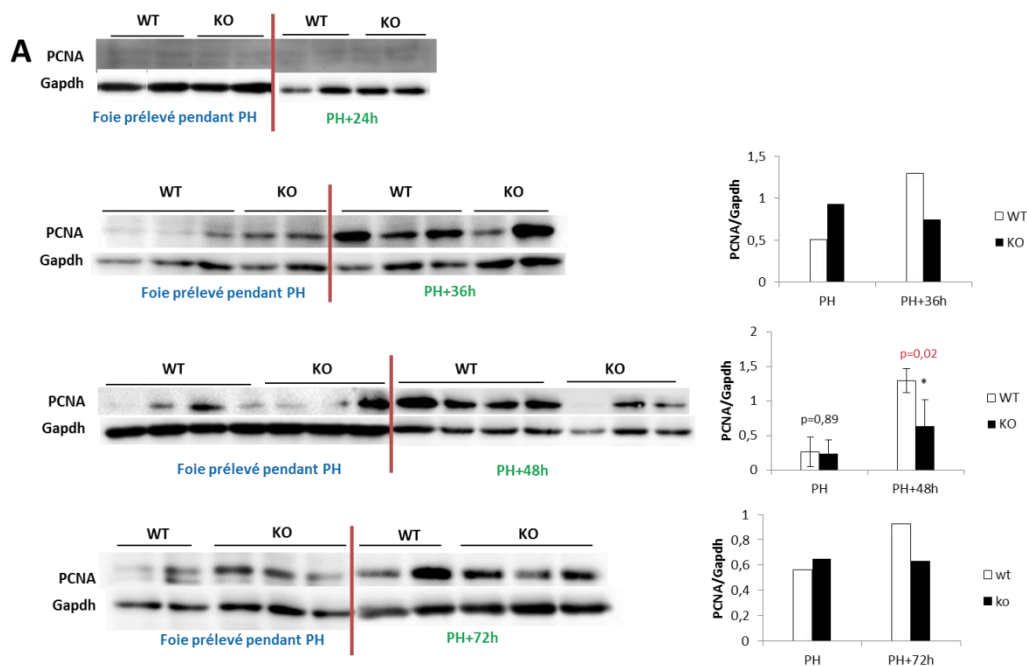


Figure 28 : Inhibition de la prolifération des hépatocytes et de la restauration du poids du foie après PH chez les souris adultes KO MTR. (A). Marquage immunohistochimique de la protéine Ki67 (coloration brune) des sections de foie de souris sacrifiées à 48h après l'hépatectomie partielle. (B) Analyse quantitative de Ki67, réalisée par comptage des noyaux marqués et non marqués, et calcul du pourcentage d'hépatocytes positifs pour Ki67. Les cellules Ki67-positives sont comptées dans 4 champs aléatoires de la section. La barre d'échelle représente 200 μ m. (C) Ratio du poids Foie/Corps après l'hépatectomie partielle. Les données sont comparées avec le test de Student, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Les souris sont des femelles âgées de 8-10 semaines, $n=3$.

Le niveau d'expression de certains régulateurs critiques pour la prolifération des hépatocytes après hépatectomie a alors été examiné. Le PCNA (proliferating cell nuclear antigen) a été initialement identifié comme un antigène qui est exprimé dans les noyaux des cellules pendant la phase de synthèse d'ADN du cycle cellulaire. Il est induit chez les souris WT depuis 36h jusqu'à 72h après hépatectomie partielle. En comparaison avec les souris Wild type, nous avons trouvé une diminution significative ($p < 0.05$) de PCNA chez les souris KO MTR à 48h après hépatectomie (Figure 29). A cause de l'insuffisance des effectifs des souris, nous ne pouvons pas faire des analyses statistiques aux autres temps, mais au vu des valeurs de moyenne, nous avons tout de même constaté une tendance à la diminution de l'expression de PCNA chez les souris KO MTR à 36h et 72h après hépatectomie

partielle (Figure 29). La cycline D1 est une protéine nécessaire pour la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire, elle présente une expression hétérogène dans chaque groupe avec une grande variance, mais nous observons tout de même une tendance de diminution chez les souris KO MTR (Figure 29).

Ces données nous suggèrent une perturbation de la prolifération hépatique et un retard de la reconstitution du foie chez la souris KO après l'hépatectomie partielle.



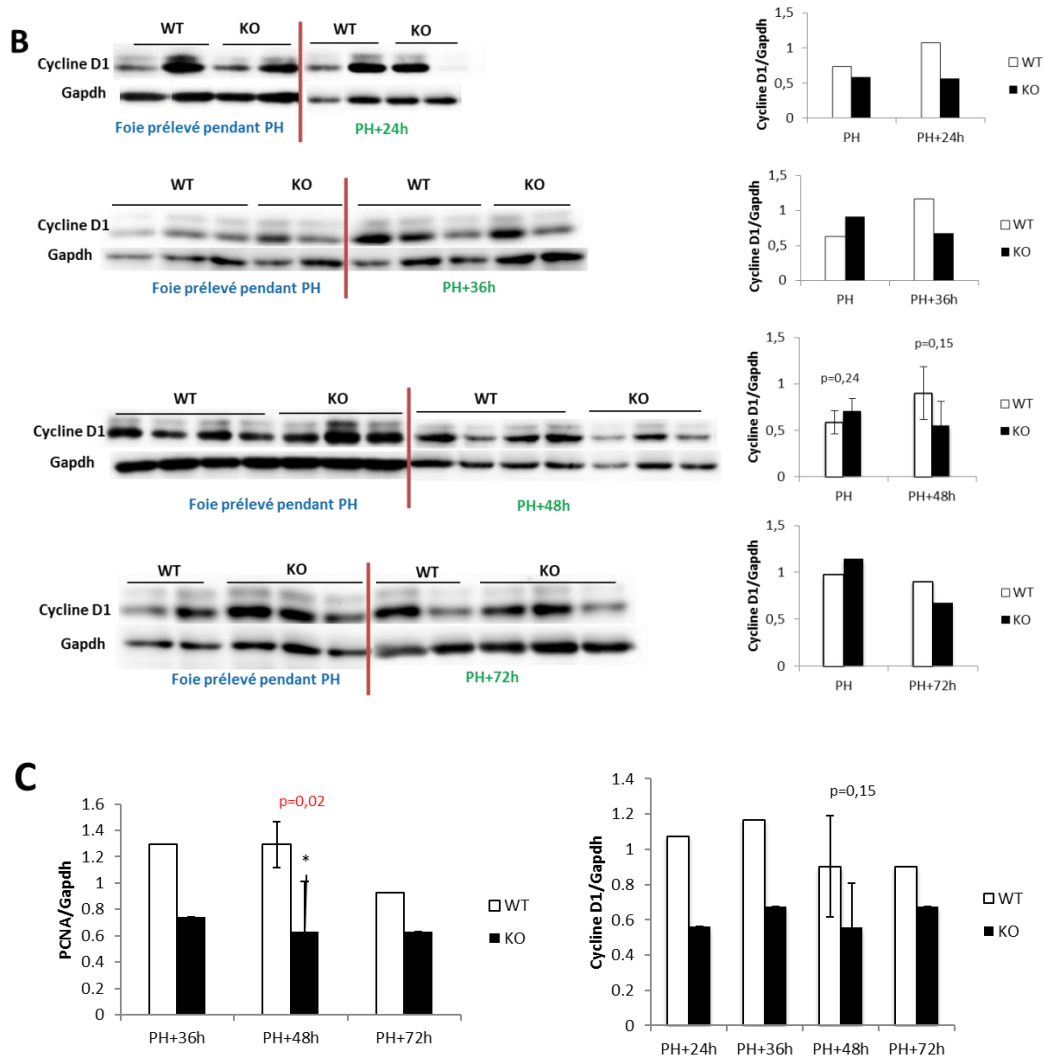


Figure 29: Analyse par western-blot de l'expression de protéines-clés du cycle cellulaire dans le foie des souris KO MTR. (A) Expression de la protéine PCNA analysée par Western Blot ; (B) Expression de la protéine Cycline D1 analysée par Western Blot ; (C) Expression des protéines PCNA et Cycline D1 au cours du temps après hépatectomie. Analyses densitométriques des blots : L'intensité des bandes est normalisée par rapport à l'intensité de la bande de GAPDH obtenue à partir des mêmes blots. PH 24h, 36h, 48h et 72h, n=2, 3, 4 et 2 pour WT respectivement ; n=2, 2, 3 et 3 pour MTR KO respectivement. Les souris sont des femelles âgées de 7-10 semaines. Les données sont comparées par de Student test, présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

1.5 Conséquences de l'inactivation de MTR sur le stress du réticulum après l'hépatectomie partielle

La présence d'un stress cellulaire dans les souris knockout du gène MTR est identifié par une augmentation du niveau protéique d'un des transducteurs de stress du réticulum endoplasmique :

ATF6 α clivé (Activating transcription factor 6) ($p < 0.05$ Figure 31), mais par contre au niveau de l'expression protéique, il n'y a pas de changement de p-PERK, PERK, IRE 1a, p-IRE 1a entre le groupe Wild type et le groupe Knockout. ATF6 α est un récepteur transmembranaire situé sur le réticulum endoplasmique, qui, avec IRE1 et PERK, constitue un senseur de protéines mal repliées. Etant donné le niveau élevé de ATF6 α clivé dans les souris knockout du gène MTR, nous suggérons qu'il existe une réponse au stress due à la délétion du gène MTR.

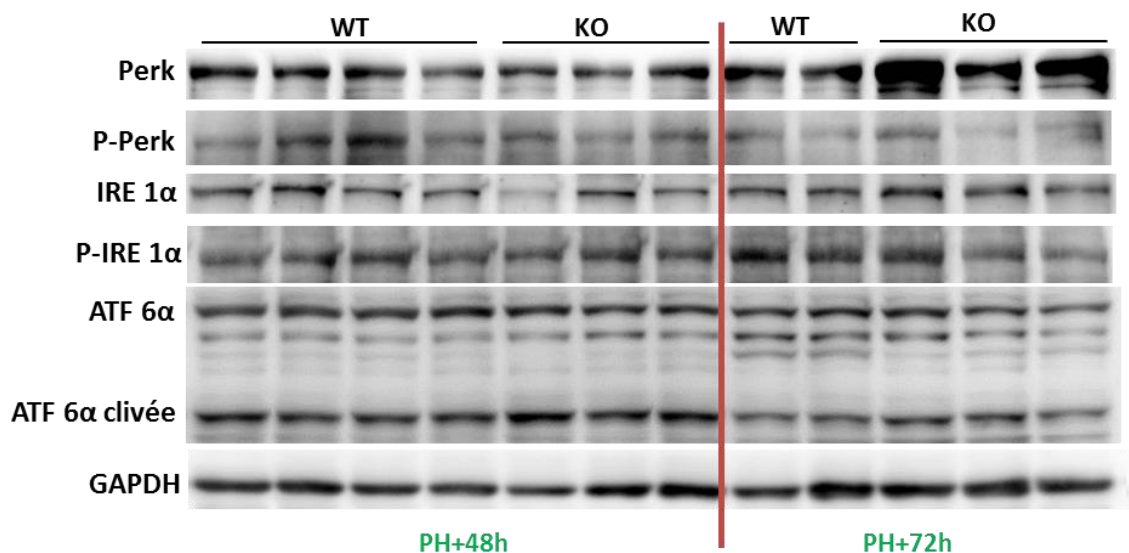


Figure 30 : Activation du stress du réticulum endoplasmique dans le foie des souris Knockout du gène MTR 48h et 72h après l'hépatectomie partielle. L'expression des protéines de p-PERK, PERK, IRE 1a, p-IRE 1a et ATF6 α a été analysée par Western Blot. Analyse densitométrique des blots : l'intensité des bandes des protéines est normalisée par rapport à l'intensité de la GAPDH obtenue à partir des mêmes blots. Les ratios de p-IRE-1 α /IRE-1 α , p-PERK/PERK sont calculés en utilisant les résultats de la densitométrie. PH 48h et 72h, $n=4$ et 2 pour WT respectivement ; $n=3$ et 3 pour MTR KO respectivement. Les souris sont des femelles âgées de 5 mois. Les données sont comparées par le Student test, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

1.6 Conséquences de l'invalidation de MTR sur le processus de l'autophagie après l'hépatectomie partielle

Les stress environnementaux, tels que la pénurie de nutriments et les facteurs de stress cellulaires, déclenchent une réponse cellulaire consistant en une induction de l'autophagie et une inhibition de la prolifération cellulaire (Cianfanelli and Cecconi, 2015). Les marqueurs de l'autophagie, Atg16L1 et Atg5, présentent une tendance à l'augmentation chez les souris KO sacrifiées 48h après l'hépatectomie partielle, et leur niveau d'expression semble être restauré 72h après l'hépatectomie partielle (Figure 31).

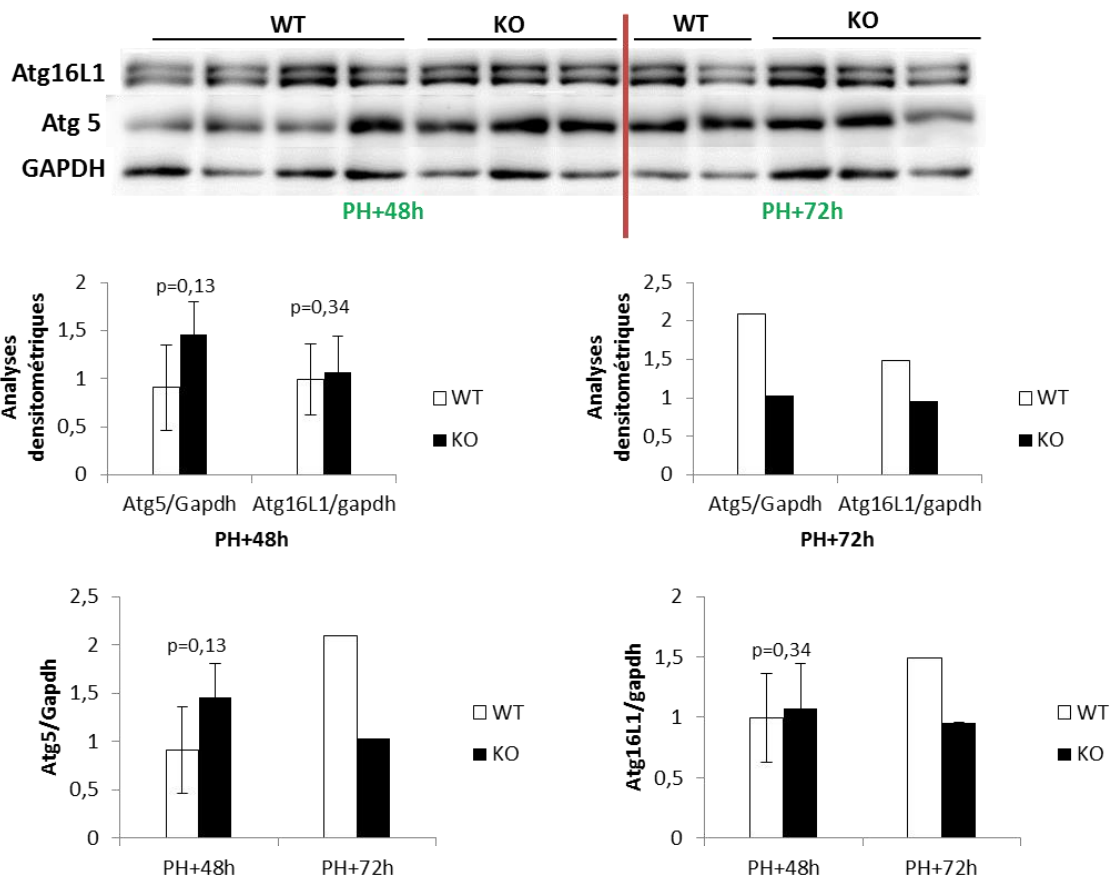


Figure 31: Analyse par Western Blot des niveaux d'expression protéique des marqueurs d'autophagie Atg5 et Atg16L1. En haut : analyse par western-blot. En bas : Analyse densitométrique des blots. L'intensité des bandes des protéines est normalisée par rapport à l'intensité de la GAPDH obtenue à partir des mêmes blots. PH 48h et 72h, n=4 et 2 pour WT respectivement ; n=3 et 3 pour MTR KO respectivement. Les souris sont des femelles âgées de 7-10 semaines. Les données sont comparées par le Student test, présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001).

2. La régénération du foie a été bloquée chez les souris knockout du gène MTR dans le foie 48h après l'hépatectomie partielle

D'après les résultats de protocole 2, nous avons remarqué que 48h après l'hépatectomie partielle représente le moment où les effets d'inhibition de la prolifération hépatique sont optimaux. Nous avons donc choisi de poursuivre l'étude sur les échantillons des souris sacrifiées 48h après l'hépatectomie. Puisque la méthionine synthase est une protéine très stable qui a une longue demi-vie dans les cellules, et que les processus biologiques de déséquilibre du métabolisme sont des processus qui requièrent plusieurs semaines, nous avons choisi d'augmenter la période de l'invalidation à 1 mois au lieu de 9 jours (Protocole 3, Figure 32).

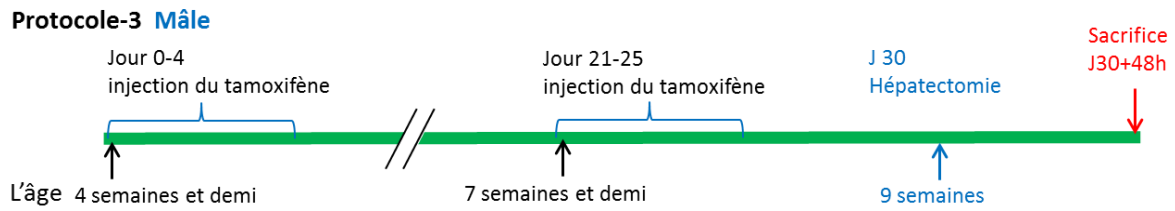


Figure 32: Protocole animal n°3 pour l'induction du KO de MTR suivie d'une hépatectomie. Nous avons fait l'hépatectomie partielle 2/3 sur les souris femelles âgées de 9 semaines, après un mois de délétion du gène MTR induit par le tamoxifène (2 séries d'injections quotidiennes pendant 5 jours consécutifs), et nous les avons sacrifiées 48h après l'hépatectomie partielle.

2.1 Mesure de l'expression de MTR

Pour ce protocole 3, nous avons utilisé les souris femelles âgées d'environ 4 semaines et demi. Une dose de 2mg de tamoxifène par jour pendant 5 jours consécutifs a été donnée aux souris Wild type (WT) et souris Knockout (KO), une répétition de l'injection du tamoxifène (2 mg par jour pendant 5 jours) a été faite deux semaines après la première injection. 30 jours après la première injection, l'hépatectomie partielle a été réalisée et les souris ont été sacrifiées 48h après (Figure 33).

Nous avons analysé la quantité de protéine MTR dans le foie de ces souris à l'âge adulte par Western Blot et mis en évidence une diminution de 50% de la quantité de protéine de la méthionine synthase au moment de l'hépatectomie partielle ainsi qu'une diminution de 80% à 48h après l'hépatectomie partielle (Figure 33). De plus, les résultats de Western Blot indiquent que la méthionine synthase a été mieux déléetée après l'hépatectomie partielle.

Les résultats du marquage immunohistochimique avec l'anticorps MTR confirment les résultats de l'analyse par western-blot et indiquent une forte réduction de l'expression de la méthionine synthase dans le foie des souris Knockout en comparaison avec les souris Wild type (Figure 33).

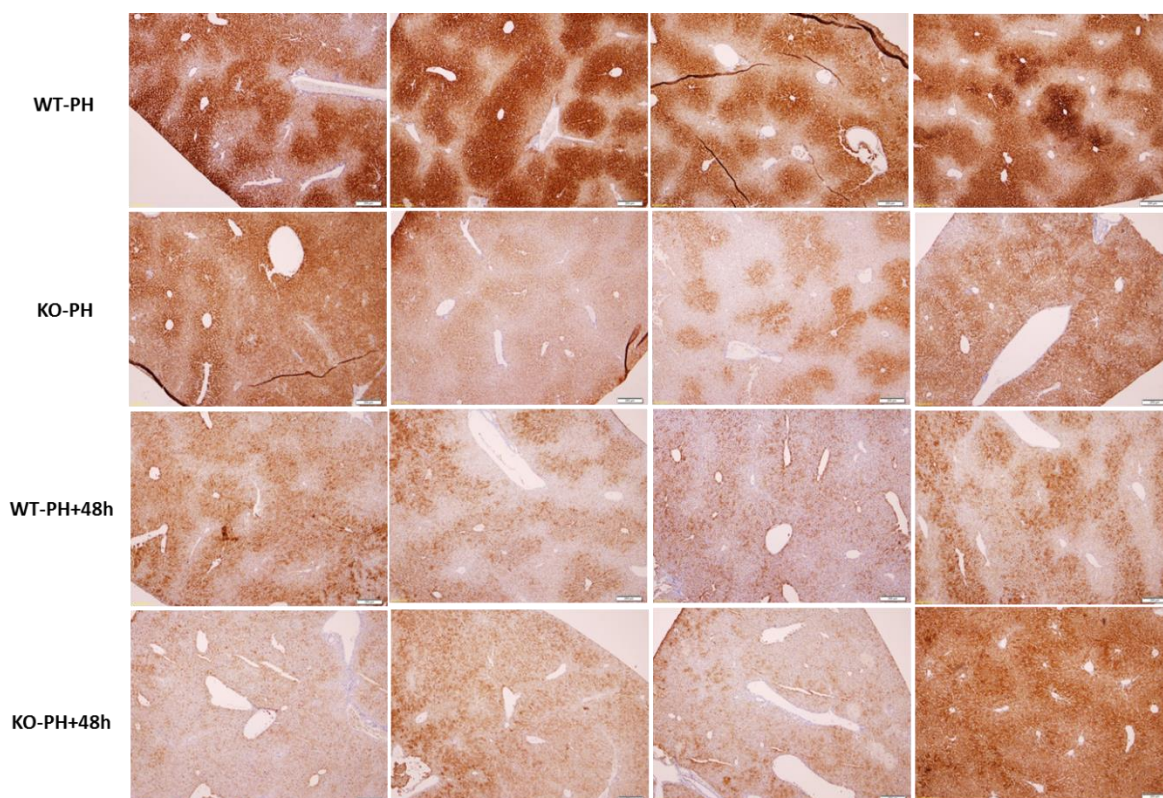
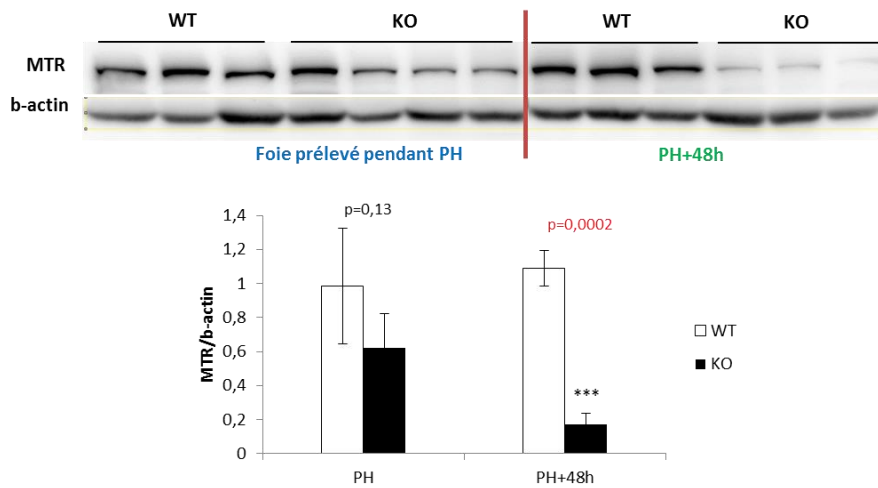


Figure 33: Une diminution de l'expression de la méthionine synthase chez les souris KO. En haut : Western Blot de la méthionine synthase. En dessous : analyse densitométrique de l'intensité des bandes de western-blot. En bas : Détection de la protéine MTR sur les coupes de foie par marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-MTR. Les souris testées sont des femelles âgées de 5 mois et n=3 par groupe. Les données sont comparées par le test de Student, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

2.2 Impact de l'inactivation du gène MTR sur le métabolisme de monocarbonate

Après l'hépatectomie partielle, nous n'avons pas observé de différence significative des métabolites impliqués dans le métabolisme des monocarbonnes en comparant les deux groupes de souris.

Chez les rats, la carence en donneurs de méthyle produit une stéatose hépatique et la perturbation de l'oxydation mitochondriale des acides gras (Pooya et al., 2012). Le bilan lipidique plasmatique des souris KO MTR indique les mêmes niveaux de triglycérides (TG), de cholestérol et de ses fractions LDL et HDL que chez les souris contrôles (Tableau 8).

Tableau 9 : Paramètres biologiques et métaboliques dans le plasma des souris ayant une invalidation hépatique de MTR induite, 48h après hépatectomie.

Paramètres plasmatique	WT-PH+48h	KO-PH+48h	p-value
Glucose g/L	1,03±0,25	1,18±0,2	0,38
Cholestérol total g/L	0,56±0,06	1,52±0,91	0,08
Triglycérides g/L	0,47±0,08	0,36±0,27	0,48
Tbil mg/L	8,75±15,5	47,75±53,51	0,21
ALAT UI/L	103±7,75	407,25±433,3	0,21
ASAT UI/L	205±34,65	1304,25±1534,1	0,20
Lactate mg/L	698±217,65	545±220,68	0,44
HDL g/L	158,5±104,97	550±802,38	0,37
LDL g/L	0,24±0,03	0,2±0,11	0,51
Acides gras libres µmol/L	0,23±0,04	1,22±1,09	0,12
Hcy (µmol/l)	0,8±0,14	0,94±0,34	0,56
MMA (µmol/l)	0,3±0,04	0,34±0,09	0,54
Met (µmol/l)	52,3±9,57	67,7±8,2	0,07
SAM (nmol/l)	265±64,71	360±102,14	0,22
SAH (nmol/l)	30,5±9,17	53,25±25,48	0,21
SAM/SAH	8,78±0,5	7,21±1,71	0,19

Les souris testées sont des femelles âgées de 9 semaines et n=3 par groupe. Les données sont comparées par le test de Student, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (* p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001)

2.3 Impact de l'inactivation du gène MTR sur l'histologie du foie

Pour mesurer les conséquences pathologiques de l'inactivation de MTR après l'hépatectomie partielle, nous avons effectué une analyse histo-pathologique du foie des souris. La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des sections hépatiques provenant des souris Wild type et Knockout MTR 48h après l'hépatectomie partielle a été faite, nous constatons que l'une des souris KO MTR comporte des lésions nécrotiques dans le foie (Figure 34). Aucun signe de stéatose hépatique n'a été détecté.

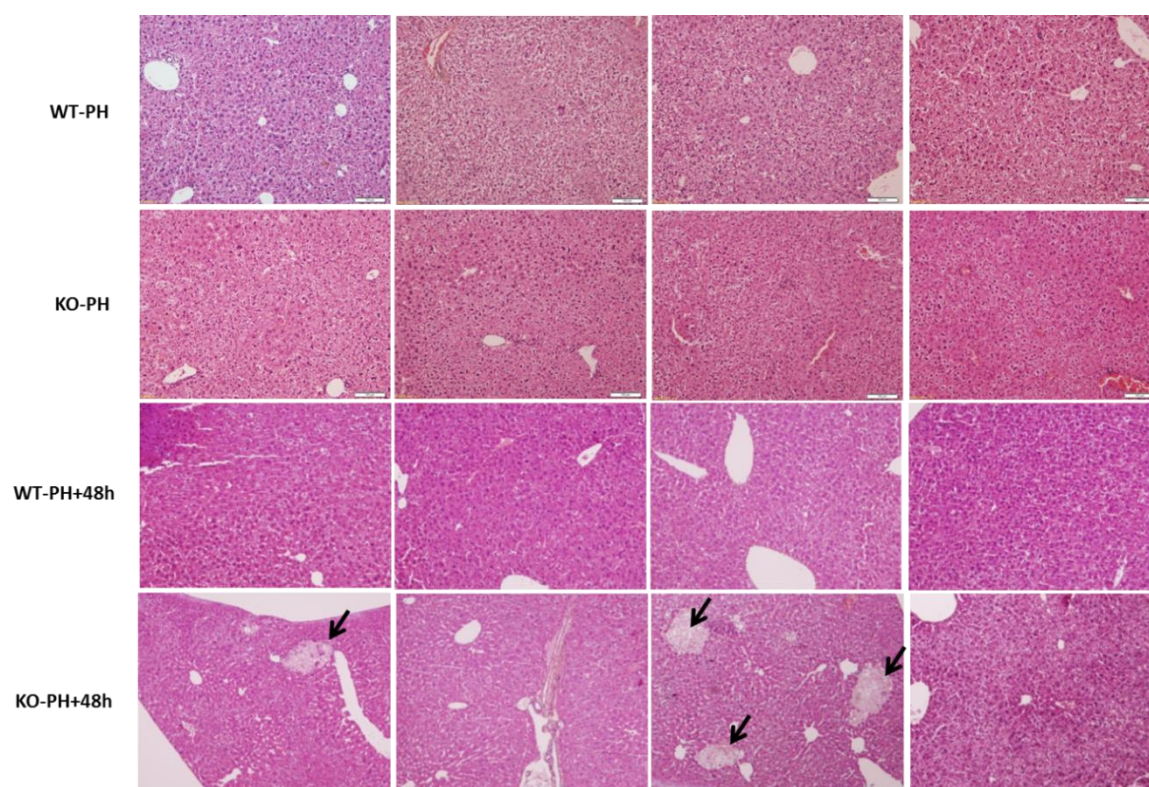


Figure 34: Analyse histopathologique du foie chez les souris adultes ayant une inactivation inducible de MTR. La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine a été réalisée sur des sections hépatiques provenant des souris Wild type et MTR Knockout 48h après l'hépatectomie partielle. Une des souris sacrifiées à 48h après l'hépatectomie partielle montre des lésions nécrotiques dans le foie, indiquées par la flèche noire. La barre d'échelle représente 200 μ m.

2.4 L'inactivation du gène MTR inhibe la prolifération du foie après hépatectomie

Pour déterminer le rôle de la méthionine synthase dans la prolifération du foie, nous avons évalué le nombre de cellules en phase active du cycle cellulaire et la reconstruction du foie chez les souris WT et KO MTR 48h après l'hépatectomie partielle. Le nombre des cellules en phase active de cycle cellulaire a été évalué d'après des immunomarquages de coupes de foie avec l'anticorps Ki-67, la

reconstruction du foie a été estimée par le calcul du ratio poids du foie/poids du corps. L'index de prolifération des souris KO est nettement moins élevé que celui des souris WT ($p < 0.01$ Figure 35). En revanche, il n'y a pas de différence du ratio poids du foie/poids du corps entre les deux groupes.

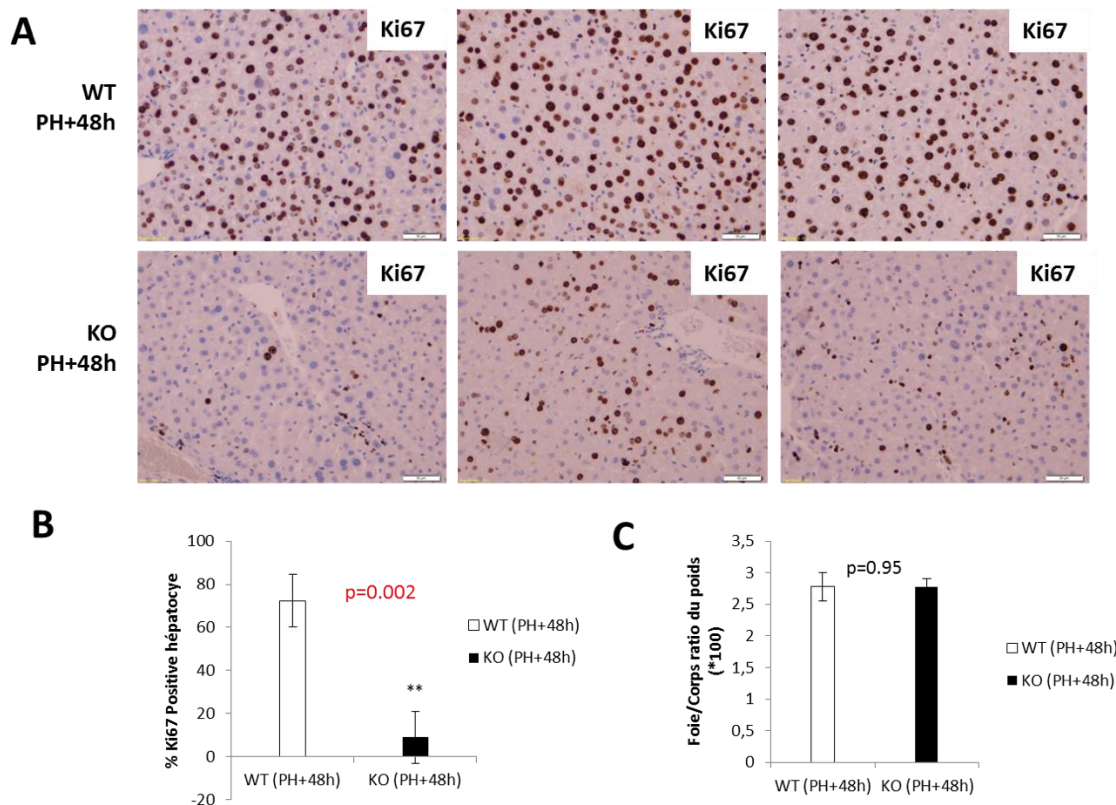


Figure 35: Inhibition de la prolifération des hépatocytes et de la restauration du poids du foie après PH chez les souris adultes KO MTR. (A). Les images représentant l'immunohistochimie de la protéine Ki67 (marron) des sections de foie qui ont été collectées de souris sacrifiées à 48h après l'hépatectomie partielle. (B) L'analyse quantitative de Ki67 a été faite par comptage et calcul du pourcentages des hépatocytes positifs pour Ki67. Les cellules Ki67 positives sont comptées dans 5 champs aléatoires de la section. La barre d'échelle représente 200 μm . (C) Mesure du ratio poids du Foie/poids du Corps après l'hépatectomie partielle. Les données sont comparées avec le test de Student, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Les souris sont des femelles âgées de 8-10 semaines, $n=3$.

Les deux souris knockout qui ont des lésions nécrotiques présentent un index prolifératif moins élevé que celle qui n'a pas de nécrose. De plus, les valeurs de bilirubine totale, cholestérol, ALAT, ASAT et LDL sont beaucoup plus élevées que pour les autres souris KO sans nécrose (bilirubine totale moyenne 94mg/L v.s. 17mg/L ; cholestérol moyenne 2.30 g/L v.s. 0.75g/L ; ALAT moyenne 729.5 UI/L v.s. 85 UI/L ; ASAT moyenne 2355.5 UI/L v.s. 253 UI/L ; LDL 2.15 g/L v.s. 0.29 g/L).

