HAL
open science

La programmation fœtale de la carence en donneurs de méthyles entraîne une stéato-hépatite chez les rats soumis à un régime hyper-énergétique au cours de la vie adulte

Anaïs Bison

To cite this version:

Anaïs Bison. La programmation fœtale de la carence en donneurs de méthyles entraîne une stéato-hépatite chez les rats soumis à un régime hyper-énergétique au cours de la vie adulte. Biologie animale. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0285 . tel-02321736

HAL Id: tel-02321736

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02321736v1

Submitted on 21 Oct 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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

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

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

Anaïs BISON

La programmation fœtale de la carence en donneurs de méthyles entraîne une stéato-hépatite chez les rats soumis à un régime hyper-énergétique au cours de la vie adulte.

Soutenue le 11 décembre 2015

Membres du jury

Rapporteurs:

M. Patrick HILLON	Professeur des Universités, Université de Bourgogne, Dijon
M. Jean-Michel CAMADRO	Directeur de Recherche, CNRS UMR7592, Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot, Paris

Examinateurs:

Mme. Rosa-Maria GUEANT-RODRIGUEZ	Professeur des Universités, Université de Lorraine, Nancy (Directeur de thèse)
M. Grégory POURIE	Maître de Conférences, Université de Lorraine, Nancy (Co-directeur de thèse)

Membres invités:

M. Jean-Pierre BRONOWICKI	Professeur des Universités, Université de Lorraine, Nancy
M. Jean-Louis GUEANT	Professeur des Universités, 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 tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude au Pr. Jean-Louis Guéant, directeur de l'unité INSERM U954, pour son accueil, pour avoir dirigé ces recherches et pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Un infini merci au Pr. Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, ma directrice de thèse, pour m'avoir soutenue et encadrée tout au long de cette thèse avec patience. Je la remercie également pour son attention et son investissement personnel.

Un infini merci au Dr. Grégory Pourié, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir encadrée lors de mon Master 2 et accompagnée tout au long de ma thèse, lui qui m'a beaucoup appris, pour ses conseils avisés, son soutien, sa gentillesse.

Je remercie le Pr. Patrick Hillon et le Dr. Jean-Michel Camadro d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'évaluer mon travail.

Je remercie également le Pr. Jean-Pierre Bronowicki pour sa participation au jury de ma soutenance de thèse en tant que membre invité.

Je tiens tout particulièrement à remercier toute l'équipe de l'U954 qui m'a épaulée et soutenue tout au long de ma thèse.

Un grand merci au Dr. Carine Bossenmeyer-Pourié de m'avoir prise sous son aile et de m'avoir fait confiance lors mon stage de Master 1, en m'ouvrant ainsi les portes du laboratoire.

Un grand merci au Dr. Bernard Beck pour avoir mis au point le protocole animalier et pour ses conseils avisés et son soutien.

Je remercie tous les ingénieurs et techniciens du laboratoire pour leur patience, leur aide précieuse et leurs conseils, sans qui rien de tout cela n'aurait été réalisable. En particulier, M. Rémy Umoret pour tout son travail en animalerie et pour m'avoir appris à vaincre ma peur des rats.

Je remercie le Dr. Carole Arnold, le Dr. Natacha Dreumont-Schuller, le Dr. Shyue-Fang Battaglia-Hsu et le Pr. Farès Namour pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs nombreux conseils.

Merci aux secrétaires Dominique Guillaume et Catherine Tavera pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur patience. Un grand merci à Aline Cazé pour son aide précieuse pour mon rapport de Master 2 et mon manuscrit de thèse, pour ses conseils et sa grande gentillesse.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin à l'élaboration de cette thèse et également à toutes celles qui ont relu ma thèse.

Merci à toutes mes stagiaires et surtout Zhen pour leur aide précieuse, leur soutien et tous ces moments partagés.

Cette liste ne serait pas complète si je ne remerciais pas tous les doctorants et post-doctorants du laboratoire. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, votre aide, votre soutien, vos conseils, votre bonne humeur que ce soit dans les bons comme les moins bons jours.

Merci à tous mes collègues et amis, Rose, Racha K, Christine, Racha Z, Hassan, Rémy, Zhen, Lu, Gaili, Fereshteh, Thierry Fontaine, Fabian Marin, ... de m'avoir encouragée et soutenue jusqu'à la fin. Merci pour tout !

Mille mercis à toi Thibault, pour tout. Pour être à mes côtés, dans les bons comme les mauvais moments. Pour m'avoir aidée, jusqu'à avoir été ma main droite de remplacement quand la mienne m'a fait défaut à deux semaines du dépôt de thèse. Les mots ne sont pas assez forts pour exprimer ma reconnaissance. Ton soutien m'est si précieux. Je t'aime.

Un grand merci à, je l'espère, ma future belle-famille, pour vos conseils, votre soutien et votre encouragement.

Un immense merci à toute ma famille pour être toujours là, m'épauler, me soutenir, me consoler et me conseiller et cela à tout moment. Papa, maman, Coralie, Philippe, mémé, vous êtes mon bonheur. Je vous aime et vous adore.
J'aurais aimé et aurais été fière de montrer cette thèse à pépé et mamie, je ne vous oublierai jamais.

A toutes les personnes qui me sont chères,

Liste des communications et publications

Publications :

Kerek R, Geoffroy A, **Bison A**, Martin N, Akchiche N, Pourié G, Helle D, Guéant JL, Bossenmeyer-Pourié C, Daval JL. **Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124.** *Cell Death Dis, 2013, Aug 8;4:e755. doi: 10.1038/cddis.2013.278.*

Bison A, Bressenot A, Feigerlova E, Li Z, Houlgatte R, Beck B, Pourié G, Alberto JM, Umoret R, Bronowicki JP, Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM. **Fetal programming by methyl donor deficiency produces steato-hepatitis in rats exposed to high-fat diet in adult life.** *Soumis à The Journal of Pathology.*

Communications orales :

Bison A, Guéant-Rodriguez RM, Pourié G, Guéant JL. **Mécanismes épigénomiques d'inadaptation du métabolisme énergétique à l'exposition séquentielle à une surnutrition, chez le rat carencé en donneurs de méthyles.** *Journée de la FR, Nancy, Septembre 2014.*

Bison A, Guéant-Rodriguez RM, Pourié G, Guéant JL. **Mécanismes épigénomiques d'inadaptation du métabolisme énergétique à l'exposition séquentielle à une surnutrition, chez le rat carencé en donneurs de méthyles.** *Journée de rentrée de l'école doctorale Biose, Nancy, Novembre 2014.*

Bison A, Li Z , Bressenot A, Beck B, Pourié G, Alberto JM, Umoret R, Bronowicki JP , Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM. **Methyl donor deficiency during gestation and lactation produces hepatosteatosis in rat offspring fed a high-fat diet in adult life.** *International Conference One Carbone Metabolism Vitamins B and Homocysteine, Nancy, Juillet 2015.*

Communications affichées :

Bison A, Kerek R, Bossenmeyer-Pourié C, Geoffroy A, Guéant JL, Pourié G Daval JL. **Conséquences d'une carence maternelle en donneurs de méthyles sur le développement cérébral embryonnaire du rat.** *Journée Claude Huriet de la Recherche Biomédicale, Nancy, Mars 2012.*

Bison A, Bressenot A, Beck B, Pourié G, Alberto JM, Umoret R, Bronowicki JP , Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM. **Methyl donor deficiency during gestation and lactation produces hepatosteatosis and myocardium fibrosis in rat offspring fed a high-fat diet in adult life.** *Vitamin B12 Symposium, Nancy, Septembre 2012.*

Bison A, Bressenot A, Beck B, Pourié G, Alberto JM, Umoret R, Bronowicki JP , Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM. **Mécanismes épigénomiques d'inadaptation du métabolisme énergétique à l'exposition séquentielle à une surnutrition, chez le rat carencé en donneurs de méthyles.** *Journée de la FR, Nancy, Juin 2013.*

Bison A, Bressenot A, Beck B, Pourié G, Alberto JM, Umoret R, Bronowicki JP , Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM. **Methyl donor deficiency during gestation and lactation produces hepatosteatosis and myocardium fibrosis in rat offspring fed a high-fat diet in adult life.** *Second colloque de la SF-DOHAD, Nantes, Novembre 2014.*

Bison A, Li Z , Bressenot A, Beck B, Pourié G, Alberto JM, Umoret R, Bronowicki JP , Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM. **Methyl donor deficiency during gestation and lactation produces hepatosteatosis in rat offspring fed a high-fat diet in adult life.** *International Conference One Carbone Metabolism Vitamins B and Homocysteine, Nancy, Juillet 2015.*

Prix :

Prix Wittner, *Décembre 2014*.

Table des matières

Liste des communications et publications 4
Table des matières 6
Liste des tableaux 11
Liste des figures 12
Liste des abréviations 16
Données bibliographiques 26
Partie 1: Les facteurs influençant le métabolisme des monocarbones 27
1 Les déterminants nutritionnels 27
1.1 Les folates (vitamine B9) 27
1.1.1 Définition 27
1.1.2 Les apports nutritionnels 27
1.1.3 La structure chimique 28
1.1.4 L'absorption 31
1.1.5 Le transport 32
1.1.5.1 Le transport plasmatique 32
1.1.5.2 Le transport cellulaire 32
1.1.6 Le stockage et l'élimination 35
1.1.7 Les rôles 36
1.1.7.1 La synthèse des acides aminés 37
1.1.7.2 La synthèse des acides nucléiques 37
1.1.7.3 La conversion sérine-glycine 37
1.1.7.4 La synthèse de la méthionine 37
1.1.8 La carence en folates 37
1.2 La cobalamine (vitamine B12) 38
1.2.1 Définition 38
1.2.2 Les apports nutritionnels 38
1.2.3 La structure chimique 39
1.2.4 L'absorption 41
1.2.5 Le transport 43
1.2.5.1 Le transport plasmatique 43
1.2.5.2 Le transport cellulaire 44
1.2.6 Le stockage et l'élimination 44
1.2.7 Les rôles 45
1.2.7.1 La conversion combinée de l'homocystéine en méthionine et du méthyltétrahydrofolate en tétrahydrofolate 45
1.2.7.2 La conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA 45

1.2.8 Les perturbations du métabolisme de la vitamine B12 45
1.2.9 La carence en vitamine B12 47
1.2.9.1 Les causes de la carence en vitamine B12 47
1.2.9.1.1 Le déficit d'apport 47
1.2.9.1.2 Le défaut d'absorption 47
1.2.9.2 Les conséquences de la carence en vitamine B12 48
1.2.9.3 La perturbation de l'interaction entre la vitamine B12 et les folates 48
2 Les autres facteurs influençant le métabolisme des monocarbones 48
2.1 Les facteurs propres à chaque individu 48
2.2 Les facteurs liés au mode de vie (ou comportementaux) et les facteurs liés à un état pathologique 49
2.3 Les facteurs environnementaux 49
2.4 Les facteurs génétiques 50
2.4.1 Le polymorphisme de MTHFR 50
2.4.2 Le polymorphisme de MTR 50
2.4.3 Le polymorphisme de MTRR 50
2.4.4 Le polymorphisme de TCN2 51
Partie 2: Le métabolisme des monocarbones et mécanismes épigénétiques 52
1 Le métabolisme des monocarbones et cycles associés 52
1.1 Le cycle des folates 53
1.2 Le cycle de la méthionine (ou de l'homocystéine) 53
1.2.1 La méthionine 53
1.2.2 La SAM, la SAH et le rapport SAM/SAH 54
1.2.2.1 La SAM 54
1.2.2.2 La SAH 55
1.2.2.3 Le rapport SAM/SAH 55
1.2.3 L'homocystéine 56
1.3 La voie de trans-sulfuration 56
2 Les modifications épigénétiques 57
2.1 La méthylation de l'ADN 58
2.2 Les modifications des histones 61
2.2.1 Définition 61
2.2.2 L'acétylation des histones 63
2.2.3 La méthylation des histones 63
2.3 Les intéractions entre méthylation de l'ADN et modifications des histones 65

Partie 3: Les pathologies en lien avec le métabolisme des monocarbones et la programmation fœtale 67
1 Les pathologies liées au métabolisme des monocarbones 67
1.1 Les maladies obstétriques 67
1.2 Les maladies neurologiques 67
1.3 Les maladies cardiovasculaires 68
1.4 L'homocystéine et insulino-résistance 74
1.5 Les maladies hépatiques 75
1.5.1 Les NAFLDs (stéato-hépatopathies non-alcooliques) 75
1.5.2 Les AFLDs (stéato-hépatopathies alcooliques) 79
1.5.3 L'hépatocarcinome 80
2 La programmation fœtale 80
2.1 L'hypothèse de Barker 80
2.2 Les donneurs de méthyles et la programmation fœtale 82
2.3 Le syndrome métabolique 83
Partie 4 : La stéato-hépatopathie non-alcoolique (SHNA ou NAFLD) 87
1 L'anatomie, l'histologie et la physiologie du foie 87
1.1 L'anatomie du foie 87
1.2 La structure du foie 88
1.3 La vascularisation du foie 89
1.4 L'histologie du foie 92
1.5 Les grandes fonctions du foie 94
1.5.1 Le stockage et la livraison des nutriments 94
1.5.1.1 Les glucides 94
1.5.1.2 Les protéines 94
1.5.1.3 Les lipides 95
1.5.2 La production et l'excrétion de la bile 97
1.5.3 Le traitement des déchets 98
2 Les caractéristiques de la NAFLD 99
3 L'épidémiologie de la NAFLD 104
4 La pathogenèse de la NAFLD 105
4.1 L'augmentation de la synthèse et de la disponibilité des lipides 105
4.2 La diminution de la sécrétion et du catabolisme des lipides 107
4.3 Le rôle de l'inflammation dans la progression de la NAFLD 108
4.4 Les dysfonctionnements mitochondriaux et le stress oxydant 111
4.4.1 Les anomalies mitochondriales 111
4.4.2 Le stress oxydant 113

4.5 L'insulino-résistance 116
4.6 L'apparition et le développement d'une fibrose 119
4.6.1 La matrice extracellulaire dans le foie normal et le foie fibreux 119
4.6.2 Les cellules fibrogéniques du foie 121
4.6.3 Le rôle des cellules fibrogéniques dans la physiopathologie de la fibrogenèse hépatique 122
4.6.3.1 L'activation et le recrutement 122
4.6.3.2 La prolifération et la survie 123
4.6.3.3 Le remodelage tissulaire et la fibrose 123
4.7 L'implication de l'angiotensine II dans la NAFLD 126
4.7.1 Le rôle de l'angiotensine II dans la stéatose hépatique 127
4.7.1.1 L'angiotensine II et la disponibilité accrue des acides gras libres plasmatiques 127
4.7.1.2 L'angiotensine II et la diminution de l'oxydation des acides gras 128
4.7.1.3 L'angiotensine II et l'augmentation de la lipogenèse de novo 129
4.7.1.4 L'angiotensine II et la résistance à l'insuline 129
4.7.2 Le rôle de l'angiotensine II dans le stress oxydant et l'inflammation 130
4.7.2.1 L'angiotensine II et la production de ROS mitochondriaux 130
4.7.2.2 L'angiotensine II et l'inflammation 132
4.7.3 Le rôle de l'angiotensine II dans la fibrose 132
Objectifs d'étude 135
Etude expérimentale 139
1 Résumé du protocole expérimental 140
2 L'augmentation de la graisse abdominale et du ratio ASAT/ALAT des rats D50 iMDD et signes biochimiques et histologiques de NASH des rats D185 iMDD/HF 141
3 L'apparition dans le groupe iMDD/HF d'une insulino-résistance et de modifications de l'expression de différents gènes impliqués dans la régulation du métabolisme 152
4 La fibrose dans les foies du groupe D185 iMDD/HF est due à une activation de gènes mis en jeu dans l'inflammasome et dans la voie fibrogénique 157
5 L'inflammasome, l'angiotensine II (AGT), le récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1) et la voie de TGFβ sont des activateurs de la voie fibrogénique dans les foies du groupe D185 iMDD/HF 160
Discussion et perspectives 163
Fiches techniques 172
Modèle d'étude 173
Protocole animal 174
Prélèvement des échantillons 181
Absorption bi-photonique à rayons X : méthode DXA 182
Dosages biochimiques 185

Dosage des vitamines B9 et B12 186
Dosage de l'homocystéine et de l'acide méthylmalonique 188
Analyse de molécules adénylées (SAM/SAH) 191
Dosage des triglycérides, du cholestérol total et des acides gras libres 193
Dosage des marqueurs du stress cellulaire (ALAT/ASAT) 195
Dosage du glucose 197
Dosage de l'insuline 198
Calcul du HOMA-IR 200
Dosage de l'angiotensine II 201
Analyses histologiques 203
Traitement des échantillons tissulaires pour l'analyse histologique 204
Réalisation de la coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) 205
Réalisation de la coloration Rouge Sirius 206
Réalisation de la coloration Trichrome de Masson 207
Réalisation de la coloration Red Oil 209
Quantification des protéines 210
Extraction des protéines totales à partir de tissus 211
Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) 213
Western Blotting 214
Déshybridation de membrane après western blotting (stripping) 223
Quantification des ARN 224
Extraction des ARN avec le Kit RNeasy Plus Mini Kit avec élimination d'ADN génomique à partir des tissus 225
Quantification des ARN 227
Analyse qualitative de l'ARN sur gel d'agarose 228
Transcription inverse des ARN (RT) 230
Screening de l'expression des gènes par le « RT² Profiler PCR Array – Rat Fibrosis – Qiagen Kit » 232
Analyses statistiques 234
Références bibliographiques 235

Liste des tableaux

Tableau 1 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) en folates (µg/j) pour la population française 28

Tableau 2 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) en vitamine B12 (µg/j) pour la population française 39

Tableau 3 : Exemples d'association entre les atteintes périnatales et les maladies de l'adulte. 82

Tableau 4 : Composition du régime standard (contrôle)..... 177

Tableau 5 : Composition du régime carencé en donneurs de méthyles (MDD). 179

Tableau 6 : Composition du régime hyper-énergétique (HF)..... 180

Tableau 7 : Composition des gels de concentration et de séparation pour SDS-PAGE Tris/Glycine..... 216

Tableau 8 : Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte. 221

Tableau 9 : Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte. 222

Liste des figures

Figure 1 : La structure chimique des folates. 28
Figure 2 : La structure chimique de l'acide folique et de quelques formes réduites des folates. 29
Figure 3 : Interconversion des folates. 30
Figure 4 : Absorption et distribution des folates dans le foie et les tissus périphériques 31
Figure 5 : Processus de transport des folates à travers la membrane 32
Figure 6 : Cavéole et potocytose. 34
Figure 7 : Représentation schématique de quelques rôles joués par les folates 36
Figure 8 : La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl) et ses différentes formes. 40
Figure 9 : Mécanisme d'absorption de la vitamine B12 42
Figure 10 : Transport et métabolisme de la vitamine B12 43
Figure 11 : Défauts du métabolisme de la cobalamine 46
Figure 12 : Le cycle des folates, le cycle de l'homocystéine (ou méthionine) et la voie de trans-sulfuration 52
Figure 13 : Structure chimique de la méthionine. 54
Figure 14 : Structure chimique de la SAM. 54
Figure 15 : La SAH est un inhibiteur des réactions de méthylation. 55
Figure 16 : Structure chimique de l'homocystéine. 56
Figure 17 : Exemple de conséquences dues à des modifications épigénétiques 58
Figure 18 : Mécanisme de méthylation de l'ADN sur les résidus cytosines par les ADN méthyltransférases 59
Figure 19 : Le nucléosome et les modifications des histones. 62
Figure 20 : Conséquences des modifications épigénétiques sur l'expression des gènes. 65
Figure 21 : Photographies prises au microscope optique de cœurs de ratons de 21 jours dans des conditions de régime contrôle et de carence en donneurs de méthyles. 70
Figure 22 : Photographies prises au microscope électronique de coupes de ventricule gauche de ratons de 21 jours contrôles et carencés en donneurs de méthyles 71
Figure 23 : Les mécanismes moléculaires expliquant le lien entre les modifications épigénétiques et le métabolisme énergétique dans le cœur et le foie. 72
Figure 24 : Analyses histologiques en microscopie électronique et colorations histologiques de foies de ratons de 21 jours soumis à un régime alimentaire standard ou à un régime carencé en donneurs de méthyles 77

Figure 25 : Hypothèse de Barker sur la programmation fœtale.....81
Figure 26 : Les critères permettant de définir le syndrome métabolique.....84
Figure 27 : Schéma de l'anatomie du foie.....87
Figure 28 : Photographie d'une coupe histologique d'un foie de porc 88
Figure 29 : La structure d'un segment d'un lobule hépatique.....89
Figure 30 : Schéma de l'anatomie microscopique du foie.....90
Figure 31 : Schéma comparant les capillaires continus, fenestrés et les sinusoïdes 91
Figure 32 : Les circulations hépatiques artérielle et veineuse.....91
Figure 33 : Schéma d'un lobule hépatique montrant les différentes structures cellulaires du foie 92
Figure 34 : Schéma récapitulatif de la structure d'un lobule hépatique 93
Figure 35 : Le métabolisme du cholestérol dans le foie 96
Figure 36 : Schéma récapitulatif du métabolisme des lipoprotéines 97
Figure 37 : Voies empruntées par la bile de l'hépatocyte jusqu'au canal cholédoque, en passant par la vésicule biliaire 98
Figure 38 : Spectre évolutif des stéato-hépatopathies non-alcooliques.....99
Figure 39 : Les différents types histologiques de stéatose.....101
Figure 40 : Spectre évolutif et histologie comparative des stéato-hépatopathies non-alcooliques 103
Figure 41 : La pathogenèse de la NAFLD : hypothèse «multi-hits» 109
Figure 42 : Altérations de la chaîne respiratoire (CR) mitochondriale dans les maladies métaboliques.....112
Figure 43 : Lien entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la peroxydation lipidique et le développement de lésions hépatiques observées dans la NASH 114
Figure 44 : Les modifications tissulaires liées à la fibrose hépatique.....121
Figure 45 : Cause et conséquences de l'activation des cellules étoilées hépatiques.....122
Figure 46 : Les voies d'activation et de désactivation de la fibrogenèse hépatique 125
Figure 47 : L'angiotensine II entraîne la diminution de la fonction mitochondriale 128
Figure 48 : L'association entre l'inflammation du foie et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produisant l'insulino-résistance et la fibrose 131
Figure 49 : Schéma récapitulatif des facteurs mis en jeu dans les NAFLDs.....134
Figure 50 : Schéma récapitulatif des résultats sur le foie à 21 jours et problématiques du sujet. 138

Figure 51 : Représentation schématique du protocole animal. 141
Figure 52 : Caractéristiques biophysiques des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 145
Figure 53 : Caractéristiques biophysiques des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 146
Figure 54 : Paramètres biochimiques des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 147
Figure 55 : Paramètres biochimiques des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 148
Figure 56 : Paramètres biochimiques des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 149
Figure 57 : Histologie des foies des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 150
Figure 58 : Expression protéique de marqueurs de fibrose hépatique des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 151
Figure 59 : Marqueur de la résistance à l'insuline et expression d'une protéine hépatique impliquée dans le transport du glucose des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 154
Figure 60 : Expression de protéines, impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique, dans le foie des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 155

Figure 61 : Analyse quantitative des transcrits de gènes jouant un rôle dans l'inflammation et dans la voie fibrogénique des foies de rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 158
Figure 62 : Analyse quantitative des transcrits de gènes jouant un rôle dans la voie fibrogénique et le remodelage des tissus des foies de rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 159
Figure 63 : Expression de protéines, impliquées dans l'inflammasome et la voie fibrogénique, dans le foie des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte. 161
Figure 64 : Représentation schématique du protocole animal. 175
Figure 65 : Photographie prise lors de l'examen d'un rat au DXA. 184
Figure 66 : Exemple d'image obtenue après analyse au DXA où les différentes régions nous intéressant ont été délimitées. 184
Figure 67 : Exemple représentatif du contenu des puits d'une PCR array 232

Liste des abréviations

Pour une raison de commodité par rapport aux figures, nous avons choisi de conserver dans le texte les abréviations anglo-saxonnes pour l'âge des rats (D21 pour 21 jours, D50 pour 50 jours et D185 pour 185 jours).

A : Adénine

ABCD4 : ATP-binding cassette (ABC) transporter D4

ACE : Angiotensin I converting enzyme

AdipoR : Adiponectin receptor

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

AdoCbl : Adenosylcobalamine

ADP : Adénosine diphosphate

AFLD : Alcoholic fatty liver diseases

AG : Acide gras

AGL : Acide gras libre

AHA/NHLBI : American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute

Akt : Alpha serine/threonine-protein kinase

ALAT : Alanine aminotransférase

α-SMA : α-smooth muscle actin

AMFE : Association Maladies Foie Enfants

AMPK : Adenosine monophosphate-activated kinase

ANC : Apport nutritionnel conseillé

AngII : Angiotensin II (ou AGT)

AO : Acide obéticholique

AOX : Acyl coenzyme A oxydase

ApoB : Apolipoprotein B

ARB : Angiotensin II receptor blocker

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

ASAT : Aspartate aminotransférase

AT1-2 : Angiotensin II receptor type 1-2

ATP : Adénosine triphosphate

BCA : Acide bicinchoninique

BET : Bromure d'éthidium

BHMT : Bétaïne-homocystéine méthyltransférase

BMP : Bone morphogenetic protein

BSA : Bovine serum albumin

C : Cytosine

$Ca2^+$: Calcium

CAV1 : Caveolin 1

Cbl : Cobalamine

Cbl-IF : Complexe cobalamine-facteur intrinsèque

CBS : Cystathionine β-synthase

Ccl : C-C motif chemokine

CD : Cluster of differentiation

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CHE : Cholestérol estérase

CHO : Cholestérol oxydase

ChREBP : Carbohydrate responsive element binding protein

CM : Chylomicron

CMO : Contenu minéral osseux

CNCbl : Cyanocobalamine

Co : Cobalt

CoA : Coenzyme A

COL1A1: Collagen type I, alpha 1

COL1A2: Collagen type I, alpha 2

CPT : Carnitine palmitoyl transférase

CR : Chaîne respiratoire

$Cu2^+$: Cuivre

CV : Veine centro-lobulaire

Cxcr : Chemokine (C-X-C Motif) Receptor

D21 : Jour 21

D50 : Jour 50

D185 : Jour 185

DAG : Diacylglycérol

DHF : Dihydrofolate

DMB : Diméthylbenzimidazole

DMO : Densité minérale osseuse

DNMT : ADN méthyltransférase

dNTP : Désoxyribonucléotides tri-phosphate

DO : Densité optique

DSVG : Dysfonctionnement systolique du ventricule gauche

dTMP : Désoxythymidylate monophosphate

DTT : Dithiothréitol

dUMP : Désoxyuridilate monophosphate

DXA : Dual energy X-ray Absorptiometry

E20 : 20ème jour embryonnaire

ECL : Electrochemiluminescence (chimioluminescence amplifiée)

Edn : Endothéline

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

EGF : Epidermal growth factor

ERK : Extracellular-signal-regulated kinase

ERR-α : Estrogen related receptor α

ER-α : Estrogen receptor α

FABP : Fatty acid binding protein

FAD : Flavine-adénosine dinucleotide

FAS : Fatty acid synthase

FasL : Fas ligand

FAT : Fatty acid translocase

FATP : Fatty acid transport protein

FGCP : Folylpolyglutamate carboxypeptidase

FID : Fédération Internationale des Diabétiques

FIGLU : Acide formimino glutamique

Fox01: Forkhead box 01

FR : Folate receptor (ou FOLR)

FXR : Farnésoïde X receptor

G : Guanine

G6P-DH : Glucose 6-phosphate déshydrogénase

GCN5 : General control nondepressible 5 (ubiquitous histone acetyltransferase)

GH : γ-glutamyl hydrolase

GK : Glycérol kinase

Glut2 : Glucose transporter 2

GNMT : Glycine N-methyltransferase

GPO : Glycérol phosphate oxydase

H2O2 : Peroxyde d'hydrogène

HAT : Histone acétyltransférase

Hcy : Homocystéine

HDAC : Histone deacetylase

HDL : High density lipoprotein

HDL-C : High density lipoprotein-Cholesterol

HES : Hématoxyline-Eosine-Safran

HF : Régime hyper-énergétique (=high fat)

HIF : Hypoxia Inducible Factor

HK : Hexokinase

HMT : Histone méthyltransférase

HNE : Hydroxynonenal

HNF4-α : Hépatocyte Nuclear Factor 4-α

HOMA-IR : Homeostasis Model for Assessment of Insulin Resistance

HPLC : High-performance liquid chromatography

HSC : Hepatic stellate cell

IDL : Intermediary density lipoprotein

IF : Intrinsic factor

IFN : Interféron

IGF-1 : Insulin-like growth factor-I

IL : Interleukine

iMDD : Carence en donneurs de méthyles initiale

IR : Insulino-résistance

IRS : Insulin receptor substrate

Itga-b : Intégrines a et b

Kinase JNK : c-Jun N-terminal kinase

KO : Knock out

LC/MSMS : Liquid chromatography- Tandem mass spectrometry

LDH : Lactate déshydrogénase

LDL : Low density lipoprotein

LMBD1 : Lysosomal membrane binding D1

LPL : Lipoprotéine lipase

LV : Left ventricle

MADB : Sel disodique

MAT : Méthionine-adénosyl-transférase

MBD : Methyl-CpG sequence binding domain protein

MCD : Méthionine-choline deficiency

MCFA: Medium chain fatty acid

MCM : Méthylmalonyl-CoA mutase

MCP : Monocyte chemoattractant protein

MDA : Malondialdéhyde

MDD : Methyl donor deficiency

MDH : Malate déshydrogénase

MEC : Matrice extracellulaire

MeCbl : Méthylcobalamine

MeCP2 : Methyl CpG binding protein 2

MeTHF : Méthyl-THF

Méthylmalonyl CoA mutase : Méthylmalonyl Coenzyme A mutase

MG : Masse grasse

$Mg2^+$: Magnésium

miR : Micro-RNA

MM : Masse maigre

MMA : Acide méthylmalonique

MMACHC : Methylmalonic aciduria and homocystinuria type C protein

MMADHC : Methylmalonic aciduria and homocystinuria type D protein

MMP : Matrix Metalloprotease

MnSOD : Superoxyde dismutase mitochondriale à manganèse

MS : Méthionine synthase

MS/MS : Tandem mass spectrometry

MSR : Méthionine synthase réductase

MSR1 : Macrophage scavenger receptor 1

mtDNA : ADN mitochondrial

MTHF : Méthylène-THF

MTHFR : Méthylène tétrahydrofolate réductase

MTR : 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase

MTRR : 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase (ou méthionine synthase réductase)

Mut : Méthylmalonyl-CoA mutase

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

N5-MTHF : N5-méthyl tétrahydrofolate

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADP: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease

NASH : Nonalcoholic steato-hepatitis

NFκB : Nuclear factor kappa B

$NH4^+$: Ammoniaque

NO : Nitric oxide

NOX : ROS-generating NADPH oxydase (ou superoxyde NADPH oxydase)

NR2A1 : Nuclear Receptor Subfamily 2, group A, member 1

$O_2^{\cdot -}$: Ion radicalaire superoxyde

OCTN : Organic cation transporter novel

OMS : Organisation mondiale de la santé

$ONOO^-$: Radical péroxynitrique

P450 CYP4A : cytochrome P450 4 A

PABA : Para-aminobenzoic acid

PAI : Plasminogen Activator Inhibitor

PCFT : Proton-coupled folate transporter

PCR : Polymerase chain reaction

PDGF : Platelet derived growth factor

PGC- 1α : Peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activateur-1 α

PHD : Prolyl hydroxylase

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PKC : Protein kinase C

Plat : Plasminogen activator

PLP : Pyridoxal phosphate

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

POD : Peroxydase

PPAR-α : Peroxisome proliferator-activated receptor-α

PPAR-γ : Peroxisome proliferator-activated receptor-γ

PRMT : Protéine arginine méthyltransférase

PT : Triade espace porte

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

PTPB1 : Protein tyrosine phosphatase 1B

PVDF : Polyvinylidène fluoride

RAAS : Renin-angiotensin-aldosterone system

RE : Réticulum endoplasmique

RFC : Reduced folate carrier

RIA : Radioimmunoassay

RIPA : Radioimmunoprecipitation Assay

RNS : Reactive nitrogen species

ROS : Reactive oxygen species

RT : Reverse transcription

RT-qPCR : Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

RV : Right ventricle

RXR : Retinoid X receptor

SAH : S-adénosylhomocystéine

SAHH : S-adénosylhomocystéine hydrolase

SAM : S-adénosylméthionine

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SET : Su(var) enhancer of Zeste and Thrithorax

S-FBP : Folate Binding Proteins Solubles

SHMT : Sérine hydroxyméthyltransférase

SHNA : Stéato-hépatopathie non-alcoolique (ou NAFLD)

siRNA : Small interfering RNA

SIRT1 : Sirtuin -1

SLC : Solute carrier

SOCS : Suppressor of cytokine signalling

SOD : Superoxyde dismutase

SREBP-1c : Sterol regulatory element binding protein-1c

SS : Stéatose simple

Stat 3 : Signal transducer and activator of transcription 3

T : Thymine

TAG : Triacylglycérol

Tampon TBE : Tris, Borate, EDTA

TBST : Tris-Buffered Saline and Tween 20

TC : Transcobalamine

TG : Triglycéride

TGFβ : Transforming growth factor β

Thbs : Thrombospondine

THF : Tétrahydrofolate

TIMP : Tissu Inhibitor of Metalloproteases

TLR : Toll-like receptor

TMDS : Thymidylate synthase

TNFR : Tumor Necrosis Factor α receptor

TNFα : Tumor Necrosis Factor α

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

Vegfa : Vascular endothelial growth factor a

VLDL : Very low density lipoprotein

ZF : Zinc finger transcription factor cDNA

Données bibliographiques

Partie 1: Les facteurs influençant le métabolisme des monocarbones.

1 Les déterminants nutritionnels.

1.1 Les folates (vitamine B9).

1.1.1 Définition.

L'acide folique, nommé aussi acide ptéroylglutamique, est une vitamine hydrosoluble.

La vitamine B9 est présente en majorité dans les végétaux foliacés ; d'où le terme «folique» qui vient du latin *folium* et qui signifie feuille.

Cette vitamine facilite le transfert d'unités mono-carbonées provenant de multiples molécules vers de nombreuses réactions biosynthétiques telles que la synthèse de purines et de pyrimidines ainsi que la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine *(Bottiglieri, 2005)*.

1.1.2 Les apports nutritionnels.

Notre organisme étant incapable de synthétiser les folates, leur apport est donc exclusivement alimentaire.

Les aliments constituant une source importante de folates sont le foie, les légumes à feuilles vertes, les haricots, les germes de blé, les levures, le jaune d'oeuf, le lait et les produits laitiers, les betteraves, le jus d'orange et le pain complet *(Iyer et Tomar, 2009)*. Cependant, la teneur de cette vitamine diminue en cas de cuisson (dépassant 15 min), congélation et mise en conserve.

Les valeurs de l'apport nutritionnel conseillé (ANC) en France varient en fonction du sexe, de l'âge, et de l'état physiologique.

Ces valeurs sont définies dans le tableau 1.

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

Tableau 1 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) en folates (µg/j) pour la population française (d'après *l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 3ème édition, Ed. Tec &Doc*).

1.1.3 La structure chimique.

L'acide folique est composé d'un noyau ptérine, d'un acide para-aminobenzoïque (PABA) et d'une molécule d'acide glutamique ; d'où son nom chimique : l'acide ptéroylglutamique (figure 1).

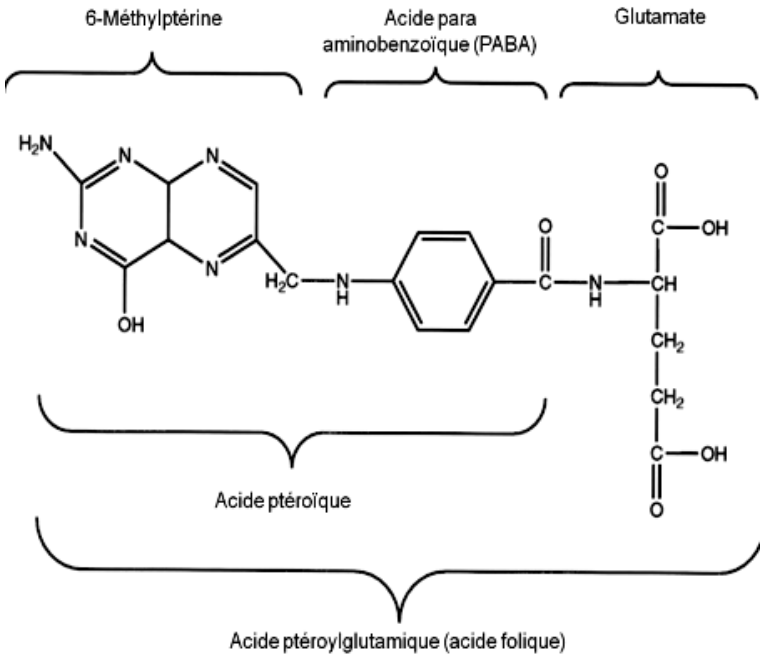


Figure 1 : La structure chimique des folates (modifié d'après *Scott, 1999*).

En général, les folates présents dans l'alimentation sont des ptéroylpolyglutamates car ils contiennent un enchaînement de plusieurs acides glutamiques.

L'acide folique ne correspond pas à la forme physiologiquement active. Les formes actives dans l'organisme sont l'acide dihydrofolique (DHF), l'acide tétrahydrofolique (THF) et ses dérivés méthylés (-CH3) ou formylés (-CHO) pouvant porter des radicaux monocarbonés sur les azotes en position 5 et/ou 10 (figures 2 et 3): N5-formylTHF ; N10-formylTHF ; N5-méthylTHF (N5-MeTHF) ; N5-formiminoTHF ; N5, N10-méthylèneTHF (N5,10-MTHF) et N5, N10-méthénylTHF.

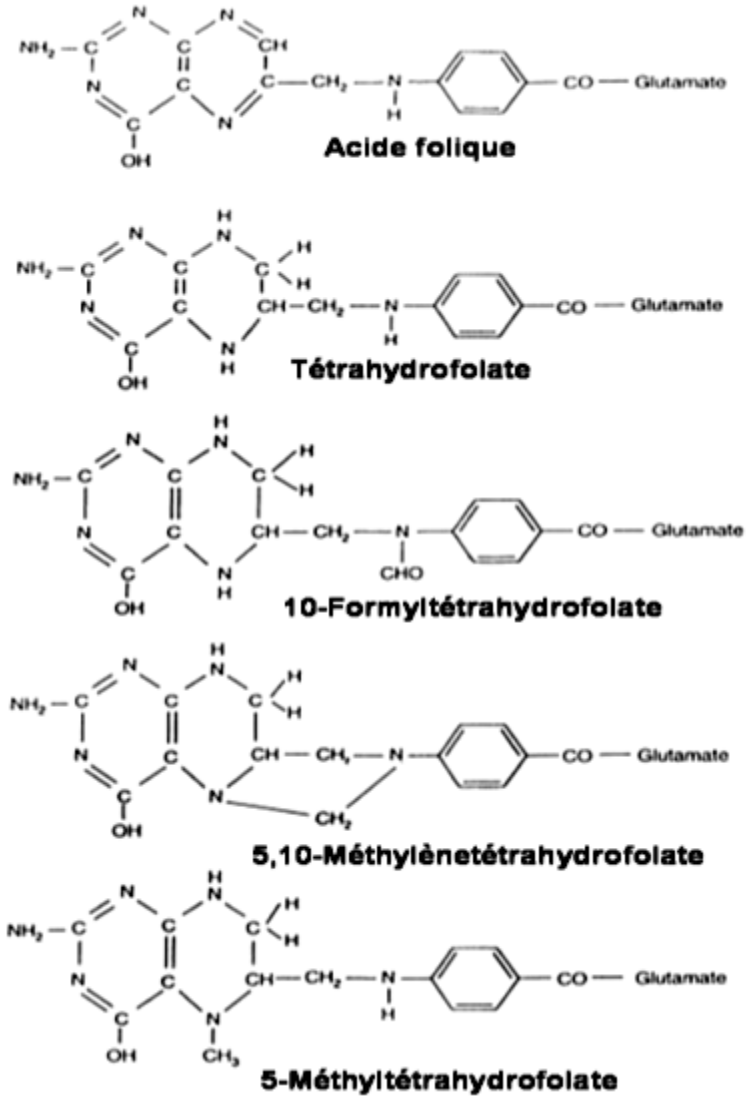


Figure 2 : La structure chimique de l'acide folique et de quelques formes réduites des folates (modifié d'après *Scott, 1999*).

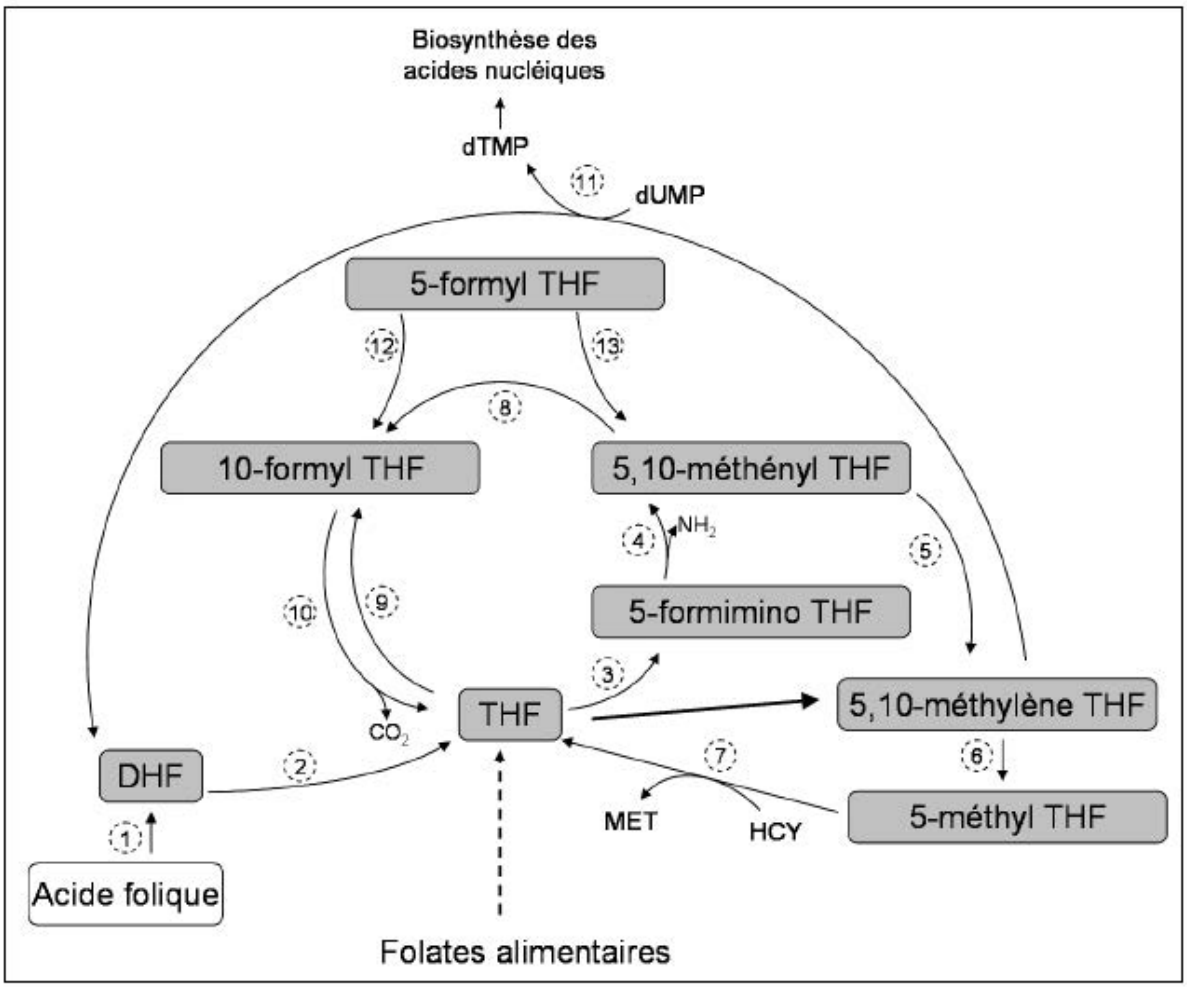


Figure 3 : Interconversion des folates *(d'après Jean-Claude Guilland et Bruno Lequeu. Encyclopédie des vitamines - Du nutriment au médicament. Vol.1).*

(1) et (2) : dihydrofolate réductase, (3): tétrahydrofolate formiminotransférase,

(4) : formiminotétrahydrofolate cyclodéaminase, (5) : 5,10-méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase, (6) : 5,10- méthylènetétrahydrofolate réductase, (7) : méthionine synthase,

(8) : 5,10- méthényltétrahydrofolate cyclohydrolase, (9) : 10-formyl-tétrahydrofolate synthétase,

(10) : 10-formyl-tétrahydrofolate déshydrogénase, (11) : thymidilate synthase,

(12) : formyltétrahydrofolate isomérase, (13) : formyltétrahydrofolate cyclohydrolase.

MET: méthionine; HCY: homocystéine.

De nombreuses réactions métaboliques essentielles font intervenir les folates dans le rôle de co-enzymes en agissant comme accepteur ou donneur d'unités monocarbonées, notamment dans le métabolisme des acides aminés (constituants des protéines) et des acides nucléiques (ADN et ARN) *(Bhaskar, Murthy et al 2011)*. Ils sont donc essentiels à la division cellulaire, la croissance, la formation des cellules sanguines et au fonctionnement optimal de la moelle osseuse *(Lucock, 2000)*.

1.1.4 L'absorption.

Les folates, sous forme de ptéroylpolyglutamates, sont catabolisés en ptéroylmonoglutamates par une enzyme spécifique présente dans la bordure en brosse de l'intestin grêle appelée folylpolyglutamate carboxypeptidase (FGCP) ou γ-glutamyl hydrolase (GH). Cette enzyme a une activité maximale à un pH de 5,5 et en présence du zinc (*Yao et al, 1996*). Les monoglutamates sont ensuite absorbés par le récepteur «proton-coupled folate transporter» (PCFT) au niveau du jéjunum proximal de l'intestin grêle *(Zhao et al, 2009)*. Ils seront ensuite méthylés et réduits en 5-méthylTHF et passeront dans la veine porte grâce à un système de transporteurs spécifiques *(Rosenberg, 1990)*. Le transport des folates peut être plasmatique ou cellulaire (figure 4).

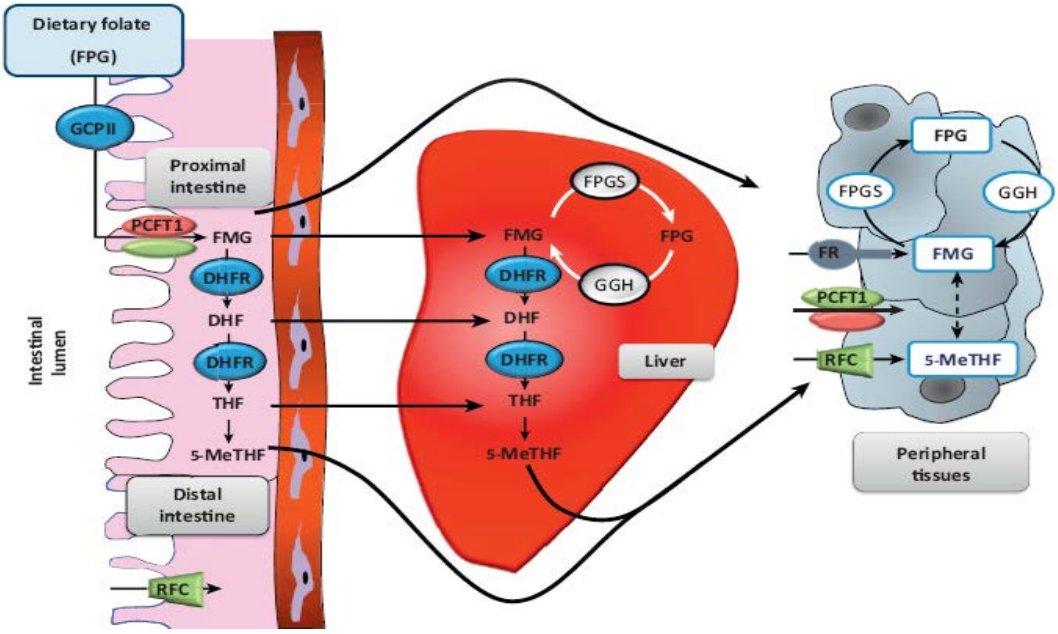


Figure 4: Absorption et distribution des folates dans le foie et les tissus périphériques (d'après *Guéant et al, 2013*).

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

1.1.5 Le transport.

1.1.5.1 Le transport plasmatique.

Les monoglutamates, surtout sous forme de 5-méthylTHF, sont transportés dans le plasma soit sous forme libre soit liés. Ils vont se lier soit à un ligand de faible affinité, principalement l'albumine, qui transporte les folates vers certains tissus comme le placenta et le fœtus, soit à un ligand de haute affinité, le «folate binding proteins solubles» (S-FBP) *(Fernandes-Costa et Metz, 1979)*.Ce dernier transporte les folates vers le foie qui forment une réserve majoritaire de la quantité totale de folates dans l'organisme (50 % du stock de l'organisme).

La concentration en folates est beaucoup plus importante dans les érythrocytes que dans le plasma (> 150 µg/L *vs* > 5 µg/L). La concentration érythrocytaire est un bon indicateur à long terme du statut en folates (*Jean-Claude Guilland et Bruno Lequeu. Encyclopédie des vitamines-Du nutriment au médicament. Vol.1*).

1.1.5.2 Le transport cellulaire.

Trois types de récepteurs peuvent intervenir dans le transport cellulaire des folates (figure 5).

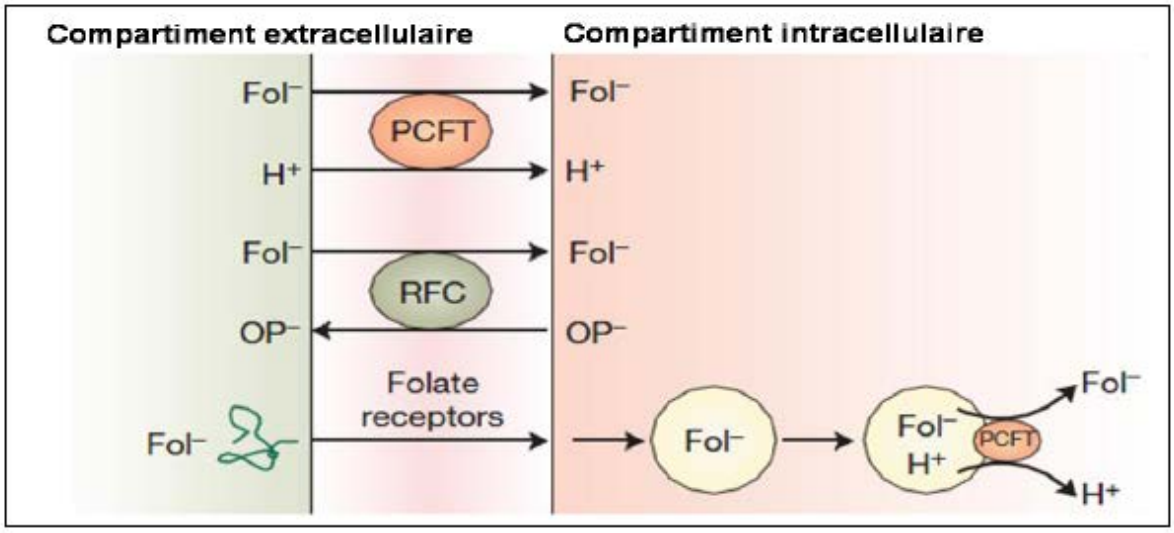


Figure 5 : Processus de transport des folates à travers la membrane (modifié d'après *Zhao et al, 2009*).

- **Reduced folate carrier (RFC) : transporteur des folates réduits :**

Le «reduced folate carrier» (RFC) est un membre de la superfamille des «solute carrier» (SLC) *(Ganapathy et al, 2004)*. C'est un échangeur d'anions qui utilise le gradient transmembranaire

d'ions phosphates (OP^-) pour transporter les folates dans les cellules et ainsi distribuer les folates aux tissus à pH physiologique *(Zhao et al, 2009 ; Sirotnak et Tolner, 1999)* (figure 5).

La spécificité de ce transporteur pour les différents folates varie en fonction du tissu et du pôle de la cellule (apical ou basal).

Ce transporteur possède une faible affinité pour les folates non réduits comme l'acide folique mais une affinité élevée pour les folates réduits ; son substrat prédominant étant le 5-méthylTHF *(Assaraf et Goldman, 1997).*

Même si l'expression de RFC est ubiquitaire, celle-ci reste plus élevée dans les tissus ayant une fonction d'absorption et un rôle dans l'homéostasie des folates (intestin, colon, tubules rénaux, membrane plasmique des hépatocytes, axones, dendrites, rate, plexus choroïde) (*Wang et al, 2001 ; Trippett et al, 2001*).

Il a été montré que des mécanismes épigénétiques régulent l'expression de RFC *(Worm et al, 2001).*

Des études menées sur des souris *rfc -/-* issues de mères supplémentées avec une faible concentration en folates montrent un défaut de l'érythropoïèse et de nombreuses malformations congénitales (tube neural, membres, poumons, cœur et peau) *(Gelineau-van Waes et al, 2008).*

- **Folate receptors (FRs) : récepteurs des folates :**

Les récepteurs «folate receptors» présentent une forte homologie avec la protéine de liaison plasmatique S-FBP.

Ces récepteurs possèdent une plus grande affinité pour l'acide folique et le 5-méthylTHF, mais une plus faible affinité pour les autres folates réduits.

Mais la capacité de liaison des folates aux FRs est diminuée lorsque le pH est inférieur à 5, ou en l'absence d'ions Cl^-, ou bien encore lorsque le stock d'ATP n'est pas régénéré *(Spinella, Brigle et al, 1995).*

Ils ont été mis en évidence chez l'Homme dans le placenta (*Antony et al, 1981*), le cortex, les tubules rénaux (*Selhub et Franklin, 1984*), les glandes salivaires submandibulaires, les tubules proximaux du rein, l'épithélium des trompes de Fallope, l'utérus, l'épididyme, les cellules des acini du sein, les glandes bronchiques, les alvéoles pulmonaires (pneumocytes de type I et II), le trophoblaste, et un peu plus faiblement dans l'ovaire (cellules de la granulosa), le pancréas, le canal déférent et la thyroïde.

Ces récepteurs (FRα et FRβ) lient les folates avec une forte affinité et effectuent leur internalisation dans la cellule *via* un mécanisme d'endocytose. Une fois dans le cytoplasme, la vésicule d'endocytose est acidifiée, les folates sont ainsi libérés de leurs récepteurs et exportés grâce à PCFT (*Zhao et al, 2009)* (figure 5).

Le modèle proposé est le suivant : les folates (5-méthylTHF) se lient aux récepteurs orientés vers l'extérieur de la cellule puis le récepteur est internalisé *via* les cavéoles (invaginations de la membrane riches en cavéoline-1). A l'intérieur de ces cavéoles, un environnement acide est établi sous l'action d'une pompe à protons. Les folates se dissocient ensuite de leurs récepteurs et une fois dans le cytoplasme, le 5-méthylTHF est modifié de manière covalente par ajout de plusieurs résidus d'acide glutamique (polyglutamates). Les récepteurs sont alors recyclés dans les cavéoles pour un nouveau cycle (*Rothberg et al, 1990 a et b ; Kamen et al, 1988*). Plus récemment, il a été suggéré que PCFT pouvait être à l'origine du transport des folates de l'intérieur de la vésicule d'endocytose acidifiée vers le cytoplasme (*Andrews, 2007 ; Qiu et al, 2006*).

Ce processus d'endocytose, par l'intermédiaire de cavéoles, est appelé potocytose (*Anderson et al, 1992*) (figure 6).

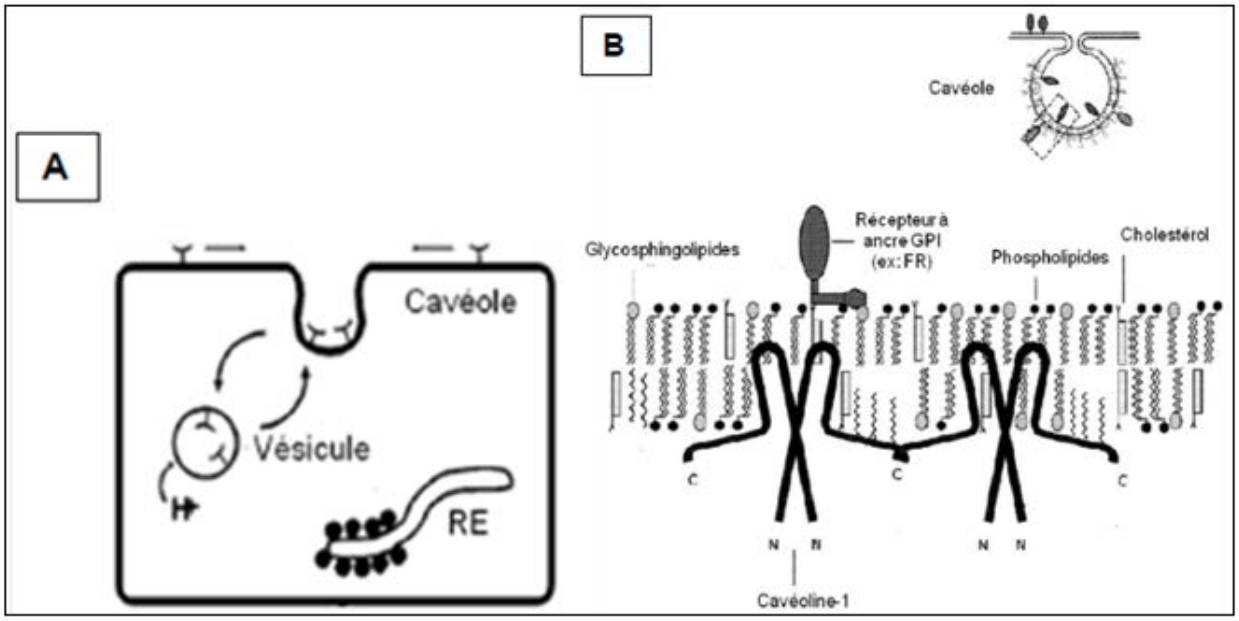


Figure 6 : Cavéole et potocytose. A : Le mécanisme de potocytose (modifié d'après *Bender et al, 2002*). B : Organisation d'une cavéole et des microdomaines associés (modifié d'après *Anderson, 1998*).

L'expression de FRα est régulée par des mécanismes épigénétiques (méthylation du promoteur) (*Hsueh et Dolnick, 1994*).

L'invalidation du gène *Folbp1* chez la souris (correspondant à *FOLR1* chez l'Homme et codant pour FRα) est létale pour l'embryon à E10 qui présente des malformations (non fermeture du tube neural). Si une supplémentation des mères *Folbp1* +/- est administrée avec de l'acide folique, ceci inverse le phénotype des embryons *Folbp1* -/-. Le KO du gène *Folbp2* (correspondant à *FOLR2* chez l'Homme et codant pour FRβ) n'est pas létal ; le développement embryonnaire se déroulant normalement. Ce récepteur lie les folates de manière plus faible (*Piedrahita et al, 1999*).

- **Proton-coupled folate transporter (PCFT) : transporteur de folates couplés à des protons (symport):**

Il appartient également à la superfamille des «solute carrier» et fonctionne à pH acide (*Zhao et al, 2009*). Il transporte les folates et a une forte affinité pour l'acide folique.
C'est une protéine membranaire exprimée majoritairement dans la membrane apicale des cellules intestinales de la bordure en brosse (au niveau du jéjunum proximal), le rein, le foie, le placenta, la rétine et le cerveau (*Qiu, Jansen et al, 2006 ; Zhao et al, 2009*).
Le transporteur PCFT exporte les folates du milieu acidifié de l'endosome (après entrée des folates dans la cellule par potocytose) vers le cytoplasme des cellules ainsi que vers le liquide céphalo-rachidien *(Zhao, Diop-Bove et al, 2011)* (figure 5).

1.1.6 Le stockage et l'élimination.

L'organe principal de stockage des folates est le foie, le reste étant essentiellement contenu dans les érythrocytes et pouvant être récupéré lors de leur destruction *(Herbert, 1962).* Le foie contient la moitié des réserves en folates de l'organisme (10 à 15mg), principalement sous forme 5-méthylTHF, après avoir capté 10 à 20 % des folates absorbés au premier passage tandis que le reste sera distribué aux autres tissus (à renouvellement rapide), essentiellement la moelle osseuse et les épithéliums (buccal, digestif et vaginal).
Une proportion importante des folates intracellulaires est associée à la mitochondrie.
Il existe un cycle entérohépatique des folates où le 5-méthylTHF libéré par le foie par voie biliaire est réabsorbé dans l'intestin grêle. Ce cycle entérohépatique permettrait de redistribuer les folates aux tissus.

Les réserves en folates permettent de subvenir aux besoins de l'organisme pendant quatre mois en moyenne *(Herbert, 1962).* Les folates en excès sont éliminés dans les selles et les urines.

1.1.7 Les rôles.

Les folates jouent différents rôles importants (figure 7) :

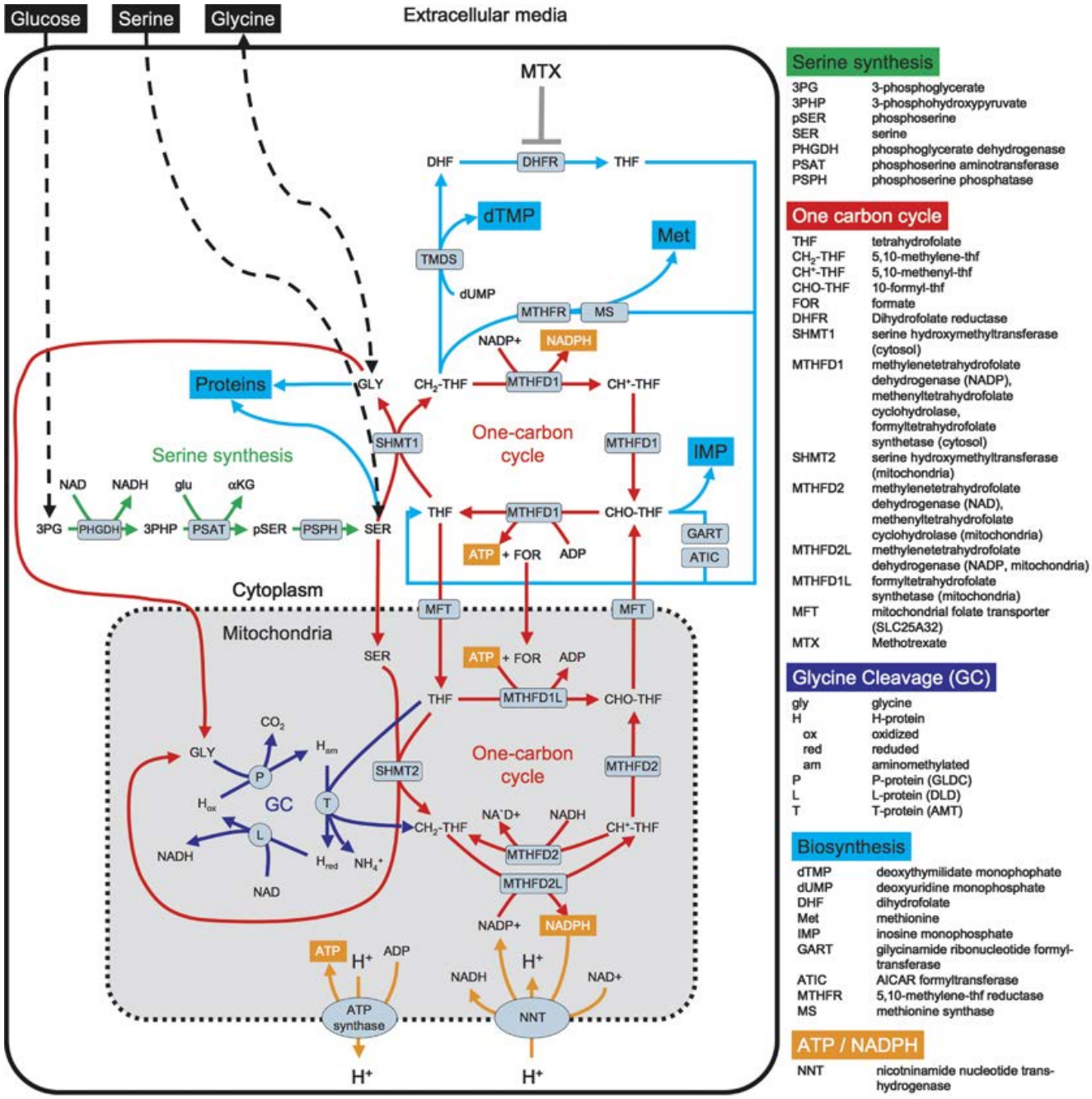


Figure 7 : Représentation schématique de quelques rôles joués par les folates (modifié d'après *Tedeschi, 2013*). *Représentation montrant la synthèse de sérine (en vert), le cycle des monocarbones (en rouge) et le clivage de la glycine (en bleu) et leurs interactions avec d'autres voies de signalisation.*

1.1.7.1 La synthèse des acides aminés.

La conversion de l'histidine en acide glutamique passe par un intermédiaire métabolique, l'acide formimino glutamique (FIGLU). Cette réaction s'effectue dans le cytoplasme et nécessite le THF qui sera lui-même transformé en N5,10-méthénylTHF.

1.1.7.2 La synthèse des acides nucléiques.

- La synthèse des bases pyrimidiques :

  La synthèse de la thymine, base pyrimidique indispensable à la synthèse d'ADN, passe par la méthylation du désoxyuridilate monophosphate (dUMP) en désoxythymidylate monophosphate (dTMP) dans le cytoplasme. Cette réaction est catalysée par la thymidylate synthase (TMDS), ayant le N5,10-méthylèneTHF comme co-enzyme (*Carreras et Santi, 1995*) (figure 7).

- La synthèse des bases puriques :

  Les 2ème et 8ème atomes de carbone des noyaux purine sont formés par le N5,10-méthylèneTHF et le N10-formylTHF dans le cytoplasme.

1.1.7.3 La conversion sérine-glycine.

Cette conversion démarre avec la sérine et le THF pour synthétiser la glycine et le N5,10-méthylèneTHF.

L'enzyme catalysant cette réaction est la sérine hydroxyméthyltransférase 1 (SHMT1) dans le cytoplasme et SHMT2 dans la mitochondrie *(Tedeschi, 2013)* (figure 7).

1.1.7.4 La synthèse de la méthionine.

Le N5-méthylTHF, donneur de groupement méthyle, sera transféré sur l'homocystéine par transméthylation à l'aide de la vitamine B12 qui est le cofacteur de la méthionine synthase (MS). La réaction entraîne la régénération du THF et la formation de méthionine (figure 7).

1.1.8 La carence en folates.

La carence en folates est répandue dans de nombreuses régions du monde que ce soit dans les pays industrialisés ou non industrialisés. Pour pallier ce problème, aux Etats-Unis, il a été mis en place une supplémentation systématique des céréales et des farines alimentaires en acide folique.

La carence d'apport alimentaire reste la principale cause de carence (10 % de la population mondiale). Elle résulte de la malnutrition, des régimes amaigrissants, de la cuisson excessive des aliments ou de l'inadéquation entre les apports et les besoins (accrus au cours de la grossesse, de la lactation et en cas de cancer). Les autres causes d'une carence en folates sont une malabsorption, un métabolisme anormal et l'alcoolisme.

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

Cette carence est associée à une accumulation de l'homocystéine, celle-ci étant toxique pour notre organisme. La reméthylation de l'homocystéine étant bloquée, cette dernière s'accumule et provoque une hyperhomocystéinémie.

1.2 La cobalamine (vitamine B12).

1.2.1 Définition.

La vitamine B12, également appelée cobalamine (Cbl), est une vitamine hydrosoluble qui doit son nom à l'atome de Cobalt qu'elle contient. Cette vitamine est indispensable pour le maintien des fonctions hématologiques et neurologiques.

La vitamine B12 est un nutriment essentiel jouant le rôle de coenzyme dans deux processus métaboliques : la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA par la méthylmalonyl-CoA mutase (MCM) au niveau de la mitochondrie et la reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase (MS) *(Rafnsson, Saravanan et al, 2011)* au niveau du cytoplasme des cellules *(Rosenberg, 2008).*

1.2.2 Les apports nutritionnels.

Notre organisme ne pouvant synthétiser la vitamine B12, son apport alimentaire est donc indispensable. Elle est principalement présente dans les aliments d'origine animale comme les abats (foie, rognons), la viande, les œufs, les poissons, les crustacés et les laitages.

Les besoins en vitamine B12 sont variables en fonction des périodes de la vie, mais les apports conseillés restent toujours très faibles (environ 2 µg par jour chez l'adulte). Le tableau 2 récapitule les apports nutritionnels conseillés en vitamine B12.

La concentration plasmatique est comprise entre 160-800 pg/mL. Les valeurs normales doivent être supérieures à 200 pg/mL (150 pmol/L) chez un sujet sain.

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

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

1.2.3 La structure chimique.

La vitamine B12 est une molécule organométallique volumineuse. Sa structure chimique est proche de l'hème mais l'atome central de Fer y est remplacé par un atome de Cobalt. L'atome de Cobalt peut être tri-, bi- ou monovalent, en fonction du ligand fixé à cet atome, ce qui correspond à 3 niveaux d'oxydation. La cobalamine étant alors nommée Cob(I)alamine, Cob(II)alamine et Cob(III)alamine.

La cobalamine appartient à une famille de composés complexes appelés corrinoïdes, tous composés d'un noyau central appelé corrine. La cobalamine est constituée de trois parties (figure 8) : le noyau corrine (un noyau tétrapyrrolique central : un atome de Cobalt avec 4 noyaux pyrroles) et deux chaînes axiales, l'une en position α (figure 8 en bleu) avec un groupement pseudo-nucléotidique diméthylbenzimidazole (DMB) et l'autre en position β (figure 8 en jaune) avec un radical anionique variable R.

La nature du radical en position β détermine le nom du composé vitaminique : -CN pour cyanocobalamine (forme circulante), -OH pour hydroxocobalamine (forme circulante), $-CH_3$ pour méthylcobalamine (cofacteur de réactions de reméthylation, en particulier dans la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine) et -5'd Ado pour 5'-désoxyadénosylcobalamine (cofacteur de la méthylmalonyl CoA mutase).

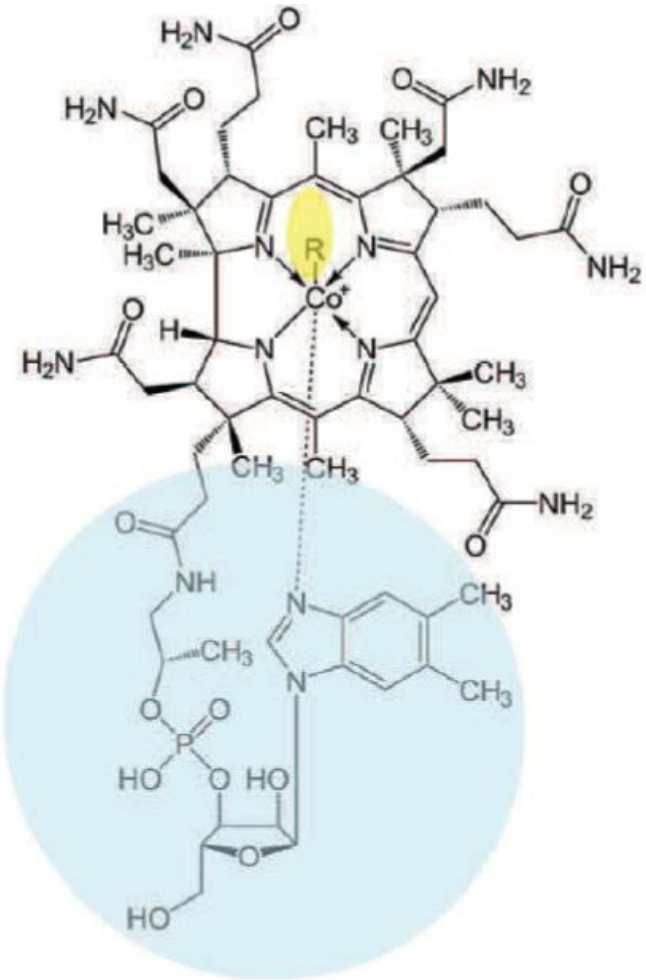


Figure 8 : La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl) et ses différentes formes.

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

- R = - CN cyanocobalamine

- R = - CH3 méthylcobalamine

- R = -OH hydroxocobalamine

- R = -5'd Ado 5'-désoxyadenosylcobalamine

1.2.4 L'absorption.

Le processus d'absorption de la cobalamine (Cbl) est complexe car il nécessite l'intervention de plusieurs composés capables de lier la vitamine B12 (figure 9).

Lors de l'ingestion des aliments, la majorité des Cbl reste attachée aux protéines alimentaires, principalement sous forme d'AdoCbl et de MeCbl.

Au niveau de la bouche, les Cbl libres sont prises en charge par les haptocorrines salivaires (protéines P). Puis les sécrétions chlorohydropepsiques de l'estomac libèrent les Cbl encore liées à des protéines alimentaires. En raison du pH acide du suc gastrique, la Cbl va préférentiellement se lier à l'haptocorrine (protéine R) et arrive dans le duodénum sous cette forme *(Allen et al, 1978)*. A ce niveau, les haptocorrines vont être dégradées par des enzymes pancréatiques exocrines *(Russell-Jones et Alpers, 1999).* De nouveau libre et dans un environnement plus alcalin, la Cbl va pouvoir former un complexe avec le facteur intrinsèque (IF) *(Nicolas et Guéant, 1994)*. L'IF est une glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales de l'estomac, qui va permettre à la cobalamine de franchir la barrière intestinale au niveau de l'iléon *(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 de son catabolisme par les bactéries intestinales *(Combs, 1998)*. Le complexe IF-vitamine B12 va se fixer sur un récepteur spécifique appelé cubam situé sur la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'iléon. Ce récepteur est composé de cubiline associée à la protéine amnionless *(Guéant et al, 1988 ; Ganesan, Khadra et al, 2002)*. Le récepteur cubam nécessite la présence de Ca^{2+} ainsi qu'un pH supérieur à 5,4 pour se lier au complexe IF-vitamine B12. Une fois internalisé, le complexe va traverser la paroi du tube digestif par endocytose et l'IF sera dégradé dans l'entérocyte, libérant ainsi la vitamine B12. Pour pénétrer dans le cytoplasme, la vitamine B12 traverse la membrane lysosomale par un processus impliquant les protéines LMBD1 et ABCD4 (ATP-binding cassette (ABC) transporter D4), localisées au niveau de la membrane du lysosome *(Coelho et al, 2012 ; Rutsch et al, 2009)*.