Le niveau d'expression des régulateurs critiques pour la prolifération des hépatocytes après hépatectomie a été mesuré. PCNA (proliferating cell nuclear antigen) a été initialement identifié

comme un antigène exprimé dans les noyaux des cellules pendant la phase de synthèse d'ADN du cycle cellulaire. Il est induit chez les souris WT depuis 36h jusqu'à 72h après hépatectomie partielle. En comparaison avec les souris Wild type, nous avons trouvé une diminution significative ($p < 0.001$) de PCNA chez les souris KO MTR 48h après hépatectomie (Figure 36). Ces données nous suggèrent une perturbation de la prolifération hépatique chez les souris KO MTR.

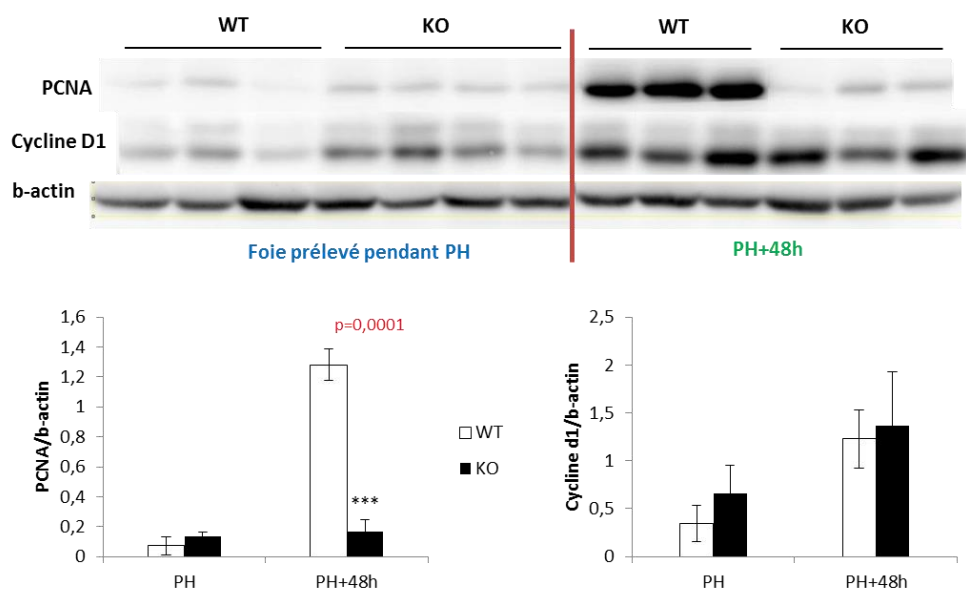


Figure 36: Analyse par western-blot de l'expression de protéines-clés du cycle cellulaire dans le foie des souris KO MTR 48h après hépatectomie (protocole n°3). En haut : Expression des protéines PCNA et Cycline D1 analysée par Western Blot. En bas : Analyses densitométriques des blots : L'intensité des bandes est normalisée par rapport à l'intensité de la bande de GAPDH obtenue à partir des mêmes blots. PH + 48h.

2.5 Analyse transcriptomique du foie des souris KO MTR 48h après hépatectomie

Pour obtenir une vue de l'ensemble des processus et des gènes dérégulés par le KO de MTR, nous avons extrait les ARN totaux des échantillons de foie WT ou KO MTR prélevés pendant l'hépatectomie partielle (PH) ou 48h après (PH+48h). Nous avons donc constitué 4 groupes, notés WT-PH, KO-PH, WT-PH+48h, KO-PH+48h.

L'efficacité de la délétion de MTR a été vérifiée par RT-qPCR avec des amorces spécifiques de MTR. Les ARN ont été analysés quantitativement et qualitativement par Bioanalyzer (Agilent Technologies). L'analyse transcriptomique a été faite sur puces GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix) au Laboratoire de Génomique et de Protéomique de l'Institut de Santé du Luxembourg (Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg. <http://www.lih.lu/>).

L'analyse bioinformatique a d'abord comporté une correction et une normalisation avec la suite Partek (www.partek.com/), puis une analyse statistique de l'expression différentielle avec le logiciel libre de traitement des données et d'analyse statistiques R (www.r-project.org). L'analyse des voies et des gènes dérégulés a été réalisée avec le logiciel PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, pantherdb.org), initialement développé par le laboratoire du Pr. Thomas (University of Southern California, USA) pour classifier les protéines et leurs gènes en vue de faciliter leur analyse à haut débit (Mi et al., 2005, 2015; Thomas et al., 2003). Un protocole d'utilisation de PANTHER a été publié (Mi et al., 2013). PANTHER est un système d'analyse globale qui combine la fonction du gène, son ontologie, les voies dans lesquelles il est impliqué et des outils statistiques. Il permet une analyse à grande échelle sur l'ensemble du génome, à partir de données provenant du séquençage, de la protéomique ou de mesure de l'expression génique.

Nous avons d'abord sélectionné les gènes qui ont une différence significative (avec $FDR < 0,001$) au niveau de l'expression entre les souris WT et KO sacrifiées 48h après l'hépatectomie partielle. Les annotations fonctionnelles des gènes ont été faites par PANTHER, ce qui a permis d'identifier différents processus biologiques dérégulés : la régulation du cycle cellulaire, le cycle cellulaire et la mitose (Figure 37), et nous avons obtenu une liste de gènes de chacun de ces 3 processus biologiques (nombre de gènes encadrés en rouge dans la figure 37).

	Mus musculus (REF)	Client Text Box Input (▼ Hierarchy NEW! ?)				
PANTHER GO-Slim Biological Process	#	#	expected	Fold Enrichment	+/-	P value
chromatin assembly	26	9	.59	15.24	+	3.21E-06
↳ organelle organization	767	81	17.42	4.65	+	6.76E-28
↳ cellular component organization	1627	107	36.95	2.90	+	6.25E-21
↳ cellular component organization or biogenesis	1767	108	40.13	2.69	+	9.33E-19
chromosome segregation	111	30	2.52	11.90	+	4.25E-20
↳ cellular process	8700	261	197.60	1.32	+	1.90E-06
DNA recombination	49	11	1.11	9.88	+	6.49E-06
↳ DNA metabolic process	344	61	7.81	7.81	+	3.54E-32
↳ nucleobase-containing compound metabolic process	3157	135	71.70	1.88	+	3.40E-11
↳ primary metabolic process	5922	196	134.51	1.46	+	4.21E-07
↳ metabolic process	6955	225	157.97	1.42	+	7.00E-08
regulation of gene expression, epigenetic	69	15	1.57	9.57	+	3.04E-08
DNA replication	146	28	3.32	8.44	+	6.77E-15
DNA repair	162	28	3.68	7.61	+	8.92E-14
meiosis	47	8	1.07	7.49	+	3.77E-03
↳ cell cycle	867	81	19.69	4.11	+	1.97E-24
chromatin organization	279	46	6.34	7.26	+	1.42E-22
mitosis	355	46	8.06	5.70	+	1.96E-18
cytokinesis	111	14	2.52	5.55	+	9.88E-05
regulation of cell cycle	107	11	2.43	4.53	+	1.08E-02
cytoskeleton organization	154	15	3.50	4.29	+	9.01E-04
cellular component movement	403	26	9.15	2.84	+	7.20E-04
catabolic process	783	43	17.78	2.42	+	3.69E-05
cellular component biogenesis	491	25	11.15	2.24	+	4.84E-02
nitrogen compound metabolic process	2001	99	45.45	2.18	+	4.28E-11
phosphate-containing compound metabolic process	1251	56	28.41	1.97	+	3.39E-04
Unclassified	9053	187	205.62	.91	-	0.00E00
response to stimulus	3345	48	75.98	.63	-	3.73E-02
developmental process	2027	24	46.04	.52	-	3.78E-02
G-protein coupled receptor signaling pathway	813	3	18.47	< 0.2	-	2.24E-03
↳ cell surface receptor signaling pathway	1625	10	36.91	.27	-	1.84E-05
↳ signal transduction	2728	29	61.96	.47	-	1.71E-04
↳ cell communication	3008	31	68.32	.45	-	1.73E-05
sensory perception	1283	2	29.14	< 0.2	-	1.13E-08
↳ neurological system process	1770	5	40.20	< 0.2	-	2.27E-10
↳ system process	1992	10	45.24	.22	-	1.82E-08
↳ single-multicellular organism process	2527	16	57.40	.28	-	4.03E-09
↳ multicellular organismal process	2628	16	59.69	.27	-	6.03E-10

Figure 37: Les annotations fonctionnelles de gènes analysés par le logiciel PANTHER. Des puces Affymetrix ont été utilisées pour faire l'analyse d'expression différentielle des gènes dans le foie des souris sauvages ou ayant une invalidation de MTR, sacrifiées 48h après hépatectomie partielle. Les gènes dérégulés ont été identifiés et regroupés selon leurs annotations fonctionnelles par le logiciel PANTHER, et les processus cellulaires majoritairement dérégulés ont été identifiés. La colonne « Mus Musculus Ref » répertorie le nombre de gènes totaux existant pour le processus concerné dans la base de données PANTHER, et la colonne juste à droite de celle-ci répertorie le nombre de gènes qui ont été trouvés comme étant dérégulés chez les souris KO par rapport aux souris contrôles, et appartenant à ce même processus. GO : Gene Ontology (processus dans lesquels le gène

est impliqué) ; *Fold enrichment* : ratio de l'expression du gène dans le groupe KO MTR par rapport à l'expression dans le groupe contrôle ; *P-value* : valeur de *p* dans le test statistique de Student. Sont entourés d'un cadre rouge les 3 processus biologiques d'intérêt pour notre étude, à savoir la mitose, la cytokinèse et la régulation du cycle cellulaire.

A la suite, nous avons sélectionné parmi ces gènes ceux qui ont une différence significative (avec $FDR < 0,05$) d'expression entre les 4 groupes (WT-PH, KO-PH, WT-PH+48h, KO-PH+48h). Voici la liste des gènes ainsi identifiés :

Processus "régulation du cycle cellulaire" : Top2a, Aurka, Birc5, Ube2c, Brca1, Aurkb, Sae1, Cdc45.

Processus "cycle cellulaire" : Actg1, Aurka, Aurkb, Birc5, Blm, Brca1, Bub3, Ccnb2, Ccna2, Cdc20, Cdc25c, Cdc45, Cdk5rap2, Cdkn1b, Cdk1, Cdkn2d, Cep128, Cks2, Dbf4, Efcab11, Esco2, Espl1, Exo1, Fen1, Gen1, Gins1, Gins2, Gpsm2, Iqgap3, Kif18a, Kif18b, Lin54, Mastl, Mcm5, Mcm7, Mcm8, Mob3b, Ncapd2, Ncapd3, Ncapg, Ndc80, Nde1, Nfatc2ip, Nucks1, Nudcd2, Nuf2Orc6, Pkmyt1, Plk1, Polh, Prc1, Prim1, Rad21, Rbl1, Rpa1, Sae1, Sass6, Slfn9, Smc2, Smc4, Top2a, Topbp1, Tpx2, Ttk, Tubb5, Tubb6, Tubd1, Ube2c, Zak.

Processus "mitose" : Actg1, Birc5, Bub3, Ccna2, Ccnb2, Cdk1, Cdk5rap2, Esco2, Cep128, Espl1, Gpsm2, Kif18a, Kif18b, Mob3b, Ncapd2, Ncapd3, Ncapg, Ndc80, Nde1, Nucks1, Nudcd2, Nuf2, Pkmyt1, Polh, Prc1, Rad21, Sass6, Smc2, Smc4, Tpx2, Ttk, Tubd1, Ube2c.

Il existe de nombreuses interactions entre ces trois processus, nous avons donc sélectionné les gènes communs des processus "cycle cellulaire" et "mitose": Cyclin A2, Cyclin B1, Cyclin B2, Cdc 2, CDK 2, Wee 1, CDC 25. Nous avons vérifié que l'altération des niveaux d'ARN correspondant à ces gènes était statistiquement significative (critère utilisé : Fold Change > 5 dans la comparaison KO versus WT 48h après hépatectomie), et nous avons analysé par western-blot la quantité de protéines correspondantes.

2.6 L'invalidation du gène MTR bloque le cycle cellulaire dans le foie après hépatectomie

48h après l'hépatectomie partielle, nous observons une diminution de la quantité des protéines Cycline A2 et Cycline B2 chez les souris KO (Figure 38). La cycline A2 peut activer deux CDK différentes, elle se lie à CDK2 dans la phase S et à CDC 2 pendant la transition de phase G2 à phase M. Le complexe Cycline B2/Cdc2 joue un rôle très important dans le cycle cellulaire, ce complexe est activé par phosphorylation activatrice de la Thréonine 161 de cdc2. Il est inhibé par

déphosphorylation de la Thréonine 161 de cdc2 et phosphorylation inhibitrice de la Tyrosine15 par coopération des kinases Wee1 et Mik1. Ce complexe inhibé peut être réactivé par cdc25 qui déphosphoryle les résidus Tyrosine 15 et Thréonine 14. Nous avons observé une diminution de Phospho-Cdc2 (Thr161), ce qui indique une diminution de l'activité du complexe Cycline B2/Cdc2. Cdk 2 est essentiel pour la transition G1/S, il se lie à la Cycline A pour la transition vers la phase S. La diminution de Phospho-Cdk2 (Thr160), Phospho-Cdk2 (Tyr15) et Cdk 2 chez les souris KO indique un blocage du cycle cellulaire.

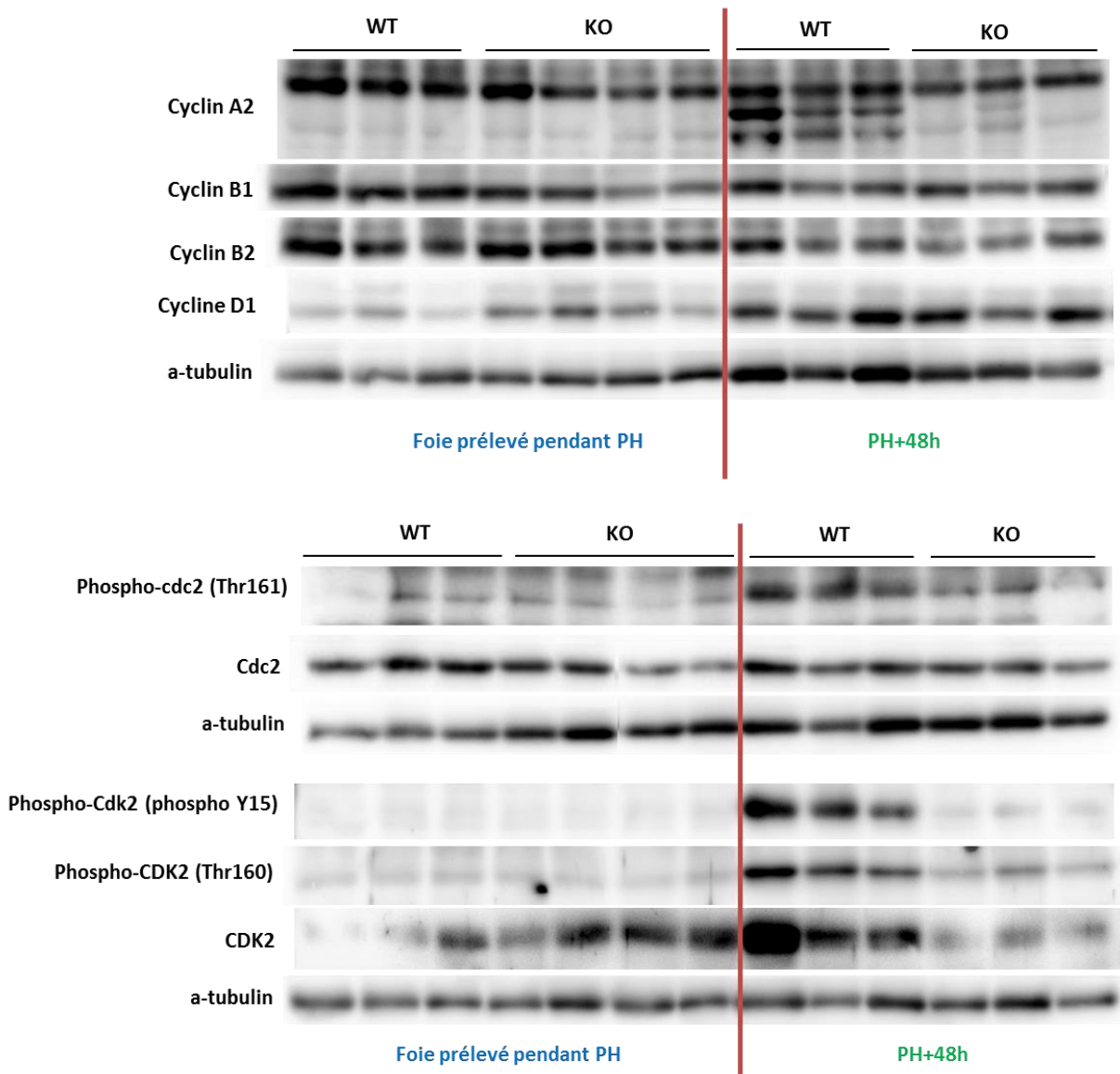


Figure 38: Analyse par western-blot de l'expression des marqueurs du cycle cellulaire. Les souris sont des mâles âgés de 9 semaines (protocole n°3), et les échantillons de foie sont prélevés pendant l'hépatectomie ou 48h après, chez les souris WT ou chez les souris KO MTR induit. Les données sont comparées par le Student test, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.7 Conséquence de l'inactivation du gène MTR sur le stress du réticulum

La présence d'un stress cellulaire chez les souris knockout du gène MTR est identifiée par une augmentation du niveau protéique d'un des transducteurs de stress du réticulum endoplasmique : ATF6 α clivé (Activating transcription factor 6) (Figure 39). Au vu du niveau élevé de ATF6 α clivé dans les souris knockout du gène MTR par rapport au groupe contrôle nous concluons qu'il existe une réponse au stress du réticulum endoplasmique suite à la délétion du gène MTR.

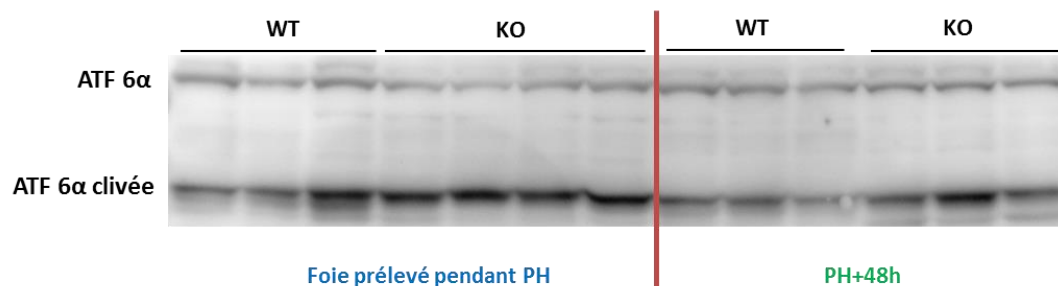


Figure 39: Analyse par western-blot de l'expression des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique. Les souris sont des mâles âgés de 9 semaines (protocole n°3), et les échantillons de foie sont prélevés pendant l'hépatectomie ou 48h après, chez les souris WT ou chez les souris KO MTR induit. Les données sont comparées par le Student test, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.8 Conséquence de l'invalidation de MTR sur le processus de nécrose après l'hépatectomie partielle

D'après les résultats d'histopathologie du foie, deux des quatre souris KO MTR présentent une nécrose hépatique après l'hépatectomie. Nous avons donc recherché l'expression des marqueurs de la nécrose hépatique déjà décrits dans les publications, pour décrire le processus de nécrose observé dans nos échantillons et en expliquer les mécanismes, qui sont induits par le KO de MTR. L'analyse par western-blot montre que les niveaux d'expression des protéines connues pour être impliquées dans la nécrose hépatique, MLKL, Ripk1, Rip3, Bnip3 et Rénine ne présentent pas de différence entre souris KO et WT après hépatectomie (Figure 40).

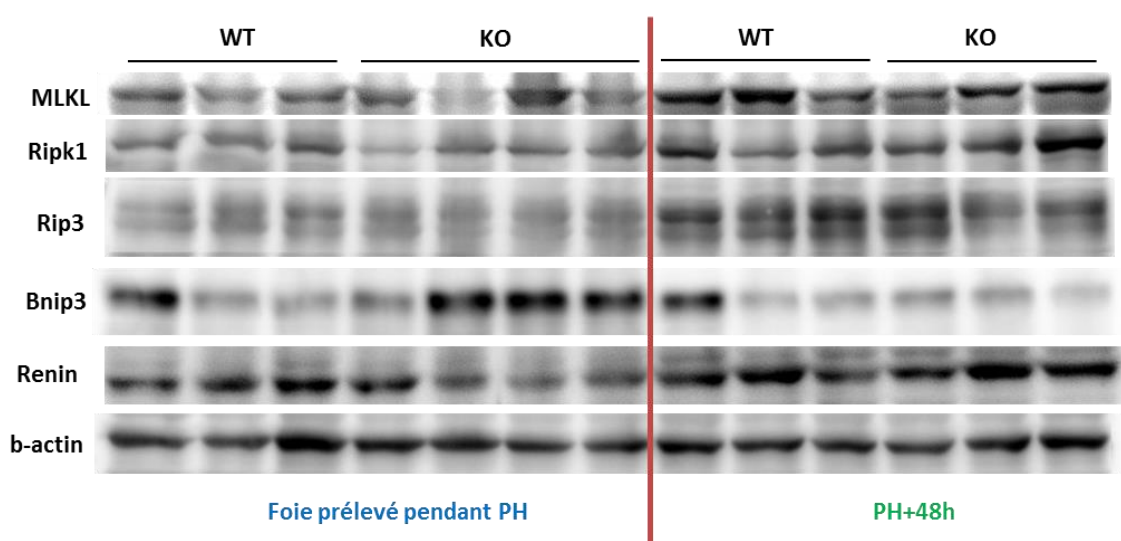


Figure 40 : Analyse par western-blot de l'expression des marqueurs de nécrose. Les souris sont des mâles âgés de 9 semaines (protocole n°3), et les échantillons de foie sont prélevés pendant l'hépatectomie ou 48h après, chez les souris WT ou chez les souris KO MTR induit. Les données sont comparées par le Student test, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.9 Conséquence de l'invalidation de MTR sur le processus de l'autophagie après l'hépatectomie partielle

Les stress environnementaux, tels que la pénurie de nutriments et les facteurs de stress cellulaires, déclenchent une réponse cellulaire consistant en une induction de l'autophagie et une inhibition de la prolifération cellulaire.

Les marqueurs de l'autophagie, Atg16L1 et Atg5 ont une tendance à l'augmentation chez les souris KO dans les échantillons prélevés pendant l'hépatectomie partielle, et cette augmentation disparaît 48h après hépatectomie. (Figure 41).

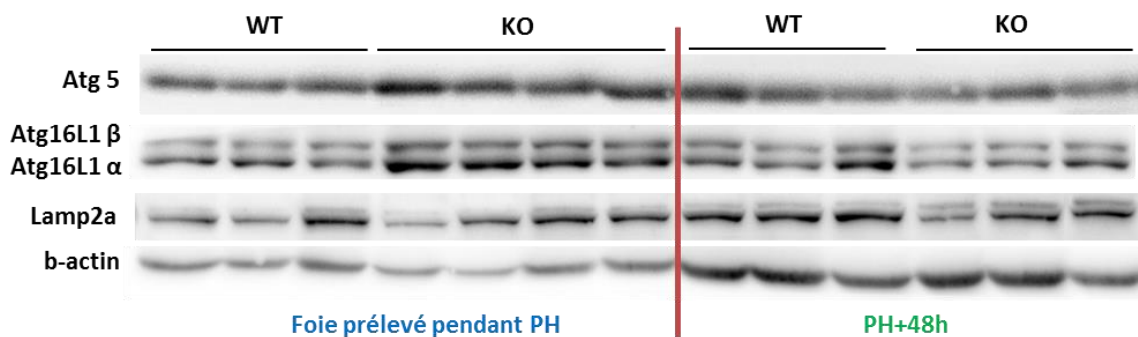


Figure 41: Analyse par western-blot de l'expression des marqueurs de l'autophagie. Les souris sont des mâles âgés de 9 semaines (protocole n°3), et les échantillons de foie sont prélevés pendant l'hépatectomie ou 48h après, chez les souris WT ou chez les souris KO MTR induit. Les données sont comparées par le Student test, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.10 Conséquence de l'inactivation de MTR sur la voie de signalisation MAPK après l'hépatectomie partielle

La voie de signalisation des MAPK est impliquée dans la prolifération et le métabolisme énergétique. 48h après l'hépatectomie partielle, les facteurs impliqués dans la voie de signalisation des MAPK que Phospho-p54 SAPK/JNK, Phospho-p46 SAPK/JNK, p54 SAPK/JNK, p46 SAPK/JNK et Phospho-MEK3 ne présentent aucune différence d'expression entre les souris KO et WT. En revanche, lorsqu'on compare les échantillons de souris KO et WT prélevés pendant l'hépatectomie partielle, la délétion de la méthionine synthase a activé la voie de signalisation des MAPK via une augmentation de l'expression de Phospho-p46 SAPK/JNK, p54 SAPK/JNK, p46 SAPK/JNK et Phospho-MEK3 (Figure 42).

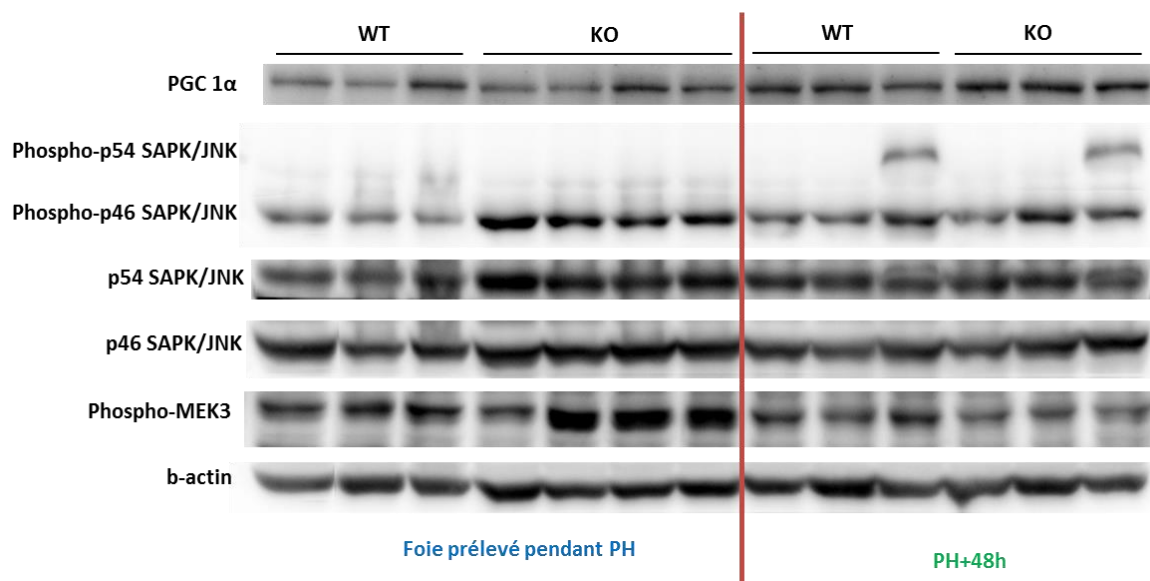


Figure 42: Analyse par western-blot de l'expression des marqueurs de la voie de signalisation MAPK. Les souris sont des mâles âgés de 9 semaines (protocole n°3), et les échantillons de foie sont prélevés pendant l'hépatectomie ou 48h après, chez les souris WT ou chez les souris KO MTR induit. Les données sont comparées par le Student test, et présentées sous forme de la moyenne \pm écart-type (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

RESULTATS II : Conséquences pathologiques neuronales de la déficience en méthionine synthase.

Partie 1 : Invalidation de MTR dans le cerveau : aspects biochimiques et neurocognitifs

Afin d'étudier les conséquences de l'invalidation de MTR dans le cerveau, nous avons croisé la lignée MTRlox/lox avec la lignée Thy1-Cre qui permet l'expression de la Cre recombinase dans tout le système nerveux central à partir du jour embryonnaire E11.5. Il s'agit ici de la Cre recombinase constitutivement active, aucun inducteur n'est requis. Notre étude a porté sur les souris de génotype Thy1-Cre ;MTRlox/lox notées « KO MTR », c'est-à-dire présentant une délétion homozygote du gène MTR.

1. Analyse morphométrique

Les souris KO MTR naissent dans les proportions attendues, conformes aux ratios mendéliens, et ne présentent pas d'anomalies évidentes à la naissance. Aucun retard de croissance n'a été détecté chez ces souris mutantes, elles sont viables et fertiles. Ainsi nous montrons pour la première fois que la délétion de MTR restreinte au cerveau est viable, alors qu'elle est létale au stade embryonnaire quand elle est restreinte au foie. La délétion de MTR ne semble pas affecter la prolifération des cellules nerveuses dans le cerveau embryonnaire, alors qu'elle affecte profondément celle des cellules de foie fœtal.

Nous avons mesuré la masse corporelle et la masse du cerveau après extraction de la boîte crânienne (sans les bulbes olfactifs) chez des souris adultes (Tableau 9). Aucun effet de la délétion du gène MTR n'a été détecté sur ces deux paramètres.

Tableau 10 : Poids du corps et du cerveau des souris témoins et homozygotes (Jour de la mise à mort)

	Souris	Age (jours)	Poids corps	Moyenne poids corps	SEM corps	Poids cerveau	Moyenne poids cerveau	SEM cerveau
Témoins	475	135	27,8	28,233	0,632	0,4397	0,448	0,0071
	488	131	28,7					
	490	131	29,7					
	527	95	30					
	534	86	27,3					
	535	86	25,9					
Homozygotes	480	135	25	28,233	0,744	0,4268	0,441	0,0080
	486	131	32,1					
	513	98	30,5					
	514	98	26,5					
	516	98	27,9					
	519	98	28,7					
	528	95	28,6					
	531	95	28,9					
536	86	25,9						

2. Evaluation de l'efficacité de l'extinction de MTR dans différentes régions du cerveau

Le système Cre/Lox permet une recombinaison très large in vivo, cependant son efficacité est rarement complète, en particulier dans le cerveau. Nous avons quantifié la protéine MTR par western-blot dans trois microstructures cérébrales, le cortex, l'hippocampe et le mésencéphale (Figure 43 et 44). L'analyse densitométrique permet une quantification de MTR normalisée par l' α -tubuline. Chez les souris sauvages, les trois microstructures présentent une expression de la méthionine synthase. Nous avons mis en évidence une diminution significative de la quantité de protéine MTR d'un facteur 10 dans le cortex et l'hippocampe (valeur de p respectivement égale à 0.001 et 0.0024) et d'un facteur 2 dans le mésencéphale des souris KO ($p = 0.0115$).

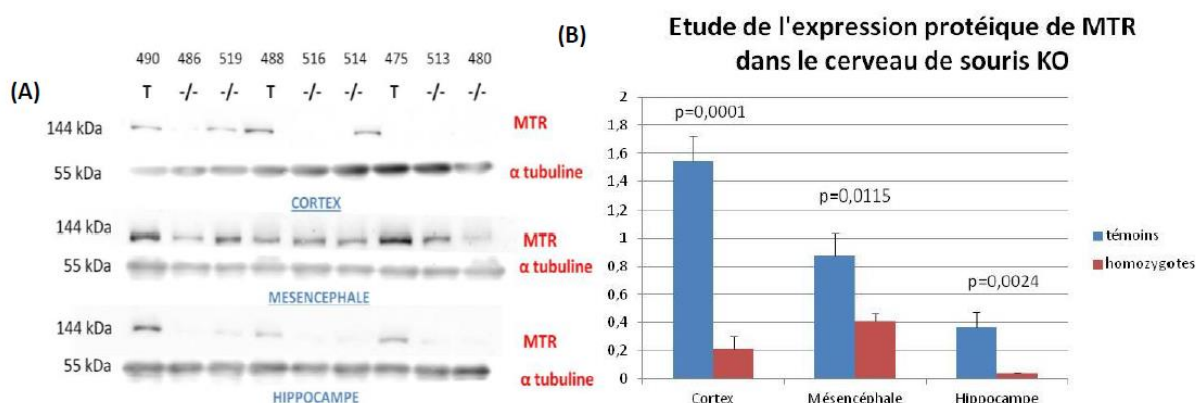


Figure 43: Profil d'expression protéique et quantification de la méthionine synthase (A,B)

T : témoins (n = 3), -/- : homozygotes (n = 6)

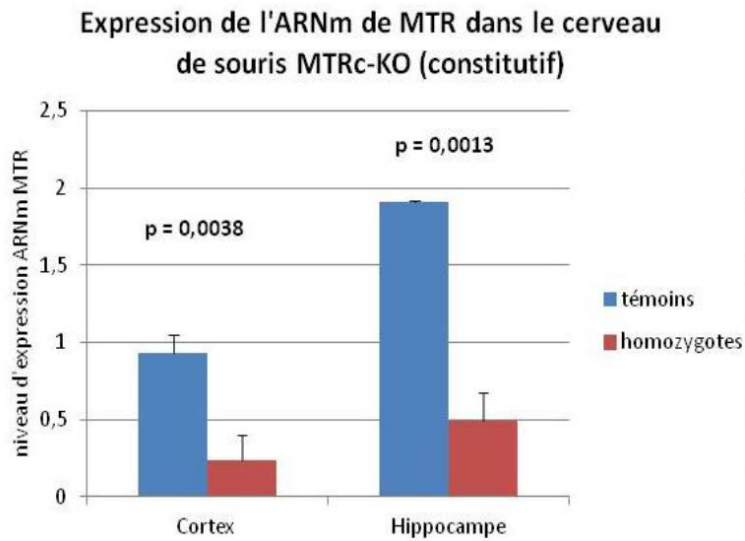


Figure 44: quantification de l'expression de MTR par RT-qPCR dans le cortex et l'hippocampe.

3. Impact de la délétion de la méthionine synthase sur le métabolisme des donneurs de méthyle

Les principaux métabolites intervenant dans le métabolisme des donneurs de méthyle ont été dosés dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet : la méthionine, la SAM, la SAH, l'acide folique et ses dérivés (THF, N5-méthylTHF et 5,10 méthénylTHF) (Figure 45). Les seules différences significatives apparaissent dans l'hippocampe avec une diminution de la quantité de MMA, de SAM, de SAH et de N5-méthylTHF chez les individus KO par rapport aux témoins. En revanche, les dosages plasmatiques (Hcy, méthionine, SAM, SAH et MMA) ne montrent aucune variation significative entre le groupe des souris témoins et celui des souris KO, ce qui atteste que le KO et ses effets métaboliques sont effectivement restreints au cerveau.

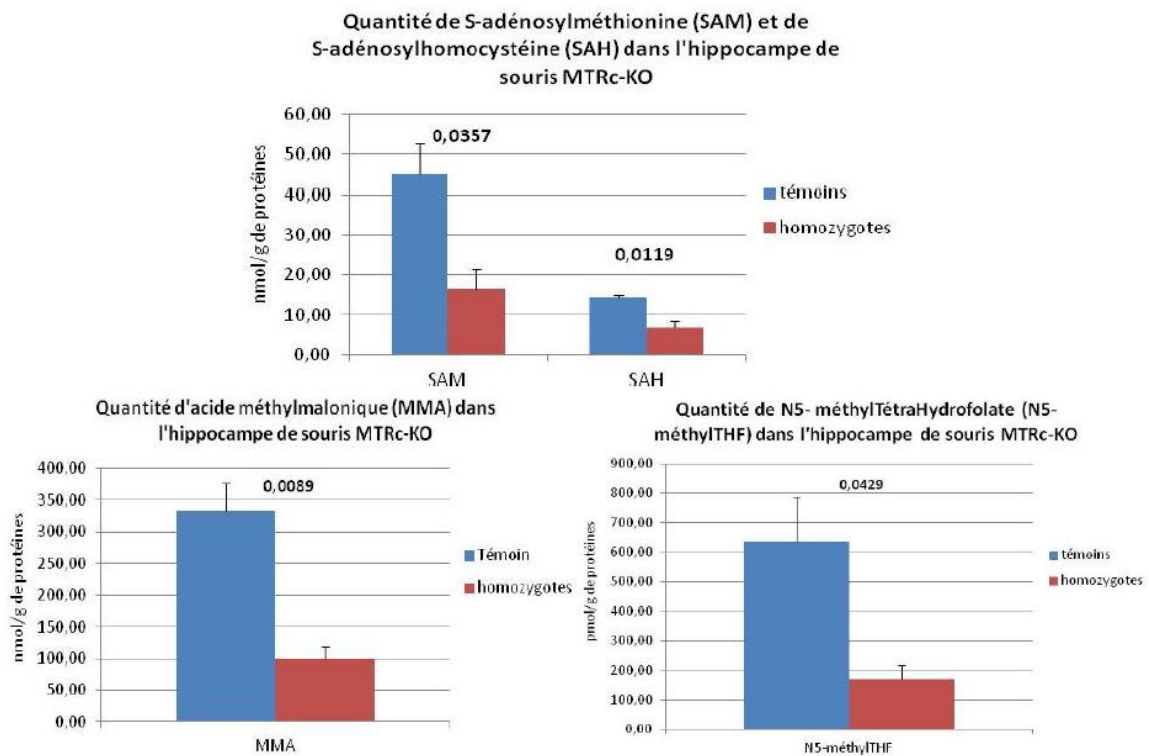


Figure 45: Dosage tissulaire (hippocampe) des métabolites : (A) SAM et SAH, (B) MMA et (C) N5-méthylTHF

S-Adénosylméthionine (SAM), S-Adénosylhomocystéine (SAH), acide méthylmalonique (MMA) et (N5-méthyltétrahydrofolate (N5-méthylTHF), (n=3).

4. Etude comportementale : aspects neurofonctionnels et cognitifs

A la suite d'une semaine d'apprentissage dans le labyrinthe, les souris sont soumises à un test permettant d'évaluer leurs capacités de mémorisation spatiale. Ce test a déjà été utilisé précédemment dans notre laboratoire pour mettre en évidence des défauts cognitifs chez des rongeurs carencés en donneurs de méthyle. Le test se déroule en 5 sessions (une par jour pendant 5 jours) permettant de mesurer les facultés d'apprentissage des souris. Les souris sauvages présentent une amélioration très nette de leurs performances, tant du point de vue du nombre d'erreurs que de la latence de sortie du labyrinthe, dès la deuxième session d'apprentissage. Les souris KO, en revanche, ont besoin de 5 sessions pour acquérir des taux de réussite comparables à ceux des témoins. Le temps de latence de sortie et le nombre d'erreurs sont tous deux significativement supérieurs chez les KO lors des sessions 2, 3 et 4. Les souris mettent donc plus de temps pour trouver la sortie, et ceci en faisant davantage d'erreurs que les témoins (Figure 46). L'invalidation de MTR dans le cerveau entraîne donc des défauts d'apprentissage et de mémorisation spatiale.

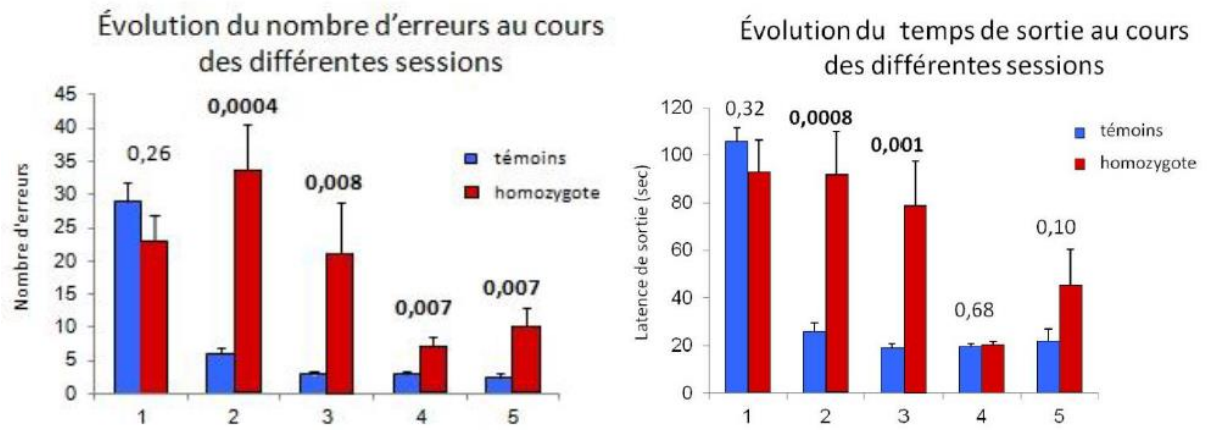


Figure 46: Étude comportementale (labyrinthe aquatique multi-T)

Évolution du nombre d'erreurs (A) et du temps de sortie (B) en fonction des sessions (témoin, n=9 vs. homozygotes n=6)

Partie 2 : Conséquences pathologiques de la déficience en méthionine synthase lors du vieillissement neuronal : perturbations des RNA binding proteins régulant la réponse anti-oxydante

Dans un modèle de carence nutritionnelle chez le rat ainsi que dans un modèle génétique chez la souris, notre laboratoire a montré que les troubles du métabolisme des donneurs de méthyle perturbent l'apprentissage et la mémorisation spatiale liée au cervelet et à l'hippocampe. Notre laboratoire a récemment élucidé une partie des mécanismes en jeu à l'aide du modèle génétique murin (noté CD320^{-/-}) dans lequel le gène *CD320* du récepteur d'endocytose de la transcobalamine a été invalidé dans le cerveau, permettant une carence en vitamine B12 restreinte au cerveau. Chez les souris CD320^{-/-} jeunes (âgées de 7 semaines), nous avons montré par des marquages immunofluorescents une altération de la localisation intracellulaire de la RBP HuR. Rôle de HuR : protéine de réponse au stress, régule l'ARN de SIRT1. Cet effet sur la localisation de HuR est encore plus profond chez des souris mutantes vieillissantes (âgées de 40 semaines). Le vieillissement cérébral s'accompagne d'un état de stress cellulaire, en particulier un stress oxydant. La lutte contre ce stress oxydant nécessite la mise en place d'une réponse anti-oxydante efficace dans laquelle SIRT1 joue un rôle central. La carence en vitamine B12 perturbe le trafic intracellulaire des RBPs nécessaires à la stabilisation de l'ARNm de SIRT1, empêchant la mise en place de la réponse anti-oxydante adéquate. Le traitement des souris mutantes par un activateur de SIRT1, l'agoniste SRT1720, améliore leurs performances lors des tests d'apprentissage spatial.

Pour élucider les mécanismes expliquant l'altération des capacités neurocognitives en lien avec le vieillissement dans le modèle KO MTR, nous avons donc analysé la réponse au stress oxydant ainsi que le trafic intracellulaire des RBPs. Par ailleurs, afin de déterminer le rôle de la déacétylase SIRT1 dans la réponse au stress, nous avons testé l'effet de l'agoniste de SIRT1. Notre travail a combiné

une étude comportementale des souris portant sur les capacités de mémorisation spatiale

une analyse du transcriptome

une analyse par marquages immunofluorescents des marqueurs du stress oxydant ainsi que de la réponse cellulaire anti-oxydante

une analyse par marquages immunofluorescents des RNA Binding Proteins interagissant avec les ARNm de Sirt1, facteur clé de la réponse au stress oxydant.

1. Evaluation de l'efficacité de la délétion de MTR par dosage biochimique

1.1 Etude par la technique de western-blot

Nous avons d'abord vérifié l'efficacité du KO de MTR *in vivo* par western-blot sur des extraits protéiques de cortex de souris des 4 groupes (femelles non traitées, femelles traitées, mâles non traités et mâles traités). Le choix de cette structure cérébrale pour réaliser les mises au point des western-blots et les tests des anticorps dirigés contre MTR et la Cre recombinase se justifie par le fait qu'elle est de taille bien supérieure à celle de l'hippocampe. L'hippocampe étant un tissu peu abondant dans le cerveau de souris, la quantité de protéines extraites ne permettait pas de faire plusieurs expériences de western-blot. L'analyse par western-blot a donc été mise au point sur le cortex, la quantification de MTR et Cre a été réalisée sur toutes les souris de tous les groupes, puis la concordance avec ces résultats a été vérifiée dans l'hippocampe avec un nombre réduit de souris, à savoir 3 par groupe.

Dans le cortex cérébral, nos résultats montrent que la protéine MTR est correctement détectée chez toutes les souris de génotype sauvage, quel que soit le traitement (véhicule ou agoniste SRT1720) et quel que soit le sexe. Chez les souris KO MTR, la Cre recombinase est exprimée et l'inactivation du gène MTR diminue significativement la quantité de protéine MTR détectée. Cependant, la corrélation génotype-phénotype n'est pas parfaite car la protéine MTR reste détectable chez certaines souris KO MTR. Ceci s'explique par un fonctionnement imparfait du système Cre-Lox *in vivo*, problème que l'on retrouve dans d'autres tissus comme le foie.

A la suite de ces mises au point sur le cortex, des résultats comparables ont été reproduits sur l'hippocampe avec un nombre réduit de souris (Figure 47). Les souris qui ont été sélectionnées sont celles qui ont donné les meilleurs résultats d'extinction de MTR et d'expression de la Cre lors de l'analyse du cortex.

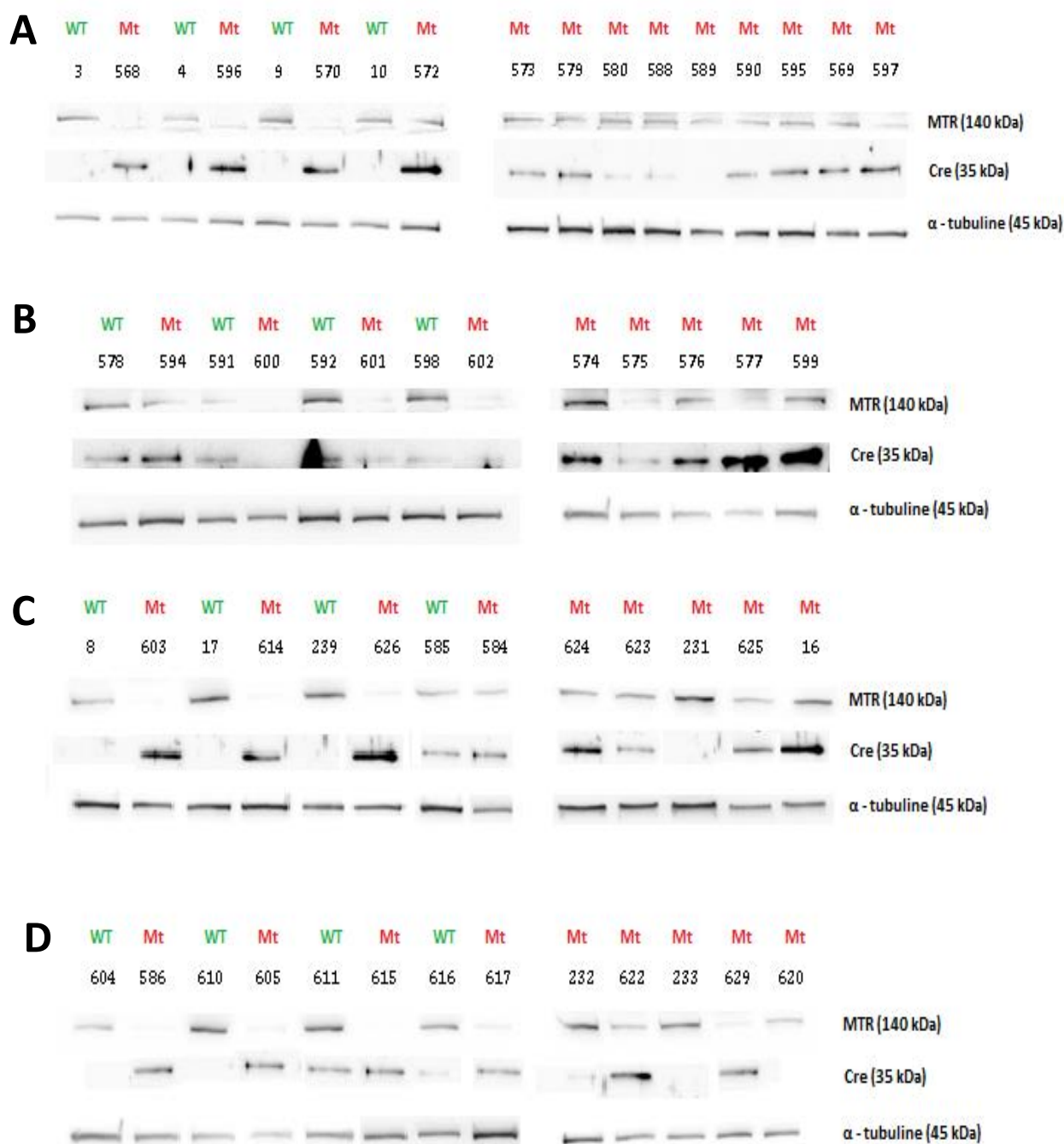


Figure 47: Profils d'expression des protéines MTR et Cre dans le cortex des souris MTR.

WT : souris sauvages. Mt : souris mutantes KO MTR homozygotes. A : souris femelles non traitées - B : souris mâles non traités - C : souris femelles traitées par SRT1720 - D : souris mâles traitées par SRT1720.

1.2 Etude par la quantification de l'activité enzymatique de la méthionine synthase

Une baisse de l'activité enzymatique de MTR, encore plus qu'une baisse de la quantité protéique, est recherchée dans ce modèle pour espérer avoir un impact sur le métabolisme cérébral, le

fonctionnement du cerveau et sur les capacités cognitives. Pour confirmer les résultats obtenus par la technique de western-blot, nous avons dosé l'activité de l'enzyme MTR sur des extraits protéiques de cortex cérébral de souris femelles non traitées ayant soit le génotype sauvage (n=3) soit le génotype muté (n= 3) (Figure 48). Là encore, le choix du cortex plutôt que l'hippocampe s'explique par l'abondance relative du tissu, et les souris sélectionnées pour ce dosage sont celles qui ont donné de bons résultats en western-blot. Nos résultats montrent que l'activité spécifique de l'enzyme MTR a chuté d'un facteur 20 ($p=0,0005$) dans le groupe des souris mutantes par rapport au groupe témoin (Figure 48). Une diminution d'activité enzymatique aussi profonde est vraisemblablement compatible avec des effets marqués sur le métabolisme des donneurs de méthyle.

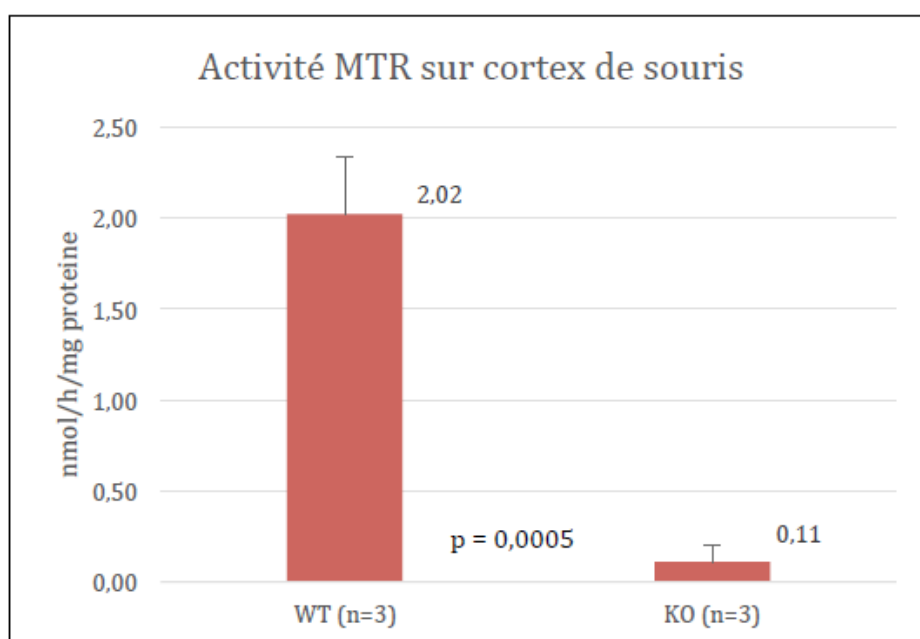


Figure 48 : Dosage biochimique de l'activité méthionine synthase dans le cortex cérébral.

2. Etude fonctionnelle du cerveau des souris KO MTR: analyse des capacités d'apprentissage

Les analyses biochimiques par western-blot et mesure d'activité ont été réalisées a posteriori, après mise à mort des animaux, donc après l'étude comportementale qui a été réalisée sur l'ensemble des 26 souris de la cohorte 1. Au vu des résultats des analyses biochimiques, qui ont révélé que de nombreuses souris de génotype KO MTR ont une délétion insuffisante de MTR, nous avons sélectionné 16 souris qui donnaient les meilleurs résultats. Seules ces souris ont été prises en compte pour l'analyse des résultats de l'étude fonctionnelle. Parmi les nombreux paramètres enregistrés lors de ces expériences comportementales, l'analyse a porté sur 2 paramètres pertinents : le nombre d'erreurs et la latence de sortie du labyrinthe.

Au cours de la phase de Learning 1, les souris sauvages s'améliorent au cours des sessions successives (sauf lors de la session 3). En effet, les résultats montrent une diminution du temps de latence au fil des sessions, ce qui témoigne d'un apprentissage chez ces souris. Aucune amélioration n'est observée chez les souris mutantes (Figure 49 A). En revanche, une diminution du nombre d'erreurs au cours des différentes sessions peut être constatée chez ces deux groupes de souris (Figure 49 C).

Au cours de la phase de Learning 2, c'est-à-dire après avoir reçu le traitement SRT1720 par gavage, aucune amélioration ne peut être constatée (Figure 49 B). Le traitement semble même perturber les souris puisque certaines d'entre elles obtiennent de moins bons résultats par rapport au Learning 1. Seul le nombre d'erreurs diminue au cours du Learning 2 dans le groupe des souris témoins (Figure 49 D).

Nos résultats montrent donc que la délétion de MTR dans le cerveau a des conséquences neurofonctionnelles délétères, mais que l'activation de la déacétylase SIRT1 par un agoniste *in vivo* n'améliore pas les fonctions cognitives.

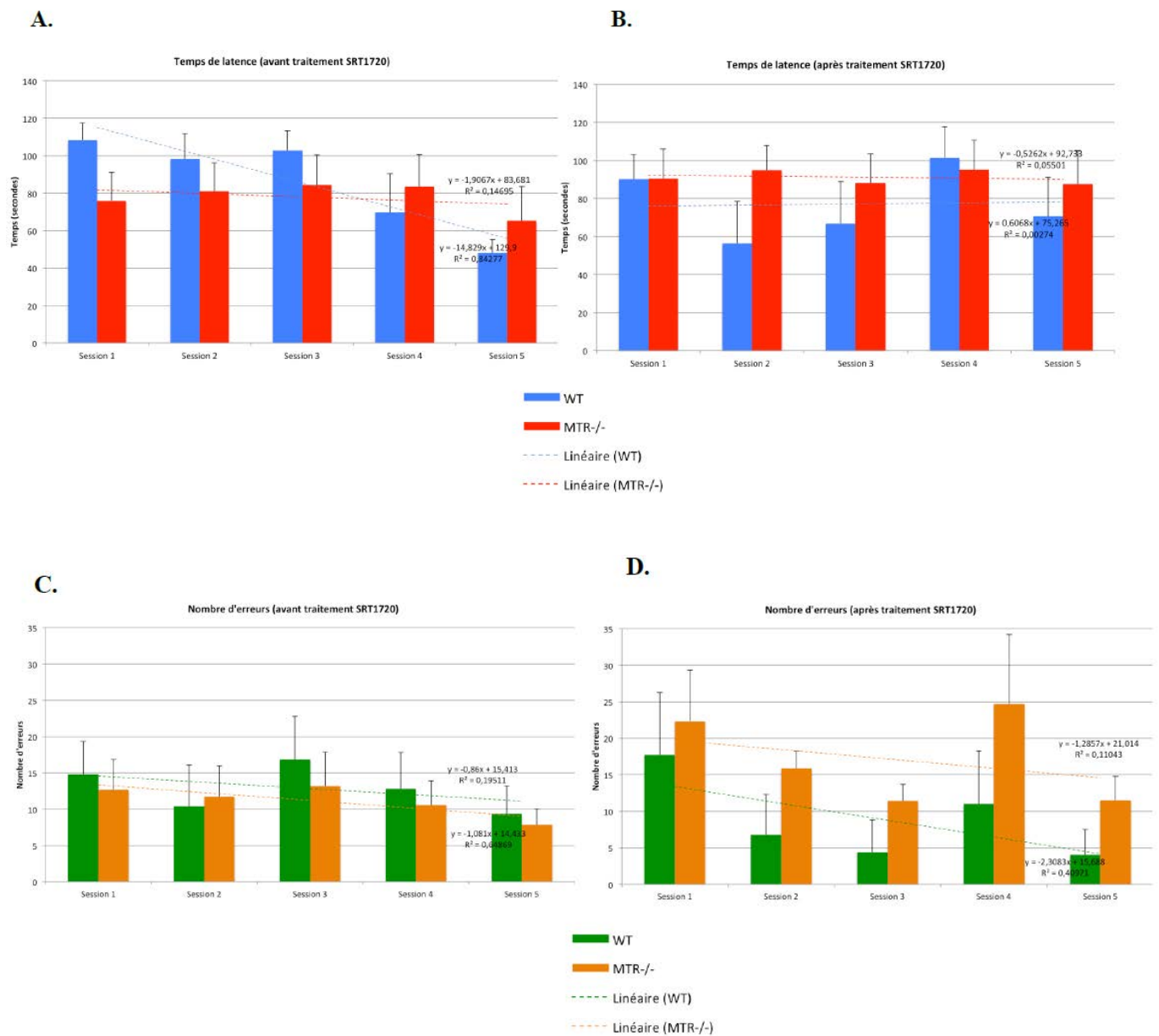


Figure 49 : Etude comportementale via le test du labyrinthe aquatique multi-T.

Evolution du temps de sortie avant traitement (A) et après traitement (B), ainsi que du nombre d'erreurs avant traitement (C) et après traitement (D) en fonction des sessions. (Souris témoins n=8, souris mutantes n=8).

3. Etude de la localisation et de l'expression des RBPs dans l'hippocampe et le cervelet par immunofluorescence

La réponse au stress cellulaire passe non seulement par une réponse transcriptionnelle, mais aussi par un circuit plus rapide faisant intervenir directement la régulation des ARN, au niveau post-transcriptionnel, et impliquant la régulation de la stabilité des ARN, leur épissage et leur traduction. Ceci se fait notamment via la liaison de ces ARN par une famille de protéines appelées RBPs. Nous avons montré précédemment, dans un modèle cellulaire et dans un modèle *in vivo*, que la carence en vitamine B12 perturbe le trafic des RBPs en réponse au stress. Nos résultats non encore publiés montrent que la localisation subcellulaire de la RBP HuR est altérée chez les souris mutées pour le récepteur de la transcobalamine (TcblR ou CD320). Chez ces souris mutantes CD320^{-/-} âgées de 7 semaines, HuR a une localisation exclusivement nucléaire alors qu'elle est périnucléaire chez les témoins. Cette délocalisation est encore plus marquée chez les souris âgées de 40 semaines. Notre hypothèse est que le vieillissement représente un stress et que la carence en vitamine B12 perturbe le trafic des RBPs en réponse à ce stress. Par ailleurs, nous avons mis en évidence un effet plus marqué sur les femelles que sur les mâles. Pour ces raisons, nous avons choisi d'étudier l'expression et la localisation des RBPs dans l'hippocampe et le cervelet des souris KO MTR femelles âgées de 40 semaines non traitées (n=3). Le groupe témoin est constitué de souris WT femelles âgées de 40 semaines non traitées (n=3).

3.1 La RBP HuR et sa forme méthylée méthyl-HuR

Chez les souris sauvages non traitées âgées de 40 semaines, la RBP HuR présente une localisation exclusivement nucléaire au niveau de l'hippocampe et du cervelet, (Figure 50 A et C). Dans le groupe KO MTR en revanche, HuR est détectée à la fois dans le noyau et le cytoplasme. La forme méthylée de HuR, notée méthyl-HuR, est nucléaire dans les deux groupes de souris (figure 50 E et G). La quantification de l'expression de ces RBPs par analyse densitométrique montre une élévation de l'expression de HuR dans l'hippocampe ($p=0,0132$) (figure 50 B et D) et dans le cervelet ($p=0,0250$) (Figure 50 D) des souris KO MTR par rapport aux souris contrôles. L'expression de méthyl-HuR, quant à elle, est identique entre les deux groupes de souris (Figure 50 F).

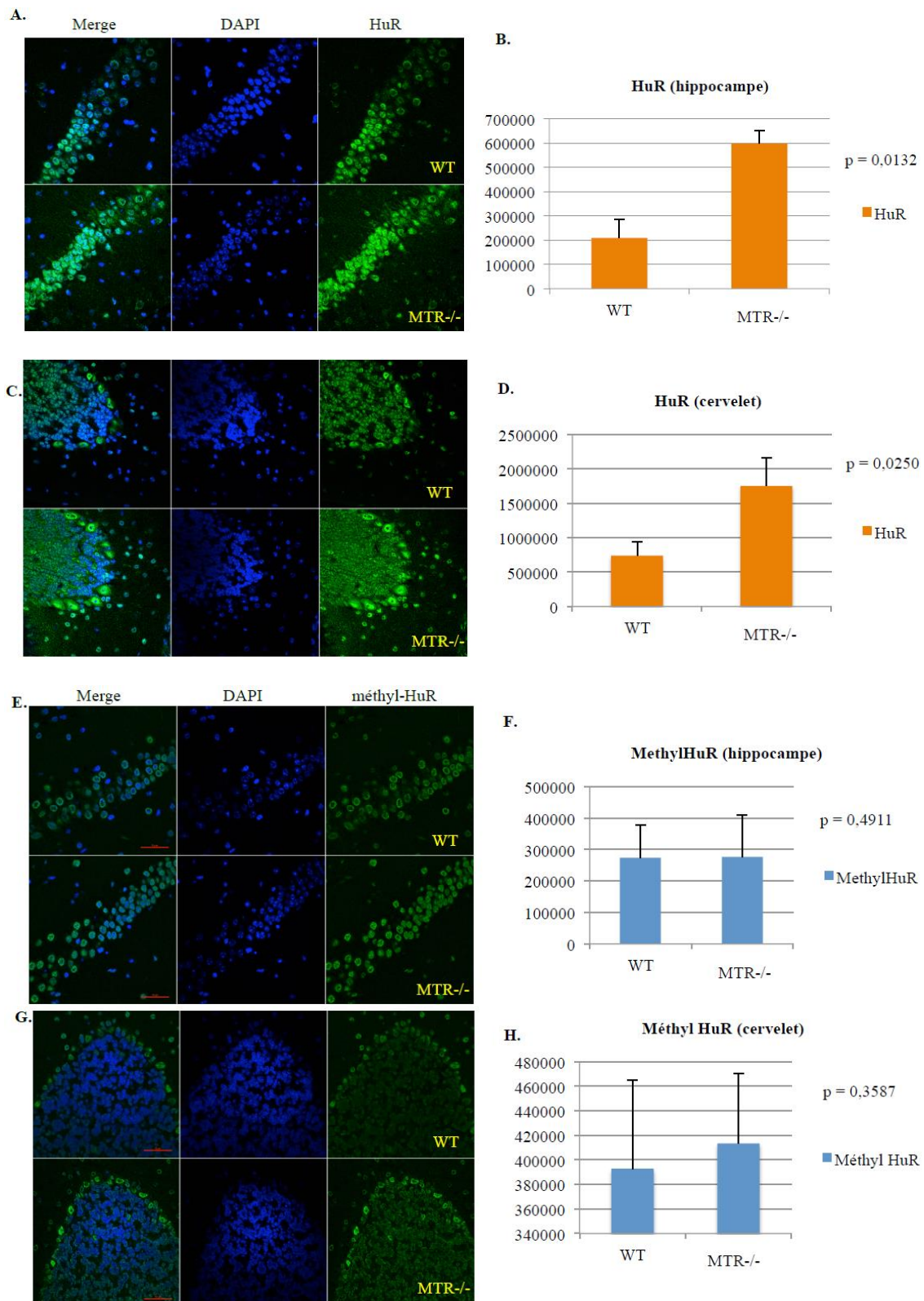


Figure 50: Etude de la localisation et de l'expression HuR et méthyl-HuR dans l'hippocampe et le cervelet. Hippocampe : A, B, E et F. Cervelet : C, D, G et H

3.2 La RBP eIF4A3

La famille des EIF4A comprend plusieurs membres qui appartiennent au complexe protéique d'épissage des exons (EJC, Exon Junction Complex), qui participe entre autres au transport des ARNm, à leur stabilisation dans le cytoplasme et à la dégradation des ARNm aberrants (Giorgi et al., 2007). mEIF4A3 est une ARN hélicase appartenant à cette famille. Il a été montré que EIF4A3 était impliqué dans la modulation de la plasticité synaptique en régulant l'expression de la protéine ARC (activity-regulated cytoskeleton-associated protein). ARC est une protéine localisée au niveau des dendrites et est essentielle dans la consolidation de la mémoire à long terme.

L'immunomarquage fluorescent de Eif4A3 dans le cervelet montre une localisation exclusivement nucléaire chez les souris sauvages comme chez les mutantes, avec toutefois une intensité de marquage supérieure dans les cellules de Purkinje chez les mutantes (Figure 51C). Dans cette microstructure cérébrale, le niveau d'expression de cette RBP, évalué par une analyse densitométrique, ne varie pas significativement dans le groupe KO MTR par rapport au groupe contrôle (figure 51 D).

En revanche, dans l'hippocampe nous observons une différence de localisation de la RBP EIF4A3 entre les deux groupes de souris (figure 51A) : alors qu'elle est présente à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules nerveuses du groupe sauvage, elle devient exclusivement nucléaire chez les souris KO MTR. L'analyse densitométrique a montré une diminution de l'intensité du marquage EIF4A3 chez les souris mutantes.

En conclusion, nos résultats révèlent une altération du trafic intracellulaire de la RBP EIF4A3 dans l'hippocampe suite au KO de MTR.