Après un délai de 3 à 5 heures, la vitamine B12 apparaît dans le sang sous une forme liée à une protéine : soit l'haptocorrine (en majorité) *(Fernandes-Costa et Metz, 1982),* soit la transcobalamine II (TCII) (10 à 30 % de la cobalamine se lie à cette protéine) *(Nicolas et Guéant, 1994 ; Seetharam et al, 1999 ; Seetharam et Li, 2000).*

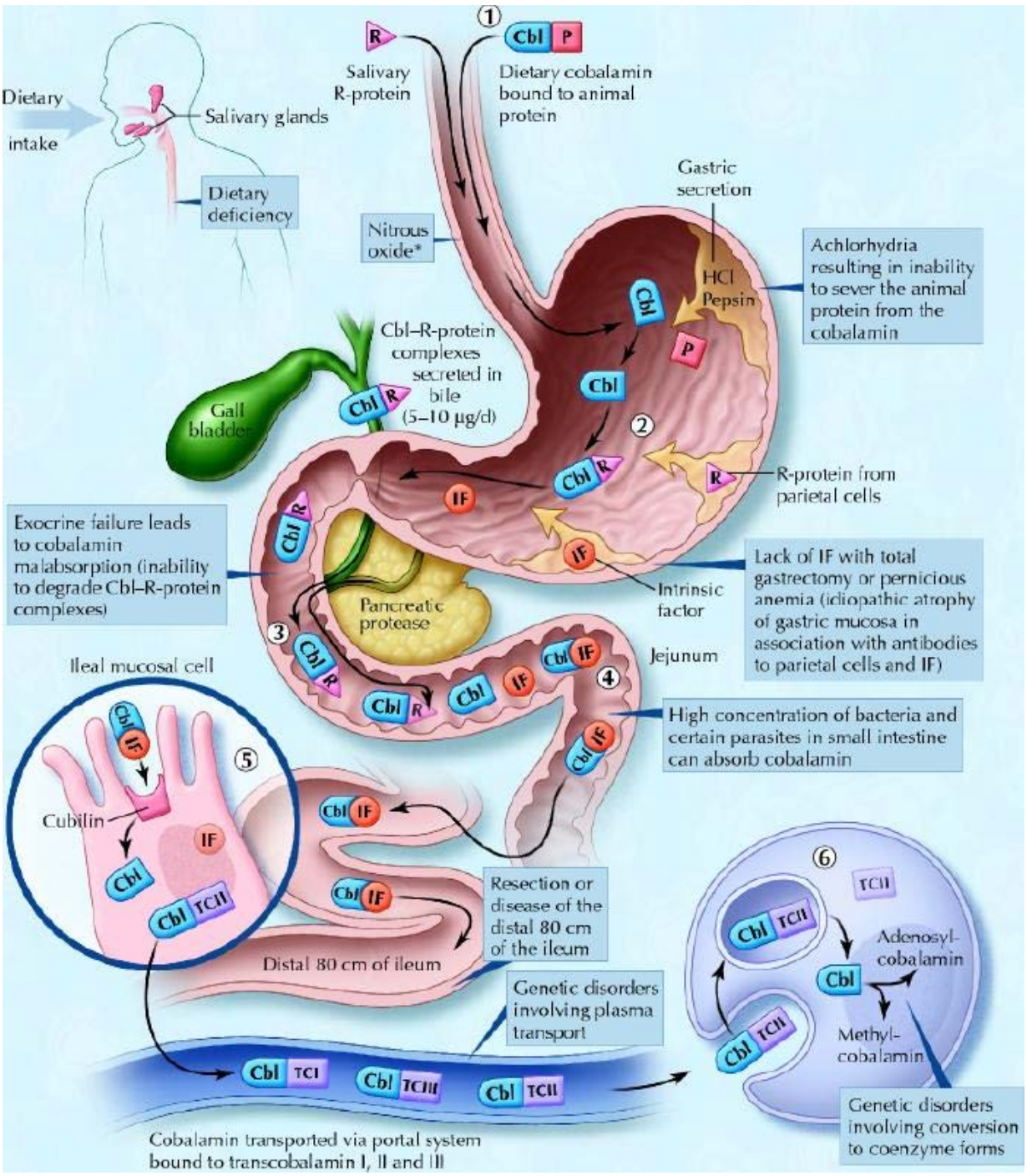


Figure 9 : Mécanisme d'absorption de la vitamine B12

(modifié d'après *Andrès et al, 2004*). *(1) Les cobalamines (Cbl) alimentaires issues de l'alimentation d'origine animale se dirigent vers l'estomac sous forme liée aux protéines animales (P). (2) Sous l'action de la pepsine et de l'acide chlorhydrique (HCl) dans l'estomac, les Cbl sont libérées de leur support protéique et se lient aux protéines R (R). (3) Dans le duodénum, les Cbl alimentaires liées aux protéines R et les complexes Cbl-protéine R sécrétés dans la bile sont soumis à l'action des enzymes pancréatiques qui dégradent les protéines R et permettent la libération des Cbl. (4) Les Cbl se lient au facteur intrinsèque (IF). (5) Dans l'iléon distal, les complexes Cbl-IF se fixent à la cubiline et la cobalamine libérée se lie à la transcobalamine II*

(TCII) nécessaire au transport via le système porte. (6) Dans les cellules périphériques, les complexes Cbl-TCII sont internalisés par endocytose et la Cbl libérée dans le compartiment lysosomal est transformée en méthylcobalamine (MeCbl) et adénosylcobalamine (AdoCbl), deux formes coenzymes actives.

1.2.5 Le transport.

1.2.5.1 Le transport plasmatique.

Dans le sang, la vitamine B12 est toujours liée à des protéines de transport spécifiques, la transcobalamine II ou l'haptocorrine, qui assurent son internalisation dans les cellules grâce à un phénomène d'endocytose qui s'opère au niveau de récepteurs membranaires *(Seetharam et al, 1999)*. La transcobalamine II assure majoritairement le transport de la Cbl des entérocytes vers les cellules périphériques possédant un récepteur spécifique à leur surface (figure 10). L'interaction de la transcobalamine II avec son récepteur est calcium-dépendante.

Chez l'Homme, ce récepteur est présent dans le rein, l'intestin, le foie et le placenta ; tandis que chez le rat, le récepteur est détecté dans le rein, l'intestin et plus faiblement dans le foie (*Bose et al, 1995a ; Bose et al, 1995b*).

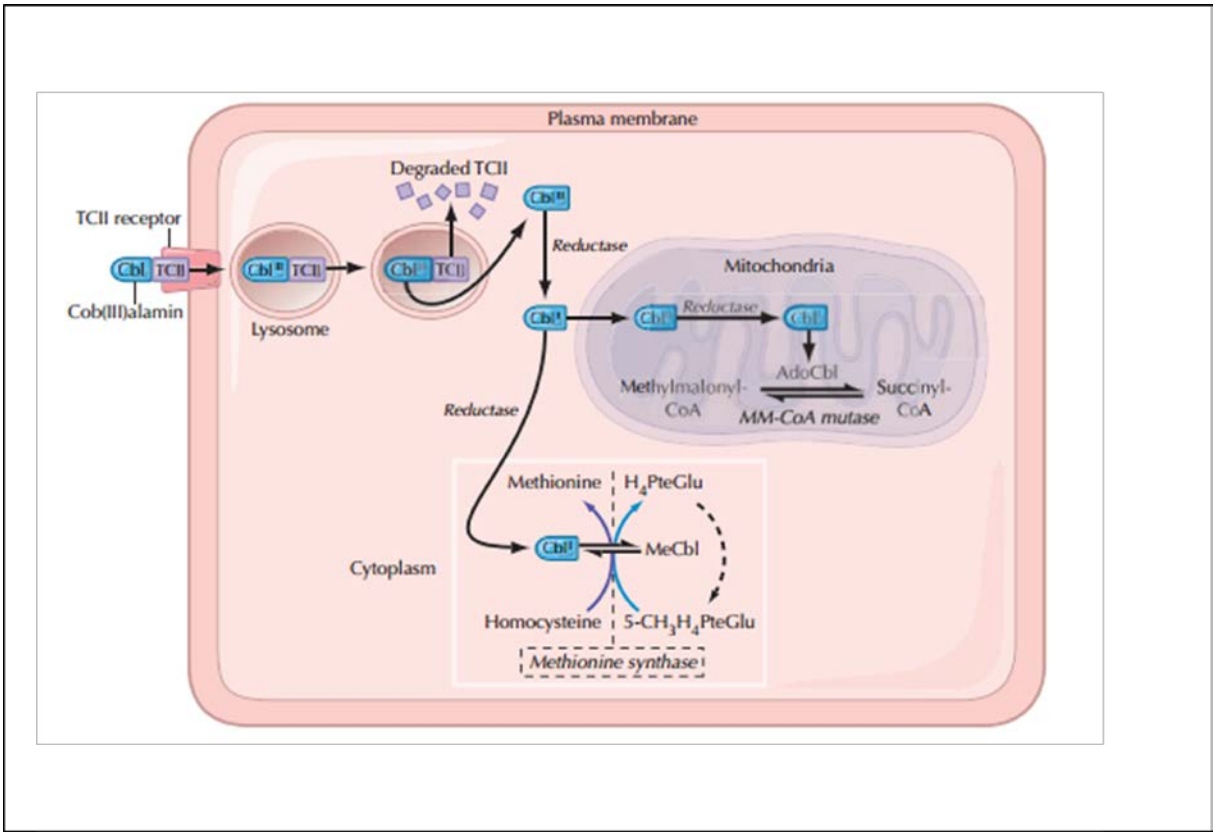


Figure 10 : Transport et métabolisme de la vitamine B12 (modifié d'après *Andrès et al, 2004*).

1.2.5.2 Le transport cellulaire.

La Cbl liée à l'haptocorrine est absorbée par les hépatocytes *via* le récepteur de l'asialoglycoprotéine. Cette Cbl n'est donc pas disponible aux autres cellules.

La transcobalamine II fixe la cobalamine avec une grande affinité et la délivre aux différents tisus. Le complexe Cbl/TCII, circulant dans le sang, se fixe par sa partie protéique à un récepteur d'endocytose membranaire spécifique (figure 10) *(Andrès et al, 2004)*. Il s'agit du récepteur mégalin pour les reins et du récepteur CD320 pour le foie et les autres tissus *(Cho et al, 2008 ; Jiang et al, 2013 ; Nielsen et al, 2012).*

Le complexe Cbl/TCII est ensuite internalisé dans la cellule par un mécanisme d'endocytose.

La transcobalamine II est dissociée de la Cbl puis dégradée dans le lysosome et la vitamine B12 est ainsi libérée *(Lildballe et al, 2012)*. Elle quitte alors les lysosomes et est transformée en coenzymes actifs :

- La méthylcobalamine (MeCbl), coenzyme de la méthionine synthase, au niveau du cytoplasme.

- L'adénosylcobalamine (AdoCbl), coenzyme de la méthylmalonyl –CoA mutase, au niveau de la mitochondrie.

Un déficit en transcobalamine II entraîne un déficit en cobalamine cellulaire grave, ceci montrant bien le rôle primordial de la transcobalamine II dans le transport de la cobalamine.

1.2.6 Le stockage et l'élimination.

Nous mettons en réserve en moyenne 3 à 4 mg de cobalamine. Les principaux lieux de stockage sont le foie, le cœur et la rate. Le foie humain contient près de la moitié de ce stock. Il existe un cycle entérohépatique de la cobalamine de l'ordre de 1,3 µg par jour environ (*El Kholty et al, 1991*).

Physiologiquement, les besoins en vitamine B12 sont largement assurés (environ 3 à 4 µg/jour) car les apports quotidiens sont importants lors d'une alimentation normale. De plus, les réserves étant de 3 à 4 mg, une carence en vitamine B12 ne se manifestera qu'après plusieurs années (3 à 4 ans) si l'apport de cette vitamine cesse brutalement (suite à une gastrectomie par exemple).

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

1.2.7 Les rôles.

Après son transport par le lysosome dans le cytoplasme, la cobalamine intracellulaire est liée à deux enzymes intracellulaires, la méthionine synthase (dans le cytoplasme) et la méthylmalonyl-CoA mutase (dans la mitochondrie) *(Andrès et al, 2004)* (figure 10).

1.2.7.1 La conversion combinée de l'homocystéine en méthionine et du méthyltétrahydrofolate en tétrahydrofolate.

Au niveau cytoplasmique, la méthionine synthase (MS) transfert le groupement méthyle du N5-méthylTHF sur la Cbl pour donner la MeCbl et le tétrahydrofolate (THF). Puis la MeCbl transfert son groupement méthyle sur l'homocystéine pour former la méthionine *(Kapadia, 1995).*

Une carence en vitamine B12 entraînera une accumulation du N5-méthylTHF et une diminution du THF, ce qui aura pour conséquence une réduction de la synthèse de thymidylate (nécessaire à la synthèse d'ADN).

1.2.7.2 La conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA.

Dans la mitochondrie, la cobalamine adénosyltransférase en coordination avec une cobalamine réductase (encore non identifiée), catalyse la réduction de la cobalamine en AdoCbl. L'AdoCbl, un coenzyme de la méthylmalonyl-CoA mutase *(Yamanishi et al, 2005)*, va ensuite intervenir dans la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA *(Krautler, 2005)* qui intègre le cycle de Krebs et participe à la néoglucogenèse.

Un déficit en vitamine B12 entraînera le blocage de la méthylmalonyl-CoA mutase et aura pour conséquence une acidurie méthylmalonique *(Grutzner et al, 2013)*.

1.2.8 Les perturbations du métabolisme de la vitamine B12.

Plusieurs perturbations du métabolisme intracellulaire de la cobalamine peuvent avoir lieu, à différentes étapes, suite à des mutations de gènes jouant un rôle dans le transport ou le métabolisme de la vitamine B12 : CblA, CblB, CblC, CblD, CblE, CblF (ou CblJ), CblG, CblH et Mut. Selon le gène touché, il y aura soit défaut de synthèse d'AdoCbl, soit de MeCbl, ou alors des deux simultanément (figure 11).

- Les défauts génétiques affectant uniquement la synthèse d'AdoCbl : mutation des gènes *MMAA* (CblA) et *MMAB* (CblB). Ces mutations provoquent une acidurie méthylmalonique *(Coelho et al, 2008).* En effet, la protéine MMAA est nécessaire à la

stabilité et à l'activité de la protéine MMAB, une cobalamine adénosyltransférase qui se lie à la vitamine B12.

- Les défauts génétiques affectant uniquement la synthèse de MeCbl : mutation des gènes *MTR* (CblG) et *MTRR* (CblE). Ces deux mutations provoquent une homocystéinurie *(Coelho et al, 2008)*. La méthionine synthase réductase (MTRR) est impliquée dans la régénération de la méthionine synthase oxydée (MS).

- Les défauts génétiques affectant la synthèse d'AdoCbl et de MeCbl : mutations des gènes *LMBRD1* (CblF), *ABCD4* (CblF), *MMACHC* (CblC) et *MMADHC* (CblD). Ces troubles entraînent une acidurie méthylmalonique combinée à une homocystéinurie *(Coelho et al, 2008 ; Watkins et Rosenblatt 1989 ; Watkins et Rosenblatt, 2011)*. Les défauts de *LMBRD1* et *d'ABCD4* inhibent le passage de la vitamine B12 du lysosome vers le cytoplasme *(Kim et al, 2012)*. La protéine MMACHC se lie à la CNCbl, clive le groupement -CN et forme le complexe MMACHC-cob(II)alamine *(Kim et al, 2008)*. La protéine MMADHC, quant à elle, interagit avec MMACHC.

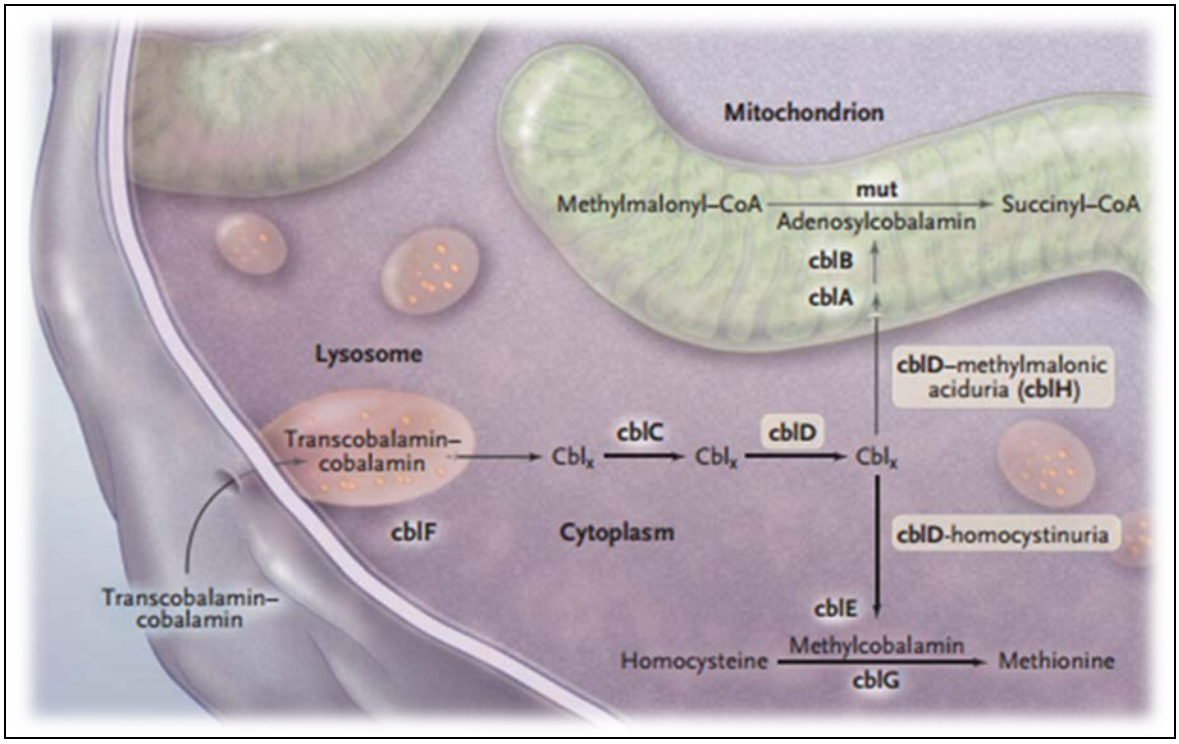


Figure 11 : Défauts du métabolisme de la cobalamine (d'après *Coelho et al, 2008*).

À ce jour, neuf défauts de la voie du métabolisme de la cobalamine ont été décrits. La cobalamine liée à la transcobalamine pénètre dans la cellule par endocytose. Le transport de la B12 libérée du lysosome dans le cytoplasme, est défectueux chez les patients atteints du défaut CblF. Les étapes dans le cytosol après la libération lysosomale sont encore mal connues (CblC et

CblD) et la forme exacte de la cobalamine à ce stade n'est pas claire (indiqué par "CBL_X"). Dans le cytoplasme, l'homocystéine est transformée en méthionine sous l'action de la méthionine synthase utilisant la méthylcobalamine (CblE, CblG). Après son transport dans la mitochondrie, la cobalamine est convertie en adénosylcobalamine, cofacteur pour la méthylmalonyl-CoA mutase (mut), par la cobalamine adénosyl-transférase (CblB). Le rôle exact de la protéine associée au groupe CblA n'est pas clair. La protéine CblD constitue un point de liaison entre les voies cytosoliques et mitochondriales.

1.2.9 La carence en vitamine B12.

La carence en vitamine B12 a une prévalence d'environ 20 % dans les pays industrialisés et d'environ 50 % dans les pays non industrialisés (*Masalha et al, 2002*).

1.2.9.1 Les causes de la carence en vitamine B12.

1.2.9.1.1 Le déficit d'apport.

Les carences d'apport en vitamine B12 sont assez rares chez l'adulte dans les pays industrialisés, en bonne santé et ayant une alimentation variée, mais plus fréquentes chez les sujets végétaliens car cette vitamine est majoritairement apportée par l'alimentation d'origine animale.

1.2.9.1.2 Le défaut d'absorption.

Différentes maladies digestives et une malabsorption de la vitamine B12 peuvent également être à l'origine d'une carence. Les gastrectomies totales ou partielles, la pullulation bactérienne de l'intestin grêle (ou syndrome de l'anse borgne), des maladies provoquées par des parasites intestinaux (la bothriocéphalose par exemple), des maladies chroniques intestinales (maladie de Crohn, colite ulcéreuse, maladie coeliaque) *(Akbulut et al, 2010 ; Headstrom et al, 2008; Murray, 1999)*, la pancréatite chronique, les lymphomes, la tuberculose intestinale et l'anémie pernicieuse de Biermer en sont des exemples (*Guéant et Namour, 2004*).

L'anémie de Biermer, une maladie auto-immune, est caractérisée par la destruction de la muqueuse gastrique par des auto-anticorps dirigés contre les cellules pariétales gastriques produisant l'IF (62 % des patients) et des auto-anticorps contre l'IF (87,5 % des patients) ; empêchant la liaison de la vitamine B12 à l'IF et entraînant ainsi l'incapacité d'absorption de la vitamine B12 alimentaire *(Stabler et Allen, 2004)*.

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

1.2.9.2 Les conséquences de la carence en vitamine B12.

Une carence en vitamine B12 entraîne une diminution de l'activité des enzymes Cbl-dépendantes : la méthionine synthase et la méthylmalonyl-CoA mutase *(Allen et al, 1990)*. Ceci aura pour conséquence une accumulation de l'acide méthylmalonique (MMA) et de l'Hcy dans le sang et les urines.

Parmi les conséquences cliniques on retrouve des pathologies neurologiques (polynévrites sensitives, ataxie, sclérose combinée de la moelle), hématologiques (macrocytose, anémie mégaloblastique) et digestives (glossite de Hunter).

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

1.2.9.3 La perturbation de l'interaction entre la vitamine B12 et les folates.

Une carence en vitamine B12 ne perturbera pas seulement le cycle de la méthionine mais aussi le cycle des folates.

La carence en vitamine B12 provoque une diminution de la méthionine et donc de la SAM. Sachant que la SAM est un effecteur allostérique de la méthylène-THF réductase (MTHFR), la diminution de la SAM induira une baisse de l'inactivation de la MTHFR. Le N5,10-MTHF sera alors converti en N5-MeTHF en abondance. Il y aura donc une accumulation de N5-MeTHF, un métabolite inactif et une diminution de N5,10-MTHF, un métabolite actif, ce qui inhibe la conversion de dUMP en dTMP et rendra ainsi l'ADN plus instable.

La carence en vitamine B12 empêche également la réaction de régénération des folates qui se trouvent alors piégés sous la forme de N5-MeTHF. En effet, au cours du cycle des folates, le N5-MeTHF devait être régénéré en N5,10-MTHF actif, par un transfert du groupement méthyle vers la cobalamine lors de la synthèse de MeCbl, catalysée par la méthionine synthase.

2 Les autres facteurs influençant le métabolisme des monocarbones.

2.1 Les facteurs propres à chaque individu.

L'âge et le sexe sont des facteurs qui influencent le cycle des monocarbones et peuvent ainsi contribuer à une hyperhomocystéinémie modérée. En effet, les personnes âgées ont des taux d'Hcy plus élevés *(Selhub, 1993)*. Les hommes aussi ont une concentration d'Hcy plus élevée

que les femmes due aux hormones sexuelles et à une plus grande masse musculaire *(Andersson, 1992 ; Jacobsen, 1994 ; De Bree, 2002).*

2.2 Les facteurs liés au mode de vie (ou comportementaux) et les facteurs liés à un état pathologique.

La consommation régulière de nicotine, de café, et d'alcool favoriserait l'apparition d'une hyperhomocystéinémie *(De Bree, 2002)*. Chez les sujets dépendants à l'alcool, une hyperhomocystéinémie a été décrite pour la première fois en 1993 (*Hultberg et al, 1993*). L'alcool provoque une altération du métabolisme des monocarbones *via* une réduction de l'activité de la MS et une modification de la voie de reméthylation (*Barak et Beckenhauer, 1988*; *Kenyon et al, 1998*). Chez le rat, la consommation chronique d'alcool provoque également une baisse de l'hydroxocobalamine et de l'activité de la MS (*Waly et al, 2011*).

Certains médicaments peuvent également interagir avec le métabolisme des monocarbones en provoquant des carences et une hyperhomocystéinémie : le phénobarbital, des contraceptifs oraux (*Shojania et al, 1968*), des antibiotiques (Bactrim®), des anti-diabétiques (sulfamides) et des médicaments anti-folates comme le méthotrexate (inhibiteur de la dihydrofolate réductase) (*Jolivet et al, 1987*).

Plusieurs pathologies comme l'insuffisance rénale, l'hypothyroïdie, les maladies inflammatoires intestinales, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, le diabète de type 2, les maladies lymphoprolifératives et certains cancers (sein, ovaire, pancréas) peuvent augmenter les taux d'Hcy *(De Bree, 2002)*.

2.3 Les facteurs environnementaux.

L'environnement peut également induire des modifications du métabolisme des monocarbones.

En effet, une exposition trop importante au plomb (pollution) entraînerait une hyper-homocystéinémie *(Iqbal, 2012)*.

Il a déjà été démontré également qu'une exposition à la fumonisine B1, une mycotoxine alimentaire contaminant les céréales, combinée à un régime carencé en donneurs de méthyles, cause une augmentation de la concentration d'Hcy plasmatique. La carence en donneurs de méthyles et la fumonisine agissent en synergie et altèrent les marques sélectives de l'assemblage de l'hétérochromatine, fournissant ainsi un mécanisme qui peut contribuer à l'instabilité génétique *(Pellanda, 2012)*.

D'autres mycotoxines sont capables d'interférer avec le métabolisme des monocarbones : l'aflatoxine (*Viogt et al, 1981*), l'ochratoxine et le déoxinivalénol (*Hunder et al, 1991*).

2.4 Les facteurs génétiques.

Toutes mutations pouvant affecter l'expression des enzymes qui interviennent dans le métabolisme des monocarbones, peuvent induire une hyperhomocystéinémie. Il s'agit principalement du polymorphisme des enzymes MTHFR, MS, MSR et TC (MTHFR 677T C→T, MTHFR 1298 A→C, MTR 2756 A→G, MTRR 66 A→G et TCN2 776 C→G).

2.4.1 Le polymorphisme de MTHFR.

Une soixantaine de polymorphismes ont été décrits pour ce gène. Les plus étudiés sont cités ci-dessous :

- La substitution de la cytosine en thymidine en position 677 (677 C→T) provoque un remplacement de la valine en alanine, dans le domaine catalytique de l'enzyme (*Selhub, 1999 ; Martin et al, 2006*), induisant une diminution de l'activité de MTHFR *(Bailey et Gregory, 1999)*. Ce polymorphisme a été décrit comme un facteur de risque des maladies cardiovasculaires, des néoplasies colorectales, des défauts de fermeture du tube neural et des complications de grossesse (*Meyer et al, 2004*).

- La substitution de l'adénine en cytosine en position 1298 (1298 A→C) entraînant le remplacement du glutamate par l'alanine est une mutation ponctuelle du domaine régulateur de l'enzyme.

2.4.2 Le polymorphisme de MTR.

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

2.4.3 Le polymorphisme de MTRR.

La substitution d'une adénosine en guanosine en position 66 (66 A→G) et le remplacement d'une isoleucine en méthionine (*Wilson et al, 1999*). Cette modification touche le site de

fixation de la flavine mononucléotide nécessaire à la réduction de la vitamine B12 (*Laraqui et al, 2007*).

2.4.4 Le polymorphisme de TCN2.

La substitution de la cytosine en guanosine en position 776 (776 C→G) provoque le remplacement d'une arginine par une proline. Cette mutation induit une diminution de la concentration plasmatique en transcobalamine ainsi qu'une augmentation de la concentration en Hcy *(Namour et al, 2001)*.

Partie 2: Le métabolisme des monocarbones et mécanismes épigénétiques.

1 Le métabolisme des monocarbones et cycles associés.

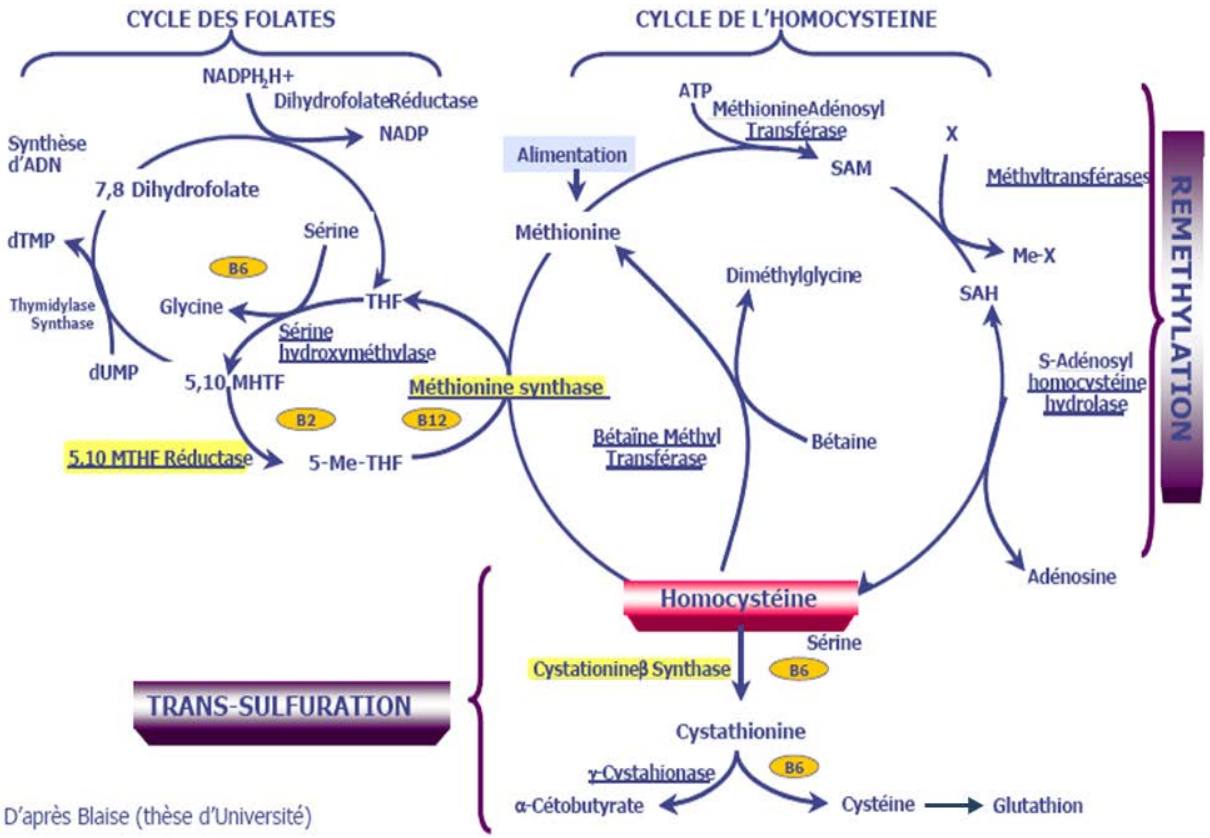


Figure 12 : Le cycle des folates, le cycle de l'homocystéine (ou méthionine) et la voie de trans-sulfuration (détaillés ci-après) (tiré de *Blaise, thèse d'université*).

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

La méthionine synthase (MS, MTR, E.C.2.1.1.13), ayant la méthylcobalamine comme cofacteur, catalyse la méthylation de l'homocystéine pour former la méthionine et le tétrahydrofolate. Le groupement méthyle provient du méthyl-tétrahydrofolate dont la synthèse est catalysée par la méthylène tétra-hydrofolate réductase (MTHFR).Une fois la méthionine formée, la méthionine-adénosyl-transférase (MAT, E.C.2.5.1.6) catalyse la synthèse de S-adénosyl-méthionine (SAM) en utilisant l'ATP. Le transfert de groupements méthyles, catalysé par des méthyltransférases, induit la formation de la S-adénosyl-homocystéine *(SAH). La SAM est également un inhibiteur*

allostérique de MTHFR, empêchant ainsi la reméthylation de l'homocystéine par une diminution de la synthèse de méthyl-tétrahydrofolate. La SAH formée sera convertie en homocystéine et en adénosine par la S-adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH, E.C.3.3.1.1). C'est la seule réaction réversible parmi toutes les réactions chimiques impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine. Elle est plus en faveur de la synthèse de SAH que de la synthèse de l'homocystéine. En plus de la MS, il existe une autre enzyme nommée la bétaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT, E.C.2.1.1.5) capable de reméthyler l'homocystéine en méthionine. Cette dernière utilise la bétaïne (provenant de l'alimentation) comme donneur de groupements méthyles. Chez l'Homme, la BHMT n'est exprimée qu'au niveau du foie et du rein et est donc moins importante que la MS.

1.1 Le cycle des folates (figure 12).

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

Le groupement méthyle du N5-MeTHF est transféré à l'homocystéine pour devenir le tétrahydrofolate (THF). Le THF est transformé en N5,10-MTHF par la sérine hydroxyméthylase ayant la vitamine B6 (le pyridoxal phosphate ou PLP) comme coenzyme et la sérine, qui sera transformée en glycine, comme donneur de méthyle. Le N5,10-MTHF donne ensuite le 7,8-dihydrofolate (7,8-DHF) grâce à la thymidylate synthase, ce qui permet également la synthèse de dTMP à partir de dUMP. La dihydrofolate réductase régénère le THF à partir du 7,8-dihydrofolate et de NADPH, H^+.

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

1.2.1 La méthionine.

La méthionine (figure 13) est un acide aminé essentiel qui joue un rôle dans la synthèse des protéines. Elle possède une fonction thioéther ($-SCH_3$).

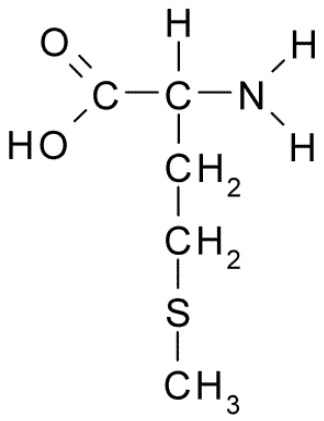


Figure 13 : Structure chimique de la méthionine.

Le groupement méthyle lié à l'atome de Soufre peut être transféré. En effet, la méthionine adénosyltransférase (MAT) transfert un groupe adénosyl à la méthionine (à partir de l'ATP) pour former la S-adénosyl-méthionine (SAM) (figure 14). Tous les organismes possèdent une ou deux des trois isoformes de la MAT : MATI, MATII et MATIII *(Chamberlin et al, 2000)*.

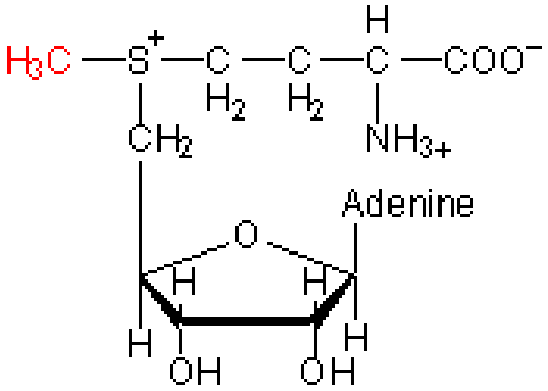


Figure 14 : Structure chimique de la SAM.

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

1.2.2.1 La SAM.

La SAM (ou S-adénosyl-méthionine) est le donneur universel de groupements méthyles. Elle est libérée dans le cytosol de la cellule. Durant la réaction de transméthylation, catalysée par une méthyltransférase, la SAM donne son groupement méthyle à une grande variété de molécules acceptrices (protéines, lipides, ADN, etc..) formant ainsi la SAH (S-adénosyl-

homocystéine) (figure 12). Dans le foie, 50 % des apports quotidiens en méthionine sont convertis en SAM et 85 % de réactions de méthylation y ont lieu *(Mudd et Poole, 1975)*. La SAM est également un inhibiteur allostérique de MTHFR, empêchant ainsi la reméthylation de l'homocystéine par une diminution de la synthèse de méthyl-tétrahydrofolate.

1.2.2.2 La SAH.

La SAH (ou S-adénosyl-homocystéine) est ensuite hydrolysée par la SAH-hydrolase (SAHH) pour former l'homocystéine (Hcy) et l'adénosine. C'est la seule réaction réversible parmi toutes les réactions chimiques impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine. Il faut noter que la SAH est un puissant inhibiteur compétitif des réactions de méthylation (figure 15). Un métabolisme rapide de l'adénosine et de l'Hcy est nécessaire pour empêcher l'accumulation de SAH.

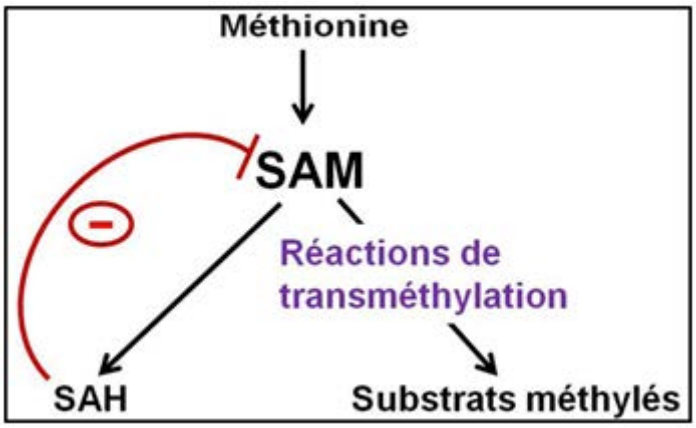


Figure 15 : La SAH est un inhibiteur des réactions de méthylation.

1.2.2.3 Le rapport SAM/SAH.

Ce rapport est un indicateur de la capacité de méthylation de la cellule. Plusieurs études ont montré que la diminution de SAM et l'augmentation de SAH dans le foie de rats recevant un régime pauvre en méthionine, choline, folates et vitamine B12 induisent des méthylations anormales impliquées dans la formation de cancers *(Poirier et al, 1977 ; Shivapurkar et Poirier, 1983)*.

1.2.3 L'homocystéine (Hcy).

L'Hcy est un acide aminé soufré formé à partir de la méthionine (figure 16). Il n'intervient pas dans la synthèse protéique.

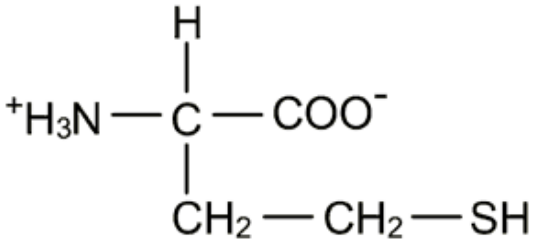


Figure 16 : Structure chimique de l'homocystéine.

Différentes études ont montré que l'Hcy est toxique pour la cellule *(Boldyrev, 2009 ; Jakubowski, 2004)*. L'hyperhomocystéinémie est connue pour provoquer un stress oxydant *(Hoffman, 2011).*

L'élimination de l'Hcy est assurée par deux voies :

- **La voie de la méthylation** aboutissant à la synthèse de la méthionine, puis de la SAM *via* la méthionine synthase (figure 12).
- **La voie de la trans-sulfuration** formant la cystathionine (détaillée dans le paragraphe suivant, figure 12).

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

1.3 La voie de trans-sulfuration.

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

Cette voie consiste en une condensation entre l'Hcy et la sérine formant la cystathionine, sous l'action de la cystathionine β-synthase (CBS). Ensuite, la cystathionine est hydrolysée en cystéine et en α-cétobutyrate par la γ-cystathionase (figure 12). Ces deux dernières enzymes sont dépendantes du pyridoxal 5'- phosphate (PLP), la forme active de la vitamine B6.
Sachant que la cystéine formée donnera le glutathion (régulateur intracellulaire du statut redox), la voie de la trans-sulfuration est surtout active dans les tissus nécessitant une forte concentration de glutathion (comme les neurones) *(Dringen et Hamprecht, 1999)*.

2 Les modifications épigénétiques.

Les modifications épigénétiques peuvent être définies comme étant des changements de l'expression des gènes, réversibles et héritables lors de la mitose et/ou de la méiose, sans changement de la séquence nucléotidique. Elles comprennent notamment la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. D'autres mécanismes existent comme le remodelage de la chromatine, l'interférence à l'ARN et le système polycomb-trithorax (*Waterland et Michels, 2007*).
La mémoire épigénétique est établie en trois étapes, la première consiste en des combinaisons transitoires de facteurs de transcription qui initient le profil d'expression spatio-temporel des gènes cibles, la deuxième est une étape de transition dans laquelle les facteurs de transcription disparaissent et la mémoire épigénétique est établie. La dernière étape est l'étape de maintenance pour garder les modifications épigénétiques à travers les divisions cellulaires successives, cette étape est réalisée par le système polycomb/trithorax.
Le génome humain se présente sous la forme d'une double hélice d'ADN dont la taille à l'état déroulé est de deux mètres. Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN génomique est compacté avec les histones sous forme de chromatine.
Les histones, que l'on retrouve uniquement chez les eucaryotes, sont les protéines les plus abondantes de la chromatine. Elles possèdent une masse moléculaire comprise entre 10 et 24 kDa. Elles sont très basiques et riches en résidus lysine et arginine.
Des modifications réversibles au niveau de l'ADN et/ou des histones sont nécessaires afin de rendre la chromatine accessible et faciliter son ouverture. Ainsi la chromatine se trouvera soit sous forme d'euchromatine correspondant à une configuration plus relâchée et ainsi accessible à la machinerie de la transcription, soit sous forme d'hétérochromatine associée à un haut

degré de compaction et à une forte répression de la transcription (*Sawan et Herceg, 2010 ; Vandermeers et al, 2008*) (figure 17).

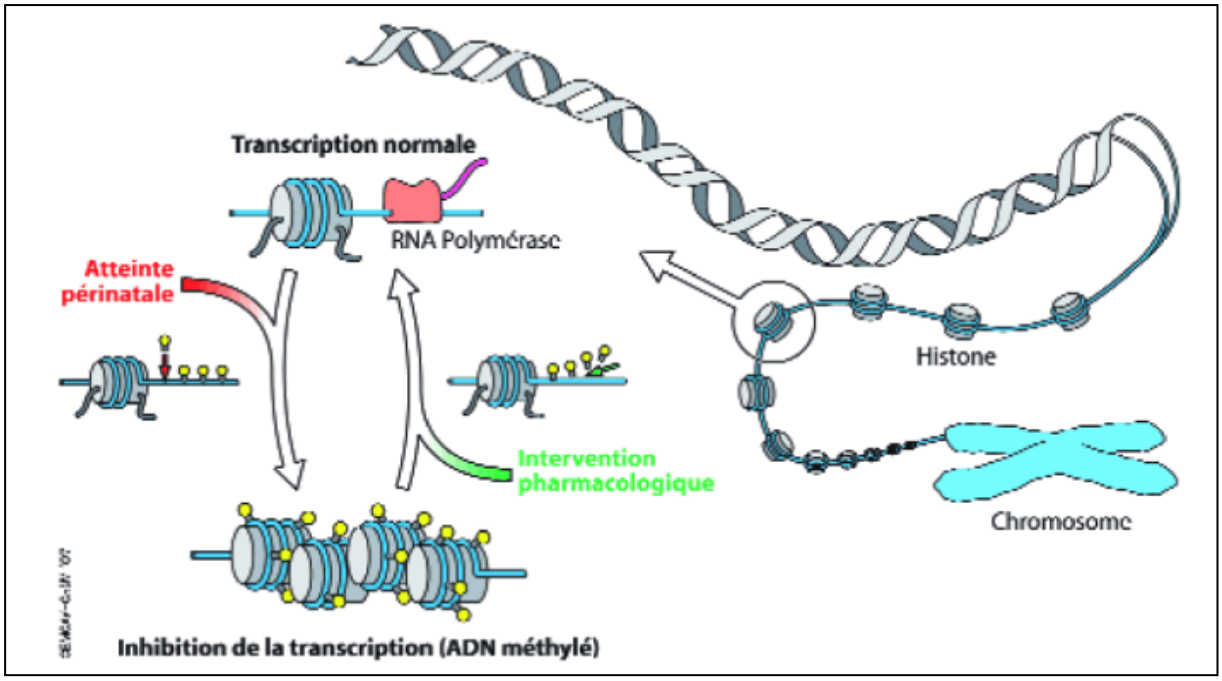


Figure 17 : Exemple de conséquences dues à des modifications épigénétiques (tiré de *Bloch et al, 2007*). *Une atteinte périnatale entraîne l'ajout de groupements méthyles (jaune) au brin d'ADN (bleu) et une condensation de la chromatine. Cela induit le passage d'une configuration où la transcription de l'ARNm (rose) par l'ARN polymérase est possible (euchromatine), à une configuration où la transcription est réprimée (hétérochromatine). Ces modifications peuvent être inversées par un traitement pharmacologique.*

2.1 La méthylation de l'ADN.

La méthylation de l'ADN fait partie des modifications post-réplicatives. Il s'agit du mécanisme épigénétique le mieux caractérisé. La méthylation s'effectue sur les cytosines des dinucléotides cytosine-guanine souvent présents dans les îlots CpG. Les groupements méthyles, provenant de la SAM, sont transférés sur la position N5 des cytosines par toute une famille d'ADN méthyltransférases (DNMTs) *(Robertson, 2001 ; Jair et al, 2006)* (figure 18).

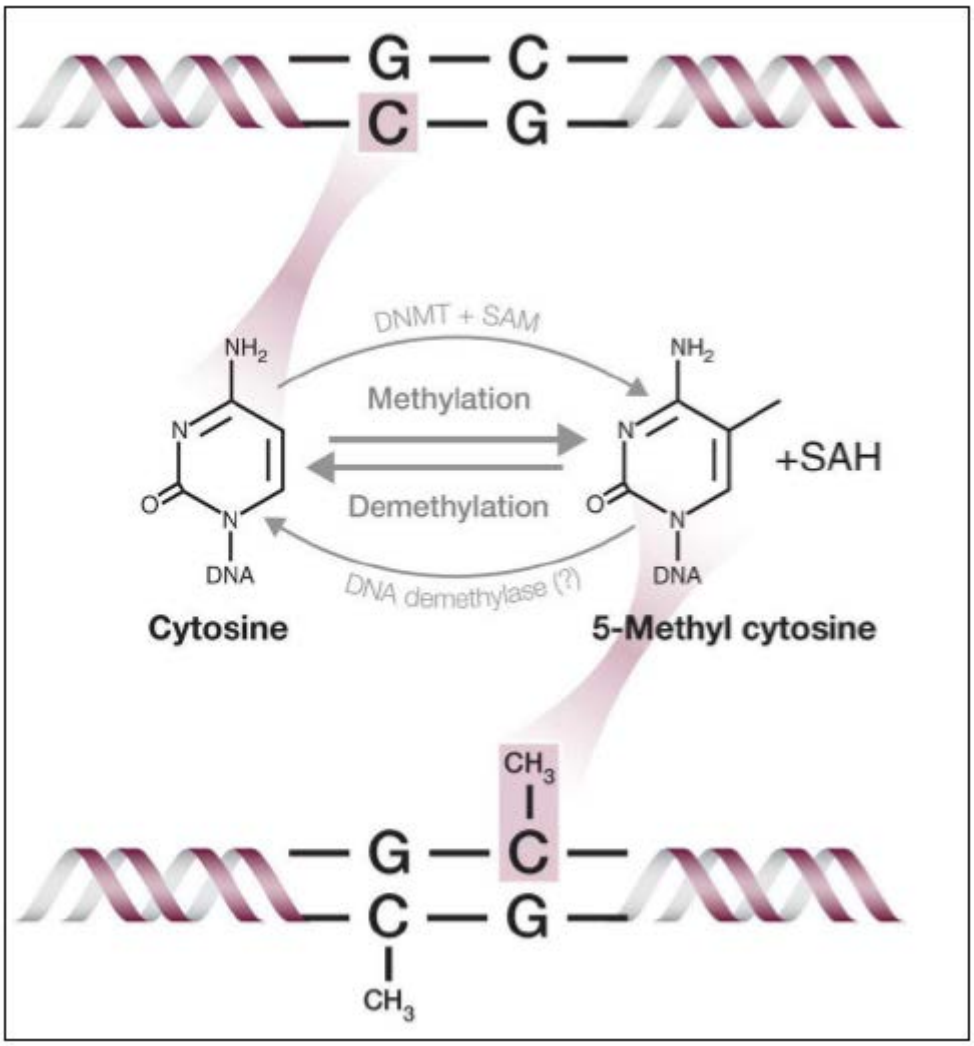


Figure 18 : Mécanisme de méthylation de l'ADN sur les résidus cytosines par les ADN méthyltransférases (DNMTs) (modifié d'après *May, DNA methylation : Fingerprints of the (epi)genome, www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2153*).

Les DNMTs utilisent la S-adénosyl-méthionine (SAM) comme donneur de groupements méthyles. Il en résulte la formation de N5- méthylcytosine et de S-adénosyl-homocystéine (SAH)

Les ADN méthyltransférases sont classées en plusieurs catégories : DNMT1, DNMT2, DNMT3A et DNMT3B. DNMT2 n'a pas de domaine catalytique *(Robertson, 2001)* et est impliquée dans la méthylation des ARNt *(Pfeifer et Rauch, 2009)*.

La méthylation des îlots CpG régule l'expression des gènes en affectant la liaison de protéines régulatrices ou en recrutant des complexes répresseurs (*Waterland et Michels, 2007*). Dans la plupart des espèces, 3 à 5 % des cytosines sont méthylées.

D'une manière générale, un taux faible de méthylations favorisera l'expression des gènes tandis qu'un taux plus élevé de méthylations correspondra à une inhibition de l'expression des gènes (mise sous silence) (*Holliday et Grigg, 1993*) (figure 17). Une étude a montré que les facteurs de

transcription se lient moins efficacement à l'ADN quand celui-ci est méthylé. Un mécanisme alternatif stipule que des protéines se fixent aux promoteurs méthylés en lieu et place des facteurs transcriptionnels, empêchant ainsi l'activation des gènes.

La méthylation de l'ADN est une modification covalente, héritable et réversible ; c'est une réaction importante dans plusieurs processus biologiques. Elle est essentielle au développement normal et est associée à un certain nombre de processus clés, dont l'empreinte génomique, l'inactivation du chromosome X, la suppression d'éléments répétitifs et la cancérogenèse *(Jair et al, 2006 ; Herceg et Vaissière, 2011)*.

Les profils de méthylation de l'ADN varient en fonction des tissus et évoluent lors du développement. Chez les Mammifères, la régulation épigénétique est très active en cas de fonctionnement cellulaire normal, à partir de la conception jusqu'au vieillissement et la mort.

Les cellules cancéreuses néoplasiques (prolifération cellulaire excessive) sont caractérisées par une hypométhylation globale.

Il y a encore quelques années, la méthylation des cytosines semblait être réservée exclusivement aux îlots CpG, en raison de leur symétrie intrinsèque qui facilite la transmission de cette marque épigénétique par divisions cellulaires *(Schübeler, 2015)*. Cependant, les îlots CpG ne sont pas les seuls sites pouvant être méthylés. Initialement découverts dans les cellules embryonnaires et pluripotentes *(Ziller et al, 2011 ; Lister et al, 2013 ; Tognini et al, 2015)*, des taux élevés de méthylation de cytosines ne faisant pas partie des îlots CpG, nommés mCH (où H représente l'adénine A, la thymine T ou la cytosine C) ont ensuite été trouvés dans les génomes de souris adulte et du cerveau humain *(Xie et al, 2012 ; Varley et al, 2013)* et, plus récemment, dans presque tous les tissus humains *(Schultz et al, 2015)*.

Des résultats récents suggèrent que, dans les cellules différenciées, la méthylation mCH a la même fonction répressive sur l'expression des gènes que la méthylation sur les îlots CpG *(Lister et al, 2013 ; Guo et al, 2014 ; Schultz et al, 2015)* ; cette action répressive ne pouvant pas encore être généralisée à tous les types cellulaires. A l'inverse, une corrélation positive entre des niveaux élevés de méthylation de type mCH et des niveaux élevés d'expression génique a été observée dans les cellules souches embryonnaires *(Chen et al, 2011)*.

Les enzymes DNMT3a et DNMT3b ont la capacité à catalyser cette réaction de méthylation mCH. Des travaux récents suggèrent d'ailleurs que DNMT3b est l'enzyme principale des méthylations mCH dans les cellules souches embryonnaires humaines *(Liao et al, 2015)*.

2.2 Les modifications des histones.

2.2.1 Définition.

Les modifications des histones jouent un rôle primordial dans la structure de la chromatine (*Fraga et al, 2005*).

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, formé d'environ 146 paires de bases d'ADN enroulées deux fois autour d'un octamère d'histones. Cet octamère est composé de deux dimères d'histones H2A-H2B et de deux dimères d'histones H3-H4 ; ces histones formant le «cœur». Alors que l'histone H1 ainsi que d'autres protéines «non histones», participent à un degré de condensation supplémentaire en faisant le lien entre chaque nucléosome (figure 19).

Chaque histone est composée d'un domaine globulaire central et d'un domaine N-terminal de 20 à 30 acides aminés appelé «queue». Seule l'histone H2A possède 37 acides aminés supplémentaires en N-terminal.

Les queues des histones sont les sites des modifications post-traductionnelles réversibles pouvant relâcher ou au contraire compacter la chromatine (figure 19). Ces modifications ou «marques» sont de plusieurs types : acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination (ou ubiquitinylation), sumoylation, ADP-ribosylation, désamination, isomérisation de proline, et propionylation (*Kouzarides, 2007 ; Liu et al, 2009 ; Biancotto et al, 2010 ; Sawan et Herceg, 2010*).

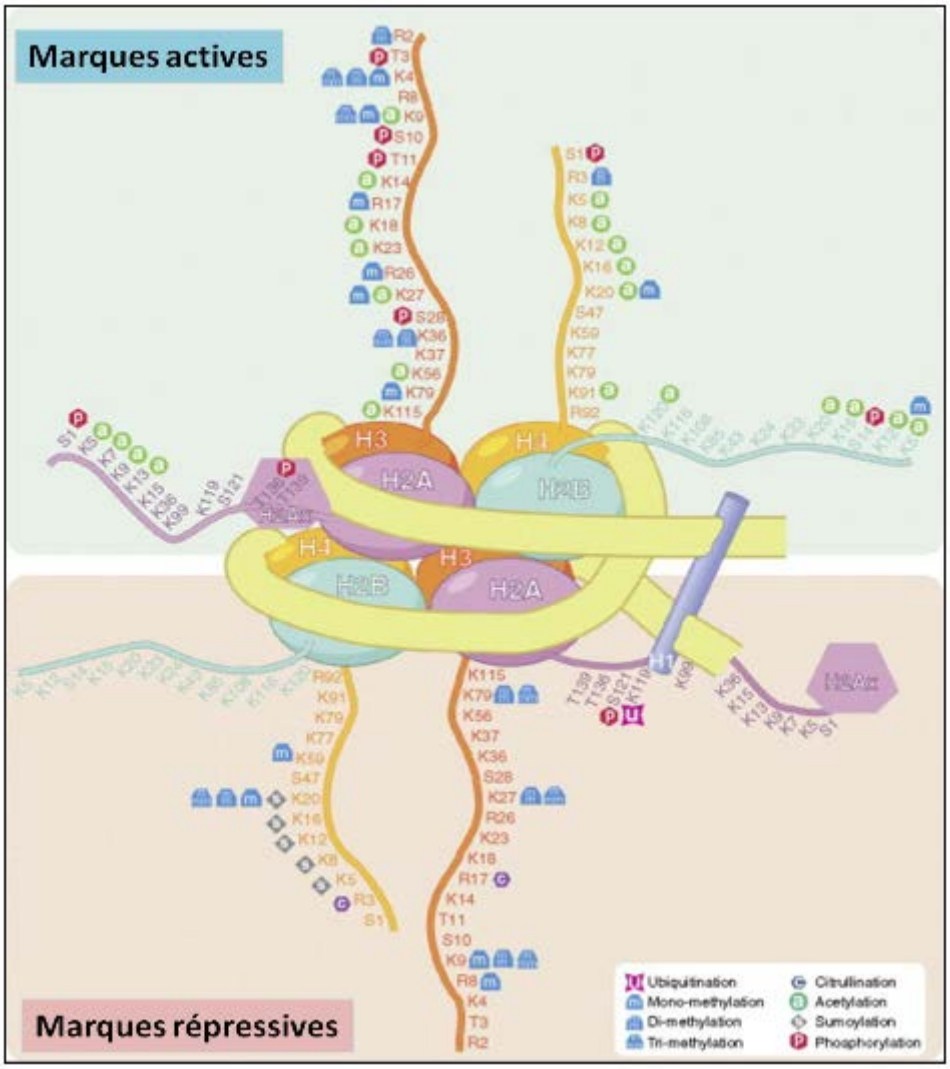


Figure 19 : Le nucléosome et les modifications des histones

(modifié d'après *Sawan et Herceg, 2010*).

L'ADN est enroulé autour d'un octamère à partir des 4 «cœurs» d'histones H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 effectue la liaison entre chaque nucléosome en se liant à l'ADN. Différents acides aminés constituant les «queues» des histones sont représentés avec leurs différentes modifications covalentes spécifiques. Les marques actives sont indiquées sur le panel du haut et les marques répressives sur celui du bas (K : lysine, R : arginine, S : sérine, T : thréonine).

Les modifications sur les queues des histones sont des modifications covalentes *(Sawan et Herceg, 2010)* qui donnent lieu au code des histones. Les modifications des histones ne sont pas considérées de manière isolée. Elles sont lues par les protéines régulatrices sous forme de combinaisons qui constituent la base du «langage ou code des histones». Ainsi une modification donnée, selon la combinaison dans laquelle elle se trouve, peut entraîner des effets totalement différents en aval. Une modification des histones peut être influencée par

une autre modification de manière synergique ou antagoniste. Cette interaction entre histones ou «cross-talk» peut se dérouler entre résidus appartenant à la même histone ou à des histones différentes (*Strahl et Allis, 2000* ; *Sawan et Herceg, 2010*).

2.2.2 L'acétylation des histones.

Les histones sont acétylées sur les résidus lysines *(Minucci et Pelici, 2006 ; Sawan et Herceg, 2010)*. Deux types d'enzymes sont mis en jeux : les «histones acétyltransférases» (HATs) (*Loidl, 1994*) et les «histones deacetylases» (HDACs) (*Rundlett et al, 1996 ; Waterland et al, 2007 ; Walkinshaw et al, 2008*). Les HATs et les HDACs fonctionnent comme des complexes multiprotéiques (*Lee et Workman, 2007 ; Ekwall, 2005*) et l'équilibre dynamique de l'acétylation des lysines *in vivo* est gouverné par les actions opposées de ces deux enzymes. Les histones acétyltransférases (HATs) utilisent un acétyl-coA pour transférer un groupement acétyle sur le groupement amine-epsilon.

L'acétylation neutralise la charge positive portée par les résidus basiques des histones, affaiblissant ainsi les interactions entre histones et ADN (chargé globalement négativement) (*Steger et Workman, 1996 ; Luger et Richmond, 1998*). Ceci aboutit à un changement conformationnel de la chromatine facilitant l'accessibilité à l'ADN pour de nombreux facteurs de transcription.

Une hyperacétylation des histones est donc considérée comme une marque transcriptionnellement active de la chromatine qui se trouve alors sous forme d'euchromatine.

Par contre, une désacétylation des histones résulte en une diminution de l'espace disponible entre les histones et l'ADN, ce qui conduit à une conformation fermée de la chromatine (hétérochromatine) et à une diminution de l'accessibilité pour les facteurs de transcription (*Norton et al, 1989* ; *Biancotto et al, 2010 ; Sawan et Herceg, 2010*).

Des modifications aberrantes de l'acétylation des histones sont impliquées dans diverses maladies, y compris le cancer *(Yang et Schwartz, 2011)*. Différentes modifications des histones ont été observées dans le cancer hépatique. Ce cancer présente une perte de H4K20me3, H3K9ac et H4K16ac et une augmentation remarquable de H3K9me3 *(Pogribny et al, 2007)*.

2.2.3 La méthylation des histones.

Les queues des histones peuvent également être méthylées sur les chaînes latérales des lysines et des arginines. Les histones H3 et H4 sont les plus fréquemment méthylées *(Lee et al, 2005)*.

Les enzymes catalysant cette réaction transfèrent les groupements méthyles de la S-adénosyl-méthionine (SAM) sur les histones.

La méthylation des histones fut considérée comme un mécanisme irréversible jusqu'en 2004 où la première enzyme déméthylase fut découverte. La régulation de la méthylation des histones est donc maintenant considérée comme un mécanisme plus dynamique (*Shi et al, 2004* ; *Sawan et Herceg, 2010*).

Les «protéines arginine méthyltransférases» (PRMTs) sont les enzymes qui catalysent les réactions de méthylation des arginines, en utilisant la SAM comme donneur de groupements méthyles. Elles sont de deux types : le type I catalyse les mono- et les di-méthylations asymétriques et le type II catalyse les mono- et les di-méthylations symétriques (*Gary et Clarke, 1998*). Jusqu'à présent, 11 PRMTs ont été identifiées. La majorité d'entre elles présente une activité méthyltransférase, sauf PRMT2, PRMT10 et PRMT11 *(Wolf, 2009)*. Les PRMTs sont impliquées dans divers processus comme le remodelage de la chromatine, la réparation de l'ADN, la transcription des gènes, le transport nucléocytosolique, l'épissage des ARN, et la traduction des protéines *(Wolf, 2009)*. Plusieurs études ont montré que la méthylation des arginines pourrait jouer un rôle important dans l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs (*Pal et al, 2004 ; Singh et al, 2004*).

Les résidus lysine sont méthylés par les «histones méthyltransférases» (HMTs) qui sont des enzymes lysine-spécifiques. Les résidus lysine peuvent être mono-, di- ou tri-méthylés. Il existe deux types de HMTs : celles contenant un domaine SET (Su(var), enhancer of Zeste, and Thrithorax) et celles ne contenant pas de domaine SET (*Feng et al, 2002 ; Ng et al, 2002*). La méthylation des lysines provoque diverses conséquences car selon le résidu méthylé, cette méthylation peut être soit une marque de l'euchromatine transcriptionnellement active soit une marque de l'hétérochromatine transcriptionnellement réprimée. En effet, la méthylation des histones H3K9, H4K20 et H3K27 est généralement associée à l'hétérochromatine alors que la méthylation des histones H3K4, H3K36 et H3K79 est plutôt corrélée à l'euchromatine (*Sims et al, 2003*).

Une activité aberrante de plusieurs enzymes modifiant les histones a été démontrée dans de nombreux cancers *(Esteller, 2006 ;* Biancotto et al, 2010*)*.

2.3 Les intéractions entre méthylation de l'ADN et modifications des histones.

Les modifications des histones peuvent affecter directement ou indirectement le profil de méthylation de l'ADN. Inversement, la méthylation de l'ADN influence également les modifications des histones *(Yang et Schwartz, 2011)* (figure 20).

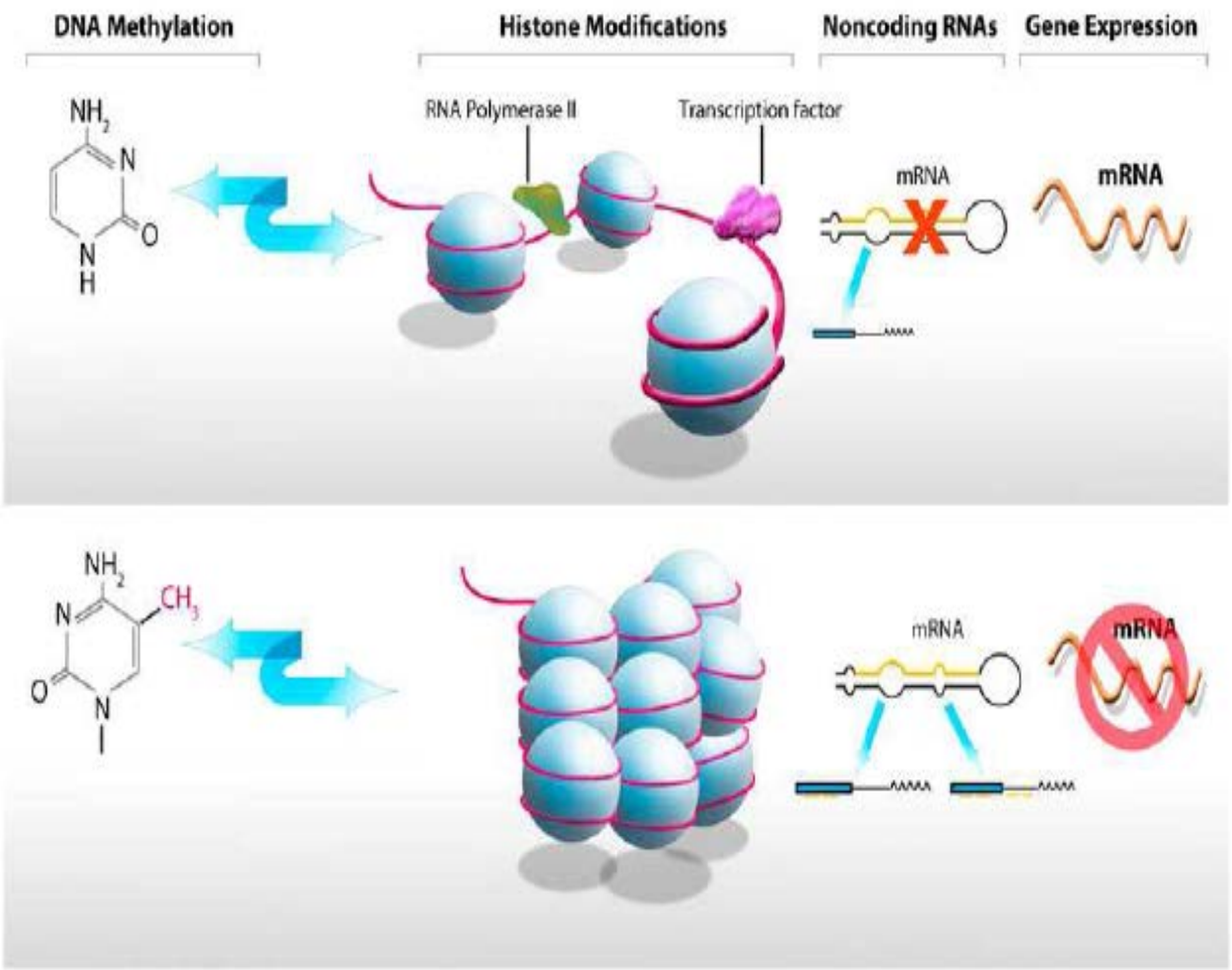


Figure 20 : Conséquences des modifications épigénétiques sur l'expression des gènes (tiré de *Yang et Schwartz, 2011*).

Les flèches bleues indiquent le «cross-talk» entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones.

Une hyperméthylation des îlots CpG au niveau des promoteurs de gènes déclenche la désacétylation des histones. Des protéines possédant un domaine de liaison aux CpG méthylées (MBD pour «methyl-CpG sequence binding domain proteins»), comme MeCP2, se lient de manière sélective aux régions méthylées de l'ADN et recrutent des corépresseurs

transcriptionnels et des HDACs. Au contraire, des inhibiteurs de HDAC contribuent au détachement de la protéine MeCP2 des cytosines méthylées, ce qui permet aux HATs d'acétyler à nouveau les histones favorisant ainsi la transcription des gènes. Ceci met bien en évidence l'existence d'une coopération entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones *(Monparler et Bovenzi, 2000)*. Mais quel évènement se produit en premier et lequel déclenche l'autre ? Cette question reste encore ouverte au débat. Le consensus actuel semble favoriser le fait que la méthylation de l'ADN soit plutôt secondaire à l'hypoacétylation des histones dans le processus d'inactivation des gènes (*Baylin et al, 2001*).

D'autres modifications de la chromatine, comme la méthylation des histones, peuvent diriger la méthylation de l'ADN et *vice versa*. La plupart des DNMTs et des protéines MBD interagissent avec des enzymes qui modifient les histones, incluant les HMTs. Les mécanismes moléculaires de la régulation de l'expression des gènes impliquent donc une coordination étroite entre DNMTs, HDACs, HMTs et d'autres protéines de remodelage de la chromatine (*Moggs et al, 2004 ; Baylin et al, 2001*).

La méthylation des îlots CpG est souvent considérée comme une marque répressive associée aux marques de chromatine inactive comme les histones H3 et H4 déacétylées, et les H3K9 et H3K27 méthylées *(Pfeifer et Rauch, 2009)*. Par contre, une hypométhylation des îlots CpG est associée à une méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 qui est une marque d'activation de la chromatine *(Pfeifer et Rauch, 2009)*.

Toutes ces modifications épigénétiques jouent un rôle critique dans le recrutement de protéines qui régule de nombreuses fonctions cellulaires, comme la recombinaison ou la réparation de l'ADN, la réplication et la transcription *(Sawan et al, 2008 ; Sawan et Herceg, 2010)*. Elles sont effectuées par des enzymes qui utilisent des métabolites cellulaires (acétyl-CoA pour l'acétylation, groupement -CH3 pour la méthylation, ATP pour la phosphorylation…). La chromatine est donc un reflet des fluctuations métaboliques cellulaires.

Par conséquent, le facteur nutrition peut induire une dérégulation épigénétique.

Partie 3: Les pathologies en lien avec le métabolisme des monocarbones et la programmation fœtale.

1 Les pathologies liées au métabolisme des monocarbones.

1.1 Les maladies obstétriques.

La grossesse est une période où les besoins en folates sont considérablement augmentés par transfert préférentiel des folates vers l'unité fœto-placentaire et en raison d'une augmentation physiologique de l'érythropoïèse (*Henderson et al, 1995*). Une carence en folates pendant la grossesse peut induire un décollement du placenta, une prééclampsie, une naissance prématurée, un faible poids à la naissance, un retard de croissance et des anomalies du développement (non fermeture du tube neural, fentes palatines,...) (*Scholl et Johnson, 2000)*. Il a été montré qu'une carence en folates augmente de 50 % le risque d'avortement spontané (*George et al, 2002*) mais également un retard de croissance et un retard de puberté chez l'enfant. Plusieurs études ont également associé une concentration plasmatique en Hcy élevée chez la mère à des fausses couches à répétition, des prééclampsies, des décollements placentaires (*Hague, 2003*) et à des malformations cardiaques congénitales *(Kapusta et al, 1999)*.

Des études ont montré qu'une supplémentation en folates avant la conception réduit les risques d'anomalies du développement comme le *spina bifida* et l'anencéphalie (*MRC Vitamin Study Research Group, 1991 ; Mantovani et al, 2014*) ainsi que la fréquence du Syndrome de Down chez l'enfant (*Barkai et al, 2003*).

1.2 Les maladies neurologiques.

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

Un lien entre Hcy et/ou vitamines B ainsi que les fonctions cognitives a été établi *(Herrmann et Obeid, 2011)*. La cobalamine est nécessaire à la synthèse de myéline (*Sesso et al 1999 ; Scalabrino, 2009*). Une carence en vitamine B12 affecte donc le cerveau, la moelle épinière, les nerfs optiques et les nerfs périphériques ; ceci se traduisant par des neuropathies, des névrites, une perte de la vision et des symptômes psychiatriques (*Durand et al, 2003 ; Gochard et al, 2009*).

La déficience en folates est également impliquée dans certains troubles neuropsychologiques (dépression, schizophrénie, démence…) et dans des maladies neurodégénératives (les maladies d'Alzheimer et de Parkinson) (*Iyer et Tomar, 2009*). En effet, les patients atteints de la maladie de Parkinson ont des niveaux élevés d'Hcy *(Allain et al, 1995 ; Kuhn et al, 1998)* et de MMA *(Levin et al, 2010; Toth et al, 2010)*. De plus, des observations effectuées sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer montrent que ces individus ont des concentrations d'Hcy significativement élevées, ce qui confirme la théorie que les donneurs de méthyles sont d'importants facteurs de risque modulables chez les personnes âgées ayant des dysfonctionnements cognitifs *(Clarke et al, 1998 ; McCaddon et al, 1998*).

Une étude sur le rat a montré qu'une carence maternelle gestationnelle en vitamines B9 et B12 entraîne un retard de fermeture du système nerveux central et des anomalies cérébrales au niveau des embryons (E20) ; ceci étant lié à une inhibition de la voie Stat 3 *(Kerek et al, 2013)*.

Une autre étude a également dévoilé des problèmes d'olfaction et des altérations de protéines jouant un rôle clé dans la neurostéroïdogenèse au niveau des bulbes olfactifs de ratons femelles de 21 jours, suite à une carence maternelle gestationnelle en donneurs de méthyles *(El Hajj Chehadeh et al, 2014)*.

1.3 Les maladies cardiovasculaires.

D'après l'OMS, les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de décès dans le monde. En 1976, Wilcken et al ont suggéré une association entre l'homocystéine circulante et les maladies cardiovasculaires *(Wilcken et Wilcken, 1997)*. En effet, une méta-analyse de données épidémiologiques a montré qu'une augmentation de la concentration d'Hcy est associée aux maladies cardiovasculaires *(Boushey et al, 1995)*. Deux autres méta-analyses publiées en 2002 suggèrent qu'un abaissement de 25 % de la concentration plasmatique d'Hcy permet la réduction du risque de maladies cardiaques (11-16 %) *(Wald et al, 2002)*. Depuis, Clarke et al ont démontré que l'association de la concentration d'Hcy avec les maladies cardiovasculaires est indépendante des facteurs de risque classiques, comme le tabagisme, l'hypercholestérolémie et l'hypertension artérielle *(Clarke et al, 2010)*. De plus, Guéant-Rodriguez et al ont démontré qu'une hyperhomocystéinémie modérée induit un dysfonctionnement systolique du ventricule gauche (DSVG) *(Géant-Rodriguez et al, 2007)*.

La plupart des études indiquent qu'une hyperhomocystéinémie est associée à des altérations dans le métabolisme des lipides et peut jouer un rôle dans la pathologie vasculaire *(Werstuck et al, 2001 ; Namekata et al, 2004 ; Mikael et al, 2009)*. Des études ultérieures ont suggéré que

des altérations épigénétiques pourraient jouer un rôle dans ces processus *(Devlin et Lentz, 2006; Mikael et al, 2006)*.

Une étude portant sur la supplémentation en vitamine B12 a suggéré que le risque d'avoir des perturbations vasculaires est réduit avec des doses élevées de vitamine B12 *(Spence et al, 2005)*. 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)*.

Des études réalisées chez l'animal suggèrent que l'Hcy altérerait les propriétés élastiques de la paroi artérielle. Ces études ont suggéré la possibilité d'interaction de l'Hcy avec des médiateurs physiologiques de la matrice endothéliale par l'intermédiaire de mécanismes oxydatifs ainsi qu'une diminution de l'activité biologique du monoxyde d'azote conduisant à un dysfonctionnement endothélial avec pour conséquence l'apparition d'une pro-athérosclérose *(Langman et Cole, 1999 ; Engman, 1998 ; Fanapour et al, 1999)*.