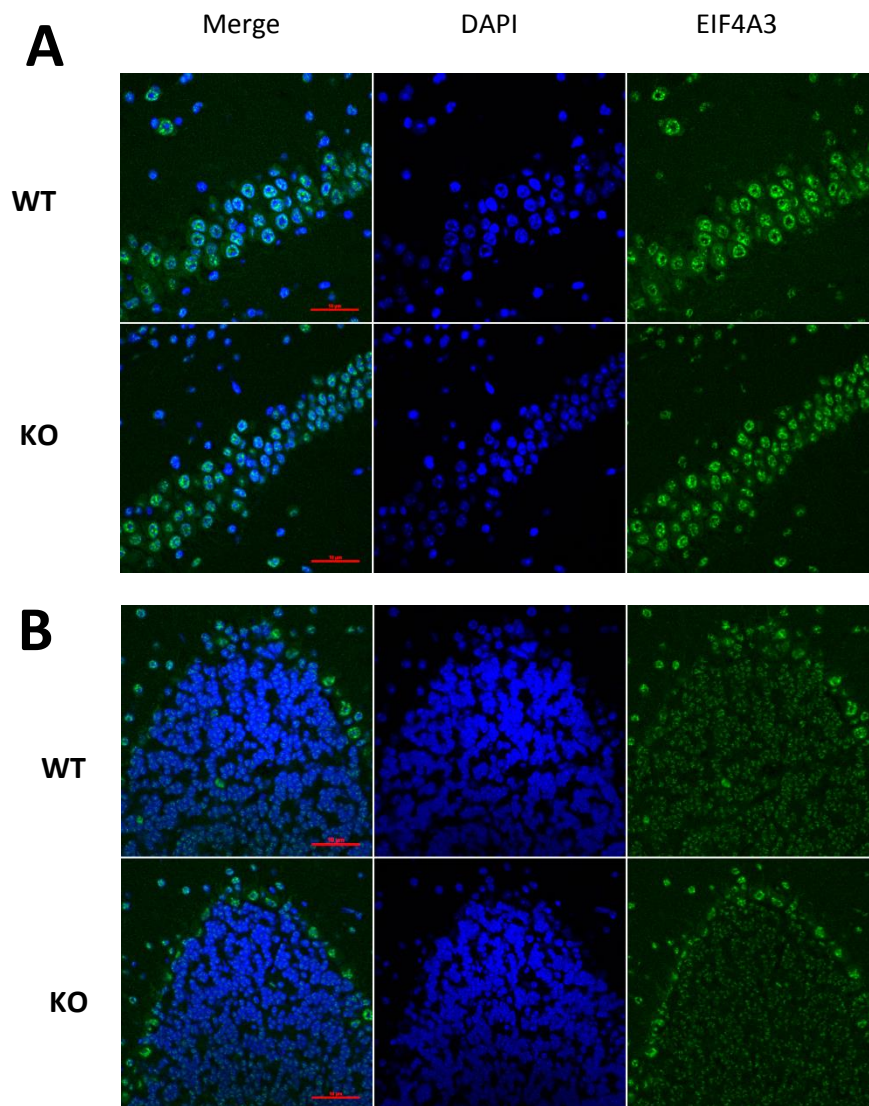
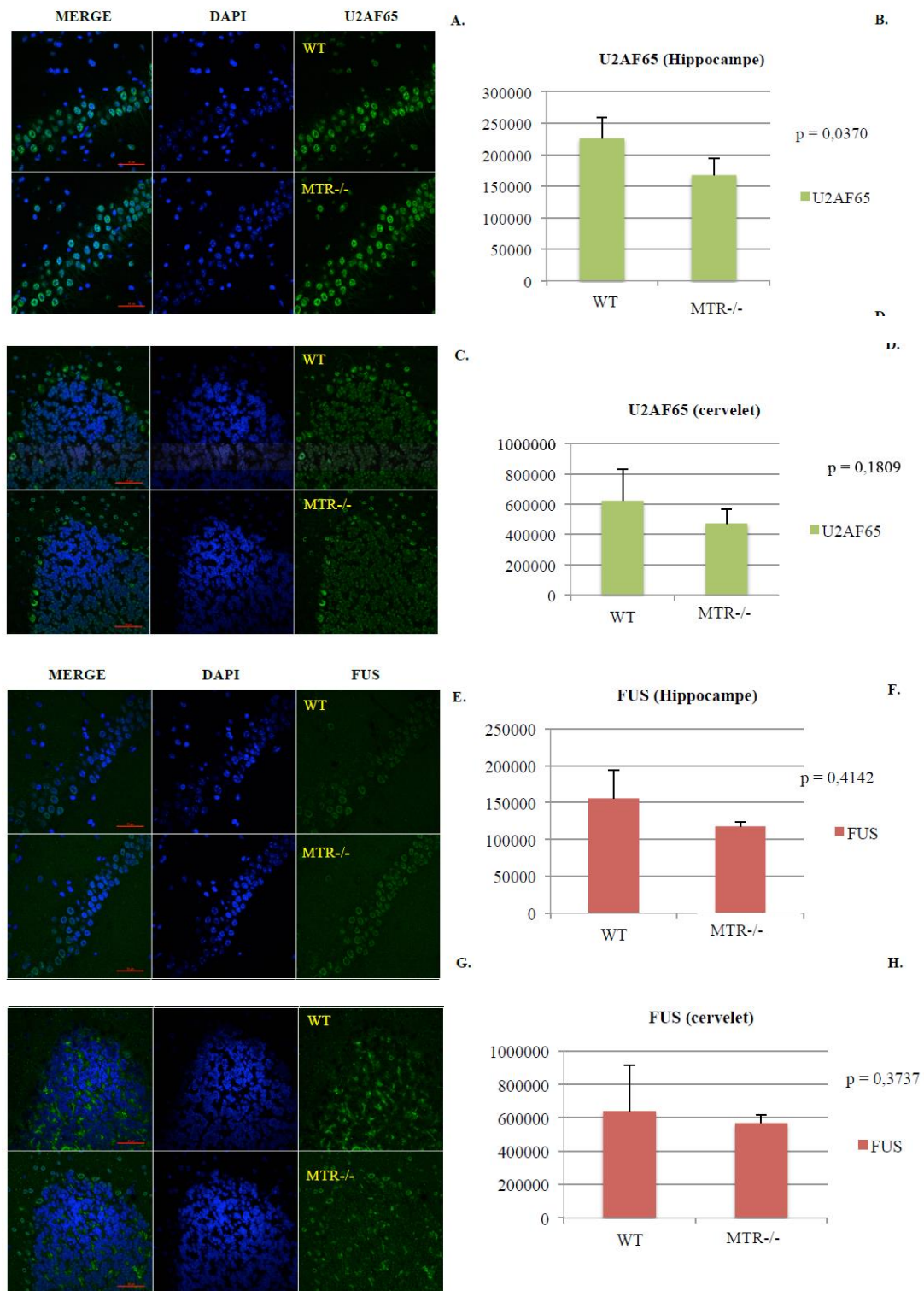


Figure 51: Etude de la localisation et de l'expression de EIF4A3 dans l'hippocampe et le cervelet.
 Hippocampe : A. Cervelet : B.

3.3 La RBP U2AF65

L'hétérodimère U2AF (U2 Auxiliary Factor) est un complexe protéique d'épissage composé de deux sous-unités, U2AF35 et U2AF65 (Chen L, Nucleic Acid Research 2016) et impliqué dans la liaison de la snRNP U2 à l'ARN pré-messager. U2AF permet l'assemblage du spliceosome et définit les sites 3' d'épissage fonctionnels sur l'ARN pré-messager (Wu and Fu, 2015). Des mutations de U2AF chez l'humain mènent à des cancers.

Nos marquages immunofluorescents montrent que le KO de MTR n'entraîne pas de délocalisation de U2AF65, qui reste exclusivement nucléaire dans l'hippocampe et dans les cellules de Purkinje du cervelet (Figure 52 A et C). Seule l'intensité de son expression est altérée chez les mutants, avec une diminution à la fois dans l'hippocampe et le cervelet ($p=0,0370$ et $p=0,1809$ respectivement) (Figure 52 B et D).



3.4 La RBP FUS

FUS (fused in sarcoma) a d'abord été identifié comme un oncogène qui est sujet à des translocations chromosomiques, menant à la fusion d'un domaine de FUS avec des domaines d'autres protéines, ce qui entraîne différents cancers tels que la leucémie myéloïde aigüe. Des mutations de FUS sont par ailleurs associées à la dégénérescence fronto-temporale et à la sclérose latérale amyotrophique. La protéine FUS présente des propriétés de liaison à l'ADN et de régulation de la transcription. C'est aussi une RBP impliquée dans l'épissage des ARN, notamment dans le cerveau. La localisation de FUS est normalement majoritairement nucléaire, bien qu'elle puisse jouer le rôle de navette entre le noyau et le cytoplasme. Dans la sclérose latérale amyotrophique, FUS est retrouvée sous forme d'agrégats dans le cytoplasme.

Nos résultats montrent que dans l'hippocampe, l'expression de FUS est essentiellement nucléaire et le génotype ne présente aucune influence sur cette localisation (Figure 52 E). En revanche, dans le cervelet, le KO de MTR provoque une délocalisation de FUS du cytoplasme vers le noyau des cellules de Purkinje (Figure 52 G).

Le KO de MTR entraîne une diminution de l'expression de FUS, mesurée par analyse densitométrique, à la fois dans l'hippocampe et le cervelet (Figures 52 F et H).

4. Etude des marqueurs du stress oxydant et de la réponse anti-oxydante par immunofluorescence

Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'altération du trafic des RBP modifie la réponse anti-oxydante dans le cerveau des souris KO MTR. Nous avons étudié par immunofluorescence un marqueur du stress oxydant ainsi qu'un acteur majeur de la réponse anti-oxydante.

4.1 Le marqueur de stress oxydant 8-hydroxyguanosine

La 8-hydroxyguanosine (8-OHG) est un ribonucleoside provenant de l'oxydation de la guanosine et dont le taux urinaire est utilisé comme marqueur biochimique du stress oxydant. Ce marqueur est détecté en particulier chez les fumeurs, chez les patients atteints de cancers, et dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Parkinson.

Concernant l'hippocampe, nos marquages immunofluorescents ont détecté ce produit du stress oxydant dans le noyau des deux groupes de souris, avec cependant une localisation particulière chez les mutants, puisqu'elle est retrouvée dans le nucléole (Figure 53 E). Dans le cervelet, la localisation de la 8-OHG ne varie pas selon le génotype, mais nous avons observé par analyse densitométrique une tendance à l'augmentation de la quantité de 8-OHG dans les cellules de Purkinje des mutants (Figure 53 G).

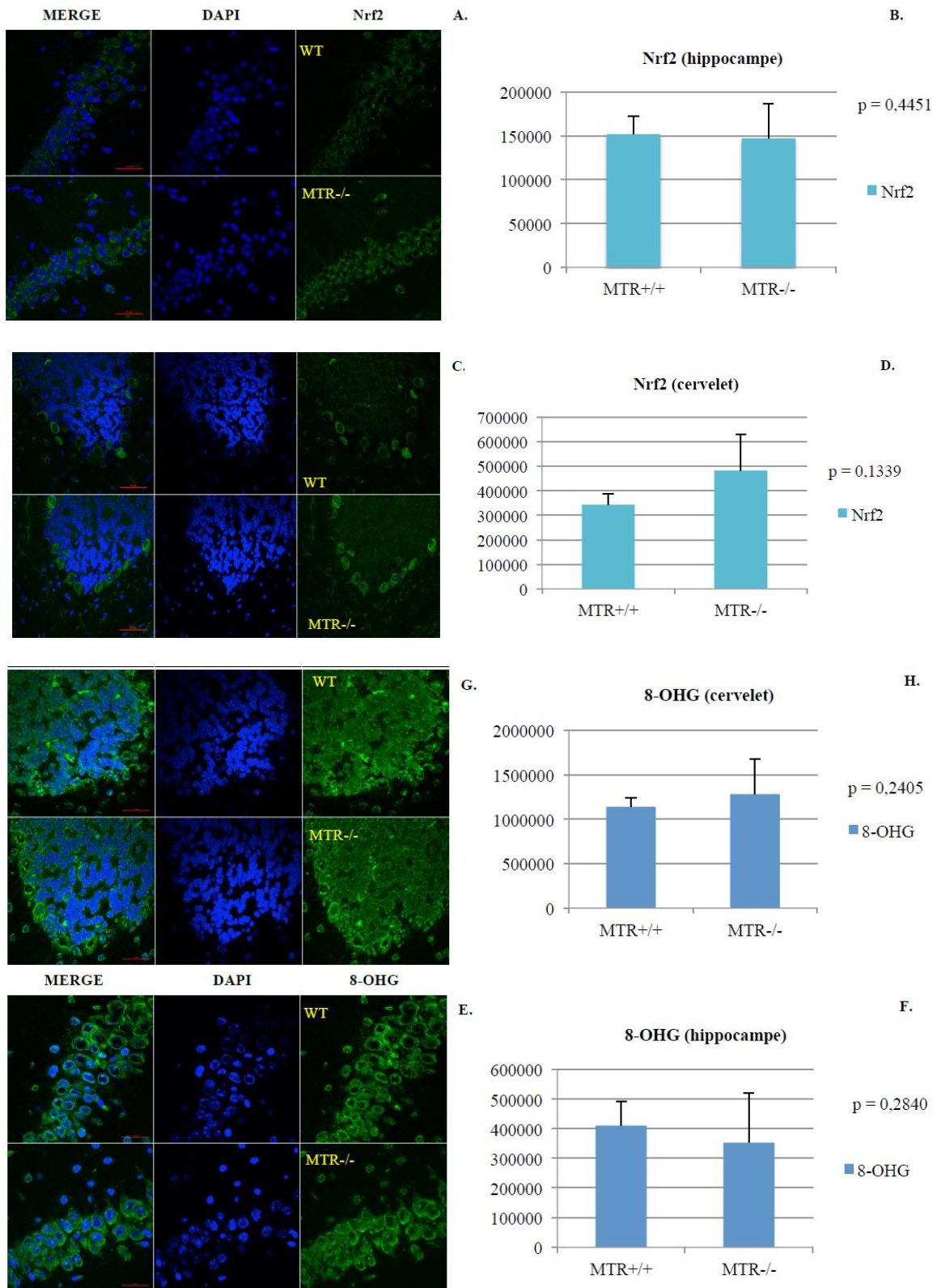


Figure 53: Localisation de Nrf2 et 8-OHG au niveau de l'hippocampe et du cervelet des souris MTR. A et E : région CA2 de l'hippocampe. C et G : cervelet.

4.2 Le facteur de transcription Nrf2 (réponse anti-oxydante)

En réponse à un stress oxydant, la cellule active un mécanisme de défense, la voie de signalisation Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2) - Keap1 (kelch-like ECH associated protein 1) (Nguyen et al., 2009). En absence de stress oxydant, Nrf2 est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice Keap1 et dirigée vers la voie de dégradation du protéasome. En conditions oxydantes, Nrf2 est activée, stabilisée et envoyée dans le noyau, où elle joue le rôle de facteur de transcription en se liant à des éléments de réponse anti-oxydante (antioxidant response element, ARE) (Gorrini et al., 2013). Nrf2 active la transcription d'enzymes cytoprotectives telles que GSTA2 (glutathione S-transferase A2) and NQO1 (NADPH:quinone oxidoreductase 1), qui permettent respectivement la production des antioxydants glutathion et NADPH.

Dans l'hippocampe, nos immunomarquages montrent une localisation principalement cytoplasmique de Nrf2 chez les souris contrôles (Figure 53 A). En revanche dans le groupe KO MTR, ce facteur de transcription a une localisation nucléaire, et on le retrouve plus particulièrement dans le nucléole. Dans le cervelet, Nrf2 se situe majoritairement dans le cytoplasme des cellules de Purkinje chez les mutants (Figure 53 C). Dans le groupe KO MTR, le niveau d'expression de Nrf2 n'est pas altéré dans l'hippocampe, alors qu'il présente une tendance à la hausse dans le cervelet (Figure 53 B et D).

Discussion et Conclusion

Notre travail de thèse porte sur la première étude d'un modèle de souris KO tissu-spécifique sur le gène MTR. Cela permet de mettre en évidence des effets spécifiques de chaque organe. Ce modèle KO peut servir de modèle de pathologie humaine (patients mutés MTR, CblG). Cependant il ne récapitule pas tous les effets observés chez l'Homme. Notre étude s'appuie sur deux organes qui se comportent de manière très différente lors de l'exposition à un stress. Le foie est un organe capable de se régénérer très rapidement après hépatectomie partielle (Michalopoulos, 2007), ce qui en fait un organe très adapté à l'étude de la régénération post stress (Javier et al., 2014), au contraire du cerveau qui est le siège d'une neurogénèse très limitée (Martino et al., 2011) et met en jeu de ce fait des mécanismes orientés vers l'adaptation au stress. Ces différences expliquent les résultats observés dans nos deux modèles conditionnels. Dans le foie ce sont les mécanismes de prolifération qui sont altérés. Dans le cerveau, ce sont plutôt des mécanismes de réponse au stress.

1. Conséquences biochimiques sur le métabolisme des donneurs de méthyle

Les modifications de l'homéostasie de l'homocystéine, la méthionine, l'acide folique, et / ou la vitamine B12 ont été associées à des anomalies du tube neural, des maladies cardiovasculaires et le cancer (Brunaud et al., 2003; Ganguly and Alam, 2015; Kerek et al., 2013; Xiao et al., 2014). L'augmentation du niveau d'homocystéine dans le plasma est utilisé comme indicateur d'une carence en folates (Hague, 2003). Les rats en carence de vitamine B12 et folates présentent une réduction dans les concentrations de vitamine B12 et d'acide folique dans le sérum, ainsi qu'une diminution de la concentration de l'acide folique, de la méthionine, de la SAM et du rapport SAM/SAH, ainsi qu'une diminution de l'activité de MTR. Les rats en carence de vitamine B12 et folates ont également une augmentation des acides gras libres sanguins, du cholestérol total et des triglycérides, ainsi qu'une élévation des lipides totaux et des triglycérides dans le tissu hépatique (Chen et al., 2015). Les souris déficientes en MTR ont une augmentation d'homocystéine plasmatique, une diminution de la méthionine plasmatique, et une augmentation de méthyltétrahydrofolate dans les tissus (Elmore et al., 2007). Swanson et ses collègues ont montré que les souris MTR knockout hétérozygotes ont une légère augmentation de l'homocystéine plasmatique et de la méthionine par rapport aux souris wild type, mais qu'il n'y a pas d'autre paramètre biochimique modifié. Ils ont montré que les embryons knockout homozygotes survivent à l'implantation, mais meurent peu après (Swanson et al., 2001). Les patients humains atteints d'un déficit de la méthionine synthase présentent une homocystéinémie, une homocystéinurie et une hypométhioninémie (Swanson et al., 2001).

Au niveau hépatique, l'étude des effets métaboliques de l'inactivation de MTR est conditionnée par ses conséquences sur la régénération. Les embryons qui ont survécu étaient ceux pour lesquels existait un effet mosaïque important avec une activité de MTR résiduelle importante résultant d'une prolifération des cellules non mutées. Cette adaptation explique que nous n'avons pas trouvé de modifications importantes des constantes métaboliques, et notamment des modifications de concentration tissulaire de SAM, SAH et du rapport SAM/SAH. Ce mécanisme adaptatif pourrait expliquer également la présence d'une activité résiduelle importante de la méthionine synthase chez les souris KO à E15.5. Le résultat le plus significatif est en fait obtenu dans la période post-natale chez les souris hétérozygotes pour lesquelles on observe une augmentation paradoxale de la SAM hépatique en lien probable avec ce mécanisme adaptatif, l'activité MTR étant parallèlement diminuée d'un peu plus de 30 %.

Au contraire, au niveau du cerveau, l'inactivation de MTR engendre un déficit d'expression de la méthionine synthase important mais variable selon les zones étudiées. Il existe une inactivation quasi complète au niveau de l'hippocampe et de plus de 80 % au niveau du cortex, en Western-blot. De même, on retrouve les conséquences métaboliques attendues par l'inactivation de MTR, avec une diminution très importante de la SAM et de la SAH, sans augmentation de l'acide méthylmalonique. Ceci reflète probablement l'incapacité du cerveau à s'adapter à l'inactivation du gène par une neurogénèse comparable à la régénération hépatique.

L'inactivation dans le cerveau est viable, contrairement à l'inactivation dans le foie, ce qui nous a permis d'étudier les animaux dans la période post-natale. On retrouve chez les homozygotes un rapport poids du cerveau/poids total comparable à celui observé chez les animaux témoins. On peut donc conclure que contrairement à ce qui est observé dans le foie, l'inactivation de MTR n'a pas de conséquence majeure sur l'organogénèse du cerveau.

Nos résultats sont concordants avec ceux du modèle transgénique CD320. Dans ce modèle, il existe une inactivation de l'expression du récepteur de la transcobalamine nécessaire à la captation intracellulaire du cofacteur de la méthionine synthase, la vitamine B12. De manière similaire, Lai et al (Lai et al., 2013) ont observé une diminution de synthèse de la SAM et de la SAH. Ils ont observé également une augmentation de l'homocystéine, mais aussi de manière surprenante, une

augmentation de l'acide méthylmalonique qui n'est pas retrouvée dans notre modèle. Les effets de l'invalidation de CD320 sur l'organogénèse globale semblent également très réduits.

2. Etude comportementale : aspects neurofonctionnels et cognitifs

L'invalidation de MTR dans le cerveau entraîne des défauts d'apprentissage et de mémorisation spatiale. Les animaux CD 320 ont des troubles du comportement modérés qui contrastent avec des troubles importants observés dans notre modèle. Les troubles du comportement des souris homozygotes sont concordante avec l'étude immuno-histochimique que nous avons réalisée dans les différentes aires du cerveau. Il existe une réponse inadaptée au stress prédominante au niveau de l'hippocampe, réponse notamment illustrée par les altérations de localisation des protéines de transport des ARN mis en jeu par le stress cellulaire. Au total notre modèle a des conséquences fonctionnelles plus sévères que celles du modèle CD320.

3. Les effets du modèle KO conditionnel hépatique sur l'organogénèse

Swanson et ses collègues ont établi un modèle d'invalidation de MTR dans tout l'organisme, ils ont montré que les embryons knockout homozygotes survivent à l'implantation, mais meurent peu après. Les embryons sont en cours de résorption au stade E8.5 (Swanson et al., 2001). Notre modèle a permis de montrer que l'invalidation du gène MTR empêche le développement du foie à des stades très précoces de l'organogénèse. Cet arrêt de l'organogénèse hépatique entraîne logiquement la mort embryonnaire. Ceci nous a permis d'établir que l'invalidation du gène à un stade précoce du développement n'est pas un modèle adapté pour étudier les effets à plus long terme de l'invalidation de MTR.

Nous avons analysé des portées d'embryons à différents stades de développement après la mise en place de la délétion du gène MTR et nous avons analysé des embryons au stade E11.5 ainsi qu'aux stades ultérieurs. Nous n'avons en effet retrouvé aucune souris de génotype de type MTR homozygote mutée dans les portées lorsque l'invalidation est réalisée entre E 7.5 et E 8.5. Nous avons voulu ensuite déterminer si l'invalidation à des stades ultérieurs était compatible avec la vie embryo-fœtale. Les résultats obtenus sont parcellaires. Ils montrent cependant la survie de quelques embryons après E 11.5. Ces embryons avaient une taille et une morphologie normales, ainsi qu'un développement normal du foie. Ces résultats sont à interpréter avec prudence. Il est en effet probable qu'un mécanisme compensateur lié à la prolifération des cellules qui expriment toujours le gène entraîne un mosaïsme tissulaire. Cette hypothèse est confirmée par l'absence de diminution de

l'expression de MTR dans le foie des homozygotes mutés par rapport aux contrôles au stade embryonnaire E 13.5 et E 15.5. Nous observons par ailleurs un nombre d'embryons MTR inférieur au nombre attendu. Ceci suppose que ce mosaïsme est présent uniquement chez les embryons qui ont pu être analysés et que les autres n'étaient pas viables et ont donc été lysés. Ceci suggère donc que l'inactivation de MTR exerce un effet sélectif prédominant sur la prolifération cellulaire de l'organe au stade précoce de son développement.

Il existe plusieurs mécanismes possibles par lesquels la déficience de MTR chez la souris entraîne une létalité embryonnaire. Ceux-ci comprennent la toxicité du précurseur (accumulation d'homocystéine), un déficit de produit (la méthionine), le piégeage de l'acide folique (par exemple, l'acide folique est pris au piège sous la forme de 5-Me-THF), avec une diminution proportionnelle du métabolisme des monocarbones dépendant des folates, notamment pour la synthèse des précurseurs de l'ADN. La méthionine synthase est en effet un acteur clé du processus de prolifération du foie.

Dans une deuxième partie de l'étude embryonnaire, nous avons utilisé le modèle inductible à différentes fenêtres de l'organogénèse hépatique, cependant, nous avons été confrontés à la toxicité du tamoxifène. De plus, les nouveaux nés étaient mangés par leur mère, ce qui ne nous a pas permis de faire une analyse génétique précise. Le tamoxifène a été testé avec différents protocoles d'administration et de dosage qui n'ont pas solutionné le problème de sa toxicité. Ce phénomène est observé dans tous les génotypes, knockout ou wild type. Ceci est contradictoire aux résultats des études des autres chercheurs, qui montrent que les embryons exposés au tamoxifène au stade embryonnaire sont viables après la naissance (Bowman et al., 2013; Pan et al., 2013). Nous avons donc testé le Raloxifène réputé moins toxique (Koitabashi et al., 2009), avec une induction à E 10.5 et une analyse tissulaire à E 15.5. Nous avons mis en évidence une légère diminution de l'expression de la méthionine synthase par Western blot, insuffisante pour perturber notablement le métabolisme des donneurs de méthyle. Nous proposons une hypothèse qu'une diminution partielle de l'expression de la méthionine synthase, avec une expression hétérogène qui est également en faveur d'un mosaïsme par prolifération sélective et rapide des cellules qui continuent d'exprimer le gène.

Nous avons tenté de tirer le meilleur parti du système Cre-lox en utilisant toutes ses potentialités (KO constitutif, KO inductible), induction chez l'embryon à différents stades, et chez l'adulte, avec différentes doses d'inducteur pour trouver les meilleures conditions d'inactivation. Au total nos résultats montrent que lorsque la délétion est très efficace, l'embryon n'est pas viable. Chez les animaux hétérozygotes, l'enzyme résiduelle suffit pour maintenir l'activité du métabolisme des

donneurs de méthyle. C'est aussi le cas pour Mtrr, et les auteurs ont donc opté pour un système de genetrap permettant le knock-down de Mtrr. Les effets délétères ont été observés à la génération F2 (Padmanabhan et al., 2013). Nous n'avons pas étudié la génération F2, car nous voulions dans un premier temps définir les conditions expérimentales de notre étude sur la F1.

Au total, nos études du stade embryonnaires ont donc permis de montrer que MTR a un effet majeur sur les stades précoces de l'organogénèse en lien avec une inhibition de la prolifération cellulaire. Lorsque l'inactivation est incomplète, il existe une prolifération compensatrice des cellules non mutées. Lorsqu'elle est complète, la délétion de MTR ne permet pas le développement du foie et la vie de l'embryon.

4. Les effets du modèle KO conditionnel hépatique sur la régénération post hépatectomie chez la souris adulte

Nous avons étudié dans un second temps les effets d'une inactivation post-natale du gène chez les souris adultes par inactivation constitutive ou inducible. Pour l'inactivation constitutive, nous avons étudié des animaux hétérozygotes, ce qui nous a permis de mettre en évidence la présence d'une activité diminuée de MTR. Nous n'avons pas retrouvé de conséquence métabolique majeure dans la mesure où cette diminution est de l'ordre de 35 % seulement. De même, nous n'avons pas retrouvé d'anomalie tissulaire et notamment pas de stéatose. Nous avons donc poursuivi notre projet sur les souris inducibles, avec inactivation complète. Nous observons une expression hétérogène de la méthionine synthase prédominante dans l'espace péri-veineux.

MTR a une expression forte dans des sites de prolifération de l'épithélium tels que les cryptes intestinales et la couche basale de l'épithélium malpighien de la peau, son activité est réduite dans les zones où la prolifération de l'épithélium est réduite, tel que du côté apical des villosités intestinales et de la couche différenciée des kératinocytes, dans la peau. Nous avons observé que l'activité MTR présente un gradient très fort le long de l'axe crypto-villositaire, dans des explants intestinaux de rat. L'activité enzymatique de MTR était environ 8 fois plus élevée dans les cryptes, où le taux de prolifération est élevé, que dans la partie apicale des villosités, où l'apoptose produit une exfoliation des entérocytes (Guéant et al., 2013b). Le taux de prolifération des cellules TO (neuroblastome avec séquestration intracellulaire de la vitamine B12) était réduit de 5,5 fois, par rapport aux cellules contrôles (Battaglia-Hsu et al., 2009).

Nous nous sommes donc posé la question d'un effet prédominant de l'expression de MTR sur la prolifération cellulaire. Pour étudier l'effet de MTR sur la prolifération, nous avons réalisé une 2/3 hépatectomie partielle et étudié le délai optimal entre hépatectomie et le sacrifice de l'animal pour mettre en évidence la fenêtre correspondant au pic de régénération. La division cellulaire est rarement observée dans les hépatocytes du foie adulte normal, ces cellules sont dans la phase G0 du cycle cellulaire (Fausto et al., 2006; Michalopoulos and DeFrances, 1997). Cependant, après hépatectomie partielle, environ 95% des cellules hépatiques, qui sont normalement quiescentes, rentrent rapidement dans le cycle cellulaire (Taub, 2004). Après hépatectomie 2/3, la régénération du foie commence par une première vague de prolifération des hépatocytes, suivie par la prolifération successive des cellules biliaires, des cellules de Kupffer et des cellules endothéliales (Fausto et al., 2006; Michalopoulos, 2007). Le déclenchement de la synthèse de l'ADN est bien synchronisé dans les hépatocytes qui entourent la veine porte du lobule du foie et la veine centrale (Corlu and Loyer, 2012). L'initiation de la synthèse de l'ADN des hépatocytes se met en place au cours des 24 premières heures après l'hépatectomie 2/3 (Merlen et al., 2014). Le pic de la synthèse d'ADN (phase S) chez la souris se produit à 36-40 heures après hépatectomie partielle et varie entre les souches (Taub, 2004). Les hépatocytes rentrent en mitose (phase M) 48 heures après hépatectomie (Javier et al., 2014). Le PCNA (proliferating cell nuclear antigen) commence à s'exprimer dans les cellules de phase G1 et augmente dans les phases S et M (Giordano et al., 1991). Nous avons observé une diminution significative de PCNA à 48 heures et un effet plus modeste à 36 et 72 heures. Ceci indique que la déficience de la méthionine synthase influence plutôt les phases S et M de la prolifération des hépatocytes. Ghemrawi et al. ont trouvé qu'une carence en vitamine B12 induit un stress du réticulum endoplasmique (ER stress) suivi d'une diminution de la prolifération cellulaire (Ghemrawi et al., 2013). Yong et al. ont trouvé qu'une suppression du gène de l'insuline atténue le stress du réticulum endoplasmique et favorise la prolifération des cellules β matures. (Yong et al., 2016). Nous avons étudié si cet effet sur la prolifération cellulaire était provoqué par un stress cellulaire ou par une altération des voies des facteurs de croissance et des cytokines, notamment la voie IL-6-STAT 3 et la voie TGF β (Böhm et al., 2010; Taub, 2004). Nous n'avons pas observé d'augmentation des protéines des voies PERK et IRE, mais nous avons observé une augmentation d'ATF6 α clivé, ce qui suggère une réponse réelle mais limitée au stress cellulaire. Ceci est partiellement en accord avec les résultats obtenus sur des modèles cellulaires de séquestration de la vitamine B12 qui produisent également une diminution de l'activité de la méthionine synthase, dans des neuroblastomes transfectés par un plasmide transcobalamine-oléosine (Battaglia-Hsu et al., 2009; Ghemrawi et al., 2013). L'activation de NF- κ B et de la voie STAT 3 a été mise en évidence dans un modèle

d'hépatectomie partielle de souris IL-6 knockout (Aldeguer et al., 2002; Sakamoto et al., 1999; Tachibana et al., 2014).

Nous avons focalisé notre hypothèse sur un effet direct du gène MTR sur l'expression des cyclines. Cette hypothèse découle du résultat du transcriptome. L'analyse différentielle d'expression du transcriptome montre en effet que le cluster des gènes de la prolifération et du cycle cellulaire a une expression très altérée. Parmi les clusters de gènes, figurent les gènes du cycle cellulaire, avec une significativité de $p=2.1 \times 10^{-17}$. Les deux autres groupes de gènes les plus significatifs étaient ceux en lien avec le métabolisme de l'ADN ($p=4.4 \times 10^{-26}$) et la réplication de l'ADN ($p=3.3 \times 10^{-20}$). Nous avons donc focalisé notre intérêt sur l'étude de ces gènes et en particulier CDC45, BRCA1, CDC25, Wee 1, CDC2, CDK2, ainsi que les cyclines A2, B1, B2 et D1. On observe une diminution très importante de la cycline A2 48 heures après l'hépatectomie, ainsi qu'une diminution de phospho-CDK2 tyrosine 15, phospho-CDK2 thréonine 160 et CDK2. Les complexes Cdk/cyclines jouent un rôle crucial dans la régulation de la formation des complexes pre-RC (prereplication complexes). Les Pre-RC sont activés par des phosphorylations impliquant la protéine kinase Cdc7 et le complexe Cdk2/cyclineE qui déclenchent le recrutement de CDC45 (Zindy et al., 1992), un facteur crucial pour l'ADN hélicase et la polymérase. Au cours de la phase S, l'hétérodimère Cdk2/cycline A contribue également à la réplication de l'ADN par des phosphorylations de composants de la machine de réplication, y compris le PCNA et les ADN-polymérases. L'activité de cdk2 est donc associée à l'entrée et la progression en phase S (Corlu and Loyer, 2012).

Ces résultats montrent donc un effet très important de l'inactivation de MTR sur l'inhibition du cycle cellulaire. Ils confirment les résultats précédents du laboratoire obtenus sur des cellules HepG2 dont l'expression du gène MTR a été invalidée par SiRNA (Guéant et al., 2013b).

La phosphorylation de la thréonine 160 est à elle seule activatrice du cycle cellulaire. Sa diminution d'expression est donc une signature pouvant traduire la diminution du cycle, et par conséquent la diminution de la prolifération. La phosphorylation de la tyrosine 15 est au contraire une signature d'inactivation qui met en jeu les protéines WEE1 et MIK1. Il conviendra d'étudier ultérieurement s'il existe une dérégulation de ces protéines (Krishnan et al., 2010).

5. Comparaison du modèle génétique cKO mtr par rapport au modèle nutritionnel de carence gestationnelle en donneur de méthyles

L'importance de la régénération hépatocytaire ne s'accompagne pas d'anomalies tissulaires majeures, telles que celles observées dans le modèle de la carence gestationnelle en donneur de méthyle. Dans ce modèle nutritionnel, nous observons chez les rats nés de mères carencées une stéatose hépatique importante qui correspond à une dérégulation épigénomique des co-activateurs qui régulent l'expression des gènes de la β -oxydation et du métabolisme énergétique (Pooya et al., 2012). Ces différences peuvent être liées aux limites expérimentales de notre modèle. Dans le modèle nutritionnel de foetal programming, l'ensemble des cellules est exposé au stress métabolique. Au contraire, dans le modèle MTR KO conditionnel, seules les cellules pour lesquelles l'inactivation est efficace et complète subissent ce stress.

Nous avons observé chez les animaux transgéniques un stress du réticulum hépatique modéré portant notamment sur ATF6. Il existe également chez les animaux carencés un stress du réticulum très modéré, sans diminution de SIRT1, résultats qui sont donc tout à fait superposables. Notre modèle de souris transgénique ne produit pas de fibrose hépatique. Ce résultat est également similaire à ceux obtenus dans le modèle de carence en donneur de méthyle. Nous avons observé chez les animaux hétérozygotes, dans la période post-natale, une stéatose comparable à celle des animaux témoins. De même, nous avons observé une stéatose dans le modèle inductible, chez les souris adultes. Cependant nous avons observé une stéatose modérée similaire à celle observée chez les animaux contrôles et nous ne pouvons donc conclure définitivement sur l'effet spécifique de l'inactivation de MTR sur la stéatose.

6. Conclusion générale

La létalité prénatale de l'invalidation homozygote confirme l'efficacité de la délétion du gène MTR dans notre modèle murin. Nous montrons ici pour la première fois que l'invalidation homozygote de MTR dans le foie est létale in utero. MTR est donc un gène essentiel au développement embryonnaire hépatique mais pas à celui du cerveau. L'invalidation de la méthionine synthase hépatique inhibe la prolifération hépatocytaire après hépatectomie partielle des 2/3, ce qui constitue à notre connaissance la première démonstration in vivo d'un rôle de la méthionine synthase dans la prolifération. Les effets de l'invalidation de la méthionine synthase dans le foie sont rapidement atténués par la régénération, avec effet mosaïque qui « gomme » les conséquences sur le métabolisme des monocarbones. Au contraire, dans le cerveau où les effets de la régénération sont limités, l'invalidation altère le métabolisme des monocarbones et la concentration tissulaire en SAM, une réponse inadaptée au stress, via une dérégulation de certaines RBPs. La délétion de la méthionine synthase produit des défauts d'apprentissage et de mémorisation spatiale, qui traduisent des effets prédominants au niveau de l'hippocampe.