Plus récemment, une étude a démontré chez le rat un lien entre une carence maternelle en donneurs de méthyles (folates et vitamine B12) pendant la gestation et l'allaitement et une insuffisance cardiaque (développement d'une cardiomyopathie) dans la descendance. En effet, une altération de l'oxydation des acides gras et du métabolisme énergétique a entraîné le développement d'une hypertrophie myocardique (figure 21) *(Garcia et al, 2011)*. La SAM, intervenant dans le cycle de la méthionine, joue un rôle important dans l'activation du peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activateur-1 α (PGC-1α) *(Blaise et al, 2007 ; Ventura-Clapier et al, 2008)*. PGC-1α interagit fonctionnellement avec les peroxisome proliferator-activated receptor-α et γ (PPAR-α et PPAR-γ), tandis que l'activation de PGC-1α dépend de sa désacétylation par Sirtuin -1 (SIRT1) et de sa méthylation par la protéine arginine methyltransferase -1 (PRMT1) *(Holness et al, 2010 ; Ventura-Clapier et al, 2008)*. L'expression de SIRT1 est impliquée dans les mécanismes épigénétiques de programmation fœtale, ce qui peut également être influencé par la carence en donneurs de méthyles *(Holness et al, 2010 ; Bossenmeyer-Pourie et al, 2010)*. Enfin, PPAR-α, PPAR-γ et PGC-1α sont trois régulateurs majeurs du métabolisme oxydatif des mitochondries cardiaques qui jouent un rôle central dans les patho-mécanismes qui conduisent à une hypertrophie du myocarde et à une insuffisance cardiaque *(Ventura-Clapier et al, 2008 ; Madrazo et Kelly, 2008)*. L'étude de Garcia et al a montré que le régime carencé en donneurs de méthyles produit une diminution de la concentration en folates et du ratio SAM/SAH chez des ratons de 21 jours *(Garcia et al, 2011)*. La diminution du ratio SAM/SAH agit sur la méthylation des protéines impliquées dans les mécanismes épigénétiques, notamment celles jouant un rôle clé dans la régulation de

l'homéostasie du métabolisme du myocarde au cours de la période périnatale *(Holness et al, 2010 ; Forges et al, 2007)*. La perturbation de l'alignement des mitochondries et la concentration accrue de lipides dans le tissu sont évocateurs d'un effet dramatique de la carence sur le métabolisme énergétique mitochondrial (figure 22). Ceci a été illustré par l'accumulation de gouttelettes lipidiques autour des mitochondries, la diminution de l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire et le développement d'une hypertrophie cardiaque après la naissance, lorsque les acides gras sont les principaux fournisseurs d'énergie dans le cœur *(Ventura-Clapier et al, 2008)*. Une analyse protéomique a également mis en évidence une modification de l'expression de protéines impliquées dans la β- oxydation des acides gras et le stockage des lipides *(Garcia et al, 2011)*.

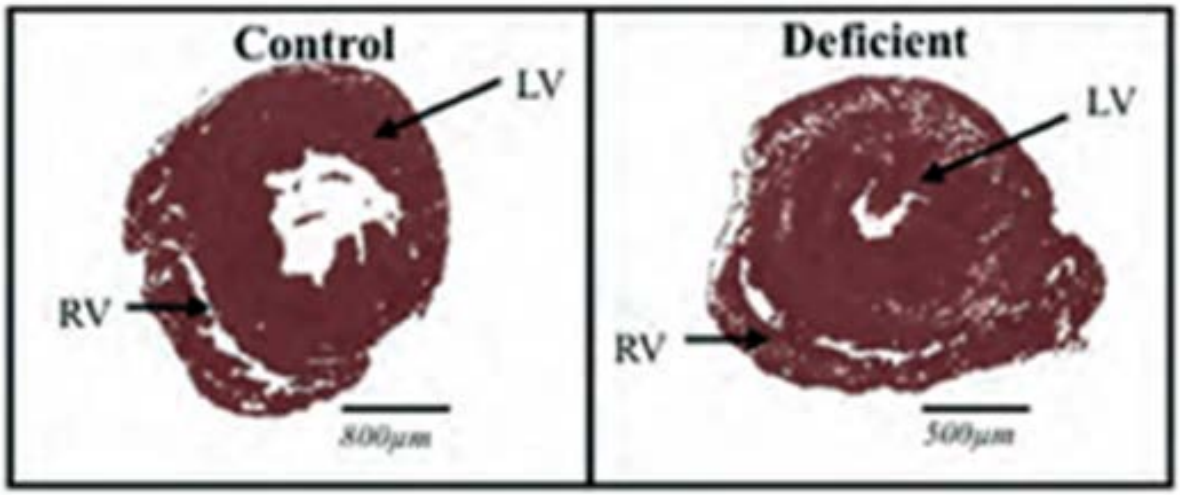


Figure 21 : Photographies prises au microscope optique de cœurs de ratons de 21 jours dans des conditions de régime contrôle et de carence en donneurs de méthyles (modifié de *Garcia et al, 2011*). *Une hypertrophie du ventricule gauche est visible chez les ratons carencés (à droite) en comparaison avec les ratons contrôles (à gauche). Sont indiqués, LV pour le ventricule gauche et RV pour le ventricule droit.*

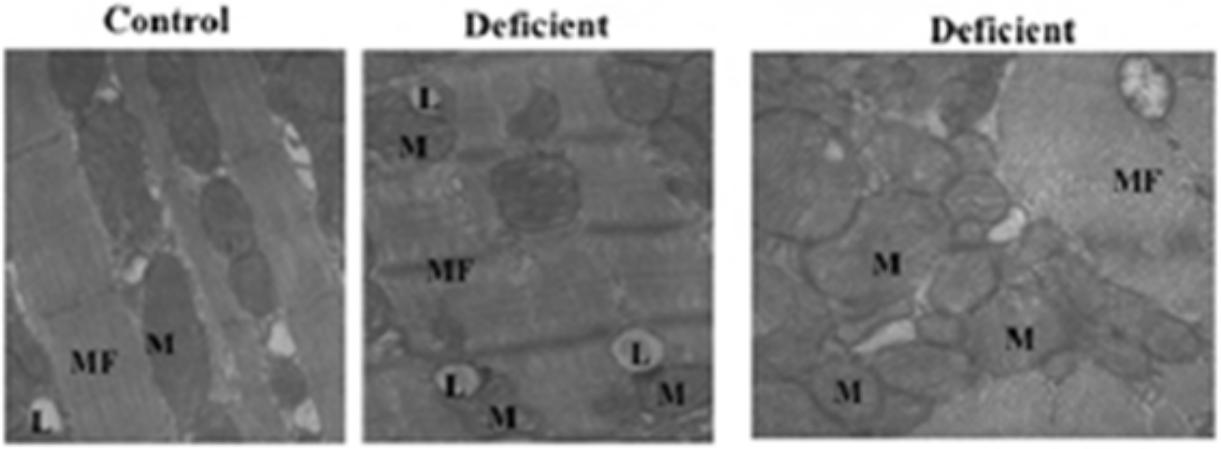


Figure 22 : Photographies prises au microscope électronique de coupes de ventricule gauche de ratons de 21 jours contrôles et carencés en donneurs de méthyles
(modifié de *Garcia et al, 2011*). *Les mitochondries sont désorganisées dans le cœur des rats carencés et des gouttelettes lipidiques sont visibles à leur proximité (photographies au centre et à droite). Sont indiquées, les gouttelettes lipidiques (L), les mitochondries (M) et les myofibrilles (MF).*

D'après l'analyse bio-informatique des données protéomiques, PGC1-α, PPAR-α et ERR-α étaient les facteurs les plus déterminants des changements produits par le régime alimentaire carencé en donneurs de méthyles *(Garcia et al, 2011)*. La désacétylation et la méthylation de PGC-1α sont deux mécanismes clés de régulation du métabolisme oxydatif qui ont un intérêt particulier dans notre modèle expérimental, où la méthylation altérée et l'acétylation sont attendues dans le contexte de la diminution du ratio SAM/SAH et le retard de croissance intra-utérin *(Holness et al, 2010 ; Forges et al, 2007).* La fonction de PGC-1α est induite par sa méthylation au niveau de plusieurs résidus d'arginine dans sa région C-terminale par la protéine arginine methyltransferase-1 (PRMT1) *(Teyssier et al, 2005)*. L'acétylation de PGC-1α diminue son activité et est régulée par l'histone désacétylase SIRT1 et l'acétyltransférase GCN5 *(Holness et al, 2010 ; Teyssier et al, 2005 ; Jeninga et al, 2010)* (figure 23). Une acétylation accrue et une diminution de la méthylation de PGC-1α ont été mises en évidence dans le myocarde des animaux carencés *(Garcia et al, 2011)*. Ces deux modifications post-traductionnelles sont en adéquation avec la diminution du ratio SAM/SAH et la diminution de l'expression de SIRT1 et PRMT1 observées chez les rats carencés et sont indicatives d'une inhibition fonctionnelle de PGC-1α *(Holness et al, 2010 ; Ventura-Clapier et al, 2008 ; Jeninga et al, 2010)*. Cela soulève l'hypothèse d'une programmation métabolique de la carence en donneurs de méthyles dans le cœur *(Holness et al, 2010 ; Ventura-Clapier et al, 2008 ; Jeninga et al, 2010 ; Chen et al, 2009)*.

L'expression des protéines PPAR-α et ERR-α est diminuée dans le myocarde des animaux carencés, en plus de la diminution de l'activation de leur co-régulateur PGC-1α, ce qui est également concordant avec la diminution de l'oxydation mitochondriale des acides gras *(Garcia et al, 2011)*. En conclusion, la carence en donneurs de méthyles a induit une cardiomyopathie en diminuant l'oxydation mitochondriale des acides gras par un déséquilibre dans l'acétylation/ méthylation de PGC-1α par SIRT1 et PRMT1 et une expression altérée de PPAR-α et ERR-α *(Garcia et al, 2011)*.

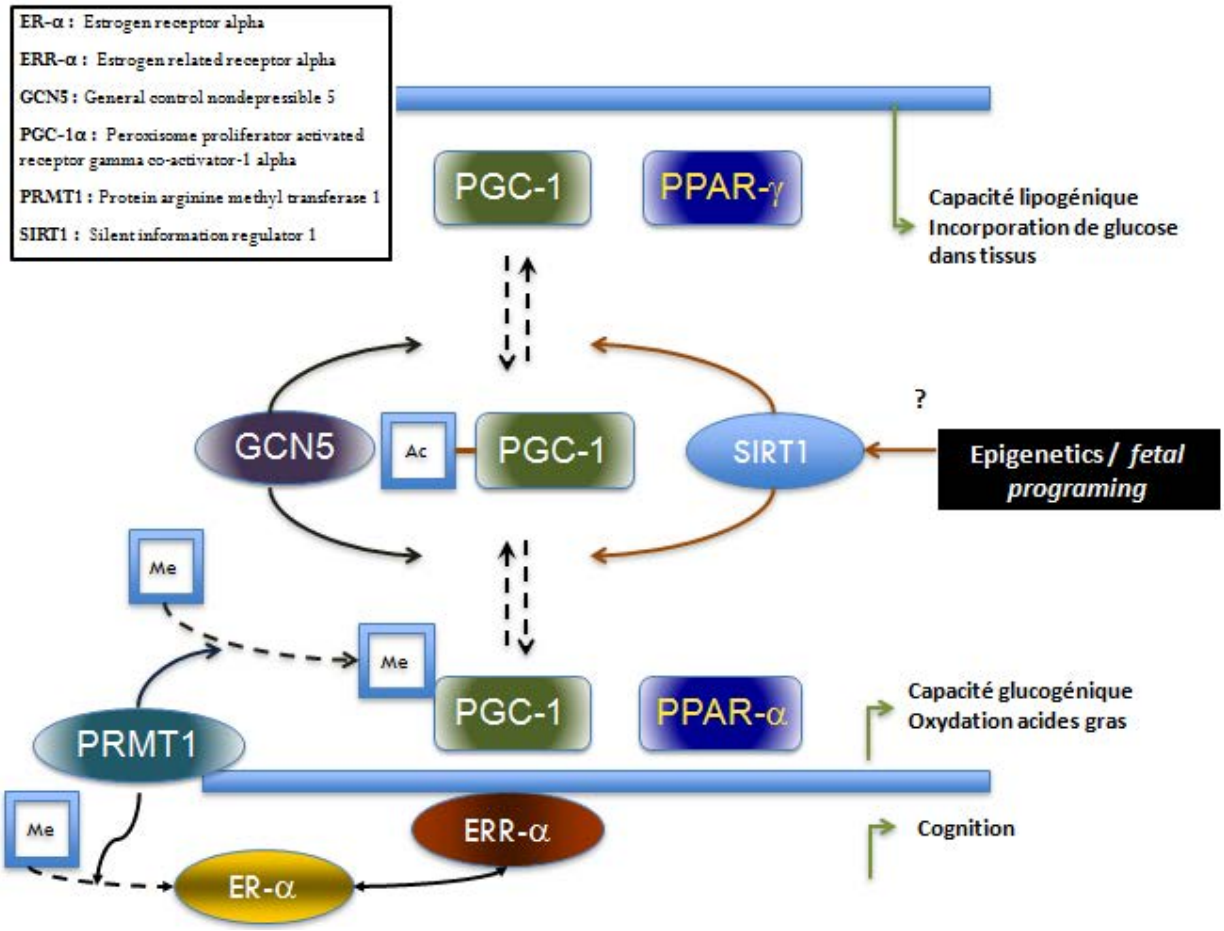


Figure 23 : Les mécanismes moléculaires expliquant le lien entre les modifications épigénétiques et le métabolisme énergétique dans le cœur et le foie.

PPAR-α est principalement exprimé dans les tissus métaboliquement actifs, impliquant le foie, le rein, le cœur, le muscle squelettique et le tissu adipeux brun, mais il est également exprimé dans les monocytes, les cellules endothéliales vasculaires et les cellules musculaires lisses. Il a été suggéré que PPAR-α puisse jouer le rôle de régulateur des besoins en lipides des tissus en régulant leur captation et leur β-oxydation, en opposition à la fonction de PPAR-γ, qui favorise

la capture et le stockage ultérieur des lipides dans le tissu adipeux *(Khan et Vanden Heuvel, 2003)*.

PPAR-γ forme un hétérodimère avec les récepteurs X des rétinoïdes (RXR). Il est bien établi que PPAR-γ est un régulateur clé de l'adipogenèse. Il est exprimé surtout dans les adipocytes, le colon et les cellules hématopoïétiques, mais également dans les macrophages, les ostéocytes, les cellules endothéliales, le placenta, le rein, le foie, les muscles squelettiques et lisses, le pancréas et l'intestin grêle.

Quant aux œstrogènes, ils régulent de nombreux processus cellulaires dans une grande variété de tissus cibles pendant la croissance, le développement et la différenciation. Les effets biologiques des œstrogènes sont principalement observés *via* leurs actions sur leurs récepteurs nucléaires, dont le rôle est de réguler l'expression des gènes sensibles aux œstrogènes.

Le récepteur aux œstrogènes ER-α (ou NR3A1) est un membre de la famille de ces récepteurs nucléaires *(Welboren et al, 2009)*. Les mitochondries sont des cibles importantes pour l'action des œstrogènes et des récepteurs aux œstrogènes (ERs). Plusieurs données de la littérature ont souligné que l'absence d'ER-α provoque une hyperplasie/hypertrophie adipocytaire, une résistance à l'insuline, une intolérance au glucose et une diminution des dépenses énergétiques, dans les deux sexes *(Chen et al, 2009)*. Bien que les mécanismes responsables de la régulation des œstrogènes sur l'adipogenèse restent flous, l'absence d'œstrogènes entraine une altération de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme lipogénique qui régule le métabolisme des triglycérides plasmatiques, des acides gras libres et l'augmentation du stockage des lipides par les adipocytes *(Cooke et al, 2001)*. De plus, les œstrogènes favorisent la voie de la lipolyse au détriment de la lipogenèse par augmentation de l'expression des lipases qui sont hormono-sensibles et catalysent ainsi l'hydrolyse du triacylglycérol stocké et la libération des acides gras *(Pallottini et al, 2008)*.

En ce qui concerne ERR-α, son activité peut être inhibée par des siRNA ou par un antagoniste de ERR-α, ce qui diminue la capacité de PGC-1α à induire l'expression des gènes du métabolisme énergétique et à améliorer la biogenèse mitochondriale et la capacité oxydative *(Villena et Kralli, 2008)*. En réponse à l'activation de PGC-1α, ERR-α régule donc la fonction de gènes importants pour la biogenèse mitochondriale. En outre, ERR-α, en fonction du type cellulaire, a été montré comme favorisant l'absorption des lipides et leur oxydation, la biogenèse mitochondriale, la capacité respiratoire et la production de ROS (espèces réactives de

l'oxygène) et inhibant l'oxydation du glucose *(Mootha et al, 2004; Schreiber et al, 2004; Wende et al, 2005)*.

1.4 L'homocystéine et insulino-résistance.

Plusieurs études ont présenté une augmentation de la fréquence du diabète de type 2 (insulino-résistant) chez des sujets carencés en vitamine B12, avec une augmentation de l'Hcy et du MMA *(Kumthekar et al, 2012 ; Nervo et al, 2011 ; Pflipsen et al, 2009)*.

Munshi et al ont montré, dans une étude comparative entre les diabètes de type 1 et de type 2, que seul le type 2 est associé à une hyperhomocystéinémie *(Munshi et al, 1996)* ; ces patients développant plus vite des complications macrovasculaires. D'autres études ont également montré une augmentation de l'homocystéinémie chez les patients diabétiques qui développent une athérosclérose ou une insuffisance rénale *(Wiklund et al, 1996 ; Araki et al, 1993)*. Des patients diabétiques souffrant d'hypertension (par néphropathie) et/ou sous traitement d'hémodialyse, ont une hyperhomocystéinémie modérée associée à une diminution du ratio SAM/SAH et une diminution de l'activité MTHFR *(Poirier et al, 2001)*. Cela indique que les patients diabétiques avec une néphropathie ont également des troubles du métabolisme des monocarbones. Dicker-Brown et al ont également observé une hyperhomocystéinémie modérée chez des patients diabétiques de type 2 présentant des complications cardiovasculaires *(Dicker-Brown et al, 2001)*. De plus, une hyper-insulinémie conduirait à une chute de l'homocystéinémie chez des sujets sains mais pas chez des patients diabétiques de type 2 *(Fonseca et al, 1998)*.

Cependant, bien qu'il existe une corrélation négative entre l'insuline et l'Hcy chez des patients obèses diabétiques, il n'y a aucune corrélation entre l'Hcy et l'indice de masse corporelle (IMC) *(Fonseca et al, 2003)*. Le rôle de ces anomalies métaboliques dans l'étiologie du diabète reste assez flou.

Des études plus récentes suggèrent que l'Hcy pourrait induire une insulino-résistance par sa forme toxique, l'homocystéine thiolactone, qui provoque des altérations dans les structures protéiques, notamment sur les récepteurs à l'insuline *(Najib et Sanchez-Margalet, 2005)*.

1.5 Les maladies hépatiques.

1.5.1 Les NAFLDs (stéato-hépatopathies non-alcooliques).

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 stéato-hépatopathies non-alcooliques (NAFLDs) se réfèrent à un large spectre de lésions hépatiques qui vont de la stéatose simple ou accumulation de triglycérides intracellulaires, à l'inflammation, la fibrose et la cirrhose. Les mécanismes impliqués dans l'accumulation de triglycérides dans le foie et les lésions hépatocellulaires ultérieures sont multifactoriels.

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)*.

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. Il a été aperçu que des patients ayant une accumulation hépatique d'acides gras présentent également une hyperhomocystéinémie *(de Carvalho et al, 2013 ; Roblin et al, 2007* a*)*. De plus, la concentration en Hcy semble être plus élevée en cas de NASH qu'en cas de stéatose simple. Les résultats d'une étude ont également montré une forte corrélation entre la concentration d'Hcy, le score de fibrose et le score nécrotico-inflammatoire *(Gulsen et al, 2005)*.

Les différents travaux d'expérimentation animale ont montré que des souris invalidées pour certaines enzymes régulant le métabolisme de l'Hcy présentent une stéatose hépatique sévère. En effet, les souris invalidées en cystathionine β syntase (CBS) ont une stéatose hépatique sévère de type microvésiculaire *(VanAerts et al, 1995)*. Les souris déficientes en MAT1 ont une stéato-hépatite avec risque accru de carcinome hépatocellulaire *(Martinez-Chantar et al, 2002)*. Ainsi toute anomalie enzymatique du métabolisme de l'Hcy responsable d'hyperhomocystéinémie est 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)*.

Une étude sur le rat a montré qu'une carence maternelle en donneurs de méthyles (folates et vitamine B12) entraîne l'apparition d'une stéatose hépatique au niveau de la descendance (figure 24 A) et prédispose au syndrome métabolique ; des dérégulations épigénomiques du métabolisme énergétique jouant un rôle majeur dans ce processus *(Pooya et al, 2012)*. Cette étude a montré que des ratons de 21 jours, carencés en donneurs de méthyles (MDD), présentent un petit poids à la naissance mais aucun changement dans la concentration de l'insuline, comme observé dans des modèles de programmation fœtale de restriction alimentaire et de restriction protéique chez le rat *(Tarry-Adkins et al, 2010 ; Desai et al, 2007)*. La carence en donneurs de méthyles a également causé la diminution du ratio SAM/SAH. Une augmentation accrue des acides gras libres plasmatiques a également été observée ; bien plus que chez les ratons soumis à un régime restrictif alimentaire et/ou protéique *(Tarry-Adkins et al, 2010 ; Desai et al, 2007)*. Cela pourrait expliquer pourquoi le régime carencé en donneurs de méthyles, contrairement à la restriction en protéines, entraîne une stéatose hépatique microvésiculaire et une augmentation du rapport poids du foie/poids total corporel *(Blaise et al, 2007 ; Burdge et al, 2009)*. Outre la stéatose hépatique, le régime MDD a augmenté l'expression de protéines marqueurs de fibrose et de constituants de l'inflammasome. Ces effets peuvent être causés par l'augmentation de la concentration en peroxydes lipidiques, à la suite d'une dysrégulation de l'oxydation des acides gras *(Csak et al, 2011)*. Cependant, l'analyse histologique n'a révélé aucune fibrose ou inflammation dans les tissus hépatiques (figure 24 B). L'oxydation mitochondriale des acides gras a été considérablement diminuée chez les rats carencés en donneurs de méthyles, ce qui est en adéquation avec la diminution de l'expression protéique d'enzymes clés de l'oxydation mitochondriale des acides gras et la diminution de l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire. Il a été montré que, l'oxydation des acides gras et les activités des complexes I et II, sont réduites dans le tissu hépatique de patients atteints de stéato-hépatite non-alcoolique *(Spiekerkoetter, 2010 ; Perez-Carreras et al, 2003)*. La carence en donneurs de méthyles entraîne également un déficit en carnitine, une coenzyme jouant un rôle dans le transport des acides gras et indispensable à la β-oxydation, ainsi que la diminution de l'expression de la protéine transporteur de cations organiques OCTN1 (pour novel organic cation transporter) dans le foie ; ce qui correspond à une altération de l'import de carnitine OCTN1-dépendant *(Eder et Ringseis, 2010)*. La voie PPAR-α/PGC-1α joue un rôle clé dans l'expression des gènes codant pour des transporteurs OCTN *(Makowski et al, 2009 ; Vaz et Wanders, 2002)*. L'inhibition de cette voie par hypométhylation de PGC-1α pourrait donc expliquer les modifications du métabolisme de la carnitine chez les rats carencés

(Makowski et al, 2009). Sur le plan clinique, ces résultats sont en accord avec le déficit en carnitine aperçu chez certains patients atteints de stéatose et de stéato-hépatite *(Bowyer et al, 1988)*. De plus, ces résultats soutiennent l'hypothèse que l'inefficacité de la β-oxydation des acides gras et de la respiration mitochondriale est une cause possible de la stéato-hépatite non-alcoolique *(Reddy et Rao, 2006)*.

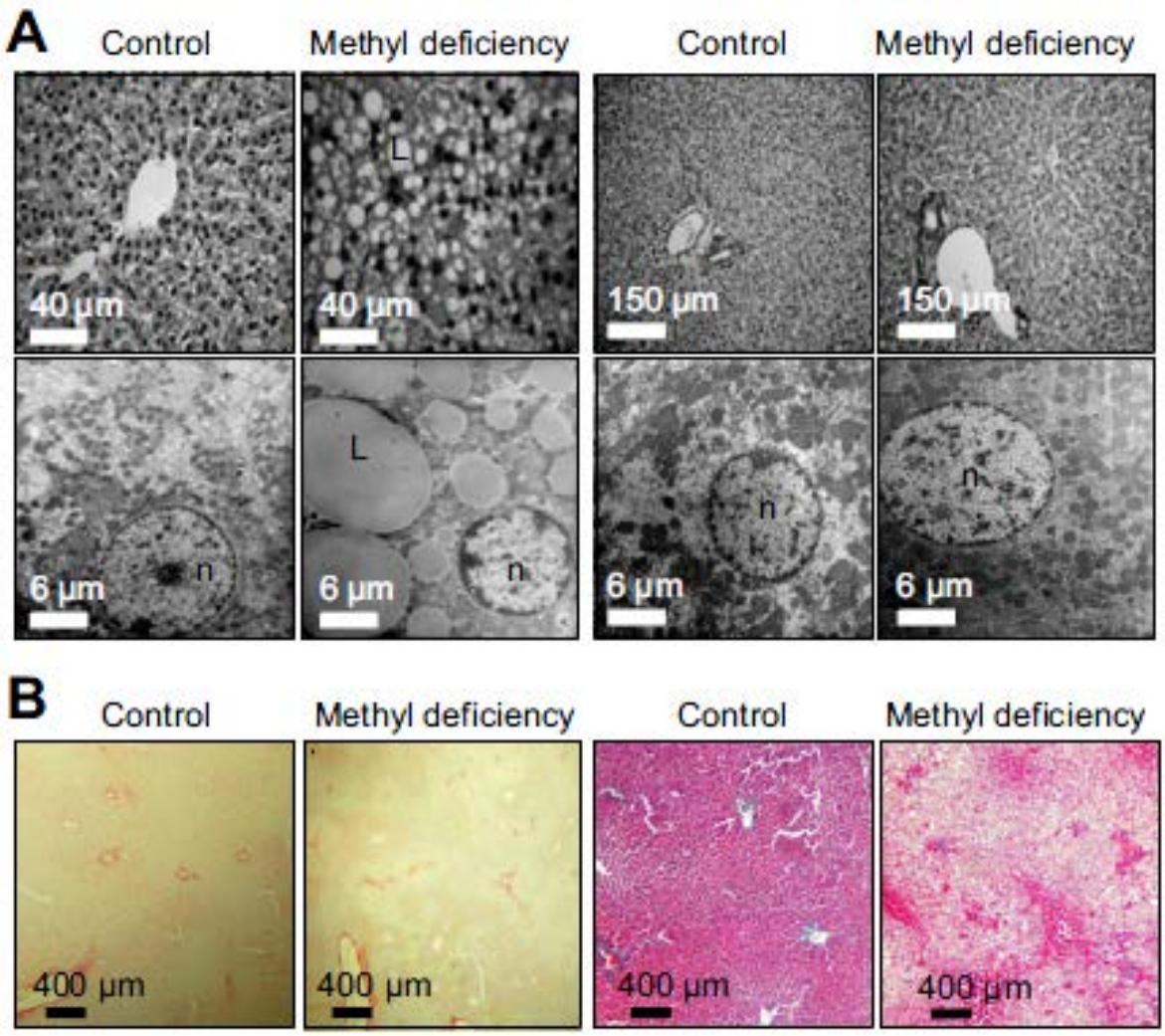


Figure 24 : Analyses histologiques en microscopie électronique et colorations histologiques de foies de ratons de 21 jours soumis à un régime alimentaire standard ou à un régime carencé en donneurs de méthyles (tiré de *Pooya et al, 2012*).

(A) La stéatose microvésiculaire trouvée chez les animaux carencés n'a pas été observée chez les ratons témoins de 21 jours (à gauche, haut et bas) et a disparu lors du retour à un régime alimentaire standard après le sevrage (à droite, en haut et en bas, foies examinés à 80 jours). (B) L'analyse de la fibrose avec la coloration Rouge Sirius (à gauche) (spécifique pour les fibres de collagène et de réticuline) et la coloration Trichrome de Masson (à droite, spécifique pour les

fibres de collagène) n'a pas montré de différences entre les foies de ratons de 21 jours contrôles et ceux carencés en donneurs de méthyles.

La fonction de PGC-1α étant régulée par méthylation *via* PRMT1 *(Holness et al, 2010)*, la diminution accrue de l'interaction de PGC-1α avec PPAR-α, ERR-α et HNF-4α et l'hypométhylation de PGC-1α observées dans le foie des animaux carencés en donneurs de méthyles sont en adéquation avec la diminution du ratio SAM/SAH observé. Dans le modèle de carence en donneurs de méthyles, l'oxydation mitochondriale des acides gras a été altérée par hypométhylation de PGC-1α, puis par conséquent, la diminution de sa liaison avec différents récepteurs nucléaires, PPAR-α, ERR-α, et HNF4-α *(Holness et al, 2010 ; Rodgers et al, 2008)*. En accord avec ces résultats, une étude a montré que l'inhibition de l'import mitochondrial d'acides gras produit des variations transcriptomiques liées à l'altération des voies PGC-1α et HNF4-α *(Van der Leij et al, 2007)*. De plus, les souris déficientes en PGC-1α montrent une inhibition de ces voies et une stéatose hépatique *(Vaz et Wanders, 2002)*. L'absence de PPAR-α favoriserait le développement de la stéato-hépatite, tandis que l'administration d'un agoniste de PPAR-α montre l'effet opposé, chez des souris recevant un régime déficient en méthionine et choline *(Ip et al, 2004 ; Kashireddy et Rao, 2004)*. Une concentration faible en glucose plasmatique a été également observée chez les ratons carencés et est cohérente avec des études antérieures sur l'effet de la restriction alimentaire, indiquant que ceci peut provenir d'une altération de l'expression des enzymes de la néoglucogenèse par l'inhibition de PGC-1α *(Rinaudo et Wang, 2012 ; Desai et al, 2007 ; Fernandez-Marcos et Auwerx, 2011)*.

Selon l'hypothèse de la programmation fœtale, le faible poids observé à la naissance dans le modèle expérimental de carence en donneurs de méthyles est un indicateur potentiel du syndrome métabolique. Dans ce contexte, les stéatoses du foie et du myocarde, également observées dans ce modèle, pourraient être deux manifestations précoces de prédisposition au syndrome métabolique, dans lequel la dysrégulation de l'homéostasie du métabolisme lipidique par l'inhibition de PGC-1α joue un rôle majeur *(Holness et al, 2010 ; Fernandez-Marcos et Auwerx, 2011)*. Cette dysrégulation pourrait contribuer à expliquer les liens entre le régime MDD, le petit poids à la naissance et les manifestations ultérieures du syndrome métabolique, dans diverses études de population *(Yajnik et al, 2008 ; Frelut et al, 2011 ; Fernandez-Marcos et Auwerx, 2011)*.

En conclusion, la carence en donneurs de méthyles pendant la gestation et l'allaitement produit une stéatose hépatique, qui résulte d'une altération de l'oxydation mitochondriale des acides

gras par diminution de l'interaction de PGC-1α hypométhylée avec les récepteurs nucléaires PPAR-α, ERR-α, et HNF4-α. Ce lien entre la carence en donneurs de méthyles et la dysrégulation épigénomique du métabolisme énergétique ouvre de nouvelles perspectives sur la pathogenèse de la stéato-hépatopathie, en particulier en ce qui concerne l'hypothèse de la programmation fœtale.

L'hépatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4-α), aussi connu sous le nom NR2A1 (nuclear receptor subfamily 2, group A, member 1), fait partie de la famille des récepteurs nucléaires. Il se lie à l'ADN et régule l'expression de nombreux gènes clés impliqués dans le métabolisme du cholestérol, des acides gras, du glucose (néoglucogenèse), dans les jonctions cellulaires, la différenciation et la prolifération dans le foie. La protéine HNF4 joue un rôle dans le développement du foie, des reins, des intestins et des cellules du pancréas. Les changements d'expression du gène codant HNF4-α peuvent induire un diabète de type 1, en réduisant la quantité d'insuline *(Gonzalez et al, 2008)*. Outre ces différents rôles, il a été montré que HNF4-α joue également un rôle dans les processus inflammatoires du foie *(Babeu et Boudreau, 2014)*.

Une étude plus récente sur des ratons de 21 jours, nés de mères recevant un régime carencé en donneurs de méthyles, a rapporté une analyse du génome entier des effets combinés induits par la carence maternelle sur l'épigénome et le transcriptome du foie de la progéniture. Les données montrent que la carence en donneurs de méthyles induit des changements importants dans la méthylation de l'ADN et dans l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, le stress du réticulum endoplasmique, la fonction mitochondriale, la coagulation sanguine, des troubles neurologiques et dans des maladies métaboliques comme les NAFLDs et le diabète. Cette étude montre également que la carence semble induire beaucoup plus de changements dans la transcription des gènes que dans la méthylation de l'ADN ; ceci reflétant probablement le fait que la plupart des changements moléculaires observés sont des événements tardifs et que les événements précoces induits dans la vie fœtale pourraient avoir été perdus *(Chen et al, 2015)*.

1.5.2 Les AFLDs (stéato-hépatopathies alcooliques).

En ce qui concerne les AFLDs (alcoholic fatty liver diseases), l'alcoolisme chronique est depuis longtemps connu pour compromettre le métabolisme des vitamines et en particulier celles impliquées dans le métabolisme des monocarbones, notamment les folates et la vitamine B12 *(Morgan et Levine, 1988 ; Bonjour et al, 1980)*. Cette altération du statut vitaminique engendre

une élévation de la concentration 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, de nombreux travaux expérimentaux ont montré un stress du réticulum endoplasmique lié à une hyperhomocystéinémie, en cas d'alcoolisation aiguë *(Roblin et al, 2007 b)*.

1.5.3 L'hépatocarcinome.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) ou hépatocarcinome est un cancer du foie provenant, dans la plupart des cas, d'une complication de maladies hépatiques préexistantes.

Un déficit en donneurs de méthyles (méthionine, folates et vitamine B12), du à une carence alimentaire ou à une consommation chronique d'alcool, entraîne une diminution de la SAM, principal donneur de méthyles, qui peut potentiellement conduire à une hypométhylation de l'ADN ; cette hypométhylation de l'ADN étant rencontrée dans le CHC (*Hamid et al, 2009*).

Parallèlement, une carence en folates induit des cassures dans l'ADN qui peuvent être accompagnées par une augmentation de survenue de CHC chez l'Homme. Plusieurs mécanismes peuvent créer ces cassures : une accumulation de résidus uraciles dans l'ADN et une déamination *in situ* des résidus cytosine (*Blount et al, 1997*).

De plus, une étude a aussi montré une altération de l'expression d'enzymes du métabolisme des monocarbones (MAT1A, GNMT, BHMT, CBS et MS) chez des patients atteints d'hépatocarcinome (*Avila et al, 2000*). Cependant, les mécanismes moléculaires de cette altération sont encore mal connus.

Ainsi, une déficience chronique en donneurs de méthyles peut agir comme un carcinogène (*Chandar et Lombardi, 1988 ; Poirier, 1994 ; Mikol et al, 1983 ; Ghoshal et Farber, 1984 ; Kuo et al, 2008 ; Welzel et al, 2007*).

2 La programmation fœtale.

2.1 L'hypothèse de Barker.

De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une relation entre des événements pathologiques durant la grossesse et le développement, et plus tard au cours de la vie de l'enfant devenu adulte, l'apparition de maladies cardiovasculaires et métaboliques. Ce phénomène porte le nom de «programmation fœtale».

Ainsi, l'hypothèse de la programmation fœtale propose que l'environnement fœtal, en particulier la nutrition, peut directement influencer le développement embryonnaire et «programmer» la santé de l'enfant à l'âge adulte.

En 1986, Barker a pu observer que les individus nés avec un faible poids avaient un taux de mortalité cardiovasculaire plus élevé une fois l'âge adulte atteint (théorie de Barker). Cette théorie postule que des facteurs nutritionnels pourraient agir durant les phases précoces de la vie et entraîner le risque de souffrir de maladies cardiovasculaires ou d'un syndrome métabolique à l'âge adulte *(Barker et Osmond, 1986 a et b)* (figure 25).

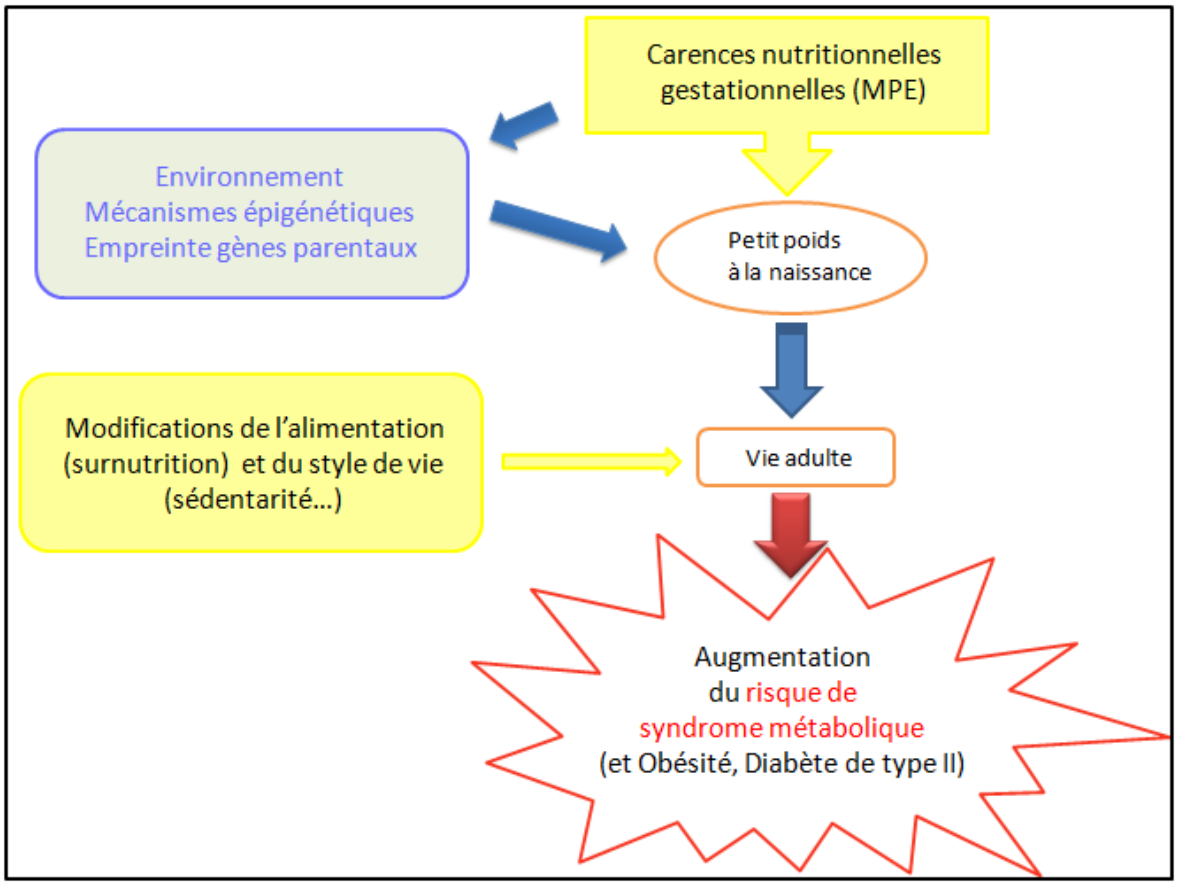


Figure 25 : Hypothèse de Barker sur la programmation fœtale.

Depuis, de nombreuses études épidémiologiques chez l'Homme et expérimentales chez l'animal ont montré qu'il existe une corrélation entre un petit poids de naissance (atteintes périnatales) et de nombreuses maladies de l'adulte, notamment la maladie coronarienne, l'hypertension artérielle, le diabète de type 2, la dyslipidémie et l'obésité *(Fernandez-Twinn et Ozanne, 2006 ; McMillen et Robinson, 2005)* (tableau 3).

Facteurs environnementaux responsables de la programmation fœtale	Pathologies liées à la programmation fœtale
• Restriction alimentaire maternelle – Restriction calorique – Restriction protéique – Restrictions en micronutriments • Substances exogènes – Glucocorticoïdes – Nicotine • Perturbations de la circulation utéro-placentaire	Mortalité par accidents cardiovasculaires Maladie coronarienne Diabète (type 1 et 2) Hypertension Dyslipidémie Obésité Ostéoporose Schizophrénie Cancers (sein ; testicule ; leucémies...)
Hypoxie périnatale Prééclampsie	Hypertension artérielle pulmonaire
Comportement maternel protecteur	Résistance au stress

Tableau 3 : Exemples d'association entre les atteintes périnatales et les maladies de l'adulte (modifié d'après *Bloch et al, 2007*).

Il est intéressant de constater que le risque de développer une pathologie augmente linéairement avec la diminution du poids du bébé.

Pour expliquer ces observations, Barker a proposé l'hypothèse du «thrifty phenotype», littéralement «phénotype économe». Cette hypothèse postule que, quand l'environnement intra-utérin est pauvre en nutriments, le fœtus adapte son métabolisme pour augmenter ses chances de survie après la naissance dans un milieu extra-utérin supposé pauvre. Toutefois, si par la suite cet environnement extra-utérin se révèle plus riche en nourriture que celui prédit, les adaptations programmées pendant la grossesse peuvent être sources de maladies *(Hales et Barker, 2001)*. C'est le cas notamment lorsqu'un individu né dans un pays pauvre immigre dans un pays où la nourriture est abondante ou lorsque des changements socio-économiques rapides dans un pays en voie de développement rendent la nourriture plus riche en calories. Trois principaux mécanismes ont été suggérés : une altération de la croissance de certains organes, un excès de corticoïdes et des modifications épigénétiques.

2.2 Les donneurs de méthyles et la programmation fœtale.

Les donneurs de méthyles jouent un rôle clé dans les interactions entre la nutrition, la programmation fœtale et l'épigénomique *(Guéant et al, 2013 ; Guéant et al, 2014)*. Différentes expérimentations et études de populations ont montré qu'une carence en donneurs de méthyles pourra avoir un impact sur les mécanismes épigénétiques et épigénomiques,

notamment la programmation fœtale, ainsi que sur le retard de croissance intra-utérin *(Forges et al, 2007 ; Stover, 2011).*

En effet, les donneurs de méthyles sont indispensables pour le bon développement du fœtus *(Antony, 2007 ; Kim et al, 2009 ; Smith et al, 2008)*. Le statut maternel en vitamines B9 et B12 influence la méthylation de l'ADN et de l'ARN des embryons ainsi que l'expression des gènes soumis à empreinte chez les jeunes rongeurs *(Guéant et al, 2013).*

Il a été montré que des jeunes rats issus d'une mère carencée en folates et vitamine B12, présentent plusieurs perturbations de leur programmation fœtale. En effet, cette carence induit chez les jeunes rongeurs des cas de stéatose cardiaque et hépatique, des hypertrophies myocardiques, des hépatocarcinomes *(Blaise et al, 2007 ; Garcia et al, 2011 ; Pooya et al, 2012 ; Guéant et al, 2013 ; Guéant et al, 2014),* des malformations congénitales du tube neural ainsi que des cardiopathies congénitales *(Blom et Smulders, 2011 ; Guéant et al, 2003 ; Weingartner et al, 2007).* La carence en donneurs de méthyles est également associée à une N-homocystéinylation des protéines structurales de l'estomac, une inflammation ainsi qu'une apoptose des cellules gastriques *(Bossenmeyer-Pourié et al, 2013).* Cette même programmation fœtale entraîne également des troubles au niveau du cerveau. En effet, une carence maternelle en folates et vitamine B12 affecte les cellules neuronales des ratons (prolifération, migration, différenciation, survie, transport vésiculaire et plasticité synaptique) ; ces modifications apparaissant suite à des variations épigénomiques et épigénétiques ainsi qu'une importante augmentation de la N-homocystéinylation des protéines neuronales *(Akchiche et al, 2012 ; Blaise et al, 2009 ; Kruman et al, 2005 ; Zhang et al, 2009).* Elle engendre des difficultés d'apprentissage et une faible coordination locomotrice *(Blaise et al, 2007 ; Daval et al, 2009 ; Guéant et al, 2013)*. La carence en folates et en vitamine B12 est également liée à l'apparition de maladies neurodégénératives *(Guéant et al, 2013).*

2.3 Le syndrome métabolique.

L'hypothèse de Barker suppose qu'une carence nutritionnelle gestationnelle entraînerait, entre autres, un risque de développer un syndrome métabolique.

Le syndrome métabolique désigne une combinaison d'anomalies métaboliques reliées entre elles et dont la signification clinique et l'origine exacte restent controversées. Malgré l'intérêt scientifique croissant suscité par ce syndrome, notamment en raison du problème majeur de santé publique qu'il soulève lié au vieillissement de la population et à l'évolution des modes de vie, sa définition comme ses critères diagnostiques sont encore peu harmonisés.

Les définitions les plus récentes du syndrome métabolique sont celles de la Fédération Internationale des Diabétiques (FID, 2006) ainsi que l'American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI, 2006). Différents groupes d'experts de la FID et de l'AHA/NHLBI ont réfléchi à l'amélioration des définitions pré-existantes et ont proposé un consensus international.

D'après Alberti et al, une définition commune a pu être déterminée, excluant l'obésité abdominale comme pré-requis obligatoire. Ainsi, la présence de trois sur les cinq critères suivants permet de définir le syndrome métabolique *(Alberti et al, 2009)* (figure 26):

- Tour de taille élevé (en fonction des ethnies et du sexe).
- Triglycérides élevés ≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L) ou traitement pour réduire les triglycérides.
- HDL-C réduit < 40 mg/dL (1 mmol/L) chez l'homme et < 50 mg/dL (1,3 mmol/L) chez la femme ou traitement pour réduire les HDL-C.
- Tension élevée ≥ 130 mmHg (systole) / 85 mmHg (diastole) ou traitement de l'hypertension.
- Glucose à jeun élevé ≥ 100 mg/dL ou traitement du diabète.

Cette nouvelle définition reconnaît que le risque associé au tour de taille varie en fonction des populations.

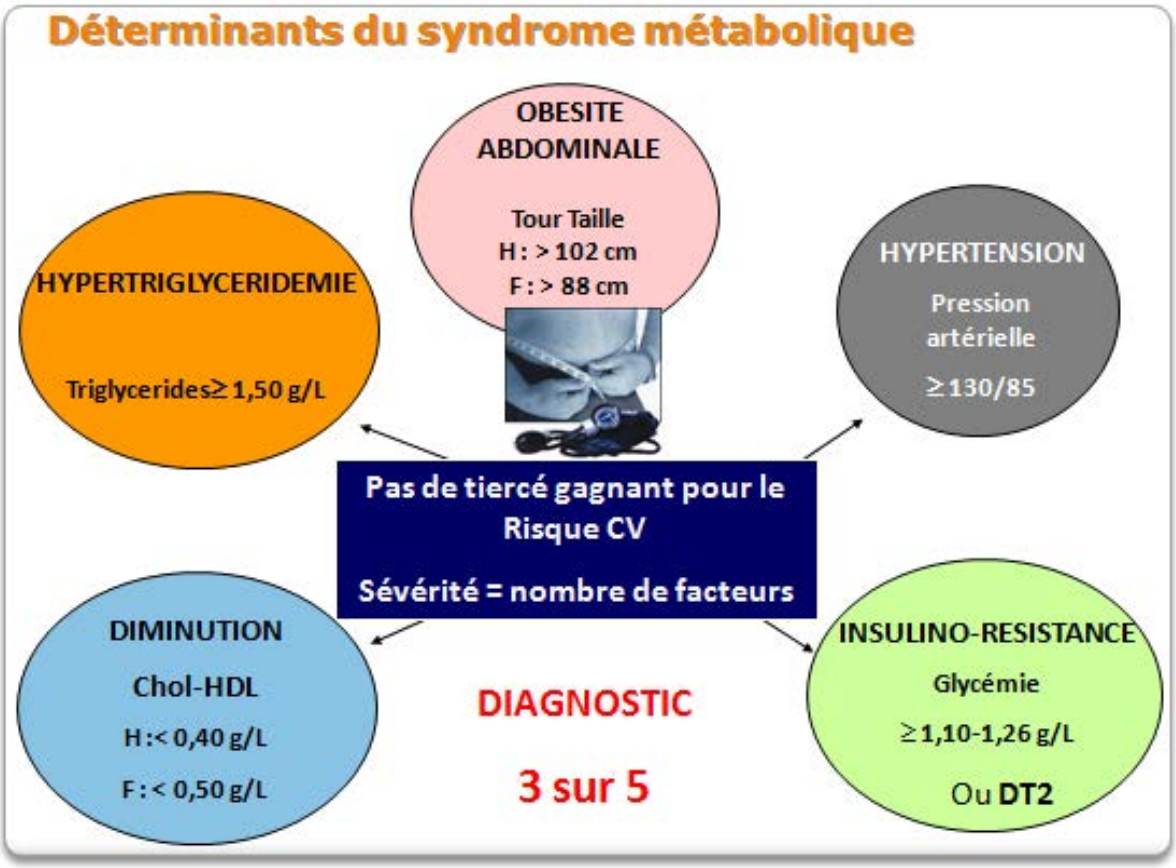


Figure 26 : Les critères permettant de définir le syndrome métabolique (tiré de *Andreelli et Ziegler, 2005)*.

Connaître la prévalence du syndrome métabolique est fondamental si l'on souhaite estimer l'ampleur de ce phénomène et ainsi mettre en place une politique de santé publique adaptée et réaliser des comparaisons entre les populations. Cependant, les études publiées diffèrent sur la sélection de la population, l'année d'étude et la définition du syndrome métabolique, ce qui rend difficile l'analyse de la prévalence et entraîne des variations épidémiologiques importantes. Les différentes études montrent que le syndrome métabolique chez l'adulte touche aussi bien les pays industrialisés que les pays en voie de développement. L'Amérique, l'Europe, l'Australie, l'Iran et la Turquie sont les plus touchés par le syndrome métabolique, avec une prévalence touchant environ un quart de leur population. La prévalence du syndrome métabolique varie de 10 à 20 % en France et suit un gradient Nord/Sud avec une prévalence plus élevée dans le Nord *(Lameira et al, 2008)*. De plus, la prévalence du syndrome métabolique semble être dépendante de l'âge d'après plusieurs études. En effet, Balkau et al ont démontré, dans la population française, une augmentation de la prévalence du syndrome métabolique avec l'âge : 5,6 % chez les 30-39 ans, 10 % chez les 50-59 ans et 17,5 % chez les 60-64 ans *(Balkau et al, 2003)*. Cette augmentation s'expliquerait par l'augmentation de tous les composants du syndrome métabolique avec l'âge. Il semblerait également que la prévalence du syndrome métabolique touche davantage les hommes.

Le syndrome métabolique est lié à un risque élevé de développer des maladies cardiovasculaires et/ou un diabète de type 2. En effet, différentes études épidémiologiques ont prouvé que le syndrome métabolique est associé à un risque relativement élevé d'accidents cardiovasculaires *(Ford, 2005 ; Gami et al, 2007)*. Le syndrome métabolique est également associé à un risque accru de diabète de type 2, quelque soit la population *(Ford et al, 2008)*.

Les causes du syndrome métabolique sont encore peu connues mais feraient intervenir des facteurs génétiques (déterminant la corpulence, la répartition de la masse grasse, l'hyperinsulinisme, les différents métabolismes) ainsi que des facteurs liés au mode de vie (la sédentarité, le tabagisme, l'excès de calories apportées) *(Andreelli et Ziegler, 2005)*. Actuellement, aucun argument décisif en faveur d'une cause unique responsable de l'ensemble des anomalies du syndrome métabolique n'existe. L'obésité abdominale et l'insulino-résistance font partie intégrante des mécanismes incriminés dans la genèse et l'évolution du syndrome métabolique vers des complications cardiovasculaires et le diabète de type 2. Cependant, l'obésité abdominale semble être l'hypothèse la plus retenue puisqu'elle apparaît selon plusieurs études comme l'élément central du syndrome métabolique *(Maison et al, 2001 ; Palaniappan et al, 2004 ; Hillier et al, 2006) et* précéderait même l'apparition des autres

composants du syndrome *(Cameron et al, 2008)*. Le tissu adipeux viscéral est relié indépendamment à tous les composants du syndrome métabolique et est reconnu comme métaboliquement actif et à l'origine de désordres métaboliques ; ceci suggérant son implication dans la physiopathologie du syndrome métabolique. L'augmentation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux viscéral conduit à une libération plus importante d'acides gras libres et contribue ainsi à divers troubles des métabolismes glucidique et lipidique *(Rebuffé-Scrive et al, 1992)*. De plus, son activité métabolique se traduit par la production d'autres produits comme des facteurs pro-thrombiques et des cytokines pro-inflammatoires, à l'origine d'éventuelles complications cardiovasculaires. Mais cette augmentation d'acides gras libres pourrait également entraîner une accumulation de lipides et de cytokines pro-inflammatoires au niveau du foie pouvant conduire à une stéato-hépatopathie non-alcoolique (NAFLD).

Partie 4 : La stéato-hépatopathie non-alcoolique (SHNA ou NAFLD).

1 L'anatomie, l'histologie et la physiologie du foie.

1.1 L'anatomie du foie.

Le foie est une glande annexe du tube digestif qui assure trois fonctions vitales : une fonction d'épuration, une fonction de synthèse et une fonction de stockage. C'est la glande la plus volumineuse de l'organisme, avec 2 % du poids corporel, soit une moyenne de 1 500 grammes. Le foie est logé dans l'hypochondre droit, la loge sous-phrénique droite, la partie supérieure du creux épigastrique puis atteint l'hypochondre gauche. Il se divise en quatres lobes inégaux ; le lobe hépatique droit est le plus volumineux, le lobe hépatique gauche est la partie la plus étroite de l'organe (figure 27). Entre ces deux lobes majeurs, on distingue le lobe carré et le lobe caudé. Chaque lobe du foie est divisé en segments, ce qui mène à un total de 8 segments. La vésicule biliaire est attachée au foie à la limite du lobe carré et du lobe hépatique droit. Le lobe carré et le lobe caudé sont séparés par un sillon appelé le hile du foie. C'est au niveau du hile que la veine porte et l'artère hépatique pénètrent dans le foie et que passent les canaux biliaires majeurs.

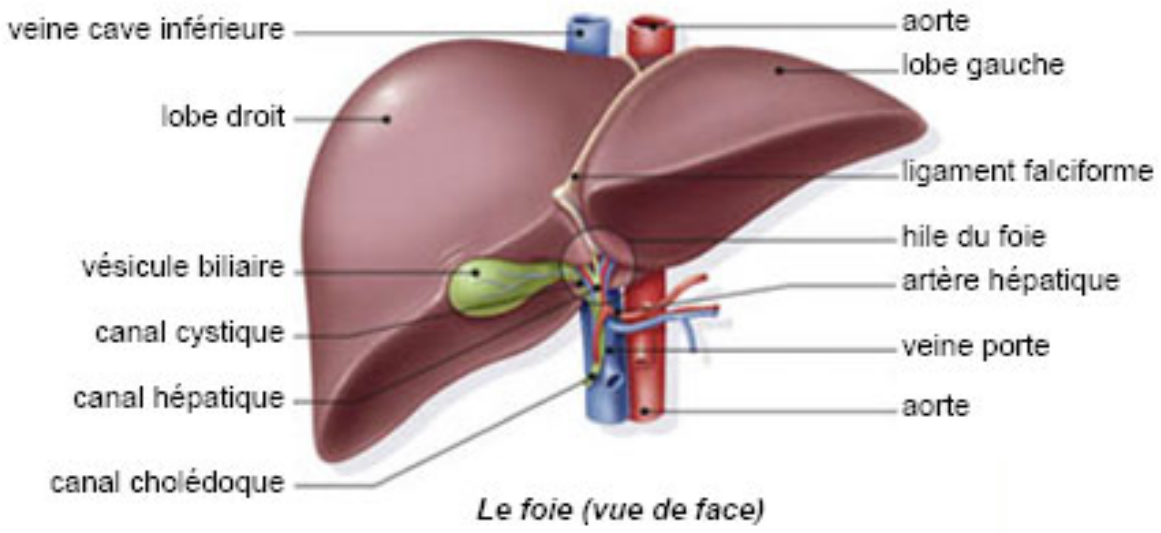


Figure 27 : Schéma de l'anatomie du foie (tiré de AMFE-Association Maladies Foie Enfants).

1.2 La structure du foie.

Le foie est constitué essentiellement de cellules hépatiques (hépatocytes) organisées en travées (travées de Remak) autour des sinusoïdes (capillaires hautement perméables où le sang circule). L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique (figure 28).

Les lobules hépatiques sont des groupements de cellules hépatiques, de forme polyédrique (hexaèdre régulier), limités à leurs angles par les espaces portes et centrés par la veine centro-lobulaire vers laquelle convergent des sinusoïdes radiaires. Chaque lobule est constitué de milliers de cellules hépatiques. Les lobules hépatiques sont séparés les uns des autres par des travées de tissu conjonctif, auxquelles on donne le nom d'espace porte ou espace de Kiernan, où cheminent des vaisseaux et des canaux biliaires intra-hépatiques. Chaque espace porte réunit une veine porte (vaisseau le plus large), un canal biliaire et une artère (figure 29).

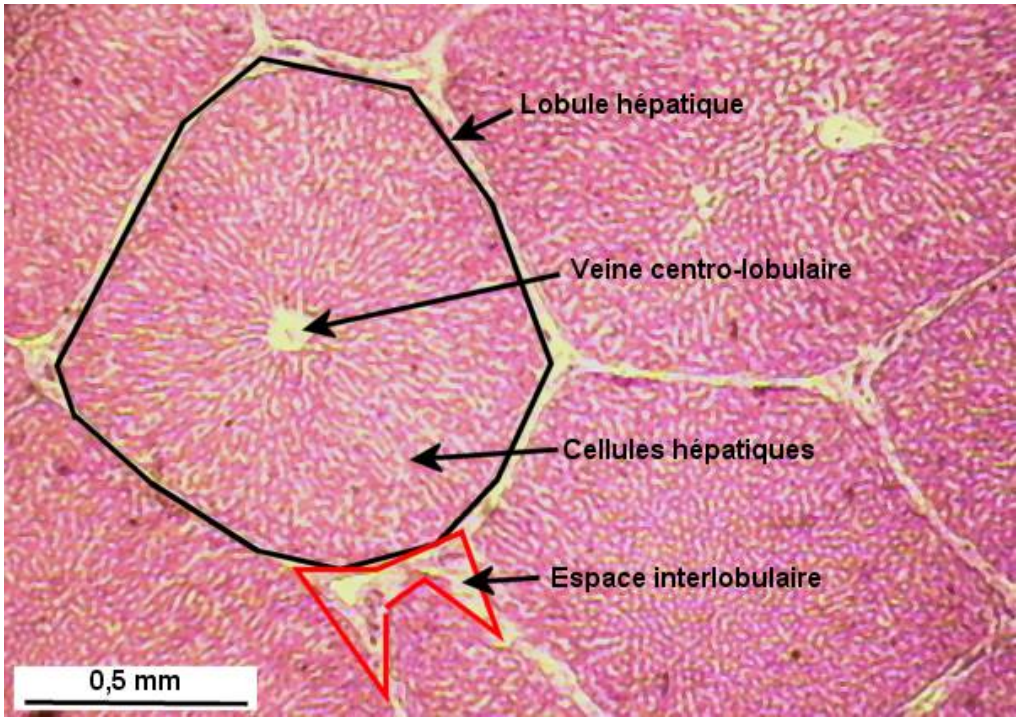


Figure 28 : Photographie d'une coupe histologique d'un foie de porc (vu sur http://www.ac rennes.fr/pedagogie/svt).

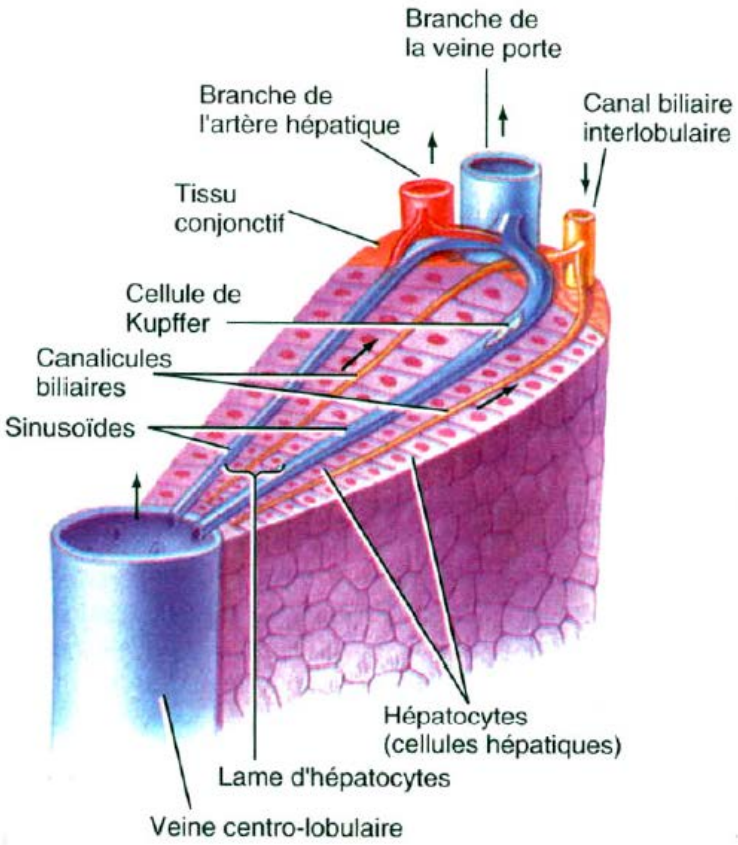


Figure 29 : La structure d'un segment d'un lobule hépatique (tiré du cours de Bernard Massonnet, sur http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/).

1.3 La vascularisation du foie.

Les échanges du foie avec le reste de l'organisme se font pour la plupart à travers sa double irrigation sanguine (veine porte et artère hépatique), qui se termine par une multitude de capillaires (sinusoïdes) jusqu'à l'intérieur du foie (figure 30).

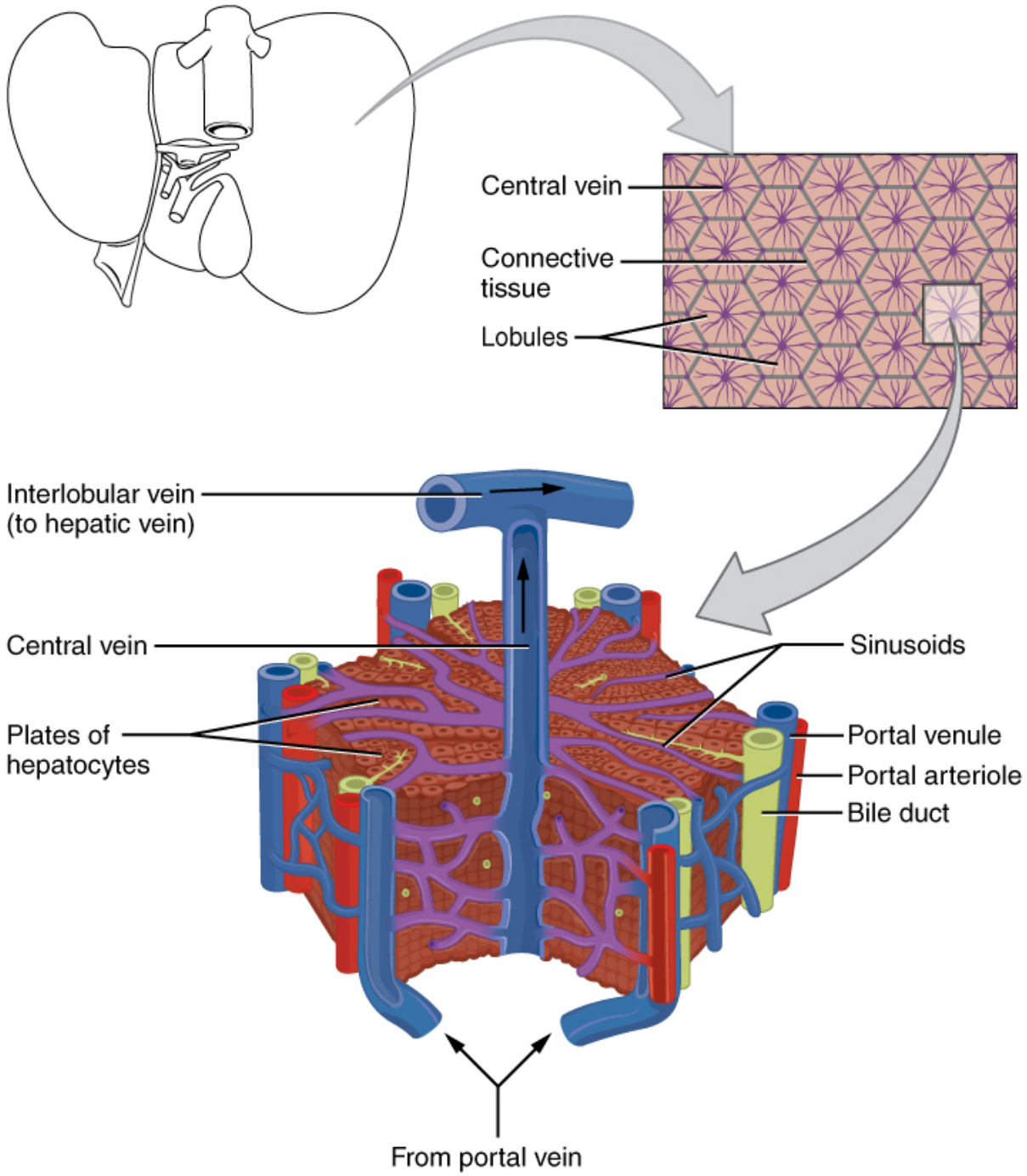


Figure 30 : Schéma de l'anatomie microscopique du foie (vu sur OpenStax College- Anatomy & Physiology, Connexions Web site, http://cnx.org/content/col11496/1.6/).

Le sang porte est mélangé au sang artériel à l'entrée des sinusoïdes. Les capillaires sinusoïdes sont formés par des cellules fenestrées (0,2 µm) ce qui permet aux grosses molécules (250 000 daltons) d'entrer au contact direct des hépatocytes dans l'espace de Disse, qui est situé entre les capillaires et les lames d'hépatocytes (figure 31). La composition des liquides remplissant l'espace de Disse est identique à celle du plasma sanguin.

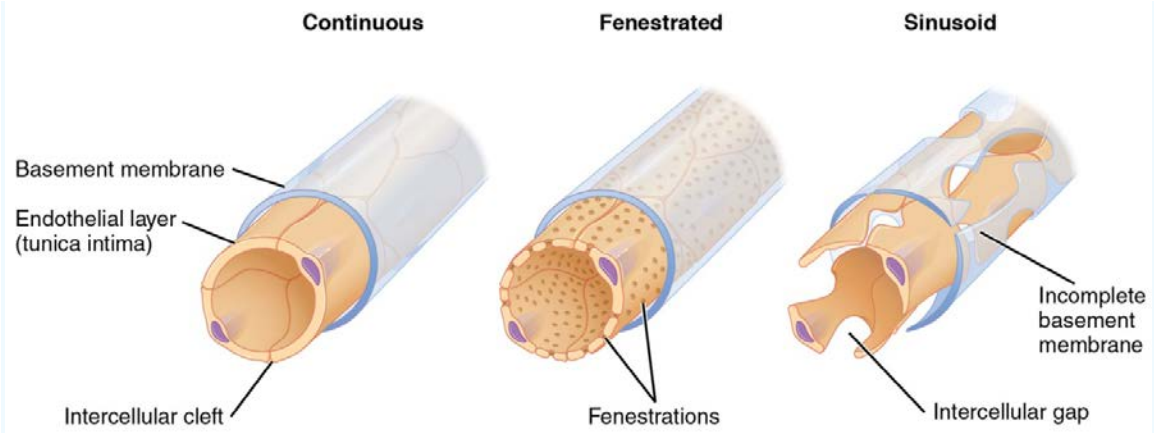


Figure 31 : Schéma comparant les capillaires continus, fenestrés et les sinusoïdes (tiré de OpenStax College- Anatomy & Physiology, Connexions Web site, http://cnx.org/content/col11496/1.6/).

L'artère hépatique apporte du sang artériel qui oxygène le tissu hépatique ; son produit veineux est drainé par les veines hépatiques. De plus, la veine porte hépatique amène au foie du sang provenant des veines ayant drainé l'intestin, véhiculant les produits de la digestion absorbés par les capillaires intestinaux (notamment acides aminés, lipides, glucides), de même que du sang ayant drainé la rate et véhiculant les produits de dégradation de l'hémoglobine. Après passage dans le foie, ce sang est également drainé par les veines hépatiques ; celles-ci se jetant dans la veine cave inférieure (figure 32).

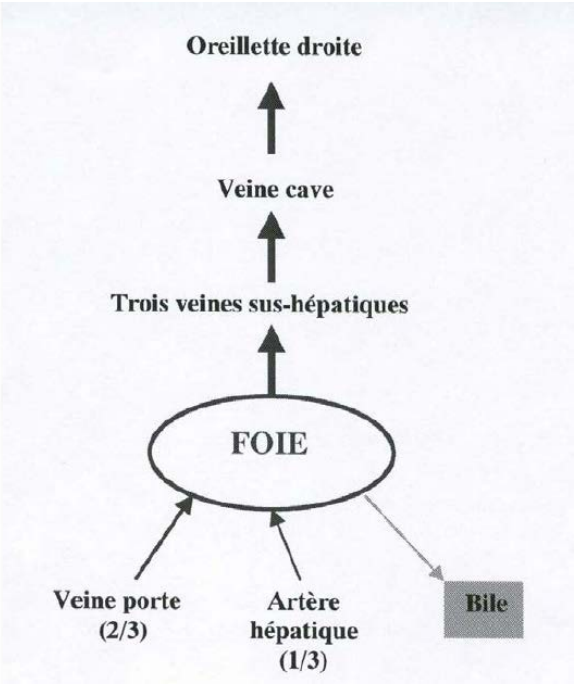


Figure 32 : Les circulations hépatiques artérielle et veineuse (tiré du cours de Bernard Massonnet sur http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/).

1.4 L'histologie du foie.

Les cellules les plus importantes présentes dans le foie sont les hépatocytes (environ 65 % des cellules) (figures 33 et 34).

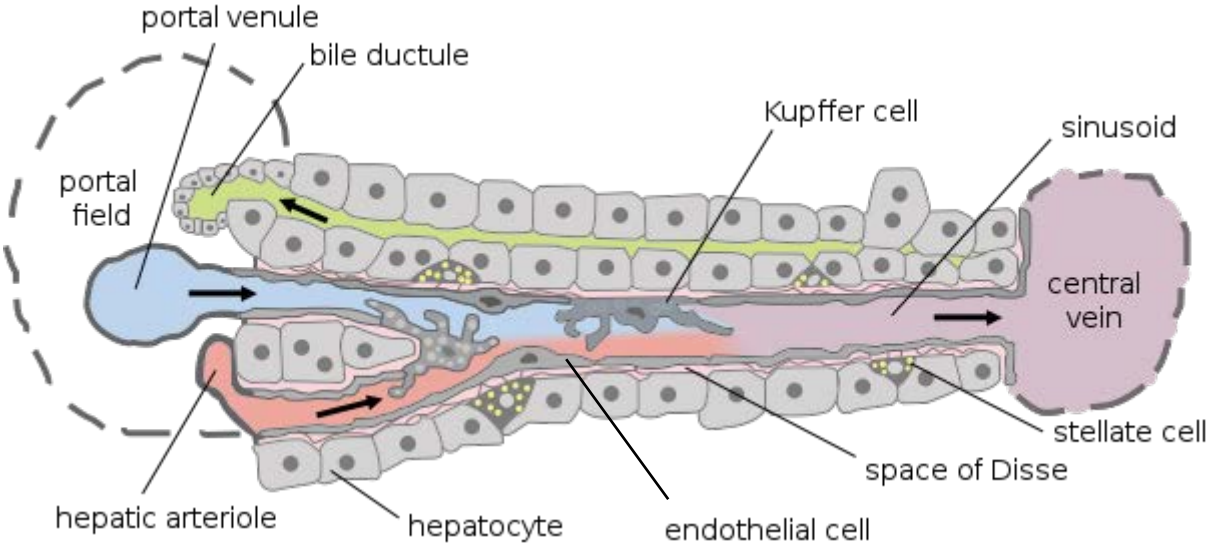


Figure 33 : Schéma d'un lobule hépatique montrant les différentes structures cellulaires du foie (modifié d'après *Frevert et al, 2005*).

Les cellules sinusoïdales sont des cellules endothéliales et représentent environ 20 % de la totalité des cellules du foie. Elles bordent la paroi des capillaires sinusoïdes et sont caractérisées, par rapport à d'autres cellules endothéliales, par le fait qu'elles ne reposent pas sur la membrane basale et qu'elles sont lâches : cela favorise les échanges entre le secteur sanguin et les cellules hépatiques (figures 33 et 34).

Les cellules de Küpffer représentent environ 10 % des cellules du foie (figures 33 et 34). Ce sont des macrophages résidents (différents des macrophages présents dans la circulation sanguine et transportés entre les différents organes). Elles sont fixées aux cellules endothéliales et restent dans la lumière des capillaires sinusoïdes. Elles ont pour rôle de phagocyter les particules étrangères qui ont traversé la barrière intestinale avant qu'elles ne gagnent la circulation générale.

Les cellules étoilées hépatiques (HSC) ou cellules stellaires représentent environ 5 % des cellules du foie. Ces cellules se trouvent dans les espaces de Disse, espaces compris entre les

cellules sinusoïdales et les hépatocytes (figure 33)**.** Elles stockent des graisses, notamment de la vitamine A, et ont une fonction physiopathologique. Quand elles sont activées par un processus inflammatoire, ces cellules se transforment en myofibroblastes, perdent leur réserve de vitamine A et synthétisent de la matrice extracellulaire (tissu fibreux) qui au niveau du foie est un indicateur de lésion. Sa progression peut se traduire par une aggravation de maladie du foie où le stade ultime est la cirrhose hépatique.

D'autres types cellulaires sont également présents dans le foie, les lymphocytes hépatocytaires et les cellules des canaux biliaires (cholangiocytes).

Toutes ces cellules contrôlent la composition du sang qui quitte les hépatocytes et la captation des nutriments qui sont prélevés, stockés ou utilisés par les hépatocytes. Suite aux processus de détoxification, de dégradation, les nutriments vont être sécrétés dans la bile. Les hépatocytes produisent également les sels biliaires.

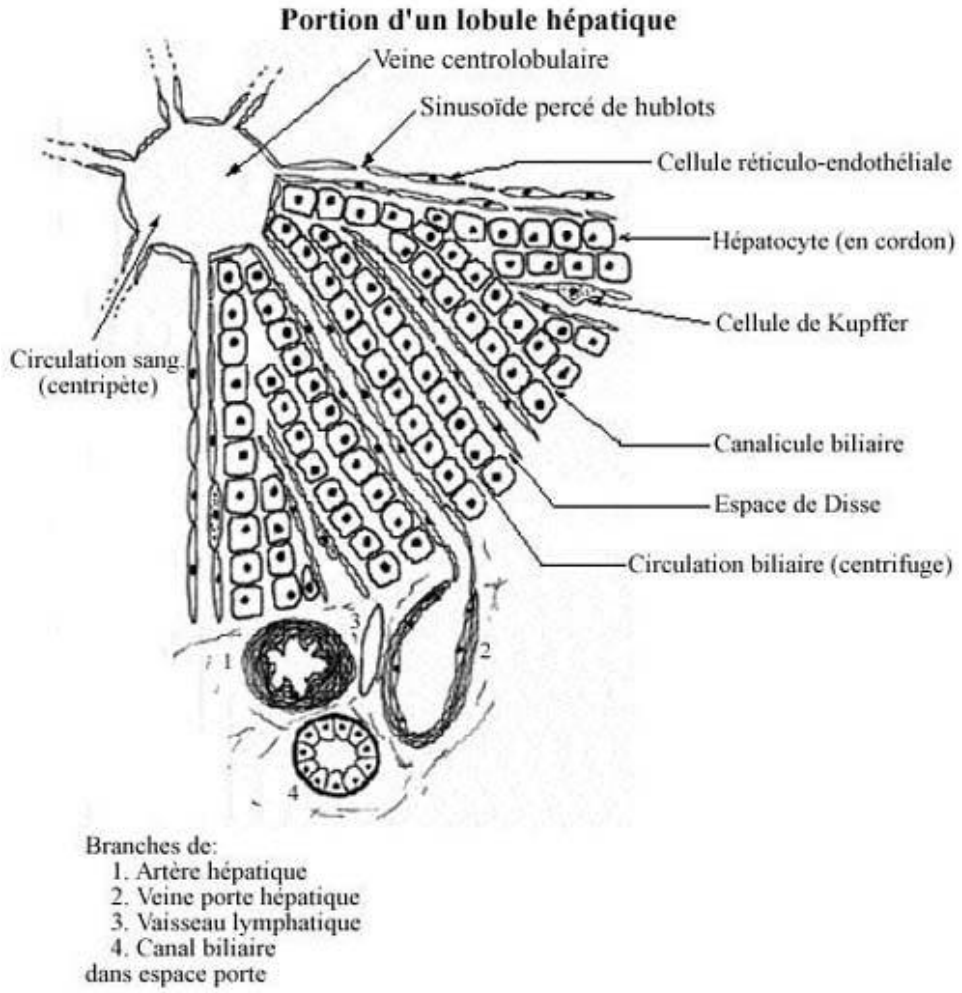


Figure 34 : Schéma récapitulatif de la structure d'un lobule hépatique (vu sur http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2412/Chapitre14.html).