Bibliographie

Akbari, M.T., Naderi, A., Saremi, L., Sayad, A., Irani, S., and Ahani, A. (2015). Methionine synthase A2756G variation is associated with the risk of retinoblastoma in Iranian children. *Cancer Epidemiol.* 39, 1023–1025.

Albrecht, J.H., Hoffman, J.S., Kren, B.T., and Steer, C.J. (1993). Cyclin and cyclin-dependent kinase 1 mRNA expression in models of regenerating liver and human liver diseases. *Am. J. Physiol.* 265, G857–G864.

Aldeguer, X., Debonera, F., Shaked, A., Krasinkas, A.M., Gelman, A.E., Que, X., Zamir, G.A., Hiroyasu, S., Kovalovich, K.K., Taub, R., et al. (2002). Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration. *Hepatology*. Baltimore, Md 35, 40–48.

Al Farra, H.Y. (2010). Methionine synthase polymorphisms (MTR 2756 A>G and MTR 2758 C>G) frequencies and distribution in the Jordanian population and their correlation with neural tube defects in the population of the northern part of Jordan. *Indian J. Hum. Genet.* 16, 138–143.

Anastassiadis, K., Glaser, S., Kranz, A., Bernhardt, K., and Stewart, A.F. (2010). A Practical Summary of Site-Specific Recombination, Conditional Mutagenesis, and Tamoxifen Induction of CreERT2. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 109–123.

Andersson, H.C., and Shapira, E. (1998). Biochemical and clinical response to hydroxocobalamin versus cyanocobalamin treatment in patients with methylmalonic acidemia and homocystinuria (cblC). *J. Pediatr.* 132, 121–124.

Antony, A.C., Kane, M.A., Portillo, R.M., Elwood, P.C., and Kolhouse, J.F. (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, 14911–14917.

Arai, M., Yokosuka, O., Chiba, T., Imazeki, F., Kato, M., Hashida, J., Ueda, Y., Sugano, S., Hashimoto, K., Saisho, H., et al. (2003). Gene expression profiling reveals the mechanism and pathophysiology of mouse liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 278, 29813–29818.

Assaraf, Y.G., and Goldman, I.D. (1997). Loss of folic acid exporter function with markedly augmented folate accumulation in lipophilic antifolate-resistant mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272, 17460–17466.

Azuma, H., Paulk, N., Ranade, A., Dorrell, C., Al-Dhalimy, M., Ellis, E., Strom, S., Kay, M.A., Finegold, M., and Grompe, M. (2007). Robust expansion of human hepatocytes in *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}* mice. *Nat. Biotechnol.* 25, 903–910.

Bailey, L.B., and Gregory, J.F. (1999). Folate Metabolism and Requirements. *J. Nutr.* 129, 779–782.

Balaghi, M., and Wagner, C. (1995). Folate deficiency inhibits pancreatic amylase secretion in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 90–96.

Bandarian, V., and Matthews, R.G. (2001). Quantitation of rate enhancements attained by the binding of cobalamin to methionine synthase. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 5056–5064.

Bartholomew, D.W., Batshaw, M.L., Allen, R.H., Roe, C.R., Rosenblatt, D., Valle, D.L., and Francomano, C.A. (1988). Therapeutic approaches to cobalamin-C methylmalonic acidemia and homocystinuria. *J. Pediatr.* *112*, 32–39.

Battaglia-Hsu, S., Akchiche, N., Noel, N., Alberto, J.-M., Jeannesson, E., Orozco-Barrios, C.E., Martinez-Fong, D., Daval, J.-L., and Guéant, J.-L. (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*, 21930–21935.

Bergmeyer, H.U., Scheibe, P., and Wahlefeld, A.W. (1978). Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* *24*, 58–73.

Bertolo, R.F., and McBreairty, L.E. (2013). The nutritional burden of methylation reactions. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *16*, 102–108.

Beyer, K., Lao, J.I., Latorre, P., Riutort, N., Matute, B., Fernández-Figueras, M.T., Mate, J.L., and Ariza, A. (2003). Methionine synthase polymorphism is a risk factor for Alzheimer disease. *Neuroreport* *14*, 1391–1394.

Biselli, J.M., Goloni-Bertollo, E.M., Haddad, R., Eberlin, M.N., and Pavarino-Bertelli, E.C. (2008). The MTR A2756G polymorphism is associated with an increase of plasma homocysteine concentration in Brazilian individuals with Down syndrome. *Braz. J. Med. Biol. Res.* *41*, 34–40.

Blom, H.J., and Smulders, Y. (2011). Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J. Inherit. Metab. Dis.* *34*, 75–81.

Blom, H.J., Shaw, G.M., Heijer, M. den, and Finnell, R.H. (2006). Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 724–731.

Böhm, F., Köhler, U.A., Speicher, T., and Werner, S. (2010). Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol. Med.* *2*, 294–305.

Borowiak, M., Garratt, A.N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., and Birchmeier, C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10608–10613.

Bosco, P., Guéant-Rodríguez, R.-M., Anello, G., Romano, A., Namour, B., Spada, R.S., Caraci, F., Tringali, G., Ferri, R., and Guéant, J.-L. (2004). Association of IL-1 RN*2 allele and methionine synthase 2756 AA genotype with dementia severity of sporadic Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *75*, 1036–1038.

Bowman, A.N., van Amerongen, R., Palmer, T.D., and Nusse, R. (2013). Lineage tracing with Axin2 reveals distinct developmental and adult populations of Wnt/ β -catenin-responsive neural stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 7324–7329.

Boyles, A.L., Billups, A.V., Deak, K.L., Siegel, D.G., Mehlretter, L., Slifer, S.H., Bassuk, A.G., Kessler, J.A., Reed, M.C., Nijhout, H.F., et al. (2006). Neural tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions. *Environ. Health Perspect.* *114*, 1547–1552.

Breathnach, R., and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *50*, 349–383.

Brunaud, L., Alberto, J.-M., Ayav, A., Gérard, P., Namour, F., Antunes, L., Braun, M., Bronowicki, J.-P., Bresler, L., and Guéant, J.-L. (2003). Effects of vitamin B12 and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver. *Clin. Chem. Lab. Med.* *41*, 1012–1019.

Butler, C.C., Vidal-Alaball, J., Cannings-John, R., McCaddon, A., Hood, K., Papaioannou, A., McDowell, I., and Goringe, A. (2006). Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency: a systematic review of randomized controlled trials. *Fam. Pract.* *23*, 279–285.

Carmel, R., Watkins, D., Goodman, S.I., and Rosenblatt, D.S. (1988). Hereditary defect of cobalamin metabolism (cblG mutation) presenting as a neurologic disorder in adulthood. *N. Engl. J. Med.* *318*, 1738–1741.

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

Carrillo, N., Adams, D., and Venditti, C.P. (1993). Disorders of Intracellular Cobalamin Metabolism. In *GeneReviews*(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle),.

Carrillo-Carrasco, N., Sloan, J., Valle, D., Hamosh, A., and Venditti, C.P. (2009). Hydroxocobalamin dose escalation improves metabolic control in cblC. *J. Inherit. Metab. Dis.* *32*, 728–731.

Carrillo-Carrasco, N., Chandler, R.J., Chandrasekaran, S., and Venditti, C.P. (2010). Liver-directed recombinant adeno-associated viral gene delivery rescues a lethal mouse model of methylmalonic acidemia and provides long-term phenotypic correction. *Hum. Gene Ther.* *21*, 1147–1154.

Chamberlin, M.E., Ubagai, T., Mudd, S.H., Thomas, J., Pao, V.Y., Nguyen, T.K., Levy, H.L., Greene, C., Freehauf, C., and Chou, J.Y. (2000). Methionine Adenosyltransferase I/III Deficiency: Novel Mutations and Clinical Variations. *Am. J. Hum. Genet.* *66*, 347–355.

Chandler, R.J., and Venditti, C.P. (2008). Adenovirus-mediated gene delivery rescues a neonatal lethal murine model of mut(0) methylmalonic acidemia. *Hum. Gene Ther.* *19*, 53–60.

Chandler, R.J., Zerfas, P.M., Shanske, S., Sloan, J., Hoffmann, V., DiMauro, S., and Venditti, C.P. (2009). Mitochondrial dysfunction in mutant methylmalonic acidemia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 1252–1261.

Chen, G., Broséus, J., Hergalant, S., Donnart, A., Chevalier, C., Bolaños-Jiménez, F., Guéant, J.-L., and Houlgatte, R. (2015). Identification of master genes involved in liver key functions through transcriptomics and epigenomics of methyl donor deficiency in rat: Relevance to nonalcoholic liver disease. *Mol. Nutr. Food Res.* *59*, 293–302.

Chen, L.H., Liu, M.-L., Hwang, H.-Y., Chen, L.-S., Korenberg, J., and Shane, B. (1997). Human Methionine Synthase cDNA CLONING, GENE LOCALIZATION, AND EXPRESSION. *J. Biol. Chem.* *272*, 3628–3634.

Chen, Z., Karaplis, A.C., Ackerman, S.L., Pogribny, I.P., Melnyk, S., Lussier-Cacan, S., Chen, M.F., Pai, A., John, S.W., Smith, R.S., et al. (2001). Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 433–443.

Cianfanelli, V., and Cecconi, F. (2015). AMBRA1: When autophagy meets cell proliferation. *Autophagy* *11*, 1705–1707.

Coelho, D., Suormala, T., Stucki, M., Lerner-Ellis, J.P., Rosenblatt, D.S., Newbold, R.F., Baumgartner, M.R., and Fowler, B. (2008). Gene Identification for the cblD Defect of Vitamin B12 Metabolism. *N. Engl. J. Med.* *358*, 1454–1464.

Coelho, D., Kim, J.C., Miousse, I.R., Fung, S., du Moulin, M., Buers, I., Suormala, T., Burda, P., Frapolli, M., Stucki, M., et al. (2012). Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat. Genet.* *44*, 1152–1155.

Colnot, S., and Perret, C. (2011). Liver Zonation. In *Molecular Pathology of Liver Diseases*, S.P.S. Monga, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 7–16.

Cooper, B.A., Rosenblatt, D.S., and Watkins, D. (1990). Methylmalonic aciduria due to a new defect in adenosylcobalamin accumulation by cells. *Am. J. Hematol.* *34*, 115–120.

Corlu, A., and Loyer, P. (2012). Regulation of the G1/S Transition in Hepatocytes: Involvement of the Cyclin-Dependent Kinase Cdk1 in the DNA Replication. *Int. J. Hepatol.* *2012*, 1–17.

Coutant, A., Rescan, C., Gilot, D., Loyer, P., Guguen-Guillouzo, C., and Baffet, G. (2002). PI3K-FRAP/mTOR pathway is critical for hepatocyte proliferation whereas MEK/ERK supports both proliferation and survival. *Hepatol. Baltim. Md* *36*, 1079–1088.

Cr, K. (1995). Vitamin B12 in health and disease: part I--inherited disorders of function, absorption, and transport. *The Gastroenterologist* *3*, 329–344.

Datta, S., Koutmos, M., Patridge, K.A., Ludwig, M.L., and Matthews, R.G. (2008). A disulfide-stabilized conformer of methionine synthase reveals an unexpected role for the histidine ligand of the cobalamin cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 4115–4120.

David, P., and Richert, L. (2000). TRANSPLANTATION D'HEPATOCYTES ISOLES : DE LA DISPONIBILITE EN CELLULES HUMAINES A L'APPLICATION DANS UN MODELE RAT IN VIVO = ISOLATED HEPATOCYTES TRANSPLANTATION : HUMAN HEPATOCYTES DISPONIBILITY AND APPLICATION IN A RAT MODEL IN VIVO.

Deng, L., Elmore, C.L., Lawrance, A.K., Matthews, R.G., and Rozen, R. (2008). Methionine synthase reductase deficiency results in adverse reproductive outcomes and congenital heart defects in mice. *Mol. Genet. Metab.* *94*, 336–342.

Desjardins, P., and Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J. Vis. Exp. JoVE*.

Dixon, M.M., Huang, S., Matthews, R.G., and Ludwig, M. (1996). The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B12. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *4*, 1263–1275.

Dorszewska, J., Florczak, J., Rozycka, A., Kempisty, B., Jaroszewska-Kolecka, J., Chojnacka, K., Trzeciak, W.H., and Kozubski, W. (2007). Oxidative DNA damage and level of thiols as related to polymorphisms of MTHFR, MTR, MTHFD1 in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* *67*, 113–129.

Drennan, C.L., Huang, S., Drummond, J.T., Matthews, R.G., and Lidwig, M.L. (1994). How a protein binds B12: A 3.0 Å X-ray structure of B12-binding domains of methionine synthase. *Science* *266*, 1669–1674.

Elmore, C.L., Wu, X., Leclerc, D., Watson, E.D., Bottiglieri, T., Krupenko, N.I., Krupenko, S.A., Cross, J.C., Rozen, R., Gravel, R.A., et al. (2007). Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase. *Mol. Genet. Metab.* *91*, 85–97.

Evans, J.C., Huddler, D.P., Hilgers, M.T., Romanchuk, G., Matthews, R.G., and Ludwig, M.L. (2004). Structures of the N-terminal modules imply large domain motions during catalysis by methionine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3729–3736.

Farber, J.L., and Gerson, R.J. (1984). Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals. *Pharmacol. Rev.* *36*, 71S – 75S.

Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology* *43*, S45–S53.

Feil, S., Valtcheva, N., and Feil, R. (2009). Inducible Cre mice. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *530*, 343–363.

FitzGerald, M.J., Webber, E.M., Donovan, J.R., and Fausto, N. (1995). Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *6*, 417–427.

Fofou-Caillierez, M.B., Mrabet, N.T., Chery, C., Dreumont, N., Flayac, J., Pupavac, M., Paoli, J., Alberto, J.-M., Coelho, D., Camadro, J.-M., et al. (2013). Interaction between methionine synthase isoforms and MMACHC: characterization in cblG-variant, cblG and cblC inherited causes of megaloblastic anaemia. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 4591–4601.

Fyfe, J.C., Madsen, M., Højrup, P., Christensen, E.I., Tanner, S.M., Chapelle, A. de la, He, Q., and Moestrup, S.K. (2004). The functional cobalamin (vitamin B12)–intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood* *103*, 1573–1579.

Galivan, J., Ryan, T.J., Chave, K., Rhee, M., Yao, R., and Yin, D. (2000). Glutamyl hydrolase: pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacol. Ther.* *85*, 207–215.

Ganesan, T., Khadra, M.H., Wallis, J., and Neal, D.E. (2002). Vitamin B12 malabsorption following bladder reconstruction or diversion with bowel segments. *ANZ J. Surg.* *72*, 479–482.

Ganguly, P., and Alam, S.F. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr. J.* *14*.

Gebhardt, R. (1992). Metabolic zonation of the liver: Regulation and implications for liver function. *Pharmacol. Ther.* *53*, 275–354.

Ghemrawi, R., Pooya, S., Lorentz, S., Gauchotte, G., Arnold, C., Gueant, J.-L., and Battaglia-Hsu, S.-F. (2013). Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis.* *4*, e553.

Giordano, M., Danova, M., Pellicciari, C., Wilson, G.D., Mazzini, G., Fuhrman Conti, A.M., Franchini, G., Riccardi, A., and Manfredi Romanini, M.G. (1991). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin expression during the cell cycle in normal and leukemic cells. *Leuk. Res.* *15*, 965–974.

Giorgi, C., Yeo, G.W., Stone, M.E., Katz, D.B., Burge, C., Turrigiano, G., and Moore, M.J. (2007). The EJC factor eIF4AIII modulates synaptic strength and neuronal protein expression. *Cell* *130*, 179–191.

Gorrini, C., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 931–947.

Goulding, C.W., Postigo, D., and Matthews, R.G. (1997). Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine. *Biochemistry (Mosc.)* *36*, 8082–8091.

Grisham, J.W. (1962). A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res.* *22*, 842–849.

Grützner, N., Heilmann, R.M., Stupka, K.C., Rangachari, V.R., Weber, K., Holzenburg, A., Suchodolski, J.S., and Steiner, J.M. (2013). Serum homocysteine and methylmalonic acid concentrations in Chinese Shar-Pei dogs with cobalamin deficiency. *Vet. J.* *197*, 420–426.

Guéant, J.-L., Namour, F., Guéant-Rodriguez, R.-M., and Daval, J.-L. (2013a). Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol. Metab.* *24*, 279–289.

Guéant, J.-L., Caillerez-Fofou, M., Battaglia-Hsu, S., Alberto, J.-M., Freund, J.-N., Dulluc, I., Adjalla, C., Maury, F., Merle, C., Nicolas, J.-P., et al. (2013b). Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie* *95*, 1033–1040.

Guéant-Rodriguez, R.M., Rendeli, C., Namour, B., Venuti, L., Romano, A., Anello, G., Bosco, P., Debard, R., Gérard, P., Viola, M., et al. (2003). Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. *Neurosci. Lett.* *344*, 189–192.

Gulati, S., Baker, P., Li, Y.N., Fowler, B., Kruger, W., Brody, L.C., and Banerjee, R. (1996). Defects in human methionine synthase in cblG patients. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 1859–1865.

Haber, B.A., Mohn, K.L., Diamond, R.H., and Taub, R. (1993). Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J. Clin. Invest.* *91*, 1319–1326.

Hague, W.M. (2003). Homocysteine and pregnancy. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *17*, 459–469.

Henry, R.J., Chiamori, N., Golub, O.J., and Berkman, S. (1960). Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. *Am. J. Clin. Pathol.* *34*, 381–398.

Hickey, R.D., Lillegard, J.B., Fisher, J.E., McKenzie, T.J., Hofherr, S.E., Finegold, M.J., Nyberg, S.L., and Grompe, M. (2011). Efficient production of Fah-null heterozygote pigs by chimeric adeno-associated virus-mediated gene knockout and somatic cell nuclear transfer. *Hepatology*. *Baltim. Md* *54*, 1351–1359.

Huh, C.-G., Factor, V.M., Sánchez, A., Uchida, K., Conner, E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4477–4482.

Iyer, R., Tomar, S.K., Kapila, S., Mani, J., and Singh, R. (2010). Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Res. Int.* *43*, 103–110.

Jadavji, N.M., Deng, L., Malysheva, O., Caudill, M.A., and Rozen, R. (2015). MTHFR deficiency or reduced intake of folate or choline in pregnant mice results in impaired short-term memory and increased apoptosis in the hippocampus of wild-type offspring. *Neuroscience* *300*, 1–9.

Jakubowski, H., Perla-Kaján, J., Finnell, R.H., Cabrera, R.M., Wang, H., Gupta, S., Kruger, W.D., Kraus, J.P., and Shih, D.M. (2009). Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J.* *23*, 1721–1727.

Javier, A., Cienfuegos, F.R., Jorge Baixauli, F.M.-R., Pardo, F., and Hernández-Lizoáin, J.L. (2014). Liver regeneration—The best kept secret. A model of tissue injury. *Rev. Esp. ENFERMEDADES Dig.* *2014*, 171–194.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* *337*, 816–821.

Kane, M.A., Elwood, P.C., Portillo, R.M., Antony, A.C., and Kolhouse, J.F. (1986). The interrelationship of the soluble and membrane-associated folate-binding proteins in human KB cells. *J. Biol. Chem.* *261*, 15625–15631.

Kerek, R., Geoffroy, A., Bison, A., Martin, N., Akchiche, N., Pourié, G., Helle, D., Guéant, J.-L., Bossenmeyer-Pourié, C., and Daval, J.-L. (2013). Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124. *Cell Death Dis.* *4*, e755.

Kim, J., Gherasim, C., and Banerjee, R. (2008). Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 14551–14554.

Kim, J., Hannibal, L., Gherasim, C., Jacobsen, D.W., and Banerjee, R. (2009). A human vitamin B12 trafficking protein uses glutathione transferase activity for processing alkylcobalamins. *J. Biol. Chem.* *284*, 33418–33424.

Kiso, S., Kawata, S., Tamura, S., Higashiyama, S., Ito, N., Tsushima, H., Taniguchi, N., and Matsuzawa, Y. (1995). Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a hepatotrophic factor in rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* *22*, 1584–1590.

Koitaishi, N., Bedja, D., Zaiman, A.L., Pinto, Y.M., Zhang, M., Gabrielson, K.L., Takimoto, E., and Kass, D.A. (2009). Avoidance of Transient Cardiomyopathy in Cardiomyocyte-Targeted Tamoxifen-Induced MerCreMer Gene Deletion Models. *Circ. Res.* *105*, 12–15.

Koniaris, L.G., McKillop, I.H., Schwartz, S.I., and Zimmers, T.A. (2003). Liver regeneration. *J. Am. Coll. Surg.* *197*, 634–659.

Kos, C.H. (2004). Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr. Rev.* *62*, 243–246.

Koutmos, M., Datta, S., Patridge, K.A., Smith, J.L., and Matthews, R.G. (2009). Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 18527–18532.

Kräutler, B. (2005). Vitamin B12: chemistry and biochemistry. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 806–810.

Krishnan, A., Nair, S.A., and Pillai, M.R. (2010). Loss of cks1 homeostasis deregulates cell division cycle. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 154–164.

Lai, S.-C., Nakayama, Y., Sequeira, J.M., Wlodarczyk, B.J., Cabrera, R.M., Finnell, R.H., Bottiglieri, T., and Quadros, E.V. (2013). The transcobalamin receptor knockout mouse: a model for vitamin B12 deficiency in the central nervous system. *FASEB J.* *27*, 2468–2475.

Lamers, W.H., Geerts, W.J., Jonker, A., Verbeek, F.J., Wagenaar, G.T., and Moorman, A.F. (1997). Quantitative graphical description of portocentral gradients in hepatic gene expression by image analysis. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *26*, 398–406.

Leclerc, D., Campeau, E., Goyette, P., Adjalla, C.E., Christensen, B., Ross, M., Eydoux, P., Rosenblatt, D.S., Rozen, R., and Gravel, R.A. (1996). Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 1867–1874.

Lerner-Ellis, J.P., Tirone, J.C., Pawelek, P.D., Doré, C., Atkinson, J.L., Watkins, D., Morel, C.F., Fujiwara, T.M., Moras, E., Hosack, A.R., et al. (2006). Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nat. Genet.* *38*, 93–100.

Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D.J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M., and Clavien, P.-A. (2006). Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* *312*, 104–107.

Leu, J.I., Crissey, M.A., Leu, J.P., Ciliberto, G., and Taub, R. (2001). Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 414–424.

Leu, J.I., Crissey, M.A.S., and Taub, R. (2003). Massive hepatic apoptosis associated with TGF-beta1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1-deficient mice. *J. Clin. Invest.* *111*, 129–139.

Li, W., Liang, X., Leu, J.I., Kovalovich, K., Ciliberto, G., and Taub, R. (2001). Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *33*, 1377–1386.

Li, Y.N., Gulati, S., Baker, P.J., Brody, L.C., Banerjee, R., and Kruger, W.D. (1996). Cloning, Mapping and RNA Analysis of the Human Methionine Synthase Gene. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 1851–1858.

Lildballe, D.L., Mutti, E., Birn, H., and Nexø, E. (2012). Maximal Load of the Vitamin B12 Transport System: A Study on Mice Treated for Four Weeks with High-Dose Vitamin B12 or Cobinamide. *PLOS ONE* *7*, e46657.

de Lima, E.L.S., da Silva, V.C., da Silva, H.D.A., Bezerra, A.M., de Moraes, V.L.L., de Moraes, A.L., Cruz, R.V., Barros, M.H.M., Hassan, R., de Freitas, A.C., et al. (2010). MTR polymorphic variant A2756G and retinoblastoma risk in Brazilian children. *Pediatr. Blood Cancer* *54*, 904–908.

Linnebank, M., Linnebank, A., Jeub, M., Klockgether, T., Wüllner, U., Kölsch, H., Heun, R., Koch, H.G., Suormala, T., and Fowler, B. (2004). Lack of genetic dispositions to hyperhomocysteinemia in Alzheimer disease. *Am. J. Med. Genet. A.* *131*, 101–102.

Locasale, J.W. (2013). Serine, glycine and the one-carbon cycle: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 572–583.

Lucock, M. (2000). Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol. Genet. Metab.* *71*, 121–138.

Ludwig, M.L., and Matthews, R.G. (1997). Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* *66*, 269–313.

Malik, R., Selden, C., and Hodgson, H. (2002). The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin. Cell Dev. Biol.* *13*, 425–431.

Mao, S.A., Glorioso, J.M., and Nyberg, S.L. (2014). Liver Regeneration. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* *163*, 352–362.

Martinelli, D., Deodato, F., and Dionisi-Vici, C. (2010). Cobalamin C defect: natural history, pathophysiology, and treatment. *J. Inherit. Metab. Dis.* *34*, 127–135.

Martino, G., Pluchino, S., Bonfanti, L., and Schwartz, M. (2011). Brain regeneration in physiology and pathology: the immune signature driving therapeutic plasticity of neural stem cells. *Physiol. Rev.* *91*, 1281–1304.

Matsuo, K., Suzuki, R., Hamajima, N., Ogura, M., Kagami, Y., Taji, H., Kondoh, E., Maeda, S., Asakura, S., Kaba, S., et al. (2001). Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood* *97*, 3205–3209.

Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., and Okamura, H. (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* *302*, 255–259.

Matthews, R.G., Ross, J., Baugh, C.M., Cook, J.D., and Davis, L. (1982). Interactions of pig liver serine hydroxymethyltransferase with methyltetrahydropteroylpolyglutamate inhibitors and with tetrahydropteroylpolyglutamate substrates. *Biochemistry (Mosc.)* *21*, 1230–1238.

Mead, J.E., and Fausto, N. (1989). Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 1558–1562.

Mead, J.E., Braun, L., Martin, D.A., and Fausto, N. (1990). Induction of replicative competence (“priming”) in normal liver. *Cancer Res.* *50*, 7023–7030.

Melhem, H., Hansmannel, F., Bressenot, A., Battaglia-Hsu, S.-F., Billioud, V., Alberto, J.M., Gueant, J.L., and Peyrin-Biroulet, L. (2015). Methyl-deficient diet promotes colitis and SIRT1-mediated endoplasmic reticulum stress. *Gut* *gutjnl* – 2014–307030.

Menjo, M., Ikeda, K., and Nakanishi, M. (1998). Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in liver regeneration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *13 Suppl*, S100–S105.

Merlen, G., Gentric, G., Celton-Morizur, S., Foretz, M., Guidotti, J.-E., Fauveau, V., Leclerc, J., Viollet, B., and Desdouets, C. (2014). AMPK α 1 controls hepatocyte proliferation independently of energy balance by regulating Cyclin A2 expression. *J. Hepatol.* *60*, 152–159.

Mi, H., Lazareva-Ulitsky, B., Loo, R., Kejariwal, A., Vandergriff, J., Rabkin, S., Guo, N., Muruganujan, A., Doremieux, O., Campbell, M.J., et al. (2005). The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic Acids Res.* *33*, D284–D288.

Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., and Thomas, P.D. (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat. Protoc.* *8*, 1551–1566.

Mi, H., Poudel, S., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., and Thomas, P.D. (2015). PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids Res.* *gkv1194*.

Michalopoulos, G.K. (2007). Liver Regeneration. *J. Cell. Physiol.* *213*, 286–300.

Michalopoulos, G.K. (2010). Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am. J. Pathol.* *176*, 2–13.

Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver Regeneration. *Science* *276*, 60–66.

Michalopoulos, G.K., and Khan, Z. (2005). Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology* *128*, 503–506.

Mitchell, C., and Willenbring, H. (2008). A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat. Protoc.* *3*, 1167–1170.

Mitchell, C., Nivison, M., Jackson, L.F., Fox, R., Lee, D.C., Campbell, J.S., and Fausto, N. (2005). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* *280*, 2562–2568.

Miyaoka, Y., and Miyajima, A. (2013). To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Div.* *8*, 8.

Morel, C.F., Lerner-Ellis, J.P., and Rosenblatt, D.S. (2006). Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cbIC): phenotype-genotype correlations and ethnic-specific observations. *Mol. Genet. Metab.* *88*, 315–321.

Moreno-Garcia, M.A., Pupavac, M., Rosenblatt, D.S., Tremblay, M.L., and Jerome-Majewska, L.A. (2014). The *Mmachc* gene is required for pre-implantation embryogenesis in the mouse. *Mol. Genet. Metab.* *112*, 198–204.

Morrison, K., Edwards, Y.H., Lynch, S.A., Burn, J., Hol, F., and Mariman, E. (1997). Methionine synthase and neural tube defects. *J. Med. Genet.* *34*, 958.

Nelsen, C.J., Rickheim, D.G., Timchenko, N.A., Stanley, M.W., and Albrecht, J.H. (2001). Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth in vivo. *Cancer Res.* *61*, 8564–8568.

Nguyen, T., Nioi, P., and Pickett, C.B. (2009). The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* *284*, 13291–13295.

Nicolas, J.P., and Guéant, J.L. (1994). [Absorption, distribution and excretion of vitamin B12]. *Bull. Acad. Natl. Med.* *178*, 551–565; discussion 565–568.

Nielsen, M.J., Rasmussen, M.R., Andersen, C.B.F., Nexø, E., and Moestrup, S.K. (2012). Vitamin B12 transport from food to the body's cells—a sophisticated, multistep pathway. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 345–354.

Nijhout, H.F., Reed, M.C., Anderson, D.F., Mattingly, J.C., James, S.J., and Ulrich, C.M. (2006). Long-range allosteric interactions between the folate and methionine cycles stabilize DNA methylation reaction rate. *Epigenetics* *1*, 81–87.

Nogueira, C., Aiello, C., Cerone, R., Martins, E., Caruso, U., Moroni, I., Rizzo, C., Diogo, L., Leão, E., Kok, F., et al. (2008). Spectrum of *MMACHC* mutations in Italian and Portuguese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, *cbIC* type. *Mol. Genet. Metab.* *93*, 475–480.

Obeid, R. (2013). The Metabolic Burden of Methyl Donor Deficiency with Focus on the Betaine Homocysteine Methyltransferase Pathway. *Nutrients* *5*, 3481–3495.

Oltean, S., and Banerjee, R. (2005). A B12-responsive Internal Ribosome Entry Site (IRES) Element in Human Methionine Synthase. *J. Biol. Chem.* *280*, 32662–32668.

Ozaki, M., Haga, S., Zhang, H.Q., Irani, K., and Suzuki, S. (2003). Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon *rac1*. *Cell Death Differ.* *10*, 508–515.

Padmanabhan, N., Jia, D., Geary-Joo, C., Wu, X., Ferguson-Smith, A.C., Fung, E., Bieda, M.C., Snyder, F.F., Gravel, R.A., Cross, J.C., et al. (2013). Mutation in Folate Metabolism Causes Epigenetic Instability and Transgenerational Effects on Development. *Cell* *155*, 81–93.

Pan, F.C., Bankaitis, E.D., Boyer, D., Xu, X., Van de Castele, M., Magnuson, M.A., Heimberg, H., and Wright, C.V.E. (2013). Spatiotemporal patterns of multipotentiality in *Ptf1a*-expressing cells during pancreas organogenesis and injury-induced facultative restoration. *Development* *140*, 751–764.

Park, E.J., Sun, X., Nichol, P., Saijoh, Y., Martin, J.F., and Moon, A.M. (2008). System for tamoxifen-inducible expression of cre-recombinase from the Foxa2 locus in mice. *Dev. Dyn.* 237, 447–453.

Peng, L., Dreumont, N., Coelho, D., Guéant, J.-L., and Arnold, C. (2016). Genetic animal models to decipher the pathogenic effects of vitamin B12 and folate deficiency. *Biochimie* 126, 43–51.

Peters, H., Nefedov, M., Sarsero, J., Pitt, J., Fowler, K.J., Gazeas, S., Kahler, S.G., and Ioannou, P.A. (2003). A knock-out mouse model for methylmalonic aciduria resulting in neonatal lethality. *J. Biol. Chem.* 278, 52909–52913.

Pooya, S., Blaise, S., Moreno Garcia, M., Giudicelli, J., Alberto, J.-M., Guéant-Rodriguez, R.-M., Jeannesson, E., Gueguen, N., Bressenot, A., Nicolas, B., et al. (2012). Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypomethylation and decreased ER- α , ERR- α , and HNF-4 α in the rat liver. *J. Hepatol.* 57, 344–351.

Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S.H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2006). Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell* 127, 917–928.

Quéré, I., Paul, V., Rouillac, C., Janbon, C., London, J., Demaille, J., Kamoun, P., Dufier, J.L., Abitbol, M., and Chassé, J.F. (1999). Spatial and temporal expression of the cystathionine beta-synthase gene during early human development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 127–137.

Riehle, K.J., Dan, Y.Y., Campbell, J.S., and Fausto, N. (2011). New Concepts in Liver Regeneration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 203–212.

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

Rosenblatt, D.S., Cooper, B.A., Schmutz, S.M., Zaleski, W.A., and Casey, R.E. (1985). Prenatal vitamin B12 therapy of a fetus with methylcobalamin deficiency (cobalamin E disease). *Lancet Lond. Engl.* 1, 1127–1129.

Russell, W.E., Kaufmann, W.K., Sitaric, S., Luetkeke, N.C., and Lee, D.C. (1996). Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor- α -targeted mice. *Mol. Carcinog.* 15, 183–189.

Rutsch, F., Gailus, S., Miousse, I.R., Suormala, T., Sagné, C., Toliat, M.R., Nürnberg, G., Wittkamp, T., Buers, I., Sharifi, A., et al. (2009). Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nat. Genet.* 41, 234–239.

Sadek, S., and Bell, S.C. (1996). The effects of the antihormones RU486 and tamoxifen on fetoplacental development and placental bed vascularisation in the rat: a model for intrauterine fetal growth retardation. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 103, 630–641.

- Sakamoto, T., Liu, Z., Murase, N., Ezure, T., Yokomuro, S., Poli, V., and Demetris, A.J. (1999). Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology*. Baltimore, Md 29, 403–411.
- Saxena, R., Theise, N.D., and Crawford, J.M. (1999). Microanatomy of the human liver-exploring the hidden interfaces. *Hepatology*. Baltimore, Md 30, 1339–1346.
- Schibler, U. (2003). Circadian rhythms. Liver regeneration clocks on. *Science* 302, 234–235.
- Schuler, M., Dierich, A., Chambon, P., and Metzger, D. (2004). Efficient temporally controlled targeted somatic mutagenesis in hepatocytes of the mouse. *Genesis* 39, 167–172.
- Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* 23, 5080–5081.
- Scott, J.M. (1999). Folate and vitamin B12. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 441–448.
- Seetharam, B., and Li, N. (2000). Transcobalamin II and its cell surface receptor. *Vitam. Horm.* 59, 337–366.
- Seetharam, B., Bose, S., and Li, N. (1999). Cellular Import of Cobalamin (Vitamin B-12). *J. Nutr.* 129, 1761–1764.
- Sharp, L., and Little, J. (2004). Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review. *Am. J. Epidemiol.* 159, 423–443.
- Shimizu, M., Hara, A., Okuno, M., Matsuno, H., Okada, K., Ueshima, S., Matsuo, O., Niwa, M., Akita, K., Yamada, Y., et al. (2001). Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology*. Baltimore, Md 33, 569–576.
- Silaste, M.-L., Rantala, M., Sämpi, M., Alfthan, G., Aro, A., and Kesäniemi, Y.A. (2001). Polymorphisms of Key Enzymes in Homocysteine Metabolism Affect Diet Responsiveness of Plasma Homocysteine in Healthy Women. *J. Nutr.* 131, 2643–2647.
- Skov Olsen, P., Boesby, S., Kirkegaard, P., Therkelsen, K., Almdal, T., Poulsen, S.S., and Nexø, E. (1988). Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology*. Baltimore, Md 8, 992–996.
- Smith, S.E., Kinney, H.C., Swoboda, K.J., and Levy, H.L. (2006). Subacute combined degeneration of the spinal cord in cblC disorder despite treatment with B12. *Mol. Genet. Metab.* 88, 138–145.
- Stern, L.L., Mason, J.B., Selhub, J., and Choi, S.-W. (2000). Genomic DNA Hypomethylation, a Characteristic of Most Cancers, Is Present in Peripheral Leukocytes of Individuals Who Are

Homozygous for the C677T Polymorphism in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* *9*, 849–853.

Sunden, S.L., Renduchintala, M.S., Park, E.I., Miklasz, S.D., and Garrow, T.A. (1997). Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch. Biochem. Biophys.* *345*, 171–174.

Suormala, T., Baumgartner, M.R., Coelho, D., Zavadakova, P., Kožich, V., Koch, H.G., Berghäuser, M., Wraith, J.E., Burlina, A., Sewell, A., et al. (2004). The cblD Defect Causes Either Isolated or Combined Deficiency of Methylcobalamin and Adenosylcobalamin Synthesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 42742–42749.

Swanson, D.A., Liu, M.L., Baker, P.J., Garrett, L., Stitzel, M., Wu, J., Harris, M., Banerjee, R., Shane, B., and Brody, L.C. (2001). Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 1058–1065.

Tachibana, S., Zhang, X., Ito, K., Ota, Y., Cameron, A.M., Williams, G.M., and Sun, Z. (2014). Interleukin-6 is required for cell cycle arrest and activation of DNA repair enzymes after partial hepatectomy in mice. *Cell Biosci.* *4*, 6.

Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 836–847.

Teng, Y.-W., Mehedint, M.G., Garrow, T.A., and Zeisel, S.H. (2011). Deletion of betaine-homocysteine S-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon metabolism, resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas. *J. Biol. Chem.* *286*, 36258–36267.

Thomas, P.D., Campbell, M.J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., and Narechania, A. (2003). PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. *Genome Res.* *13*, 2129–2141.

Trolin, C.G., Löfberg, C., Trolin, G., and Orelund, L. (1994). Brain ATP:l-methionine S-adenosyltransferase (MAT), S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocysteine (SAH): regional distribution and age-related changes. *Eur. Neuropsychopharmacol.* *4*, 469–477.

Van Hove, J.L.K., Van Damme-Lombaerts, R., Grünewald, S., Peters, H., Van Damme, B., Fryns, J.-P., Arnout, J., Wevers, R., Baumgartner, E.R., and Fowler, B. (2002). Cobalamin disorder Cbl-C presenting with late-onset thrombotic microangiopathy. *Am. J. Med. Genet.* *111*, 195–201.

Vidal-Alaball, J., Butler, C.C., Cannings-John, R., Goringe, A., Hood, K., McCaddon, A., McDowell, I., and Papaioannou, A. (2005). Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004655.

Wang, X.L., Cai, H., Cranney, G., and Wilcken, D.E. (1998). The frequency of a common mutation of the methionine synthase gene in the Australian population and its relation to smoking and coronary artery disease. *J. Cardiovasc. Risk* *5*, 289–295.

- Wang, X.L., Duarte, N., Cai, H., Adachi, T., Sim, A.S., Cranney, G., and Wilcken, D.E. (1999). Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. *Atherosclerosis* *146*, 133–140.
- Watkins, D., and Rosenblatt, D.S. (1989). Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. *Am. J. Med. Genet.* *34*, 427–434.
- Watkins, D., and Rosenblatt, D.S. (2011). Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* *157*, 33–44.
- Watkins, D., Ru, M., Hwang, H.-Y., Kim, C.D., Murray, A., Philip, N.S., Kim, W., Legakis, H., Wai, T., Hilton, J.F., et al. (2002). Hyperhomocysteinemia Due to Methionine Synthase Deficiency, cblG: Structure of the MTR Gene, Genotype Diversity, and Recognition of a Common Mutation, P1173L. *Am. J. Hum. Genet.* *71*, 143–153.
- Webber, E.M., Wu, J.C., Wang, L., Merlino, G., and Fausto, N. (1994). Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* *145*, 398–408.
- Weglarz, T.C., and Sandgren, E.P. (2000). Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 12595–12600.
- Weisberg, I.S., Park, E., Ballman, K.V., Berger, P., Nunn, M., Suh, D.S., Breksa, A.P., Garrow, T.A., and Rozen, R. (2003). Investigations of a common genetic variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) in coronary artery disease. *Atherosclerosis* *167*, 205–214.
- Weitman, S.D., Lark, R.H., Coney, L.R., Fort, D.W., Frasca, V., Zurawski, V.R., and Kamen, B.A. (1992). Distribution of the Folate Receptor GP38 in Normal and Malignant Cell Lines and Tissues. *Cancer Res.* *52*, 3396–3401.
- van der Westhuyzen, J., Fernandes-Costa, F., and Metz, J. (1982). Cobalamin inactivation by nitrous oxide produces severe neurological impairment in fruit bats: protection by methionine and aggravation by folates. *Life Sci.* *31*, 2001–2010.
- Wilson, A., Leclerc, D., Saberi, F., Campeau, E., Hwang, H.Y., Shane, B., Phillips, J.A., Rosenblatt, D.S., and Gravel, R.A. (1998). Functionally null mutations in patients with the cblG-variant form of methionine synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* *63*, 409–414.
- Wu, T., and Fu, X.-D. (2015). Genomic functions of U2AF in constitutive and regulated splicing. *RNA Biol.* *12*, 479–485.
- Wuerges, J., Geremia, S., and Randaccio, L. (2007). Structural study on ligand specificity of human vitamin B12 transporters. *Biochem. J.* *403*, 431–440.

Xiao, Q., Freedman, N.D., Ren, J., Hollenbeck, A.R., Abnet, C.C., and Park, Y. (2014). Intakes of folate, methionine, vitamin B6, and vitamin B12 with risk of esophageal and gastric cancer in a large cohort study. *Br. J. Cancer* *110*, 1328–1333.

Yamaji, T., Iwasaki, M., Sasazuki, S., Sakamoto, H., Yoshida, T., and Tsugane, S. (2009). Methionine Synthase A2756G Polymorphism Interacts with Alcohol and Folate Intake to Influence the Risk of Colorectal Adenoma. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* *18*, 267–274.

Yamanishi, M., Vlasie, M., and Banerjee, R. (2005). Adenosyltransferase: an enzyme and an escort for coenzyme B12? *Trends Biochem. Sci.* *30*, 304–308.

Yao, R., Schneider, E., Ryan, T.J., and Galivan, J. (1996). Human gamma-glutamyl hydrolase: cloning and characterization of the enzyme expressed in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 10134–10138.

Yong, J., Itkin-Ansari, P., and Kaufman, R.J. (2016). When Less Is Better: ER Stress and Beta Cell Proliferation. *Dev. Cell* *36*, 4–6.

Yun, W. (2013). The Association between the MTR Gene A2576G Polymorphism and Alzheimer's Disease: a Meta Analysis Study. *Hum. Genet. Embryol.* *01*.

Zavadáková, P., Fowler, B., Suormala, T., Novotna, Z., Mueller, P., Hennermann, J.B., Zeman, J., Vilaseca, M.A., Vilarinho, L., Gutsche, S., et al. (2005). *cb1E* Type of homocystinuria due to methionine synthase reductase deficiency: Functional correction by minigene expression. *Hum. Mutat.* *25*, 239–247.

Zhao, H.-L., Li, X.-Q., Zhang, Z.-X., Bi, X.-H., Wang, B., and Zhang, J.-W. (2008). Association analysis of methionine synthase gene 2756 A>G polymorphism and Alzheimer disease in a Chinese population. *Brain Res.* *1204*, 118–122.

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

Zhu, H., Wicker, N.J., Shaw, G.M., Lammer, E.J., Hendricks, K., Suarez, L., Canfield, M., and Finnell, R.H. (2003). Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. *Mol. Genet. Metab.* *78*, 216–221.

Zindy, F., Lamas, E., Chenivesse, X., Sobczak, J., Wang, J., Fesquet, D., Henglein, B., and Bréchet, C. (1992). Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *182*, 1144–1154.

Matériels et méthodes

Fiche 1 : Modèle murin d'invalidation de la méthionine synthase

Les animaux ont été traités selon l'Arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques. Le numéro d'autorisation d'établissement d'expérimentation animale est le n°54-547-22 délivré par la Direction départementale pour la protection des populations, Meurthe et Moselle, France, et le numéro d'agrément du comité d'éthique pour l'utilisation de ce modèle de souris génétiquement modifiée est le n°APAFIS#2776-2015111915482808. La commission d'examen de l'Université de Lorraine a aussi approuvé cette étude. Les souris sont maintenues en conditions standard d'élevage, avec un cycle d'alternance jour/nuit de 12 h, à température ambiante ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), et avec eau et nourriture à volonté. Tous les animaux de laboratoire ont été gardés selon les exigences du Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale.

1. Système Cre/Lox

Le système est constitué de la recombinaise Cre, qui recombine une paire de séquences ciblées courtes appelées les séquences Lox (des sites de reconnaissance d'ADN de 34 pb) (Anastassiadis et al., 2010). La stratégie de base pour le knockout Cre/Lox du gène est de flanquer, ou "floxed", un exon essentiel du gène d'intérêt avec les deux sites loxP (par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires) puis faire agir la Cre recombinaise qui va exciser la portion d'ADN située entre les LoxP, y compris sur le chromosome générant ainsi un allèle nul dans toute cellule où Cre est activée. La recombinaison par la Cre peut être obtenue par croisement des souris portant le gène cible floxé avec des souris transgéniques exprimant la Cre (Feil et al., 2009). L'enzyme Cre et la séquence LoxP sont dérivées du bactériophage P1. La mise en place des séquences Lox de manière appropriée permet à des gènes d'être activés, réprimés ou échangés contre d'autres gènes. Au niveau de l'ADN de nombreux types de manipulations peuvent être réalisées. L'activité de l'enzyme Cre peut être contrôlée de telle sorte qu'elle est exprimée dans un type de cellule particulier ou déclenchée par un stimulus externe, comme un signal chimique ou un choc thermique (Schwenk et al., 1995).

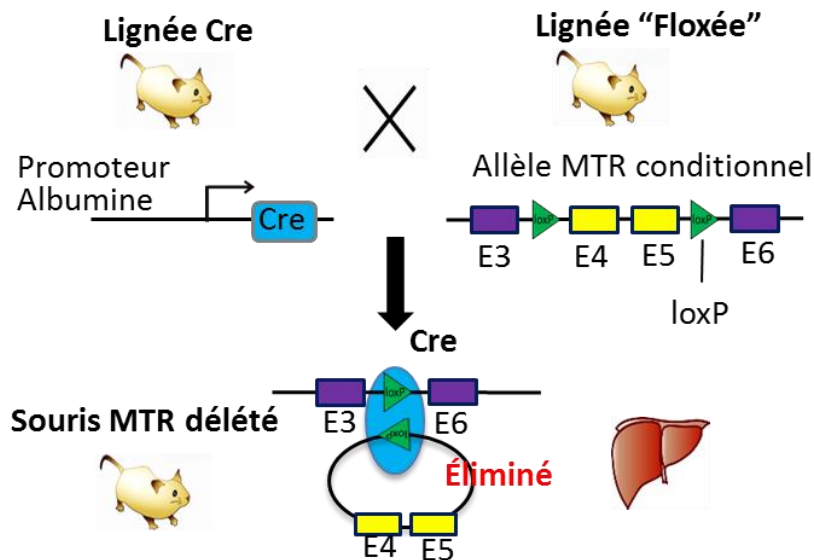


Figure : Mécanisme de système Cre/LoxP pour exciser le gène MTR dans le foie.

L'altération du génome de la souris par la transgénèse classique et les approches génétiques ciblées a facilité les études de la fonction des gènes. Cependant, une altération du gène exprimé dans la lignée germinale peut provoquer un phénotype létal embryonnaire résultant en l'absence de souris viable pour étudier la fonction des gènes. De même, une modification génétique peut exercer son effet dans plusieurs types de cellules ou de tissus différents, ce qui crée un phénotype complexe dans lequel il est difficile de distinguer la fonction directe dans un tissu particulier d'effets secondaires résultant de la fonction du gène altéré dans d'autres tissus. Par conséquent, des procédés ont été mis au point pour contrôler des conditions telles que le temps, le type cellulaire et la spécificité tissulaire de l'activation ou de la répression du gène (Kos, 2004).

Pour déclencher l'invalidation du gène dans des fenêtres temporelles précises du développement embryonnaire, nous avons utilisé le système inducible CreERT2/lox détaillé dans la figure .

Contrairement au système avec la Cre constitutive, ce système permet une induction de la délétion contrôlée dans le temps. La séquence de la Cre recombinase est fusionnée à la séquence du récepteur aux oestrogènes dans sa version mutée. Cette version, obtenue par mutagenèse dirigée, ne lie plus les oestrogènes endogènes mais est activée par des agonistes tels que le tamoxifène. L'induction se fait par le tamoxifène, qui provoque le changement de conformation de la protéine de

fusion CreERT2 et donc l'activation de la Cre, qui migre dans le noyau et recombine les sites loxP présents dans le génome.



Figure 2 : Principe du système CreERT2/lox pour l'inactivation génique conditionnelle inducible.

2. Lignées de souris

Lignée ML

Nous avons établi un modèle murin porteur d'un allèle conditionnel de MTR (spécifique de tissu et contrôlée dans le temps grâce au système Cre/Lox) en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (ICS) à Strasbourg-Illkirch. Ces souris transgéniques permettent l'inactivation conditionnelle du gène MTR.

Le vecteur choisi pour cibler le gène MTR est le vecteur de référence CSD 69523, acquis auprès du Consortium EUCOMM (The European Conditional Mouse Mutagenesis Program). Il s'agit d'une stratégie de « KO first », knockout du gène combiné à un knock-in du gène LacZ permettant la caractérisation de l'expression sauvage du gène.

Le gène MTR sauvage comporte 33 exons. L'analyse bioinformatique prédit que les exons 4 et 5 codant pour le domaine AdoMet d'activation de l'enzyme méthionine synthase sont délétés par la Cre, que par conséquent les exons 6 à 9 ont un décalage du cadre de lecture, produisant un STOP dans l'exon 9, et que les exons 10 à 33 ne sont pas traduits. L'ARN messager transcrit à partir du gène ainsi délété ne pourra pas produire de protéine MTR fonctionnelle.

A l'ICS, ce vecteur a été linéarisé puis électroporé dans des cellules ES (souche embryonnaire). Des étapes de sélection positive et négative ont permis d'isoler des clones de cellules ES porteuses du transgène. Ces clones ont été testés par PCR et southern-blot pour vérifier la présence du transgène. 2 clones positifs ont été choisis pour créer des lignées de souris par injection de cellules ES dans des blastocystes. Des souris dites « chimériques » sont nées de ces croisements. Elles ont été recroisées avec des souris sauvages pour vérifier la transmission effective du transgène à la descendance. Des colonies de souris transgéniques ont été obtenues par croisements avec des souris sauvages. L'une de ces colonies a été importée dans notre laboratoire NGERE U954 pour être d'abord testée par croisement avec une lignée Cre (la lignée Albumine-Cre ou AC) afin de vérifier la délétion efficace du gène MTR sous action de la Cre dans les tissus concernés (en l'occurrence, dans le foie).

Lignée Cre

Tableau des lignées de souris exprimant la Cre recombinase :

Organe	Type	Abbréviation	Nom	Notre fournisseur	Numéro de Référence Stock	Référence bibliographique	Fond génétique	Stade début transcription Cre
Foie	Constitutive	AC	AlbCre	Jaxmice USA	Stock Number 3574 B6.Cg-Tg(Alb-cre)21Mgn/J	Postic, ..., Magnuson, JBC 1999	C57BL/6J	E9.5
Foie	Inductible	ACT	AlbCreERT2	Metzger et Chambon, IGBMC, Strasbourg-IIIkirch		Schuler et al, Genesis 2004		
Cerveau	Constitutive	TC	ThyCre	Jaxmice USA	Stock Number 6143 FVB/N-Tg(Thy1-cre)1Vln/J	Dewachter, ..., Van Leuven, J Neurosc 2002	FVB/N	E11.5
Cerveau	Inductible	TCT	Thy1CreERT2	Jaxmice USA	Stock Number: 012708 SLICK-H Tg(Thy1-cre/ERT2,-EYFP)HGfng/PyngJ	Heimer, Genesis 2011	C57BL/6J x CBA	

Structure des transgènes :

Ces 3 lignées AC, TC, TCT ont été obtenues par insertion aléatoire du transgène dans le génome, alors que la lignée ACT a été conçue par Knock-in dans le locus du gène de l'albumine.

Lignée AC

Le vecteur ayant servi à produire cette lignée comporte un fragment de 2.34 kbp de l'enhancer/promoteur de l'albumine de souris, suivi de la séquence de la Cre recombinase modifiée par fusion avec une séquence de localisation nucléaire, puis en aval, un fragment de 2.1 kbp du gène de l'hormone de croissance humaine.

Lignée ACT

Cette lignée porte un knock-in de la séquence codante de la CreERT2 (placée en aval d'une séquence IRES, Internal Ribosomal Entry Site) dans le 3'UTR du gène de l'albumine. Ce knock-in est une modification génétique dans laquelle une séquence d'intérêt (ici, CreERT2) est introduite dans le locus-même de l'albumine, par recombinaison homologue. Ceci permet l'expression de la protéine de fusion CreERT2 dans les cellules exprimant l'albumine, sous le contrôle du promoteur même de l'albumine et sans gêner l'expression de cette dernière.

Un vecteur a été utilisé pour insérer la cassette IRES-Cre-ER^{T2} en aval du codon stop dans l'exon 14. L'allèle noté ACT représente donc AlbPromoter-AlbCDS-IRES-CreER^{T2}, comme indiqué sur le schéma :

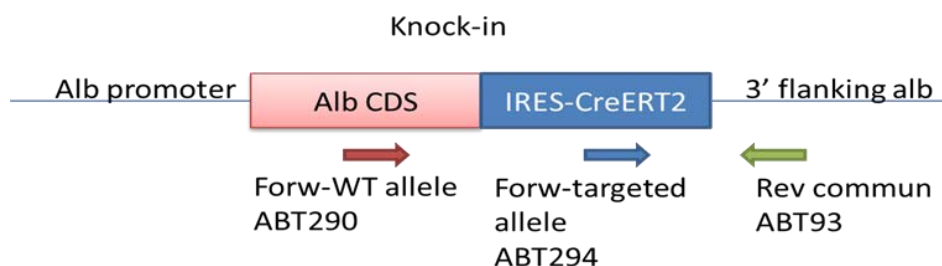


Figure : Lignée ACT

Lignée TC

La lignée a été obtenue à l'aide d'un vecteur comportant la séquence codante de la Cre recombinase en aval d'une partie du promoteur du gène Thy1.

Lignée TCT

Le transgène comporte deux promoteurs Thy1 inversés, l'un contrôlant la transcription de la CreER^{T2} et l'autre contrôlant la transcription de la YFP (Yellow Fluorescent Protein) :

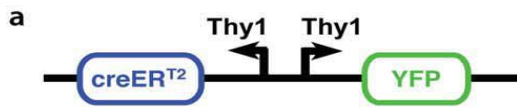


Figure : Lignée TCT

3. Modèle d'invalidation

Pour réaliser l'invalidation constitutive du gène MTR dans le foie, nous avons réalisé des croisements entre la lignée MC et la lignée AC obtenue auprès du Jackson Institute (USA). La lignée ML indique les souris avec exon4 et exon 5 du gène floxé par site loxP. Le schéma de croisement est détaillé dans la figure.

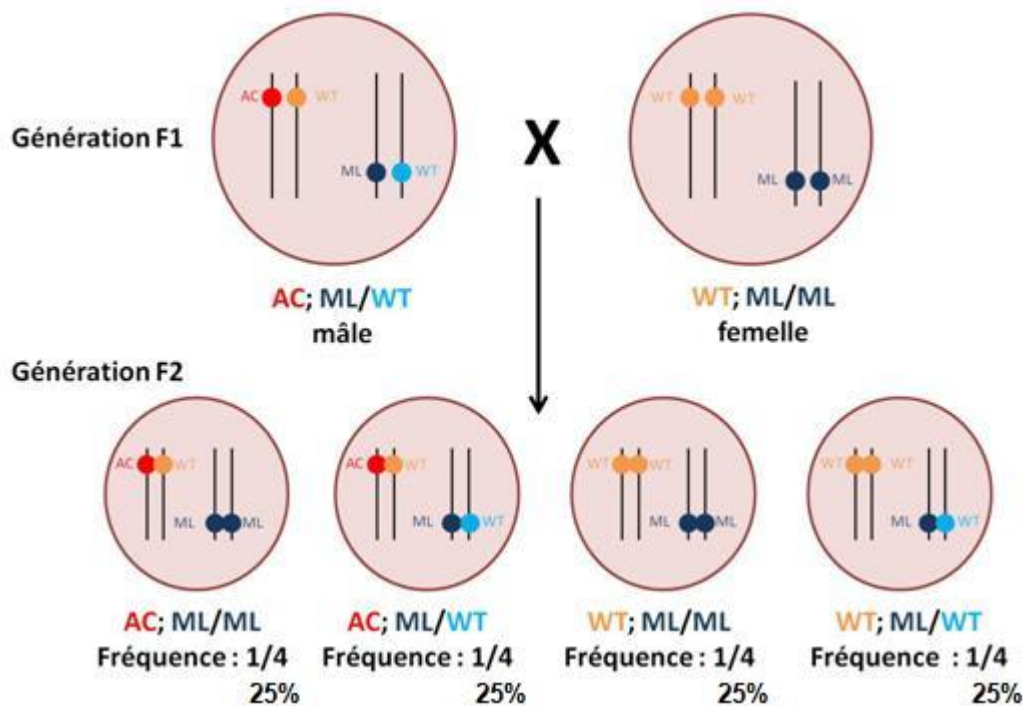


Figure : Croisement des souris

Par croisements des lignées ACT et ML, nous avons obtenu des souris ACT ; MTRWT/lox en génération F1 puis des souris ACT ;MTRlox/lox en génération F2. Les mâles ACT ;MTRlox/lox ont été croisés avec des femelles MTRlox/lox et les bouchons vaginaux ont été relevés chaque matin pour déterminer le jour de fécondation. Le tamoxifène a été injecté par voie intrapéritonéale.

4. Injection d'inducteurs :

Les protocoles sont expliqués dans la partie résultats.

Tamoxifène : trans-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-butenyl)phenoxy]-N,N-dimethylethylamine, SIGMA, 10540-29-1

Raloxifene : [6-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)- benzo[b]thien-3-yl][4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]phenyl], SIGMA, 84449-90-1

5. Embryons

Accouplement, vérification de la gestation, définition des jours embryonnaires :

Les souris sont mises en accouplement à raison d'un mâle pour plusieurs femelles, le nombre de souris par cage étant conforme à la réglementation en vigueur. La mise en évidence de l'accouplement des femelles pendant la nuit est réalisée par l'observation du bouchon vaginal le matin du jour suivant, qui est alors considéré comme le jour embryonnaire E0,5 (E : embryonnaire). A titre d'exemple, le 11^e jour après le jour E0,5 est par définition le jour E11,5.

Dissection des embryons de souris :

1. Les femelles gravides sont euthanasiées par asphyxie à l'aide de gaz CO₂ comprimé.
2. Poser le dos des animaux sur le tampon absorbant et tremper dans de l'éthanol à 70% pour réduire le risque de contamination de la dissection avec les poils de la souris.
3. Pincer la peau et de faire une petite incision latérale à la ligne médiane avec des ciseaux chirurgicaux. Tenir fermement la peau dessus et en dessous de l'incision et tirer la peau en dehors vers la tête et la queue afin d'exposer l'abdomen.
4. Saisir le péritoine avec une pince forceps (n°5, Moria SA, Anthony, France, <http://www.moria-surgical.com/>) et couper pour exposer la cavité abdominale.
5. Sortir le chapelet d'embryons contenus dans les deux cornes utérines de la femelle gestante.
6. Couper l'artère utérine pour libérer le chapelet d'embryons.
7. Noter la présence éventuelle d'embryons réabsorbés et les compter.
8. Ouvrir aux ciseaux la corne utérine sur toute sa longueur pour libérer les embryons. Séparer les embryons individuels. Chaque embryon se trouve dans son propre sac vitellin et possède un placenta.

9. Avec les pinces, pincer le sac vitellin et l'ouvrir. Alternativement, ouvrir le sac vitellin avec les ciseaux.
10. Couper l'artère ombilicale avec les ciseaux pour libérer l'embryon.
11. Jeter le sac vitellin, conserver l'embryon et le placenta, les peser. Photographier les embryons pour documenter d'éventuelles anomalies macroscopiques.
12. Nettoyer très soigneusement les pinces forceps d'abord au détergent puis à l'éthanol 70%, afin d'éviter toute contamination par des cellules maternelles lors du prélèvement de la queue des embryons. Prélever la queue de chaque embryon, destinée au génotypage, et la placer dans un microtube propre.
13. Pour les embryons E15.5 et stades ultérieurs, ouvrir la nuque et le bas de la colonne vertébrale avec les pinces ou les ciseaux, pour que le fixateur pénètre correctement. Pour les stades antérieurs, la pénétration est correcte sans faire ces ouvertures.
14. Placer les embryons dans des tubes à hémolyse contenant un volume de fixateur (paraformaldéhyde 4% dilué en PBS) dix fois supérieure au volume de l'échantillon à fixer. Incuber à 4°C sous agitation pendant 4 heures.
15. Rincer 3 fois au PBS 1X pendant 5 minutes sous agitation.
16. Incuber en tube à hémolyse dans une solution de sucrose 20% (20 g de sucrose pour 100 ml de PBS 1X) à 4°C sous agitation, jusqu'à ce que l'échantillon tombe au fond du tube, ce qui indique que les tissus sont gorgés de sucrose.
17. Rincer 3 fois au PBS 1X pendant 5 minutes sous agitation. Eponger sur un papier absorbant.
18. Procéder à la préparation et l'inclusion de l'embryon en paraffine ou en milieu cryoprotecteur.

Vidéos d'isolement d'embryons de souris :

Stade E11.5 :

<http://www.youtube.com/watch?v=f0nyBJYaTz4>

Stade E15.5 :

<http://www.youtube.com/watch?v=RlfQQnVoxs8>

6. Protocole de Knockout MTR dans le cerveau traité par SRT1720

Des souris mâles et femelles, sauvages ou KO MTR, âgées de 40 semaines ont été réparties dans 2 cohortes (Figure: Constitution des groupes de souris). La première cohorte est traitée avec l'agoniste de SIRT1 appelé SRT1720, la deuxième n'est pas traitée.

SRT1720 :N-(2-(3-(piperazin-1-ylmethyl)imidazo[2,1-b]thiazol-6-yl)phenyl)quinoxaline-2-carboxamide hydrochloride ; CAS 1001645-58-4 ; Santa Cruz

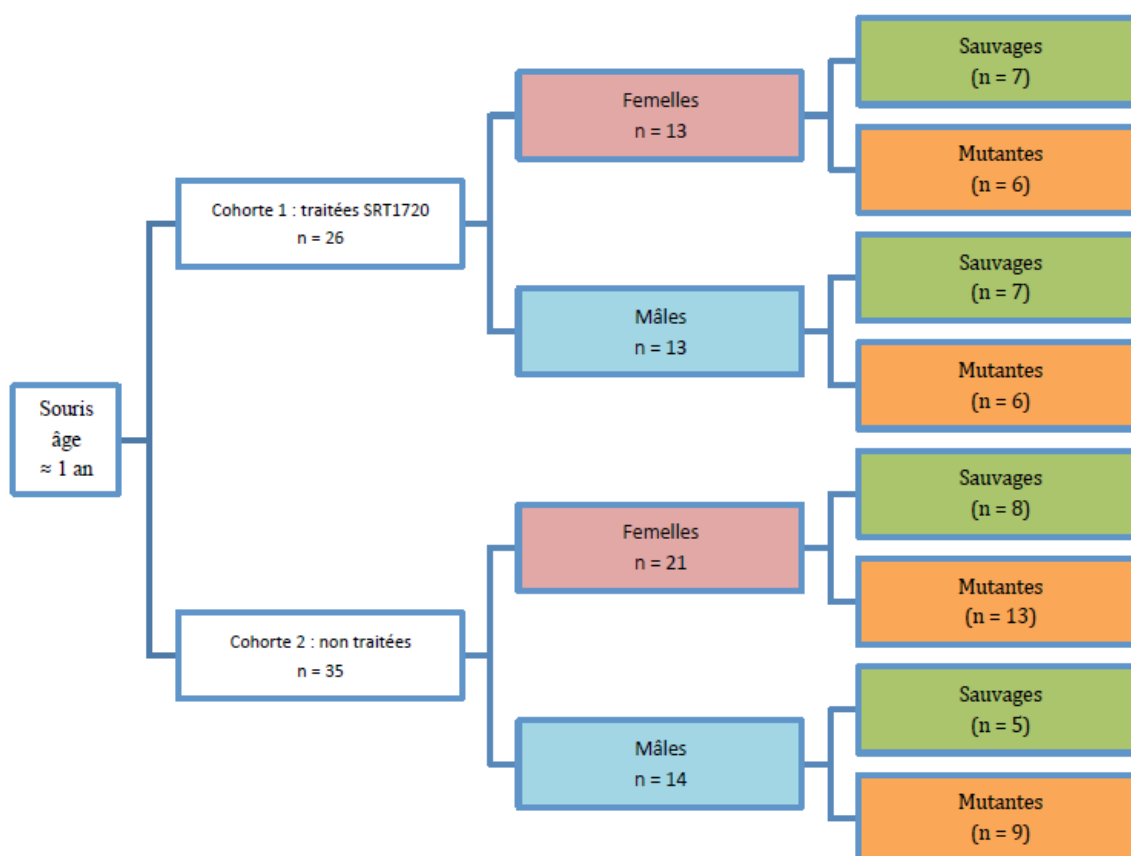


Figure : Constitution des groupes de souris.

7. Etude comportementale : test du labyrinthe aquatique multi-T

Seules les souris de la cohorte 1 sont utilisées pour l'étude comportementale et chaque souris est utilisée comme son propre témoin. En effet, l'étude comportementale est réalisée en 2 sessions appelées « Learning 1 » et « Learning 2 ». Au cours de la session de Learning 1, les souris n'ont pas encore reçu le traitement alors qu'à la session 2, toutes les souris ont reçu par gavage oral un

agoniste de SIRT1 : le SRT1720. Le test du labyrinthe aquatique multi-T est composé de multiples croisements en forme de T. Il permet de tester les capacités d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendante des souris et est basé sur les aptitudes des individus à mémoriser un parcours dans lequel il navigue en fonction de repères environnementaux. Afin d'éviter toute contamination olfactive, ce test a été réalisé dans une enceinte remplie d'eau. Après avoir défini un point de départ et un point d'arrivée, les souris sont placées au niveau du point de départ. Elles doivent ensuite trouver la récompense, c'est-à-dire la cage de repos chauffée, située à l'autre extrémité du labyrinthe. Afin de conserver une motivation optimale et homogène chez toutes les souris, il est nécessaire de procéder à une habituation préalable au test, c'est-à-dire sans la totalité des « cul-de-sac », pour qu'elles prennent connaissance du dispositif (environnement aquatique, murs verticaux...) et de la possibilité de s'échapper par une voie unique (« sortie ») qui les amèneront vers une cage d'élevage contenant de la litière. Cette phase d'habituation se déroule sur 2 jours consécutifs. Arrive ensuite la phase d'apprentissage qui dure 5 jours.

Au cours de cette phase, tous les murs du dispositif de labyrinthe sont positionnés. La souris est déposée dans la case de départ et le logiciel d'acquisition est lancé. Elle est laissée libre de ses mouvements pendant 2 minutes. Si au bout de ce temps, l'animal n'a pas trouvé la voie de sortie, l'acquisition s'arrête et il est guidé manuellement vers la voie de sortie. Les paramètres enregistrés peuvent être multiples (vélocité, mouvement lents ou rapides...) mais les principaux sont le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans un cul-de-sac ou dans un compartiment du labyrinthe déjà emprunté qualifié de « retour en arrière ») et la latence de sortie du labyrinthe (entrée avec les quatre pattes dans la voie de sortie).

Fiche 2 : Modèle 2/3 hépatectomie partielle (Mitchell and Willenbring, 2008)

1 | Placer la souris dans une chambre de Plexiglas pour l'induction de l'anesthésie avec 2% d'isoflurane et 2 litres/min d'oxygène. Après anesthésie, transférer l'animal sur un bloc de styromousse et maintenir une anesthésie par inhalation d'isoflurane par un embout approprié.

2 | Désinfecter la peau avec 70% d'éthanol.

3 | Faire une incision abdominale médiane (environ 3 cm de long) pour exposer le processus xiphoïde

4 | Coller deux aiguilles dans le coussinet de mousse de polystyrène de chaque côté de l'animal au niveau du processus xiphoïde; étirer le caoutchouc bande autour des deux aiguilles. Tirez et placer la bande de caoutchouc autour de la xiphoïde, qui est ensuite soulevé vers le haut et vers l'arrière

5 | De même, coller deux aiguilles dans le tampon de mousse de polystyrène de chaque côté de l'animal au niveau de l'extrémité inférieure de la incision abdominale et placer les trombones dépliés ou rétracteurs de sorte qu'ils maintiennent ouverte la cavité péritonéale, ce qui exposer le foie.

6 | Tout en tirant doucement sur le lobe médian avec une pointe de coton humidifié, utiliser un ciseau de microchirurgie pour couper le ligament falciforme (il n'y a pas besoin de couper tout le long jusqu'à la veine cave supérieure).

7 | En utilisant une pointe de coton humidifié, soulever le lobe médiane et le lobe latéral gauche et maintenez-les contre le diaphragme / thorax. Doucement tirer vers le bas l'estomac avec la pince de microdissection pour être en mesure de visualiser et de sectionner la membrane qui relie lobe caudal et le lobe latéral gauche.