1.5 Les grandes fonctions du foie.

Le foie assure des fonctions endocrine (synthèse de molécules à visée sanguine) et exocrine (synthèse de molécules à visée externe, en l'occurrence, digestive), le stockage des nutriments et la détoxification de l'organisme.

1.5.1 Le stockage et la livraison des nutriments.

Grâce à la circulation porte qui amène les produits de digestion intestinale au foie, les hépatocytes n'accomplissent pas qu'une fonction glandulaire (exocrine et endocrine). Effectivement, les nutriments peuvent être également stockés, éventuellement transformés, puis relargués dans la circulation générale.

1.5.1.1 Les glucides.

Le glucose traverse la membrane sinusoïdale par l'intermédiaire d'un transporteur protéique de faible affinité, Glut2. Le foie est responsable de l'homéostasie glucidique car cet organe peut à la fois capter le glucose sanguin, le stocker sous forme de glycogène (glycogénogenèse) et ensuite le redistribuer en fonction des besoins de l'organisme mais aussi synthétiser le glucose (néoglucogenèse). Au besoin, le foie retransforme le glycogène en glucose (glycogénolyse), sous l'action de l'hormone pancréatique glucagon, et le largue dans la circulation sanguine. Les hépatocytes contiennent de nombreuses mitochondries, ce qui reflète le rôle important qu'ils jouent dans les activités métaboliques.

1.5.1.2 Les protéines.

Le foie joue également un rôle essentiel dans la synthèse et le catabolisme des protéines. Les protéines sont apportées par l'alimentation et dégradées essentiellement en acides aminés. Le foie capte ces acides aminés et les utilise principalement pour la synthèse protéique (albumine, protéines de coagulation, facteurs de croissance...). Les protéines n'étant pas spécifiques au foie, elles sont relarguées dans la circulation générale et constituent essentiellement les protéines plasmatiques. Le principal déchet toxique qui résulte du catabolisme des protéines est l'ammoniaque ($NH4^+$). Le foie transforme l'ammoniaque en urée, qui est éliminée par le rein, ou en glutamine.

1.5.1.3 Les lipides.

Le foie est un organe central du métabolisme et du transport des lipides, dont il assure la distribution dans l'organisme. En situation normale, il capte les acides gras (AG) résiduels plasmatiques, concentrés au sein de particules d'origine digestive, nommées chylomicrons (CM). Les hépatocytes les métabolisent *via* deux voies : la β-oxydation pour produire de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) ou l'estérification pour synthétiser des lipides plus volumineux, les triglycérides (TG), eux-mêmes stockés dans le foie ou exportés aux tissus périphériques.

Les adipocytes sont les cellules du tissu adipeux qui permettent le stockage des TG. Lorsque les capacités de stockage des adipocytes sont dépassées, dans un contexte d'obésité et en particulier avec la graisse viscérale, les acides gras libres (AGL) parviennent par voie portale au foie où ils sont catabolisés par la β-oxydation. Lorsque cette voie est elle-même dépassée, les AGL en excès sont stockés sous forme de triglycérides au sein d'organelles cytoplasmiques de stockage, appelées gouttelettes lipidiques, dans les organes tels que le foie, le muscle et le pancréas.

Le foie est le principal organe de contrôle dans l'homéostasie du cholestérol. La synthèse du cholestérol a lieu majoritairement dans le foie mais le cholestérol peut également arriver au foie directement après son passage dans la circulation générale, s'il est absorbé par les chylomicrons (CM). Il sera alors stocké dans le foie sous forme de cholestérol estérifié ou remis en circulation. Le cholestérol étant un stérol (hydrophobe), il n'est donc pas soluble dans le sang. Pour être assimilé, il doit alors être incorporé et transporté par des lipoprotéines, constituées de protéines et de lipides, synthétisées par le foie. Les lipoprotéines sont extrudées à travers la membrane sinusoïdale, vont passer dans le sang et amènent le cholestérol vers les tissus périphériques pour l'utilisation du cholestérol par les autres tissus. Ces lipoprotéines peuvent être des VLDL (very low density lipoprotein) ou des HDL (high density lipoprotein) (figure 35).

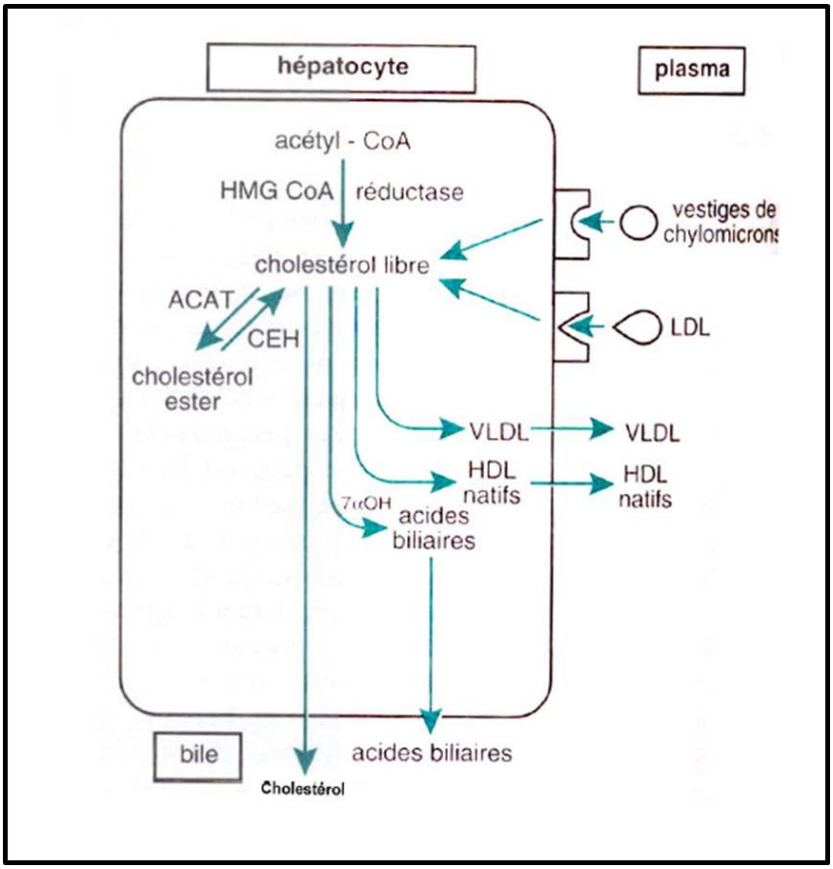


Figure 35 : Le métabolisme du cholestérol dans le foie (tiré du cours de Bernard Massonnet, sur http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/).

Les lipoprotéines à basse densité (ou LDL pour low density lipoprotein) ont un rôle dans le transport du cholestérol. En effet, elles transportent le cholestérol (ainsi que des triglycérides et des vitamines liposolubles) vers les cellules de l'organisme qui en ont besoin. La synthèse des VLDL est réalisée de façon continue par les cellules hépatiques permettant la sécrétion permanente des triglycérides de synthèse endogène. Les VLDL sont transformées en IDL (intermediary density lipoprotein) puis en LDL dans la circulation sanguine (figure 36).

Les lipoprotéines à haute densité (ou HDL) ont un rôle de recyclage du cholestérol. En effet, elles déchargent les artères et les tissus extra-hépatiques du cholestérol oxydé et le ramènent vers le foie où il sera dégradé (figure 36).

Le foie permet l'élimination du cholestérol en excès par excrétion dans la bile sous forme d'acides biliaires (figure 35). Le foie est le seul organe pouvant éliminer le cholestérol.

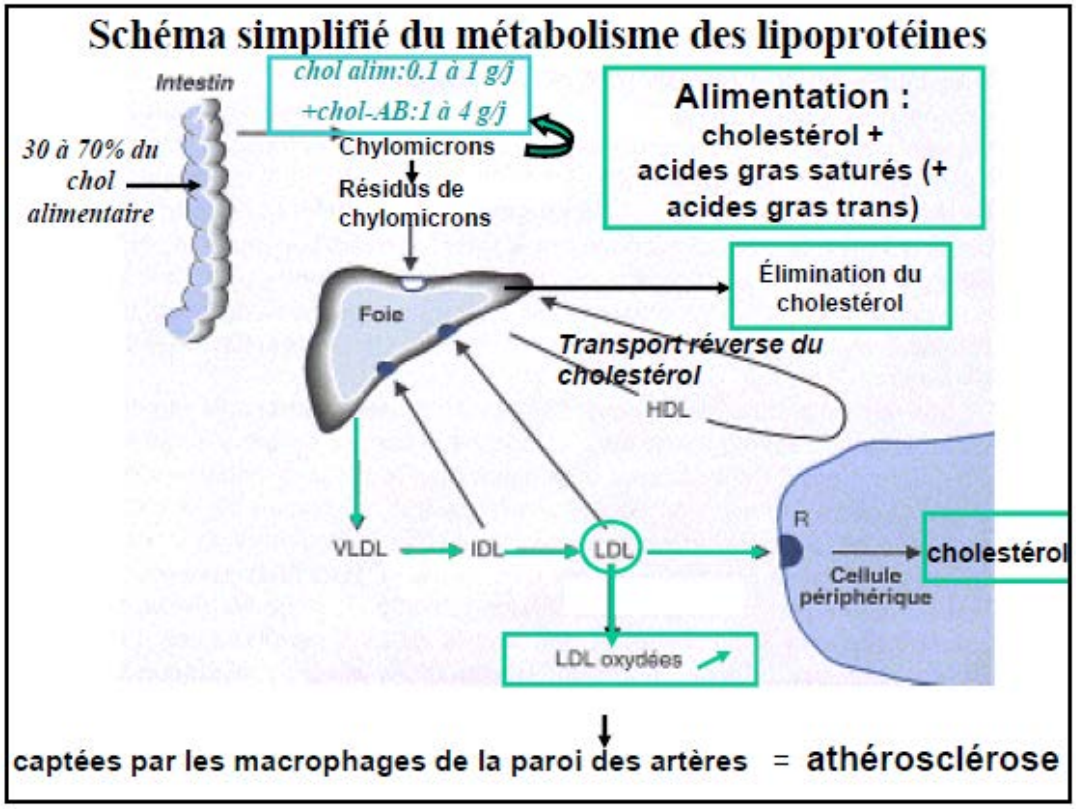


Figure 36 : Schéma récapitulatif du métabolisme des lipoprotéines (tiré du cours de M-A Carbonneau, sur http://www.med.univ-montp1.fr/).

1.5.2 La production et l'excrétion de la bile.

La bile représente la fonction exocrine du foie. C'est une substance jaunâtre et aqueuse, contenant de l'eau, des électrolytes et des substances organiques : sels biliaires, phospholipides, cholestérol et bilirubine (produit de dégradation de l'hème). La bile est produite en continue par les hépatocytes et sécrétée dans les canalicules puis les ductules. Elle est drainée par les canaux hépatiques et stockée dans la vésicule biliaire, où sa composition est modifiée (phénomène de réabsorption et addition de mucus). La bile est ensuite excrétée dans les canaux biliaires. Ces canaux se regroupent pour former le canal cholédoque qui sort du foie le long de la veine porte et se déverse dans le duodénum après avoir rejoint le canal pancréatique; la vésicule biliaire étant en dérivation de ce canal (figure 37). Les acides biliaires et d'autres composants de la bile interviennent dans la digestion des graisses qui se déroule dans l'intestin grêle. La bile a aussi pour fonction de transporter jusqu'à l'intestin les produits liposolubles à éliminer après leur passage dans le foie. Chez le rat, il n'y a pas de vésicule biliaire mais les grands canaux biliaires jouent un rôle analogue.

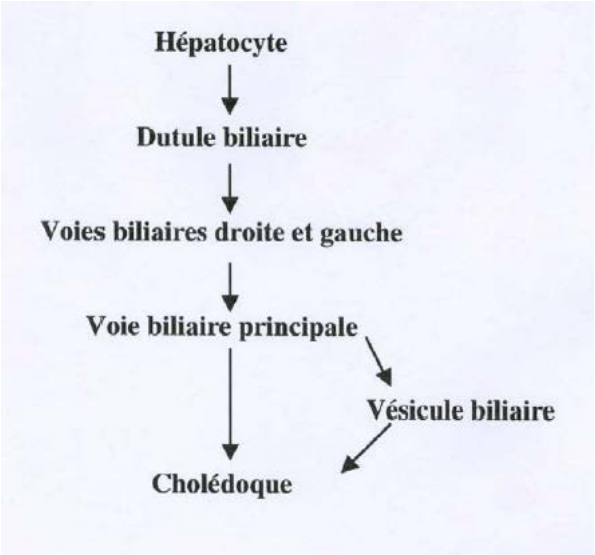


Figure 37 : Voies empruntées par la bile de l'hépatocyte jusqu'au canal cholédoque, en passant par la vésicule biliaire (tiré du cours de Bernard Massonnet, sur http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/).

1.5.3 Le traitement des déchets.

Le foie accomplit, tout comme le rein, la tâche de détoxification de l'organisme. La détoxification est le métabolisme de désactivation et d'excrétion de molécules toxiques actives de l'organisme et de xénobiotiques (molécules étrangères au métabolisme). Un certain nombre de substances qui sont soit endogènes (produits par le métabolisme cellulaire), soit exogènes (apportées par l'alimentation (dont les médicaments)) sont des déchets organiques. Ces substances peuvent être potentiellement toxiques pour l'organisme, d'où leur élimination.

Lorsque ces substances toxiques arrivent au foie, le rôle de ce dernier sera de les dégrader en produits non toxiques. Les produits liposolubles sont reversés dans la bile, puis dans l'intestin et éliminés dans les selles. Les produits hydrosolubles sont reversés dans le sang, qui les mène jusqu'aux reins où ils seront éliminés par les urines. Les hépatocytes et les macrophages (cellules de Küpffer) absorbent et dégradent ces substances toxiques.

Les réactions de détoxification se déroulent le plus souvent dans le foie et en deux temps : les réactions de phase I permettent l'inactivation des substrats ; les réactions de phase II rendent le composé plus hydrosoluble, plus polaire pour être mieux excrété dans la bile, ou les urines. Le foie élimine, entre autres, l'ammoniaque. La dégradation des protéines par l'organisme produit de l'ammoniaque ($NH4^+$) qui peut être éliminé de deux façons par le foie : en urée par les hépatocytes péri-portaux ou en glutamine par les hépatocytes péri-hépatiques. L'alcool

(éthanol) ingéré parvient aussi pour l'essentiel jusqu'au foie. Absorbé par les cellules hépatiques, il est transformé en acétaldéhyde puis en acétate. Ces substances sont reversées dans le sang et éliminées par voie rénale. Mais l'éthanol et l'acétaldéhyde ont un effet toxique sur les cellules hépatiques : elles possèdent des propriétés chimiques qui perturbent gravement leur fonctionnement, et peuvent entraîner une stéatose hépatique. Les hormones stéroïdes et les médicaments sont également métabolisés par le foie.

2 Les caractéristiques de la NAFLD.

Le foie est un organe essentiel à la vie chez tous les Mammifères. Il est un organe central du métabolisme énergétique et des substances xénobiotiques auxquelles l'individu est exposé. Le foie peut être la cible d'agressions diverses telles que les virus, l'alcool ainsi que les substances chimiques présentes dans l'alimentation ou l'environnement de vie. Le parenchyme hépatique peut réagir à ces agressions de façon aigüe, aboutissant a une hépatite fulminante (pouvant s'avérer létale en l'absence de transplantation), mais également, comme on l'observe souvent, par une réponse chronique caractérisée par le développement d'une stéatose ou par des degrés variables de nécrose hépatocytaire, d'infiltration tissulaire des cellules inflammatoires et de fibrose. La progression de ces conditions pathologiques peut aboutir au développement d'une cirrhose hépatique voire d'un carcinome hépatocellulaire (figure 38).

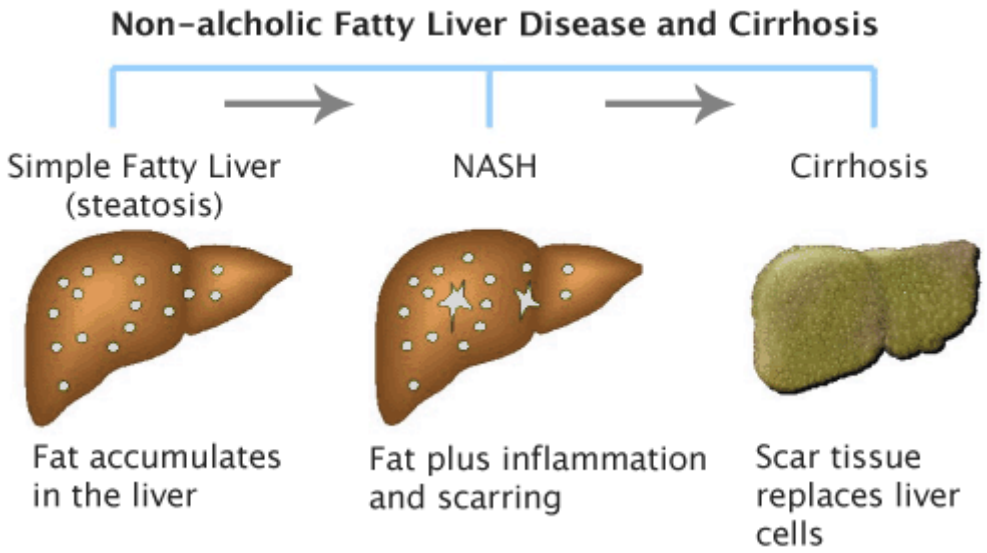


Figure 38 : Spectre évolutif des stéato-hépatopathies non-alcooliques (SHNA ou NAFLD) (modifié de *Liver Condition in Obese Patients May Not Increase Risk of Death (Medtalk)*). *Ce spectre comprend la stéatose simple (SS), avec une accumulation lipidique dans > 5% des*

hépatocytes, la stéato-hépatite non-alcoolique (NASH) avec l'apparition de lésions nécrotico-inflammatoires, voire de fibrose, dont l'extension à l'ensemble du parenchyme hépatique mène à la cirrhose.

La stéatose hépatique est définie par une accumulation d'acides gras libres (AGL) et de triglycérides (TG) dans le cytoplasme des hépatocytes, au sein de vacuoles lipidiques ; les hépatocytes n'en contenant normalement que des traces non observables en microscopie optique *(Burt et al, 1998)*. Elle peut être diffuse ou, plus spécifiquement, localisée au niveau centro-lobulaire. Deux types histologiques différents de stéatose ont été mis en évidence, reconnaissables selon la taille des vacuoles intra-hépatocytaires et qui sont le plus souvent de mécanismes physiopathologiques distincts :

- la stéatose macro-vésiculaire ou macro-vacuolaire, est celle majoritairement observée en cas de NAFLD. Elle correspond histologiquement à une large vacuole lipidique, unique et refoulant le noyau cellulaire. Bénigne à court terme, elle évolue lentement et rarement vers la fibrose et la cirrhose lorsqu'elle est isolée (figure 39).

- la stéatose micro-vésiculaire ou micro-vacuolaire est une accumulation de microgouttelettes lipidiques, respectant le noyau des hépatocytes. Isolée, elle est relativement rare et potentiellement sévère, du fait du risque d'insuffisance hépatique sous-jacente. Les acides gras (AG) ont subi alors une estérification accrue en triglycérides et s'accumulent dans l'hépatocyte. Elle pourrait également être un état précurseur d'une stéatose macro-vésiculaire, par fusion des microgouttelettes *(Murphy et al, 2009)* (figure 39).

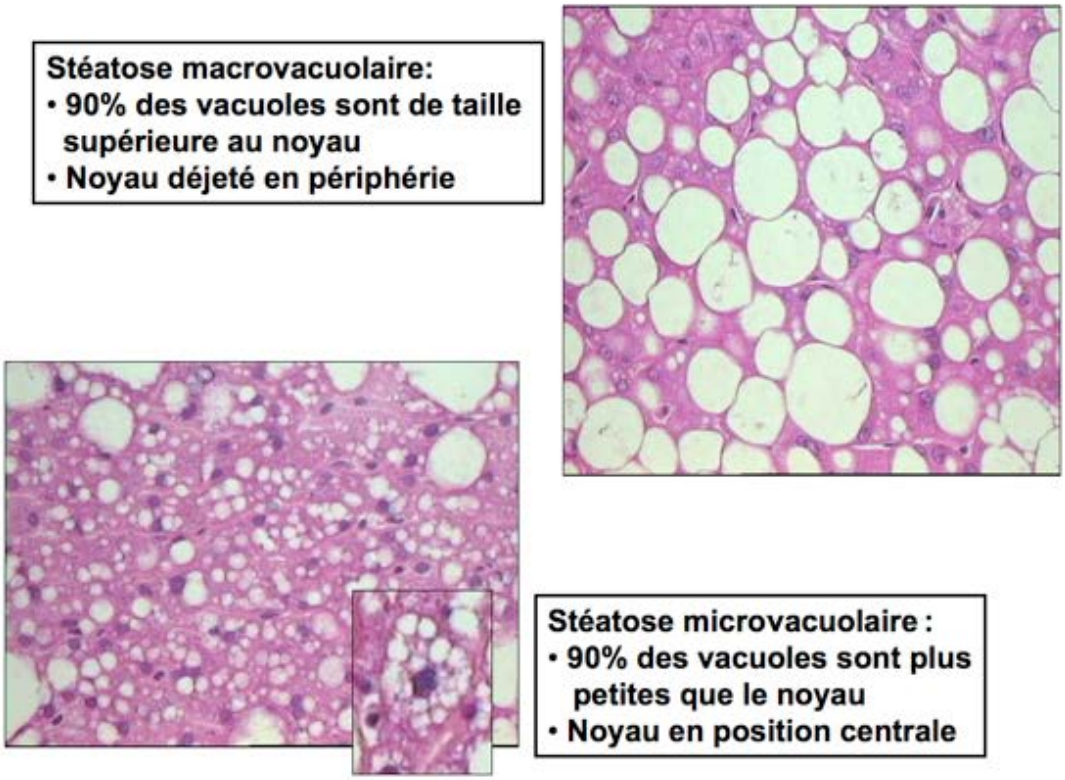


Figure 39 : Les différents types histologiques de stéatose (tiré de http://www.centre-hepato-biliaire.org/maladies-foie/steatose.html).

Différentes causes de cette accumulation de graisse sont possibles : il peut s'agir d'une synthèse et/ou d'une disponibilité accrues en lipides, d'une sécrétion et/ou d'un catabolisme de triglycérides diminués, ou bien d'une combinaison de ces altérations. Les triglycérides intra-hépatiques peuvent provenir de plusieurs carrefours métaboliques. En effet, ils sont produits a partir des acides gras captés par le foie depuis le sérum, suite soit à une lipolyse du tissu adipeux soit à une augmentation quantitative des apports lipidiques alimentaires et peuvent également être issus de l'hydrolyse des triglycérides sériques. Le foie est également le siège de la synthèse *de novo* des acides gras qui peut être accrue en présence d'un diabète ou d'une consommation excessive d'alcool. On peut observer également une oxydation anormale des acides gras dans le cas de mitochondries endommagées et une détérioration du transport systémique d'acides gras *via* la sécrétion de protéines à très basse densité (VLDL) en cas de malnutrition, d'action de toxines ou de prise de médicaments *(Fabbrini et al, 2010)*.

On distingue deux types de stéatose : la stéato-hépatopathie alcoolique due à une consommation abusive d'alcool du patient (alcoholic fatty liver disease, AFLD) et la stéato-

hépatopathie non-alcoolique (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD) *(Ludwig et al, 1980 ; O'Shea et al, 2010 ; Lewis et Mohanty, 2010)*.

La stéato-hépatopathie non-alcoolique (SHNA), appelée «non alcoholic fatty liver disease» (NAFLD) en anglais, est la conséquence hépatique de désordres métaboliques. Elle est devenue la forme la plus fréquente de maladie hépatique et un enjeu majeur de santé publique. Cette pathologie est caractérisée par l'accumulation anormale de graisse dans les hépatocytes *(Angulo, 2002)*. L'accumulation de graisse dans plus de 5 % des hépatocytes définit une stéatose du foie significative. Lorsque celle-ci atteint plus de 66 % des hépatocytes la stéatose est considérée comme sévère *(Kleiner et al, 2005 ; Bedossa et al, 2012)*.

La NAFLD englobe un large spectre de maladies du foie allant de la stéatose simple à la stéato-hépatite non-alcoolique, en anglais «non-alcoholic steatohepatitis» (NASH), et différents stades de fibrose jusqu'à la cirrhose *(Angulo, 2002 ; Leclercq et Sempoux, 2006 ; Brunt et Tiniakos, 2010)* (figures 38 et 40). La stéatose simple, qui est souvent réversible, est définie par la présence d'une stéatose sans lésion cellulaire. La NASH est déterminée par la présence d'une stéatose, le plus souvent mixte à prédominance macro-vésiculaire, associée à d'autres critères histologiques hépatiques, comme un infiltrat chronique de cellules inflammatoires (lymphocytes et macrophages majoritairement), des lésions cellulaires telles que la ballonisation des hépatocytes (hépatocytes de grande taille, considérés comme en voie de destruction) et la nécrose hépatocytaire, ainsi qu'une fibrose avec ou sans corps de Mallory (agrégats de filaments d'actine et une fibrose périsinusoïdale) *(Harrison et Neuschwander-Tetri, 2004)* (figure 40). Le terme NASH provient des travaux de Ludwig et al, qui en 1980, décrivaient des altérations histologiques hépatiques dans une série de 20 patients, sans histoire avérée de consommation d'alcool *(Ludwig et al, 1980)*.

Les lésions histologiques sont généralement divisées en 3 stades : stéatose simple, hépatite, et hépatite chronique associée à la fibrose hépatique ou à la cirrhose *(MacSween et Burt, 1986 ; O'Shea et al, 2010)*.

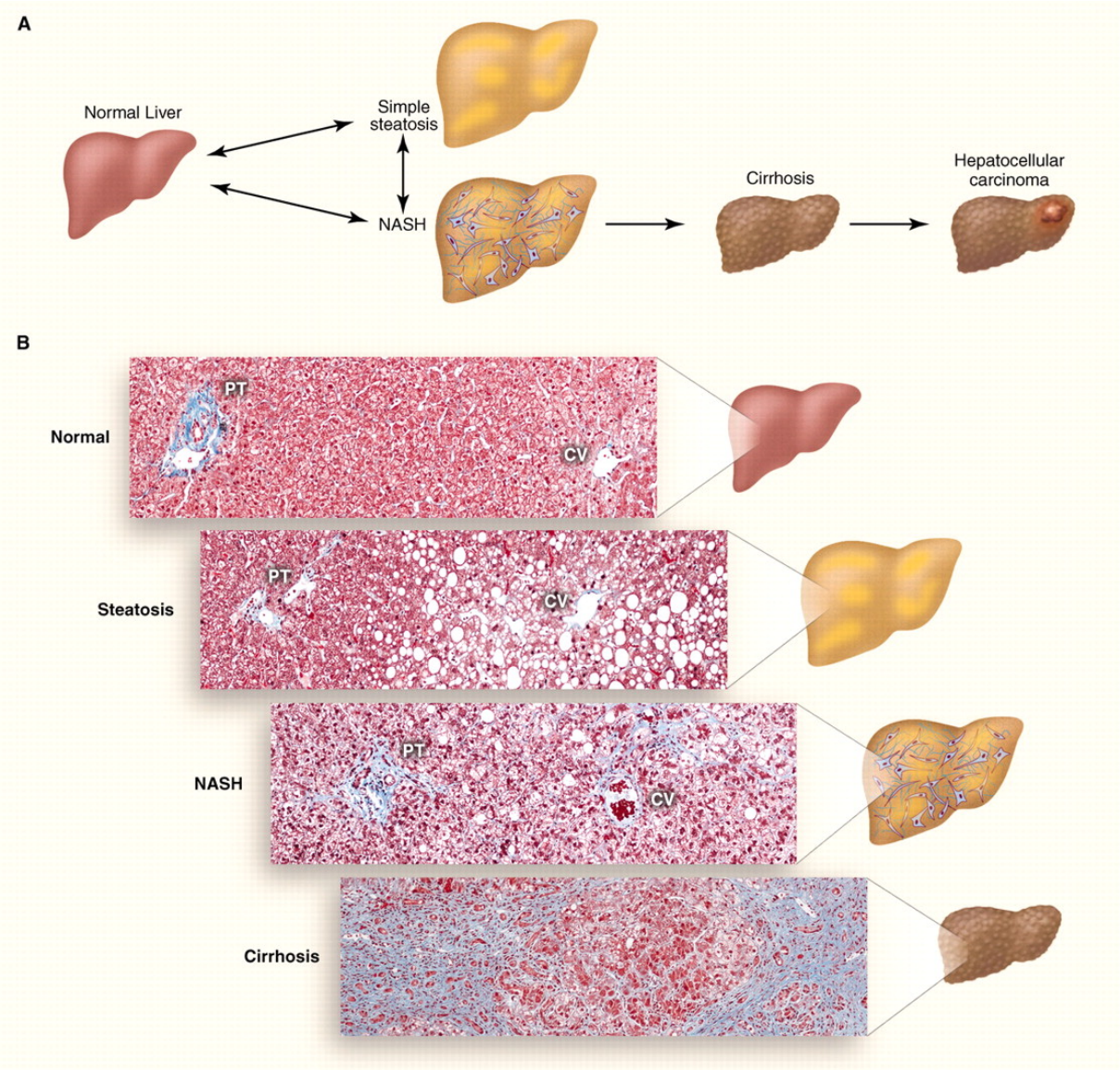


Figure 40 : Spectre évolutif et histologie comparative des stéato-hépatopathies non-alcooliques (SHNA ou NAFLD) (modifié de *Cohen et al, 2011*). *(A) Schéma de la progression de la NAFLD. L'accumulation de TG dans les gouttelettes lipidiques au sein des hépatocytes provoque une stéatose. La stéatose associée à l'inflammation, la mort cellulaire et la fibrose est appelée NASH, et peut évoluer vers une cirrhose. Les individus atteints de cirrhose ont un risque accru de développer un carcinome hépatocellulaire. (B) Les coupes histologiques illustrant un foie normal, la stéatose simple, la NASH et la cirrhose. Les fibres de collagène sont colorées en bleu avec le Trichrome de Masson. La triade espace porte (PT) constituée de l'artère hépatique, la veine porte et des voies biliaires ainsi que la veine centro-lobulaire (CV) sont indiquées.*

3 L'épidémiologie de la NAFLD.

Actuellement, la NAFLD est la maladie hépatique chronique la plus fréquente au monde, avec une incidence estimée à 20/10 000 personnes par année *(Browning et al, 2004)*. La prévalence croissante de la NAFLD dans la population générale fait de cette maladie un véritable problème de santé publique.

La NAFLD est une maladie de l'âge adulte, souvent diagnostiquée après 40 ans ; bien que cette pathologie soit également décrite dans la population pédiatrique, mais avec des caractéristiques pathologiques distinctes par rapport à celles observées chez l'adulte (fréquence moindre d'hépatocytes ballonisés, de fibrose péricentrale, d'inflammation parenchymateuse) *(Loomba et al, 2009)*. La NAFLD est plus fréquente chez les hommes, les obèses morbides ainsi que chez les populations asiatiques et hispaniques *(Arun et al, 2006 ; Weston et al, 2005 ; Browning et al, 2004)*. La prévalence de la NAFLD dans la population générale est d'environ 30-40 % chez les hommes et de 15-20 % chez les femmes, allant jusqu'à 70 % chez les patients diabétiques de type 2 *(Byrne et Targher, 2015)*. La prévalence de la NASH est d'environ 3-5 % *(Williams et al, 2011)*.

Bien que les données épidémiologiques sur la NAFLD soient récentes et fragmentaires, la prévalence de la stéatose a été estimée de 17 à 33 % dans la population générale *(McCullough, 2004 ; Vernon et al, 2011)*. On peut effectivement observer une différence de prévalence de la stéatose entre les sujets de poids normal, pour lesquels l'estimation varie de 16 à 20 % *(Bellentani et al, 2000)*, et les sujets obèses, pour lesquels l'estimation varie de 60 à 86 % *(Ruhl et al, 2003 ; Marceau et al, 1999)*.

Une étude prospective sur 328 personnes (âge moyen de 54 ans) basée sur un questionnaire, une échographie du quadrant supérieur droit et une biopsie hépatique, chez les sujets dont l'échographie était positive, a été publiée récemment *(Williams et al, 2011)* : la prévalence de la NAFLD était de 46% et la prévalence globale de la NASH de 12,2 %, celle-ci augmentant à 29,9 % chez les patients ayant un foie stéatosique. L'étude confirme que la NAFLD et la NASH sont plus souvent retrouvées chez les hommes âgés, obèses ou en surpoids, avec des antécédents d'hypertension et de diabète. D'ailleurs, les patients atteints de NAFLD consommaient plus fréquemment des repas du type fast-food et avaient une activité physique moindre *(Williams et al, 2011)*.

Ces pathologies sont étroitement liées à l'augmentation de l'incidence et de la prévalence de facteurs associés, tels que l'insulino-résistance (IR), la dyslipidémie, le diabète de type 2 ou

l'obésité abdominale, caractéristiques du syndrome métabolique *(Marchesini et al, 2001 ; Marchesini et al, 2003 ; Leclerq et Sempoux, 2006)*. En effet, au cours des dernières années, l'augmentation de prévalence de la NAFLD a suivi l'augmentation de fréquence du syndrome métabolique et de ses facteurs de risque. Environ 90 % des patients obèses morbides ayant subi une chirurgie bariatrique ont une NAFLD *(Boza et al, 2005)*. Une stéatose hépatique a été observée chez 69 à 87 % des patients ayant un diabète de type 2, ce qui souligne la forte association entre ces deux pathologies *(Leite et al, 2009)*. La stéatose hépatique affecte aussi jusqu'à 50 % des patients ayant une dyslipidémie *(Assy et al, 2000)*. Malgré de nombreuses études, il n'a pas encore été clairement déterminé si c'est la stéatose qui provoque le dysfonctionnement métabolique ou si c'est ce dernier qui est responsable de l'accumulation de graisse dans les hépatocytes et donc de la NAFLD *(Taylor, 2008; Fabbrini et al, 2010)*. Des études récentes rapportent une association entre la NAFLD et l'athérosclérose, suggérant que des médiateurs inflammatoires communs peuvent provoquer à la fois une atteinte du parenchyme hépatique et des vaisseaux périphériques *(Brea et al, 2005 ; Kim et al, 2009)*. De nombreuses études et case-reports ont également mis en évidence un lien direct entre la NAFLD et le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) *(Powell et al, 1990 ; Marrero et al, 2002 ; Sorensen et al, 2003 ; Hashizume et al, 2007 ; Hashimoto, 2009)*. Plusieurs résultats ont montré que l'âge et une fibrose plus avancée étaient des facteurs de risque importants pour le développement d'un CHC *(Hashimoto, 2009 ; Page et Harrison, 2009)*.

4 La pathogenèse de la NAFLD.

4.1 L'augmentation de la synthèse et de la disponibilité des lipides.

Une stéatose hépatique peut apparaître lorsque le taux d'acides gras plasmatiques captés par le foie et la synthèse *de novo* des acides gras sont supérieurs à leurs taux d'oxydation et d'export.

Le tissu adipeux joue un rôle important dans l'homéostasie systémique des lipides et du glucose. Dès que sa capacité à estérifier les acides gras provenant de la circulation sanguine et à les stocker au sein des adipocytes est dépassée (ce qui se produit en cas d'excès alimentaire riche en graisses et sucres et en cas d'insulino-résistance), les acides gras libres sont délivrés au foie, provoquant ainsi une stéatose *(Lewis et al, 2002)*.

La disponibilité des lipides dans le foie dépend également de l'expression de certains transporteurs d'acides gras, comme la «fatty acid binding protein» (FABP), les «fatty acid transport proteins» (FATP), la «fatty acid translocase» (FAT/CD36) et la «caveolin 1» (CAV1) *(Canbay et al, 2007)*. La synthèse d'acides gras au niveau du foie est induite par l'activation de facteurs de transcription, tels que les «carbohydrate responsive element binding proteins» (ChREBP), la «sterol regulatory element binding protein-1c» (SREBP-1c), «forkhead box 01» (Fox01), ou de certains récepteurs nucléaires comme PPAR-γ et le «retinoid X receptor» (RXR) *(Canbay et al, 2007)*.

Un dysfonctionnement dans le contrôle du métabolisme global des lipides joue un rôle majeur dans l'initiation et la persistance de la NAFLD *(Fabbrini et al, 2010)*. Des études *in vivo* chez l'Homme montrent qu'environ 60 % des acides gras composant les triglycérides hépatiques proviennent du tissu adipeux blanc *(Donnelly et al, 2005)*. En effet, il a été montré que la quantité d'acides gras libérés dans la circulation sanguine est proportionnelle à la masse grasse, tant chez l'homme que chez la femme ; ce qui implique que la quantité d'acides gras libres par rapport à la masse maigre soit supérieure chez les sujets obèses par rapport aux sujets de poids normal *(Mittendorfer et al, 2009)*. L'obésité est considérée comme la cause la plus fréquente du développement de NAFLD *(Fabbrini et al, 2010).* D'autres résultats montrent, chez des sujets obèses avec une NAFLD, une expression augmentée de certaines protéines, comme les lipases hépatiques ou bien le transporteur FAT/CD36, protéines permettant l'absorption des acides gras du plasma tant au niveau hépatique que musculaire *(Greco et al, 2008 ; Fabbrini et al, 2009)*. De surcroît, l'hyper-insulinémie peut à elle seule stimuler l'accumulation de lipides au niveau hépatique, activant la synthèse de novo des acides gras (lipogenèse) *via* le facteur de transcription SREBP-1c, qui active la plupart des gènes impliqués dans la lipogenèse *(Wanless et al, 1989 ; Wanless et Shiota, 2004)*. Enfin, des études ont montré que la contribution de la lipogenèse à la production de triglycérides (TG) intra-hépatiques est limitée chez les sujets normaux et rend compte pour 5 % des acides gras délivrés par les protéines VLDL (very low density lipoproteins). En revanche, chez les sujets atteints de NAFLD la contribution de la lipogenèse est beaucoup plus importante et rend compte pour 15 à 23 % des acides gras délivrés dans les protéines VLDL *(Diraison et al, 2003; Donnelly et al, 2005)*.

La résistance à l'insuline est considérée comme une étape clé dans l'accumulation des lipides au niveau hépatique et donc dans l'initiation de la NAFLD. Dans des conditions d'insulino-résistance, le tissu adipeux et le muscle oxydent de préférence les lipides, ce qui a pour

conséquence d'augmenter la quantité d'acides gras libres dans la circulation sanguine *(Leclerq et Sempoux, 2006 ; Lewis et Mohanty, 2010)*.

4.2 La diminution de la sécrétion et du catabolisme des lipides.

Une élimination insuffisante des lipides par β-oxydation ou par sécrétion de VLDL (very low density lipoproteins) ne semble pas jouer un rôle important dans l'accumulation de lipides dans la NAFLD *(Lewis et al, 2002 ; Ferré et Foufelle, 2010)*. Cependant, certaines conditions peuvent altérer la synthèse des lipoprotéines au niveau du foie. En effet, une altération de l'assemblage des VLDL et du transport de TG au réticulum endoplasmique (RE) a été observée dans un modèle de NAFLD induit par un régime riche en graisses chez le rat *(Cano et al, 2009)*. Il a également été montré que certains acides gras à chaîne moyenne (MCFA pour «medium chain fatty acids»), comme l'octanoate, le décanoate et le dodécanoate, diminuent la sécrétion de l'apoprotéine apoB (un constituant des lipoprotéines servant à la reconnaissance de ces lipoprotéines par des récepteurs et des enzymes) dans des hépatocytes de poulet *(Sato et al, 2005)*. En ce qui concerne la cinétique de sécrétion des protéines VLDL, la plupart des études ont montré une sécrétion de VLDL supérieure chez les sujets avec NAFLD par rapport aux sujets sains *(Adiels et al, 2006 ; Fabbrini et al, 2008)*. Chez les sujets sains, la sécrétion de VLDL augmenterait linéairement avec la concentration de TG intra-hépatiques, tandis que cette sécrétion atteindrait un plateau chez les sujets avec NAFLD *(Fabbrini et al, 2008)*. Les mécanismes responsables de ce phénomène sont peu connus mais peuvent être dus à une taille de VLDL excédant le diamètre des sinusoïdes, ce qui empêcherait leur libération par les hépatocytes *(Horton et al, 1999)*.

Quant à l'oxydation hépatique des acides gras, les études sur l'Homme montrent une oxydation des acides gras normale ou augmentée chez les patients avec une NAFLD *(Bugianesi et al, 2005 a et b ; Kotronen et al, 2009)*. Cependant, les données issues de modèles animaux montrent que l'augmentation de l'oxydation des acides gras diminue l'accumulation de lipides dans le foie et *vice-versa* ; l'inhibition de l'oxydation des acides gras induisant, quant à elle, une stéatose hépatique *(Zhang et al, 2007 ; Stefanovic-Radic et al, 2008)*. La NAFLD, chez les individus obèses, semble être associée à la suppression de plusieurs gènes impliqués dans la voie d'oxydation des acides gras *(Wanless et Lentz, 1990 ; Mitsuyoshi et al, 2009)*. La β-oxydation des acides gras se produit au niveau mitochondrial et peroxysomal, mais les acides gras à chaîne supérieure à 20 carbones sont aussi métabolisés au niveau du RE par le

cytochrome P450 CYP4A pour être ensuite délivrés au peroxysome *(Hashimoto et al, 1999)*. Le métabolisme intracellulaire des acides gras hépatiques est principalement régulé par le système de β-oxydation mitochondriale *(Kurtz et al, 1998)*. De plus, différentes études sur l'Homme et des modèles animaux ont montré qu'une diminution de la β-oxydation mitochondriale des acides gras semble liée à un dysfonctionnement mitochondrial *(Nassir et Ibdah, 2014)*. En effet, des altérations structurelles et fonctionnelles au niveau des mitochondries sont souvent rencontrées dans les foies stéatosiques *(Fabbrini et al, 2010)*. Les gènes qui codent pour des enzymes clés de la β-oxydation mitochondriale, microsomiale (RE) et peroxysomale sont sous le contrôle du facteur de transcription nucléaire PPAR-α. Des souris knock-out pour PPAR-α montrent une diminution constitutive de la β-oxydation mitochondriale et développent une stéatose localisée au niveau centrolobulaire. Si, à cette perte de fonction, est associée une délétion des allèles du gène qui code pour l'enzyme clé de la β-oxydation peroxysomale (fatty acyl-CoA oxidase, AOX), une stéato-hépatite micro-vésiculaire est observée *(Hashimoto et al, 1999)*. Ces résultats montrent que PPAR-α et AOX peuvent jouer un rôle important dans le métabolisme lipidique du foie, et de ce fait, dans la pathogenèse de certains phénotypes de NAFLD *(Hashimoto et al, 1999)*.

4.3 Le rôle de l'inflammation dans la progression de la NAFLD.

Les mécanismes impliqués dans la progression de la stéatose vers l'inflammation et la fibrose restent encore à élucider, bien que certains facteurs soient connus depuis longtemps, comme une vulnérabilité accrue des hépatocytes stéatosiques, une altération de l'état inflammatoire systémique, un dysfonctionnement mitochondrial, un excès de stress oxydant et une insulino-résistance qui, au-delà de conséquences métaboliques déjà citées, est responsable de l'altération de la production des adipokines par le tissu adipeux, donnant lieu à un état pro-inflammatoire et probablement pro-fibrotique *(Leclerq et Sempoux, 2006)*.

La pathogenèse de la NAFLD est basée sur l'hypothèse «multi-hits» *(Lewis et Mohanty, 2010)*, hypothèse appelée initialement «two-hits» en 1998 *(Day et James, 1998)* (figure 41). Dans ce modèle, un métabolisme dérégulé des acides gras libres («first hit») induit une accumulation de lipides dans le foie et produit ainsi une stéatose. Des médiateurs inflammatoires, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une altération de l'apoptose constituent différents «second hits» qui entraînent la survenue d'une inflammation. L'interaction entre les médiateurs

inflammatoires et les cellules étoilées hépatiques peut générer une fibrose qui, en l'absence de contrôle, peut surpasser les capacités régénératives du foie et progresser vers une cirrhose.

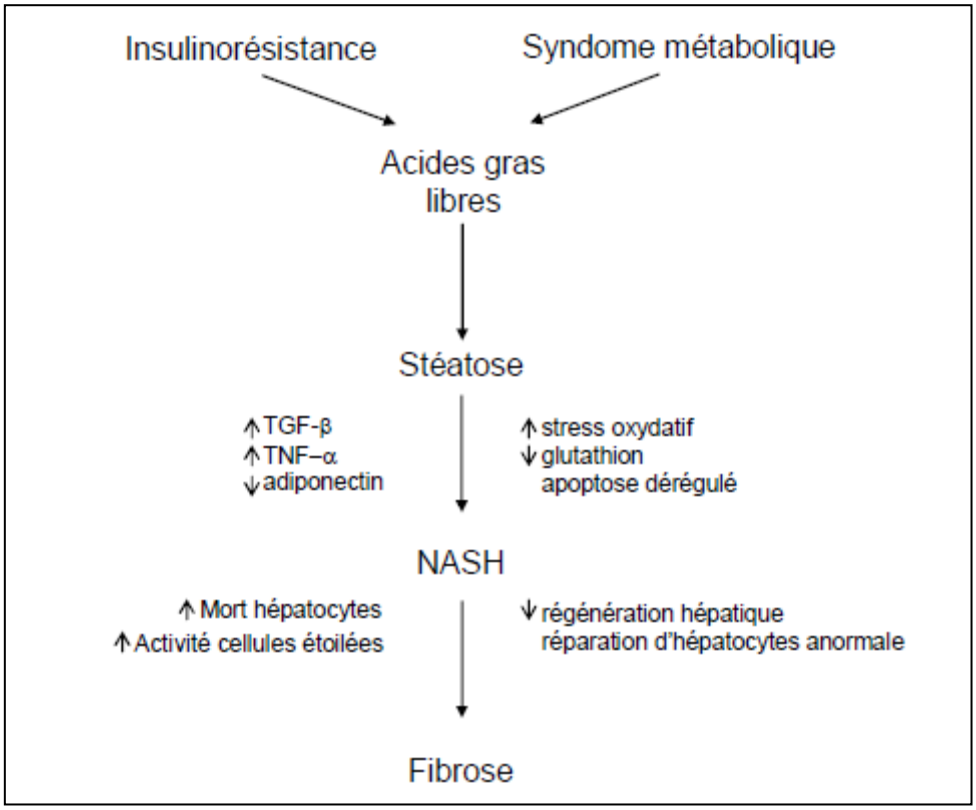


Figure 41 : La pathogenèse de la NAFLD : hypothèse «multi-hits» (Adapté *de Lewis et Mohanty, 2010*). *La dérégulation du métabolisme des acides gras libres («first hit») induit une accumulation de lipides dans le foie (stéatose). Des médiateurs inflammatoires, des espèces réactives de l'oxygène et une altération de l'apoptose constituent des «second hits» caractérisés par la survenue d'une inflammation. L'interaction entre les médiateurs inflammatoires et les cellules étoilées peut générer une fibrose qui, voire une cirrhose.*

Les foies stéatosiques sont plus vulnérables au stress que les foies normaux *(Selzner et Clavien, 2001 ; Peralta et Brenner, 2011 ; El-Badry et al, 2007)*. Différents facteurs peuvent contribuer à cette vulnérabilité au stress, comme les altérations de la fonction des cellules de Küpffer (les macrophages résidants dans le foie) et l'adhérence des leucocytes *(Farrell et al, 2008)*. La stéatose est également associée à un flux sinusoïdal perturbé et à une diminution de la synthèse d'ATP *(Peralta et al, 2001)*. De plus, les foies stéatosiques souffrant principalement d'une mort cellulaire par nécrose ont une tolérance réduite aux dommages de

l'ischémie/reperfusion *(Selzner et Clavien, 2001)*, pouvant contribuer à augmenter l'intensité de la réponse inflammatoire *(VanSaun et al, 2009)*.

Il semble de plus en plus évident qu'il existe, dans la NAFLD, une connexion étroite entre l'activité sécrétoire du tissu adipeux et la réponse inflammatoire systémique, plus particulièrement hépatique *(Feldstein, 2010)*. Il a été démontré, au cours des dernières années, que le tissu adipeux n'est pas simplement un organe de stockage des lipides, mais un tissu ayant une activité endocrine et des fonctions immunitaires importantes *(Tilg et Moschen, 2010)*.

L'adiponectine est une adipocytokine anti-inflammatoire dont la signalisation est médiée par deux récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2. La liaison de l'adiponectine sur son récepteur AdipoR1 permet un influx de Ca^{2+} extracellulaire nécessaire à l'activation de l'«adenosine monophosphate-activated kinase» (AMPK) et de la protéine Sirtuin 1 (SIRT1), une désacétylase ; l'action combinée de ces deux protéines protégeant de la stéatose et de l'inflammation hépatique *(Yamauchi et al, 2007)*. L'adiponectine peut donc jouer un rôle central dans l'équilibre local et systémique de l'inflammation, permettant la prévention de l'inflammation hépatique *(Tilg et Hotamisligil, 2006)*.

La leptine est une adipocytokine qui stimule l'oxydation des acides gras dans les tissus périphériques, notamment dans le foie, diminuant ainsi l'expression du facteur de transcription lipogénique SREBP-1 *(Unger, 2002 ; Kakuma et al, 2000)*. Néanmoins, la leptine semble participer au développement de la NASH. Elle semble contribuer à l'insulino-résistance hépatique et, par conséquent, à la mise en place de la stéatose *(Tsochatzis et al, 2009)*. De plus, elle a un rôle pro-inflammatoire et est considérée comme un médiateur essentiel de la fibrose hépatique *(Tsochatzis et al, 2006)*. En effet, une hyper-leptinémie peut avoir des effets délétères sur le foie en augmentant la production des ROS (espèces réactives de l'oxygène) *(Bouloumie et al, 1999 ; Yamagishi et al, 2001)* et en activant les cellules étoilées hépatiques, *via* TGFβ1, favorisant ainsi la synthèse de collagène *(Tang et al, 2002 ; Ikejima et al, 2002 ; Saxena et al, 2002)*.

L'expression du «Tumor Necrosis Factor α» (TNFα) et de l'interleukine-6 (IL-6), deux cytokines pro-inflammatoires majeures, est augmentée dans le tissu adipeux des sujets obèses et insulino-résistants *(Hotamisligil et al, 1993 ; Hotamisligil, 2006)*. Le TNFα, induisant SREBP-1, a un rôle lipogénique *(You et al, 2005)*. De plus, les souris génétiquement déficientes pour TNFR1, le récepteur de TNFα, sont résistantes au développement d'une NASH. De plus, le traitement des souris déficientes en leptine (*ob/ob*) avec un anticorps anti-TNFα améliore la stéatose et

l'insulino-résistance hépatiques *(Feldstein et al, 2004)*. Un déséquilibre des adipocytokines, notamment du ratio TNFα/adiponectine, semble jouer un rôle important dans la progression de la stéatose à la NASH *(Feldstein, 2010)*.

En ce qui concerne la cytokine IL-6, son rôle semble être plus complexe. En effet, certaines études avaient montré initialement un rôle hépato-protecteur pour cette cytokine, grâce à son effet antioxydant, dans le contexte du préconditionnement ischémique et dans les foies stéatosiques *(El Assal et al, 2004 ; Teoh et al, 2006)*. Mais une autre étude a montré qu'il existe une différence d'effet entre une exposition courte et une exposition chronique à l'IL-6, la dernière rendant le foie plus sensible à la mort apoptotique *(Jin et al, 2006)*. De ce fait, le rôle exact de l'IL-6 dans la pathogenèse de la NASH reste encore à élucider *(Tsochatzis et al, 2009; Feldstein, 2010)*.

4.4 Les dysfonctionnements mitochondriaux et le stress oxydant.

4.4.1 Les anomalies mitochondriales.

Au cours des dernières années, différentes études ont exploré l'implication des mitochondries dans la pathogenèse de la NAFLD et de la NASH *(Pessayre et Fromenty, 2005)*. Des évidences s'accumulent quant au rôle d'un dysfonctionnement mitochondrial, notamment une déficience de la chaîne respiratoire, dans la physiopathologie de la NASH, indépendamment de sa cause initiale *(Begriche et al, 2006 ; Rector et al, 2010)*.

Des études portant sur des patients obèses, diabétiques ou atteints de NASH ont montré des anomalies fonctionnelles et structurelles des mitochondries hépatiques *(Spahr et al, 2003 ; Sanyal et al, 2001)*. Il est désormais évident que les mitochondries hépatiques sont une source significative d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour «reactive oxygen species») dans la NASH (figure 42) *(Begriche et al, 2006)*.

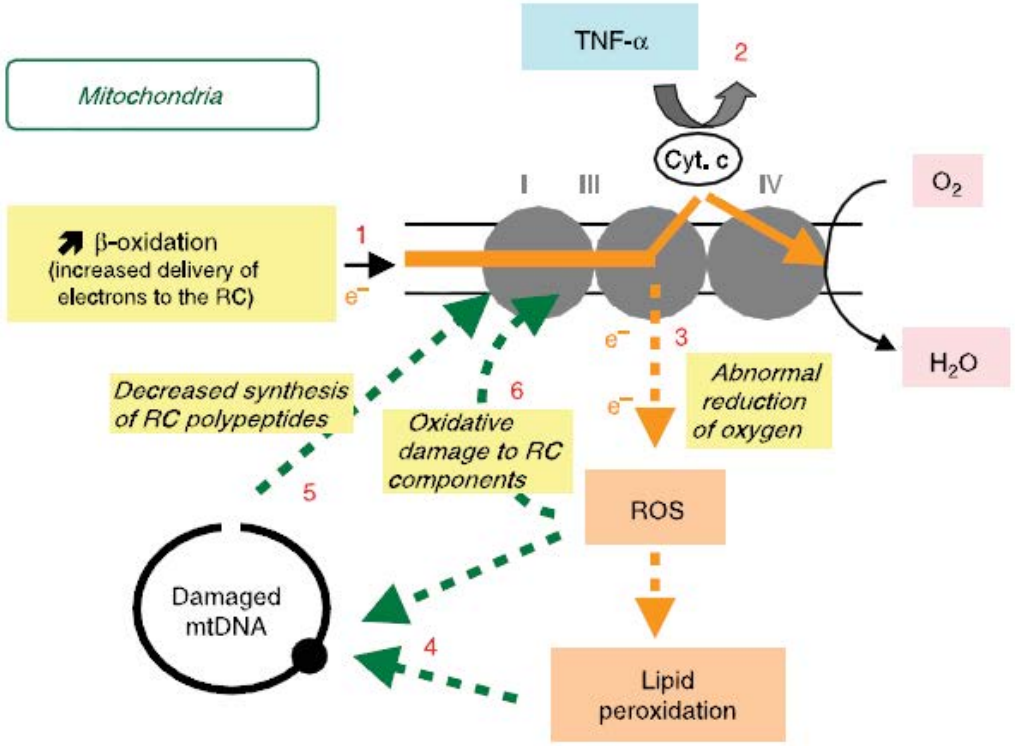


Figure 42 : Altérations de la chaîne respiratoire (CR) mitochondriale dans les maladies métaboliques.

(tiré de *Begriche et al, 2006*). *Dans le foie d'un patient insulino-résistant, on observe une activité élevée de la β-oxydation qui augmente l'apport d'électrons dans la CR (flèche 1). Le tissu adipeux des sujets obèses libère de grandes quantités de TNFα, dont la signalisation hépatique contribue à la perméabilisation des mitochondries (flèche 2). Le déséquilibre entre un apport élevé et un flux normal peut causer une réduction excessive des complexes I et III de la CR. Ces complexes trop réduits peuvent réagir avec l'oxygène et former des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (flèche 3). Les ROS oxydent les acides gras insaturés dans le foie, déclenchant une peroxydation lipidique. Les ROS, les espèces réactives de l'azote (RNS) et les produits réactifs de la peroxydation lipidique (aldéhydes) peuvent directement endommager l'ADN mitochondrial (mtDNA) (flèche 4). Les altérations de l'ADN mitochondrial peuvent résulter en une diminution de la synthèse de protéines de la CR (flèche 5). D'ailleurs, les protéines mitochondriales peuvent être la cible des ROS, des RNS et des produits de la peroxydation lipidique (flèche 6), générant un cercle vicieux.*

Dans le foie des patients insulino-résistants, l'activité accrue de la β-oxydation augmente le flux d'électrons de la chaîne respiratoire *(Pessayre et Fromenty, 2005)*. Chez les personnes obèses, les adipocytes libèrent des quantités importantes de TNFα, qui, en se liant à son récepteur

hépatique, peut induire la perméabilisation des mitochondries et une libération partielle du cytochrome c de l'espace inter-membranaire *(Hotamisligil et al, 1993*). Le déséquilibre entre un apport élevé et un flux diminué d'électrons peut être la cause d'une réduction excessive des complexes I et III de la chaîne respiratoire, qui peuvent ainsi réagir directement avec l'oxygène, produisant des ROS, notamment l'ion radicalaire superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) *(Begriche et al, 2006)*. La superoxyde dismutase mitochondriale à manganèse (MnSOD) peut dismuter l'ion superoxyde ; ce dernier pouvant oxyder les acides gras insaturés accumulés dans le foie en déclenchant la peroxydation lipidique. L'ion superoxyde, en présence d'oxyde nitrique (NO), peut également donner naissance au radical péroxynitrique ($ONOO^-$), espèce radicalaire de l'azote (RNS pour «reactive nitrogen species»), responsable de la nitrosation de lipides et protéines. Les ROS, les RNS et les produits réactifs de la peroxydation lipidique (aldéhydes) peuvent directement endommager l'ADN mitochondrial (ADNmt). Les mutations de l'ADNmt peuvent produire des altérations des protéines de la chaîne respiratoire, causant une détérioration du transfert des électrons en augmentant encore plus la production des ROS mitochondriaux, générant ainsi un cercle vicieux.

La compréhension du rôle physiopathologique de la mitochondrie est donc incontournable pour le développement de stratégies préventives et thérapeutiques visant à lutter contre la NAFLD et sa progression.

4.4.2 Le stress oxydant.

Le stress oxydant constitue une condition de déséquilibre de la balance entre espèces réactives de l'oxygène («reactive oxygen species», ROS) et de l'azote («reactive nitrogen species», RNS) et les défenses antioxydantes de la cellule, en faveur des espèces oxydantes *(Liu et al, 2008)*. Ce stress oxydant se produit en cas de stéatose ; il est considéré comme une cause principale dans la pathogenèse de la NASH et dans sa progression vers la fibrose et la cirrhose *(Videla et al, 2004 ; Seki et al, 2002)* (figure 43). Les ROS ont des effets délétères qui sont connus depuis des décennies : la peroxydation lipidique, qui rend les membranes cellulaires instables et fragiles ; l'oxydation des protéines qui altère leur fonction et peut causer la formation d'agrégats cytotoxiques ; et l'oxydation des acides nucléiques avec un risque accru de formation de mutations génomiques. Il a été montré que les ROS peuvent avoir différentes fonctions dans la signalisation cellulaire, en stimulant la prolifération ou la différenciation, ou encore en déclenchant des réponses adaptatives en fonction de l'intensité oxydative (due à la fois à la

concentration en ROS et à la durée de leur production intracellulaire) *(Hamanaka et Chandel, 2010)*.

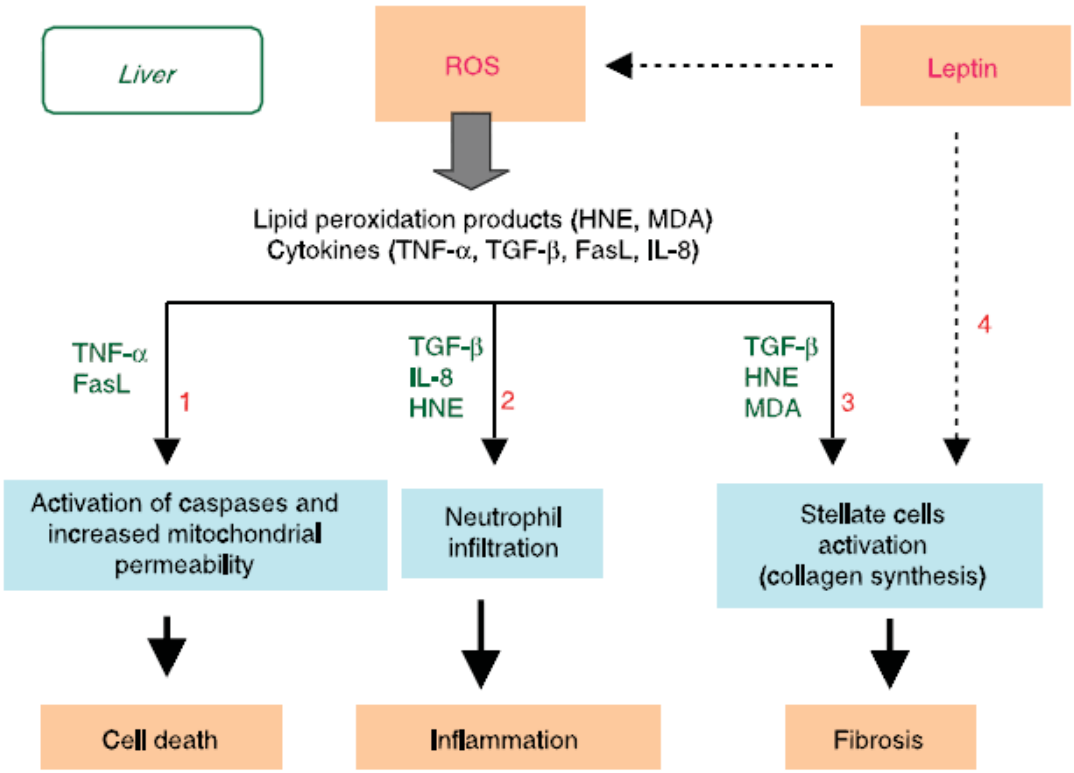


Figure 43 : Lien entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la peroxydation lipidique et le développement de lésions hépatiques observées dans la NASH (tiré de *Begriche et al, 2006*). *L'augmentation de la production de ROS dans une cellule riche en graisses (en particulier due au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire) active la peroxydation lipidique et génère ainsi des produits de la peroxydation lipidique, comme le 4-hydroxynonenal (HNE) et le malondialdéhyde (MDA). La synthèse de ROS entraîne également l'augmentation de l'expression de différentes cytokines, dont le Tumor necrosis factor α (TNFα), le Transforming growth factor β (TGFβ), le ligand de Fas (FasL) et l'interleukine-8 (IL-8). Les produits de la peroxydation lipidique ainsi que différentes cytokines sont impliqués dans le développement de différentes lésions du foie. TNFα et FasL, en se fixant à leurs récepteurs, induisent la libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol et activent les caspases ; ceci entraînant la perméabilisation de la membrane mitochondriale ainsi que la mort cellulaire (1). La mort cellulaire, selon le taux d'ATP, pourra être soit sous forme d'apoptose ou de nécrose. TGF β, IL-8 et HNE sont des substances chimioattractives ayant pour cible les neutrophiles ; ce qui induit l'infiltration des neutrophiles puis une inflammation (2). TGFβ, HNE et MDA activent la transformation des cellules étoilées*

hépatiques en myofibroblastes (produisant du collagène), ce qui pourra entraîner le développement d'une fibrose (3). La leptine, dont le taux est augmenté chez les individus obèses et ceux atteints de NASH, semble avoir des effets délétères sur le foie en augmentant la production des ROS et en favorisant l'activation des cellules étoilées hépatiques (4).

Les ROS jouent un rôle crucial dans différentes voies de signalisation impliquées dans la pathogenèse de la NAFLD : la réponse cellulaire à l'hypoxie *(Chandel et al, 1998 ; Bell et al, 2007)*, la régulation de l'activité des phosphatases *(Kwon et al, 2004)*, et la mort cellulaire induite par TNFα *(Kamata et al, 2005)*.
L'hypoxie conduit initialement à l'activation d'un programme transcriptionnel adaptatif afin de réduire la consommation d'oxygène et d'énergie. De façon paradoxale, l'hypoxie augmente la production des ROS mitochondriaux, mais des résultats montrent que c'est effectivement la production de H2O2, au cours de l'hypoxie, qui régule en amont la réponse cellulaire *(Chandel et al, 1998 ; Bell et al, 2007)*. La réponse cellulaire à l'hypoxie nécessite l'induction des facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie (HIFs). Ils consistent en une sous-unité stable (HIF-β) et trois sous-unités labiles (HIF-1 α, HIF-2 α et HIF-3α) *(Weidemann et Johnson, 2008)*. Au cours de l'hypoxie, les sous-unités HIF-α, normalement dégradées, sont stabilisées, ce qui permet la translocation nucléaire du facteur de transcription et l'activation de l'expression des gènes régulant l'érythropoïèse, la glycolyse, l'angiogenèse, le cycle et la survie cellulaires *(Weidemann et Johnson, 2008)*. Le turnover normoxique des sous-unités HIF-α nécessite une hydroxylation directe des prolines, modification qui permet sa dégradation par le système du protéasome. Cette hydroxylation est réalisée par une famille de prolyl hydroxylases 1, 2, 3 (PHD1-3), dont l'activité est inhibée pendant l'hypoxie par les ROS mitochondriaux. Au delà de la régulation transcriptionnelle, l'exposition des cellules aux faibles concentrations d'oxygène induit une diminution de la consommation énergétique, en supprimant réversiblement, par endocytose, l'activité de la Na/K ATPase, le transporteur de sodium et potassium qui maintient le gradient ionique de la cellule. La suppression de l'activité de cette enzyme nécessite l'activité de l'AMPK *(Gusarova et al, 2009)*. Les ROS mitochondriaux activent l'AMPK au cours de l'hypoxie et cette activation permet la phosphorylation de la protéine kinase C zêta (PKCζ), qui phosphoryle la sous-unité α de la Na/K ATPase, conduisant à l'endocytose du complexe *(Dada et al, 2003)*.

Les ROS régulent aussi l'activité des phosphatases, enzymes clés dans la signalisation cellulaire ayant une activité opposée à celle des kinases. Les phosphatases ont un résidu de cystéine

oxydable au sein de leur site catalytique, ce qui en fait une cible de l'action des ROS *(Hamanaka et Chandel, 2010)*. Certaines phosphatases sont impliquées dans la pathogenèse de la NASH. D'ailleurs, les souris déficientes en «phosphatase and tensin homolog» (PTEN) développent des lésions hépatiques correspondant à la NASH humaine *(Anezaki et al, 2009)*.

Les ROS mitochondriaux sont des acteurs majeurs dans la mort cellulaire induite par TNFα, qui est l'un des mécanismes permettant la progression de la NAFLD. Le TNFα peut promouvoir soit la survie soit la mort d'une cellule *(Aggarwal, 2003)*. TNFα active deux types de récepteurs, l'un d'entre eux permet la survie cellulaire à travers l'action du facteur de transcription NFκB *(Micheau et Tschopp, 2003)*, tandis que l'autre active la kinase JNK qui est un médiateur central des signaux pro-apoptotiques médiés par TNFα. A la suite de la liaison de TNFα à ces récepteurs, JNK est active rapidement, mais transitoirement ; en l'absence de NFκB son activation est prolongée et entraine la mort cellulaire *(Liu et al, 1996 ; Tang et al, 2001)*. L'inhibition de JNK médiée par NFκB passe par l'induction de la protéine antioxydante mitochondriale SOD2 («superoxyde dismutase 2») *(Kamata et al, 2005)*. Le TNFα augmente la production des ROS mitochondriaux qui inactivent les inhibiteurs de JNK (des phosphatases), permettant son activation soutenue et la mort cellulaire. La SOD2 permet d'atténuer cette signalisation en diminuant la concentration en ROS mitochondriaux *(Kamata et al, 2005)*.

4.5 L'insulino-résistance.

Depuis sa définition dans les années 80 *(Ludwig et al, 1980)*, de nombreuses études ont été menées pour comprendre la pathogenèse de la NAFLD et sa progression chez certains patients vers des formes d'hépatopathies plus agressives, comme la NASH, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC). L'insulino-résistance est considérée comme le facteur physiopathologique majeur qui caractérise la NAFLD *(Bugianesi et al, 2005 b)*, bien que les liens entre l'insulino-résistance, la pathogenèse et la progression de la NAFLD soient complexes et restent encore à élucider. Bien que le terme soit classiquement utilisé pour décrire une consommation de glucose insuffisante par le muscle squelettique suite à une stimulation de l'insuline, l'insulino-résistance associée à la NAFLD et à l'obésité s'accompagne d'une sécrétion globale d'insuline plus élevée et d'une extraction hépatique de l'insuline normale, mais avec une signalisation altérée tant au niveau hépatique (notamment une suppression insuffisante de la néoglucogenèse) qu'au niveau du tissu adipeux (notamment une suppression insuffisante de

la lipolyse) *(Fabbrini et al, 2010)*. Dans des conditions physiologiques normales, après l'ingestion d'un repas contenant du glucose, environ 80 % de ce glucose est métabolisé par le muscle, qui le stocke sous forme de glycogène (70 % du glucose absorbé) ou l'oxyde *via* la glycolyse pour une utilisation immédiate. Le maintien de l'homéostasie du glucose est régulé par : 1) la sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas ; 2) la stimulation de l'absorption de glucose par l'intestin, le foie et le muscle ; et 3) la suppression de la libération de glucose par le foie. Bien que le tissu adipeux ne soit responsable que d'une petite fraction d'élimination du glucose (environ 5 %), son rôle reste central dans le maintien de l'homéostasie systémique du glucose *(Bugianesi et al, 2005 b)*. Pour approfondir le rôle de l'insulino-résistance comme facteur indépendant de la NAFLD, un groupe italien a mené une étude sur des patients atteints de NAFLD mais sans aucun caractère de syndrome métabolique. Les résultats montrent que l'insulino-résistance altère significativement la lipolyse, l'oxydation lipidique et l'absorption totale du glucose dans ses deux composantes oxydative et non-oxydative (glycogénogenèse) *(Bugianesi et al, 2005 a)*. Les auteurs ont trouvé une corrélation entre l'augmentation de l'oxydation lipidique et la diminution de l'absorption du glucose, ce qui suggère que le défaut métabolique, à l'origine d'une lipolyse accélérée, est responsable d'une augmentation du flux d'acides gras libres vers le foie et d'une oxydation lipidique accrue *(Bugianesi et al, 2005 a)*. Ces résultats corroborent l'hypothèse d'une implication directe de l'altération de la signalisation de l'insuline dans l'établissement d'une NAFLD.

Au niveau moléculaire, les mécanismes responsables de l'insulino-résistance restent encore mal compris. Si plusieurs mécanismes ont été proposés, tels qu'une production anormale d'insuline ou des mutations au niveau du récepteur et des ses substrats, il est de plus en plus évident que des défauts dans la signalisation intracellulaire soient les causes principales de la résistance à l'insuline dans les tissus cibles *(Meshkani et Adeli, 2009 ; Leclerq et al, 2007)*. Un premier mécanisme pourrait impliquer une expression diminuée ou une dégradation augmentée des composantes essentielles pour la signalisation de l'insuline *(Leclerq et al, 2007)*. Au niveau hépatique, c'est l'isoforme du substrat du récepteur de l'insuline IRS-2 qui fonctionne comme un adaptateur pour transférer au niveau intracellulaire le signal du lien de l'insuline avec son récepteur *(Pirola et al, 2004)*. Des souris déficientes en IRS-2 montrent en effet une hyperglycémie sévère due à une insulino-résistance hépatique *(Araki et al, 1994)*. Il a été montré que l'activation de diverses voies de transduction du signal peut induire une inhibition de la signalisation de l'insuline *(Tanti et Jager, 2009)*. La voie JNK et la protéine kinase C (PKC)

peuvent phosphoryler IRS1-2 au niveau de plusieurs résidus de sérine et thréonine, ce qui inhibe la transduction du signal, à l'opposé de la phosphorylation sur un résidu tyrosine induite par le récepteur de l'insuline *(Weickert et Pfeiffer, 2006)*. Un autre mécanisme est corrélé à l'induction de facteurs inhibiteurs, tels que les «suppressors of cytokine signalling» (SOCS1-3), qui bloquent la signalisation de l'insuline à travers une compétition avec les protéines IRS pour le récepteur de l'insuline et une induction de la dégradation des IRS par le protéasome *(Kile et al, 2002)*. Une augmentation de l'activité des phosphatases peut aussi inhiber la signalisation de l'insuline *(Schinner et al, 2005)*. Des études *in vivo* ont montré que chez la souris, la protéine «tyrosine phosphatase 1B» (PTPB1) est un régulateur majeur dans la signalisation de l'insuline *(Kaszubska et al, 2002)*.

La stéatose hépatique peut être une cause de l'insulino-résistance, même si dans la NAFLD il semble plus probable que le site primaire de l'insulino-résistance soit périphérique (le muscle) avec la stéatose hépatique qui suit temporellement et l'exacerbe *(Kim et al, 2001 ; Tiikkainen et al, 2004)*. L'insulino-résistance, chez les patients atteints de NAFLD, affecte les cellules étoilées hépatiques (HSC) ; ces cellules exprimant les récepteurs de l'insuline et les récepteurs à l'«insulin-like growth factor-I» (IGF-1). En effet, ces deux cytokines ont un effet mitogénique sur les HSC, *via* l'activation de la «phosphatidylinositol 3-kinase» (PI3K) et l'«extracellular-signal-regulated kinase» (ERK). Ainsi, l'insuline induirait la prolifération des HSC *(Svegliati-Baroni et al, 1999)*. L'insulino-résistance est aussi un facteur prédictif de la présence d'autres pathologies hépatiques plus graves comme la cirrhose, voire le CHC *(Bugianesi, 2007)*. La présence d'une stéatose est donc désormais considérée comme un marqueur important de l'insulino-résistance multi-organes, indépendamment de l'indice de masse corporelle (IMC), indice mesurant le poids et la taille, ou la masse grasse viscérale *(Korenblat et al, 2008 ; Fabbrini et al, 2009 ; Bugianesi et al, 2005 a ; Seppala-Lindroos et al, 2002)*. Des études récentes ont montré des liens étiologiques importants qui suggèrent que l'évolution de la NAFLD est étroitement associée à une augmentation du risque d'apparition d'un CHC *(Starley et al, 2010)*. L'obésité a été définitivement définie comme un facteur de risque de développer un cancer primitif du foie, soit un risque de 1,5 à 4 fois *(Moller et al, 1994 ; Wolk et al, 2001 ; Calle et al, 2003 ; Oh et al, 2005)*. Le diabète est aussi un facteur indépendant qui augmente de 1,8 à 4 fois le risque de CHC, comme le démontrent des études de cohortes conduites en Suède, Danemark et Grèce *(Adami et al, 1996 ; Wideroff et al, 1997 ; Lagiou et al, 2000)*.