8 | Placez le fil 4-0 de soie sur la base du lobe latéral gauche (près du hile du foie) à l'aide des pinces de microdissection. Avec une pointe de coton, tourner le lobe latéral gauche à sa position d'origine, tout en maintenant l'extrémité droite de la suture avec la pince microdissection, pour faire la suture aller autour du lobe.

9 | Avec l'aide du porte-aiguille de microchirurgie et la pince microdissection, attacher les deux extrémités de la suture sur la partie supérieure du lobe latéral gauche, en plaçant le nœud aussi près de la base du lobe possible. Notez que la couleur du lobe va changer (rouge foncé) immédiatement

après le nœud à cause de la sortie perturbée du sang. Parfois, la couleur de la partie gauche du lobe médian peut également changer, mais cela est sans conséquence, puisque cette partie sera supprimée par la suite.

10 | Utiliser les ciseaux de microchirurgie incurvées pour couper le lobe attaché juste au-dessus de la suture.

La seule source de sang doit venir du lobe réséqué; aucun saignement ne devrait provenir de la suture.

11 | Placer le fil pour le deuxième nœud entre la vésicule biliaire et le lobe médian gauche. Tirez le lobe médian gauche vers le bas sur le fil de suture

ÉTAPE CRITIQUE Le deuxième nœud ne doit pas être trop serré près de la veine cave, sinon cela causera une obstruction veineuse (sténose), ce qui entravera la sortie de sang des autres lobes droit et caudal, ce qui conduira à une nécrose et l'échec de la régénération.

12 | Lors de la réalisation du deuxième nœud, il n'y a généralement pas de saignement de la partie sectionnée. Couper le lobe médian gauche attaché au-dessus du fil de suture, ce qui laisse un moignon ischémique au-dessus du nœud.

13 | Faire la même chose pour lobe médian droit.

14 | Fermer le péritoine avec une suture 5-0. La peau peut être fermée en utilisant des sutures 4-0.

15 | Après la fermeture de l'abdomen, essuyer la peau entourant la suture avec de la bétadine et placer l'animal sur un coussin chauffant pour la récupération.

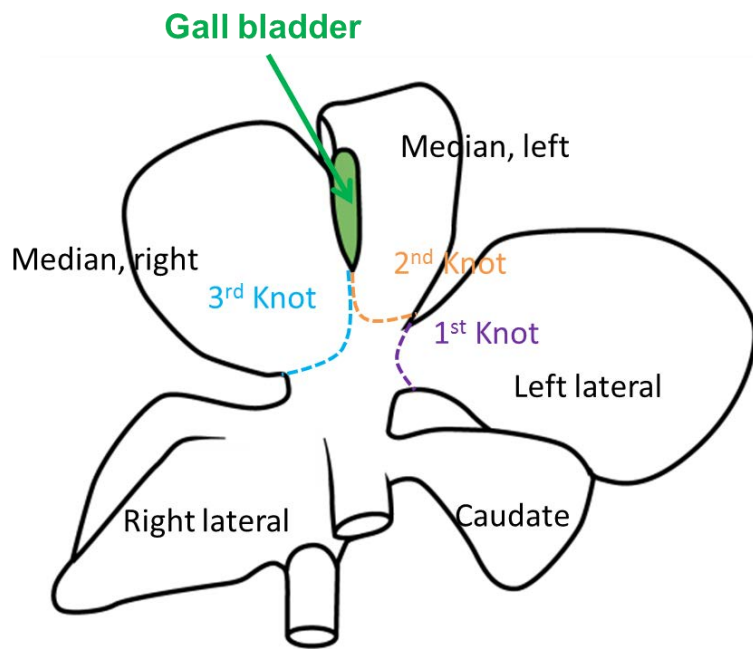


Figure : Position des nœuds par rapport aux lobes hépatiques, pour la réalisation de l'hépatectomie partielle. « knot » : nœud ; « gallbladder » : vésicule biliaire.

Fiche 3 : Prélèvement et gestion des échantillons

1. Anesthésier la souris. Ouvrir la cage thoracique. Prélever le sang par ponction intracardiaque avec une seringue 1 ml héparinée. Cette ponction sanguine provoque la mort de la souris. Conserver le tube dans la glace.
2. Sang: mettre dans un tube hépariné sur la glace fondante.

Protéger les tubes de la lumière en les emballant dans du papier aluminium.

Décanter immédiatement (3500 rpm, 10 min, 4°C).

Eviter les plasmas hémolysés.

Pour le dosage SAM, SAH, Hcy, MMA, méthionine (idéal = 100 µL, minimum = 30 µL), acidifier immédiatement le plasma avec de l'acide acétique 1N (1 volume pour 10 volumes de plasma) dans les 30 minutes suivant le prélèvement.

Pour le dosage des folates, ajouter à 150 µL de sérum 75 µL d'acide ascorbique 20 mM (idéal = 150 µL sérum + 75 µL d'acide ascorbique 20 mM, minimum 50 µL de sérum et 25 µL d'acide ascorbique 20 mM)

Pour le dosage des carnitines (idéal = 50 µL, minimum 20 µL) et les analyses biochimie générale (minimum 150 µL), on peut utiliser plasma sans traitement.

Congeler les plasmas à -80°C et acheminer congelé

3. Prélever le foie. Si des différences (taille, couleur, morphologie...) sont observées à l'œil nu entre les KO et WT, il est possible de prendre des photos pour illustrer cela. Peser le foie total.
4. Mettre une moitié de lobe gauche latéral hépatique dans le paraformaldéhyde (PAF) 4% en PBS dans la glace.
5. L'autre moitié de lobe gauche latéral hépatique est placée dans un tube 1,5 ml ou 2 ml qui est congelé immédiatement à l'azote liquide.
6. Prélever le cœur. Séparer le cœur droit du cœur gauche. Placer le cœur droit dans le PAF4% dans la glace. Placer le cœur gauche dans un tube 1,5 ml ou 2 ml congelé immédiatement à l'azote liquide.

7. Prélever le cerveau. L'hémisphère gauche est plongé pendant 24 heures dans un tube contenant une solution de fixation : la solution de Carnoy (6 volumes d'éthanol, 3 volumes de chloroforme et 1 volume d'acide acétique) et servira à la réalisation des coupes et aux marquages immunofluorescents. L'hémisphère droit est quant à lui microdisséqué et placé dans des microtubes plongés dans l'azote liquide puis stocké à -80°C. Ces tissus serviront à l'analyse biochimique et moléculaire.
8. Eliminer le cadavre.
9. Les prélèvements pour immunohistologie doivent être incubés la nuit dans le PAF4% à 4°C sous agitation.
10. Ces prélèvements sont ensuite rincés 3 fois au PBS 1X. Puis ils sont incubés dans le sucrose 20% jusqu'à ce que les organes tombent au fond du tube (cela peut prendre une nuit). Puis effectuer 3 rinçages au PBS 1X, puis égoutter sur du papier. Puis congeler dans le méthylbutane et stocker à -80°C.

Fiche 4 : Dosages plasmatiques / sériques et tissulaires

1. Dosage de l'homocystéine, acide méthylmalonique et acide succinique par LCMS/MS (COLONNE UPLC HSST3)

Les dosages biochimiques sont réalisés sur des plasmas non traités ou acidifiés pour certains métabolites comme l'homocystéine, la SAM et la SAH. L'extraction est effectuée dans un tampon hypotonique (PBS 0.1%, 2% d'inhibiteurs de protéases) (Protease Inhibitor Cocktail for mammalian tissues, Sigma-Aldrich). La lyse est réalisée à l'aide d'un sonicateur à sonde (Cell sonifier disruptor, Branson®). L'homocystéine nécessite une étape de traitement au DTT (Sigma-Aldrich) pour rompre les liaisons aux protéines. Le surnageant récupéré par centrifugation de 30min à 20000g à 4°C est dosé par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) (BCA Protein Assay® Reagent Pierce) pour en définir la concentration en protéines.

Principe : La concentration plasmatique en homocystéine est mesurée par une technique de chromatographie liquide ultra haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en mode MRM positif.

L'homocystéine liée aux protéines est libérée par ajout d'un réducteur. Les protéines sont précipitées au méthanol. Les standards internes deutérés sont ajoutés et quelques µL sont injectés dans l'UPLC. La quantification est faite grâce à une gamme d'étalonnage en plasma et à ajustement inter-échantillon grâce aux standards deutérés ajoutés en concentration connue et constante.

Ce dosage a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire du CHU de Nancy-Brabois.

Préparation des réactifs :

- Préparation d'aliquots de solutions mères standards non deutérées et deutérées à 1 mmol/L.

	Homocystéines (MM 268,4)	Homocystéine d8 (98%)
Poudre (mg)*	13,27	13,08
HCl 0,1N (<i>T° amb, hormones</i>)	50 mL	50 mL
	Vortexer, Soniquer	
NaOH 10M (+4°C, hormones)	1 mL	1 mL
DTT	132,7 mg	132,7 mg
HCl 0,1N	qsp 100 mL	
	Vortexer, Soniquer	
Concentration sol. Mère	1mM d'homocystéine	1mM d'homocystéine d4
Aliquoter par fraction de 0,7mL Congeler à -20°C		

Préparation de la gamme d'étalonnage :

Diluer S8 au ½ jusqu'à obtenir 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) lyophilisé
- Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée HPLC grade, laisser reposer 10 à 15 minutes et agiter jusque dissolution totale. Faire des aliquots de 200 µL à conserver à -20°C

Préparation de la solution d'extraction Methanol/Ac. Formique 0.1% (v/v)

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	50µL pool	50µL pool	50µL	50µL	50µL
Standard interne	0	50µL	50µL	50µL	50µL
DTT 200mM	50µL	0	0	0	0
Vortexer ATTENDRE 15' à température ambiante					
meOH 0,1% ac. Formique	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL

- Vortexer et incuber 30 min à + 4°C
- Vortexer et centrifuger à 2000g, 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 LCMSMS) par 400 µL d'H₂O 0,1 % (v/v) ac formique (= dilution au 1/5ème)
- Vortexer et centrifuger à 16000 rpm pendant 10 min
- 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 préchauffe)
- 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

2 périodes : MRM + pour HCY puis MRM – pour MMA & acide succinique et présence d'une valve pour permettre un switch vers la poubelle)

- Méthode de quantification : HCY –AC SUCC-MMA.qmf

2. Analyse de molécules adénylées (SAM/SAH) par dérivation fluorescente à l'aide du chloroacétaldéhyde

Principe

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (en anglais Liquid chromatography-mass spectrometry ou LC-MS) est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances.

Une unité LC-MS est composée de deux blocs principaux : un chromatographe en phase liquide et un spectromètre de masse.

Préparation des solutions stocks (SAM ; SAH)

- Préparer de solutions stock de standard (SAM ; SAH)^a à 50mM dans de l'acide chlorhydrique 1N
- Ajouter 0.5v de NaOH 2N ,0.2v de citrate de sodium 1M (pH=5) et 0.3v d'eau ultra pure pour atteindre une concentration finale de 25mM^b
- Aliquoter et stocker à -20°C
- Préparer des solutions de travail stock de standard à 5µM final dans de l'eau ultra pure

Déprotéinisation des échantillons

- Mélanger 100µl d'échantillon (ou de standard) à 5µl d'HClO₄ à 60%, vortexer et incuber 5 minutes dans la glace
- Centrifuger à 20000g pendant 10 minutes (4°C)
- Eliminer le culot
- Ajouter un volume de KOH (0.5N) pour neutraliser et précipiter les sels de perchlorate et vortexer
- Ajouter 20 µl de KH₂PO₄ (1M) pour tamponner la solution, vortexer, centrifuger à 20000g pendant 10 minutes (4°C) et éliminer le culot

Dérivation des adényls

- Dans des microtubes noirs de 0.5ml, ajouter successivement :
 - _ 200µl d'échantillon ou de standard
 - _ 200µl d'acétate de sodium à 1M
 - _ 10µl de chloroacétaldéhyde à 50%
- Vortexer et incubé à 80°C pendant 20 minutes puis refroidir à 4°C

Procédure de séparation et d'analyse par HPLC

Injecter les échantillons (50 µL) dans un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) constitué d'une pompe à haute pression^c, un injecteur d'échantillons automatisé^d, une colonne contenant une résine de silice de 5 µm de granulométrie comportant des greffons hydrophobes (18 carbones)^e, un détecteur à fluorescence Shimadu RF10AXL (278nm:Ex/418nm:Em)^f et un intégrateur (logiciel Borwin 3.1)^g et maintenu à 30°C dans un four à colonne^h, à un débit constant de 0,8 mL/min (générant environ une pression de 95 bar).

- L'absorbance est mesurée à 254 nm (maximum d'absorbance des purines par un spectrophotomètre UV-visibleⁱ %).

N.B : L'ordre d'élution des différents métabolites est la SAH puis la SAM. En parallèle, des standards contenant différentes concentrations de SAH et SAM □ (8- 6-4-2-1 et 0,5µM) sont passés pour obtenir une gamme étalon réalisée en mesurant l'aire sous le pic en fonction de la concentration de standards. Ceci permettra de déterminer la concentration des échantillons selon une droite d'équation $y = ax+b$.

- Standards SAM et SAH, Sigma-Aldrich (St Louis, USA).
- Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA).
- Pompe à haute pression, SpectraSystem, P1000XR, TSP.
- Injecteur d'échantillons automatisé, AS100, TSP.
- Colonne Resolve n°85711 C18 (150 x 3,9mm,5µ) Lichrospher (Interchim).
- Détecteur à fluorescence Shimadu RF10AXL (278nm:Ex/418nm:Em).
- Intégrateur: logiciel Borwin 3.1.
- Four à colonne, Waters.
- Spectrophotomètre, SpectraSeries UV100, TSP.

3. Concentration en méthionine

Principe

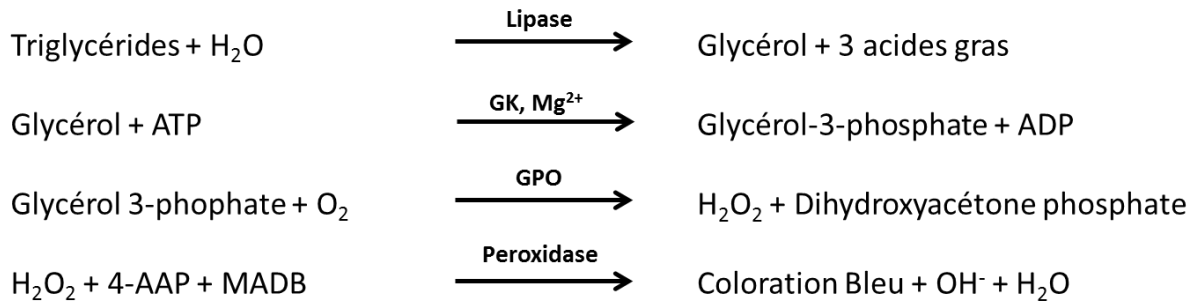
Tous les acides aminés et les peptides avec un groupe α -amino libre produit lors de la réaction à la ninhydrine (hydrate de tricétohydrindène), une substance bleu-violet, sauf de la proline et de l'hydroxyproline seulement avec la réaction à la ninhydrine produit une substance en jaune. La réaction de la formation d'un dérivé coloré entre la ninhydrine et les acides aminés est très sensible, et le maximum d'absorption du composé obtenu se situe à 570 nm. Selon la réaction des tons bleu-violet générés, la concentration d'acides aminés dans un échantillon peut être déterminée par la colorimétrie à 570 nm.

4. Métabolisme lipidique : Triglycérides, cholestérol et acides gras libres

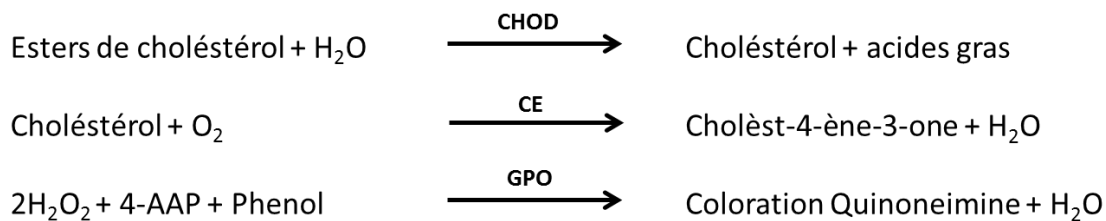
Les mesures sont réalisées avec un automate multiparamétrique Olympus AU 2700® (Beckman-Coulter, France). Les réactifs sont prêts à l'emploi et peuvent être placés directement sur l'appareil. Les analyseurs Beckman Coulter calculent automatiquement les concentrations en triglycérides, cholestérol total et acides gras libres de chaque échantillon. Ces dosages ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de biochimie biologie moléculaire nutrition et métabolisme du CHU de Nancy-Brabois

Principe

Cette méthode est basée sur une série de réactions enzymatiques couplées. Les triglycérides de l'échantillon sont hydrolysés par un ensemble de lipases microbiennes pour former du glycérol et des acides gras. Le glycérol est phosphorylé par l'adénosine triphosphate (ATP) en présence de la glycérol kinase (GK) pour former du glycérol-3-phosphate. Le glycérol-3-phosphate est oxydé par l'oxygène moléculaire en présence de la glycérol phosphate oxydase (GPO) pour produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de la dihydroxyacétone phosphate. Le H_2O_2 formé réagit avec le 4-aminophénazone, le N,N-bis(4-sulfobutyl)-3,5-diméthylaniline et le sel disodique (MADB) en présence de peroxydase (POD) afin de produire un chromophore, lu à 660/800 nm. L'augmentation de l'absorbance jusqu'à 660/800 nm est proportionnelle au contenu en triglycérides de l'échantillon.



Une méthode enzymatique est utilisée pour mesurer le taux de cholestérol dans le sérum et le plasma. Au cours de cette procédure, les esters de cholestérol contenus dans un échantillon sont hydrolysés par la cholestérol estérase (CHE). Le cholestérol libre produit est oxydé par la cholestérol oxydase (CHO) pour former du cholestène-3-one, avec production simultanée de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui s'allie par oxydation avec la 4-aminoantipyrine et le phénol en présence de la peroxydase (POD) et produit un chromophore. Le colorant rouge formé, la quinonéimine, peut être mesuré par spectrophotométrie à 540/600 nm. L'augmentation de l'absorbance jusqu'à 540/600 nm est proportionnelle au contenu en cholestérol de l'échantillon.



5. Marqueurs du stress cellulaire (ALAT/ASAT)

Le dosage de l'Alanine AminoTransférase (ALAT) a été réalisé selon la méthode de Henry (Henry et al., 1960) et Bergmeyer (Bergmeyer et al., 1978). Le principe de la méthode consiste à mesurer l'activité enzymatique de l'ALAT à partir de 2 réactions successives. La première transforme la Lalanine en pyruvate via l'ALAT, la seconde permet la transformation du pyruvate en L-lactate en utilisant comme co-facteur le NADH. La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺, proportionnelle à l'activité ALAT dans l'échantillon, est mesurée à 340 nm. Le dosage de l'Aspartate AminoTransférase (ASAT) est réalisé selon la méthode développée par Henry. Comme pour le dosage de l'ALAT, Le principe de la méthode consiste à mesurer l'activité enzymatique de l'ASAT à partir de 2 réactions successives. Le premier produit à partir du L-Aspartate, du L-Glutamate et de l'oxaloacétate via l'ASAT, la seconde permet la transformation de l'oxaloacétate en L-mactate en utilisant comme

cofacteur le NADH. La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺, proportionnelle à l'activité ASAT dans l'échantillon, est mesurée à 340 nm. Les mesures sont réalisées avec un automate multiparamétrique, Olympus AU 2700 (Beckman Coulter, France). 12 µL de résumé pour le dosage de l'ALAT et 12 µL pour le dosage de l'ASAT. Ces dosages ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de biochimie biologie moléculaire nutrition et métabolisme du CHU de Nancy-Brabois.

6. Dosages enzymatiques : Mesure de l'activité méthionine synthase, MTR

La mesure de l'activité de la MS est faite par la Dosage radio-immunologique (RIA, radio immuno assay en anglais).

La préparation des réactifs se fait avec de l'eau milli-Q désoxygénée (sous flux d'azote gazeux durant 30 minutes) et le mélange réactionnel est maintenu sous un flux d'azote durant toute la préparation. Le méthyltétrahydrofolate (MeTHF) et la méthylcobalamine (Me-B12) étant photolabiles, ils sont conservés dans des tubes noirs.

La réaction est réalisée dans un volume final de 100 µL contenant

Volume réactionnel : 100 µL	Concentration réactionnelle	Concentration stock	Volume
Protéines			40 µL
K2H/KH2(PO4) pH 7,2	0,1 M	1 M	10
DTT ⁽¹⁾	25 mM	580 mM	4,3 µL
Ascorbate ⁽¹⁾	25 mM	720 mM	3,5 µL
SAM ⁽¹⁾	0,05 mM	20 mM	0,3 µL
Methyl-B12 ⁽²⁾	50 µM	5 mM	1,0 µL
D,L-Homocystéine ⁽¹⁾	5 mM	250 mM	2,0 µL
[¹⁴ C]MeTHF ⁽³⁾	50 µM	2,5 mM	2,0 µL
H2O qsp 60 µL			37,0 µL
			60,00 µL

- Incuber le mélange réactionnel pendant 20, 40 60 et 80 min à 37°C dans un bloc chauffant thermostaté ; dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme

- Arrêt de la réaction en chauffant les échantillons à 95°C, 5 min puis refroidir dans la glace
- Centrifuger à 12.000 g pendant 10 min à 4°C
- Equilibrer les colonnes⁽⁴⁾ par des lavages successifs (4x5 mL d'HCl 0,5 N), puis un autre lavage de 5x2 mL d'eau milli-Q
- Charger les colonnes avec l'échantillon (100 µ L) puis rincer le gel avec 3x1 mL d'eau milli-Q
- La radioactivité est comptée dans des tubes en Polyéthylène⁽⁵⁾ en mélangeant 1 volume d'éluat à 4 volumes de Pico-Fluor™⁽⁶⁾
- La [¹⁴CH₃] méthionine produite a été mesurée sur un analyseur⁽⁷⁾ TRI-CARB, 1900CA
- Eluer le [¹⁴C] méthyl-tétrahydrofolate en régénérant les colonnes avec 4x5mL d'acide chlorhydrique.

(1) DTT(H₂O), Na/Ascorbate(H₂O), SAM(H₂O)

(2) Methyl-B12(H₂O) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

(3) [¹⁴C]MeTHF : GE Healthcare

(4) Colonne AG1x8, résine cationique échangeuse d'anions Cl⁻ : Bio-Rad Laboratories, (Marnes-la-Coquette, France)

(5) Fioles de comptage en polyéthylène de capacité 20mL : Packard Biosciences, Etats-Unis

(6) PicoFluor : agent de scintillation (Packard Biosciences, (Etats-Unis). Colonnes AG 1-X8 BioRad Laboratories

(7) Analyseur TRI-CARB, 1990CA : Packard Biosciences, Etats-Unis

Fiche 5 : Génotypage des souris

Nous avons développé au laboratoire des amorces de génotypage spécifiques de chaque lignée Cre, afin d'éviter les erreurs et les mélanges entre lignées porteuses de la Cre. Ces génotypages spécifiques n'étaient pour la plupart pas disponibles dans les publications utilisant ces lignées, nous avons donc dû concevoir de nouvelles amorces et les mettre au point.

Le génotypage est réalisé avec le 'KAPA Mouse Genotyping Kit' (KR0385 – v2.13).

1. Extraction de l'ADN

La réaction est réalisée dans un volume final de 100 μ L. Effectuer une lyse dans un bloc chauffant en utilisant le protocole suivant: 75°C/10min+95°C/15min.

	Par 100 μ L réaction	Concentration Finale
Eau	88 μ L	-
10x Tampon KAPA Express Extract	10 μ L	1X
1 U/ μ L KAPA Express Extract Enzyme	2 μ L	2 U/rxn
Tissu de souri	2 mm section	2 mm section

2. Protocol KAPA2G Fast Genotyping PCR

a. Solution de réaction

Réactif	Par réaction de 25 μ L	Concentration Finale
2x KAPA2G Fast Genotyping Mix	12,5 μ l	1x
10 μ M Primer Sens	1,25 μ L	0,5 μ M
10 μ M Primer Antisens	1,25 μ L	0,5 μ M
H2O qsp 24 μ L	jusqu'à 24 μ L	-
ADN génomique		1 μ L

2.2 Programme de PCR

Lignée AC			
Etape	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	94°C	3 min	1
Dénaturation	94°C	15 sec	32
Hybridation	65°C	10 sec	
Elongation	72°C	10 sec	
Elongation finale	72°C	2 min	1

Lignée ACT			
Etape	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	94°C	3 min	1
Dénaturation	94°C	15 sec	35
Hybridation touchdown	65°-55°	10 sec	10
Hybridation	65°C	10 sec	25
Elongation	72°C	10 sec	35
Elongation finale	72°C	2 min	1

Lignée TC			
Etape	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	94°C	3 min	1
Dénaturation	94°C	15 sec	32
Hybridation	65°C	10 sec	
Elongation	72°C	10 sec	
Elong. finale	72°C	2 min	1

Lignée TCT			
Etape	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	94°C	3 min	1
Dénaturation	94°C	15 sec	32
Hybridation	65°C	10 sec	
Elongation	72°C	10 sec	
Elong. finale	72°C	2 min	1

Lignée ML			
Etape	Température	Temps	Cycle
Dénaturation initiale	94°C	3 min	1
Dénaturation	94°C	15 sec	32
Hybridation	65°C	10 sec	
Elongation	72°C	10 sec	
Elong. finale	72°C	2 min	1

3. Electrophorèse Agarose 1.5%

- (1) Rincer le flacon erlenmeyer (250 mL) + cuve + support + peigne à l'eau distillée
- (2) Peser 1,2 g d'agarose (balance Sartorius) et mettre dans l'Erlenmeyer
- (3) Ajouter 80 mL de TBE 1x à l'agarose. Agiter doucement à la main
- (4) Chauffer au four micro-ondes jusqu'à ébullition vive
- (5) Ajouter 1 goutte de Bromure d'ethidium (BET, très toxique !) et laisser tiédir
- (6) Poser un papier aluminium sur sur l'Erlenmeyer et agiter doucement à la main
- (7) Préparer le support de gel et positionner deux peignes sur un gel
- (8) Verser le gel liquide sur le support (attention aux fuites)
- (9) Laisser refroidir, pendant ce temps préparer les échantillons (tubes 0,5 mL)
- (10) Migration : 110V/30 min

4. Liste des amorces

Lignée	GENE	TYPE	SENSE	SEQUENCE 5'->3'	Tm (°C)
ML	MTR	PCR genotyping	Forward	GTGGACAGTGAGATGGGCAGTGAG	65
	MTR	PCR genotyping	Reverse	GACGCAGTCTACAAGTGAAAGGACC	62
ACT	AlbCreER-F	PCR genotyping	Forward	TTAAACAAGCAAAACCAAAT	50
	3'Alb-R	PCR genotyping	Reverse	GGAACCCAAACTGATGACCA	60
	AlbCDS-F	PCR genotyping	Forward	ATCATTTCCTTTGTTTTTCAGG	52
AC	Alb-F1	PCR genotyping	Forward	TGTACCCCTCGAAACTGAC	62
	Cre-R1	PCR genotyping	Reverse	GCAAACGGACAGAAGCATTT	58
Contrôle	ContInt- Beta5-F	PCR genotyping	Forward	CTACAGCATACCTGCTTCACTGTG	52,3
	ContInt Beta5-R	PCR genotyping	Reverse	GCCTTTCTGTGGGTTCCA	56
TCT	Thy1-(TCT)-F1	PCR genotyping	Forward	TCTGAGTGGCAAAGGACCTTAGG	52
	YFP-R	PCR genotyping	Reverse	CGCTGAAGTGTGGCCGTTTACG	53,7
TC	Thy1-(TC)-F2	PCR genotyping	Forward	CCTGGCTTTCTCTGAGTGG	62
	Cre-(TC)-R2	PCR genotyping	Reverse	AGGCAAATTTGGTGTACGG	58

Fiche 6 : Extraction de l'ARN par TRIzol (Invitrogen)

1. Lyse et homogénéisation de l'échantillon

- 1) Dans des microtubes type SafeLock ou SafeSeal de 1.5 mL, ajouter 1 mL de TRIzol pour 50-100 mg de tissu (ne pas vortexer les ARN).
- 2) Homogénéiser avec une micropipette ou une seringue 1 mL (aiguille 0.6 mm).

2. Séparation des phases

- 1) Incuber l'échantillon homogénéisé 5 min à température ambiante (dissociation des complexes nucléoprotéiques).
- 2) Ajouter 0.2 mL de chloroforme pour 1 mL de TRIzol (bien vérifier que les tubes sont fermés).
- 3) Agiter vigoureusement à la main pendant 15 secondes.
- 4) Incuber 2–3 minutes à température ambiante.
- 5) Centrifuger les échantillons à 12,000 g/4°C/15 min.

Note : Le mélange est séparé en 2 parties : une phase inférieure contenant le Phénol/chloroforme et les ADN, séparée par le gel de la phase supérieure aqueuse incolore contenant les ARN.

- 6) Transférer la phase aqueuse dans un nouveau microtube.

Note : Il est possible de réeffectuer une séparation en ajoutant à nouveau du chloroforme dans le tube PLG puis de le centrifuger.

- 7) 2^{ème} lavage chloroforme :

ajouter 200µL de chloroforme à la phase aqueuse (pour 1mL de Trizol), agiter vigoureusement à la main, incuber 2-3 min à température ambiante, centrifuger à 12 000g 4°C pendant 10 min, récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube.

3. Précipitation de l'ARN

- 1) Ajouter 0.5 mL d'isopropanol 100% (=alcool isopropylique = propanol-2) à la phase aqueuse pour 1 mL de TRIzol utilisé.
- 2) Incuber 10 min à température ambiante, agiter doucement à la main régulièrement.
- 3) Centrifuger à 12,000 g/4°C/10 min.

Note : L'ARN est souvent invisible avant la centrifugation, ensuite il forme un culot sur le côté au fond du tube après la centrifugation.

4. Lavage de l'ARN

- 1) Retirer le surnageant du tube sans toucher le culot d'ARN.
- 2) Laver le culot avec 1 mL d'éthanol 75% pour 1 mL de TRIzol utilisé.

Note : L'ARN peut être stocké dans l'éthanol 75% au moins 1 semaine à 4°C ou plus d'un an à -20°C.

- 3) Agiter l'échantillon brièvement et centrifuger le tube à 7,500 g/4°C/5 min. Eliminer le surnageant.

Note : il est possible d'effectuer un deuxième lavage à l'éthanol 75%.

- 4) Sécher à l'air libre pendant 5–10 minutes : tube retourné sur un papier absorbant.

Note: Ne pas sécher complètement au risque de rendre l'ARN insoluble. Les ARN partiellement solubilisés ont un ratio A260/280 <1.6.

- 5) Reprendre les ARN dans l'eau RNase-Free.
- 6) Chauffer à 55-60°C/5 min pour le solubiliser.
- 7) Conserver les ARN à -80°C.

Fiche 7 : Quantification de l'ARN et Contrôle de qualité de l'ARN

1. Quantification de l'ARN par Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Desjardins and Conklin, 2010)

- 1) Pour commencer, nettoyer les surfaces supérieures et inférieures optiques du système de spectrophotomètre par pipetage de 2 à 3 μL d'eau déminéralisée propre sur la surface inférieure optique.
- 2) Fermer le bras de levier, s'assurer que le piédestal supérieur vient en contact avec l'eau déminéralisée. Soulever le bras de levier et essuyer les surfaces optiques avec un chiffon propre, sec, non pelucheux.
- 3) Ouvrir le logiciel NanoDrop et sélectionner l'application des acides nucléiques. Utiliser une micropipette calibrée pour effectuer un essai à blanc en déposant 1 μL de tampon sur la surface inférieure optique. Abaisser le bras de levier et sélectionner "blanc" dans l'application des acides nucléiques.
- 4) Une fois l'essai à blanc terminé, nettoyer les deux surfaces optiques avec un chiffon propre, sec, non pelucheux.
- 5) Choisir la constante appropriée à l'échantillon qui doit être mesuré.
- 6) Déposer 1 μL d'échantillon d'acides nucléiques sur la partie inférieure du piédestal optique et fermer le bras de levier. Parce que la mesure est indépendante du volume, l'échantillon doit seulement combler le fossé entre les deux surfaces optiques pour la mesure.
- 7) Sélectionner "mesure" dans le logiciel d'application. Le logiciel calcule automatiquement le taux de concentration d'acides nucléiques et de pureté. Suite à la mesure de l'échantillon, faire l'examen de l'image spectrale pour évaluer la qualité de l'échantillon.
- 8) Un échantillon d'acides nucléiques typiques a un profil très caractéristique.
- 9) Les sources communes de polluants associés à des techniques d'isolement d'acides nucléiques comprennent l'extraction phénol / Trizol et la colonne. Dans le cas de l'extraction phénol / Trizol, la contamination résiduelle peut être indiquée par des spectres anormaux entre 220 à 240 nm ainsi que par des changements dans la région 260-280 nm. Inversement, la guanidine résiduelle provenant de l'extraction de colonne peut contribuer à un pic de près de 230 nm et un changement dans le creux de 230 nm à environ 240 nm.
- 10) Pour évaluer avec précision la qualité des échantillons, les ratios 260/280 ou 260/230 doivent être analysés en combinaison avec la qualité spectrale globale. Les acides nucléiques purs ont généralement un ratio 260/280 $\sim 1,8$ et un ratio de 260/280 de ~ 2.0 pour l'ADN et

l'ARN, respectivement. Ce ratio est dépendant du pH et de la force ionique du tampon utilisé pour faire le blanc et les mesures d'échantillons. Des ratios de pureté qui sont nettement inférieurs aux valeurs attendues peuvent indiquer que la technique d'isolement utilisés nécessite une optimisation plus poussée.

2. Vérification de qualité des ARN avec le Bioanalyzer Agilent

Le Bioanalyzer 2100 (Agilent) est une plateforme qui permet de séparer des échantillons par électrophorèse en vue de leur contrôle-qualité.

Ref Kit: 5065-4476 <http://www.chem.agilent.com>

Réactifs et matériels :

1. Bioanalyzer 2100 Agilent
2. RNA 6000 Nano Kit
3. RNA 6000 Nano Chips
4. Chip priming station
5. Echantillons à doser (12 échantillons/puce)
6. RNA 6000 ladder (Stocké à -80 °C, aliquotes de 1.5ul/tube)

La concentration requise pour les échantillons requise doit être comprise entre 5 et 500ng/ μ L

1. Préparation du « ladder »

- a. A réception du kit, le « ladder » peut être conservé à -20 °C jusqu'à sa préparation.
- b. Pour préparer le « ladder », le décongeler et le dénaturer 2 min à 70 °C puis le placer immédiatement sur glace. Faire des aliquots de 1,5 μ L dans des tubes eppendorf de 0,5 mL. Les aliquots sont conservés à -80°C.