Il est donc évident qu'il existe une intégration systémique qui lie l'altération de la signalisation de l'insuline et le développement d'une inflammation chronique. Cette situation pourrait être à

la base de l'établissement des mécanismes adaptatifs aux lésions tissulaires, cellulaires et subcellulaires qui permettent une survie cellulaire au cours de la progression de la NAFLD. C'est pourquoi, il apparaît nécessaire d'adopter une vision d'ensemble des mécanismes impliqués dans la NASH pour lutter contre les causes de cette pathologie et en limiter son impact sur la santé publique.

4.6 L'apparition et le développement d'une fibrose.

La fibrose hépatique est la complication commune de toutes les maladies chroniques du foie et conduit à la cirrhose et à ses complications sévères : l'hypertension portale, l'insuffisance hépatique et le carcinome hépatocellulaire. La fibrose est due à un processus de cicatrisation exagéré qui se caractérise par l'accumulation progressive dans le foie d'une matrice extracellulaire (MEC) de composition altérée, en réponse à une agression chronique, et résulte d'un déséquilibre entre synthèse, dépôt et dégradation de ces constituants *(Friedman, 2003 ; Lotersztajn et al, 2005)*. Elle provoque une désorganisation de l'architecture du foie et perturbe son fonctionnement.
Il est établi que les myofibroblastes hépatiques jouent un rôle majeur dans le développement de la fibrose hépatique. Au cours des hépatopathies chroniques, ces cellules sont soumises à l'action de cytokines et de chimiokines qui stimulent leur prolifération et provoquent ainsi leur accumulation, et entraînent la synthèse des constituants de la fibrose ainsi que des molécules bloquant la dégradation de la matrice extracellulaire.

4.6.1 La matrice extracellulaire dans le foie normal et le foie fibreux.

Le foie normal contient une faible quantité de matrice extracellulaire, localisée principalement dans l'espace de Disse (espace entre les cellules endothéliales sinusoïdales et les hépatocytes), dans les espaces portes autour des vaisseaux et des canaux biliaires, et dans la paroi des veines centro-lobulaires *(Lotersztajn et al, 2005 ; Schuppan et al, 2001)*. Une des caractéristiques de la matrice extracellulaire hépatique est de former une lame basale discontinue entre les hépatocytes et les cellules endothéliales des sinusoïdes qui permet des échanges bidirectionnels entre les hépatocytes et le sang.

Au cours des atteintes hépatiques aiguës, la lésion initiale déclenche une réaction inflammatoire, la nécrose et l'apoptose des hépatocytes, suivies d'une régénération et d'une synthèse de composants matriciels *(Friedman, 2003 ; Lotersztajn et al, 2005)*. Ce processus permet la cicatrisation de la lésion en restaurant une architecture hépatique normale. En revanche, si la maladie causale se prolonge, l'inflammation devient chronique, le déséquilibre entre la synthèse excessive de composants matriciels et la faillite des mécanismes de dégradation aboutit à la fibrogenèse *(Friedman, 2003)* (figure 44).

Le dépôt de matrice est constitué de fibres de collagènes, principalement de collagène de type I et IV (fibrillaires), de pro-collagène de type III, d'élastine, des protéoglycanes et des glycoprotéines, avec un dépôt précoce de fibronectine suivi par l'apparition de fibres de collagènes interstitiels (*Schuppan et al, 2001)*. On constate une augmentation de trois à six fois de la plupart des molécules matricielles. La localisation initiale de la fibrose est superposable à celle de la lésion causale *(Ramadori et Saile, 2004)*. La fibrose s'effectue, initialement, au niveau péri-sinusoïdal (dans l'espace de Disse) où elle établit une véritable néo-membrane basale qui isole les hépatocytes des capillaires sinusoïdes et modifie leur phénotype, avec notamment une perte des fenestrations des cellules endothéliales sinusoïdales et une disparition des microvillosités hépatocytaires (figure 44). Ce phénomène est responsable d'une réduction de la perméabilité des sinusoïdes, réduisant ainsi les échanges de substances solubles entre le compartiment sanguin et les hépatocytes et concourant au développement de l'insuffisance hépatique et de l'hypertension portale. Plus tardivement, la fibrose devient septale, progresse dans le lobule pour former des ponts avec les espaces portes ou les régions centrolobulaires adjacentes, aboutissant à l'isolement de nodules d'hépatocytes au stade de cirrhose.

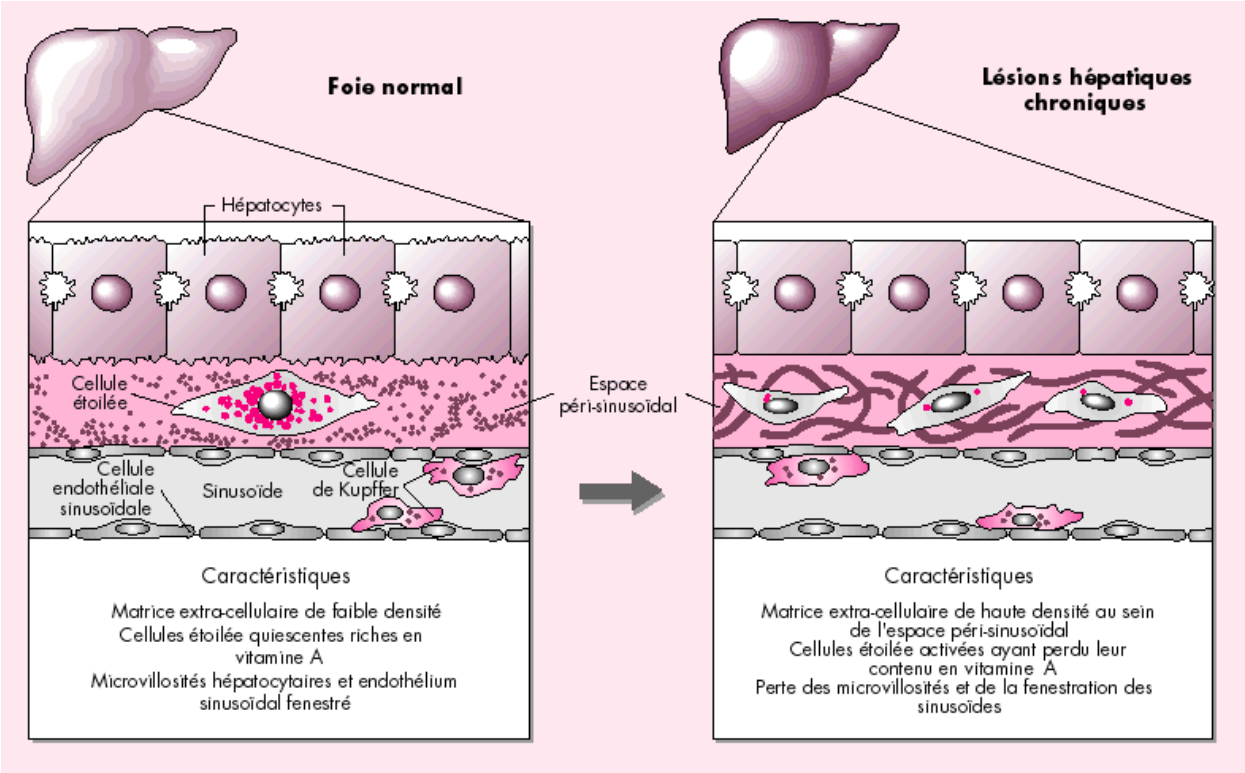


Figure 44 : Les modifications tissulaires liées à la fibrose hépatique (modifié de *Pilette et al, 1998*).

4.6.2 Les cellules fibrogéniques du foie.

Les constituants matriciels qui s'accumulent dans le foie au cours de la fibrogenèse sont synthétisés par des myofibroblastes exprimant l'α-actine de type musculaire lisse (α-SMA, pour «α-smooth muscle actin») *(Cassiman et al, 2002)*.

Dans le foie normal, les cellules étoilées représentent 5 à 10 % des cellules et sont localisées dans l'espace de Disse. Elles sont impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes et le stockage de la vitamine A, et sont capables de synthétiser les composants de la matrice extracellulaire *(Cassiman et al, 2002)*. Elles jouent un rôle essentiel dans le maintien du phénotype des hépatocytes, des cellules biliaires et des cellules non parenchymateuses.

Lors d'une agression hépatique aiguë ou chronique, ces cellules acquièrent un phénotype myofibroblastique caractérisé par la perte de leurs vacuoles lipidiques et l'acquisition de filaments de α-SMA *(Geerts, 2001)*. Ce processus d'activation est associé à l'acquisition de propriétés fibrogéniques : en particulier, les cellules myofibroblastiques prolifèrent et s'accumulent dans les zones de nécrose, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, et synthétisent les protéines de la matrice extracellulaire ainsi que des inhibiteurs de leur dégradation, conduisant à la formation progressive d'une cicatrice (figure 45).

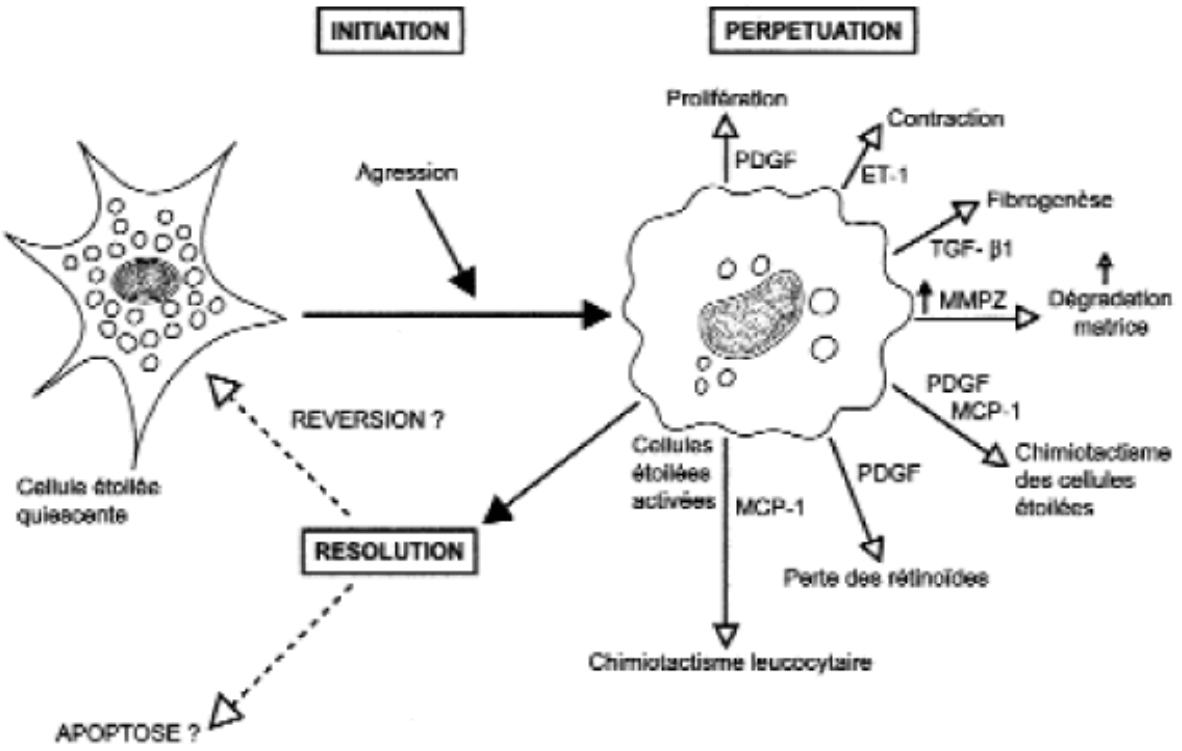


Figure 45 : Cause et conséquences de l'activation des cellules étoilées hépatiques (modifié de *Giostra et Rubbia-Brandt, 2003*).

4.6.3 Le rôle des cellules fibrogéniques dans la physiopathologie de la fibrogenèse hépatique.

4.6.3.1 L'activation et le recrutement.

L'activation des cellules étoilées hépatiques et leur transformation en myofibroblastes résulteraient de l'action combinée de médiateurs solubles libérés par les cellules adjacentes et de modifications de la matrice extracellulaire. Ainsi, l'atteinte du parenchyme hépatique provoque l'activation des cellules de Küpffer (macrophages du foie), des cellules endothéliales et des plaquettes, mais également un afflux de leucocytes, occasionnant la production de lipides peroxydés, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et également de nombreuses cytokines et chimiokines, notamment le «transforming growth factor β» (TGFβ), l'interleukine-1 (IL-1), le «platelet derived growth factor» (PDGF), le «tumor necrosis factor α» (TNFα) et l'«epidermal growth factor» (EGF) *(Pinzani et Marra, 2001)* (figure 46). En quelques heures, ces facteurs déclenchent l'induction de différents facteurs de transcription dans les cellules étoilées

(NFκB, c-myb, ZF9) *(Friedman, 2000)*, initiant ainsi l'induction de l'expression de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques, ainsi que de leurs récepteurs.
Les récepteurs Toll-like (TLR) activent NFκB, qui finit par activer à son tour la voie de signalisation pro-fibrogénique TGFβ.

4.6.3.2 La prolifération et la survie.

L'accumulation de cellules fibrogéniques lors d'une atteinte hépatique résulte à la fois de leur capacité de prolifération élevée et de leur résistance vis-à-vis de l'apoptose.
Il a déjà été montré que les cellules étoilées hépatiques synthétisent l'angiotensine II (AngII ou AGT) *(Bataller et al, 2003)* ; cette dernière améliorant la contraction et la prolifération des myofibroblastes. La prolifération des cellules fibrogéniques est également stimulée par une grande variété de facteurs de croissance exprimés au cours de l'atteinte hépatique chronique, notamment le PDGF, le mitogène le plus puissant dont les récepteurs sont surexprimés par les cellules étoilées dans le foie cirrhotique, des vasoconstricteurs comme la thrombine, des métalloprotéinases matricielles (MMPs) comme MMP-2, ou encore des molécules d'adhésion comme l'intégrine αVb3 *(Schuppan et al, 2001)*.
Parmi les facteurs de survie, on compte le TGFβ *(Saile et al, 1999)*, le sphingosine-1 phosphate (S1P) *(Davaille et al, 2002)* et le «tissu inhibitor of metalloproteases-1» (TIMP-1) *(Murphy et al, 2002)*. De plus, les myofibroblastes pourraient être maintenus en phase de quiescence, voire désactivés, notamment par le gène PPAR-γ (figure 46).

4.6.3.3 Le remodelage tissulaire et la fibrose.

La fibrogenèse dans le tissu hépatique n'est pas un processus statique, mais un processus dynamique avec une balance entre la synthèse de collagène et des autres composants, et la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). La dégradation de cette matrice est due aux métalloprotéinases matricielles (MMPs). A l'inverse, les inhibiteurs de métalloprotéinases matricielles, les TIMPs («tissu inhibitor of metalloproteases»), vont permettre le maintien de la MEC (figure 46). La production de MMPs et de TIMPs est finement régulée selon le stade d'activation des cellules étoilées *(Arthur, 2000)*.
De ce fait, les cellules étoilées activées expriment une grande variété d'enzymes permettant le remodelage de la MEC comme la plasmine, les cathepsines, l'élastase, et surtout les MMPs et les activateurs des MMPs, qui clivent les pro-MMPs et ainsi les activent *(Benyon et Arthur,*

2001). De plus, les cellules étoilées activées produisent aussi des inhibiteurs spécifiques des enzymes de la famille des MMPs, les TIMPs. Les cellules étoilées activées synthétisent aussi le «plasminogen activator inhibitor-1» (PAI-1), inhibiteur de la transformation du plasminogène en plasmine qui joue un rôle fondamental dans l'activation des autres enzymes dégradant la matrice et qui permet la production de TGFβ par clivage du TGFβ latent inactif.

Le TGFβ est l'un des médiateurs les plus importants de la fibrogenèse *(Gressner et al, 2002)*. Il stimule non seulement la synthèse de fibronectine, de collagène, de protéoglycanes et de glycoprotéines par les cellules fibrogéniques, mais il s'oppose également aux mécanismes physiologiques de dégradation de la matrice extracellulaire en inhibant la production d'enzymes dégradant la matrice, comme la MMP-1, la MMP-3, et en augmentant l'expression de leurs inhibiteurs, tels que le TIMP-1 et le PAI-1.

L'activité des lysyl oxydases et des transglutaminases, deux familles d'enzymes de réticulation covalente de la matrice extracellulaire, augmente au cours de la fibrogenèse *(Grenard et al, 1997 ; Grenard et al, 2001)*.

Les cellules étoilées hépatiques contribuent donc à la formation de la fibrose en synthétisant en excès des constituants matriciels, mais également à sa stabilisation, en limitant la dégradation des composants.

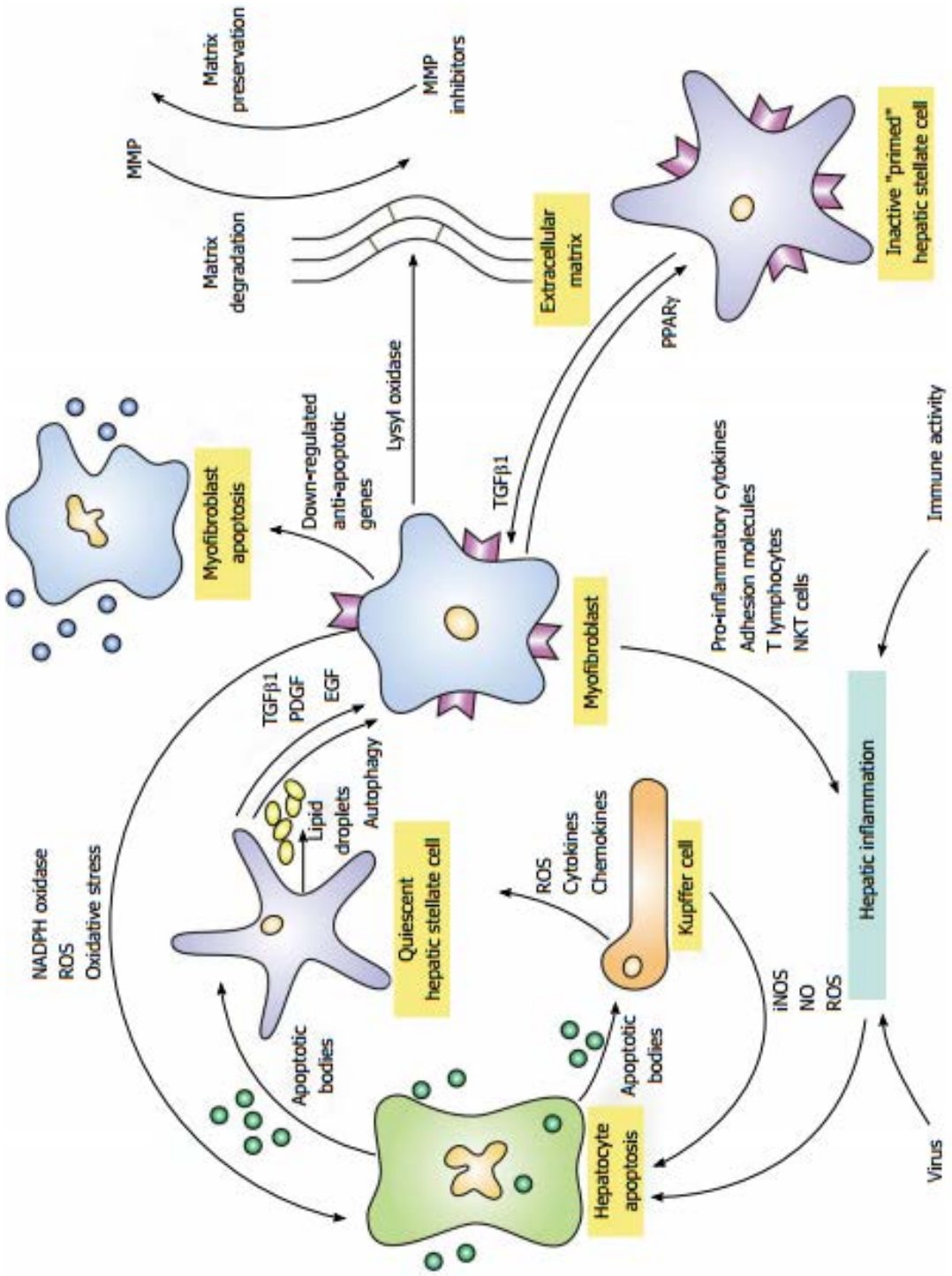


Figure 46 : Les voies d'activation et de désactivation de la fibrogenèse hépatique (modifié de *Czaja, 2014*). *L'inflammation hépatique provoquée par une infection virale ou par des mécanismes immunitaires peut initier la fibrogenèse en induisant l'apoptose des hépatocytes. Les corps apoptotiques libérés peuvent activer les cellules étoilées du foie quiescentes et les transformer en myofibroblastes sous la médiation du «transforming growth factor beta 1» (TGFβ1), le «platelet-derived growth factor» (PDGF), et l'«endothelial growth factor» (EGF). Le*

processus d'activation est alimenté par la libération de gouttelettes lipidiques (autophagie) par les cellules étoilées. Les corps apoptotiques provenant des hépatocytes endommagés peuvent également stimuler les cellules de Küpffer pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'oxyde nitrique (NO) par l' «inducible nitric oxide synthase» (iNOS). Les ROS, à leur tour, peuvent accentuer l'apoptose des hépatocytes et continuer l'activation des cellules étoilées du foie. Les cellules de Küpffer peuvent également libérer des ROS, des cytokines et des chimiokines qui contribuent à la transformation des cellules étoilées hépatiques quiescentes en myofibroblastes. Les myofibroblastes peuvent également générer des ROS et augmenter le stress oxydant dans les hépatocytes par la voie «nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase» et favoriser l'inflammation hépatique en augmentant l'expression de cytokines pro-inflammatoires, des molécules d'adhésion, des lymphocytes T activés et des cellules «natural killer T» (NKT). Les myofibroblastes génèrent la matrice extracellulaire qui peut être réticulée par la lysyl oxydase et rendue résistante à la dégradation. La réversibilité de la matrice extracellulaire dépend en partie de la réticulation des fibrilles de collagène et le contrepoids de la balance des activités entre les MMPs et les inhibiteurs de MMP. L'activité des myofibroblastes peut être atténuée par des gènes qui favorisent l'apoptose des myofibroblastes et par l'expression de PPARγ qui contribue à l'inactivation des cellules étoilées hépatiques. Les cellules étoilées inactivées sont différentes des cellules étoilées quiescentes du fait qu'elles aient un faible seuil de réactivation par TGFβ1.

4.7 L'implication de l'angiotensine II dans la NAFLD.

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) est connu pour jouer un rôle dans l'hypertension observée dans le syndrome métabolique et semble jouer également un rôle central dans la résistance à l'insuline et la NAFLD.

L'angiotensine II (AngII ou AGT) est un peptide produisant la plupart des actions biologiques du RAAS, actions principalement médiées par le récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1), qui est un récepteur couplé aux protéines G et situé sur la membrane plasmique dans la plupart des types cellulaires, y compris le foie *(Mehta et Griendling, 2007 ; Hunyady et Catt, 2006)*. Des études ont montré que l'activation du récepteur AT1 contribue à l'adiposité et au gain de poids dans différents modèles animaux *(Araki et al, 2006 ; Kouyama et al, 2005)*. En outre, un deuxième récepteur de l'AngII, de type 2 (AT2) et couplé aux protéines G, a été identifié ; ce

récepteur ayant des voies de signalisation divergentes de celles de AT1 au sein des tissus dans lesquels ces deux récepteurs sont exprimés. Le récepteur AT2 aurait un rôle protecteur contre l'adiposité. En effet, l'activation de AT2 par un agoniste réduit l'adiposité et l'insulino-résistance chez des souris mâles *(Ohshima et al, 2012 ; Shum et al, 2013)*. AT2 réduit également l'obésité et l'adiposité chez des souris femelles, indépendamment de leur taux d'œstrogènes. Cette même étude a révélé une réduction de l'hyper-insulinémie, suggérant ainsi une diminution de la résistance à l'insuline *(Nag et al, 2015)*.

L'angiotensine II (AngII) est synthétisée par les cellules étoilées hépatiques *(Bataller et al, 2003)*.

4.7.1 Le rôle de l'angiotensine II dans la stéatose hépatique.

L'AngII a été identifiée comme étant un acteur majeur du métabolisme lipidique hépatique altéré observé dans les NAFLDs. La perturbation génétique des composants individuels du RAAS dans des modèles de rongeurs entraîne une protection de l'obésité induite par un régime hyper-énergétique *(Yvan-Charvet et Quignard-Boulange, 2011 ; Takahashi et al, 2007 ; Jayasooriya et al, 2008 ; Kouyama et al, 2005 ; Yvan-Charvet et al, 2005 ; Nabeshima et al, 2009)*.

L'effet observé de l'AngII sur l'accumulation de triacylglycérols (TAG) dans le foie peut provenir de modifications de la disponibilité des lipides dans le plasma (acides gras libres et TAG), de la diminution de l'oxydation des acides gras hépatiques, de l'altération de la sécrétion des VLDLs et de l'augmentation de la lipogenèse *de novo*.

4.7.1.1 L'angiotensine II et la disponibilité accrue des acides gras libres plasmatiques.

La diminution de la capacité de l'insuline à inhiber la lipolyse en conditions postprandiales et l'augmentation résultante des acides gras libres (AGL) circulants pourraient provenir de l'impact bien documenté de l'AngII. En effet, l'AngII inhibe l'action de l'insuline par l'augmentation du stress oxydant *(Olivares-Reyes et al, 2009 ; Yvan-Charvet et Quignard-Boulange, 2011 ; Ogihara et al, 2002 ; Wei et al, 2008 a, b et c ; Wei et al, 2006)*.

4.7.1.2 L'angiotensine II et la diminution de l'oxydation des acides gras.

L'oxydation des acides gras par les mitochondries représente une voie importante (jusqu'à 90 %) du métabolisme catabolique des acides gras dans le foie *(Eaton, 2002)*, cette réaction étant nécessaire pour fournir l'ATP au métabolisme anabolique hépatique. En plus d'une augmentation du flux de lipides plasmatiques affectant les niveaux de TAG dans le foie, l'AngII semble également jouer un rôle dans la diminution de l'oxydation des acides gras (figure 47). En effet, les dépenses énergétiques accrues observées dans divers modèles knock-out de RAAS sont associées à l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras dans le foie *(Takahashi et al, 2007 ; Jayasooriya et al, 2008 ; Kouyama et al, 2005 ; Yvan-Charvet et al, 2005)*.

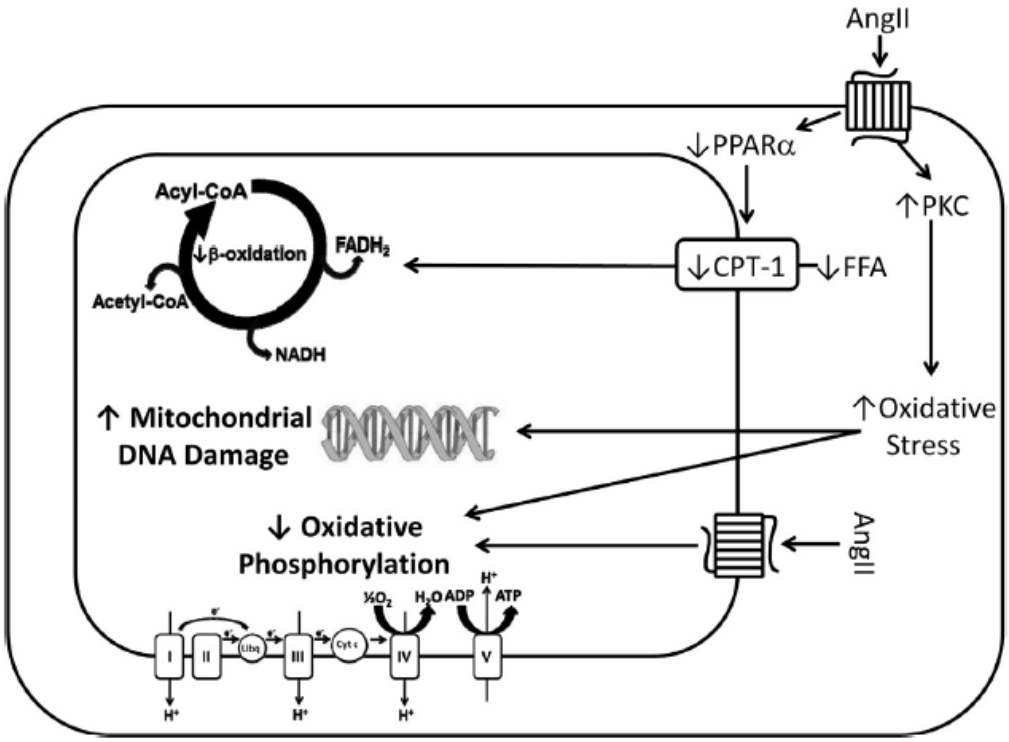


Figure 47 : L'angiotensine II entraîne la diminution de la fonction mitochondriale (d'après *Matthew Morris et al, 2013*).

L'AngII diminue l'expression de différents gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras mitochondriaux dans le foie, y compris le «peroxisome proliferator-activated receptor α» (PPARα) et la «carnitine palmitoyl transférase-I» (CPT-1). L'AngII peut produire, par une voie PKC-dépendante (protein kinase C), une augmentation du stress oxydant hépatique qui peut entraîner la diminution du contenu mitochondrial à cause de dommages dans l'ADN mitochondrial ainsi qu'une diminution de la fonction mitochondriale par la perturbation de la phosphorylation oxydative. De nouvelles données suggèrent la présence de récepteurs à l'AngII

sur la membrane externe mitochondriale, ces récepteurs pouvant être activés par l'AngII et entraînant la diminution de la consommation d'oxygène.

4.7.1.3 L'angiotensine II et l'augmentation de la lipogenèse de novo.

L'AngII peut agir comme une hormone lipogénique dans le tissu adipeux des rongeurs et chez l'Homme *(Yvan -Charvet et al, 2005 ; Jones et al, 1997)*. L'activation de la lipogenèse dans les adipocytes est en partie due à l'AngII qui entraîne une augmentation de l'expression et de l'activité de la «fatty acid synthase» (FAS) et du facteur de transcription pro-lipogénique «sterol regulatory element binding protein-1c» (SREBP-1c) *(Yvan- Charvet et al, 2005 ; Jones et al, 1997)*.

La signalisation médiée par l'AngII a donc la capacité de surcharger le foie avec les AGL plasmatiques, de diminuer l'oxydation des acides gras hépatiques et d'augmenter potentiellement la lipogenèse de novo dans les adipocytes.

4.7.1.4 L'angiotensine II et la résistance à l'insuline.

Il semblerait que l'AngII fonctionne en synergie avec d'autres effecteurs afin de réguler négativement l'action de l'insuline hépatique. Plusieurs études ont observé la présence d'une résistance à l'insuline hépatique associée à une augmentation du stress oxydant dans des modèles de NAFLD. L'augmentation de divers types de lipides, tels que les diacylglycérols (DAG) et les céramides, associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline hépatique a déjà été observée dans des modèles de rongeurs obèses *(Jornayvaz et al, 2011 ; Yew et al, 2010)*. Les DAG sont connus depuis longtemps pour activer les membres de la famille PKC (protein kinase C). Or, la capacité de l'AngII à activer ces PKC, *via* le récepteur AT1, et ainsi entraîner l'apparition d'un stress oxydant a déjà été décrit dans le tissu vasculaire *(Griendling et al, 1997 ; Matthew Morris et al, 2013)* (figure 47). Des études ont montré que l'AngII joue également un rôle dans la résistance à l'insuline en activant la voie inflammatoire de NFκB dans des modèles de rats exposés à une nourriture hyper-énergétique *(Zhou et al, 2015)*.

4.7.2 Le rôle de l'angiotensine II dans le stress oxydant et l'inflammation.

Une documentation considérable existe sur les effets négatifs de l'augmentation de la production de ROS, le stress oxydant et l'inflammation liés à l'AngII au niveau des vaisseaux, des tissus cardiaque et hépatique *(Marchesi et al, 2008 ; Bataller et al, 2003 a et b ; Sorescu et Griendling, 2002)*. De plus, des effets bénéfiques de la réduction du stress oxydant et de l'inflammation ont été observés dans le cas d'une diminution de l'activité de l'AngII en utilisant des bloqueurs du récepteur AT1 ou en inhibant l'enzyme ACE («angiotensin I converting enzyme»).

4.7.2.1 L'angiotensine II et la production de ROS mitochondriaux.

Le rôle de l'AngII sur la production de ROS mitochondriaux hépatiques n'a pas encore été étudié en détail. Les données sur les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse vasculaire montrent un rôle direct de l'activation de l'AngII sur l'augmentation de la production de ROS par les mitochondries *(Doughan et al, 2008 ; Kimura et al, 2005)*. L'AngII active la production de «superoxyde NADPH oxydase» (NOX) par une voie PKC-dépendante, augmentant la production mitochondriale de ROS par oxydation de protéines de la chaîne de transport d'électrons *(Doughan et al, 2008)* (figure 48). En se basant sur ces données, il est possible que l'AngII puisse entraîner une augmentation du stress oxydant hépatique en augmentant le dysfonctionnement mitochondrial et la production de ROS.

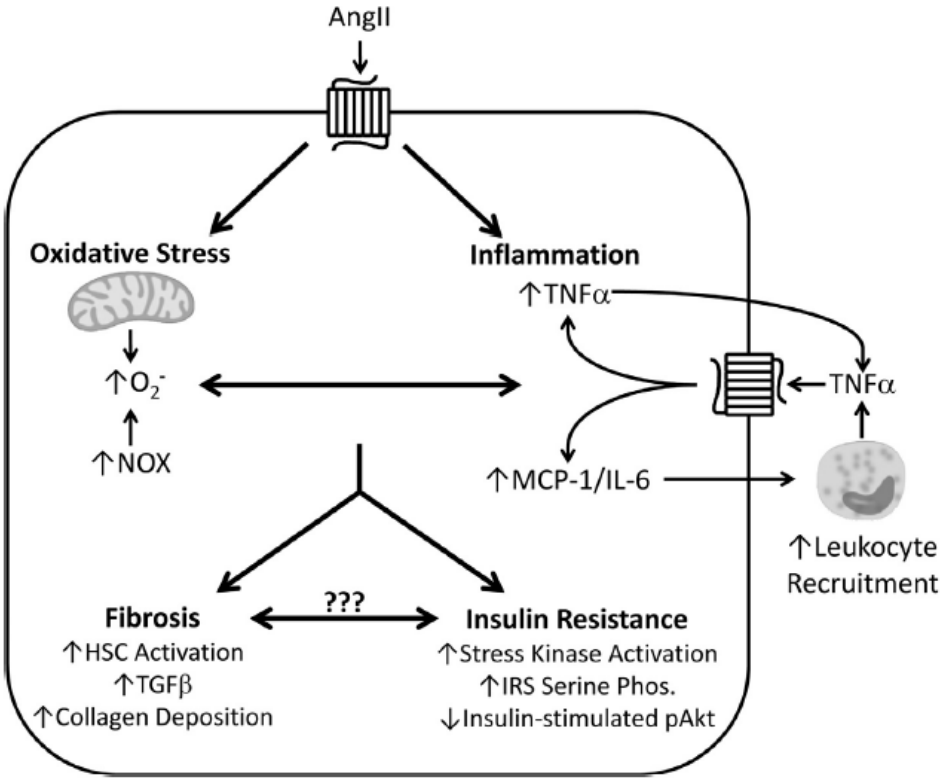


Figure 48 : L'association entre l'inflammation du foie et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produisant l'insulino-résistance et la fibrose (d'après *Matthew Morris et al, 2013*).

La voie de signalisation de l'AngII dans le foie peut initier un état inflammatoire en produisant des cytokines pro-inflammatoires, telles que le tumor necrosis factor α (TNFα), et la sécrétion de cytokines et de chimiokines additionnelles liées au recrutement et à l'infiltration des leucocytes (par exemple la monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) et l'interleukine-6 (IL-6)). Cet état inflammatoire peut être initié par et/ou entraîner la production de ROS par l'augmentation de la production mitochondriale de ROS ou l'activation de la production de superoxydes par le système enzymatique de la NADPH oxydase (NOX). L'augmentation de ROS et l'inflammation peuvent entraîner l'activation de voies de signalisation impliquées dans la propagation des physiopathologies de la NAFLD, comme la résistance à l'insuline et la fibrose. Les ROS et les cytokines inflammatoires activent les cellules étoilées du foie (HSC) qui produisent des cytokines pro-fibrotiques, telles que le transforming growth factor β (TGFβ) et initie le dépôt de matrice extracellulaire. De plus, l'augmentation de ROS et l'inflammation peuvent produire une résistance à l'insuline hépatique par l'activation de multiples voies de signalisation de kinases, avec la phosphorylation de sérine de l'insulin receptor substrate-1 (IRS-1) et une diminution de la phosphorylation de Akt (alpha serine/threonine-protein kinase) stimulée par l'insuline. S'il existe une relation entre la fibrose hépatique et la résistance à l'insuline dans la NAFLD, celle-ci n'a pas encore été décrite.

4.7.2.2 L'angiotensine II et l'inflammation.

L'activation de l'AngII *via* le récepteur AT1, puis l'activation de NOX, entraînent un mécanisme de signalisation médié par les ROS, en lien avec l'activation de la voie NFκB/TNFα *(Wei et al, 2008 a, b et c ; Wei et al, 2006)* (figure 48). Une étape cruciale dans la réponse inflammatoire locale et aigüe, suite à une lésion ou à un agent pathogène, est le recrutement des leucocytes et la sécrétion de chimiokines. Des preuves considérables existent décrivant l'obésité et le syndrome métabolique comme un état inflammatoire chronique *(Elks et Francis, 2010 ; Ferrante, 2007)* avec des élévations des taux de «monocyte chemoattractant protein-1» (MCP-1, également appelée Ccl2) et d'interleukine-6 (IL-6) tissulaires *(Elks et Francis, 2010 ; Ferrante, 2007)*. De surcroît, l'augmentation de ces deux cytokines est en corrélation avec la gravité de la NAFLD *(Haukeland et al, 2006 ; Greco et al, 2008 ; Wieckowska et al, 2008 ; Lemoine et al, 2009)*. MCP-1 est une chimiokine permettant la chimio-attraction de monocytes qui est produite par divers types cellulaires en réponse à une augmentation du stress oxydant, des facteurs de croissance et des cytokines comme TNFα *(Yadav et al, 2010)*. IL-6 est une cytokine sécrétée par différents types cellulaires et peut avoir deux modes d'action dans le foie, pro-inflammatoire et anti-inflammatoire, selon la durée d'exposition *(Tsochatzis et al, 2009)*. Un rôle potentiel de l'AngII dans l'augmentation de l'expression hépatique de ces deux cytokines a été découvert *(Kudo et al, 2009 ; Bataller et al, 2003 a et b ; Kanno et al, 2005 ; Moreno et al, 2009 ; Toblli et al, 2008)* (figure 48). En outre, il a été observé que l'AngII pourrait initier l'inflammation vasculaire en activant des monocytes, ceci par l'intermédiaire de l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'IL-6, *via* l'activation transcriptionnelle de NFκB, dans des modèles de rongeurs *(Brasier, 2010)*.

4.7.3 Le rôle de l'angiotensine II dans la fibrose.

L'AngII a la puissante capacité d'initier les cascades de signalisation pouvant produire une fibrose hépatique. La stimulation *in vitro* des HSCs par l'AngII entraîne l'augmentation de la prolifération cellulaire, l'augmentation de capacité de migration, et l'expression de TGFβ et du pro-collagène ; qui étaient au préalable tous bloqués par un traitement avec divers ARBs (angiotensin II receptor blockers) *(Bataller et al, 2000 ; Kurikawa et al, 2003)* (figure 48).
Un autre mécanisme entraînant la fibrose du foie par l'AngII est l'augmentation de l'activité de NOX dans les hépatocytes et les HSCs. Ces études démontrent le rôle de la médiation de l'AngII

dans l'activité de NOX et la signalisation des ROS entraînant ainsi une fibrogénèse par les HSCs activées *(De Minicis et Brenner, 2007)*. Le stress oxydant médié par NOX et modulateur de la fibrose hépatique a été observé chez des rats ayant une activité accrue de NOX activée par l'AngII *(Wei et al, 2008 a, b et c)*.

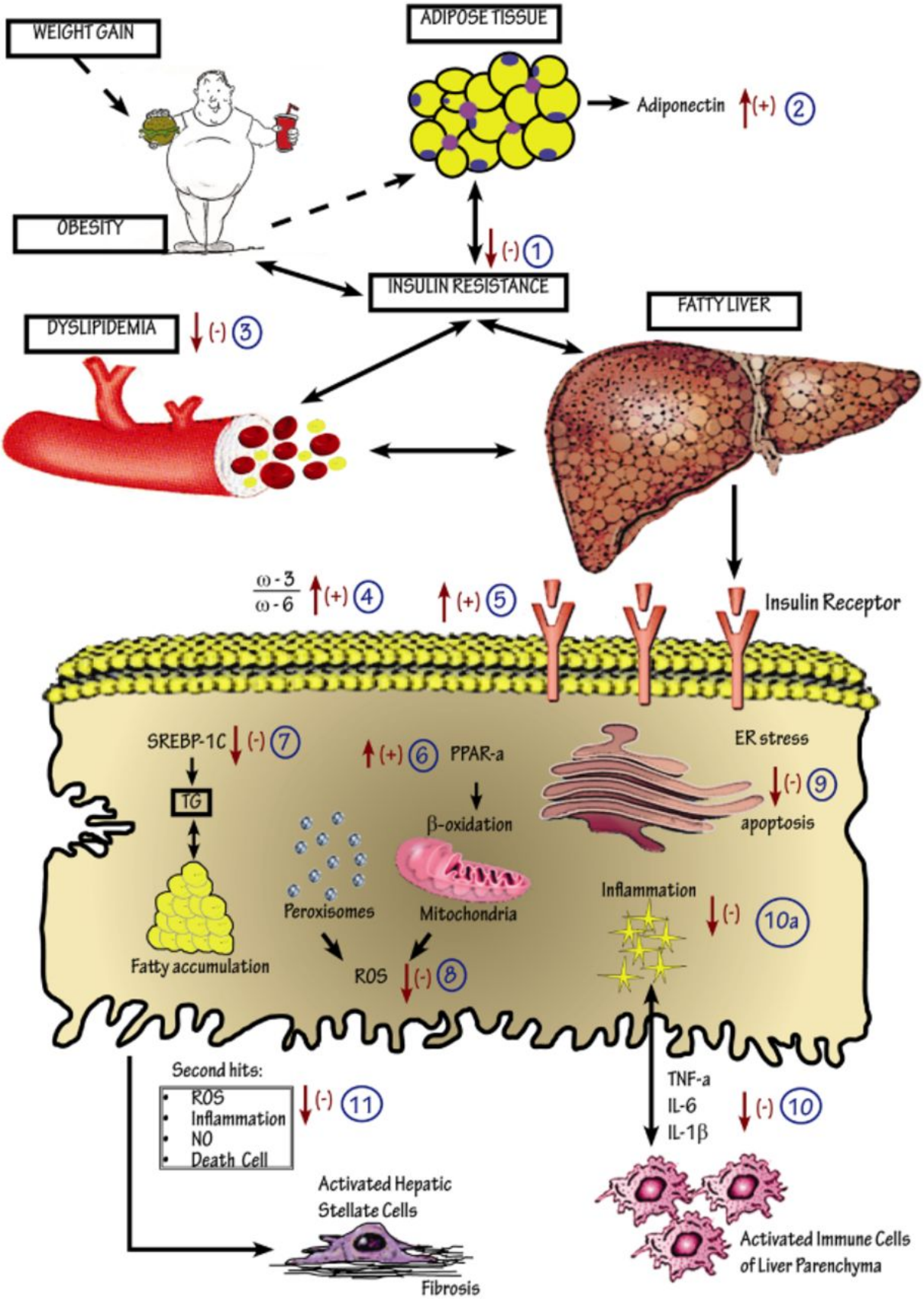


Figure 49 : Schéma récapitulatif des facteurs mis en jeu dans les NAFLDs (tiré de *Bouzianas et al, 2013*).

Objectifs d'étude

Au cours du développement fœtal et postnatal, les tissus et les organes sont progressivement modelés, alternant périodes de prolifération, de différenciation et apoptose, en réponse à des programmes génétiques et épigénétiques bien précis. Tout au long du développement, des facteurs alimentaires ou métaboliques modulent l'expression de certains gènes. Toute inadéquation entre ces apports nutritionnels et métaboliques (qualitatifs et quantitatifs) et les besoins précis de ces processus de développement, durant la fenêtre temporelle qui leur est impartie, pourra résulter en un développement anormal ou en une fonction défectueuse de ces tissus ou organes, souvent irréversibles.

Le chercheur britannique David Barker apportait en 1989 le lien entre la coronaropathie de l'adulte et la malnutrition pendant la vie fœtale. En effet, Barker a mené une étude auprès de 15 000 personnes nées avec un poids insuffisant et constaté une forte incidence des maladies cardiovasculaires chez ces sujets. Des études ultérieures sont venues confirmer sa théorie appelée «hypothèse de Barker», selon laquelle l'environnement prénatal et périnatal influe sur les probabilités d'être atteint d'une maladie cardiovasculaire, d'obésité, d'insulino-résistance ou de diabète, dans la vie adulte.

Cependant, la plupart des études portent sur des carences protéino-énergétiques, peu d'études se sont intéressées aux carences en donneurs de méthyles (folates et vitamine B12).

Récemment, deux études menées en Inde et au Népal ont montré que la carence en vitamine B12 pendant la gestation est corrélée à un faible poids à la naissance et à une insulino-résistance *(Yajnik et Deshmukh, 2012 ; Stewart et al, 2011)*.

Au cours de l'embryogenèse, les donneurs de méthyles jouent un rôle essentiel dans les mécanismes épigénétiques et épigénomiques (méthylation/acétylation) qui influencent l'expression des gènes et la signalisation cellulaire et jouent un rôle important dans la physiopathologie du retard de croissance intra-utérin, avec des répercussions au cours du développement et tout au long de la vie. Lors d'une carence en donneurs de méthyles, la dysrégulation de ces mécanismes épigénétiques et épigénomiques est observée dans le cerveau, le foie, le cœur et l'estomac.

Des travaux antérieurs dans notre laboratoire ont montré qu'une carence maternelle en donneurs de groupements méthyle provoque un déséquilibre du rapport acétylation/méthylation de PGC-1α, suite à une réduction de l'expression de SIRT1, avec pour conséquences une altération de l'oxydation des acides gras, une hypertrophie du myocarde et une stéatose hépatique *(Garcia et al, 2011 ; Pooya et al, 2012)*. La carence maternelle en donneurs de groupements méthyle perturbe également le développement neuro-

comportemental de la progéniture avec notamment des troubles cognitifs et de la neuroplasticité. Ces atteintes neurologiques sont dues à une élévation de l'apoptose dans les structures qui accumulent l'homocystéine (hippocampe, cervelet...) *(Blaise et al, 2007 ; Daval et al, 2009)*.

Initialement, ce projet comportait l'étude de trois organes clés du métabolisme énergétique, à savoir le foie, le cœur et le cerveau.
Cependant, le cerveau ne semble pas être affecté par cette problématique et le cœur quant à lui montre des résultats prometteurs mais ces recherches ne sont pas assez avancées pour vous les présenter. Donc ce manuscrit ne comprend que les résultats concernant le foie.

Les problématiques de cette étude sont les suivantes :

- Quelles seront les conséquences d'un retour à une alimentation standard chez des rats initialement carencés en donneurs de méthyles au cours de leur vie fœtale ?

- Existe-t-il un effet «fetal programming» de la carence gestationnelle en donneurs de méthyles sur le foie de rats devenus adultes et soumis à un régime hyper-énergétique (HF) ? Si oui, quelles en seront les conséquences au niveau hépatique, organe clé du métabolisme ?

- La stéatose hépatique observée chez les rats carencés en donneurs de méthyles de 21 jours s'accentue-t-elle et progresse-t-elle vers une NASH ?

- Les mécanismes de dysrégulation épigénomique du métabolisme énergétique produits par la carence en donneurs de méthyles avant et pendant la gestation sont-ils impliqués dans une augmentation du risque de syndrome métabolique liés à une programmation fœtale, en cas de surnutrition à l'âge adulte ?

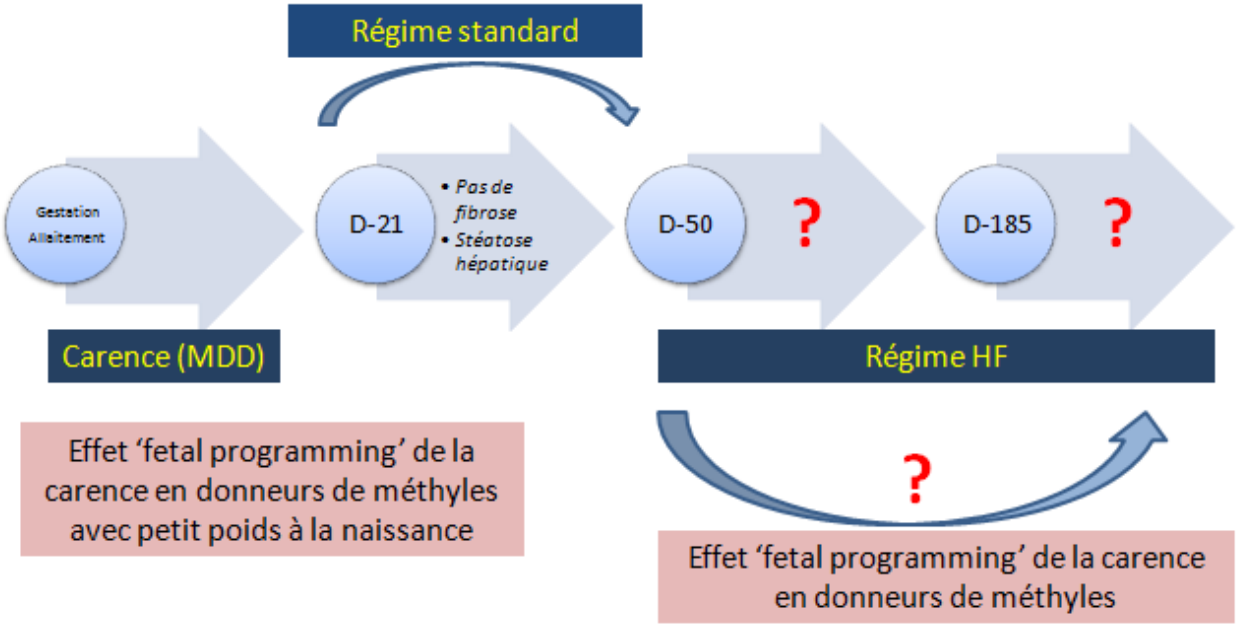


Figure 50 : Schéma récapitulatif des résultats sur le foie à 21 jours et problématiques du sujet.

Etude expérimentale

1 Résumé du protocole expérimental.

Des rates Wistar ont initialement été séparées en deux groupes, un groupe de rates "contrôles" recevant de la nourriture standard ainsi qu'un groupe de rates "carencées" recevant de la nourriture carencée en folates et vitamine B12 ; ces régimes étant reçus avant les accouplements, pendant la gestation et jusqu'au sevrage des petits (D21) (figure 51).

Puis les ratons des deux groupes ont tous reçu le même régime, à savoir le régime standard, de 21 jours à 50 jours. A ce stade D50, deux groupes sont toujours identifiables : le groupe de ratons "contrôle" nés de mères contrôles et le groupe de ratons "iMDD" nés de mères initialement carencées en donneurs de méthyles.

Puis ces ratons, devenus adultes, ont été séparés en deux types de groupes, un groupe recevant toujours le régime standard "contrôle" et un groupe recevant un régime hyper-énergétique (HF) (riche en sucres et lipides), ceci de 50 jours à 185 jours. A ce stade ultime D185 quatre groupes existent :

- le groupe de rats "contrôle", nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle.
- le groupe de rats "contrôle/HF", nés de mères contrôles et recevant un régime HF.
- le groupe de rats "iMDD", nés de mères carencées et recevant un régime contrôle.
- le groupe de rats "iMDD/HF", nés de mères carencées et recevant un régime HF.

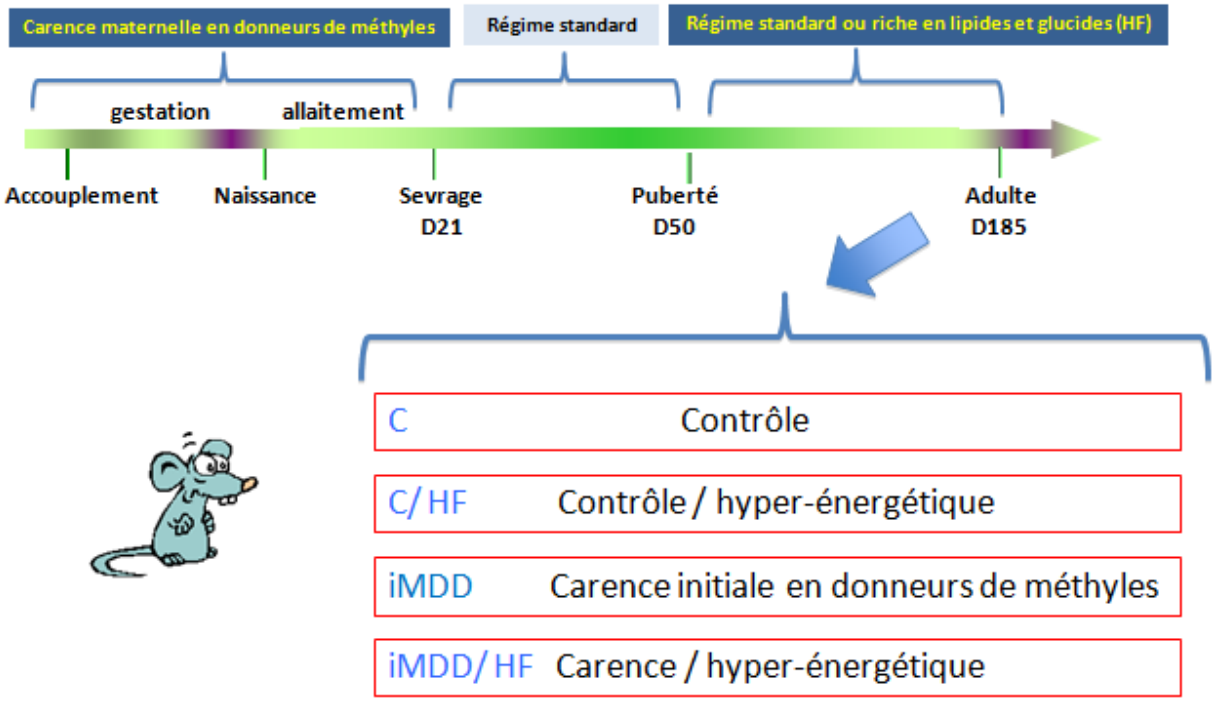


Figure 51 : Représentation schématique du protocole animal.

2 L'augmentation de la graisse abdominale et du ratio ASAT/ALAT des rats D50 iMDD et signes biochimiques et histologiques de NASH des rats D185 iMDD/HF.

Les ratons de 50 jours issus de mères carencées (iMDD) montrent une diminution de leur poids corporel par rapport à ceux nés de mères recevant un régime standard, mais ceci n'étant pas significatif (figure 52A). Le rapport poids du foie/poids corporel total ne varie pas entre les rats D50 iMDD et D50 contrôles (figure 52A).

L'analyse par DXA (absorption bi-photonique à rayons X) montre que le rapport graisse abdominale/graisse totale corporelle augmente chez les rats D50 iMDD par rapport aux rats D50 contrôles (figure 53B). Le groupe de rats iMDD a donc tendance à accumuler de la graisse au niveau de l'abdomen et développe ainsi une obésité abdominale (ou centrale), qui est un des différents critères diagnostiques d'un syndrome métabolique.

Les analyses biochimiques ont montré que le groupe iMDD de 50 jours a des concentrations plasmatiques en folates, vitamine B12 et, de manière surprenante, également en Hcy significativement inférieures par rapport au groupe contrôle (figures 54A et 55A). Ceci indique

que les rats iMDD ne semblent toujours pas avoir comblé ce déficit en vitamines B9 et B12 dans le sang, et cela malgré un retour à une alimentation standard à partir de 21 jours. En outre, les analyses biochimiques n'ont révélé aucune variation de la concentration de MMA (acide méthylmalonique) plasmatique à 50 jours (figure 55A). Or, le MMA s'élève dès les premiers stades d'une carence en vitamine B12, avant même que les concentrations en B12 ne s'abaissent de manière mesurable. En effet, la méthylmalonyl-CoA mutase entraîne la transformation du méthylmalonyl-CoA (déterminé sous la forme d'acide méthylmalonique ou MMA) en succinyl-CoA ; cette réaction nécessitant la vitamine B12 comme co-facteur. Par conséquent, à 50 jours, il semble y avoir encore certains effets visibles de la carence maternelle en donneurs de méthyles dans le sang, mais plusieurs effets ont déjà commencé à s'estomper suite à la mise en place du régime standard. La SAM et la SAH n'ont malheureusement pu être dosées par manque d'échantillons plasmatiques.

Les lipides plasmatiques, à savoir le cholestérol total, les triglycérides et les acides gras libres ont aussi été dosés. Ces dosages ne révèlent aucune variation entre les groupes D50 iMDD et D50 contrôle (figure 56A).

Le ratio des transaminases ASAT/ALAT (marqueur de fibrose hépatocytaire) augmente dans le groupe iMDD par rapport au groupe contrôle de 50 jours (figure 56C). L'augmentation de ces enzymes dans le sang témoigne d'une lésion cellulaire hépatique.

Différentes colorations histologiques ont été effectuées sur des coupes de foies prélevés, à savoir la coloration HES (Hématoxyline-éosine-safran), le Trichrome de Masson et le Rouge Sirius. Ces colorations ne montrent pas de différence entre les groupes contrôle et iMDD de 50 jours et aucun signe de stéatose ou de fibrose (figure 57A).

Afin de confirmer l'absence de fibrose dans les foies des rats de 50 jours, une analyse par Western blot de l'expression de différents marqueurs caractéristiques de la fibrose a été effectuée. Effectivement, aucune variation d'expression pour les protéines α-smooth muscle actin (α-SMA) et les collagènes de type1 α1 et α2 (α1(I)Col et α2(I)Col), qui sont des marqueurs de fibrose, n'a pu être observée dans le foie des deux groupes (figure 58A).

Ainsi, certains signes de la carence maternelle en donneurs de méthyles, notamment plasmatiques, restent tout de même encore visibles à 50 jours. De plus, les rats de 50 jours ne présentent aucun signe histologique ou biochimique de stéatose ou de fibrose hépatique. En revanche, l'augmentation des rapports graisse abdominale/graisse totale corporelle et

ASAT/ALAT chez les individus iMDD, comparés aux individus contrôles, sont tout de même en faveur de l'hypothèse de la programmation fœtale de la carence gestationnelle en donneurs de méthyles dans le développement de NAFLD. Cette programmation fœtale pourrait-elle aggraver les conséquences d'une surnutrition de ces rats à l'âge adulte?

En ce qui concerne les quatre groupes de rats à 185 jours, il n'y a aucune différence significative de poids corporel entre les groupes (figure 52B), ce qui montre que les rats iMDD ont pu rattraper leur retard de poids par rapport au groupe contrôle ; retard observé de la naissance jusqu'à 21 jours. Il n'y a également pas de variation du rapport poids du foie/poids corporel total entre ces différents groupes de rats de 185 jours (figure 52B). Les résultats de DXA montrent une augmentation du rapport graisse abdominale/graisse totale corporelle pour les groupes contrôle/HF et iMDD/HF comparés aux groupes sans surnutrition (figure 53B). Les rats iMDD de 185 jours ne montrent plus de différence de ce rapport graisse abdominale/graisse totale corporelle avec les rats contrôles, en comparaison avec les rats à 50 jours. L'obésité abdominale des individus contrôle/HF et iMDD/HF est à nouveau l'un des différents critères diagnostiques d'un syndrome métabolique.

Les analyses biochimiques effectuées n'ont révélé aucune variation significative des concentrations plasmatiques de folates, vitamine B12, Hcy, MMA et du rapport SAM/SAH entre les différents groupes de rats de 185 jours (figures 54B et 55B et C). Cependant, certaines tendances, non significatives, peuvent être mises en évidence, comme la tendance à une augmentation de la concentration en vitamine B12 dans le groupe iMDD/HF par rapport à tous les autres groupes (figure 54B) et la tendance à une augmentation du rapport SAM/SAH, l'indicateur de la capacité de méthylation cellulaire, pour les individus iMDD/HF par rapport aux autres groupes (figure 55C).

A 185 jours, la carence maternelle en donneurs de méthyles ne semble donc plus avoir une influence sur les concentrations plasmatiques des constituants des cycles de la vitamine B9 et de la méthionine, contrairement à 50 jours.

En ce qui concerne les lipides plasmatiques, les concentrations en cholestérol total et triglycérides sont diminuées, de manière surprenante, dans le groupe iMDD/HF de 185 jours par rapport au groupe contrôle/HF. A l'inverse, le groupe de rats iMDD/HF de 185 jours montre une augmentation de sa concentration en acides gras libres, comparé aux autres groupes

(figure 56B). Toutes ces variations vont dans le sens de possibles modifications du métabolisme lipidique.

Le rapport des marqueurs de fibrose hépatocytaire ASAT/ALAT du groupe iMDD/HF est fortement augmenté par rapport aux autres groupes de 185 jours, témoignant ainsi la présence d'une fibrose hépatique (figure 56C). Il est important de préciser que ce rapport ASAT/ALAT est très faible dans les groupes contrôle/HF et iMDD de 185 jours.

Les colorations histologiques ont révélé la présence de gouttelettes lipidiques sur les coupes de foie du groupe D185 contrôle/HF, indiquant une stéatose. Mais une stéatose encore bien plus marquée est observée sur les coupes de foie du groupe D185 iMDD/HF (figure 57B). La coloration Red Oil permet de mettre en évidence les lipides. L'accumulation de gouttelettes lipidiques étant sous forme de microgouttelettes qui respectent le noyau des hépatocytes, la stéatose est alors définie comme microvésiculaire.
Bien que les colorations Trichrome de Masson et Rouge Sirius ne semblent pas révéler le développement d'une fibrose hépatique, les analyses de l'expression protéique de marqueurs de la fibrose ont tout de même été réalisées.
Ces résultats de Western blot ont alors montré une augmentation de l'expression de ces protéines marqueurs de fibrose, à savoir α-smooth muscle actin (α-SMA) et les collagènes de type1 α1 et α2 (α1(I)Col et α2(I)Col) dans le foie du groupe D185 iMDD/HF par rapport aux groupes contrôle/HF et iMDD (figure 58B). La métalloprotéinase matricielle-2 (MMP-2), quant à elle, augmente uniquement avec le régime hyper-énergétique, c'est à dire dans les groupes contrôle/HF et iMDD/HF (figure 58B). Les foies des individus iMDD/HF de 185 jours semblent donc être atteints de stéatose mais également de fibrose.

Ces différents résultats rendent compte de différents signes de NASH au niveau des individus D185 iMDD/HF comparés aux individus contrôles et contrôle/HF, à savoir une stéatose hépatique microvésiculaire associée à une fibrose, une concentration en acides gras libres plasmatiques élevée et un ratio ASAT/ALAT augmenté. Quels sont alors les mécanismes responsables de la mise en place de cette NASH ?

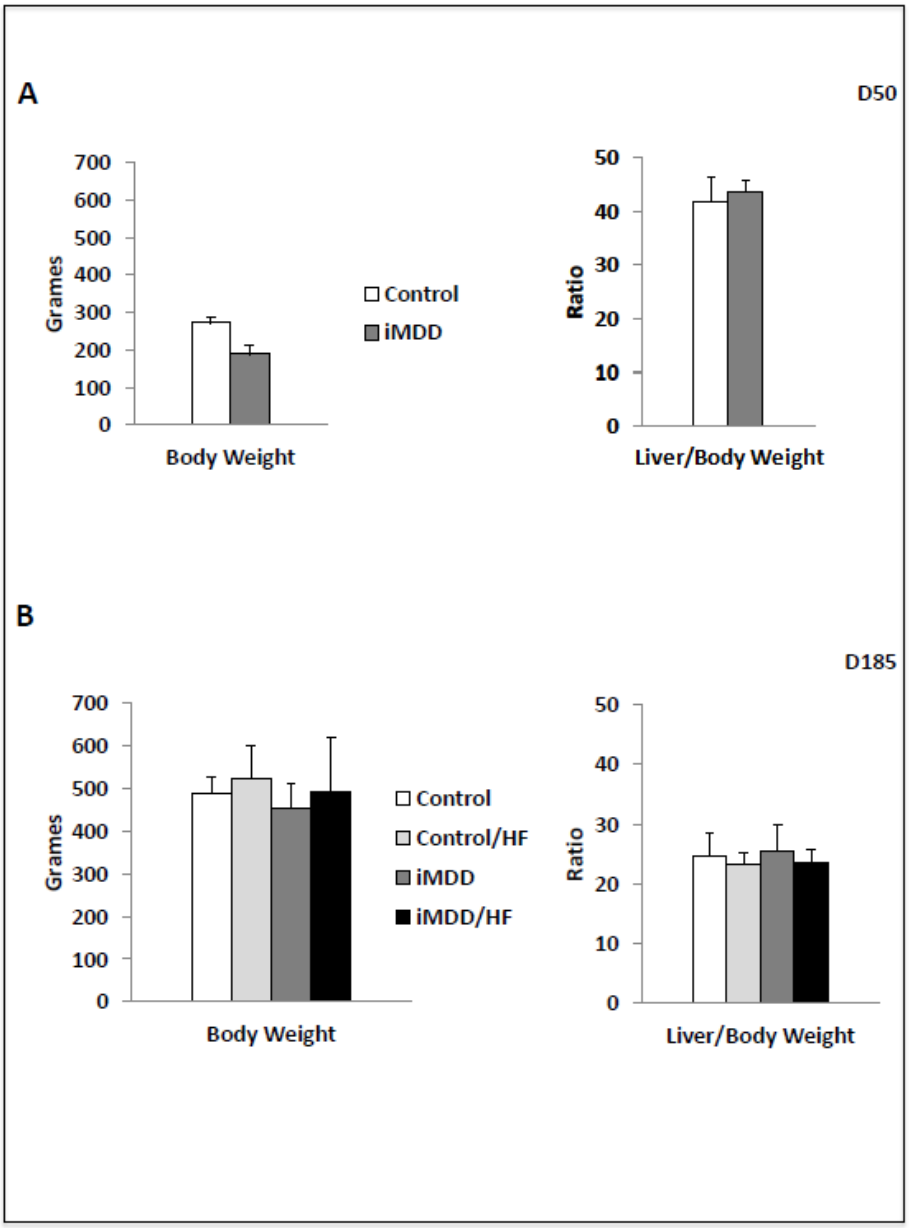


Figure 52 : Caractéristiques biophysiques des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

A : *Le poids corporel diminue, de manière non significative, chez les rats D50 iMDD par rapport aux rats D50 contrôles. Le ratio poids du foie/poids du corps total ne varie pas entre les individus D50 contrôles et D50 iMDD.*

B : *Le poids corporel et le ratio poids du foie/poids du corps total ne varient pas entre les différents individus D185.*

*Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type, avec n= 8 dans chaque groupe (*p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001).*

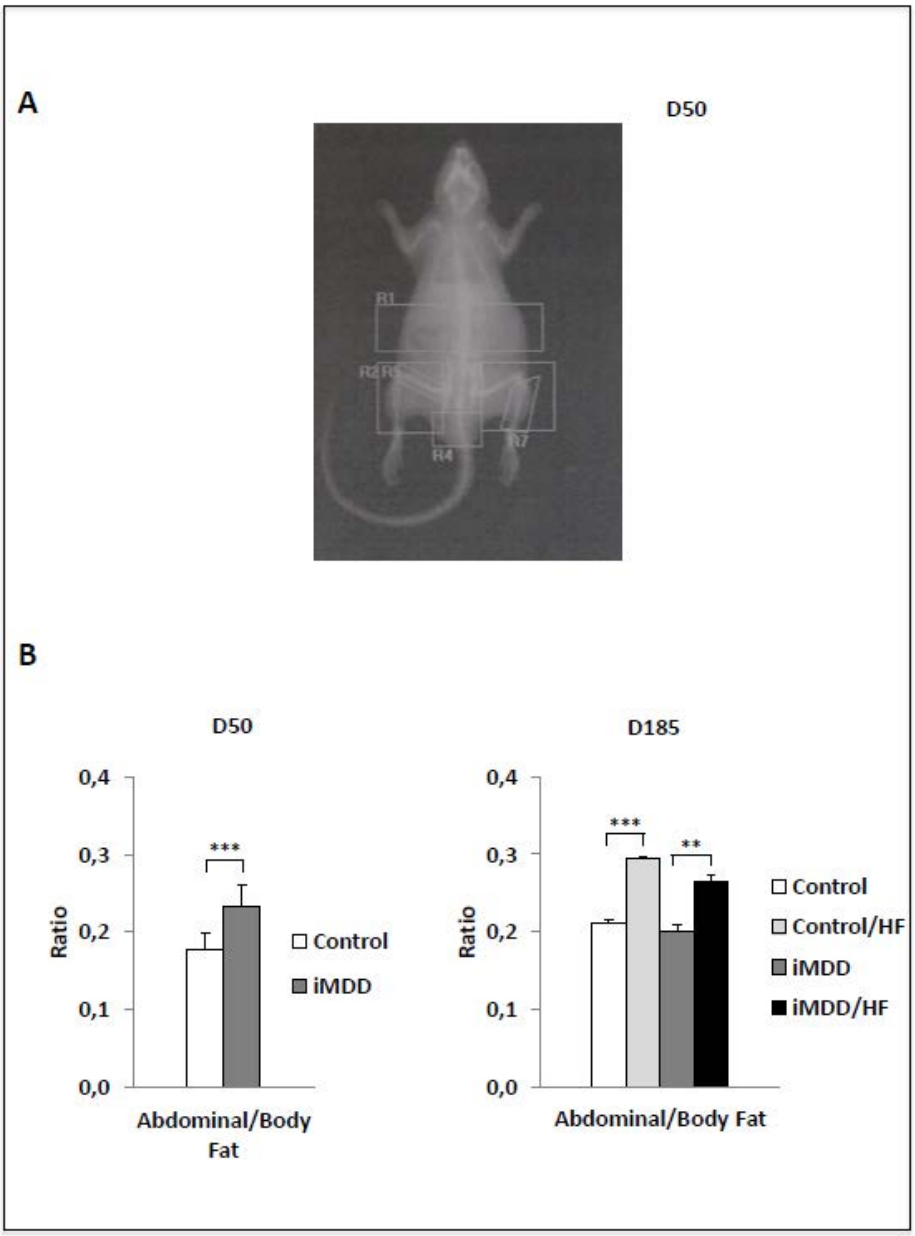


Figure 53 : Caractéristiques biophysiques des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

A : *Exemple d'un examen par DXA d'un rat D50 iMDD.*

B : *Le ratio graisse abdominale/graisse corporelle totale déterminé par DXA est supérieur chez les rats D50 iMDD par rapport aux rats D50 contrôles et augmente avec le régime hyper-énergétique chez les rats D185 (contrôle/HF et iMDD/HF) par rapport aux rats D185 contrôles et iMDD.*

*Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type, avec n= 8 dans chaque groupe (*p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001).*

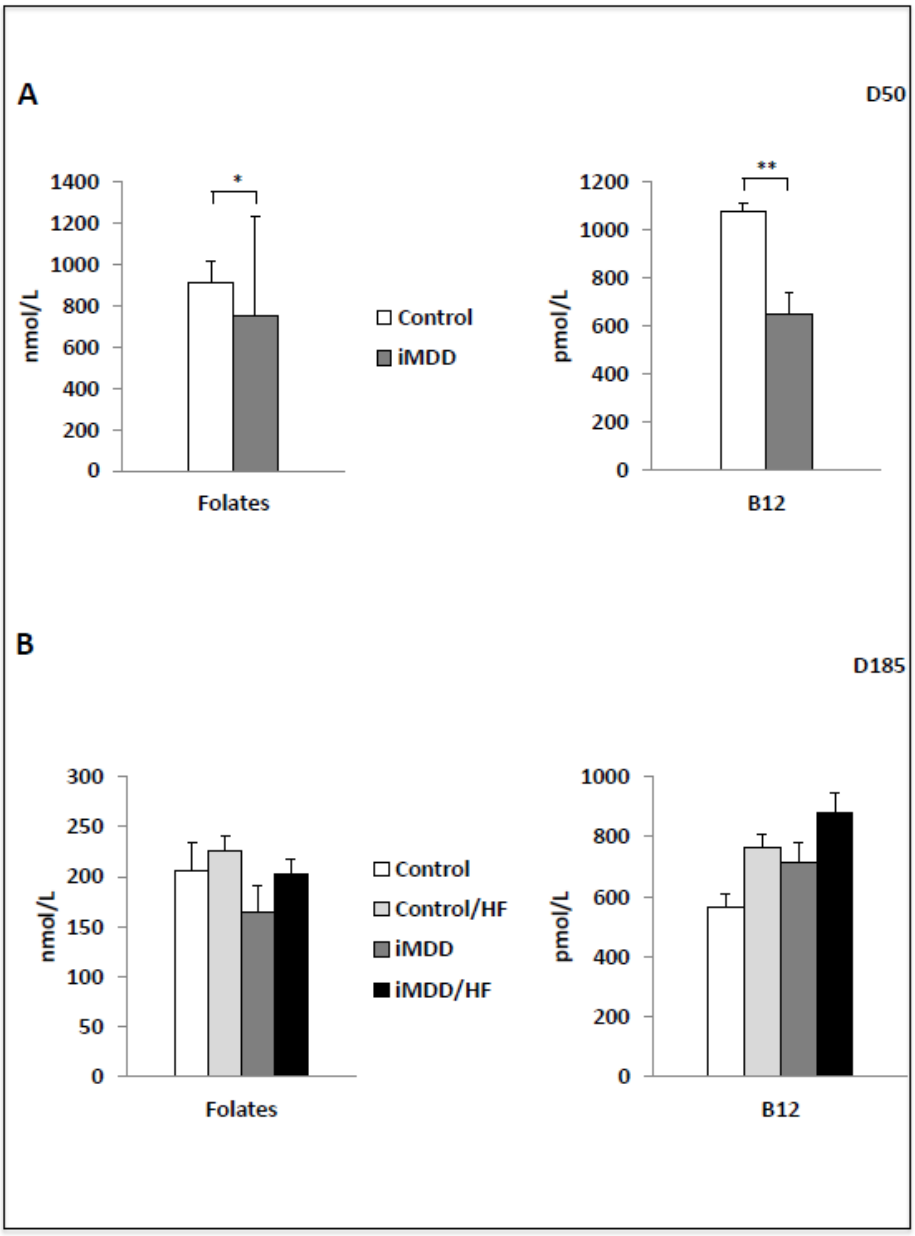


Figure 54 : Paramètres biochimiques des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

A : *Les concentrations plasmatiques de folates et vitamine B12 sont plus faibles chez les rats D50 iMDD que celles des rats D50 contrôles.*

B : *Les concentrations plasmatiques de folates et vitamine B12 ne varient pas chez les rats de 185 jours, avec tout de même une tendance non significative à l'augmentation de la concentration de la vitamine B12 dans le groupe iMDD/HF par rapport aux autres groupes.*

*Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type, avec n= 8 dans chaque groupe (*p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001).*

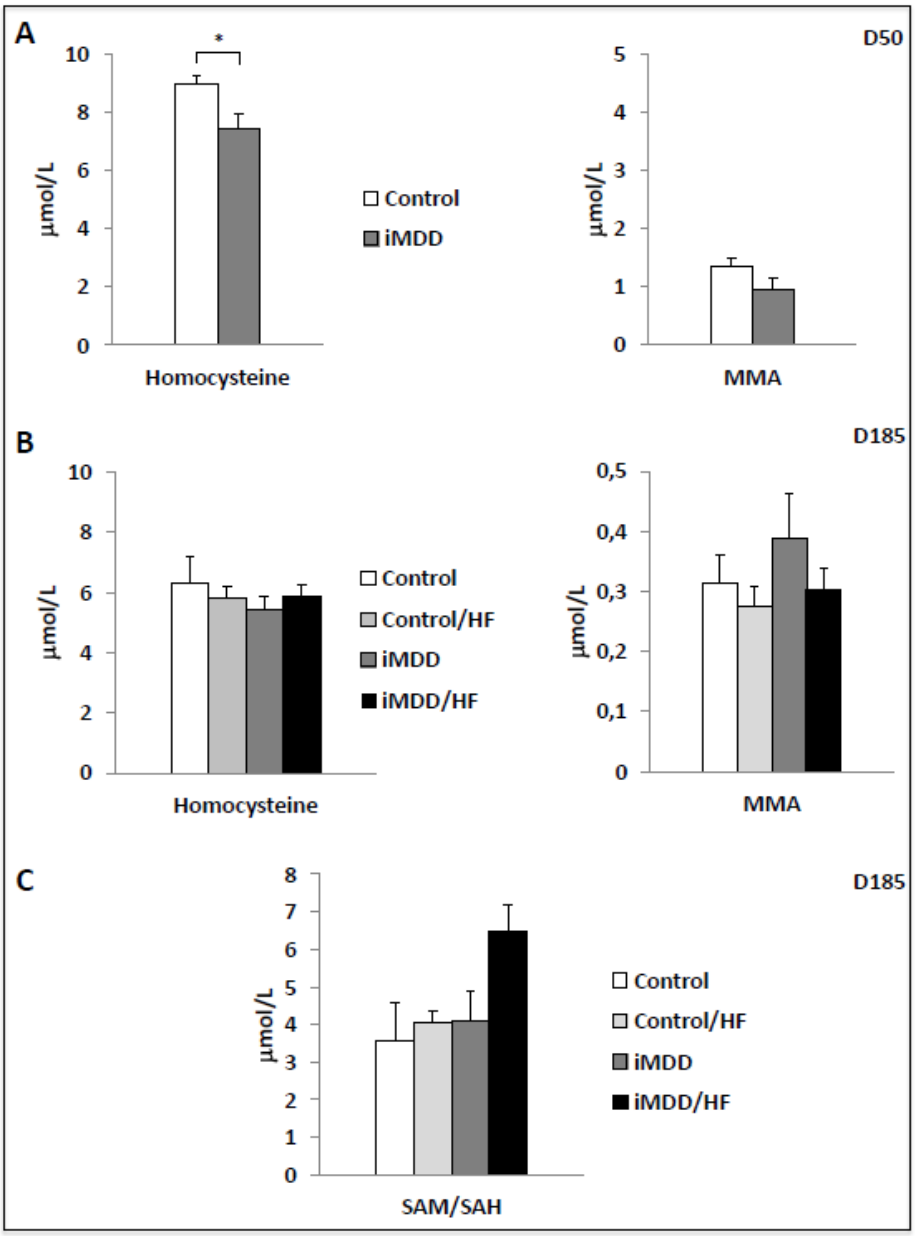


Figure 55 : Paramètres biochimiques des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

A : *La concentration plasmatique en homocystéine est plus faible chez les rats D50 iMDD par rapport aux rats D50 contrôles. Tandis que la concentration plasmatique de MMA des rats D50 iMDD est similaire à celle des rats D50 contrôles.*

B : *Les concentrations plasmatiques en homocystéine et MMA ne varient pas entre les différents groupes à 185 jours.*

C : *Les concentrations en SAM et SAH n'ont pu être dosées pour les rats de 50 jours.*

Le rapport SAM/SAH ne montre qu'une tendance, non significative, à l'augmentation dans le groupe iMDD/HF par rapport aux autres groupes à 185 jours.

*Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type, avec n= 8 dans chaque groupe (*p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001).*

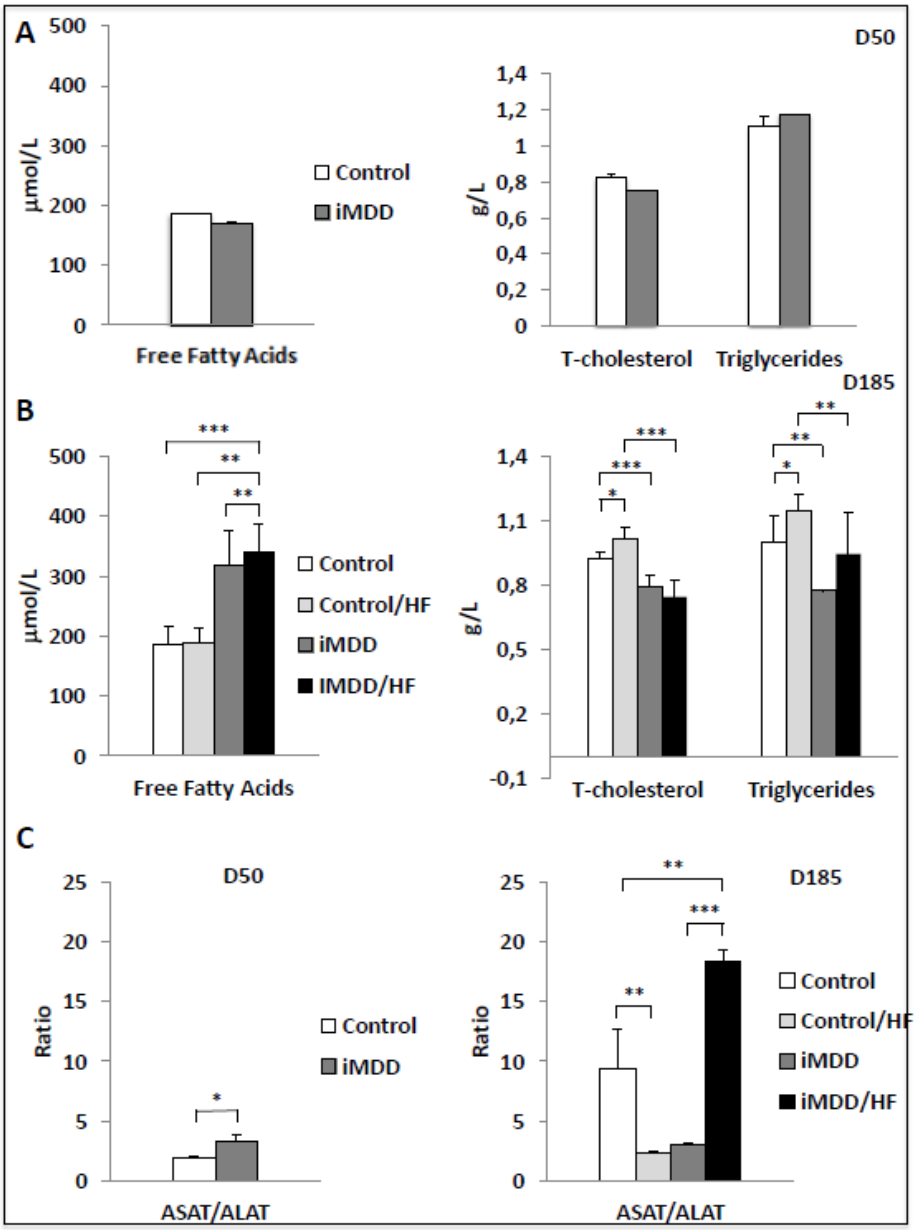


Figure 56 : Paramètres biochimiques des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

A : *Les concentrations plasmatiques en acides gras libres, cholestérol total et triglycérides des rats D50 iMDD sont similaires à celles des rats D50 contrôles.*

B : *La concentration plasmatique en acides gras libres augmente dans le groupe de rats D185 iMDD/HF, en comparaison aux autres groupes. Alors que les concentrations plasmatiques en cholestérol total et triglycérides diminuent dans le groupe D185 iMDD/HF par rapport au groupe contrôle/HF.*

C : *Le ratio ASAT/ALAT est augmenté chez les rats D50 iMDD et D185 iMDD/HF par rapport aux groupes contrôles respectifs.*

*Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type, avec n= 8 dans chaque groupe (*p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001).*

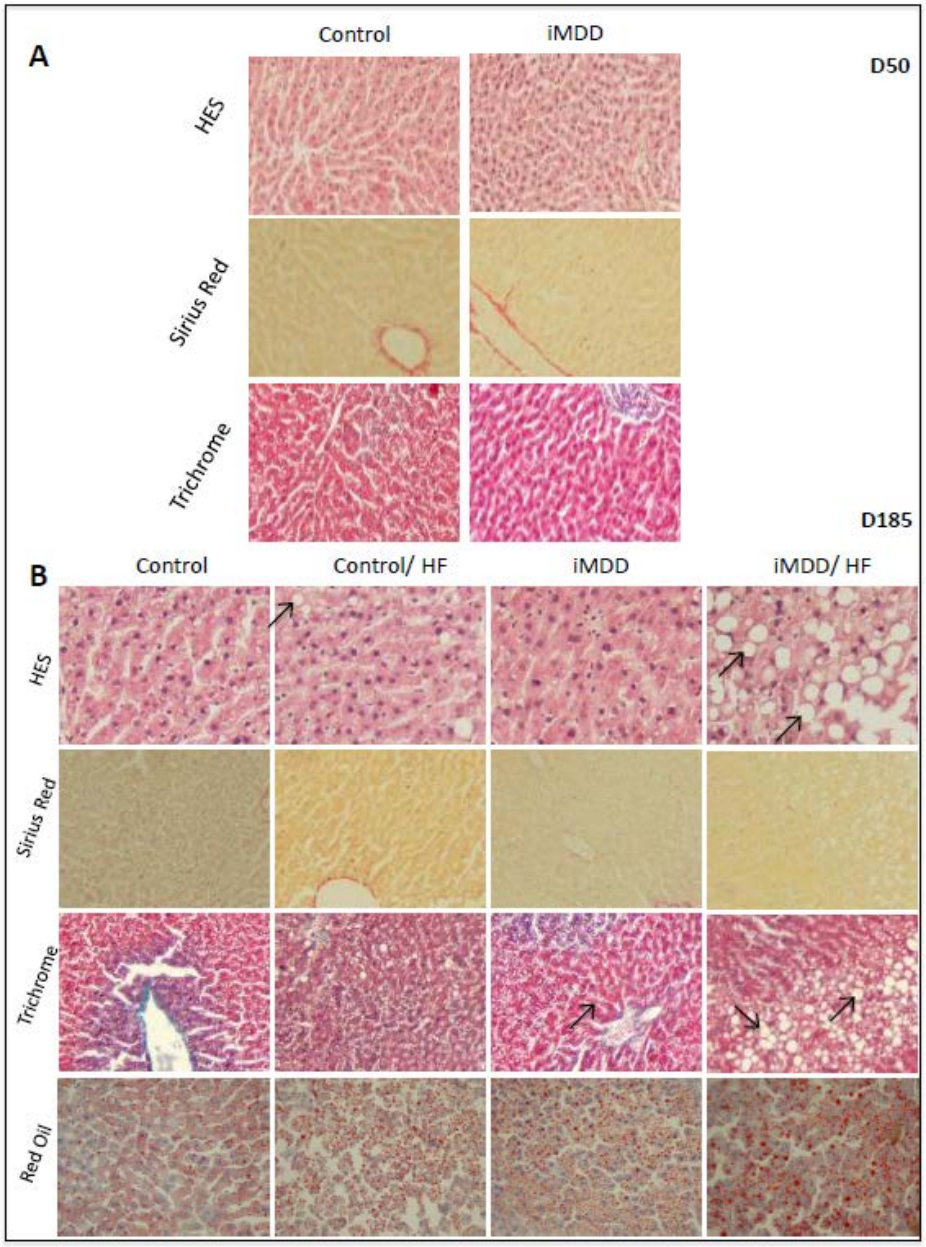


Figure 57 : Histologie des foies des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

A : *Analyse histologique de coupes de foies de rats D50 (contrôle et iMDD) avec la coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES), le Rouge Sirius (spécifique pour mettre en évidence le collagène et les fibres de réticuline) et le Trichrome de Masson (spécifique pour les fibres de collagène). Aucune stéatose ou fibrose n'est visible chez les individus D50, qu'ils soient contrôles ou iMDD.*

B : *Analyse histologique de coupes de foies de rats D185 avec la coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES), le Rouge Sirius (spécifique pour mettre en évidence le collagène et les fibres de réticuline), le Trichrome de Masson (spécifique pour les fibres de collagène) et le Red Oil (coloration de la graisse dans les cellules). Une stéatose microvésiculaire (indiquée par des flèches) peut être observée sur les coupes de foie de rats D185 contrôle/HF, mais cette stéatose étant beaucoup plus importante dans le groupe D185 iMDD/HF.*

Les photographies ont été prises au grossissement x40.

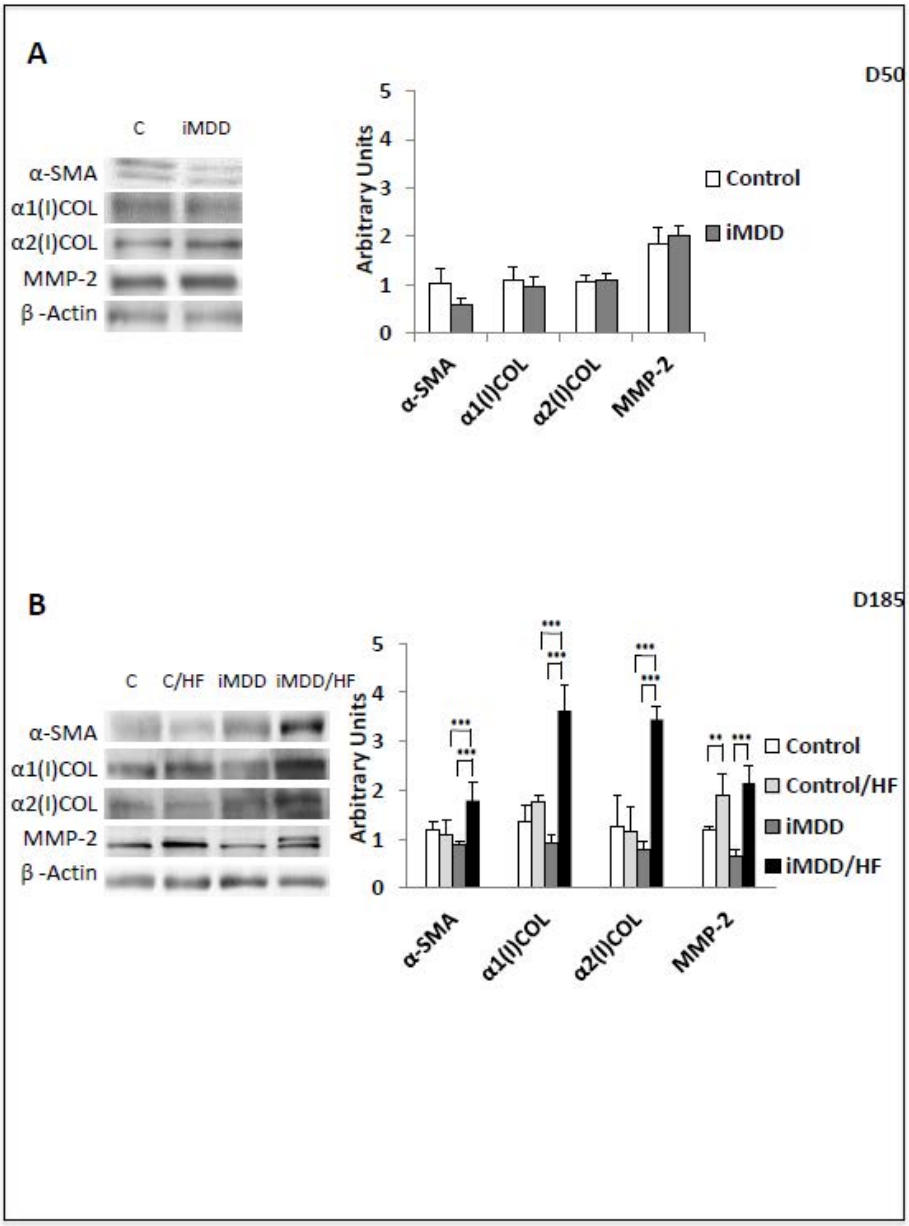


Figure 58 : Expression protéique de marqueurs de fibrose hépatique des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

Western-blots présentant α-SMA (α-Smooth Muscle Actin), les collagènes de type1 α1 et α2 (α1(I)Col et α2(I)Col) et MMP-2 (métalloprotéinase matricielle-2).

A : *L'expression des protéines α-SMA, α1(I)Col et α2(I)Col et MMP-2 ne varie pas de manière significative entre les foies de rats D50 contrôles et iMDD.*

B : *Une augmentation de l'expression de α-SMA, α1(I)Col et α2(I)Col dans le foie du groupe de rats D185 iMDD/HF par rapport aux groupes D185 contrôle/HF et iMDD peut être observée. L'expression de la protéine MMP-2 augmente dans le foie des groupes de rats D185 ayant reçu le régime hyper-énergétique, avec une augmentation plus importante mais non significative pour le groupe iMDD/HF.*

Analyses densitométriques des blots : les bandes des protéines sont normalisées par rapport à la β-actine obtenue à partir des mêmes blots. Les ratios de α-SMA, α1(I)Col, α2(I)Col et MMP-2 sont calculés en utilisant les résultats de la densitométrie et sont exprimés sous forme d'unités arbitraires. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de

Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001).*

3 L'apparition dans le groupe iMDD/HF d'une insulino-résistance et de modifications de l'expression de différents gènes impliqués dans la régulation du métabolisme.

Contrairement au HOMA-IR («Homeostasis Model for Assessment of Insulin Resistance») des rats de 50 jours qui ne varie pas, le groupe D185 iMDD/HF a un rapport HOMA-IR qui augmente par rapport aux autres groupes à 185 jours (figure 59A). De plus, les individus D50 ne montrent pas de variation significative de l'expression du transporteur spécifique du glucose dans le foie GLUT2. A l'inverse, l'expression de GLUT2 augmente dans le groupe D185 iMDD/HF par rapport au groupe D185 contrôle/HF (figure 59B et C). L'expression de GLUT2 augmente avec le régime hyper-énergétique dans les groupes de 185 jours, mais d'autant plus dans le groupe initialement carencé et soumis à un régime hyper-énergétique (iMDD/HF).

Ces résultats appuient l'hypothèse d'une insulino-résistance dans le groupe de rats iMDD/HF de 185 jours, celle-ci semblant apparaitre après 50 jours. L'insulino-résistance fait également partie des différents critères diagnostiques d'un syndrome métabolique.

En ce qui concerne les protéines régulatrices du métabolisme énergétique, une diminution de l'expression des récepteurs nucléaires PPAR-α, PPAR-γ («peroxisome proliferator-activated receptor-α et γ»), ER-α («estrogen receptor alpha»), et ERR- α («estrogen-related receptor alpha») a été observée dans le groupe D50 iMDD par rapport au groupe D50 contrôle (figure 60A). Quant aux rats de 185 jours, l'expression de ER-α et HNF4-α («hepatocyte nuclear factor 4 alpha») est diminuée dans le groupe D185 iMDD/HF par rapport au groupe D185 contrôle/HF (figure 60A). De plus, l'expression des protéines PGC-1α («peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activateur-1 α») et PPAR-α augmente avec le régime hyper-énergétique à 185 jours.

Tous ces récepteurs nucléaires jouant un rôle, entre autres, dans le métabolisme des lipides ou des glucides (que ce soit par exemple dans leur absorption, oxydation ou stockage), ces résultats montrent des dysrégulations des métabolismes énergétiques dans les groupes iMDD de 50 jours et iMDD/HF de 185 jours.

L'expression de protéines impliquées dans le transport des acides gras libres dans le foie a également été étudiée : seule l'expression de MSR1 («macrophage scavenger receptor 1») diminue dans le groupe D50 iMDD comparé au groupe D50 contrôle (figure 60B). Inversement, dans le groupe D185 iMDD/HF l'expression de MSR1 est augmentée par rapport au groupe contrôle/HF. Les autres transporteurs, à savoir CD36 («cluster of differentiation 36» ou FAT («fatty acid translocase»)), FATP2 et FATP5 («fatty acid transport proteins»), suivent la même tendance mais sans significativité (figure 60B). La disponibilité des lipides dans le foie va dépendre de l'expression de ces transporteurs d'acides gras. Ces transporteurs permettent l'absorption des acides gras du plasma au niveau hépatique. La modification de l'expression de ces transporteurs d'acides gras conforte l'hypothèse de dysrégulations du métabolisme lipidique dans les groupes iMDD de 50 jours et iMDD/HF de 185 jours.

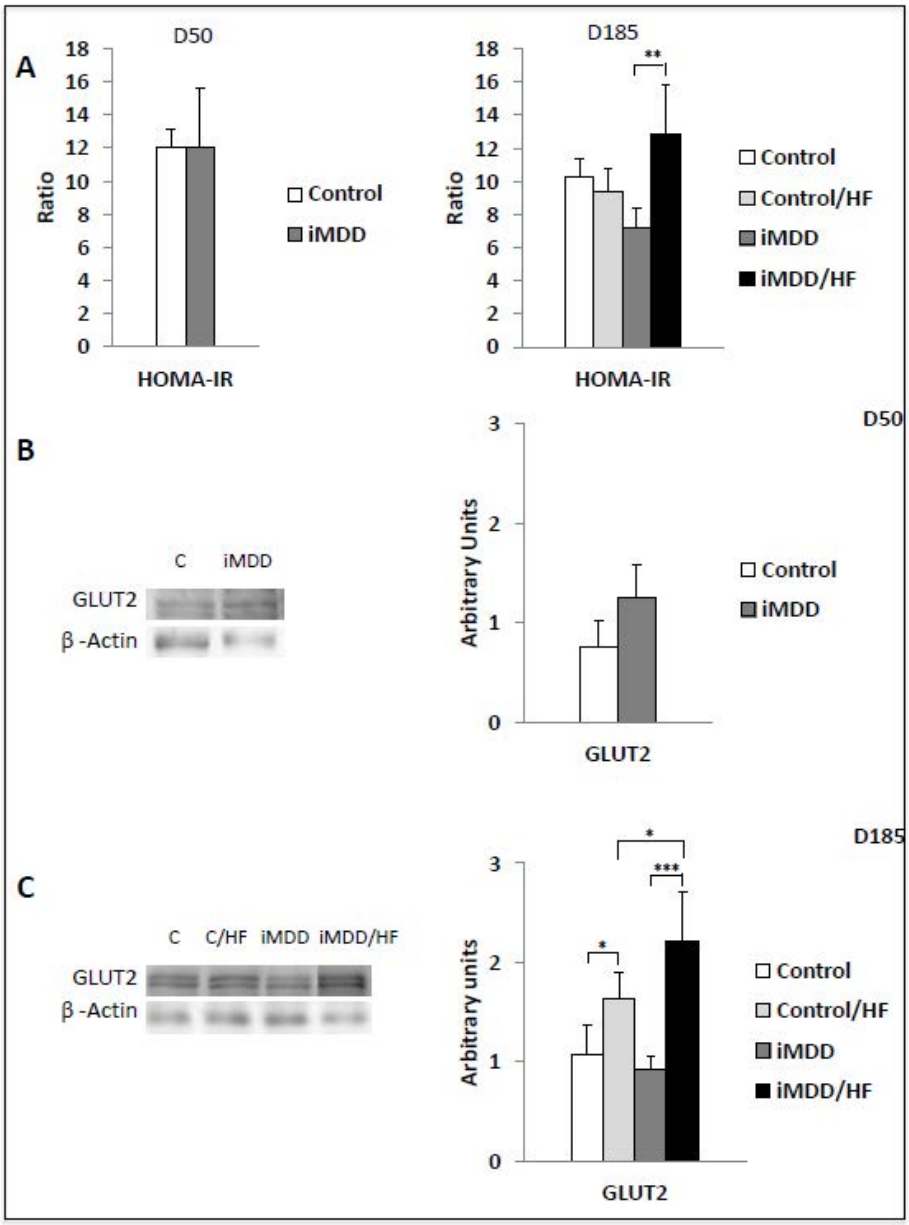


Figure 59 : Marqueur de la résistance à l'insuline et expression d'une protéine hépatique impliquée dans le transport du glucose des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

A *: Le ratio HOMA-IR, un marqueur de l'insulino-résistance, ne varie pas dans les groupes de rats D50 mais augmente dans le groupe D185 iMDD/HF comparé aux autres groupes.*

B *: Western-blot présentant l'expression de la protéine GLUT2, un transporteur hépatique du glucose. L'expression de la protéine GLUT2 ne subit pas de modification dans le foie des groupes de rats D50 (contrôle et iMDD).*

C *: L'expression de la protéine GLUT2, par Western-blot, augmente au niveau des foies du groupe D185 iMDD/HF par rapport aux groupes D185 contrôle/HF et D185 iMDD.*

Analyses densitométriques des blots : Les bandes des protéines sont normalisées par rapport à la β-actine obtenue à partir des mêmes blots. Les ratios de GLUT2 sont calculés en utilisant les résultats de la densitométrie et sont exprimés sous forme d'unités arbitraires. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque

groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001).*

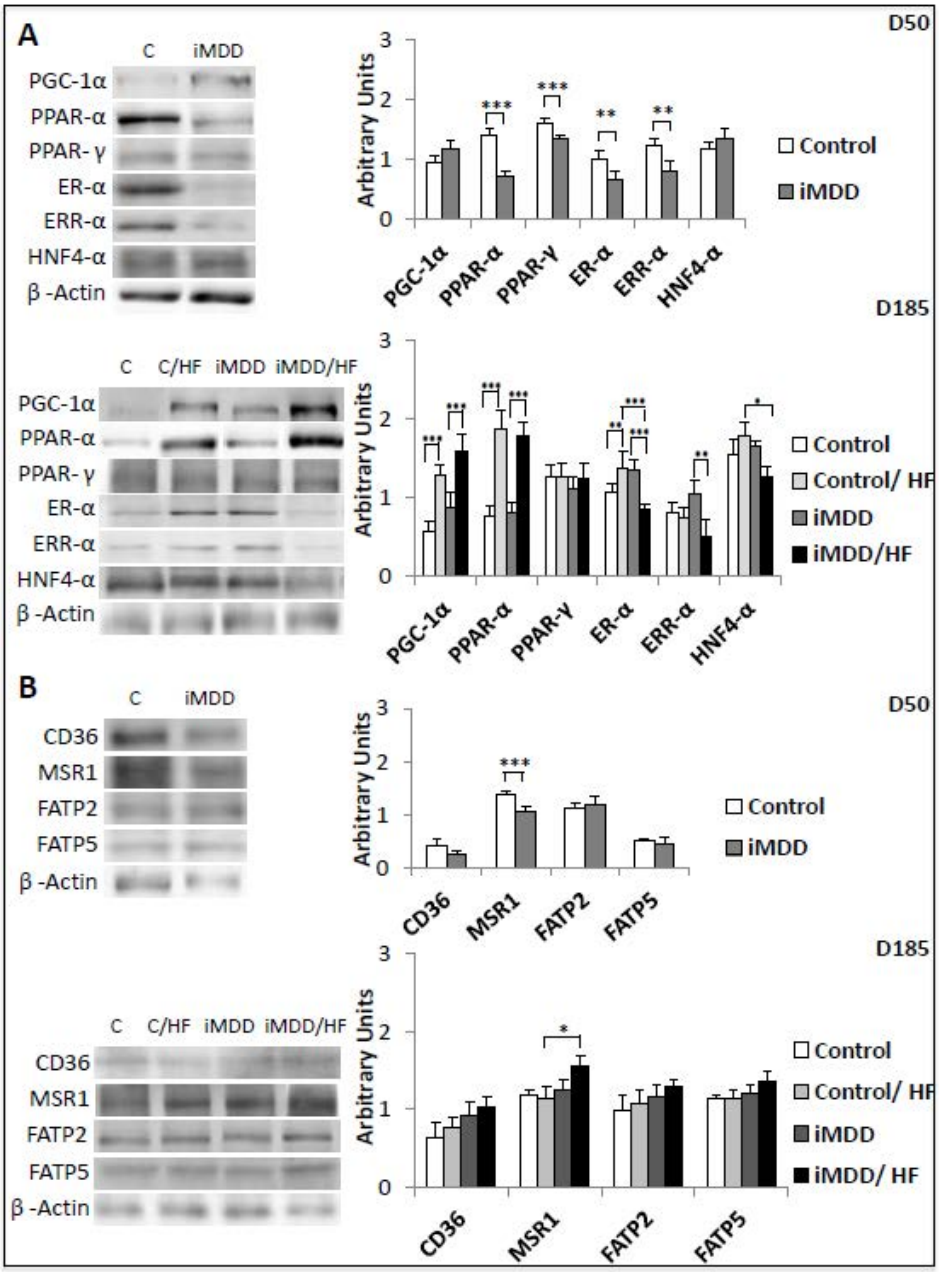


Figure 60 : Expression de protéines, impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique, dans le foie des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

A : *Western-blots présentant PGC-1α, PPAR-α, PPAR-γ, ER-α, ERR-α et HNF4-α.*
L'expression des protéines PPAR-α, PPAR-γ, ER-α et ERR-α diminue dans le foie des rats D50 iMDD par rapport au groupe contrôle. Par contre, aucune variation d'expression significative n'est observée pour les protéines PGC-1α et HNF4-α à D50. Pour les rats à D185, seuls ER-α et HNF4-α montrent une diminution d'expression, dans le foie de groupe de rats D185 iMDD/HF comparé au groupe contrôle/HF.
B : *Western-blots présentant CD36, MSR1, FATP2 et FATP5.*

L'expression de la protéine MSR1 diminue dans le foie de rats D50 iMDD par rapport au groupe contrôle ; contrairement à CD36, FATP2 et FATP5 qui ne varient pas. A l'inverse, MSR1 augmente dans le groupe D185 iMDD/HF par rapport aux autres groupes ; les autres protéines, CD36, FATP2 et FATP5, suivant la même tendance mais non significativement.
Analyses densitométriques des blots : Les bandes des protéines sont normalisées par rapport à la β-actine obtenue à partir des mêmes blots. Les ratios de PGC-1α, PPAR-α, PPAR-γ, ER-α, ERR-α, HNF4-α, CD36, MSR1, FATP2 et FATP5 sont calculés en utilisant les résultats de la densitométrie et sont exprimés sous forme d'unités arbitraires. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001).*

4 La fibrose dans les foies du groupe D185 iMDD/HF est due à une activation de gènes mis en jeu dans l'inflammasome et dans la voie fibrogénique.

Une analyse quantitative par RT- qPCR a été réalisée sur des foies des quatre groupes de rats de 185 jours. Les gènes concernés sont impliqués soit dans des processus d'inflammation, de fibrose ou de remodelage tissulaire. Les gènes représentés sur les figures 61 et 62, sont les gènes qui présentaient un changement d'expression majeur (fold change supérieur à 2), à savoir une augmentation de l'expression des transcrits des gènes dans le groupe D185 iMDD/HF. Il s'agit des gènes *Ccl11*, *Cxcr4, Il1b* et *Il1a* faisant partie des gènes pro-inflammatoires et *Nfkb1* parmi les régulateurs de l'inflammation. Mais également, *Agt* (angiotensinogène), *Tgfb1*, *Tgfb2*, *Tgfb3* et *Bmp7* (la super famille des «transforming growth factor beta»), *Vegfa* («vascular endothelial growth factor a») et *Edn1* (endothéline-1) qui font partie des gènes impliqués dans l'activation des cellules étoilées hépatiques. Le gène *Akt1*, quant à lui, code pour une protéine de la voie TGFβ impliquée dans la transition des cellules épithéliales à mésenchymateuses. Les gènes *Acta2* (α-SMA) et *Col1a2* font partie des gènes pro-fibrotiques. Et enfin, *Plat* («plasminogen activator»), *Timp1*, *Timp2 et Timp4* («tissue inhibitor of metalloproteases»), *Itga3* et *Itgb8* (intégrines) ainsi que *Thbs2* (thrombospondine 2) sont des gènes jouant un rôle dans l'adhésion cellulaire et la synthèse ou la dégradation de la matrice extracellulaire (figures 61 et 62).
Ces gènes peuvent être impliqués dans des voies de signalisation communes et différentes interactions peuvent avoir lieu entre ces nombreux gènes, comme des co-expressions ou des co-localisations.

Par conséquent, ces résultats indiquent que la NASH observée dans le groupe D185 iMDD/HF a été développée par l'activation de gènes impliqués dans différentes voies de signalisation, à savoir l'inflammation, l'activation des cellules étoilées hépatiques, la fibrose et le remodelage tissulaire ; ces voies étant essentiellement activées par les constituants de l'inflammasome, l'angiotensinogène et la famille TGFβ.

L'activation de ces différentes voies sera-t-elle confirmée par l'analyse de l'expression protéique?

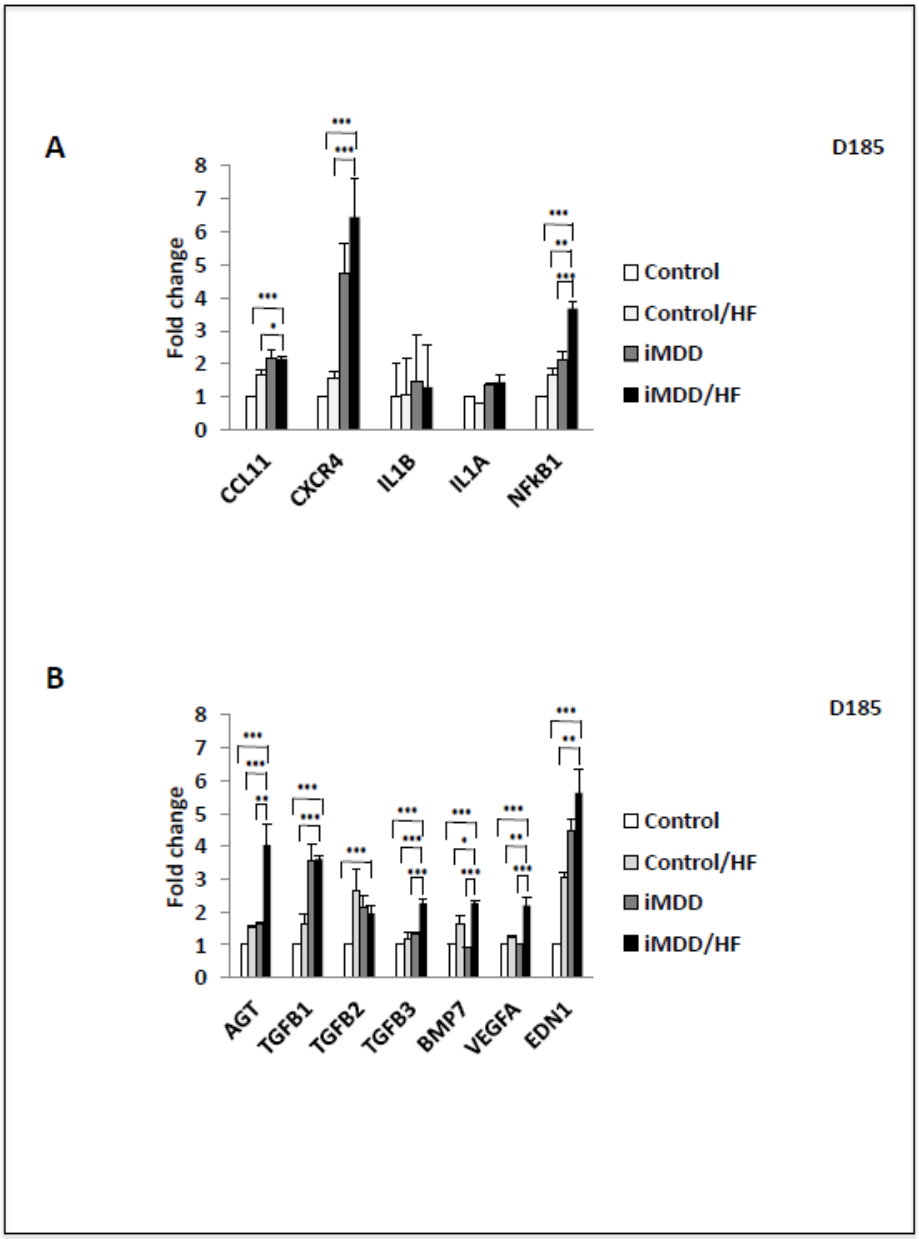


Figure 61 : Analyse quantitative des transcrits de gènes jouant un rôle dans l'inflammation et dans la voie fibrogénique des foies de rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

A : *Les modifications majeures (Fold Change supérieur à 2) de la voie inflammatoire concernent les gènes Ccl11, Cxcr4, Il1b, Il1a et Nfkb1.*

B : *Les gènes Agt (angiotensinogène), Tgfb1, Tgfb2, Tgfb3 et Bmp7 (transforming growth factor beta super family), Vegfa (Vascular endothelial growth factor A) et Edn1 (endothéline- 1) sont les gènes impliqués dans l'activation des cellules étoilées hépatiques subissant les variations les plus importantes (Fold Change supérieur à 2).*

Les données, avec n = 4 dans chaque groupe, sont présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001).*

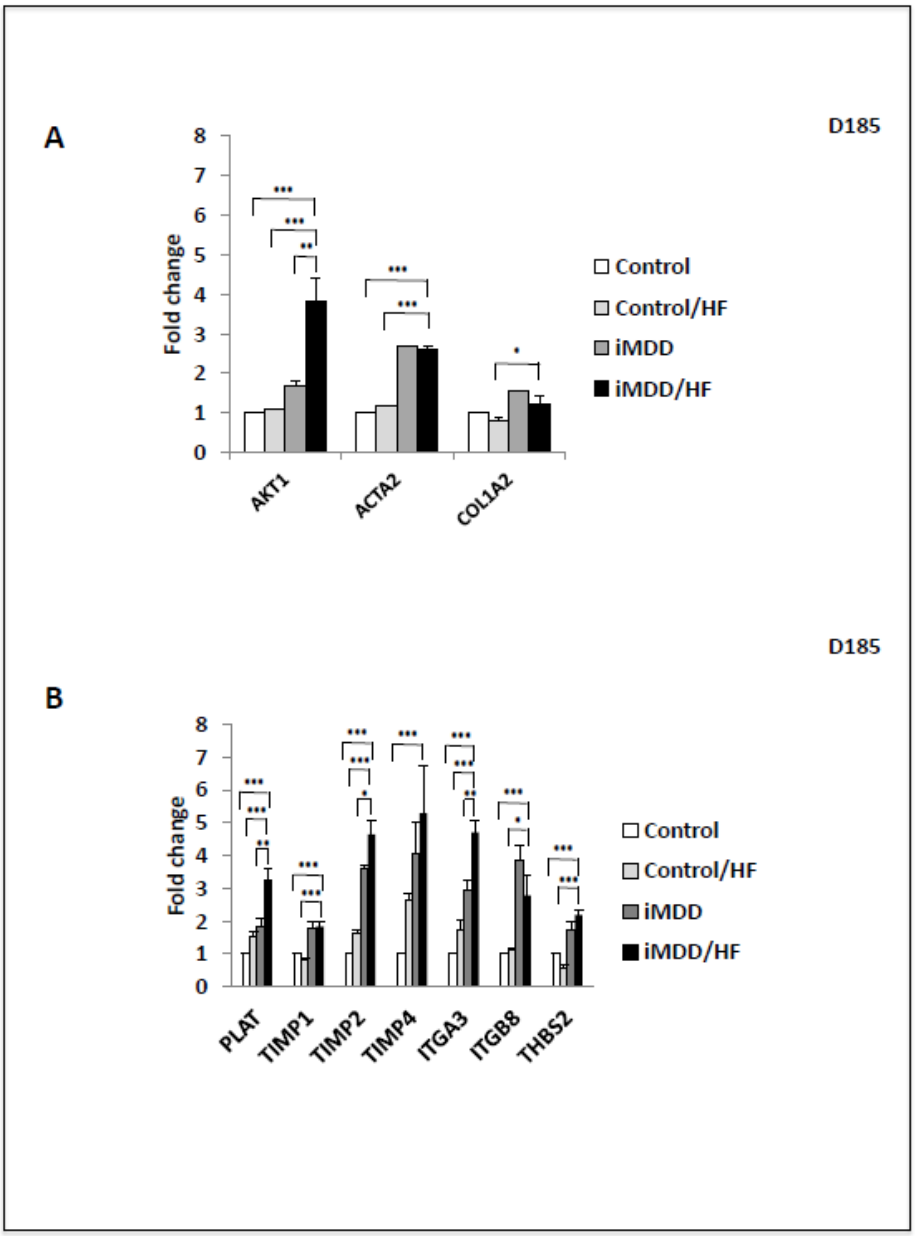


Figure 62 : Analyse quantitative des transcrits de gènes jouant un rôle dans la voie fibrogénique et le remodelage des tissus des foies de rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

A : *Le gène Akt1 code pour une protéine de la voie TGFβ impliquée dans la transition des cellules épithéliales à mésenchymateuses et subit des variations très importantes (Fold Change supérieur à 2). Les gènes Acta2 (α-SMA) et Col1a2 font partie des gènes pro-fibrotiques subissant les variations les plus importantes (Fold Change supérieur à 2).*

B : *Les gènes Plat (plasminogen activator), Timp1, Timp2 et Timp4 (tissue inhibitor of metalloproteases), Itga3 et Itgb8 (intégrines) et Thbs2 (thrombospondine 2) sont les gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et la synthèse ou la dégradation de la matrice extracellulaire subissant les variations les plus importantes (Fold Change supérieur à 2).*

Les données, avec n = 4 dans chaque groupe, sont présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001).*

5 L'inflammasome, l'angiotensine II (AGT), le récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1) et la voie de TGFβ sont des activateurs de la voie fibrogénique dans les foies du groupe D185 iMDD/HF.

Dans le but de vérifier les résultats obtenus par RT-qPCR, une analyse par Western blot, de l'expression de protéines mises en jeu dans l'inflammation, l'activation des cellules étoilées hépatiques, la fibrose et le remodelage tissulaire a été effectuée.

Aucune variation d'expression des marqueurs de l'inflammation étudiés, à savoir NFκB, Caspase-1 et IL-1β clivée, n'a été observée dans les foies des individus de 50 jours (figure 63A). Par contre, l'étude révèle une augmentation de l'expression de NFκB ainsi qu'une importante augmentation de l'expression de Caspase-1 et IL-1β clivée (interleukine-1β active) dans les foies du groupe D185 iMDD/HF par rapport au groupe D185 contrôle/HF (figure 63A). Caspase-1 clive IL-1β et la rend ainsi active.
L'expression des inducteurs de fibrose, à savoir BMP7 («bone morphogenetic protein 7»), AGT (angiotensine II) et AT1 (récepteur de l'angiotensine II de type 1, médiant le rôle pro-fibrotique de l'angiotensine), est augmentée dans le groupe D50 iMDD comparé au groupe D50 contrôle ; TGFβ1 ne variant pas entre ces deux groupes (figure 63B). Pour les individus de 185 jours, TGFβ1, BMP7 et AGT ont leur expression augmentée dans les foies du groupe iMDD/HF par rapport aux groupes iMDD et contrôle/HF (figure 63B), contrairement à AT1 qui augmente mais sans significativité.
Ces résultats confirment donc l'augmentation de l'expression des gènes *Nfkb1, Tgfb1, Agt et Bmp7* en RT-qPCR chez les animaux D185 iMDD/HF comparés aux autres groupes de 185 jours.

En appui avec ces résultats, une forte augmentation de la concentration plasmatique en angiotensine II a été mise en évidence dans le groupe D50 iMDD par rapport au groupe D50 contrôle ainsi que dans les groupes D185 iMDD et iMDD/HF (figure 63C) ; cette augmentation étant apparue visiblement avant 50 jours et se poursuivant donc à un âge plus avancé.

Ainsi, ces résultats indiquent qu'il y a, essentiellement après la période de 50 jours, mise en place d'un processus inflammatoire suivi du développement d'une fibrose hépatique, ou du moins le début de l'induction d'une fibrose, dans les foies de rats iMDD/HF de 185 jours.

Ces résultats ont mis en évidence une implication majeure de l'angiotensine II, un acteur principal du syndrome métabolique et de la NASH, ainsi que la super-famille TGFβ dans la programmation fœtale de la carence en donneurs de méthyles sur la fibrose hépatique.

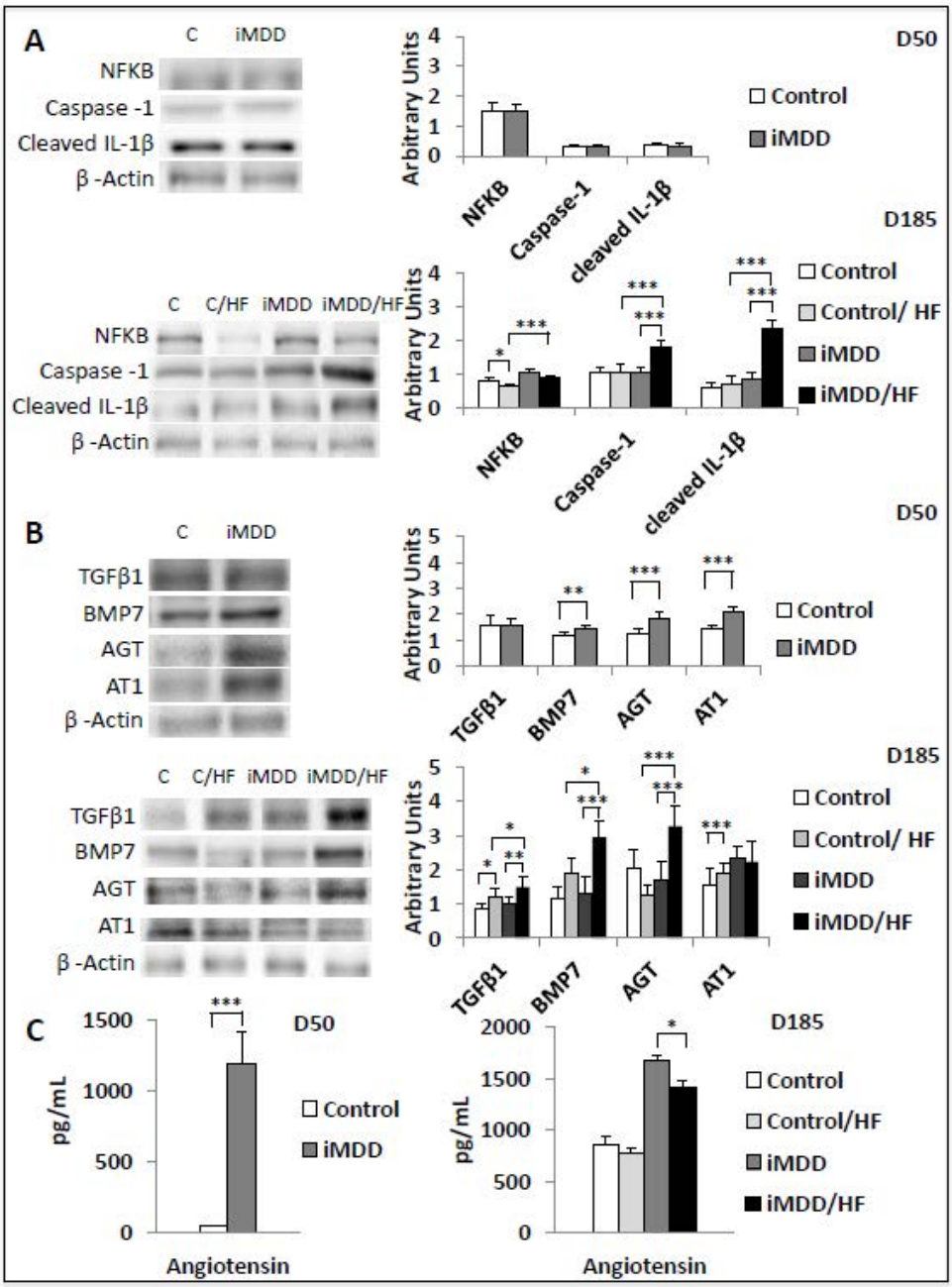


Figure 63 : Expression de protéines, impliquées dans l'inflammasome et la voie fibrogénique, dans le foie des rats D50 soumis initialement à une carence en donneurs de méthyles (pendant la gestation et l'allaitement) et des rats D185 soumis à une nourriture hyper-énergétique à l'âge adulte.

A *: Western-blots présentant NFκB, Caspase-1 et IL-1β clivée.*
L'expression des protéines NFκB, Caspase-1 et IL-1β clivée ne varie pas de manière significative dans les foies de rats D50 contrôles et iMDD.
L'expression des protéines NFκB, Caspase-1 et IL-1β clivée augmente dans le foie des rats D185 iMDD/HF par rapport aux autres groupes D185.

B : *Western-blots présentant TGFβ1, BMP7, angiotensine II (AGT) et AT1 (angiotensin receptor type 1).*
Une augmentation de l'expression de BMP7, AGT et AT1 dans le foie du groupe de rats D50 iMDD, par rapport au groupe D50 contrôle, peut être observée.
Pour les rats à D185, l'expression des protéines TGFβ1, BMP7 et AGT augmente dans le foie des rats D185 iMDD/HF par rapport aux autres groupes D185.
Analyses densitométriques des blots : Les bandes des protéines sont normalisées par rapport à la β-actine obtenue à partir des mêmes blots. Les ratios de NFκB, Caspase-1, IL-1β clivée, TGFβ1, BMP7, AGT et AT1 sont calculés en utilisant les résultats de la densitométrie et sont exprimés sous forme d'unités arbitraires. Les données sont comparées par une analyse de variance (Anova) avec le test de Fisher, avec n = 8 dans chaque groupe, et présentées sous forme de la moyenne ± écart-type (p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001).*
C : *La concentration plasmatique en angiotensine II est supérieure chez les individus D50 iMDD et D185 iMDD/HF par rapport à leurs groupes contrôles.*

Discussion et perspectives

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales ont été menées afin de déterminer le rôle de la surnutrition dans le développement du syndrome métabolique, le diabète de type 2 et la NASH, mais peu de ces études concernaient l'effet de la programmation fœtale d'une carence en micronutriments sur ces maladies. Actuellement, 5 à 15 % des femmes enceintes présentent une carence en folates et/ou en cobalamine. Ces carences en vitamines peuvent augmenter le risque d'un petit poids à la naissance et avoir une influence sur les évènements liés à la programmation fœtale, dont les mécanismes épigénomiques et épigénétiques contrôlant l'expression des gènes *(Guéant et al, 2013)*. De plus, les enfants et les adolescents sont, de nos jours, fréquemment exposés à la surnutrition.

Précédemment, nous avions déjà découvert que la carence en donneurs de méthyles durant la gestation et l'allaitement entraîne l'apparition d'une stéatose microvésiculaire au niveau du foie chez les ratons sevrés de 21 jours. Cette stéatose est accompagnée d'une augmentation de la concentration en triglycérides et acides gras libres plasmatiques et de la concentration en lipides totaux hépatiques, résultant en partie de la diminution de l'oxydation mitochondriale des acides gras. Les mécanismes moléculaires observés les plus importants sont la diminution de l'expression des protéines HNF4-α, ER-α et ERR-α ainsi que l'hypométhylation du co-activateur PGC-1α, ce qui a pour conséquence la réduction de son interaction avec PPAR-α, ER-α et HNF4-α *(Pooya et al, 2012)*.

Le but de notre étude a été d'évaluer, à l'aide d'un modèle expérimental de programmation fœtale chez des rats carencés en donneurs de méthyles, les liens et les mécanismes pathologiques entre la programmation fœtale et la NASH.

Comme attendu, le retour à un régime normal, entre 21 jours et 50 jours, a fait disparaître la stéatose hépatique et la majorité des désordres métaboliques observés chez les ratons initialement carencés de 21 jours. Les variations majeures observées chez les individus initialement carencés de 50 jours (D50 iMDD) sont une augmentation du taux de graisse abdominale et du rapport ASAT/ALAT par rapport aux individus contrôles. L'obésité abdominale des rats iMDD de 50 jours, faisant partie des différents critères diagnostiques d'un syndrome métabolique, pourrait bien être un des arguments en faveur du développement d'un tel syndrome chez ces rats.

Pour évaluer cette hypothèse, ces animaux ont été exposés à l'âge adulte à un régime hyper-énergétique, ce régime contenant moins de graisses que les autres régimes habituellement utilisés dans les modèles animaux de NASH. Ceci peut expliquer le fait que ce régime hyper-

énergétique entraîne, chez les rats D185 contrôle/HF, certaines anomalies métaboliques et histologiques sans augmentation de l'expression de NFκB ou des marqueurs de l'inflammasome. Au cours de notre étude, en comparant les groupes de rats, nous avons déduit que les différents effets observés sont liés à une exposition consécutive à un régime carencé en donneurs de méthyles suivi d'un régime hyper-énergétique (iMDD/HF) et ne sont donc pas une conséquence spécifique du régime hyper-énergétique seul.

L'influence combinée de l'effet "programmation fœtale" de la carence en donneurs de méthyles et du régime hyper-énergétique produit plusieurs caractéristiques de la NASH chez les individus D185 iMDD/HF, comme la stéatose et la fibrose hépatiques ainsi que l'augmentation de l'expression de marqueurs de l'inflammation et de la fibrose, par rapport au groupe contrôle/HF. Une plus grande concentration en acides gras libres plasmatiques ainsi que l'augmentation de l'expression de MSR1, un transporteur hépatique d'acides gras, peuvent induire les mécanismes pathologiques de la stéatose en augmentant l'import d'acides gras vers le foie *(Guéant et al, 2013 ; Bechmann et al, 2012)*. Il a déjà été montré que la disponibilité des lipides dans le foie dépend de l'expression des transporteurs d'acides gras *(Canbay et al, 2007)*. Il est également clairement établi qu'un dysfonctionnement dans le contrôle du métabolisme global des lipides joue un rôle majeur dans l'initiation et la persistance des NAFLDs.

Une inflammation au niveau du foie a également été mise en évidence, dans le groupe de rats iMDD/HF de 185 jours, par l'augmentation de l'expression de la protéine NFκB, un régulateur de l'inflammation, et Caspase-1 et IL-1β clivée, des marqueurs de l'inflammasome. Une augmentation de l'expression de NFκB a déjà été observée chez les patients obèses atteints d'une NASH *(Videla et al, 2009)*, chez les souris obèses (ob/ob) *(Velayudham et al, 2009)* et dans un modèle de rongeurs atteints d'une NASH recevant un régime carencé en méthionine et en choline (MCD) *(Dela Pena et al, 2005)*. Les protéines Caspase-1 et IL-1β jouent toutes deux un rôle majeur dans les stéato-hépatites non-alcooliques induites par un régime alimentaire spécifique chez les rongeurs, que ce soit un régime carencé en méthionine et choline (MCD) *(Csak et al, 2011)* ou encore un régime hyper-énergétique (HF) *(Dixon et al, 2013)*. Dans ces différents modèles, les acides gras libres activent la voie de signalisation de NFκB et mènent ainsi à la production de cytokines.

L'activation d'IL-1β par l'inflammasome ainsi que l'augmentation de l'expression des membres de la super famille TGFβ jouent un rôle important dans la stimulation des cellules étoilées hépatiques puis dans la mise en place de la fibrose *(Czaja, 2014)*. En effet, en cohérence avec tous ces mécanismes, une augmentation de l'expression des ARNm des membres de la super

famille TGFβ, à savoir *Tgfb1, Tgfb2, Tgfb3* et *Bmp7*, a bien été observée dans le tissu hépatique du groupe de rats iMDD/HF, comparé aux autres groupes. TGFβ1 a donc activé les cellules étoilées hépatiques, entraînant leur transformation en myofibroblastes *(Hayashi et Sakai, 2012)*, ceci étant démontré par l'augmentation de l'expression de α-SMA chez les rats iMDD/HF de 185 jours. L'activation des cellules étoilées hépatiques est également en concordance avec l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des intégrines (*Itga3 et Itgb8*) ainsi que des chimiokines inflammatoires (*Ccl11* et *Cxcr4*) *(Czaja, 2014)*. Bien que le rôle de TGFβ1 dans la fibrogenèse hépatique soit bien établi, le potentiel rôle de BMP7 n'est pas aussi clair. Une étude a montré que les cellules étoilées hépatiques stimulées par BMP7 ont également une augmentation de l'expression du collagène de type I et de la fibronectine *(Tacke et al, 2007)*. Inversement, BMP7 pourrait aussi atténuer, voire empêcher, une fibrose hépatique chez le rat en inhibant l'expression de TGFβ1 *(Wang et al, 2013)*. Or cet effet préventif de BMP7 semble plutôt limité, dans notre étude, à la vue de l'apparition d'une fibrose dans le groupe de rats iMDD/HF de 185 jours. Ainsi, d'après notre travail, BMP7 semblerait davantage entraîner, ou du moins permettre, la mise en place d'une fibrose hépatique plutôt que l'inhiber.

Le gène *Agt* (angiotensinogène) est un des gènes majeurs impliqués dans la pathogenèse de la NASH. Dans notre étude, l'expression du gène *Agt* est augmentée de manière conséquente dans le foie du groupe de rats D185 iMDD/HF. Nos résultats montrent également une importante augmentation de la concentration plasmatique en angiotensine II chez les individus iMDD de 50 jours et les individus iMDD/HF de 185 jours, ainsi qu'une augmentation de l'expression de la protéine angiotensine II dans les foies de ces mêmes groupes. Il a déjà été montré que les cellules étoilées hépatiques synthétisent l'angiotensineII *(Bataller et al, 2003)* ; cette dernière améliorant la contraction et la prolifération des myofibroblastes et favorisant également la sécrétion de cytokines inflammatoires et l'accumulation de matrice extracellulaire *(Lubel et al, 2008)*. Une augmentation de l'expression de la protéine AT1, un récepteur de l'angiotensine II, peut également être observée dans le groupe de rats iMDD de 50 jours. Ce récepteur semble être responsable de la majorité des effets pro-fibrotiques de l'angiotensine. Récemment, il a été montré que le gène codant pour AT1 (*Agtr1a*) fait partie des gènes dont l'expression est fortement modifiée dans le foie des ratons carencés en donneurs de méthyles (MDD) de 21 jours *(Chen et al, 2015)*. Il a déjà été montré que l'axe délétère angiotensine/AT1 altère l'homéostasie du glucose et favorise la résistance à l'insuline. Ceci est illustré par une faible sensibilité à l'insuline pour les rats montrant un taux d'angiotensine tissulaire élevé. En effet, il a été montré que l'activation de la voie inflammatoire de NFκB par l'angiotensine joue

un rôle critique dans la résistance à l'insuline dans des modèles de rats exposés à une nourriture hyper-énergétique *(Zhou et al, 2015)*. L'augmentation de l'expression du gène *Agtr1a* dans le foie des ratons carencés en donneurs de méthyles (MDD) de 21 jours ainsi que l'augmentation du ratio HOMA-IR des rats iMDD/HF de 185 jours suggèrent qu'une altération du système rénine-angiotensine est un composant majeur des effets de la programmation fœtale de la carence en donneurs de méthyles sur l'inflammation du foie et la résistance à l'insuline.

La résistance à l'insuline joue un rôle majeur dans la pathogenèse de la NASH. Ceci est appuyé par l'augmentation du ratio HOMA-IR, l'augmentation de l'expression dans le foie de la protéine GLUT2, un transporteur du glucose hépatique, ainsi que l'augmentation de la concentration en acides gras libres plasmatiques, dans le groupe de rats iMDD/HF de 185 jours. La résistance à l'insuline n'était pas observée dans le groupe de rats iMDD de 50 jours, ce qui signifie qu'elle a donc été produite par deux expositions consécutives, en premier lieu l'effet de la programmation fœtale de la carence en donneurs de méthyles puis la nutrition hyper-énergétique à l'âge adulte. L'expression du transporteur GLUT2 est nécessaire au contrôle physiologique des gènes sensibles au glucose. En effet, l'inactivation de GLUT2 dans le foie entraînerait une altération de la sécrétion d'insuline, hormone stimulée par le glucose *(Thorens, 2015)*. En outre, dans des conditions de résistance à l'insuline, le tissu adipeux et le muscle oxydent de préférence les lipides, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la quantité d'acides gras libres dans la circulation sanguine *(Leclerq et Sempoux, 2006 ; Lewis et Mohanty, 2010)*. L'activation de la voie angiotensine/AT1, de part son influence sur le métabolisme viscéral, pourrait bien être une des causes majeures de l'augmentation de la graisse abdominale et de la résistance à l'insuline chez les rats D185 iMDD/HF. En effet, l'activation de la voie angiotensine/AT1 active NFκB et entraîne des variations de l'adipogenèse, de la lipogenèse et du contenu corporel en tissu adipeux blanc *(Favre et al, 2015)*. La diminution de l'expression du facteur nucléaire ER-α observée dans le groupe D185 iMDD/HF est en adéquation avec la résistance à l'insuline et la dysrégulation du métabolisme lipidique décrits pour ce même groupe. Plusieurs données dans la littérature ont souligné que l'absence de ER-α provoque une résistance à l'insuline, une intolérance au glucose et une diminution des dépenses énergétiques ; cela dans les deux sexes *(Chen et al, 2009).* Il a également été montré que l'absence d'œstrogènes entraîne une altération du métabolisme des triglycérides et des acides gras libres plasmatiques et du stockage des lipides par les adipocytes *(Cooke et al, 2001).* L'expression d'un autre facteur nucléaire diminue également dans le groupe D185 iMDD/HF, il

s'agit de HNF4-α, à qui on a attribué dernièrement un rôle dans les différents processus inflammatoires du foie *(Babeu et Boudreau, 2014)*. HNF4-α régule de nombreux gènes clés impliqués dans le métabolisme du cholestérol, des acides gras et du glucose (néoglucogenèse), les jonctions cellulaires, la différenciation et la prolifération dans le foie.

Notre modèle expérimental reproduit des observations faites dans des populations d'Inde et du Népal où la prévalence de la carence en vitamine B12 est très importante pendant la grossesse. Il a été constaté que cette carence produit des effets de programmation fœtale durant l'enfance qui sont très semblables à ceux observés dans notre modèle expérimental comme un petit poids à la naissance, l'augmentation de la graisse abdominale ainsi qu'une résistance ultérieure à l'insuline *(Yajnik et Deshmukh, 2012 ; Stewart et al, 2011)*. Actuellement, les enfants ainsi que les adolescents sont de plus en plus exposés à une nutrition hyper-énergétique dans les pays industrialisés et non industrialisés. Dans ces populations, une ultérieure exposition à la surnutrition peut être une deuxième cause qui participe à l'augmentation de la prévalence de la résistance à l'insuline observée chez les enfants nés de mères carencées en vitamine B12 lors de leur grossesse.

Nos résultats suggèrent que la programmation fœtale, liée à la carence en donneurs de méthyles, pourrait être l'une des conditions initiales qui augmenterait le risque de développer ultérieurement une NASH, voire un syndrome métabolique, chez les patients obèses. Cette hypothèse devrait susciter davantage d'intérêt dans les études de population.

En conclusion, une carence en donneurs de méthyles pendant la gestation et l'allaitement entraîne une stéatose hépatique chez les ratons sevrés (D21) ainsi qu'une NASH chez les rats devenus adultes et soumis à une nutrition hyper-énergétique (D185) ; cela malgré le retour à une histologie et à un métabolisme majoritairement normaux suite à une alimentation standard du sevrage jusqu'au jour D50. L'activation de la voie angiotensine/AT1, l'augmentation de l'expression de TGFβ1 et la résistance à l'insuline sont les modifications majeures liées à l'activation de l'inflammasome, de la voie NFκB et des cellules étoilées ainsi que le développement d'une fibrose. Ces résultats suggèrent que la programmation fœtale produite par la carence en donneurs de méthyles est un facteur de risque de NASH, voire même du syndrome métabolique ; la NASH étant considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique. Ces résultats devraient susciter davantage d'attention dans les études de population afin d'évaluer si la carence en vitamine B12 et/ou en folates pendant la grossesse

et l'allaitement peut augmenter le risque de développer une NASH au cours de la vie adulte chez des sujets humains soumis à la surnutrition.

Perspectives:

Une stéato-hépatite non-alcoolique (NASH) peut évoluer vers une cirrhose, voire même par la suite entraîner le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC). Il serait donc intéressant de prolonger dans le temps le protocole expérimental de programmation fœtale de la carence en donneurs de méthyles associée à une surnutrition à l'âge adulte, menant ainsi les rats à un âge plus avancé. Ainsi, nous pourrions étudier les conséquences au niveau hépatique à long terme. Il faudrait tout de même veiller à ne pas arriver à un âge des rats trop avancé pour ne pas risquer d'interférer les résultats par d'autres problèmes liés au vieillissement, comme différentes maladies neurodégénératives par exemple. En prolongeant le protocole, il sera ainsi possible de déterminer si la stéato-hépatite et la fibrose observées chez les rats iMDD/HF de 185 jours perdurent et sont accentuées avec l'âge et avec ainsi un temps d'exposition au régime hyper-énergétique plus long. Nous pourrions également découvrir si les effets de la programmation fœtale de la carence en donneurs de méthyles sont toujours observables à un âge plus avancé, avec de surcroît un éloignement de plus en plus important de la période péri-conceptionnelle et ainsi de l'exposition à la carence.

Il pourrait également être intéressant d'effectuer une analyse de la méthylation du génome des rats de notre modèle. En effet, les gènes impliqués dans le métabolisme des glucides et des lipides, le développement de la fibrose et le remodelage des tissus hépatiques sont connus pour être régulés par méthylation de l'ADN *(Tryndyak et al, 2006)*. Chez les patients atteints de NASH, il a déjà été montré que la méthylation du gène codant pour la nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) déshydrogénase-6 mitochondriale est augmentée, le degré de méthylation étant lié à la gravité de la NAFLD.

Ces dernières années, les micro-ARNs circulants (miRs) ont gagné un certain intérêt en tant que possibles biomarqueurs de diagnostic des NAFLDs. En effet, miR-122 a été montré comme étant un régulateur important dans le métabolisme du cholestérol *(Esau et al, 2006)*, du CHC *(Coulouarn et al, 2009)* et de l'hépatite C *(Jopling et al, 2005)*. Les taux de miR-122, miR-21, miR-34a et miR-451, contrôlant tous l'homéostasie du cholestérol et des acides gras dans le

foie, sont augmentés chez les patients atteints de NAFLD, en sachant que la concentration en miR-122 est associée à une stéatose hépatique *(Yamada et al, 2013 ; Cermelli et al, 2011)*. En outre, de nombreuses voies des miRs sont altérées dans des modèles animaux de NAFLD. À cet égard, miR-29 (une cible thérapeutique potentielle dans les NAFLDs chez la souris) *(Mattis et al, 2014)*, miR-34a (un régulateur de l'apoptose), miR-155 (un régulateur de suppresseur de tumeur) sont affectés positivement par un régime méthyl-déficient chez les souris C57BL/6J et DBA/2J *(Pogribny et al, 2010)*. Ainsi, ces différentes voies des miRs pourraient être intéressantes à étudier dans notre modèle.

La compréhension des mécanismes régulant le développement de la fibrose hépatique constitue un enjeu important puisqu'elle peut ainsi permettre le développement de molécules anti-fibrotiques capables de limiter ou stopper la progression de la fibrose, voire de la faire régresser. Certains antifibrosants sont déjà utilisés et d'autres sont en cours d'étude. Il serait intéressant d'étudier les conséquences d'un traitement anti-fibrotique sur notre modèle expérimental de programmation fœtale de la carence en donneurs de méthyles associée à une surnutrition à l'âge adulte. Ainsi, nous pourrions découvrir si la fibrose obtenue dans ce modèle cesse de progresser, régresse voire disparaît. De plus, il serait intéressant de voir si ce traitement anti-fibrotique a la même efficacité sur les différents groupes de rats de 185 jours, par exemple le groupe contrôle/HF et le groupe iMDD/HF. Idéalement, compte-tenu d'une durée d'administration prolongée, un traitement antifibrosant devrait être dénué d'effets extra-hépatiques, bien toléré et agir sur la matrice extracellulaire produite en excès, sans altérer la matrice extracellulaire normale.

Les stratégies antifibrosantes peuvent associer plusieurs approches thérapeutiques. Les molécules anti-inflammatoires et/ou immunomodulatrices exercent un effet antifibrosant indirect en supprimant le stimulus qui déclenche la fibrogenèse. Une action antifibrosante directe peut également être obtenue en réduisant l'accumulation des myofibroblastes par des molécules qui favorisent leur apoptose, ou réduisent leur prolifération, ou diminuent leur capacité de synthèse de composants matriciels.

Plusieurs arguments suggèrent que les interférons (IFN) pourraient également, outre leur activité antivirale, exercer un effet antifibrosant direct. Ainsi, les interférons inhibent l'activation, la prolifération et la synthèse de collagène des cellules étoilées hépatiques activées et des myofibroblastes hépatiques en culture *(Giannelli et al, 2006)*. De plus, ces cytokines inhibent le développement de la fibrose dans un modèle expérimental *(Roh et al, 2014 ; Jeong*

et al, 2011). Ces données sont renforcées par les résultats d'une étude chez des patients traités pour une hépatite virale C, qui rapporte que le traitement par l'interféron améliore la fibrose indépendamment de la réponse antivirale *(Popa et Mota, 2007)*.

D'autres stratégies sont axées sur l'inhibition du stress oxydant, dont la production augmente dans la grande majorité en cas de maladies chroniques du foie, chez l'Homme ou dans des modèles expérimentaux. De nombreuses données indiquent en effet que le stress oxydant stimule l'activation des cellules étoilées hépatiques et active la transcription des gènes du collagène. Des études ont confirmé ces données en montrant que l'activation des cellules étoilées était abolie par des antioxydants comme le Tocophérol (vitamine E) *(Sanyal et al, 2010; Ji et al, 2014)*.

Au cours de la fibrogenèse, la production de plusieurs peptides vasorégulateurs possédant des propriétés pro- ou anti-fibrogéniques est augmentée, notamment celle de peptides vaso-actifs tels que l'endothéline-1 ou l'angiotensine, ou encore des facteurs relaxants tels que les prostaglandines. L'endothéline-1 est pro-fibrogénique par l'intermédiaire de ses récepteurs ETA, alors qu'elle est anti-fibrogénique *via* ses récepteurs ETB *(Koda et al, 2006)*. En ce qui concerne l'angiotensine, l'inhibition de sa production par les enzymes de conversion de l'angiotensine, ou le blocage de sa liaison aux récepteurs AT1 par des antagonistes sélectifs, les sartans (Telmisartan, Micardis®), réduit le développement de la fibrose chez le rat *(Tamaki et al, 2013)*. De nombreux auteurs indiquent que l'utilisation de bloqueurs de AT1 pourrait être efficace dans le traitement des NAFLDs *(Yokohama et al, 2004 ; Yokohama et al, 2006)*.

Une autre approche thérapeutique utilise l'acide obéticholique (AO), un puissant agoniste de FXR. L'acide obéticholique, ou acide 6-ethyl chénodésoxycholique, est un acide biliaire lipophile, dérivé synthétique de l'acide chénodeoxycholique, conçu pour activer fortement le récepteur nucléaire farnésoïde X (FXR). L'activation du FXR augmente la sensibilité à l'insuline, diminue la néoglycogénèse, et les triglycérides plasmatiques (par diminution de la synthèse hépatique de lipides et la clairance périphérique des VLDLs), diminue la synthèse des acides biliaires, et a expérimentalement des actions anti-inflammatoires et antifibrosantes *(Neuschwander-Tetri et al, 2014)*.

La pioglitazone, un antidiabétique, est un agoniste sélectif des récepteurs nucléaires PPAR-γ ; induisant chez l'animal une sensibilité accrue à l'insuline au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle squelettique *(Sanyal et al, 2010)*. Une méta-analyse a montré que la pioglitazone pourrait faire régresser la fibrose chez des patients atteints de NASH *(Boettcher et al, 2012).*

Fiches techniques

Modèle d'étude

Fiche 1

Protocole animal

- Les animaux ont été traités conformément à la réglementation en vigueur (décret français du 1 février 2013 ; transposé de la directive européenne 2010/63/UE).
- Provenance des animaux : Janvier Labs, France.
- Espèce utilisée : rats Wistar RjHan.
- Poids à l'arrivée : 180-210 g.
- Age à l'arrivée : 2 mois.
- Acclimatation : 1 semaine.
- Animalerie de l'unité INSERM U954 - Agrément n°A5454722 – autorisation de projet en cours d'évaluation.
- Environnement : conditions standard d'élevage dans une animalerie qui conserve une température ambiante de 22-23°C avec un cycle d'alternance jour/nuit de 12h avec accès à volonté à la nourriture et à l'eau.
- Rats mâles reproducteurs : alimentés avec de la nourriture standard avant l'accouplement.
- Adaptation : un mois avant la mise en accouplement, un groupe de rates a été soumis à un régime alimentaire standard (Control B vitamin de SDS Dietex, UK) (tableau 4) et un second groupe a reçu un régime alimentaire carencé en donneurs de méthyles (folates et vitamine B12) (Low B vitamin de SDS Dietex, UK) (tableau 5).
- Accouplement : Après un mois d'adaptation, les rates sont mises en présence des mâles pendant 5 jours.
- Gestation : Le poids des rates est mesuré durant la gestation (21 jours).
- Naissance : Les ratons sont laissés avec leur mère, sauf s'il y a besoin de rééquilibrer les portées, jusqu'au jour D21 post-partum où les ratons sont sevrés.
- Sevrage (D21) : A partir du sevrage, tous les ratons reçoivent un régime alimentaire standard et sont placés à deux dans une cage jusqu'au jour D50.
- Stade D50 (correspond à la puberté chez le rat): A ce stade, deux groupes sont toujours identifiables: le groupe de ratons "contrôles" nés de mères ayant reçu le régime alimentaire standard et le groupe de ratons "iMDDs" nés de mères initialement carencées en donneurs de méthyles. Plusieurs ratons D50 sont mis à mort (fiche 2) afin de prélever leur sang et différents organes, essentiellement le foie, dans le but de découvrir les conséquences d'un retour à une alimentation standard. Les ratons restants sont à nouveau séparés en deux groupes, un groupe recevant toujours le régime alimentaire standard et un autre groupe recevant un régime hyper-énergétique (HF) (réalisé au laboratoire) (tableau 6) riche en sucres et lipides de 50 jours à 185 jours.
- Stade D185 : Les ratons à ce stade sont devenus adultes. Tous les rats D185 sont mis à mort (fiche 2) afin de prélever leur sang et différents organes, essentiellement le foie, dans le but de découvrir les conséquences du régime hyper-énergétique suite à un régime carencé en donneurs de méthyles ou non.

A ce stade ultime D185 on compte quatre groupes:

- le groupe de rats "contrôles" nés de mères contrôles et recevant un régime standard.
- le groupe de rats "contrôles/HF" nés de mères contrôles et recevant un régime HF.
- le groupe de rats "iMDD" nés mères carencées et recevant un régime standard.
- le groupe de rats "iMDD/HF" nés de mères carencées et recevant un régime HF.

N.B : - Chaque groupe d'animaux comptait au minimum 7 rats et au maximum 15 rats.

- Dans cette étude, seuls les résultats sur les rats mâles sont présentés.