2. Préparation du matériel

- a. Sortir le RNA 6000 Nano Assay Kit à température ambiante, 30 min avant utilisation, à l'abri de la lumière.
- b. Préparer un incubateur (tubes eppendorf de 0.5ml) à 70 °C.

- c. Préparer la station comme.

3. Préparation du Gel-dye Mix

- a. RNA gel matrix filtré : Placer 550 μ L de RNA gel matrix sur la colonne de filtration. Centrifuger 10 min à 4000 rpm (1500 rcf). Conserver un mois à 4 °C.
- b. Gel-dye mix : Mettre 65 μ L de RNA gel matrix filtré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et rajouter 1 μ L de RNA dye concentré → Vortexer
Centrifuger 10 min à 12 000rpm
Conservation du gel-dye mix 2 jours à 4 °C, à l'abri de la lumière

4. Préparation des échantillons et du marqueur de taille

- a. Décongeler le RNA 6000 Ladder sur glace
- b. Incubation des échantillons et du ladder (optionnel pour le ladder), 2 min à 70 °C, pour les dénaturer.
- c. Placer immédiatement les tubes sur glace. Les centrifuger (les conserver sur la glace).

5. Couler le gel

- a. Placer la seringue sur La station.
- b. Régler la seringue sur 1 mL.
- c. Déposer 9 μ L de Gel-dye mix dans le puits G de la puce (ne pas introduire de bulles d'air !)
- d. Placer la puce dans La station.
- e. Fermer La station et presser doucement sur la seringue jusqu'au « clip ».
Attendre exactement 30 secondes
- f. Déclipser la seringue. Laisser la position de la seringue remonter doucement (jusqu'à la graduation 0,8 mL environ), remonter doucement le piston de la seringue à 1 mL.
- g. Ouvrir La station.

6. Puce

- a. Déposer 9 μ L de Gel-dye mix dans les deux puits notés G de la puce (ne pas introduire de bulles d'air !).

- b. Vortexer le RNA 6000 Nano marker.
- c. Déposer 5 μL de RNA 6000 Nano marker dans le puit réservé au ladder et dans les 12 puits réservés aux échantillons.
- d. Déposer 1 μL de ladder (L décongelé) dans son puits
- e. Déposer 1 μL de chaque échantillon.
- f. Vortexer 1 min la puce à 2400 rpm.
- g. Placer la puce dans l'appareil Agilent 2100 bioanalyzer.

Fermer le couvercle de l'appareil doucement pour ne pas endommager les électrodes

Démarrer l'analyse dans un délai maximum de 5 min

7. Analyse (logiciel version B)

- a. Allumer le périphérique puis l'ordinateur, se connecter grâce au « login » et au « mot de passe » relatif au projet qui ont été fournis par la plateforme.
- b. Dans le menu Previous Assay, sélectionner RNA.
- c. Sélectionner Eucaryote Total RNA Nano pour le contrôle d'ARN total (ou mRNA).
- d. Appuyer sur START.
- e. Lorsque l'analyse commence, nommer les échantillons.

8. Nettoyage des électrodes de l'appareil

- a. Déposer 350 μL de RNase ZAP dans une puce de lavage RNase ZAP. L'introduire dans l'appareil, et la laisser 1 minute (pas plus).
- b. Déposer 350 μL d'eau dans la puce prévue à cet effet. L'introduire dans l'appareil, et la laisser 1 minute.
- c. Laisser le couvercle de l'appareil ouvert durant 1 minute pour sécher les électrodes puis le refermer.

9. Sauvegarde des données et impression

- a. Pour imprimer les données, cliquer sur l'icône d'impression.
Décocher PDF et/ou HTML puis appuyer sur « print »

b. Pour sauvegarder les données.

Cocher PDF puis « save as » sur le support le plus approprié (clé USB, serveur, mes documents...)

Fiche 8 : Transcription inverse des ARN (RT)

La transcription inverse correspond à la synthèse de l'ADN monocaténaire (ADN complémentaire ou ADNc) avec de l'ARN monocaténaire servant de modèle, et ce, par le biais de transcriptases inverses (RT). L'ADNc peut être utilisé en tant que matrice à des fins d'amplification par PCR ou en vue de générer une bibliothèque d'ADNc. Cette réaction est catalysée par l'ARN polymérase ADN dépendante (ou transcriptase).

1. Sur un volume d'ARN équivalent à 1µg par échantillon, compléter avec de l'eau (RNasefree) jusqu'à 12µl.
2. Ajouter dans chaque tube 2µl de tampon gDNA Wipeout® pour éliminer l'ADN génomique.
3. Centrifuger à la centrifugeuse de paillasse.
4. Incuber 2 minutes à 42°C au Thermocycleur et mettre les tubes rapidement dans la glace.
5. Mélanger :

Volume de réaction : 20 µL	Concentration de réaction	Concentration stock	Volume
ARN	250	-	14
5x FS buffer 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂	1.x	5.x	4 µL
Rtase	10 mM	100 mM	1 µL
RT Primer Mix	200 U	200 U/µL	1 µL

(20µL)

6. Centrifuger brièvement à la centrifugeuse de paillasse.
7. Placer dans le Thermocycleur préchauffé et sélectionner le programme RT :15 min à 42°C, 3 minutes à 95°C.
8. Faire des aliquotes et Conserver les ADNc produit à -80°C.

La RT a été faite par QuantiTect Reverse Transcription Kit de QIAGEN

Fiche 9 : PCR quantitative en temps réel

La réaction en chaîne par polymérase en temps réel (PCR en temps réel) est une technique ayant de nombreuses applications, basée sur une réaction enzymologique, la PCR, et sur la mesure en continu de son produit.

À chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible, ce qui était très difficile à obtenir sans biais en PCR en point final.

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR point final) ou au cycle $n < 40$ (PCR semi-quantitative). Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (soit à cause d'un "quencher" soit car la fluorescence nécessite un ADN double brin). Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil alors on obtient un numéro de cycle PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Il est important de connaître l'efficacité E de la PCR. Pour cela, on effectue une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissante pour obtenir un courbe étalon correspondant au couple d'amorces utilisé (spécifiques du locus d'intérêt).

Procédure :

- 1) Décongeler les échantillons d'ADNc dans la glace, le master mix, les amorces et l'eau RNase free.
- 2) Préparer un mix selon le tableau suivant :
- 3) Dénaturation initiale et activation de l'enzyme : 95°C/30sec
- 4) 40 cycles de dénaturation et hybridation/élongation : 95°C/5sec + 60°C(pol II, RSP 29) 63°C (MTR)/30sec

Solution	Volume	Concentration finale
SYBRPremix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2 X)	10 µL	1X
PCR Forward Primer (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
PCR Reverse Primer (10 µM)	0,4 µL	0,2 µM
ROX Reference Dye (50 X) or Dye II (50 X)	0,4 µL	1
Template cDNA	2 µL	-
dH2O (sterile distilled water)	6,8 µL	-
	20 L	

Liste des amorces

GENE	TYPE	SENSE	SEQUENCE 5'->3'	Tm (°C)
MTR	RT-qPCR	Forward	ACACTTGGCCTACCGGATG	56
MTR	RT-qPCR	Reverse	CCAGCCACAAACCTCTTGAC	56
Pol II	RT-qPCR	Forward	AGCAAGCGGTTCCAGAGAAG	57
Pol II	RT-qPCR	Reverse	TCCCGAACACTGACATATCTCA	57
rps 29	RT-qPCR	Forward	ATGGGTCACCAGCAGCTCTA	56
rps 29	RT-qPCR	Reverse	CATGTTTCAGCCCGTATTTGC	56

Kit utilisé : SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) de Takara

Appareil utilisé: StepOne Plus Applied Biosystems

Fiche 10 : Extraction des protéines pour l'étude par Western-Blot

- 1) Broyer le tissu dans l'azote à l'aide d'un mortier et un pilon. Faire attention à ne pas décongeler l'échantillon.
- 2) Resuspendre le broyat dans un mélange du tampon RIPA froid (500 μ L) avec PMSF, Na₃VO₄ et PIC
- 3) Incuber 10 min sur glace
- 4) Homogénéiser par 10 allers retours avec une seringue de 1 mL + aiguille bleue
- 5) Faire 3 cycles de congélation – décongélation (azote – bain marie 37°C)
- 6) Centrifuger 12000rpm – 30min – 4°C
- 7) Récupérer le surnageant, aliquoter et stocker à -80°C

<i>Tampon Ripa</i>	NaCl	8 g/l	
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l	
	KH ₂ PO ₄	0,24 g/l	dans H ₂ O miliQ
	NP40	1 %	
	SDS	0,1 %	

Fiche 11 : Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

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

1. Préparer une gamme étalon (50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 et 2000 µg/mL, en triple) à partir d'une solution stock de BSA (bovine serum albumin) diluée dans la même solution que les échantillons à doser (tampon de lyse RIPA).
2. Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes de réactif A ³⁾ avec 1 volume de réactif B (CuSO₄) ⁴⁾.
3. Distribuer 25 µL de chaque dilution de BSA ²⁾ ou d'échantillon à doser sur une plaque de 96 puits.
4. Trois blancs sont réalisés avec 25 µL de diluant seul.
5. Ajouter 200 µL de réactif de travail et agiter la plaque.
6. Couvrir la plaque et la placer 30 min à 37°C.
7. Laisser refroidir la plaque à température ambiante.
8. Mesurer l'absorbance sur un spectrophotomètre lecteur de plaques à 570 nm.
9. La droite de régression étalon est tracée et la concentration protéique des échantillons est déduite à partir de la courbe étalon.

1) *Pierce, Rockford, IL, USA*

2) *Ampoule contenant de la BSA à 2,0 mg/mL dans une solution de NaCl à 0,9% (p/v) et NaN₃ à 0,05% (p/v)*

3) *Réactif A : solution aqueuse contenant BCA-Na₂ 1% (p/v), Na₂CO₃ 2% (p/v), tartrate-Na₂ 0,16%, NaOH 0,4% (p/v) et NaHCO₃ 0,95% (p/v) (pH 11,25)*

4) *Réactif B : solution de CuSO₄.5H₂O à 4% (p/v) dans de l'eau déionisée*

Fiche 12 : Western Blot

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 immunodétection rendue possible grâce au couplage à une enzyme peroxydase.

1. Electrophorèse

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 bêta-mercaptoéthanol, permet ainsi la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire.

Préparation des gels

- 1) Monter l'appareil d'électrophorèse Mini-Protean III : plaques de verre et espaceurs (en général 1,5mm)
- 2) Préparer le gel de séparation -voir tableau- à la concentration souhaitée.
- 3) Couler les gels à l'aide d'une pipette de 1000 μ l et s'arrêter au niveau bas du plastique vert en dessous de l'emplacement du peigne.
- 4) Déposer un fin film (~ 500 μ l) d'isopropanol (ou isobutanol)
- 5) Attendre la polymérisation à température ambiante (pour gel 12%, si $t^\circ \sim 20-22^\circ\text{C}$ compter 20mn)
- 6) Rincer abondamment à l'eau distillée et éliminer toutes traces d'eau
- 7) Couler le gel de concentration ou stacking à 5% après ajout du TEMED
- 8) Positionner le peigne en Téflon doucement en évitant la formation de bulles : polymérisation en 20 mn
- 9) Monter l'appareil en assemblant les deux supports de gel sur le système central
- 10) Remplir le réservoir central (cathode) jusqu'en haut ainsi que la cuve (à moitié) avec le tampon de migration

Préparation des échantillons

- 1) Les échantillons sont dénaturés dans le tampon de charge (v/v) puis sont déposés, ainsi que le marqueur de poids moléculaire, dans les puits du gel de concentration.
- 2) Dans des tubes Eppendorf, ajouter 1 volume de tampon Laemmli 2X à 1 volume d'échantillon
- 3) Chauffer 5 mn à 100°C les échantillons et les marqueurs de taille qui se trouvent dans des tubes stériles percés à l'aiguille de couleur bleu (0,6 x 25 mm)
- 4) Laisser refroidir à température ambiante pour éviter un choc thermique.
- 5) Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration
- 6) Ne pas laisser de puits vides, les combler avec le même volume de Laemmli 1X.

2. Migration : Voltage constant

- Gel de concentration : 80V, environ 15-20 mn
- Gel de séparation : 110V, ~1h30
- Entre temps, mettre les papiers filtres dans le tampon de transfert (1X) à 4 °C pendant une heure.
- Arrêter la migration quand le front de migration arrive en bas des plaques (varie en fonction de la taille de protéine ciblée)

3. Transfert semi-sec de protéines :

- 1) Mettre la membrane PVDF au moins 30 sec dans du méthanol
- 2) Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et équilibrer le gel dans le tampon de transfert froid (5 min max).
- 3) Ouvrir le capot du dispositif de transfert et disposer dans l'ordre suivant :
 - 3 feuilles de papier filtre
 - 1 membrane PVDF (préalablement activée au moins 30s dans du méthanol et rincée de le tampon de transfert)
 - 1 gel de migration
 - 3 feuilles de papier filtre
- 4) Lancer le transfert à 10V pendant 45 min pour les protéines de faible poids moléculaire (<100 kDa) ou 1h pour les protéines de fort poids moléculaire (>100kDa).

4. Transfert liquide de protéines :

- 1) Mettre la membrane PVDF au moins 30 sec dans du méthanol
- 2) Equilibrer la membrane dans le tampon de transfert froid (5mn max) ainsi que les éponges et les filtres

- 3) Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et équilibrer les gels dans le tampon de transfert froid (5mn max)
- 4) Préparation du sandwich : placer la face blanche en haut et noire en bas, superposer sur la face blanche dans l'ordre : une éponge, 3 papiers filtres, la membrane, le gel, 3 papiers filtres, une éponge
- 5) Fermer le sandwich, placer les cassettes dans le module de transfert, face noire vers face noire, mettre le glaçon, remplir la cuve avec du tampon froid
- 6) Transfert à ampérage constant :350mA pendant 45mn
- 7) Coloration de la membrane avec une solution de Rouge Ponceau S (solution aqueuse de Rouge Ponceau S à 0.2% (p/v), acide acétique 0.1% (v /v), filtrée 0.2µm, 4°C) pendant 5mn puis décoloration à l'eau distillée.

5. Blocage

- 1) Repérer de quel côté sont les protéines.
- 2) Marquer avec un stylo les traits de marquage
- 3) Mettre les membranes dans 25mL de solution de TBST /lait écrémé 5% (en salle de pesée) (ou BSA à 4°C en WB) sous agitation lente (agitateur à gauche) pendant 1 heure à température ambiante

6. L'incubation de 1^{er} anticorps

- 1) Couper la membrane le plus possible pour économiser les anticorps.
- 2) Préparer une pochette plastique légèrement supérieure à la surface de la membrane
- 3) Préparer la solution avec le premier anticorps dilué à la concentration souhaitée dans TBST/lait 5%
- 4) Placer la membrane dans la pochette plastique, mettre la solution d'anticorps, chasser les bulles et souder la pochette.
- 5) Incuber 1 nuit à 4°C sous agitation lente.

7. Lavage

- Sortir la membrane de sa pochette plastique et la mettre dans un petit bac contenant environ 25 mL de TBST 1 X.
- Faire 1 rinçage rapide (quelques secondes) avec du TBST 1X, puis rincer avec du TBST 1X 4 fois 10 min sous agitation rapide à température ambiante

8. 2^{ème} anticorps

Procéder de la même façon qu'avec le 1^{er} anticorps. Préparer la solution avec le deuxième anticorps dilué à la concentration souhaitée dans TBST/lait 5%

Incuber 1 heure sous agitation lente à température ambiante

9. Lavage

- Sortir la membrane de sa pochette plastique et la mettre dans un petit bac contenant environ 25 mL de TBST 1 X.
- Faire 1 rinçage rapide (quelques secondes) avec du TBST 1X, puis rincer avec du TBST 1X 4 fois 10 min sous agitation rapide à température ambiante

10. Révélation ECL

- 1) Retirer la membrane du tampon de lavage.
- 2) La sécher rapidement (une fois chaque face) sur du papier absorbant.
- 3) La déposer sur une plaque en verre propre, protéines vers le plafond.
- 4) Déposer sur la membrane 1 mL d'ECL à l'aide d'une P1000 et étaler avec le dos d'une pince.
- 5) Incuber à l'obscurité 2 à 5 min.
- 6) Bien sécher la membrane sur du papier absorbant (penser à sécher la pince aussi)
- 7) La déposer sur un film à pochette, protéines vers le plafond, sans film sur le dessus.
- 8) Déposer la membrane bien au centre du plateau du bioimageur Fusion et se référer aux instructions du fabricant.
- 9) Après la lecture, remettre la membrane dans du TBST 1X (réhydratation).
- 10) Pour le stockage, mettre la membrane en pochette dans du TBST 1X et conserver à 4°C.

		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%	H ₂ O MQ	2,8	5,8	8,6	11,6	14,4	17,4	23,2	29,0
	Acrylamide Mix 29:1	0,8	1,5	2,3	3,0	3,8	4,5	6,0	7,5
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8%	H ₂ O MQ	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
	Acrylamide Mix 29:1	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10%	H ₂ O MQ	2,3	4,8	7,1	9,6	11,9	14,4	19,2	24,0
	Acrylamide Mix 29:1	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12%	H ₂ O MQ	2,1	4,3	6,4	8,6	10,7	12,9	17,2	21,5
	Acrylamide Mix 29:1	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5	9,0	12,0	15,0
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15%	H ₂ O MQ	1,7	3,5	5,3	7,1	8,8	10,6	14,2	17,7
	Acrylamide Mix 29:1	1,9	3,8	5,6	7,5	9,4	11,3	15,0	18,8
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

		1 ml	4 ml	8 ml	16 ml	24 ml	6 ml	8 ml	10 ml
Stacking	H ₂ O MQ	0,72	2,92	5,83	11,66	17,49	4,37	5,83	7,29
	Acrylamide Mix 29:1	0,13	0,5	1	2	3	0,75	1,00	1,25
	Tris 0.5M pH 6.8	0,13	0,5	1	2	3	0,75	1	1,25
	SDS 10%	0,01	0,04	0,08	0,16	0,24	0,06	0,08	0,1
	APS 10%	0,01	0,04	0,08	0,16	0,24	0,06	0,08	0,1
	TEMED	0,001	0,004	0,008	0,016	0,024	0,006	0,008	0,01

Fiche 13 : Déshybridation des membranes (STRIPPING)

1. Chauffer le tampon entre 37°C et 40°C
2. Sous hotte, remplir un bac en verre de tampon chaud
3. Immerger les membranes pendant 30 mn à 40°C en agitant de temps en temps
4. Rincer rapidement les membranes à l'eau distillée (sous la hotte)
5. Rincer ensuite avec du TBST 2x10 mn sous agitation
6. Reprendre le protocole de western à partir du tampon bloquant

Tampon de déshybridation : Pour 1 litre

100 mM 2-mercaptoethanol: 7 ml

2 % SDS: 20g

62,5mM Tris HCL pH 6,7: 7,57g

TBST 10x : Pour 1 litre

Tris 200 mM: 24,2g

NaCl 1,5 M: 87,5g

pH 7,4 à ajuster avec HCl

qsp H2O MilliQ

Conserver à 4°C

Fiche 14 : Analyses histologiques

1. Traitement des échantillons tissulaires pour l'analyse histologique

1.1 Déshydratation et inclusion en paraffine

Après fixation, les tissus sont placés dans des cassettes. Ils sont ensuite déshydratés et imprégnés de paraffine dans un automate de type Excelsior ES par passages dans une série de bains successifs de formol, d'alcool, de toluène et de paraffine. Après cette étape de déshydratation, les tissus sont placés dans un moule rempli de paraffine maintenue à l'état liquide. Une fois que le tissu est correctement positionné, le moule est placé sur une plaque refroidissante afin de faire durcir la paraffine.

1.2 Réalisation des coupes

Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome (Thermo Scientific, Microm HM325) puis déposées sur des lames SuperFrost Plus. Ces lames sont ensuite placées sur une plaque chauffée à 50°C afin d'aplanir les coupes puis sont stockées à température ambiante.

2. Réalisation de la coloration HES

Les coupes sont colorées dans un automate ⁽¹⁾ □ par bains successifs :

- Toluène 2 ⁽²⁾
- Alcool 100° ⁽³⁾
- Alcool 95° ⁽³⁾
- Hématoxyline ⁽⁴⁾
- Eau acétifiée à 1% (eau + acide acétique) ...⁽⁵⁾
- Eosine 1% ⁽⁶⁾
- Alcool 100° ⁽³⁾

- Safran ⁽⁷⁾
- Alcool 100° ⁽³⁾
- Toluène ⁽²⁾

Montage des lames avec lamelles 24x60mm ⁽³⁾ et Eukitt ⁽⁸⁾.

Cette coloration permet de mettre en évidence une stéatose.

- L' hématoxyline colore les noyaux en violet.

- L'éosine colore les cytoplasmes en rose.

- Le safran colore les fibres de collagène en jaune.

Les techniques de coloration ont été réalisées au Service d'Anatomopathologie à l'Hôpital Central, Nancy.

- (1) Automate tissue-Tek DRS, Sakura, Nagano.
- (2) Toluène, Carlo-Erba, Val de Reuil.
- (3) Tous les produits sont fournis par VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois.
- (4) Hématoxyline, Shardon Gill 2 Hematoxylin, Thermoscientific.
- (5) Eau acétifiée, Merck, Darmstadt.
- (6) Eosine, Diapath, Microstain Division, Martinengo.
- (7) Safran, Microm Microtech, Francheville.
- (8) Eukitt®, Freiburg.

3. Marquages immunofluorescents

Après avoir subi une étape de déparaffinage dans une solution Histo-clear (National Diagnostics, HS-200), les lames sont réhydratées par incubation dans des bains d'alcools de degré décroissant (100%, 95%, 70% et 50%) puis dans un bain d'eau distillée. A la suite de cette étape, les lames subissent un démasquage des sites antigéniques. Pour cela, elles sont incubées dans du tampon EDTA-Na₂ 10 mM à pH = 8 pendant 30 minutes à 95°C, puis les bacs contenant les lames sont placés dans la glace

pendant 20 minutes. Les lames sont ensuite lavées plusieurs fois dans du PBS 1X. Après l'étape de lavage, les sites non spécifiques sont bloqués à l'aide d'une solution composée d'un mélange de BSA 10% - sérum de cheval 5% - PBS 1X ou une solution de BSA 10% - PBS 1X ou encore du sérum de veau 10% - PBS 1X (selon les mises au point) pendant 1 heure à température ambiante. L'anticorps primaire est ensuite ajouté puis incubé pendant 1 nuit à 4°C. Le lendemain, les lames sont rincées plusieurs fois avec du PBS, puis l'anticorps secondaire (Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit IgG, Molécular Probes) est déposé et incubé pendant 1h30 à température ambiante. Les noyaux sont colorés au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) à 0,33µg/mL pendant 3 minutes à l'obscurité. Enfin, les lames sont scellées avec un liquide de montage (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako-S3023) puis observées au microscope confocal (Nikon C2).

4. Marquage immunohistochimiques

Après avoir subi une étape de déparaffinage dans une solution Histo-clear (National Diagnostics, HS-200), les lames sont réhydratées par incubation dans des bains d'alcools de degré décroissant (100%, 95%, 70% et 50%) puis dans un bain d'eau distillée. A la suite de cette étape, les lames subissent un démasquage des sites antigéniques. Pour cela, elles sont incubées dans du tampon EDTA-Na₂ 10 mM à pH = 8 pendant 30 minutes à 95°C, puis les bacs contenant les lames sont placés dans la glace pendant 20 minutes. Les lames sont ensuite lavées plusieurs fois dans du PBS 1X. Après l'étape de lavage, les sites non spécifiques sont bloqués à l'aide d'une solution composée d'un mélange de BSA 10% - sérum de cheval 5% - PBS 1X ou une solution de BSA 10% - PBS 1X ou encore du sérum de veau 10% - PBS 1X (selon les mises au point) pendant 1 heure à température ambiante. L'anticorps primaire est ensuite ajouté puis incubé pendant 1 heure à température ambiante. Ensuite, les lames sont rincées plusieurs fois avec du PBS, puis l'anticorps secondaire est déposé et incubé pendant 1 heure à température ambiante.

Fiche 15 : Liste des anticorps

Anticorps primaire	Technique	Fournisseur	Host	Size (Kda)	Bloquant	Dilution
[pSer727]Stat3	WB	Enzo	Mouse	92	BSA 5%	1/700
Ampk α	WB	Cell signaling	Rabbit	62	BSA 5%	1/1000
Anti-PGC-1 α	WB	Millipore	Mouse	113	BSA 5%	1/700
ATF-6 α	WB	Santa Cruz	Rabbit	90	BSA 5%	1/200
b-actin	WB	abcam	Chicken	40kDa	Lait 5%	1/1000
BHMT	WB	Novus	Goat	45	BSA	1/1000
BHMT2	WB	Abcam	Rabbit	40	Lait	1/1500
Binp 3	WB	Abcam	mouse	30	lait 5%	1/700
Cdc2	WB	Cell signaling	Rabbit	35	BSA 5%	1/1000
CDK2	WB	Cell signaling	Rabbit	34	BSA 5%	1/1001
Cdk2 (phospho Y15)	WB	Abcam	Rabbit	33	BSA 5%	1/10000
Cleaved caspase 3	WB	Cell signaling	Rabbit	19/17	Lait 5%	1/700
CRE	WB	Cell signaling	Rabbit	34	Lait 5%	1/1000
Cyclin A2	WB	Abcam	mouse	50	Lait 5%	1/200 (5 μ g/mL)
Cyclin B1	WB	Cell signaling	mouse	55	Lait 5%	1/2000
Cyclin B2	WB	Abcam	mouse	45	Lait 5%	1/1000 (2 μ g/mL)
Cycline D1(SP4)	WB	Thermo scientifique	Rabbit	35	Lait5%	1/500
Gapdh	WB	Millipore	chicken	38	Lait 5%	1/1000
Gapdh-HRP	WB	Abcam	Mouse	38	BSA 5%	1/1000
IRE1 alpha	WB	Cell signaling	Rabbit	130	BSA 5%	1/700
IRE-1 alpha Phosphospecific	WB	novus biologicals	Rabbit	110	BSA 5%	1/700
MEK1/2	WB	Cell signaling	Rabbit	45	Lait 5%	1/1000
MLKL	WB	Abcam	Rabbit	54	BSA 5%	1/500
MTR	WB	Abcam	Rabbit	140	Lait 5%	1/1000
Nrf 2	WB	Abcam	Rabbit	100	BSA 5%	1/1000
p-Ampk β 1 (ser108)	WB	Cell signaling	Rabbit	38	BSA 5%	1/1000
PARP 1	WB	Abbiotec	Rabbit	113-116	BSA 5%	1/500
PCNA	WB	Cell signaling	Rabbit	36	BSA 5%	1/700

Anticorps primaire	Technique	Fournisseur	Host	Size (Kda)	Bloquant	Dilution
PERK	WB	Cell signaling	Rabbit	140	BSA 5%	1/700
Phospho-cdc2 (Thr161)	WB	Cell signaling	Rabbit	34	BSA 5%	1/1000
Phospho-CDK2 (Thr160)	WB	Cell signaling	Rabbit	33	BSA 5%	1/1000
Phospho-PERK	WB	Cell signaling	Rabbit	170	BSA 5%	1/700
p-MEK1/2 (Ser217/221)	WB	Cell signaling	Rabbit	45	BSA 5%	1/1000
Renin	WB	Abcam	Rabbit	45	BSA 5%	1/700
Rip3	WB	Abcam	Rabbit	57	BSA 5%	1/700
Ripk 1	WB	Novus	Rabbit	76	BSA 5%	1/500
Sirt 1	WB	Abcam	mouse	120	BSA 5%	1/1000
STAT 3	WB	Cell signaling	Rabbit	79/86	BSA 5%	1/1000
TRADD	WB	Cell signaling	Rabbit	34	BSA 5%	1/1000
U2AF65	WB	Abcam	Rabbit	54	BSA 5%	1/1001
α -tubulin	WB	Cell signaling	Rabbit	52	BSA 5%	1/1000
α -tubulin-HRP	WB	Abcam	Rabbit	52	BSA 5%	1/5000

Anticorps secondaires	Technique	Fournisseur	Dilution
HRP donkey IgG anti-rabbit	WB	Jackson ImmunoR	1/5000
HRP donkey IgG anti-mouse	WB	Jackson ImmunoR	1/5001
HRP donkey IgG anti-goat	WB	Jackson ImmunoR	1/5002
HRP donkey IgG anti-chicken	WB	Jackson ImmunoR	1/5003

4-hydroxynonenal	Immunofluorescence	Abcam	Rabbit	1/200
8-hydroxyguanosine	Immunofluorescence	Abcam	Rabbit	1/400
Anticorps primaire	Technique	Fournisseur	Host	Dilution
eIF4AIII	Immunofluorescence	E. Daguenet, IGBMC, Strasbourg, France	Rabbit	1/1000
FUS/TLS	Immunofluorescence	Abcam	Rabbit	1/50
HuR	Immunofluorescence	Millipore	Rabbit	1/200
Ki 67	Immunofluorescence	Cell signaling	Rabbit	1/50
Méthyl-HuR	Immunofluorescence	UnitedPeptide, USA	Rabbit	1/100
MTR	Immunofluorescence	Abcam	Rabbit	1/201
Nrf2	Immunofluorescence	Abcam	Rabbit	1/200
SRSF1	Immunofluorescence	J. Stevenin, IGBMC, Strasbourg, France	Rabbit	1/200
U2AF65	Immunofluorescence	Abcam	Rabbit	1/400

Anticorps secondaires	Technique	Fournisseur	Dilution
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG	Immunofluorescence	Molecular probes	1/1000
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG	Immunofluorescence	Molecular probes	1/1000

Fiche 16 : Etude transcriptomique

L'étude transcriptomique a comporté les étapes suivantes :

1. Analyse quantitative et qualitative des ARN par Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).
2. Le traitement des ARN et le marquage des acides nucléiques ont été réalisés avec le GeneChip® WT PLUS Reagent Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA), selon le protocole du fournisseur. L'hybridation sur puces GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA), les lavages et l'acquisition des données ont été réalisés selon les protocoles standards du fournisseur Affymetrix au Laboratoire de Génomique et de Protéomique de l'Institut de Santé du Luxembourg (Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg. <http://www.lih.lu/>).
3. Analyse bioinformatique :
 - Correction et normalisation avec la suite Partek (Partek, Saint-Louis, MO, USA, www.partek.com/)
 - Analyse statistique de l'expression différentielle avec le logiciel libre de traitement des données et d'analyse statistiques R (www.r-project.org)
 - Analyse des voies et des gènes dérégulés avec le logiciel PANTHER, Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, www.pantherdb.org, laboratoire du Pr. Thomas (Mi et al., 2013).

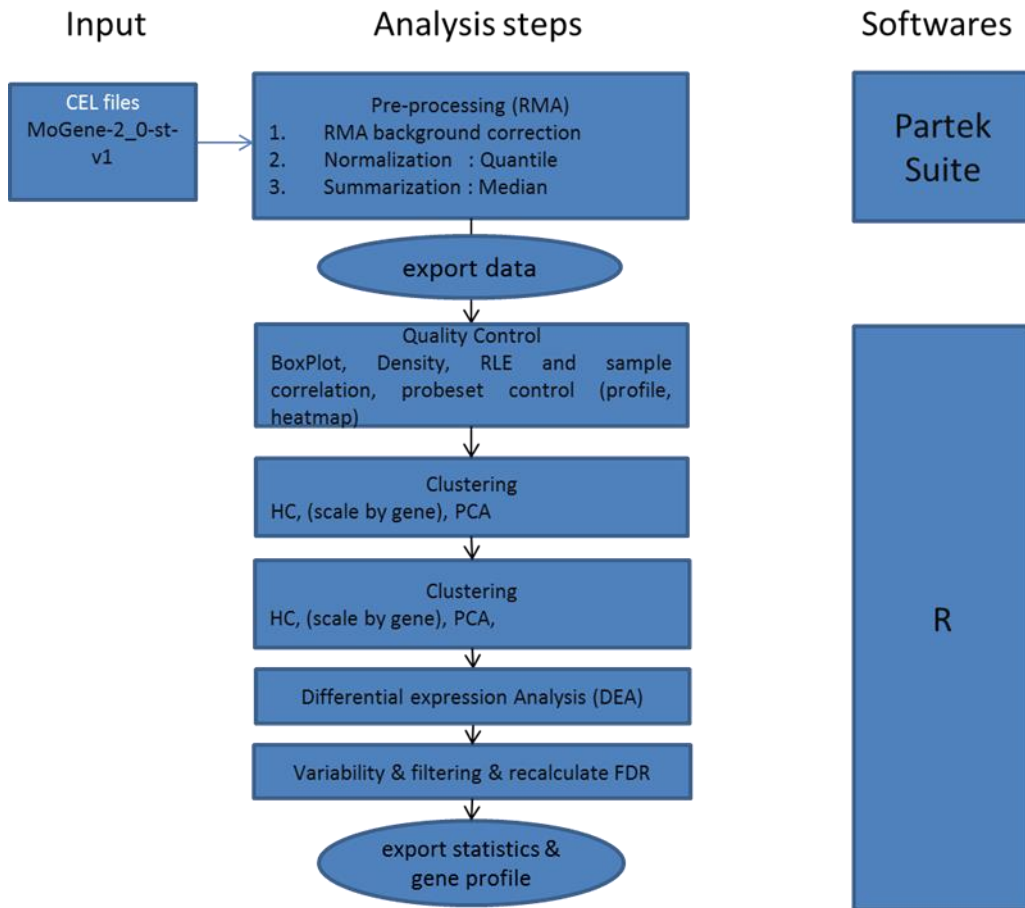


Figure : Etapes clés de la stratégie d'analyse bioinformatique de l'étude transcriptomique.

RMA : Robust Multiarray Average algorithm. PCA : Principal Component Analyses (pour identifier les « outliers »). FDR : False Discovery Rate.

Fiche 17 : Analyses Densitométrique et Statistiques

Analyse densitométrique pour western

Nous avons utilisé logiciel Image J pour quantifier les bandes de Western et après normalisé avec les protéines de référence respectives. Avec la quantification, nous transformons le niveau de gris des bandes de Western vers les chiffres qui seront analysé par t-Test.

Analyse densitométrique pour le comptage des noyaux marqués :

Les images obtenues au microscope confocal sont analysées par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ. Dans un premier temps, le nombre de noyaux est comptabilisé. L'intensité du marquage au FITC (fluorescein isothiocyanate) est ensuite mesurée. Enfin, l'intensité du marquage rapportée au nombre de noyaux est calculée selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Intensité}}{\text{Nombre de noyaux}}$$

Analyse statistique

Les données ont été analysées avec le logiciel Excel et rapportées en moyenne \pm S.E. Les données ont été comparées avec le Student test. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

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