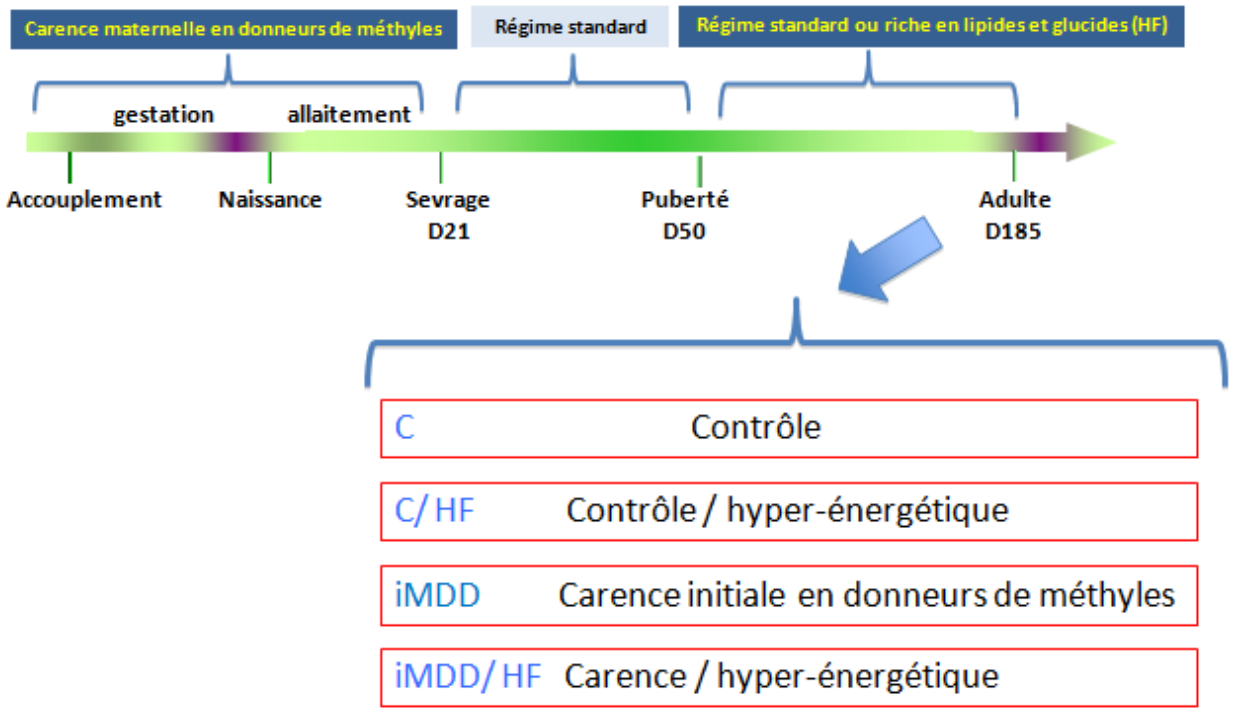


Figure 64 : Représentation schématique du protocole animal.

CALCULATED ANALYSIS:								
		FRESH	10% H2O				FRESH	10% H2O
TOTAL	%	100,00	100,00		CL	%	0,37	0,35
MOISTURE	%	4,22	10,00		S CL	%	0,31	0,29
C FAT	%	5,46	5,13		K	%	0,51	0,48
C PROTEIN	%	17,21	16,17		S K	%	0,50	0,47
C FIBRE	%	2,46	2,31		MG	%	0,11	0,10
ASH	%	5,07	4,76		S MG	%	0,00	0,00
NFE	%	64,33	60,45		FE	mg/kg	153,32	144,07
PECTIN	%	0,00	0,00		S FE	mg/kg	111,65	104,91
HEMICELL	%	0,06	0,06		CU	mg/kg	11,08	10,41
CELLULOSE	%	2,88	2,71		S CU	mg/kg	10,00	9,40
LIGNIN	%	0,00	0,00		MN	mg/kg	50,99	47,91
STARCH	%	31,50	29,60		S MN	mg/kg	49,91	46,90
SUGAR	%	31,85	29,93		ZN	mg/kg	42,08	39,54
G ENERGY	MJ/kg	16,39	15,40		S ZN	mg/kg	18,00	16,91
D ENERGY	MJ/kg	15,27	14,35		CO	µg/kg	525,00	493,32
M ENERGY	MJ/kg	13,90	13,06		S CO	µg/kg	525,00	493,32
AF ENERGY	kcal/kg	3752,15	3525,72		I	µg/kg	0,00	0,00
C14 1 MYRI	%	0,01	0,01		S I	µg/kg	0,00	0,00
C16 1 PALM	%	0,03	0,03		SE	µg/kg	0,00	0,00
C18 1W9 OL	%	1,13	1,06		S SE	µg/kg	0,00	0,00
C18 2W6 LI	%	2,66	2,50		F	mg/kg	0,00	0,00
C18 3W3 LI	%	0,37	0,35		VIT A	iu/kg	5000,00	4698,27
C20 4W6 AR	%	0,01	0,01		S VIT A	iu/kg	5000,00	4698,27
C22 5W3 CL	%	0,00	0,00		VIT D3	iu/kg	2200,00	2067,24
C12 LAURIC	%	0,02	0,02		S VIT D3	iu/kg	1000,00	939,65
C14 MYRIST	%	0,03	0,03		VIT E	iu/kg	55,31	51,97
C16 PALMIT	%	0,55	0,52		S VIT E	iu/kg	50,00	46,98
C18 STEARI	%	0,21	0,20		VIT B1 THI	mg/kg	4,13	3,88
ARGININE	%	0,55	0,52		S VIT B1	mg/kg	4,05	3,81
LYSINE	%	1.10	1.03		VIT B2 RIB	mg/kg	0.34	0.32
S LYS	%	0.00	0.00		S VIT B2	mg/kg	0.00	0.00
METHIONINE	%	0.43	0.40		VIT B6 PYR	mg/kg	4.16	3.91
S METH	%	0.00	0.00		S VIT B6	mg/kg	4.08	3.83
CYSTINE	%	0.04	0.04		VIT B12 CY	µg/kg	50.00	46.98
S CYST	%	0.00	0.00		S VIT B12	µg/kg	50.00	46.98
TRYPTOPHAN	%	0.15	0.14		VIT C ASCO	mg/kg	7.00	6.58
S TRYPT	%	0.00	0.00		S VIT C	mg/kg	7.00	6.58
HISTIDINE	%	0.40	0.38		VIT K MENE	mg/kg	5.15	4.84
THREONINE	%	0.60	0.56		S VIT K	mg/kg	5.15	4.84
S THREO	%	0.00	0.00		FOLIC ACID	mg/kg	1.94	1.82
ISOLEUCINE	%	0.88	0.83		S FOLIC	mg/kg	1.90	1.79
LEUCINE	%	1.32	1.24		NICOTINIC	mg/kg	10.08	9.47
PHENYLALAN	%	0.72	0,68		S NICOTIN	mg/kg	9,80	9,21
VALINE	%	1,05	0,99		PANTOTHENI	mg/kg	10,45	9,82
TYROSINE	%	0,72	0,68		S PANTOTH	mg/kg	9,87	9,27
TAURINE	%	0,00	0,00		CHOLINE	mg/kg	1248,50	1173,16
GLYCINE	%	0,69	0,65		S CHOLINE	mg/kg	1027,50	965,49
ASPARTIC A	%	0,98	0,92		INOSITOL	mg/kg	98,00	92,09
GLUTAMIC A	%	2,84	2,67		S INOSITOL	mg/kg	98,00	92,09
PROLINE	%	1,19	1,12		BIOTIN	µg/kg	0,00	0,00
SERINE	%	0,65	0,61		S BIOTIN	µg/kg	0,00	0,00
HYD PROLIN	%	0,00	0,00					

INGREDIENTS:
NAME
RICE STARCH
SUCROSE
CASEIN
SOYA OIL
VITAMINS, MINERALS, AMINO ACIDS AND TRACE ELEMENTS
CELLULOSE
CHOLINE BITARTRATE

Tableau 4 : Composition du régime standard (contrôle).

CALCULATED ANALYSIS:								
		FRESH	10% H2O				FRESH	10% H2O
TOTAL	%	100,00	100,00		GLYCINE	%	0,69	0,65
MOISTURE	%	4,23	10,00		ASPARTIC ACID	%	0,98	0,92
CRUDE OIL	%	5,46	5,13		GLUTAMIC ACID	%	2,84	2,67
CRUDE PROTEIN	%	17,21	16,17		PROLINE	%	1,19	1,12
CRUDE FIBRE	%	2,46	2,31		SERINE	%	0,65	0,61
ASH	%	4,94	4,64		HYD, PROLINE	%	0,00	0,00
NFE	%	64,54	60,65		HYD, LYSINE	%	0,00	0,00
PECTIN	%	0,00	0,00		ALANINE	%	0,56	0,53
HEMICELLULOSE	%	0,06	0,06		Ca	%	0,65	0,61
CELLULOSE	%	2,88	2,71		P TOTAL	%	0,46	0,43
LIGNIN	%	0,00	0,00		P PHYTATE	%	0,00	0,00
STARCH	%	31,72	29,81		P AVAILABLE	%	0,46	0,43
SUGAR	%	31,86	29,94		Na	%	0,22	0,21
GROSS ENERGY	MJ/kg	16,43	15,44		Cl	%	0,27	0,25
SDS DIGESTIBLE ENERGY	MJ/kg	15,31	14,39		K	%	0,53	0,50
SDS METABOLISABLE ENERGY	MJ/kg	13,93	13,09		Mg	%	0,11	0,10
AF ENERGY	MJ/kg	15,72	14,77		Fe	mg/kg	106,08	99,69
C14 1 MYRISTOLEIC	%	0,01	0,01		Cu	mg/kg	11,08	10,41
C16 1 PALMITOLEIC	%	0,09	0,08		Mn	mg/kg	50,99	47,92
C18 1 W9 OLEIC	%	0,98	0,92		Zn	mg/kg	44,08	41,42
C18 2 W6 LINOLEIC	%	1,91	1,79		Co	µg/kg	525,00	493,37
C18 3 W3 LINOLENIC	%	0,33	0,31		I	µg/kg	0,00	0,00
C20 4 W6 ARICHIDONIC	%	0,01	0,01		Se	µg/kg	0,00	0,00
C22 5 W3 CLUPANODONIC	%	0,00	0,00		F	mg/kg	0,00	0,00
C12:0 LAURIC	%	0,10	0,09		VITAMIN A	iu/kg	5000,00	4698,76
C14:0 MYRISTIC	%	0,17	0,16		VITAMIN D3	iu/kg	1000,00	939,75
C16:0 PALMITIC	%	0,32	0,30		VITAMIN E	iu/kg	55,50	52,16
C18:0 STEARIC	%	0,19	0,18		VITAMIN B1 THIAMINE	mg/kg	4,98	4,68
ARGININE	%	0,55	0,52		VITAMIN B2 RIBOFLAVIN	mg/kg	0,34	0,32
LYSINE	%	1,10	1,03		VITAMIN B6 PYRIDOXIN	mg/kg	4,98	4,68
METHIONINE	%	0,43	0,40		VITAMIN B12 CYANOCOBALAMINE	µg/kg	0,00	0,00
CYSTINE	%	0,04	0,04		VITAMIN C ASCORBIC ACID	mg/kg	7,00	6,58
TRYPTOPHAN	%	0,15	0,14		VITAMIN K MENEDIONE	mg/kg	4,80	4,51
HISTIDINE	%	0,40	0,38		FOLIC ACID	mg/kg	0,01	0,01
THREONINE	%	0,60	0,56		NICOTINIC ACID	mg/kg	10,08	9,47
ISOLEUCINE	%	0,88	0,83		PANTOTHENIC ACID	mg/kg	10,45	9,82
LEUCINE	%	1,32	1,24		CHOLINE	mg/kg	0,06	0,06
PHENYLALANINE	%	0,72	0,68		INOSITOL	mg/kg	98,00	92,10
VALINE	%	1,05	0,99		BIOTIN	µg/kg	0,00	0,00

INGREDIENTS:
NAME
RICE STARCH
SUCROSE
CASEIN
SOYA OIL
VITAMINS, MINERALS, AMINO ACIDS AND TRACE ELEMENTS
CELLULOSE

Tableau 5 : Composition du régime carencé en donneurs de méthyles (MDD).

Ingrédients	Quantité (g)	Quantité P/L/G (g)	% masse	Kcal	% énergie
Régime A04 SAFE	1000				
Protéines		160	16	640	
Amidon		458	45,8	1832	
Sucres totaux		20	2	80	
Cellulose		39	3,9		
Sucre fin	451	451	100	1804	
Caséine lactique	330				
Protéines		290,4	88	1161,6	
Huile Lesieur Isio4	287				
Lipides		287	100		
Margarine Astra	408				
Lipides		285,6	70		
Glucides		1,632	0,4	6,528	
Vitamines UAR200	16				
Lait concentré sucré	100				
Protéines		7,6	7,6	30,4	
Lipides		9	9	81	
Glucides		55	55	220	
Total général (g)	2592			11008,93	
Total Glucides		985,63	38,03	3942,53	35,81
Total Lipides		581,60	22,44	5234,40	47,55
Total Protéines		458,00	17,67	1832,00	16,64
Densité énergétique (kcal/g)					4,25

Tableau 6: Composition du régime hyper-énergétique (HF) (constitué par B. Beck).

Fiche 2

Prélèvement des échantillons

- A 50 jours puis 185 jours post-partum, peser les rats puis les anesthésier avec un mélange d'isoflurane ① et d'air (les rats ayant été mis à jeun la veille au soir).
- Après s'être assuré que chaque animal soit bien endormi (disparition de certains réflexes : retrait de la patte lors de son pincement, réflexe oculaire...), effectuer la mise à mort par exsanguination et recueillir directement le sang dans des tubes héparinés ② contenant 50 µL d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) pour l'analyse biochimique plasmatique:
  - centrifuger les tubes à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C pour récupérer le plasma.
  - aliquoter le plasma par 100 µL.
  - acidifier un seul tube de plasma en ajoutant 10 µL d'acide acétique 1N.
  - conserver tous les tubes de plasma à -80°C.
- Disséquer chaque rat afin de récupérer un maximum d'organes (foie, cœur, cerveau...).
- Les organes sont pesés puis directement congelés dans l'azote liquide puis placés à - 80°C (pour les analyses de biologie moléculaire, western blot, dosages tissulaires) ou fixés dans du formol à 10 % ③ (pour les analyses histologiques).

① Isoflurane, Baxter.
② Tubes héparinés, Dutscher.
③ Formol à 10 % (v/v) pH 7,4 (LABONORD S.A., Templemars).

Fiche 3

Absorption bi-photonique à rayons X : méthode DXA

Principe :

La méthode DXA («Dual energy X-ray Absorptiometry») est une méthode d'imagerie médicale basée sur la comparaison de l'atténuation de rayons X de deux énergies différentes. Il s'agit en effet de mesurer l'atténuation de deux faisceaux de rayon X d'énergies différentes à travers les tissus. L'absorption dépendant à la fois de la quantité et de la nature de la matière traversée, le rapport d'absorption selon l'énergie permet de décorréler la nature de la matière de sa quantité. Elle est très utilisée en ostéodensitométrie du fait de sa performance en termes d'exactitude, de reproductibilité et de linéarité. La DXA est devenue une technique très utile pour les études animales car elle permet, en particulier, un suivi longitudinal évitant ainsi la mort de l'animal.

La DXA mesure la composition corporelle totale et régionale de trois compartiments :
la masse grasse (MG), la masse non grasse (MM) des tissus mous et l'os. Tous les appareils DXA sont composés d'un générateur émettant des rayons X de deux énergies, une table d'examen, un détecteur et un système informatique. La DXA mesure la transmission à travers le corps de rayons X à basse et haute énergie. Dans les pixels contenant de l'os, la DXA détermine les densités de surface de l'os et des tissus mous en utilisant deux énergies différentes. Dans les pixels ne contenant pas d'os, la DXA mesure directement les pourcentages de masses grasse et maigre des tissus mous. La DXA compare le rapport de l'atténuation du faisceau de basse et de haute énergie avec des valeurs expérimentales de masses grasse et maigre des tissus mous, obtenues par calibration avec des fantômes équivalant à 100 % de masse grasse et 100 % de masse maigre. La mesure par DXA du corps entier est rapide (3-10 minutes selon les appareils), non invasive, précise et elle induit une irradiation de 2-5 µSv, ce qui est faible par rapport à l'irradiation naturelle journalière (5-7 µSv).
Le ralentissement de la croissance longitudinale chez le rat survient à environ 64 jours d'âge, avec un léger retard par rapport à l'âge de maturité sexuelle. La maturité sexuelle chez les rats est déterminée pour les mâles par l'apparition de spermatozoïdes matures dans les canaux déférents (45-55 jours), et pour les femelles par la première ovulation (35-40 jours).

La densitométrie du corps entier pour la mesure de la densité osseuse et composition corporelle (masse grasse, MG ; et masse maigre, MM) est réalisée *in vivo* par dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) utilisant un densitomètre DR-4500A ① (Hologic Inc., Waltham, MA, USA) avec un module pour les petits animaux (calibration avec un fantôme dédié à ce module) chez les rats à l'âge de 50 jours et de 185 jours.

Procédure expérimentale :

- Placer un fantôme (conçu pour analyser les rats) sur l'appareil① et lancer la calibration (à faire une seule fois par jour).
- Anesthésier le rat avec un excès d'isoflurane② en utilisant un appareil d'anesthésie③.
- Déposer le rat anesthésié, en décubitus ventral, sur une plaque en verre positionnée sur la table d'examen. Le rat continue d'inhaler de l'isoflurane② à l'aide d'un masque relié à l'appareil d'anesthésie (figure 65).
- Marquer la position du premier rat sur la plaque en verre et disposer, par la suite, les autres rats toujours de la même manière.
- Lancer la mesure. Les mesures sont répétées de manière consécutive 5 fois pour chaque animal (utiliser le logiciel «petits animaux»). La durée de chaque passage est de 2 minutes et la durée totale de l'examen pour chaque animal est de 15 minutes.
- Une fois toutes les mesures effectuées pour un même rat, retirer le masque anesthésiant et reposer le rat dans sa cage, la tête bien dégagée et surveiller son réveil.

Résultats :

Le corps entier du rat est analysé lors d'une mesure avec le DXA, puis le corps est divisé en plusieurs régions. Pour chacune de ces régions, la surface, le contenu minéral osseux (CMO), la densité minérale osseuse (DMO) et la composition corporelle (la mase grasse, la masse musculaire et le pourcentage de graisse) sont mesurés et calculés.
La densité osseuse, MG et MM sont exprimées en moyenne ± Ecart type pour chaque point de mesure. La densité minérale osseuse (DMO) (g/cm²) et le contenu minéral osseux (CMO) (g) sont évalués, par la suite, à l'aide d'un logiciel dédié pour le corps entier, et les trois régions d'intérêt: la région lombaire (L1-L4), le fémur et le tibia. La composition corporelle est évaluée pour la région abdominale, la jambe gauche et la région gonadique. Les données sont exprimées pour chaque animal en pourcentage de la MG et MM et changement du CMO sur la durée de l'étude. La longueur de fémur est mesurée à partir des images numérisées. Chaque animal est utilisé comme son propre contrôle et les variations internes des mesures répétées sont définies.

Figure 65 : Photographie prise lors de l'examen d'un rat au DXA.

Figure 66 : Exemple d'image obtenue après analyse au DXA où les différentes régions nous intéressant ont été délimitées.

①Appareil DXA, Hologic QDR4500A (Waltham, MA, USA).
②Isoflurane, Baxter.
③Appareil d'anesthésie, CAR 600H, TEM (Lormont France).

Dosages biochimiques

Fiche 4

Dosage des vitamines B9 et B12

Technique radioisotopique, SimulTRAC-SNB①

Principe : Il s'agit d'un dosage radio-isotopique. La vitamine B12 et les folates non marqués présents dans l'échantillon entrent en compétition avec leurs homologues marqués (vitamine B12 [^{57}Co] et folates [^{125}I]) vis-à-vis d'un nombre restreint et constant de sites de fixation. Par conséquent, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon. Grâce à cette technique, les taux de vitamine B12 et des folates sont déterminés simultanément dans un seul tube. En effet, les deux marqueurs (vitamine B_{12} $^{[57\ Co]}$ / Folates $^{[125\ I]}$) de niveaux d'énergie différents peuvent être facilement séparés en utilisant un compteur à double canal.

Les dosages ont été effectués sur des échantillons de plasma à l'aide du kit SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals).
Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant:

- Les courbes d'étalonnage sont réalisées sur 6 points :
  - Vitamine B12 (A= 0, B= 74, C= 148, D= 296, E= 740 et F= 1480 pmol/L).
  - Folates (A= 0, B= 2.3, C= 4.5, D= 9.1, E= 23 et F= 45 nmol/L).

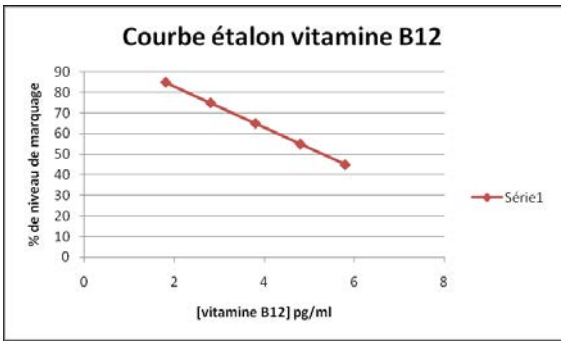
  Les étalons de vitamine B12 et folates sont dilués dans de la serum-albumine, du chlorure de sodium et des agents stabilisateurs de conservation.
- Ajouter 200 µL de solution active de marquage/DTT② puis agiter.
- Incuber à température ambiante pendant 15 min.
- Ajouter 100 µL de réactif d'extraction puis vortexer.
- Incuber à température ambiante pendant 15 min.
- Ajouter 1000 µL de réactif de liaison SimulTRAC-SNB puis agiter.
- Incuber les tubes à température ambiante pendant 60 min, à l'abri de la lumière.
- Centrifuger pendant 10 min à 1000 g.
- Eliminer le surnageant.
- Compter la radioactivité du culot à l'aide d'un compteur gamma③.

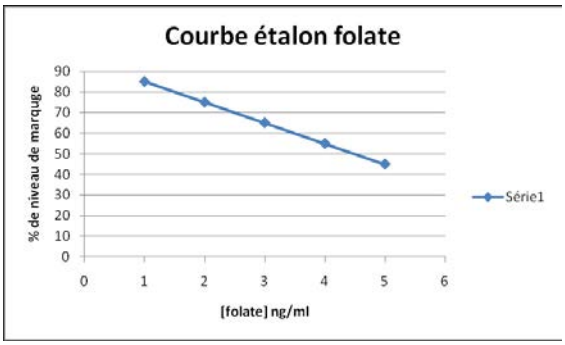
Calcul des résultats :

- Pour la manipulation, disposer de 16 tubes pour la courbe étalon. A partir du numéro 17, numéroter 2 tubes supplémentaires pour chaque échantillon. Les étalons (A à F) et les échantillons sont ajoutés conformément aux indications données dans le tableau présenté à la page suivante :

Tubes	1,2	3,4	5,6	7,8	9,10	11,12	13,14	15,16	RESTES
Etalons ou Echantillons (200 µL)		A	A	B	C	D	E	F	Echantillons

- La courbe et les résultats pour la vitamine B12 sont calculés à partir des résultats obtenus par comptage du Cobalt[57] et pour les folates, ceux-ci sont calculés à partir des résultats obtenus par comptage de l'Iode[125].
- Faire la moyenne des mesures des tubes 3 et 4 (tubes « neutres ») et soustraire cette valeur de toutes les autres mesures pour obtenir des valeurs corrigées.
- Faire la moyenne des mesures corrigées des tubes 1 et 2 pour obtenir le nombre de coups total corrigé pour chaque dosage.
- Diviser la moyenne des mesures corrigées des tubes 5 et 6 par le nombre de coups total corrigé de façon à obtenir le coefficient de niveau de marquage B0 (ce coefficient ne doit pas dépasser 36 %).
- Diviser les mesures corrigées de chaque tube par la moyenne corrigée des tubes 5 et 6 pour obtenir le pourcentage de niveau de marquage de chaque tube.
- Tracer une courbe étalon : en abscisse la concentration des étalons de vitamine B12 en pg/ml et la concentration des étalons de folates en ng/ml et en ordonnée le pourcentage de niveau de marquage (B12 ou folates)/B0.





- La concentration de la vitamine B12 ou des folates dans le plasma est déterminée par extrapolation à partir de la courbe étalon donnant le pourcentage de niveau de marquage par rapport à la valeur en pg/ml de vitamine B12 ou la valeur en ng/ml de folates.

①Kit ICN Pharmaceuticals, Inc, USA coffret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals).
②DTT : Sigma-Aldrich (St Louis, USA).
③Fluostar Galaxy (BMG LabTechnologies, Champigny sur Marne, France).
③Compteur COBRA-IIrTM autogamma (Packard) à double canal.
Coup total par minutes Cobalt 57 : 10.000-25.000
Coup total par minutes Iode 125 : 15.000-35.000

Dosage de l'homocystéine et de l'acide méthylmalonique

Principe : L'homocystéine liée aux protéines est quantifiée après libération par ajout d'un réducteur. Les protéines sont précipitées au méthanol. Les concentrations plasmatiques en homocystéine et acide méthylmalonique sont ensuite mesurées par une technique de chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en mode MRM positif (UPLC-MS/MS). Les standards internes deutérés sont ajoutés et quelques µL sont injectés dans l'UPLC. La colonne de chromatographie permet de séparer le MMA de son isomère, l'acide succinique (même masse moléculaire mais polarité différente). La quantification est faite grâce à une gamme d'étalonnage et à un ajustement inter-échantillon grâce aux standards deutérés ajoutés en concentration connue et constante.

❖ Préparation des réactifs et de la gamme d'étalonnage :

➢ **Préparation des standards :**
Préparation d'aliquots de solutions mères de standards non deutérés et deutérés à 1 mmol/L.

	Homocystéine ① (MM 268,4)	**Homocystéine** d8 ③ (98 %)	**MMA** ② (118.09 ; >99 %)	**MMA** d3 ④ (98 %)
Poudre (mg) *	13.27	13.8	11.809	12.356
HCl 0.1 N *(T° amb, hormones)*	50 mL	50 mL		
	Vortexer, soniquer			
NaOH 10 M (+ 4°C, hormones)	1 mL	1 mL		
DTT	132.7 mg	132.7 mg		
HCl 0,1 N	qsp 100 ml			
H_2O Milli Q			100 mL	100 mL
	Vortexer, soniquer		Vortexer, soniquer	
Concentration sol. mère	1 mM (d'homo-cystéine)	1 mM (d'homo-cystéine d4)	1 mM	1 mM
Aliquoter par fraction de 0,7 mL. Congeler à – 20°C.				

* N.B : Vérifier les quantités à peser pour chaque flacon en fonction de la masse et de la pureté du produit.

- **Préparation de la gamme d'étalonnage :**
  Diluer S8 au ½ jusque S1 dans le pool de plasma :

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

- **Préparation du mélange de standards internes :**
  150 µL d' **HCYd4** à 1 mmol/L.
  10 µL de **MMA d3** à 2 mmol/L.
  4,5 ml de DTT② 200 mmol/L.

- **Préparation des contrôles de l'homocystéine :**
  Plasma Control Level I (n°0072) + II (n°0073) lyophilisé⑤.
  Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée HPLC grade, laisser reposer 10 à 15 minutes et agiter jusqu'à dissolution totale. Aliquoter à 200 µL et conserver à -20°C.

- **Préparation de la solution d'extraction :**
  MeOH 0,1 % (v/v) d'acide formique②.

❖ **<u>Préparation des échantillons :</u>**

- Décongeler les plasmas, les vortexer et les centrifuger (10 min, 3500 tours par minutes).
- Allumer la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffe).
- Dans un tube de 1,5 mL en polypropylène, ajouter :

	Double blanc	**Standards S0**	**Standards S1 à S8**	**Contrôles (pool, levels 1 & 2)**	**Echantillons**
Echantillon	50 µL pool	50 µL pool	50 µL	50 µL	50 µL
Solution de SI	0		50 µL	50 µL	50 µL
DTT 200 mM	50 µL		0	0	0
Vortexer ATTENDRE 15 min à température ambiante					
MeOH 0,1% ac formique	100 µL		100 µL	100 µL	100 µL

N.B : Travail possible à partir de 25 µL de plasma. Dans ce cas, diviser tous les volumes par 2.

- Vortexer et incuber 30 min à + 4°C.
- Vortexer et centrifuger à 16000 tours par minute pendant 10 min.

- Reprendre 100 µL de surnageant dans un microtube de 1,5 ml (congeler éventuellement si nécessaire de faire ultérieurement l'étape LC/MSMS) par 400 µL d'H_2O 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 LC/MSMS *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 (présence d'une valve pour permettre un switch vers la poubelle).
  - Méthode de quantification : HCY –AC SUCC-MMA.qmf.

① DL Homocystine, Tréitol (DTT) en poudre (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).
② Acide méthylmalonique, Acide Formique 98% : (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).
③ Standards internes (SI) d8 Homocystine (DLM 3619, Cambridge isotopes).
④ MMA d3.
⑤ Homocystéine Plasma Control Level I (n°0072) & Level II (n°0073) lyphylisé (Chromsystems).

- Colonne UPLC : Acquity UPLC HSS T3 (1,8µm ; 2,1 x 50 mm).
- UPLC Acquity Waters**,** Boucle d'injection de 10 µl.
- Spectromètre de Masse 4000 QTrap Applied Biosystems / MDS Sciex.

Analyse de molécules adénylées (SAM/SAH)

Technique de 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 ces deux techniques 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.

Technique :

1. Préparation des solutions stocks (SAM ; SAH):

- Préparer les solutions stock de standard (SAM ; SAH) ① 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 ②.
- Aliquoter et stocker à -20°C.
- Préparer les solutions de travail stock de standard à 5µM final dans de l'eau ultra pure.

2. Déprotéinisation des échantillons:

- Mélanger 100µl d'échantillon (ou de standard) à 5µl d'$HClO_4$ à 60 %, vortexer et incuber 5 minutes dans la glace.
- Centrifuger à 20 000g pendant 10 minutes à 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 KH_2PO_4 (1M) pour tamponner la solution, vortexer, centrifuger à 20 000g pendant 10 minutes (4°C) et éliminer le culot.

3. 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 incuber à 80°C pendant 20 minutes puis refroidir à 4°C.

4. 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 ③, un injecteur d'échantillons automatisé ④, une colonne contenant une résine de silice de 5 µm de granulométrie comportant des greffons hydrophobes (18 carbones) ⑤ , un détecteur à fluorescence Shimadu RF10AXL (278nm : Ex/418nm:Em) ⑥ et un intégrateur (logiciel Borwin 3.1) ⑦ et maintenu à 30°C dans un four à colonne ⑧, 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-visible ⑨.

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 ① (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.

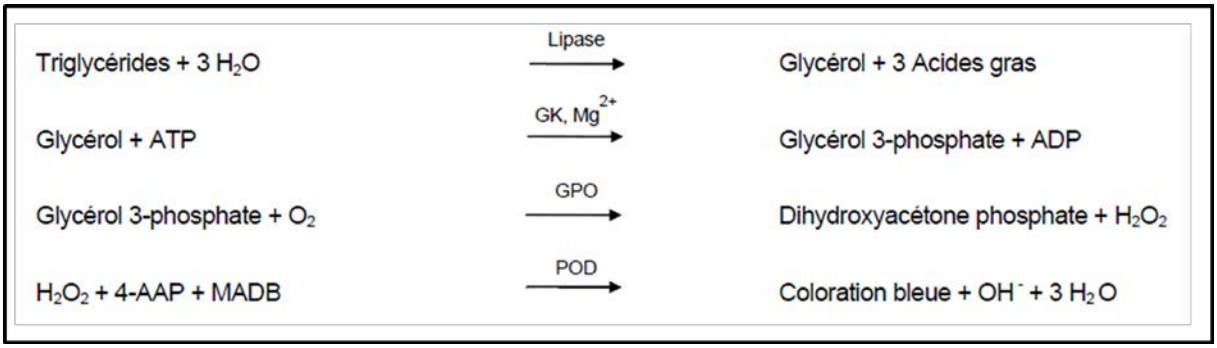
①Standards SAM et SAH, Sigma-Aldrich (St Louis, USA).
②Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA).
③Pompe à haute pression, SpectraSystem, P1000XR, TSP.
④Injecteur d'échantillons automatisé, AS100, TSP.
⑤Colonne Resolve n°85711 C18 (150 x 3,9mm,5µ) Lichrospher (Interchim).
⑥Détecteur à fluorescence Shimadu RF10AXL (278nm:Ex/418nm:Em).
⑦Intégrateur: logiciel Borwin 3.1.
⑧Four à colonne, Waters.
⑨Spectrophotomètre, SpectraSeries UV100, TSP.

Fiche 7

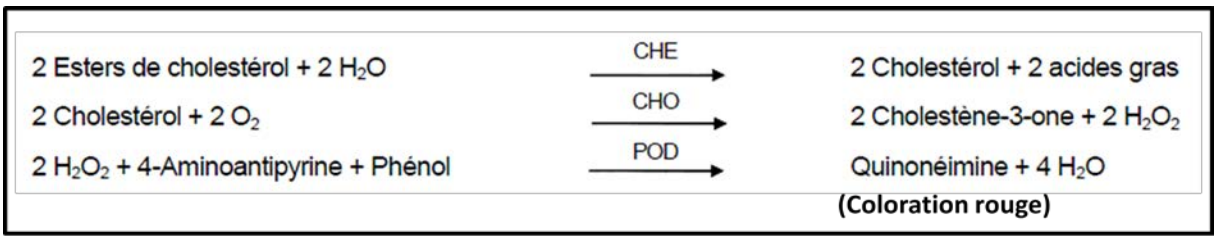
Dosage des triglycérides, du cholestérol total et des acides gras libres

Principe : Toutes ces méthodes sont basées sur une série de réactions enzymatiques en colorimétrie couplées.

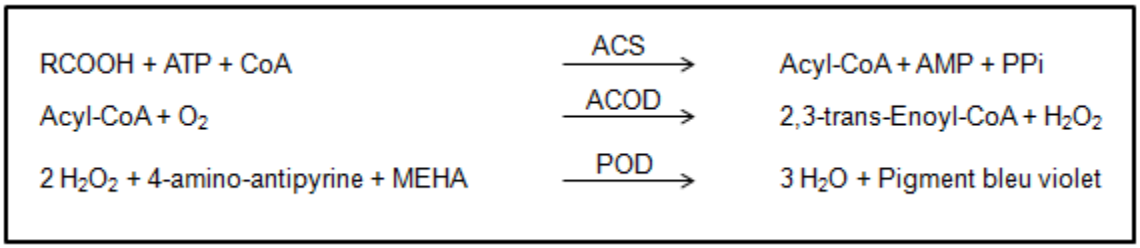
- Dosage des triglycérides : Les triglycérides de l'échantillon sont hydrolysés par un ensemble de lipases microbiennes pour former du glycérol et des acides gras. Le glycérol est phosphorylé par l'adénosine triphosphate (ATP) en présence de la glycérol kinase (GK) pour former du glycérol-3-phosphate. Le glycérol-3-phosphate est oxydé par l'oxygène moléculaire en présence de la glycérol phosphate oxydase (GPO) pour produire du peroxyde d'hydrogène (H2O2) et de la dihydroxyacétone phosphate. Le H2O2 formé réagit avec le 4-aminophenazone, le N,N-bis(4-sulfobutyl)-3,5-dimethylaniline 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.



- Dosage du cholestérol total : 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.



- <u>Dosage des acides gras non estérifiés (ou acides gras libres)</u> : Sous l'action de l'Acyl-CoA synthétase (ACS), et en présence de coenzyme A et de sel trisodique d'adénosine 5-triphosphate (ATP), les acides gras non estérifiés de l'échantillon (RCOOH) sont transformés en Acyl-CoA, AMP et acide pyrophosphorique (PPI). Grâce à l'Acyl-CoA oxydase (ACOD), l'Acyl-CoA obtenu est oxydé et libère du 2,3-trans-Enoyl-CoA et du peroxyde d'hydrogène (H2O2). En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène libéré conduit à la formation d'un pigment bleu violet par condensation oxydative avec la 3-Méthyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyéthyl)-Aniline (MEHA) et la 4-amino-antipyrine (4-AA). La concentration en acides gras non estérifiés s'obtient par la mesure de l'absorbance du composé coloré en bleu violet (540-700 nm).



<u>Technique</u> :

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.

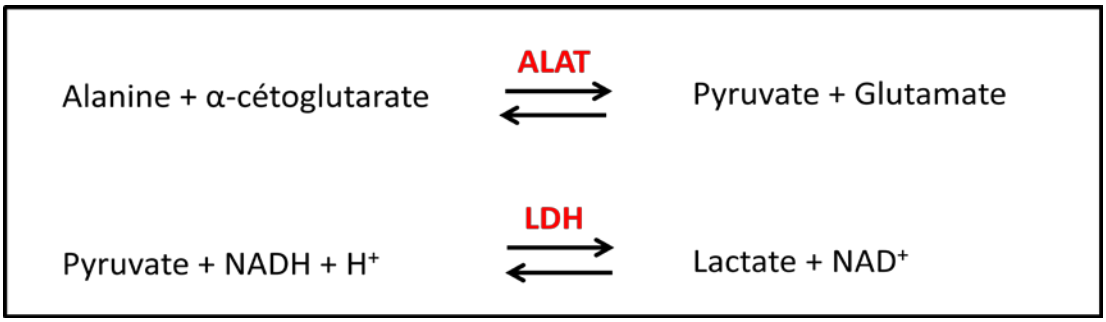
Dosage des marqueurs du stress cellulaire (ALAT/ASAT)

Principe :

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique à l'intérieur des cellules. Ces enzymes sont présentes dans plusieurs tissus (foie, cœur, reins, muscles…) reflétant ainsi l'activité et la destruction des cellules de ces organes. L'augmentation de leur taux dans le sang témoigne d'une lésion cellulaire, le plus souvent dans le foie, parfois dans le cœur, les muscles ou les reins. Les principales causes d'augmentation du taux des transaminases dans le sang sont les anomalies hépatiques.
Les dosages sont basés sur la mesure cinétique des transaminases sériques dans un système réactionnel dont la finalité est l'oxydation du coenzyme NADH,H.$^{+}$

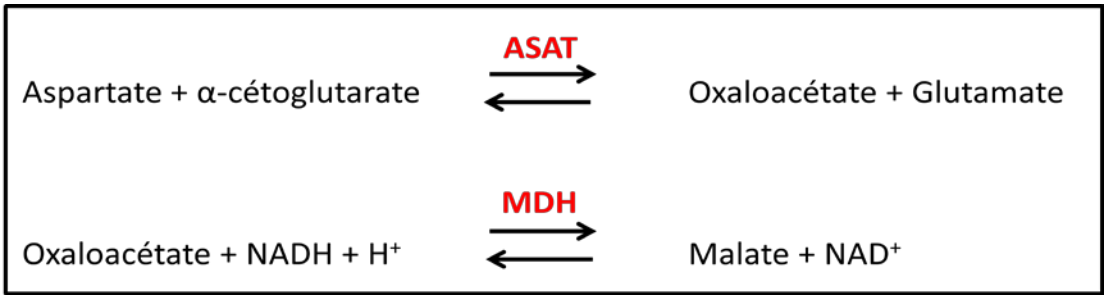
Technique :

L'activité enzymatique de l'ALAT se mesure à partir de deux réactions successives.
La transamination de l'alanine en pyruvate est réalisée en présence de l'alanine aminotransférase (ALAT). Le pyruvate obtenu est réduit en lactate en présence du coenzyme NADH,H^{+} et de la lactate déshydrogénase (LDH). La cinétique de cette dernière réaction est déterminée par les mesures successives de l'absorbance du coenzyme NADH,H^{+} à 340 nm. De cette cinétique est déduite la concentration de l'alanine aminotransférase (ALAT). En effet, la diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD^{+} est proportionnelle à l'activité ALAT dans l'échantillon.



Comme pour le dosage de l'ALAT, l'activité enzymatique de l'ASAT se mesure à partir de deux réactions successives. L'aspartate aminotransférase (ASAT) catalyse la transformation de l'aspartate en oxaloacétate. L'oxaloacétate formé est réduit en malate en présence d'une quantité connue de coenzyme NADH,H^{+} et de la malate déshydrogénase (MDH). La cinétique de cette dernière réaction est déterminée par les mesures successives de l'absorbance du coenzyme NADH,H^{+} à 340 nm. De cette cinétique est déduite la concentration de l'aspartate

aminotransférase (ASAT). En effet, la diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD^+ est proportionnelle à l'activité ASAT dans l'échantillon.



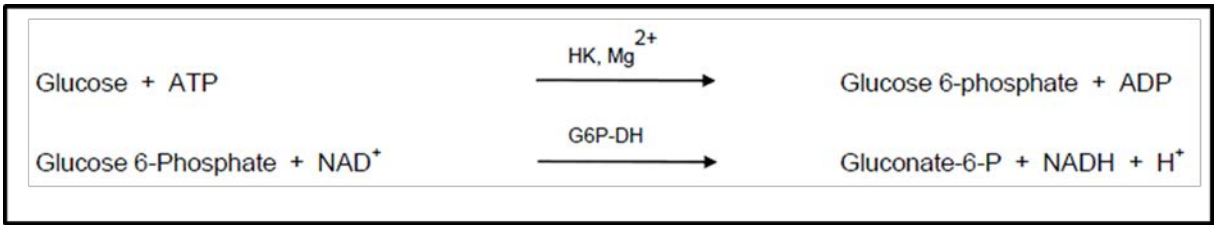
Les mesures sont réalisées avec un automate multiparamétrique, Olympus AU 2700 (Beckman Coulter, France).La solution de contrôle, les réactifs ainsi que 12 µL de chaque échantillon de sérum à doser ont été ajoutés à l'automate. La calibration de l'automate et le dosage des sérums ont été ensuite programmés *via* un microordinateur intégré au système. Les différentes lectures de l'absorbance de $NADH,H^+$ ont été réalisées grâce à un spectrophotomètre intégré à l'automate. Les résultats du dosage des transaminases sont déduits par l'automate.
Ces dosages ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de biochimie-biologie moléculaire-nutrition et métabolisme du CHU de Nancy-Brabois.

Fiche 9

Dosage du glucose

Principe :

Il s'agit d'un test enzymatique UV (méthode à l'hexokinase) utilisé dans la détermination quantitative du glucose dans le sérum, le plasma et l'urine.
Le glucose est phosphorylé par l'action de l'hexokinase (HK) en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et d'ions magnésium pour produire du glucose 6-phosphate et de l'adénosine diphosphate (ADP). La glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH) oxyde le glucose 6-phosphate de façon spécifique pour produire du gluconate 6-phosphate; le NAD^+ étant simultanément réduit en NADH. L'augmentation de l'absorbance à 340nm est proportionnelle à la concentration en glucose de l'échantillon.
L'équation de la réaction est présentée ci-dessous:



Technique :

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 glucose de chaque échantillon. Ce dosage a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de biochimie- biologie moléculaire-nutrition et métabolisme du CHU de Nancy-Brabois.

Fiche 10

Dosage de l'insuline

Technique radioimmunologique, ImmuChem™ RIA Kit①

Principe : Le dosage radioimmunologique dépend de la capacité d'un anticorps à se lier à son antigène. Pour quantifier l'antigène, les formes radioactives [Insuline- ^{125}I] et non radioactives de l'antigène sont en compétition pour les sites de liaison sur un anticorps spécifique. Plus l'antigène non radioactif est présent, moins l'antigène radioactif va se lier à l'anticorps. Lors du dosage de l'insuline par ImmuChem™ ①, l'anticorps est lié de façon covalente à la surface intérieure d'un tube en polypropylène. Ainsi, le complexe antigène-anticorps lié est également lié à la paroi du tube. Il n'y a pas de deuxième anticorps, de charbon actif ou tout autre agent précipitant nécessitant une centrifugation. À la conclusion de l'essai, l'antigène libre est aspiré ou décanté.
La radioactivité [^{125}I] liée à l'anticorps, inversement proportionnelle à la quantité d'insuline non-radioactive contenue dans les standards et les échantillons à doser, est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur gamma. L'insuline dans les échantillons est déterminée graphiquement à partir d'une courbe de standards d'insuline.
Les dosages ont été effectués sur des échantillons de plasma à l'aide du coffret commercial ImmuChem™①.

N.B: - Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (18-25°C) au moins 30 min avant leur utilisation.
- La distribution des réactifs dans les tubes revêtus s'effectue également à température ambiante.
- Les essais sont effectués en double pour les standards, les contrôles et les échantillons.

Méthode :

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant.

- **Reconstitution et dilution du traceur:**
  - Reconstituer le lyophilisat d'insuline-[^{125}I] avec 5 mL d'eau distillée, bien mélanger.
  - Compléter à 125 mL avec la solution tampon.
  - Laisser 60 min à température ambiante.

- **Procédure de dosage:**
  - Numéroter 14 tubes pour la courbe étalon, 2 autres pour les contrôles positifs et négatifs ainsi que les tubes pour les échantillons.
  - Ajouter les standards, les contrôles et les échantillons à doser conformément aux indications données dans le tableau suivant:

Tubes	*1,2*	*3,4*	*5,6*	*7,8*	*9,10*	*11,12*	*13,14*	*15,16*	*17, …*
Etalons ou échantillons	100 µL Standard1	100 µL Standard2	100 µL Standard3	100 µL Standard4	100 µL Standard5	100 µL Standard6	100 µL Standard7	100 µL Contrôles	100 µL Echantillons
Description	0 µUI/mL	5,5 µUI/mL	15 µUI/mL	35 µUI/mL	70 µUI/mL	175 µUI/mL	310 µUI/mL	Contrôle µUI/mL	Plasma

  - Ajouter 900 µL de solution active de marquage dans chaque tube. Agiter les tubes au vortex.
  - Fermer les tubes et les incuber à température ambiante pendant 18 h.
  - Décanter avec précaution et jeter le surnageant. Retirer la dernière goutte en posant les tubes sur du papier absorbant.
  - Laver chaque tube avec 4 mL d'eau distillée.
  - Aspirer l'eau et sécher les tubes avec du papier absorbant.
  - Mesurer la radioactivité des tubes vides (revêtus), l'un après l'autre à l'aide d'un compteur gamma②.
  - Lire les valeurs des échantillons à partir de la courbe d'étalonnage en corrigeant s'il y a lieu par le facteur de dilution et calculer les résultats.

① ImmuChem™ Coated Tube Insulin ^{125}I RIA Kit, MP (Biomedicals, LLC, USA).

② COBRA-II™ autogamma (Packard) à double canal.

Fiche 11

Calcul du HOMA-IR

La relation entre glycémie et insulinémie est bien connue et a conduit à l'élaboration de l'indice HOMA (Homeostasis Model Assessment), indice qui permet de mettre en évidence une résistance à l'insuline qui est un facteur de risque de diabète de type 2.
Après avoir dosé le glucose et l'insuline, il est ainsi possible de calculer l'indice HOMA-IR.
Un résultat trop élevé de l'indice HOMA indique la présence d'une résistance à l'insuline.
L'indice HOMA est basé sur une formule mathématique, présentée ci-dessous, permettant d'évaluer la résistance à l'insuline de manière simple et fiable.

$$\text{HOMA-IR} = \frac{(\text{Insuline} \times \text{Glucose})}{22{,}5}$$

Avec : - l'insuline en mUI/L
- le glucose en mmol/L

<u>Pour la conversion des unités</u>:

- Insuline: pour convertir des pmol/L en mUI/L, **pmol/L / 6,045 = mUI/L.**
- Glucose: pour convertir des g/l en mmol/l, **g/L x 5,5 = mmol/L.**

Fiche 12

Dosage de l'angiotensine II

Technique radioimmunologique, RIA Kit①

Principe :

Le dosage radioimmunologique dépend de la capacité d'un anticorps à se lier à son antigène. Pour quantifier l'antigène, les formes radioactives [Angiotensine II- ^{125}I] et non radioactives de l'antigène sont en compétition pour les sites de liaison sur un anticorps spécifique. Plus l'antigène non radioactif est présent, moins l'antigène radioactif va pouvoir se lier à l'anticorps. Par conséquent, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon. La radioactivité [^{125}I] liée à l'anticorps, inversement proportionnelle à la quantité d'Angiotensine II non-radioactive, est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur gamma. L'Angiotensine II dans les échantillons est déterminée graphiquement à partir d'une courbe de standards d'Angiotensine II.

Le dosage a été effectué sur des échantillons de plasma à l'aide du coffret commercial RIA (Phoenix Pharmaceuticals)①.

Méthode :

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant.

- **Préparation des réactifs:**

Reconstituer le lyophilisat d'Angiotensine II-[^{125}I], les anticorps spécifiques, le peptide standard, les contrôles positifs et négatifs ainsi que les échantillons à doser avec le tampon RIA.

- **Procédure de dosage:**
  - Numéroter 16 tubes pour la courbe étalon, 2 autres pour les contrôles positifs et négatifs ainsi que les tubes pour les échantillons.
  - Préparer la gamme étalon.
  - Ajouter les étalons et les échantillons conformément aux indications données dans le tableau suivant:

Tubes	1,2	3,4	5,6	7,8…	15,16	17,18	19…
Etalons ou échantillons	100 µL Standard1	100 µL Standard2	100 µL Standard3	100 µL Standard4	100 µL Standard8	100 µL Contrôles	100 µL Echantillons
Description	1,280 pg/mL	640 pg/mL	320 pg/mL	160 pg/mL	10 pg/mL	Contrôle	Plasma

- Ajouter 100 µL d'anticorps primaire (anticorps lapin anti-peptide) dans chaque tube. Agiter les tubes au vortex.
- Couvrir les tubes et les incuber à 4°C pendant 24 h.
- Ajouter 100 µL de solution traceur [^{125}I] dans chaque tube. Agiter les tubes au vortex.
- Couvrir les tubes et les incuber à 4°C pendant 24 h.
- Ajouter 100 µL d'anticorps secondaire dans chaque tube (le sérum chèvre anti-lapin IgG, puis le sérum lapin). Agiter les tubes au vortex.
- Incuber à température ambiante pendant 90 min.
- Ajouter 500 µL de tampon RIA dans chaque tube puis vortexer.
- Centrifuger les tubes à 3000 rpm pendant 20 min à 4°C.
- Aspirer délicatement la totalité du surnageant de chaque tube.
- Mesurer la radioactivité du culot à l'aide d'un compteur gamma②.
- Lire les valeurs des échantillons à partir de la courbe d'étalonnage en corrigeant s'il y a lieu par le facteur de dilution et calculer les résultats.

① Coffret commercial RIA (Radio-Immunoassay), Phoenix Pharmaceuticals, Inc, USA.
② COBRA-II ™ autogamma (Packard) à double canal.

Analyses histologiques

Fiche 13

Traitement des échantillons tissulaires pour l'analyse histologique

- Après fixation pendant 24h dans le formol, les prélèvements sont mis en cassette.

- Ils sont ensuite déshydratés et imprégnés de paraffine dans un automate de type Excelsior ES① par passages dans une série de bains successifs de formol, d'alcool, de toluène et de paraffine.

- A partir des blocs de paraffine ainsi obtenus, des coupes de 5 µM d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome.

- Ces coupes sont ensuite montées à l'eau albumineuse sur des lames de verre traitées à la poly-L-lysine② pour les colorations ordinaires ou spéciales.

① Excelsior ES (Thermoscientific, Pittsburg, USA).
② Poly-L-lysine TM (VWR International, Leuven, Belgique).

Fiche 14

Réalisation de la coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safran)

Technique:

- Les coupes sont colorées dans un automate ① par bains successifs :
  - Toluène 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.

Résultats: 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.

①Automate tissue-Tek DRS, Sakura, Nagano.
②Toluène (Carlo-Erba, Val de Reuil, France).
③Tous les produits sont fournis par VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France).
④Hématoxyline : Shardon Gill 2 Hematoxylin (Thermoscientific, Pittsburg, USA).
⑤Eau acétifiée (Merck, Darmstadt, Deutschland).
⑥Eosine, Diapath, Microstain Division (Martinengo, Italia).
⑦Safran, Microm Microtech (Francheville, France).
⑧Eukitt® (Freiburg, Deutschland).

Réalisation de la coloration Rouge Sirius

Technique:

- Déparaffinage et réhydratation des lames:
  - Plonger la lame dans trois bains de xylène① en agitant, 3x5 min.
  - Plonger dans deux bains d'alcool absolu② en agitant les lames, 2x3 min.
  - Plonger dans un bain d'alcool à 80 %② en agitant, 2 min.
  - Réhydrater à l'eau courante puis à l'eau distillée.

- Coloration:
  - Plonger dans l'acide phosphomolybdique 0,2 %③, 1 min.
  - Rincer à l'eau courante.
  - Colorer au Rouge Sirius④ (filtré avant l'emploi), 30 min.
  - Rincer à l'eau courante.
  - Plonger dans l'acide chlorhydrique 1N⑤, 1 min.
  - Rincer à l'eau courante.
  - Rincer par un jet de pissette d'alcool à 95 %②.
  - Rincer dans deux bains d'alcool absolu② en agitant la lame.

- Xylène et montage:
  - Plonger dans trois bains de xylène① en agitant la lame.
  - Monter la lame sous lamelle 24x60mm② et Eukitt ®⑥.

Résultats: Cette coloration permet de déceler s'il y a une fibrose.

- Le Rouge Sirius colore les fibres de collagène et de réticuline en rouge.
- Les noyaux et le cytoplasme sont jaunes.

Les techniques de coloration ont été réalisées au Service d'Anatomopathologie à l'Hôpital Central, Nancy.

①Xylène (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France).
②Tous les produits sont fournis par VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France).
③ Acide phosphomolybdique 0,2 % (Merck, Darmstadt, Deutschland).
④ Rouge Sirius (RAL) (Thermoscientific, Pittsburg, USA).
⑤ Acide chlorhydrique 1N (Merck, Darmstadt, Deutschland).
⑥ Eukitt ® (Freiburg, Deutschland).

Fiche 16

Réalisation de la coloration Trichrome de Masson

Technique:

- Déparaffinage et réhydratation des lames:
  - Plonger la lame dans trois bains de xylène① en agitant, 3x5 min.
  - Plonger dans deux bains d'alcool absolu② en agitant les lames, 2x3 min.
  - Plonger dans un bain d'alcool à 80 %② en agitant, 2 min.
  - Réhydrater à l'eau courante puis à l'eau distillée.

- Coloration:
  - Colorer à l'Hématoxyline③, 10 min.
  - Rincer à l'eau courante.
  - Plonger dans l'eau ammoniacale④ jusqu'à bleuissement de la coupe.
  - Rincer à l'eau courante puis à l'eau distillée.
  - Colorer à la Fuchsine Ponceau⑤, 10 min.
  - Rincer à l'eau distillée.
  - Plonger dans l'acide phosphomolybdique⑥ (éclaircissement du rouge), 3 min.
  - Colorer sans rincer par le bleu d'Aniline⑦, 1 min.
  - Plonger rapidement dans l'eau acétifiée⑧ pour éliminer l'excès de colorant.
  - Rincer dans deux bains d'alcool absolu② en agitant la lame.

- Xylène et montage:
  - Plonger dans trois bains de xylène① en agitant la lame. Les coupes doivent être uniformément transparentes.
  - Monter la lame sous lamelle 24x60mm② et Eukitt ®⑨.

Résultats: Cette coloration permet de mettre en évidence une fibrose.

- L' hématoxyline colore les noyaux en violet.
- La Fuchsine Ponceau colore les cytoplasmes en rose-rouge, les hématies et la kératine en rouge vif.
- Le bleu d'Aniline colore les fibres de collagène en bleu.

Les techniques de coloration ont été réalisées au Service d'Anatomopathologie à l'Hôpital Central, Nancy.

①Xylène (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France).
②Tous les produits sont fournis par VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France).
③Hématoxyline, Shardon Gill 2 Hematoxylin (Thermoscientific, Pittsburg, USA).
④Eau ammoniacale : ammoniaque (Merck), eau stérile (versyleine fresenius) (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France).
⑤Fuchsine Ponceau : fuchsine acide 1 % (RAL avec 100mL de Ponceau de Xylidine à 1%) (Thermoscientific, Pittsburg, USA).
⑥Acide phosphomolybdique (Merck, Darmstadt, Deutschland).
⑦Bleu d'Aniline (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France).
⑧Eau acétifiée (Merck, Darmstadt, Deutschland).
⑨Eukitt ® (Freiburg, Deutschland).

Fiche 17

Réalisation de la coloration Red Oil

Technique:

- Fixation des coupes:
  - Plonger la lame dans un bain d'alcool isopropylique à 60 % ①, 1 min.

- Coloration:
  - Colorer dans la solution Red Oil②, 10 min.
  - Rincer avec de l'alcool isopropylique à 60 % ①, 30 sec.
  - Rincer délicatement à l'eau distillée.
  - Colorer à l'hémalun (Hematoxyline) ③, 30 sec.
  - Rincer délicatement à l'eau distillée.

- Montage:
  - Monter la lame sous lamelle 24x60mm④ avec un liquide de montage aqueux.

NB: La visualisation des lipides se fait sur des coupes congelées fixées préalablement dans du paraformaldéhyde 5 % ⑤et coupées à l'aide d'un cryostat.

Résultats: Cette coloration permet de confirmer une stéatose, en identifiant les lipides hydrophobes en phase liquide (triglycérides, acides gras, cholestérides). Le corps coloré appelé lysochrome se déplace du solvant dans lequel il se trouve vers le lipide tissulaire.

- L'hématoxyline colore les noyaux en bleu.
- Le Red Oil colore les gouttelettes lipidiques en rouge.

Les techniques de coloration ont été réalisées au Service d'Anatomopathologie à l'Hôpital Central, Nancy.

① Alcool isopropylique 60 % (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France).
② Red Oil (Thermoscientific, Pittsburg, USA).
③ Hématoxyline, Shardon Gill 2 Hematoxylin (Thermoscientific, Pittsburg, USA).
④ Tous les produits sont fournis par VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France).
⑤ Paraformaldéhyde 5 % (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

Quantification des protéines

Fiche 18

Extraction des protéines totales à partir de tissus

Avant de commencer :

- Préparer une solution de phenylmethanesulfonylfluoride ou phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ① dissous à 10 mg/mL dans l'éthanol absolu.
- Préparer une solution d'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) ① à 18,39 mg/mL dans de l'eau MilliQ.
- Préparer le tampon de lyse RIPA ① (Radioimmunoprecipitation Assay) selon le tableau suivant :

Tampon RIPA	Concentration
NaCl (sodium chloride) ①	8 g/L
Na2HPO4 (sodium phosphate anhydrous dibasic) ①	1,44 g/L
KH2PO4 (potassium dihydrogen phosphate) ①	0,24 g/L
NP40 (Nonidet P40) ①	1 %
DOC (Deoxycholate de sodium) ①	0,5 %
SDS (Lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate) ①	0,1 %
PMSF ①	10 µL/mL
Na3VO4 ①	10 µL/mL
Cocktail d'inhibiteurs de protéases ①	1,4 µL/mL

Procédure :

L'extraction des protéines se fait en condition dénaturante à partir du tissu hépatique, en maintenant les échantillons à 4°C.

- Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote liquide et la carboglace et garder environ 60 mg de tissu puis conserver le reste à - 80°C.
- Reprendre le broyat tissulaire dans du tampon RIPA à raison de 300 µL de tampon pour 60 mg de tissu.
- Incuber 10 minutes dans la glace.

- Homogénéiser en vortexant puis en passant le broyat dans une seringue de 1mL munie d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre (10 à 20 allers-retours).
- Effectuer 3 cycles de congélation-décongélation (azote-bain marie à 37°C).
- Ultra-soniquer 15 min à 4°C.
- Centrifuger 30 minutes à 12000 rpm à 4°C.
- Récupérer le surnageant et doser les protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) (Fiche 19).
- Stocker les protéines à -80°C.

N.B : Travailler toujours sur de la glace.

①Tampon de lyse RIPA : Tampon RIPA (NaCl 8 g/l, Na2HPO4 1,44 g/l, KH2PO4 0,24 g/l, NP40 1 %, DOC 0,5 %, SDS 0,1 %), à ajouter au moment de l'extraction : PMSF (10 mg/ml d'éthanol) 10µl/ml RIPA, Na3VO4 (100mM 18,39 mg/ml d'H2O) 10µl/ml RIPA, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science, Meylan, France) 14µl/10ml RIPA.

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

Principe : La méthode BCA est une méthode de dosage colorimétrique de concentration des protéines, basée sur le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin (réduire l'ion cuivrique Cu(II) en ion cuivreux Cu(I)) et la capacité de l'acide bicinchoninique à former un complexe coloré avec les ions cuivreux. Le produit de la réaction, coloré en pourpre, est formé par l'interaction de deux molécules de BCA avec un ion Cu^{2+}. Le complexe est hydrosoluble et présente une forte absorbance entre 540 et 590 nm, permettant le dosage colorimétrique des protéines. La concentration en protéines est déterminée à partir d'une courbe étalon.

Procédure :

- Préparer une gamme étalon (0, 50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 et 2000 µg/mL, en triple exemplaires) à partir d'une solution stock de BSA ① (bovine serum albumin) diluée dans le même tampon que les échantillons à doser (tampon de lyse RIPA).
- Distribuer 25 µL de chaque dilution de BSA et d'échantillon à doser sur une plaque de 96 puits. Deux blancs sont réalisés avec 25 µL de diluant seul. S'il faut diluer l'échantillon, utiliser le tampon de lyse RIPA.
- Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes du réactif A (BCA) ② avec 1 volume du réactif B ($CuSO_4$) ③.
- Ajouter 200 µL de réactif de travail ④ et agiter la plaque.
- Couvrir la plaque et la placer 30 min à 37°C.
- Laisser refroidir la plaque à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance sur un spectrophotomètre lecteur de plaques ⑤ à 570 nm.
- La droite de régression étalon est tracée et la concentration protéique des échantillons déduite.

Smith *et al*.(Smith et al., 1985) *Anal. Biochem*., 150 : 76-85.

① Ampoule contenant de la BSA à 2,0 mg/mL dans une solution de NaCl à 0,9 % (p/v) et NaN_3 à 0,05 % (p/v).

② Réactif A : solution aqueuse contenant BCA-Na_2 1% (p/v), Na_2CO_3 2 % (p/v), tartrate-Na_2 0,16 %, NaOH 0,4 % (p/v) et $NaHCO_3$ 0,95 % (p/v) (pH 11,25).

③ Réactif B : solution de $CuSO_4.5H_2O$ à 4 % (p/v) dans de l'eau déionisée.

④ Pierce, Rockford, IL, USA kit BCA Protein Assay® Reagent (Pi erce, Rockford, IL, USA).

⑤ Lecteur de plaques Victor^3 Wallac Multilabel, Perkin Elmer.

Western Blotting

1- Electrophorèse analytique des protéines sur gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE) :

a- Préparation des gels d'électrophorèse:

- Laver les plaques de verre à l'eau distillée puis à l'alcool, puis les placer sur leur support, séparées par des espaceurs (1,5 mm) et fixer l'ensemble sur le socle de coulage.
- Couler le gel de séparation ① (préparé selon le tableau 7) entre les plaques de verre (prévoir 10mL de solution par gel) puis recouvrir la surface avec de l'isopropanol.
- Laisser polymériser pendant 20 min à température ambiante (le temps de polymérisation varie en fonction de la température ambiante).
- Aspirer l'isopropanol, rincer abondamment la surface du gel avec de l'eau distillée, tout en s'assurant par la suite de l'élimination de toute trace d'eau.
- Couler « en excès » le gel de concentration (préparé selon le tableau 7).
- Positionner le peigne en Téflon® en évitant de piéger des bulles au niveau des dents et laisser polymériser 15 min à température ambiante.
- Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration.
- Monter l'appareil de migration en assemblant les 2 supports de gel sur le système central d'électrodes.
- Remplir le réservoir central jusqu'en haut ainsi que la moitié de la cuve avec du tampon de migration ② et contrôler l'étanchéité.

b- Préparation et dépôt des échantillons:

- Ajouter 1 volume de tampon de dépôt Laemmli 2X ③ pour 1 volume d'échantillon.
- Chauffer les échantillons à 100°C pendant 5 min, dans un bloc chauffant.
- Charger les puits du gel avec les échantillons (30 à 40µg de protéines par puits en général) et les marqueurs de poids moléculaire ④.

N.B: Pour une plus belle migration, déposer à quantité et volume constants (pour une même quantité de protéines par échantillon, compléter avec de l'eau Milli-Q pour obtenir le même volume).

c- Migration à voltage constant:

- Brancher la cuve d'électrophorèse sur un générateur de courant continu. La migration débute à 80 V constant le temps que les protéines pénètrent dans le gel de concentration (~ 15min) puis 110 V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel (~ 1h 30min).
- Arrêter la migration quand le front de migration arrive en bas des plaques.

Appareil d'électrophorèse Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France).

① Gel de séparation : acrylamide : bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad Laboratories), tampon Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 0,1 % (Bio-Rad Laboratories), polymérisé avec persulfate d'ammonium 0,05% (p/v) et TEMED 0,05 % (v/v) (Euromedex, France).

② Tampon de migration : Tris 250 mM contenant glycine 1,92 mM et SDS 1% (p/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl).

③ Tampon Laemmli X2 ; Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

④ Marqueurs de poids moléculaires : *Low Molecular Weight* ; LMW - Amersham Pharmacia, UK.

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

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

Tableau 7 : Composition des gels de concentration et de séparation pour SDS-PAGE Tris/Glycine.

2- Transfert des protéines sur membrane :

a- Préparation du transfert:

- Equilibrer les éponges et les papiers filtre dans du tampon de transfert froid (30min minimum).
- Couper la membrane PVDF① (polyvinylidène fluoride) ou en nitrocellulose② à la dimension du gel (7x8,5 cm).
- Immerger uniquement la membrane PVDF dans du méthanol pour l'activer (perméabilisation de la membrane) pendant au moins 30sec, puis la tremper dans du tampon de transfert froid pendant environ 5 min.
- Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et équilibrer le gel d'électrophorèse dans le tampon de transfert③ froid (5mn maximum).

b- Electro-transfert liquide:

- Superposer les différents éléments du sandwich sur la partie transparente de la cassette du système de transfert dans l'ordre suivant :
  - éponge
  - un papier filtre④
  - la membrane de PVDF
  - le gel de polyacrylamide
  - un papier filtre④
  - éponge
- Expulser les bulles d'air en faisant rouler une pipette plastique sur le sandwich puis fermer la cassette.
- Placer la cassette dans son socle en mettant bien la partie noire de la cassette contre la partie noire du socle.
- Placer le montage dans la cuve remplie de tampon de transfert froid.
- Brancher l'appareil de transfert⑤ sur un générateur de courant continu et transférer à ampérage constant 350 mA pendant 45min. Afin de s'assurer que le tampon de transfert ne chauffe pas trop durant le transfert ajouter un pain de glace et un barreau aimanté dans l'appareil puis le placer sur un agitateur électrique.

c- Fin et vérification du transfert:

- Démonter le sandwich et récupérer la membrane puis repérer les standards de poids moléculaires.
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S⑥ pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée. Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane avec du tampon de lavage TBST⑦.

d- Blocage:

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

A noter que suivant les anticorps, la solution de blocage peut être faite soit avec de la BSA (Bovine serum albumin) soit avec du lait écrémé (idem pour la dilution des anticorps).

N.B : A ce stade, on peut soit laisser sécher la membrane avant le blocage et la conserver au frigo, soit la conserver dans la solution de blocage à -20°C, et ceci pour une révélation ultérieure. Avant de réutiliser une membrane sèche, la repasser dans un bain de méthanol (uniquement pour une membrane en PVDF).

① Membrane polyvinylidène difluoride membrane, (PVDF), porosité 0,45 ou 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France).
② Membrane nitrocellulose, porosité 0,45 ou 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France).
③ Tampon de transfert : Tris 480 mM, glycine 390 mM, SDS 0,375 % (p/v) pH~9,2 (ne pas ajuster avec HCl).
④ Papier filtre Whatman d'épaisseur 1 mm ou blotting paper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA).
⑤ Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories).
⑥ Solution filtrée de rouge Ponceau S à 0,5 % (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA).
⑦ Tampon de lavage : TBS contenant Tween® 20 à 0,05 % (v/v).
⑧ Tampon de blocage : (TBST) Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,15 M (TBS) contenant du Tween 20® à 0,3 % (v/v) et 5 % de lait en poudre écrémé ou de la BSA (Bovine serum albumin).

3- Immunodétection par révélation en chimiluminescence de l'activité peroxidase :

- Incuber la membrane avec l'anticorps primaire dirigé contre une protéine donnée (voir tableau ci-dessous) dans du tampon de blocage ① pendant 1 nuit à 4°C, sous agitation rotative lente, dans de petites pochettes scellées, après avoir enlevé toutes les bulles.
- Laver la membrane 4 fois 10 min avec le tampon de lavage TBST ②, sous agitation forte.
- Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaire conjugué à la peroxidase (voir tableau ci-dessous) pendant 1 h à température ambiante, sous agitation rotative lente, dans de petites pochettes scellées, après avoir enlevé toutes les bulles.
- Laver la membrane 4 fois 10 min avec le tampon de lavage TBST, sous agitation forte.
- L'activité peroxidase est révélée par chimiluminescence ③ :
    - Déposer la membrane (protéines vers le haut) sur un film plastique.
    - Appliquer sur la membrane le volume de mélange réactionnel indiqué par le fournisseur, laisser agir 5 min puis sécher la membrane.
    - Disposer la membrane sur un film plastique.
- Révélation des bandes protéiques en utilisant un système détecteur Fusion-FX7 ④ : pour une première révélation, utiliser l'option «auto-exposure» (calcul automatique de la durée d'exposition) puis réajuster le temps d'exposition si nécessaire.

① Tampon de blocage : Tampon TBST et 5 % de lait en poudre écrémé ou de la BSA, 5mL par membrane.
② Tampon de lavage : TBS contenant Tween® 20 à 0,05 % (v/v).
③ ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK) est basé sur la synthèse enzymatique d'un ester acridinique émettant une lumière intense.
④ Détecteur Fusion-FX7 (Fisher, S/N 10-201068).

Anticorps primaires (anti-)	Sources	Dilutions	Fournisseurs
AGT	Lapin	1/700	GeneTex (Etats-Unis)
α-SMA	Lapin	1/400	Abcam, Paris (France)
AT1	Chèvre	1/700	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
β-Actine	poulet	1/1000	US Biological (Etats-Unis)
BMP7	Souris	1/700	Abcam, Paris (France)
Caspase-1	Lapin	1/500	Abcam, Paris (France)
CD36	Souris	1/700	Millipore (Etats-Unis)
Col1A1	Chèvre	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
Col1A2	Chèvre	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
ER-α	Lapin	1/700	Millipore (Etats-Unis)
ERR-α	Lapin	1/700	Millipore (Etats-Unis)
FATP2	Chèvre	1/700	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
FATP5	Lapin	1/700	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
GLUT2	Lapin	1/2000	Abcam, Paris (France)

HNF4-α	Souris	1/700	Abcam, Paris (France)
IL-1β clivée	Lapin	1/500	Abcam, Paris (France)
MMP-2	Lapin	1/500	Abcam, Paris (France)
MSR1	Chèvre	1/500	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
NFKB	Lapin	1/700	Cell Signaling Technology, (France)
PGC-1α	Chèvre	1/500	Interchim, VWR International (France)
PPAR-α	Lapin	1/700	Cayman (Etats-Unis)
PPAR-γ	Lapin	1/800	Abcam, Paris (France)
TGFβ1	Chèvre	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)

Tableau 8 : Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte.

Anticorps secondaires	**Sources**	**Dilutions**	**Fournisseurs**
Horseradish peroxydase-conjugated anti-	Chèvre	1/2000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	Lapin	1/2000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	Poulet	1/3000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	Souris	1/2000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)

Tableau 9 : Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.

Fiche 21

Déshybridation de membrane après western blotting (stripping)

Principe: Les membranes ayant déjà été incubées avec des anticorps primaires et secondaires peuvent être ré-incubées avec un autre anticorps après avoir été déshybridées.

- Chauffer le tampon entre 37 et 50°C.
- Sous hotte, remplir un bac en verre de tampon de déshybridation① chaud.
- Immerger les membranes dans les bacs pendant 30 min dans un bain-marie en agitant de temps en temps.
- Rincer rapidement les membranes à l'eau distillée.
- Rincer ensuite avec du tampon de lavage TBST② 2x10 min sous agitation rapide.
- Reprendre le protocole de western à partir du tampon de blocage.

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

Quantification des ARN

Fiche 22

Extraction des ARN avec le Kit RNeasy®① Plus Mini Kit avec élimination d'ADN génomique à partir des tissus

Ce kit est utilisé pour extraire les ARN servant à la RT-PCR semi-quantitative. Avec la procédure RNeasy toutes les molécules d'ARN d'une taille supérieure à 200 nucléotides sont isolées. Par conséquent les ARNr 5,8S ; 5S, et les ARNt, sont exclus (15-20 % des ARN totaux). Toutes les étapes du protocole RNeasy devront être accomplies à température ambiante. Pendant la procédure, il faut travailler rapidement. Toutes les étapes de centrifugation sont menées à 20-25°C.

Avant de commencer :

- Préparer l'éthanol à 50 %.
- Ajouter 10 µl de β-mercaptoéthanol② pour 1 mL de tampon RLT.
- Ajouter 4 volumes d'éthanol 96-100 % au tampon RPE comme indiqué sur la bouteille③.

Procédure:

- Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote et la carboglace et garder 20 mg de tissu puis conserver le reste à -80°C.
- Ajouter 600 µL de tampon RLT, vortexer environ 10sec, puis homogénéiser à l'aide d'une seringue et d'une aiguille (0,9 mm) en faisant 10 allers et retours dans la seringue.

  N.B : A ce stade, les échantillons peuvent être placés à –80°C et être utilisés après plusieurs mois. Pour traiter les lysats congelés, décongeler les échantillons pendant 1min à 37°C dans un bain-marie jusqu'à décongélation complète de l'échantillon et dissolution des sels.

- Centrifuger le lysat à vitesse maximale (16000 g) pendant 3min.
- Récupérer le surnageant à l'aide d'une pipette et transférer le tout sur une mini-colonne à élimination d'ADN génomique placée dans un tube collecteur de 2 mL.
  Centrifuger pendant 30 sec à vitesse ≥8000 g. Récupérer l'éluat et jeter la colonne.
- Ajouter 1 volume d'éthanol 50 % (600 µl) (RNase-free) à l'éluat et bien mélanger en pipetant. Ne pas centrifuger.
- Transférer jusqu'à 700 µl de l'échantillon sur une mini-colonne RNeasy placée dans un tube collecteur de 2 mL.
  Centrifuger pendant 15 sec à vitesse ≥8000 g. Jeter l'éluat.

N.B : Si le volume d'échantillon excède 700 µl, charger les échantillons successivement en gardant la même colonne et centrifuger comme ci-dessus. Jeter l'éluat après chaque étape de centrifugation.

- Ajouter 700 µL de tampon RW1 sur la mini-colonne. Centrifuger pendant 15sec à vitesse ≥8000 g pour laver la colonne. Jeter l'éluat.
- Laver la colonne avec 500 µL de tampon RPE. Centrifuger pendant 15sec à vitesse ≥8000 g. Jeter l'éluat.
- Ajouter encore 500 µL de tampon RPE à la colonne. Centrifuger pendant 2 min à vitesse ≥8000 g. Jeter l'éluat.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL et recentrifuger 1 min à vitesse maximale (16000 g) pour sécher la membrane.

N.B : Enlever délicatement la colonne du tube pour éviter tout contact entre la membrane et le produit d'écoulement. S'assurer que le tube soit bien vide.

- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. Déposer 40 µL d'eau RNase-free sur la membrane. Centrifuger 1min à vitesse ≥8000 g pour éluer l'ARN.

N.B: Si le taux d'ARN attendu est >30 µg, répéter l'étape d'élution avec un second volume d'eau. Eluer dans le même tube collecteur.

- Doser les ARN afin d'obtenir la concentration de chaque échantillons (fiche 23).
- Aliquoter les ARN par 1 µg et conserver à -80°C.

① Rneasy Plus Mini Kit : Qiagen, Courtabœuf, France.
② Préparer le volume à utiliser, à savoir 10 µl de β-Mercaptoéthanol par ml de tampon RLT.
③ Ajouter de l'éthanol au tampon RPE avant utilisation soit 44 ml d'éthanol 96-100 % Rnase-free dans les 11 ml de tampon RPE.

Fiche 23

Quantification des ARN

- Prendre une cuve en quartz propre dans laquelle on dépose 60µl (volume minimum pour lire une DO) d'eau Milli-Q afin de faire le blanc.
- Diluer l'ARN dans de l'eau à 1/30ème, soit 2µl d'ARN dans 58µl d'eau Milli-Q.
- Lire l'absorbance à 230, 260 et 280 nm avec à un spectrophotomètre①.

N.B : Pour avoir une bonne estimation de la concentration, la DO doit être comprise entre 0,1 et 1 unité de DO (si on se situe en dehors de cet intervalle, il faut diluer ou concentrer les échantillons).

Le ratio A_{260} / A_{280} est calculé pour vérifier la pureté de la solution. Celui-ci doit être compris entre 1,8 et 2. Un ratio inférieur signifie une contamination par des protéines. Un ratio supérieur indique une dégradation des ARN.

De même, le ratio A_{260}/A_{230} est mesuré. Un ratio supérieur à 2,1 indique une contamination par des produits organiques.

- Calculer la concentration en ARN à partir de la valeur mesurée à 260nm, sachant qu'une concentration d'ARN de 40 µg/mL donne une absorbance d'environ une unité de DO. Ne pas oublier de multiplier le résultat trouvé par la dilution choisie.

$$[ARN] = 40\ \mu g/mL \times A_{260}\ nm \times \text{facteur de dilution}$$

- Aliquoter les ARN à 1 µg/tube.

① Spectrophotomètre Biophotometer, Eppendorf.

Fiche 24

Analyse qualitative de l'ARN sur gel d'agarose

Préparation du gel d'agarose :

- Peser l'agarose① afin de préparer un gel à 1 % (p/v (g/mL)).
- Dissoudre l'agarose dans du tampon TBE 1X② (Tris, Borate, EDTA) (50 mL pour 8 échantillons ou 80 mL pour 15/20 échantillons) par chauffage au four à micro-ondes jusqu'au début d'ébullition puis laisser refroidir sur la paillasse.

  N.B : Ne pas faire bouillir le mélange pour éviter le risque de projections.

- Après refroidissement, ajouter du bromure d'éthidium (BET)③ à une concentration finale de 0,5 µg/mL (1 ou 2 gouttes) et homogénéiser.
- Verser délicatement la solution chaude d'agarose dans le support de gel où le peigne en téflon est préalablement positionné, et laisser polymériser pendant 20 min à température ambiante.
- Retirer le peigne et la plaque de son support puis placer le gel dans la cuve d'électrophorèse④ horizontale remplie avec du tampon TBE 1X.

Préparation et dépôt des échantillons d'ARN :

- Décongeler les aliquots de 500 ng d'ARN préparés au préalable (fiche 23).
- Ajouter de l'eau Milli-Q qsp 10 µL et 2 µL de tampon de dépôt⑤.
- Déposer les 12 µL finaux ainsi que des marqueurs de taille dans les puits du gel.

Migration des ARN sur gel d'agarose :

- Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu.
- Faire migrer l'ARN sous une tension constante de 80 V (petit gel) ou 130 V (grand gel) pendant 50 min (18 V/cm).

Observation des ARN sur gel d'agarose :

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

  N.B : Deux bandes correspondant aux ARNr 28S et 18S sont alors visibles sur le gel, par contre, si les ARN sons dégradés, un smear est alors observé.

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

Fiche 25

Transcription inverse des ARN (RT)

Principe :

Ce kit a été optimisé pour la réaction d'amplification en chaîne avec le kit RT² Profiler PCR Array. Cette méthode consiste en une rétro-transcription (transcription inverse ou RT) des ARN en utilisant le kit RT^2 First Strand de Qiagen①, suivie d'une PCR sur plaque (RT² Profiler PCR Array). Elle permet de synthétiser le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse). Il contient une étape d'élimination de l'ADN génomique et un contrôle d'ARN externe pour s'assurer de la fiabilité des résultats.

N.B : Il est préférable de réaliser toutes les étapes dans la glace pour éviter la dégradation des ARN.

Contenu du kit :

1- Tampon *gDNA Elimination Buffer*, 5x : Pour l'élimination de l'ADN génomique.
2- *Reverse Transcriptase Enzyme Mix 3* : Enzyme catalysant la transcription inverse.
3- *Reverse Transcription Buffer*, 5x : Pour l'optimisation de la transcription inverse, contient Mg^{2+} et dNTPs.
4- *Primer and External Control Mix* : Mélange d'oligo-dT et de *random primers* dissouts dans l'eau.
5- *RNase-Free* Water : Eau ultrapure.

Avant de commencer, décongeler les échantillons d'ARN et le contenu du kit dans de la glace (sauf l'enzyme RT qu'il faut sortir au dernier moment).

Elimination de l'ADN génomique :

- Dans un microtube de 0,2 mL stérile, préparer un volume d'ARN extraits (fiches 22 et 23) équivalent à 1 µg d'échantillon qsp 8 µL avec de l'eau RNase free.
- Ajouter 2µl de tampon *gDNA Elimination*® par tube d'ARN.
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger rapidement.
- Incuber 5 minutes à 42°C au thermocycleur② et placer les tubes immédiatement dans la glace.

Transcription inverse :

- Préparer le mélange réactionnel selon le nombre de tubes (compter 10 % d'excès pour les erreurs de pipetage) d'après le tableau suivant :

Réactifs	Volume/tube
Tampon Reverse Transcription 5x	4 µL
Primer and External Control Mix	1 µL
Reverse Transcriptase Mix 3	2 µL
RNase-Free Water	3 µL

- Ajouter 10 µL du mix / tube d'ARN traité contre l'ADN génomique.
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement.
- Placer dans le thermocycleur préchauffé et sélectionner le programme RT suivant :

  Segment 1 : 42°C 15 min

  Segment 2 : 95°C 5 min

- Mettre les tubes dans la glace.
- Ajouter 91 µL d'eau RNase-Free dans chaque tube (volume final de 111 µL). Bien mélanger.
- Mettre les tubes dans la glace.
- Conserver les ADNc produits à -20°C.

① RT^2 First Strand® Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France.
② Thermocycler GeneAmp® PCR System 2400 : Perkin Elmer Biosystems, 91945 - Courtaboeuf cedex.

Fiche 26

Screening de l'expression des gènes par le « RT² Profiler PCR Array – Rat Fibrosis – Qiagen Kit ①»

Principe : L'analyse quantitative de l'expression des ARNm est réalisée avec le kit «*RT² Profiler PCR Array - Qiagen*», permettant l'analyse de l'expression d'un panel de gènes associés à plus de 100 voies biologiques spécifiques. Les «*Primer and External Control*» correspondent à des amorces pour PCR quantitative expérimentalement testées et optimisées pour l'analyse de l'expression génique. Notre étude a été effectuée sur une plaque contenant 84 gènes impliqués dans l'inflammasome et la fibrose - «*Rat Fibrosis*». L'expression de 5 gènes de référence est étudiée et les données sont confrontées à celles obtenues avec les gènes d'intérêts. La plaque contient des puits pour le contrôle de la contamination par l'ADNg et le contrôle de l'efficacité de la RT et de la PCR.

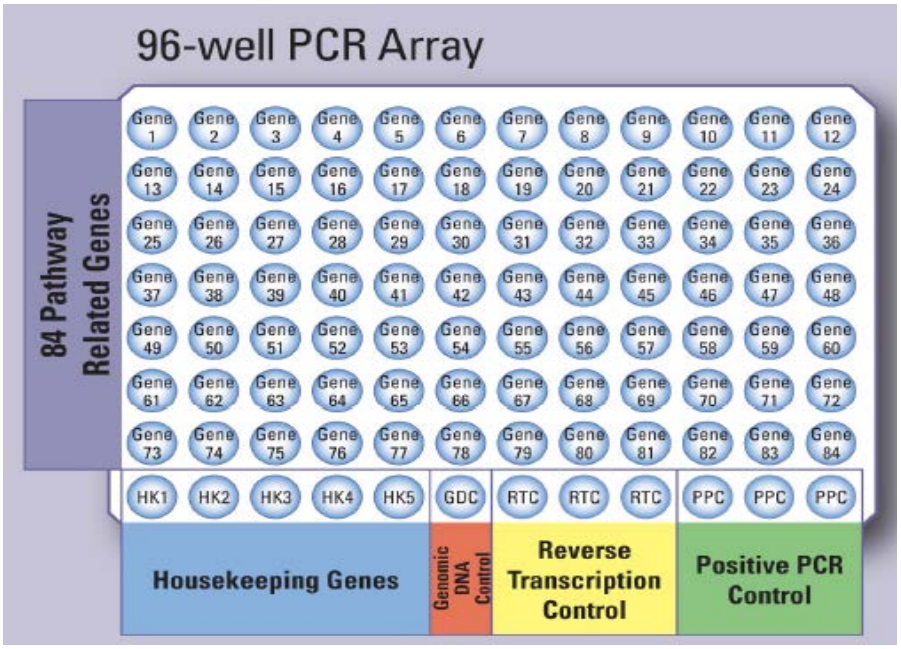


Figure 67 : Exemple représentatif du contenu des puits d'une PCR array

Avant de commencer, décongeler les produits de RT (ADNc) et le contenu du kit dans de la glace.

N.B : - Il est important de réaliser toutes les étapes dans la glace.

- Dissoudre les précipités qui peuvent être présents dans le tampon RT^2 SYBR Green Mastermix en chauffant le tube 1 min à 42°C et en le vortexant rapidement.

Réaction d'amplification :

- Dans un tube de 5 mL stérile, mélanger les composants du mix, d'après le tableau suivant :

2x RT^2 SYBR Green Mastermix	1350 µL
ADNc issu de la réaction de transcription inverse	102 µL
Eau RNase-Free	1248 µL
Volume final	2700 µL

- Sortir la plaque de son étui.
- Transférer le mix dans un réservoir stérile.
- A l'aide d'une pipette multi-canaux, ajouter 25 µL du mix dans chaque puits de la plaque avec les amorces des gènes déjà fixées, en s'assurant bien de ne pas introduire de bulles dans les puits.
- Mettre un film adhésif transparent sur la plaque.
- Centrifuger la plaque brièvement (1 min à 1000g, T° ambiante) pour éliminer les éventuelles bulles d'air.
- Vérifier ensuite qu'il n'y ai pas de bulles d'air et poser la plaque sur de la glace.
- Programmer le bloc thermostaté② pour 10 min d'activation de la polymérase (*HotStart DNA Taq Polymerase*) à 95°C puis 40 cycles de deux étapes: 95°C pendant 15 sec et 60°C pendant 60 sec③.
- Placer la plaque dans le bloc thermostaté② et lancer le run.
- Sortir la plaque de l'appareil que l'on entourer de papier aluminium pour ensuite la congeler à -20°C si une analyse par électrophorèse est nécessaire.
- Analyser les résultats à l'aide du fichier Excel d'analyse fourni «*SABiosciences PCR Array Data Analysis Template Excel*».

① *RT² Profiler PCR Array Kit*, *RT² First Strand Kit,* Qiagen, Courtabœuf, France.
② *Applied Biosystems Bio-Rad.*
③ Ces conditions ont été optimisées par le fournisseur, permettant de réaliser une amplification linéaire de la quantité d'amplicons de tous les gènes.

Fiche 27

Analyses statistiques

Les données ont été analysées avec le logiciel Statview v.5 (SAS Institute, Berkley, Californie, USA) et le logiciel Stata version 12.0 SE (StataCorp, Texas, USA). Nous avons calculé les moyennes ± écartypes. Pour les analyses biologiques et la DXA, nous avons utilisé le test de Mann-Whitney. Les données de Western-Blot ont été comparées par une analyse de la variance (Test Anova) à un facteur. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives. Concernant les changements d'expression de gènes, nous avons exprimé les données «fold change» en moyennes ± écartypes et la différence statistique était une valeur p inférieure à 0,05 de la moyenne de la différence du «fold change» de niveau d'expression.
A D50, nous avons comparé le groupe contrôle au groupe iMDD. A D185, nous avons comparé les différences entre les groupes contrôle *versus* iMDD ; contrôle *versus* contrôle/HF ; contrôle *versus* iMDD/HF ; iMDD *versus* iMDD/HF ; contrôle/HF *versus* iMDD/HF.
Les résultats de significativité ont été indiqués par des astérisques (*$p<0,05$; **$p<0,01$ et ***$p<0,001$).

Références bibliographiques

Adami HO, Chow WH, Nyrén O, Berne C, Linet MS, Ekbom A, Wolk A, McLaughlin JK, Fraumeni JF Jr (1996) Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus. J Natl Cancer Inst 88:1472-1477.

Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, Vehkavaara S, Häkkinen A, Olofsson SO, Yki-Järvinen H, Borén J (2006) Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. Diabetologia 49:755-765.

Aggarwal BB (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol 3:745-756.

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

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

Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart J, James WPT, Loria CM, Smith SC (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes Federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; american heart association; world heart Federation; international atherosclerosis society, and international association for the study of obesity. Circulation 120(16):1640 1645.

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

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

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

Anderson RG (1998) The caveolae membrane system. Annu Rev Biochem 67: 199-225.

Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW (1992) Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. Science 255(5043): 410-1.

Andersson A, Brattström L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B (1992) Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. Eur J Clin Invest 22(2):79-87.

Andreelli F et Ziegler O (2005) How to manage the metabolic syndrome ? A.M. Endocrinol 66 (2 Pt 3) : 2536-2545.

Andrès E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, Noblet-Dick M, Maloisel F, Schlienger JL, Blicklé JF (2004) Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. Cmaj 171(3): 251-9.

Andrews NC (2007) When is a heme transporter not a heme transporter? When it's a folate transporter. Cell Metab 5(1): 5-6.

Anezaki Y, Ohshima S, Ishii H, Kinoshita N, Dohmen T, Kataoka E, et al (2009) Sex difference in the liver of hepatocyte-specific Pten-deficient mice: A model of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatol Res 39:609-618.

Angulo P (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med 346:1221-1231.

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

Antony AC, Utley C, Van Horne KC, Kolhouse JF (1981) Isolation and characterization of a folate receptor from human placenta. J Biol Chem 256(18): 9684-92.

Araki A, Sako Y, Ito H (1993) Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. Atherosclerosis 103: 149-157.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, et al (1994) Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. Nature 372: 186-190.

Araki K, Masaki T, Katsuragi I, et al (2006) Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. Hypertension 48: 51–7.

Arthur MJ (2000) Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279: G245-G249.

Arun J, Clements RH, Lazenby AJ, Leeth RR, Abrams GA (2006) The prevalence of nonalcoholic steatohepatitis is greater in morbidly obese men compared to women. Obes Surg 16: 1351-1358.

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

Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G (2000) Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. Dig Dis Sci 45(10):1929-34.

Avila MA, Berasain C, et al (2000) Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. J Hepatol 33(6): 907-14.

Babeu JP et Boudreau F (2014) Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. World J Gastroenterol 20(1):22-30.

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

Balkau B, Vernay M, Mhamdi L, Novak M, Arondel D, Vol S, Tichet J, Eschwège E (2003) The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. Diabetes Metab 29(5):526-532.

Barak AJ et Beckenhauer HC (1988) The influence of ethanol on hepatic transmethylation. Alcohol Alcohol 23(1): 73-7.

Barkai G, Arbuzova S, Berkenstadt M, Heifetz S, Cuckle H (2003) Frequency of Down's syndrome and neural-tube defects in the same family. Lancet 361(9366): 1331-5.

Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C (2002) Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. International journal of epidemiology 31(6):1235 9.

Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS (1993) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. Lancet 341(8850): 938-41.

Barker DJ, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG (2009) Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. Annals of human biology 36(5):445-58.

Barker DJ et Osmond C (1986 a) Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. J Epidemiol Community Health 40(1):37-44.

Barker DJ et Osmond C (1986 b) Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet 1(8489):1077-81.

Bataller R, Gabele E, Schoonhoven R, Morris T, Lehnert M, Yang L, Brenner DA, Rippe RA (2003 a) Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 285, G642–G651.

Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbig MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J (2000) Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. Gastroenterology 118, 1149–1156.

Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA (2003 b) NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. J. Clin. Invest 112, 1383–1394.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG (2001) Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. Hum Mol Genet 10(7): 687-92.

Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A (2012) The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. J Hepatol 56: 952-964.

Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al (2012) Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. Hepatology 56: 1751-1759.

Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B (2006) Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. Mitochondrion 6:1 28.

Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Schumacker PT, Chandel NS (2007) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia. Mol Cell Biol 27:5737-5745.

Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C (2000) Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. Ann Intern Med 132:112- 117.

Bender F, Montoya M, Monardes V, Leyton L, Quest AF (2002) Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1. Biol Res 35(2): 151-67.

Benyon RC et Arthur MJ (2001) Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. Semin Liver Dis 21 : 373-84.

Bhaskar LV, Murthy J, Venkatesh Babu G (2011) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. Arch Oral Biol 56(8): 723-737.

Biancotto C, Frigè G, Minucci S (2010) Histone modification therapy of cancer. Advances in genetics 70: 341-386.

Blaise SA, Alberto JM, Audonnet-Blaise S, Guéant JL, Daval JL (2007) Influence of preconditioning-like hypoxia on the liver of developing methyl-deficient rats. Am J Physiol Endocrinol Metab 293: E1492–1502.

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

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

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

Bloch J, Scherrer U, Sartori C (2007) Fetal programming: an underestimated risk factor for cardiovascular and metabolic diseases. Rev Med Suisse 3(131):2483-4, 2486-8.

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

Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. Proc Natl Acad Sci U S A 94(7): 3290-5.

Boettcher E, Csako G, Pucino F et al (2012) Meta-analysis: pioglitazone improves liver histology and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. Alimentary Pharmacology and Therapeutics 35 (1) 66–75.

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

Bonjour JP (1980) Vitamins and alcoholism. II. folate and vitamin B12. Int J Vitam Nutr Res 50(1): 96-121.

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

Bose S, Seetharam S, Seetharam B (1995 a) Membrane expression and interactions of human transcobalamin II receptor. J Biol Chem 270(14): 8152-7.

Bose S, Seetharam S, Hammond TG, Seetharam B (1995 b) Regulation of expression of transcobalamin II receptor in the rat. Biochem J 310 (Pt 3): 923-9.

Bossenmeyer-Pourie C, Blaise S, Pourie G, Tomasetto C, Audonnet S, Ortiou S, Koziel V, Rio MC, Daval JL, Guéant JL, Beck B (2010) Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat. Am J Pathol 176: 270–277.

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

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

Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R (1999) Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. FASEB J 13(10):1231-8.

Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. JAMA: the journal of the American Medical Association 274(13): 1049-1057.

Bouzianas DG, Bouziana SD, Hatzitolios AI (2013) Potential treatment of human nonalcoholic fatty liver disease with long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. Nutr Rev 71(11): 753-71.

Bowyer BA, Miles JM, Haymond MW, Fleming CR (1988) L-Carnitine therapy in home parented nutrition patients with abnormal liver tests and low plasma carnitine concentration. Gastroenterology 94: 434–438.

Boza C, Riquelme A, Ibañez L, Duarte I, Norero E, Viviani P, Soza A, Fernandez JI, Raddatz A, Guzman S, Arrese M (2005) Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass. Obes Surg 15(8): 1148-53.

Brasier AR (2010) The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. Cardiovasc. Res 86, 211–218.

Brea A, Mosquera D, Martin E, Arizti A, Cordero JL, Ros E (2005) Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1045-1050.

Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al (2004) Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Hepatology 40: 1387-1395.

Brunt EM et Tiniakos DG (2010) Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol 16: 5286-5296.

Bugianesi E (2007) Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. Clin Liver Dis 11:191 207.

Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S et al (2005 a) Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. Diabetologia 48: 634-642.

Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G (2005 b) Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. Hepatology 42: 987-1000.

Burdge GC, Lillycrop KA, Phillips ES, Slater-Jefferies JL, Jackson AA, Hanson MA (2009) Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. J Nutr 139: 1054–1060.

Burt AD, Mutton A, Day CP (1998) Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. Semin Diagn Pathol 15: 246-258.

Byrne CD et Targher G (2015) NAFLD: A multisystem disease. J Hepatol 62, S47–S64.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. N Engl J Med 348: 1625-1638.

Cameron AJ, Magliano DJ, Zimmet PZ, Welborn TA, Colagiuri S, Tonkin AM, Shaw JE (2008) The metabolic syndrome as a tool for predicting future diabetes: the AusDiab study. J. Intern. Med 264(2): 177-186.

Canbay A, Bechmann L, Gerken G (2007) Lipid metabolism in the liver. Z Gastroenterol 45(1): 35-41.

Cano A, Ciaffoni F, Safwat GM, Aspichueta P, Ochoa B, Bravo E, et al (2009) Hepatic VLDL assembly is disturbed in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease: is there a role for dietary coenzyme Q? J Appl Physiol 107: 707-717.

Carreras CW et Santi DV (1995) The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. Annu Rev Biochem 64: 721-62.

Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. Hepatic (2002) stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. J Hepatol 36 : 200-9.

Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L (2011) Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. PLoS One 6:e23937.

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

Chandar N et Lombardi B (1988) Liver cell proliferation and incidence of hepatocellular carcinomas in rats fed consecutively a choline-devoid and a choline-supplemented diet. Carcinogenesis 9(2): 259-63.

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 11715-11720.

Chen G, Broséus J, Hergalant S, Donnart A, Chevalier C, Bolaños-Jiménez F, Guéant JL, 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(2): 293-302.

Chen JH, Martin-Gronert MS, Tarry-Adkins J, Ozanne SE (2009) Maternal protein restriction affects postnatal growth and the expression of key proteins involved in lifespan regulation in mice. PLoS One 4: e4950.

Chen JQ, Brown TR, RussoJ (2009) Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1793(7): 1128-1143.

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

Chen PY, Feng S, Joo JW, Jacobsen SE, Pellegrini M (2011) A comparative analysis of DNA methylation across human embryonic stem cell lines. Genome Biol 12: R62.

Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, et al (2008) Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. Hepatology 48:1810–20.

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

Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JE, Bønaa KH, Spence JD, Nygård O, Jamison R, Gaziano JM, Guarino P, Bennett D, Mir F, Peto R, Collins R (2010) Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37 485 individuals. Arch Intern Med 170(18): 1622 31.

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

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

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

Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH (2011) Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights Science332 (6037): 1519-1523.

Combs GF Jr (1998) Emerging relationships of vitamins and cancer risks. Curr Opin Clin Nutr Metab Care (6): 519-23.

Cooke PS, Heine PA, Taylor JA, Lubahn DB (2001) The role of estrogen and estrogen receptor-[alpha] in male adipose tissue. Molecular and Cellular Endocrinology 178(1-2): 147-154.

Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS (2009) Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. Oncogene 28: 3526–36.

Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G (2011) Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. Hepatology 54: 133–144.

Czaja AJ (2014) Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. World J Gastroenterol 20: 2515-2532.

Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, Pedemonte C, Bertorello AM, Sznajder JI (2003) Hypoxia induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. J Clin Invest 111: 1057-1064.

Dam-Larsen S, Franzmann M, Andersen IB, Christoffersen P, Jensen LB, Sorensen TI, et al (2004) Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. Gut 53: 750-755.

Davaille J, Li L, Mallat A, Lotersztajn S (2002) Sphingosine 1-phosphate triggers both apoptotic and survival signals for human hepatic myofibroblasts. J Biol Chem 277: 37323-30.

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

Day CP et James OF (1998) Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterology 114: 842-845.

De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ (2002) Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heartdisease. Pharmacol Rev 54(4): 599-618.

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

De Minicis S et Brenner DA (2007) NOX in liver fibrosis. Arch. Biochem. Biophys 462, 266 272.

Dela Pena A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G (2005) NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. Gastroenterology 129: 1663-1674.

Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG (2007) The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. Am J Obstet Gynecol 196: 555, e1-7.

Devlin AM et Lentz SR (2006) ApoA-I: a missing link between homocysteine and lipid metabolism? Circ Res 98(4): 431-3.

Dicker-Brown A, Fonseca VA, Fink LM, Kern PA (2001) The effect of glucose and insulin on the activity of methylene tetrahydrofolate reductase and cystathionine-beta-synthase: studies in hepatocytes. Atherosclerosis 158: 297-301.

Diraison F, Moulin P, Beylot M (2003) Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during nonalcoholic fatty liver disease. Diabetes Metab 29: 478-485.

Dixon LJ, Flask CA, Papouchado BG, Feldstein AE, Nagy LE (2013) Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. PLoS One 8: e56100.

Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ (2005) Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest 115: 1343-1351.

Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI (2008) Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. Circ. Res 102, 488– 496.

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

Durand C, Mary S, Brazo P, Dollfus S (2003) Psychiatric manifestations of vitamin B12 deficiency: a case report. Encephale 29(6): 560-5.

Eaton S (2002) Control of mitochondrial beta-oxidation flux. Prog. Lipid Res 41, 197–239.

Eder K et Ringseis R (2010) The role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional regulation of novel organic cation transporters. Eur J Pharmacol 628: 15.

Ekwall K (2005) Genome-wide analysis of HDAC function. Trends Genet 21(11): 608-15.

El Hajj Chehadeh S, Pourié G, Martin N, Alberto JM, Daval JL, Guéant JL, Leininger-Muller B. Br J Nutr (2014) Gestational methyl donor deficiency alters key proteins involved in neurosteroidogenesis in the olfactory bulbs of newborn female rats and is associated with impaired olfactory performance 111(6): 1021-31.

El Kholty S, Gueant JL, Bressler L, Djalali M, Boissel P, Gerard P, Nicolas JP (1991) Portal and biliary phases of enterohepatic circulation of corrinoids in humans. Gastroenterology 101(5): 1399-408.

El-Assal O, Hong F, Kim WH, Radaeva S, Gao B (2004) IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver. Cell Mol Immunol 1: 205-211.

El-Badry AM, Moritz W, Contaldo C, Tian Y, Graf R, Clavien PA (2007) Prevention of reperfusion injury and microcirculatory failure in macrosteatotic mouse liver by omega-3 fatty acids. Hepatology 45: 855-863.

Elks CM et Francis J (2010) Central adiposity, systemic inflammation, and the metabolic syndrome. Curr. Hypertens. Rep 12, 99–104.

Engman M (1998) Homocysteinemia: new information about an old risk factor for vascular disease.Journal of insurance medicine (New York, NY) 30(4): 231.

Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al (2006) MiR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. Cell Metab 3: 87–98.

Esteller M (2006) Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour suppressor genes. Br J Cancer 94(2): 179-83.

Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, et al (2009) Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. Proc Natl Acad Sci USA 106: 15430-15435.

Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S (2008) Alterations in adipose tissue and hepatic liver kinetics in obese men and women with non alcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 134: 424-431.

Fabbrini E, Sullivan S, Klein S (2010) Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. Hepatology 51: 679-689.

Fanapour PC, Yug B, Kochar MS (1999) Hyperhomocysteinemia: an additional cardiovascular risk factor. WMJ: official publication of the State Medical Society of Wisconsin 98(8): 51.

Farrell GC, Teoh NC, McCuskey RS (2008) Hepatic microcirculation in fatty liver disease. Anat Rec (Hoboken) 291: 684-692.

Favre GA, Esnault VL, Van Obberghen E (2015) Modulation of glucose metabolism by the renin-angiotensin aldosterone system. Am J Physiol Endocrinol Metab 308: E435-449.

Feldstein AE (2010) Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. Semin Liver Dis 30: 391-401.

Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ (2004) Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. Hepatology 40(1): 185-94.

Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, Zhang Y (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. Curr Biol 12(12): 1052-8.

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

Fernandes-Costa F et Metz J (1982) Vitamin B12 binders (transcobalamins) in serum. Critical reviews in clinical laboratory sciences 18: 1-30.

Fernandez-Marcos PJ et Auwerx J (2011) Regulation of PGC-1a, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. Am J Clin Nutr 93: 884S–990S.

Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE (2006) Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. Physiol Behav 88: 234-43.

Ferrante Jr AW (2007) Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. J. Intern. Med 262, 408–414.

Ferré P et Foufelle F (2010) Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. Diabetes Obes Metab 12 Suppl 2: 83-92.

Fonseca VA, Fink LM, Kern PA (2003) Insulin sensitivity and plasma homocysteine concentrations in non-diabetic obese and normal weight subjects. Atherosclerosis 167(1): 105-9.

Fonseca VA, Mudaliar S, Schmidt B, Fink LM, Kern PA, Henry RR (1998) Plasma homocysteine concentrations are regulated by acute hyperinsulinemia in nondiabetic but not type 2 diabetic subjects. Metabolism 47: 686-689.

Ford ES (2005) Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. Diabetes Care 2 8(7):1769-1778.

Ford ES, Li C, Sattar N (2008) Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence. Diabetes Care 31(9): 1898-1904.

Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. Human reproduction update 13: 225-238.

Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, Bertelli C, Fatta E, Bignamini D, Marchesini G, Fargion S (2008) Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. Hepatology 48(3): 792-798.

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet 37(4): 391- 400.

Franken DG, Blom HJ, Boers GH, Tangerman A, Thomas CM, Trijbels FJ (1996) Thiamine (vitamin B1) supplementation does not reduce fasting blood homocysteine concentration in most homozygotes for homocystinuria. Biochimica et biophysica acta 1317: 101-104.

Frelut ML, Nicolas JP, Guilland JC, de Courcy GP (2011) Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->T polymorphism: a link between birth weight and insulin resistance in obese adolescents. Int J Pediatr Obes 6: e312–317.

Frevert U, Engelmann S, Zougbédé S, Stange J, Ng B, et al (2005) Intravital Observation of Plasmodium berghei Sporozoite Infection of the liver, PloS Biology 3(6): e192.

Friedman SL (2000) Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem 275: 2247-50.

Friedman SL (2003) Liver fibrosis - from bench to bedside. J Hepatol 38: S38-S53.

Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, Montori VM (2007) Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. J. Am. Coll. Cardiol 49(4): 403-414.

Ganapathy V, Smith SB, Prasad PD (2004) SLC19: the folate/thiamine transporter family. Pflugers Arch 447(5): 641-6.

Ganesan T, Khadra MH, Wallis J, Neal DE (2002) Vitamin B12 malabsorption following bladder reconstruction or diversion with bowel segments. ANZ journal of surgery 72: 479 482.

Garcia MM, Guéant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Gueguen N, Marie PY, Lacolley P, Herrmann M, Juillière Y,Malthiery Y, Guéant JL (2011) Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetyla ion of PGC-1α by PRMT1and SIRT1. J Pathol 225(3): 324-35.

García-Tevijano ER, Berasain C, Rodríguez JA, Corrales FJ, Arias R, Martín-Duce A, Caballería J, Mato JM, Avila MA (2001) Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. Hypertension 38(5): 1217-21.

Gary JD et Clarke S (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 61: 65-131.

Geerts A (2001)History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. Semin Liver Dis 21: 311-35.

Gelineau-van Waes J, Heller S, Bauer LK, Wilberding J, Maddox JR, Aleman F, Rosenquist TH, Finnell RH (2008) Embryonic development in the reduced folate carrier knockout mouse is modulated by maternal folate supplementation. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 82(7): 494-507.

George L, Mills JL, Johansson AL, Nordmark A, Olander B, Granath F, Cnattingius S (2002) Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. Jama 288(15): 1867-73.

Gerhard GT et Duell PB (1999) Homocysteine and atherosclerosis. Current opinion in lipidology 10: 417-428.

Ghoshal AK et Farber E (1984) The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. Carcinogenesis 5(10): 1367-70.

Giannelli G, Bergamini C, Marinosci F, Fransvea E, Napoli N, Maurel P, Dentico P, Antonaci S (2006) Antifibrogenic effect of IFN-alpha2b on hepatic stellate cell activation by human hepatocytes. J Interferon Cytokine Res 26(5): 301-8.

GiostraE et Rubbia-Brandt L (2003) Fibrose hépatique Rev Med Suisse.

Gochard A, Mondon K, De Toffol B, Autret A (2009) Vitamin B12 deficiency and neurological disorders: a case report and literature review. Rev Neurol (Paris) 165(12): 1095-8.

Gonzalez FJ (2008) Regulation of hepatocyte nuclear factor 4α-mediated transcription. Drug metabolism and pharmacokinetics 23(1): 2-7.

Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, Laitinen S, Kolak M, Fisher RM, Hamsten A, Auvinen P, Yki-Jarvinen H (2008) Gene expression in human NAFLD. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 294, G1281–G1287.

Grenard P, Blanquier B, Ricard-Blum S (1997) Urinary excretion of the collagen cross-link pyridinoline increases during liver fibrogenesis. J Hepatol 26: 1356-62.

Grenard P, Bresson-Hadni S, El Alaoui S, Chevallier M, Vuitton DA, Ricard-Blum S (2001) Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. J Hepatol 35: 367-75.

Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S (2002) Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. Front Biosci 7: d793-d807.

Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW (1997) Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. Hypertension 29, 366–373.

Grutzner N, Heilmann RM, Stupka KC, Rangachari VR, Weber K, Holzenburg A, Suchodolski JS, Steiner JM (2013) Serum homocysteine and methylmalonic acid concentrations in Chinese Shar-Pei dogs with cobalamin deficiency. Veterinary journal.

Guéant JL et Namour F (2004) Vitamin B12: Absorption, Metabolism and Deficiency. Encyclopedia of Gastroenterology Elsevier (USA).

Guéant JL, Gerard A, Monin B, Champigneulle B, Gerard H, Nicolas JP (1988) Radioautographic localisation of iodinated human intrinsic factor in the guinea pig ileum using electron microscopy. ut 29: 1370-1378.

Guéant JL, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, Ferri R, Romano A, Candito M, Namour B (2003) Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC 41: 1473-1477.

Guéant JL, Namour F, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL (2013) Folate and fetal programming: a play in epigenomics? Trends in endocrinology and metabolism: TEM 24: 279-289.

Guéant JL, Elakoum R, Ziegler O, Coelho D, Feigerlova E, Daval JL, Guéant-Rodriguez RM (2014) Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in the liver and heart. Pflugers Arch 466(5): 833-50.

Guéant Rodriguez RM, Juillière Y, Nippert M, Abdelmouttaleb I, Herbeth B, Aliot E, Danchin N, Guéant JL (2007) Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions. Journal of Thrombosis and Haemostasis 5(6): 1209-1216.

Gulsen M, Yesilova Z, Bagci S, Uygun A, Ozcan A, Ercin CN, Erdil A, Sanisoglu SY, Cakir E, Ates Y, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K (2005) Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol Hepatol 20(9): 1448-1455.

Guo JU, Su Y, Shin JH, Shin J, Li H, Xie B, et al (2014) Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. Nat. Neurosci 17, 215–222.

Gusarova GA, Dada LA, Kelly AM, Brodie C, Witters LA, Chandel NS, Sznajder JI (2009) Alpha1- AMP-activated protein kinase regulates hypoxia-induced Na,K ATPase endocytosis via direct phosphorylation of protein kinase C zeta. Mol Cell Biol 29: 3455-3464.

Hague WM (2003) Homocysteine and pregnancy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 17(3): 459-69.

Hales CN et Barker DJ (2001) The thrifty phenotype hypothesis. Br Med Bull 60: 5-20.

Halsted CH, Villanueva J, Chandler CJ, Stabler SP, Allen RH, Muskhelishvili L, James SJ, Poirier L (1996) Ethanol feeding of micropigs alters methionine metabolism and increases hepatocellular apoptosis and proliferation. Hepatology 23(3): 497-505.

Hamanaka RB et Chandel NS (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. Trends Biochem Sci 35: 505-513.

Hamid A, Wani NA, Kaur J (2009) New perspectives on folate transport in relation to alcoholism-induced folate malabsorption--association with epigenome stability and cancer development. Febs J 276(8): 2175-91.

Harrison SA et Neuschwander-Tetri BA (2004) Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. Clin Liver Dis 8(4): 861-79, ix.

Hashimoto E, Yatsuji S, Tobari M, Taniai M, Torii N, Tokushige K, et al (2009) Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis.J Gastroenterol 44 Suppl 19: 89-95.

Hashimoto T, Fujita T, Usuda N, Cook W, Qi C, Peters JM, et al (1999) Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferatoractivated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. J Biol Chem 274: 19228-19236.

Hashizume H, Sato K, Takagi H, Hirokawa T, Kojima A, Sohara N, et al (2007) Primary liver cancers with nonalcoholic steatohepatitis. Eur J Gastroenterol Hepatol 19: 827-834.

Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, Loberg EM, Haaland T, Goverud I, Torjesen PA, Birkeland K, Bjoro K, Aukrust P (2006) Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. J. Hepatol 44, 1167–1174.

Hayashi H et Sakai T (2012) Biological Significance of Local TGF-beta Activation in Liver Diseases. Front Physiol 3: 12.

Headstrom PD, Rulyak SJ, Lee SD (2008) Prevalence of and risk factors for vitamin B(12) deficiency in patients with Crohn's disease. Inflammatory bowel diseases 14: 217-223.

Henderson GI, Perez T, Schenker S, Mackins J, Antony AC (1995) Maternal-to-fetal transfer of 5- methyltetrahydrofolate by the perfused human placental cotyledon: evidence for a concentrative role by placental folate receptors in fetal folate delivery. J Lab Clin Med 126(2): 184-203.

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

Herceg Z et Vaissière T (2011) Epigenetic mechanisms and cancer. Epigenetics 6 (7):804-819.

Herrmann W et Obeid R (2011) Biomarkers of neurodegenerative diseases. Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC 49: 343-344.

Hillier TA, Fagot-Campagna A, Eschwège E, Vol S, Cailleau M, Balkau B (2006) Weight change and changes in the metabolic syndrome as the French population moves towards overweight: the D.E.S.I.R. cohort. Int J Epidemiol 35(1): 190-196.

Hoffman M (2011) Hypothesis: hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress. Medical hypotheses 77: 1088-1093.

Holliday R et Grigg GW (1993) DNA methylation and mutation. Mutat Res 285(1): 61- 7.

Holness MJ, Caton PW, Sugden MC (2010) Acute and long-term nutrient-led modifications of gene expression: potential role of SIRT1 as a central co-ordinator of short and longer-term programming of tissue function. Nutrition 26: 491–501.

Horton JD, Shimano H, Hamilton RL, Brown MS, Goldstein JL (1999) Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid rich VLDL. J Clin Invest 103: 1067-1076.

Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. Nature 444: 860-867.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factoralpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259: 87 91.

Hsueh CT et Dolnick BJ (1994) Regulation of folate-binding protein gene expression by DNA methylation in methotrexate-resistant KB cells. Biochem Pharmacol 47(6): 1019-27.

Hultberg B, Berglund M, Andersson A, Frank A (1993) Elevated plasma homocysteine in alcoholics. Alcohol Clin Exp Res 17(3): 687-9.

Hunder G, Schümann K, Strugala G, Gropp J, Fichtl B, Forth W (1991) Influence of subchronic exposure to low dietary deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, on intestinal absorption of nutrients in mice. Food Chem Toxicol 29(12): 809-14.

Hunyady L et Catt KJ (2006) Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. Mol. Endocrinol 20, 953–970.

Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N (2002) Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. Gastroenterology 122(5): 1399-410.

Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I (2004) Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. Hepatology 39: 1286–1296.

Iqbal MP (2012) Lead pollution - a risk factor for cardiovascular disease in Asian developing countries. Park J Pharm Sci 25(1): 289-94.

Iyer R et Tomar SK (2009) Folate: a functional food constituent. Journal of food science 74: R114-122.

Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto JM, Taylor LM Jr (1994) Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. Clin Chem 40(6): 873-81.

Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE (2006) De novo CpG island methylation in human cancer cells. Cancer Res 66(2): 682-692.

Jakubowski H (2004) Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. Cellular and molecular life sciences : CMLS 61: 470-487.

Jayasooriya AP, Mathai ML, Walker LL, Begg DP, Denton DA, Cameron-Smith D, Egan GF, McKinley MJ, Rodger PD, Sinclair AJ, Wark JD, Weisinger HS, Jois M, Weisinger RS (2008) Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 6531–6536.

Jeninga EH, Schoonjans K, Auwerx J (2010) Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. Oncogene 29: 4617–4624.

Jeong WI, Park O, Suh YG, Byun JS, Park SY, Choi E, Kim JK, Ko H, Wang H, Miller AM, Gao B (2011) Suppression of innate immunity (natural killer cell/interferon-γ) in the advanced stages of liver fibrosis in mice. Hepatology 53(4): 1342-51.

Ji HF, Sun Y, Shen L (2014) Effect of vitamin E supplementation on aminotransferase levels in patients with NAFLD,NASH, and CHC: results from a meta-analysis. Nutrition 30(9): 986–991.

Jiang W, Nakayama Y, Sequeira JM, Quadros EV (2013) Mapping the functional domains of TCblR/CD320, the receptor for cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.

Jin X, Zimmers TA, Perez EA, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG (2006) Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. Hepatology 43: 474-484.

Jolivet J, Faucher F, Pinard MF (1987) Influence of intracellular folates on methotrexate metabolism and cytotoxicity. Biochem Pharmacol 36(19): 3310-2.

Jones BH, Standridge MK, Moustaid N (1997) Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. Endocrinology 138, 1512–1519.

Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. Science 309: 1577–81.

Jornayvaz FR, Birkenfeld AL, Jurczak MJ, Kanda S, Guigni BA, Jiang DC, Zhang D, Lee HY, Samuel VT, Shulman GI (2011) Hepatic insulin resistance in mice with hepatic overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 5748–5752.

Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, et al (2000) Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 8536-8541.

Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M (2005) Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. Cell 120: 649-661.

Kamen BA, Wang MT, Streckfuss AJ, Peryea X, Anderson RG (1988) Delivery of folates to the cytoplasm of MA104 cells is mediated by a surface membrane receptor that recycles. J Biol Chem 263(27): 13602-9.

Kanno K, Tazuma S, Nishioka T, Hyogo H, Chayama K (2005) Angiotensin II participates in hepatic inflammation and fibrosis through MCP-1 expression. Dig. Dis. Sci 50, 942–948.

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

Kapusta L, Haagmans ML, Steegers EA, Cuypers MH, Blom HJ, Eskes TK (1999) Congenital heart defects and maternal derangement of homocysteine metabolism. J Pediatr 135(6): 773-4.

Kashireddy P et Rao MS (2004) Lack of peroxisome proliferator-activated receptor a enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis. Hep Res 30: 104–110.

Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, et al (2002) Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. Mol Cell Endocrinol 195: 109-118.

Kenyon SH, Nicolaou A, Gibbons WA (1998) The effect of ethanol and its metabolites upon methionine synthase activity in vitro. Alcohol 15(4): 305-9.

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

Khan SA et Vanden Heuvel JP (2003) Reviews: urrent topicsrole of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review). The Journal of nutritional biochemistry 14(10): 554-567.

Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ (2002) The SOCS box: a tale of destruction and degradation. Trends Biochem Sci 27: 235-241.

Kim HC, Kim DJ, Huh KB (2009) Association between nonalcoholic fatty liver disease and carotid intima-media thickness according to the presence of metabolic syndrome. Atherosclerosis 204: 521-525.

Kim J, Gherasim C, Banerjee R (2008) Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 14551-14554.

Kim JC, Lee NC, Hwu PW, Chien YH, Fahiminiya S, Majewski J, Watkins D, Rosenblatt DS (2012) Late onset of symptoms in an atypical patient with the cblJ inborn error of vitamin B12 metabolism: diagnosis and novel mutation revealed by exome sequencing. Molecular genetics and metabolism 107: 664-668.

Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, et al (2001) Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 7522-7527.

Kim KC, Friso S, Choi SW (2009) DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. The Journal of nutritional biochemistry 20: 917-926.

Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Abe Y (2005) Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. Hypertension 45, 438–444.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, et al (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 41, 1313–1321.

Koda M, Bauer M, Krebs A, Hahn EG, Schuppan D, Murawaki Y (2006) Endothelin-1 enhances fibrogenic gene expression, but does not promote DNA synthesis or apoptosis in hepatic stellate cells. Comp Hepatol 24;5:5.

Korenblat KM, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S (2008) Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. Gastroenterology 134: 1369-1375.

Kotronen A, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Bergholm R, Frayn KN, Fielding BA, et al (2009) Liver fat and lipid oxidation in humans. Liver Int 29:1439-1446.

Kouyama R, Suganami T, Nishida J, Tanaka M, Toyoda T, Kiso M, Chiwata T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Fukamizu A, Horiuchi M, Hirata Y, Ogawa Y (2005) Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. Endocrinology 146, 3481–3489.

Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. Cell 128(4): 693-705.

Krautler B (2005) Vitamin B12: chemistry and biochemistry. Biochemical Society transactions 33: 806-810.

Kruman II, Mouton PR, Emokpae R, JR, Cutler RG, Mattson MP (2005) Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. Neuroreport 16: 1055-1059.

Kudo H, Yata Y, Takahara T, Kawai K, Nakayama Y, Kanayama M, Oya T, Morita S, Sasahara M, Mann DA, Sugiyama T (2009) Telmisartan attenuates progression of steatohepatitis in mice: role of hepatic macrophage infiltration and effects on adipose tissue. Liver Int 29, 988–996.

Kuhn W, Roebroek R, Blom H, van Oppenraaij D, Przuntek H, Kretschmer A, Buttner T, Woitalla D, Muller T (1998) Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. European neurology 40: 225-227.

Kumthekar AA, Gidwani HV, Kumthekar AB (2012) Metformin associated B12 deficiency. The Journal of the Association of Physicians of India 60: 58-60.

Kuo CS, Lin CY, et al (2008) Relationship between folate status and tumour progression in patients with hepatocellular carcinoma. Br J Nutr 100(3): 596-602.

Kurikawa N, Suga M, Kuroda S, Yamada K, Ishikawa H (2003) An angiotensin II type 1 receptor antagonist, olmesartan medoxomil, improves experimental liver fibrosis by suppression of proliferation and collagen synthesis in activated hepatic stellate cells. Br. J. Pharmacol 139, 1085–1094.

Kurtz DM, Rinaldo P, Rhead WJ, Tian L, Millington DS, Vockley J, Hamm DA, Brix AE, Lindsey JR, Pinkert CA, O'Brien WE, Wood PA (1998) Targeted disruption of mouse long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene reveals crucial roles for fatty acid oxidation. Proc Natl Acad Sci U S A 95(26): 15592-7.

Kwon J, Lee SR, Yang KS, Ahn Y, Kim YJ, Stadtman ER, et al (2004) Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 16419-16424.

Lagiou P, Kuper H, Stuver SO, Tzonou A, Trichopoulos D, Adami HO (2000) Role of diabetes mellitus in the etiology of hepatocellular carcinoma. J Natl Cancer Inst 92: 1096-1099.

Lameira D, Lejeune S, Mourad JJ (2008) Le syndrome métabolique : son épidémiologie et ses risques Annales de dermatologie 135, supplément 4: S249-S253.

Langman LJ et Cole DEC (1999) Homocysteine: cholesterol of the 90s? Clinica chimica acta 286(1-2): 63-80.

Laraqui A, Allami A, Carrié A, Raisonnier A, Coiffard AS, Benkouka F, Bendriss A, Benjouad A, Bennouar N, El Kadiri N, Benomar A, Fellat S, Benomar M (2007) Relation between plasma homocysteine, gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes, and angiographically proven coronary artery disease. Eur J Intern Med 18(6): 474-483.

Leclercq I et Sempoux C (2006) Hepatopatie non alcoolique: de la steatose a la cirrhose. Acta Endoscopica 36: 299-314.

Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, Van Hul N, Geerts A (2007) Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. J Hepatol 47: 142-156.

Lee DY, TeyssierC, StrahlBD, StallcupMR (2005) Role of protein methylation in regulation of transcription. Endocr Rev 26(2): 147-170.

Lee KK et Workman JL (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. Nat Rev Mol Cell Biol 8(4): 284-95.

Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR (2009) Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. Liver Int 29(1): 113-9.

Lemoine M, Ratziu V, Kim M, Maachi M, Wendum D, Paye F, Bastard JP, Poupon R, Housset C, Capeau J, Serfaty L (2009) Serum adipokine levels predictive of liver injury in non-alcoholic fatty liver disease. Liver Int 29, 1431– 1438.

Levin J, Botzel K, Giese A, Vogeser M, Lorenzl S (2010) Elevated levels of methylmalonate and homocysteine in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and amyotrophic lateral sclerosis. Dementia and geriatric cognitive disorders 29: 553-559.

Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A (2002) Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Endocr Rev 23: 201-229.

Lewis JR et Mohanty SR (2010) Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. Dig Dis Sci 55: 560-578.

Liao J, Karnik R, Gu H, Ziller MJ, Clement K, Tsankov AM, et al (2015) Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. Nat. Genet 47, 469–478.

Lildballe DL, Mutti E, Birn H, Nexo E (2012) Maximal load of the vitamin B12 transport system: a study on mice treated for four weeks with high-dose vitamin B12 or cobinamide PloS one 7: e46657.

Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, et al (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. Science 341: 1237905.

Liu B, Lin Y, Darwanto A, Song X, Xu G, Zhang K (2009) Identification and characterization of propionylation at histone H3 lysine 23 in mammalian cells. J Biol Chem 284(47): 32288-95.

Liu L, Wise DR, Diehl JA, Simon MC (2008) Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival. J Biol Chem 283: 31153-1162.

Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. Cell 87: 565-576.

Loidl P (1994) Histone acetylation: facts and questions. Chromosoma 103(7): 441-9.

Loomba R, Sirlin CB, Schwimmer JB, Lavine JE (2009) Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 50: 1282-1293.

Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A (2005) Hepatic fibrosis : molecular mechanisms and drug targets. Ann Rev Pharmacol Toxicol 45.

Lubel JS, Herath CB, Burrell LM, Angus PW (2008) Liver disease and the renin-angiotensin system: recent discoveries and clinical implications. J Gastroenterol Hepatol 23: 1327-1338.

Lucock M (2000) Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. Mol Genet Metab 71(1-2): 121-38.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ (1980) Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc 55: 434-438.

Luger K et Richmond TJ (1998) The histone tails of the nucleosome. Curr Opin Genet Dev 8(2): 140-6.

MacSween RN et Burt AD (1986) Histologic spectrum of alcoholic liver disease. Semin Liver Dis 6: 221-232.

Madrazo JA et Kelly DP (2008) The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. J Mol Cell Cardiol 44: 968–975.

Maison P, Byrne CD, Hales CN, Day NE, Wareham NJ (2001) Do different dimensions of the metabolic syndrome change together over time? Evidence supporting obesity as the central feature. Diabetes Care 24(10): 1758-1763.

Makowski L, Noland RC, Koves TR, Xing W, Ilkayeva OR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Muoio DM (2009) Metabolic profiling of PPARalpha_/_ mice reveals defects in carnitine and amino acid homeostasis that are partially reversed by oral carnitine supplementation. FASEB J 23: 586–604.

Mantovani E, Filippini F, Bortolus R, Franchi M (2014) Folic acid supplementation and preterm birth: results from observational studies. Biomed Res Int 2014: 481914.

Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG (1999) Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. J Clin Endocrinol Metab 84: 1513-1517.

Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL (2008) Role of the renin–angiotensin system in vascular inflammation. Trends Pharmacol Sci 29, 367–374.

Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M (2003) Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatology 37: 917-923.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N (2001) Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes 50(8): 1844-50.

Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS (2002) NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. Hepatology 36: 1349-1354.

Martin YN, Salavaggione OE, Eckloff BW, Wieben ED, Schaid DJ, Weinshilboum RM (2006) Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. Pharmacogenet Genomics 16(4): 265-77.

Martinez-Chantar ML, Corrales FJ, Martínez-Cruz LA, García-Trevijano ER, Huang ZZ, Chen L, Kanel G, Avila MA, Mato JM, Lu SC (2002) Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. FASEB J 16(10): 1292-4.

Masalha R, Rudoy I, Volkov I, Yusuf N, Wirguin I, Herishanu YO (2002) Symptomatic dietary vitamin B(12) deficiency in a nonvegetarian population. Am J Med 112(5): 413-6.

Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA (1997) S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. Pharmacol Ther 73(3): 265-80.

Matthew Morris E, Fletcher JA, Thyfault JP, Rector RS (2013) The role of angiotensin II in nonalcoholic steatohepatitis. Mol Cell Endocrinol 378(1-2): 29-40.

Mattis AN, Song G, Hitchner K, Kim RY, Lee AY, Sharma AD, et al (2014) A screen in mice uncovers repression of lipoprotein lipase by microRNA-29a as a mechanism for lipid distribution away from the liver Hepatology.

McCullough A (2004) The epidemiology and risk factors of NASH. In Fatty liver disease: NASH and related disorders. Blackwell Publishing, Oxford.

McCaddon A, Davies G, Hudson P, Tandy S, Cattell H (1998) Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. International journal of geriatric psychiatry 13: 235-239.

McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison J (2008) Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptional and foetal nutrition. Basic & clinical pharmacology & toxicology 102(2): 82-9.

McMillen IC et Robinson JS (2005) Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. Physiological reviews 85(2): 571-633.

Mehta PK et Griendling, KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. Am. J. Physiol. Cell Physiol 292, C82–C97.

Meshkani R et Adeli K (2009) Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. Clin Biochem 42: 1331-1346.

Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM (2004) High-level multiplex genotyping of polymorphisms involved in folate or homocysteine metabolism by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Clin Chem 50(2): 391-402.

Micheau O et Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell 114: 181-190.

Mikael LG, Genest J, Rozen R (2006) Elevated homocysteine reduces apolipoprotein AI expression in hyperhomocysteinemic mice and in males with coronary artery disease. Circulation research 98(4): 564-571.

Mikael LG, Wang XL, Wu Q, Jiang H, Maclean KN, Rozen R (2009) Hyperhomocysteinemia is associated with hypertriglyceridemia in mice with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. Molecular genetics and metabolism 98(1-2): 187-194.

Mikol YB, Hoover KL, et al (1983) Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. Carcinogenesis 4(12): 1619-29.

Minucci S et Pelicci PG (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nat Rev Cancer 6(1): 38-51. Review.

Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. (2009) Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatol Res 39(4): 366-73.

Mittendorfer B, Magkos F, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S (2009) Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women. Obesity (Silver Spring) 17: 1872-1877.

Moggs JG, Goodman JI, Trosko JE, Roberts RA (2004) Epigenetics and cancer: implications for drug discovery and safety assessment. Toxicol Appl Pharmacol 196(3): 422-30.

Moller H, Mellemgaard A, Lindvig K, Olsen JH (1994) Obesity and cancer risk: a Danish recordlinkage study. Eur J Cancer 30A: 344-350.

Momparler RL et Bovenzi V (2000) DNA methylation and cancer. J Cell Physiol 183(2): 145-154.

Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, Yang W, Altshuler D, Puigserver P, Patterson N, Willy PJ, Schulman IG, Heyman RA, Lander ES,Spiegelman BM (2004) Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 101: 6570– 6575.

Moreno M, Ramalho LN, Sancho-Bru P, Ruiz-Ortega M, Ramalho F, Abraldes JG, Colmenero J, Dominguez M, Egido J, Arroyo V, Gines P, Bataller R (2009) Atorvastatin attenuates angiotensin II-induced inflammatory actions in the liver. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 296, G147–G156.

Morgan MY et Levine JA (1988) Alcohol and nutrition. Proc Nutr Soc 47(2): 85-98.

Mudd SH et Poole JR (1975) Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. Metabolism: clinical and experimental 24: 721-735.

Munshi MN, Stone A, Fink L, Fonseca V (1996) Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. Metabolism 45:133-135.

Murphy S, Martin S, Parton, RG (2009) Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. Biochim. Biophys. Acta 1791, 441–447.

Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, et al (2002) Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by TIMP-1 is mediated via effects on MMP inhibition : implications for reversibility of liver fibrosis. J Biol Chem 277: 11069-76.

Murray JA (1999) The widening spectrum of celiac disease. The American journal of clinical nutrition 69: 354-365.

Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Chayama K (2009) Deletion of angiotensin II type I receptor reduces hepatic steatosis. J. Hepatol 50, 1226– 1235.

Nag S, Khan MA, Samuel P, Ali Q, Hussain T (2015) Chronic angiotensin AT2R activation prevents high-fat diet-induced adiposity and obesity in female mice independent of estrogen. Metabolism 64(7): 814-25.

Najib S, Sanchez-Margalet V (2005) Homocysteine thiolactone inhibits insulin-stimulated DNA and protein synthesis: possible role of mitogen-activated protein kinase (MAPK), glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and p70 S6K phosphorylation. J Mol Endocrinol 34: 119-126.

Namekata K, Enokido Y, Ishii I, Nagai Y, Harada T, Kimura H (2004) Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. J Biol Chem 279(51): 52961-9.

Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Gueant J (2001) Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. Blood 97: 1092-1098.

Nassir F et Ibdah JA (2014) Role of mitochondria in alcoholic liver disease. World J Gastroenterol 20(9): 2136-42.

Nervo M, Lubini A, Raimundo FV, Faulhaber GA, Leite C, Fischer LM, Furlanetto TW (2011) Vitamin B12 in metformin-treated diabetic patients: a cross-sectional study in Brazil. Revista da Associacao Medica Brasileira 57: 46-49.

Neuschwander Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ et al (2014) Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoolic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial.

Ng HH, Feng , Wang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Zhang Y, Struhl K (2002) Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. Genes Dev 16(12): 1518-27.

Nicolas JP et Gueant JL (1994) Absorption, distribution and excretion of vitamin B12. Annales de gastroenterologie et d'hepatologie 30: 270-276, 281 ; discussion 281-272.

Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CB, Nexo E, Moestrup SK (2012) Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. Nature reviews Gastroenterology & hepatology 9: 345-354.

No authors listed (1991) Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin StudyResearch Group.
Lancet 338(8760): 131-7.

Norton VG, Imai BS, Yau P, Bradbury EM (1989) Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. Cell 57(3): 449-57.

Ogihara T, Asano T, Ando K, Chiba Y, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Katagiri H, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Komuro I, Fujita T (2002) Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. Hypertension 40, 872–879.

Oh SW, Yoon YS, Shin SA (2005) Effects of excess weight on cancer incidences depending on cancer sites and histologic findings among men: Korea National Health Insurance Corporation Study. J Clin Oncol 23: 4742-4754.

Ohshima K, Mogi M, Jing F, et al (2012) Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation ameliorates insulin resistance in type 2 diabetes mice with PPARgamma activation. PLoS One 7: e48387.

Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A, Castillo-Hernandez Jr (2009) Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. Mol. Cell. Endocrinol 302, 128–139.

O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ (2010) Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Alcoholic liver disease. Hepatology 51: 307-328.

Page JM et Harrison SA (2009) NASH and HCC. Clin Liv Dis 13:631-647.

Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sif S (2004) Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. Mol Cell Biol 24(21): 9630-45.

Palaniappan L, Carnethon MR, Wang Y, Hanley AJG, Fortmann SP, Haffner SM, Wagenknecht L (2004) Predictors of the incident metabolic syndrome in adults: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Diabetes Care 27(3): 788-793.

Pallottini V, Bulzomi P, Galluzzo P, Martini C, Marino M (2008) Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms. Infect Disord Drug Targets 8(1): 52-60.

Pellanda H, Forges T, Bressenot A, Chango A, Bronowicki JP, Guéant JL, Namour F (2012) Fumonisin FB1 treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat pregnancy to produce alterations of H3- and H4-histone methylation patterns in fetuses. Mol Nutr Food Res 56(6): 976-85.

Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blazquez C, Guzman M, Prats N, Xaus C, Cutillas B, Gelpi E, Rosello-Catafau J (2001) Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia reperfusion injury in the rat. Hepatology 34: 1164-1173.

Peralta C et Brenner C (2011) Endoplasmic reticulum stress inhibition enhances liver tolerance to ischemia/reperfusion. Curr Med Chem 18(13): 2016-24.

Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA (2003) Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 38: 999–1007.

Pessayre D et Fromenty B (2005) NASH: a mitochondrial disease. J Hepatol 42: 928 940.

Pfeifer GP et Rauch TA (2009) DNA methylation patterns in lung carcinomas. Seminars in cancer biology 19: 181-187.

Pflipsen MC, Oh RC, Saguil A, Seehusen DA, Seaquist D, Topolski R (2009) The prevalence of vitamin B(12) deficiency in patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. Journal of the American Board of Family Medicine : JABFM 22: 528-534.

Piedrahita JA, Oetama B, Bennett GD, van Waes J, Kamen BA, Richardson J, Lacey SW, Anderson RG, Finnell RH (1999) Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. Nat Genet 23(2): 228-32.

Pilette C, Fort J, Calès P (1998) Traitement pharmacologique de la fibrose hépatique: bientôt disponible? JL, volume5, numéro 3.

Pinzani M et Marra F (2001) Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. Semin Liver Dis 21 : 397-416.

Pirola CJ, Fernandez Gianotti T, Castano GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al (2014) Circulating microRNA signature in nonalcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. Gut.

Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E (2004) Modulation of insulin action. Diabetologia 47: 170- 84.

Pogribny IP, Starlard-Davenport A, Tryndyak VP, Han T, Ross SA, Rusyn I, et al (2010) Difference in expression of hepatic microRNAs miR-29c, miR-34a, miR-155, and miR-200b is associated with strain-specific susceptibility to dietary nonalcoholic steatohepatitis in mice. Lab. Invest 90: 1437–46.

Pogribny IP, Tryndyak VP, Muskhelishvili L, Rusyn I, Ross SA (2007) Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis. J Nutr 137(1 Suppl): 216S-222S.

Poirier LA (1994) Methyl group deficiency in hepatocarcinogenesis. Drug Metab Rev 26(1-2): 185-99.

Poirier LA, Brown AT, Fink LM, Wise CK, Randolph CJ, Delongchamp RR, Fonseca VA (2001) Blood Sadenosylmethionine concentrations and lymphocyte methylenetetrahydrofolate reductase activity in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. Metabolism 50: 1014-1018.

Poirier LA, Grantham PH, Rogers AE (1977) The effects of a marginally lipotrope-deficient diet on the hepatic levels of S-adenosylmethionine and on the urinary metabolites of 2 acetylaminofluorene in rats. Cancer research 37: 744-748.

Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, Giudicelli J, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Jeannesson E, Gueguen N, Bressenot A, Nicolas B, Malthiery Y, Daval JL, Peyrin-Biroulet L, Bronowicki JP, Gueant JL (2012) Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1alpha hypomethylation and decreased ER-alpha, ERR-alpha, and HNF-4alpha in the rat liver. Journal of hepatology 57: 344-351.

Popa SG et Moţa M (2007) Impact of obesity and omega-3 polyunsaturated fatty acids on fibrogenesis and responsiveness to antiviral therapy in chronic hepatitis C. Rom J Intern Med 45(2): 165-70. Review.

Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW (1990) The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. Hepatology 11: 74-80.

Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. Cell 127(5): 917-28.

Rafnsson SB, Saravanan P, Bhopal RS, Yajnik CS (2011) Is a low blood level of vitamin B12 a cardiovascular and diabetes risk factor? A systematic review of cohort studies. Eur J Nutr 50(2): 97-106.

Ramadori G, Saile B. Portal (2004) Tract fibrogenesis in the liver. Lab Invest 84: 153-9.

Rebuffé-Scrive M, Walsh UA, McEwen B, Rodin J (1992) Effect of chronic stress and exogenous glucocorticoids on regional fat distribution and metabolism. Physiol. Behav 52(3): 583-590.

Rector RS, Thyfault JP, Uptergrove GM, Morris EM, Naples SP, Borengasser SJ, et al (2010) Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. J Hepatol 52: 727-736.

Reddy JK et Rao MS (2006) Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: G852–G858.

Rinaudo P et Wang E (2012) Fetal programming and metabolic syndrome. Annu Rev Physiol 74: 107–130.

Robertson KD (2001) DNA methylation, methyltransferases, and cancer. Oncogene 20: 3139-3155.

Roblin X, Phelip JM, Genevois M, Ducros V, Bonaz B (2007 a) Hyperhomocysteinaemia is associated with osteoporosis in patients with Crohn's disease. Alimentary pharmacology & therapeutics 25: 797-804.

Roblin X, Pofelski J, Zarski JP (2007 b) Steatosis, chronic hepatitis virus C infection and homocysteine. Gastroenterologie clinique et biologique 31: 415-420.

Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P (2008) Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. FEBS Lett 582: 46–53.

Roh YS, Park S, Kim JW, Lim CW, Seki E, Kim B (2014) Toll-like receptor 7-mediated type I interferon signaling prevents cholestasis and hepatotoxin-induced liver fibrosis. Hepatology 60(1): 237-49.

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

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

Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA, Anderson RG (1990 a) Cholesterol controls the clustering of the glycophospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. J Cell Biol 111(6 Pt 2): 2931-8.

Rothberg KG, Ying YS, Kolhouse JF, Kamen BA, Anderson RG (1990 b) The glycophospholipid linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. J Cell Biol 110(3): 637-49.

Ruhl CE et Everhart JE (2003) Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States.Gastroenterology 124: 71-79.

Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM, Grunstein M (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. Proc Natl Acad Sci USA 93(25): 14503-8.

Russell-Jones GJ et Alpers DH (1999) Vitamin B12 transporters. Pharmaceutical biotechnology 12: 493-520.

Rutsch F, Gailus S, Miousse IR, Suormala T, Sagne C, Toliat MR, Nurnberg G, Wittkampf T, Buers I, Sharifi A, Stucki M, Becker C, Baumgartner M, Robenek H, Marquardt T, Hohne W, Gasnier B, Rosenblatt DS, Fowler B, Nurnberg P (2009) Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. Nature genetics 41: 234-239.

Saile B, Matthes N, Knittel T, Ramadori G (1999) Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. Hepatology 30: 196-202.

Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al (2001) Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. Gastroenterology 120: 1183-1192.

Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV et al (2010) Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. The New England Journal of Medicine 362 (18): 1675–1685.

Sato K, Cho Y, Tachibana S, Chiba T, Schneider WJ, Akiba Y (2005) Impairment of VLDL secretion by medium-chain fatty acids in chicken primary hepatocytes is affected by the chain length. J Nutr 135: 1636-1641.

Sawan C et Herceg Z (2010) Histone modifications and cancer. Adv Genet 70: 57-85.

Sawan C, Vaissiere T Murr R, Herceg Z (2008) Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. Mutat Res 642(1-2): 1-13.

Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA (2002) Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. Hepatology 35(4): 762-71.

Scalabrino G (2009) The multi-faceted basis of vitamin B12 (cobalamin) neurotrophism in adult central nervous system: Lessons learned from its deficiency. Prog Neurobiol 88(3): 203-20.

Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A (2005) Molecular mechanisms of insulin resistance. Diabet Med 22: 674-682.

Scholl TO et Johnson WG (2000) Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. Am J Clin Nutr 71(5 Suppl): 1295S-303S.

Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinec M, Oakeley EJ, Kralli A (2004) The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 6472–6477.

Schübeler D (2015) Function and information content of DNA methylation. Nature 517, 321 326.

Schultz MD, He Y, Whitaker JW, Hariharan M, Mukamel EA, Leung D, et al (2015) Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. Nature 523, 212–216.

Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG (2001) Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. Semin Liver Dis 21: 351-72.

Scott JM (1999) Folate and vitamin B12. The Proceedings of the Nutrition Society 58: 441-448.

Scott JM (2001) Evidence of folic acid and folate in the prevention of neural tube defects. Bibliotheca nutritio et dieta: 192-195.

Seetharam B, Bose S, Li N (1999) Cellular import of cobalamin (Vitamin B-12). The Journal of nutrition 129: 1761-1764.

Seetharam B et Li N (2000) Transcobalamin II and its cell surface receptor. Vitamins and hormones 59: 337-366.

Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K (2002) In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. J Hepatol 37: 56-62.

Selhub J (1999) Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr 19: 217-46.

Selhub J et Franklin WA (1984) The folate-binding protein of rat kidney. Purification, properties, and cellular distribution. J Biol Chem 259(10): 6601-6.

Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. JAMA 270(22): 2693 2698.

Selzner M et Clavien PA (2001) Fatty liver in liver transplantation and surgery. Semin Liver Dis 21: 105-13.

Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, et al (2002) Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. J Clin Endocrinol Metab 87: 3023-3028.

Sesso RM, Iunes Y, Melo AC (1999) Myeloneuropathy following nitrous oxide anesthaesia in a patient with macrocytic anaemia. Neuroradiology 41(8): 588-90.

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell 119(7): 941-53.

Shivapurkar N et Poirier LA (1983) Tissue levels of S-adenosylmethionine and S adenosylhomocysteine in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets for one to five weeks. Carcinogenesis 4: 1051-1057.

Shojania AM, Hornady G, Barnes PH (1968) Oral contraceptives and serum-folate level. Lancet 1(7556): 1376-7.

Shum M, Pinard S, Guimond MO, et al (2013) Angiotensin II type 2 receptor promotes adipocyte differentiation and restores adipocyte size in high-fat/high-fructose diet-induced insulin resistance in rats. Am J Physiol Endocrinol Metab 304: E197–210.

Sims RJ, 3rd, Nishioka N, Reinberg D (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. Trends Genet 19(11): 629-39.

Singh V, Miranda TB, Jiang W, Frankel A, Roemer ME, Robb VA, Gutmann DH, Herschman HR, Clarke S, Newsham IF (2004) DAL-1/4.1B tumor suppressor interacts with protein arginine N-methyltransferase 3 (PRMT3) and inhibits its ability to methylate substrates in vitro and in vivo. Oncogene 23(47): 7761-71.

Sirotnak FM et Tolner B (1999) Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. Annu Rev Nutr 19: 91-122.

Smith AD (2008) The worldwide challenge of the dementias: a role for B vitamins and homocysteine? Food and nutrition bulletin 29: S143-172.

Smith AD, Kim YI, Refsum H (2008) Is folic acid good for everyone? The American journal of clinical nutrition 87: 517-533.

Sorensen HT, Mellemkjaer L, Jepsen P, Thulstrup AM, Baron J, Olsen JH, Vilstrup H (2003) Risk of cancer in patients hospitalized with fatty liver: a Danish cohort study. J Clin Gastroenterol 36: 356-359.

Sorescu D et Griendling KK (2002) Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. Congest. Heart Fail 8, 132140.

Spahr L, Negro F, Leandro G, Marinescu O, Goodman KJ, Rubbia-Brandt L, et al (2003) Impaired hepatic mitochondrial oxidation using the 13C-methionine breath test in patients with macrovesicular steatosis and patients with cirrhosis.Med Sci Monit 9: CR6-11.

Spence JD, Bang H, Chambless LE, Stampfer MJ (2005) Vitamin Intervention For Stroke Prevention trial: an efficacy analysis. Stroke; a journal of cerebral circulation 36: 2404-2409.

Spiekerkoetter U (2010) Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: clinical presentation of long-chain fatty acid oxidation defects before and after newborn screening. J Inherit Metab Dis 33: 527–532.

Spinella MJ, Brigle KE, Sierra EE, Goldman ID (1995) Distinguishing between folate receptor alphamediated transport and reduced folate carrier-mediated transport in L1210 leukemia cells. J Biol Chem 270(14): 7842-7849.

Stabler SP et Allen RH (2004) Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. Annual review of nutrition 24: 299-326.

Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA (2010) Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. Hepatology 51: 1820-1832.

Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, Sipula IJ, Brown NF, O'Doherty RM (2008) A moderate increase in carnitine palmitoyltranferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. Am J Physiol Endocrinol Metab 294: E969-E977.

Steger DJ et Workman JL (1996) Remodeling chromatin structures for transcription: what happens to the histones? Bioessays 18(11): 875-84.

Stewart CP, Christian P, Schulze KJ, Arguello M, LeClerq SC, Khatry SK, West KP Jr (2011) Low maternal vitamin B-12 status is associated with offspring insulin resistance regardless of antenatal micronutrient supplementation in rural Nepal. J Nutr 141(10): 1912-7.

Stover PJ (2011) Polymorphisms in 1-carbon metabolism, epigenetics and folate-related pathologies. Journal of nutrigenetics and nutrigenomics 4: 293-305.

Strahl BD et Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. Nature 403(6765): 41-5.

Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA (1997) Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. Archives of biochemistry and biophysics 345: 171-174.

Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, Orlandoni P, Macarri G, Perego L, Benedetti A, Folli F (1999) Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. Hepatology 29(6): 1743-51.

Tacke F, Gabele E, Bataille F, Schwabe RF, Hellerbrand C, Klebl F, Straub RH, et al (2007) Bone morphogenetic protein 7 is elevated in patients with chronic liver disease and exerts fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. Dig Dis Sci 52: 3404-3415.

Takahashi N, Li F, Hua K, Deng J, Wang CH, Bowers RR, Bartness TJ, Kim HS, Harp JB (2007) Increased energy expenditure, dietary fat wasting, and resistance to diet-induced obesity in mice lacking renin. Cell Metab 6, 506–512.

Tamaki Y, Nakade Y, Yamauchi T, Makino Y, Yokohama S, Okada M, Aso K, Kanamori H, Ohashi T, Sato K, Nakao H, Haneda M, Yoneda M (2013) Angiotensin II type 1 receptor antagonist prevents hepatic carcinoma in rats with nonalcoholic steatohepatitis. J Gastroenterol 48(4): 491-503.

Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, et al (2001) Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. Nature 414: 313-317.

Tang M, Potter JJ, Mezey E (2002) Leptin enhances the effect of transforming growth factor beta in increasing type I collagen formation. Biochem Biophys Res Commun 297(4): 906-11.

Tanner SM, Li Z, Bisson R, Acar C, Oner C, Oner R, Cetin M, Abdelaal MA, Ismail EA, Lissens W, Krahe R, Broch H, Grasbeck R, de la Chapelle A (2004) Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B12: founder effects, consanguinity, and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East. Human mutation 23: 327-333.

Tanti JF et Jager J (2009) Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. Curr Opin Pharmacol 9:753-62.

Tarry-Adkins JL, Chen JH, Jones RH, Smith NH, Ozanne SE (2010) Poor maternal nutrition leads to alterations in oxidative stress, antioxidant defense capacity, and markers of fibrosis in rat islets: potential underlying mechanisms for development of the diabetic phenotype in later life. FASEB J 24: 2762–2771.

Taylor R (2008) Pathogenesis of type 2 diabetes: tracing the reverse route from cure to cause. Diabetologia 51(10): 1781-9.

Tedeschi PM, Markert EK, Gounder M, Lin H, Dvorzhinski D, Dolfi SC, Chan LL, Qiu J, DiPaola RS, Hirshfield KM, Boros LG, Bertino JR, Oltvai ZN, Vazquez A (2013) Contribution of serine, folate and glycine metabolism to the ATP, NADPH and purine requirements of cancer cells. Cell Death Dis (4): e877.

Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP (1995) The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. Hepatology 22: 1714-1719.

Teoh N, Field J, Farrell G (2006) Interleukin-6 is a key mediator of the hepatoprotective and proproliferative effects of ischaemic preconditioning in mice. J Hepatol 45: 20-27.

Teyssier C, Ma H, Emter R, Kralli A, Stallcup MR (2005) Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1α by arginine methylation. Genes Dev 19: 1466–1473.

Thorens B (2015) GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. Diabetologia 58: 221-232.

Tiikkainen M, Hakkinen AM, Korsheninnikova E, Nyman T, Makimattila S, Yki- arvinen H (2004) Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. Diabetes 53: 2169-2176.

Tilg H et Hotamisligil GS (2006) Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. Gastroenterology 131: 934-945.

Tilg H et Moschen AR (2010) Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. Hepatology 52: 1836-1846.

Toblli JE, Munoz MC, Cao G, Mella J, Pereyra L, Mastai R (2008) ACE inhibition and AT1 receptor blockade prevent fatty liver and fibrosis in obese Zucker rats. Obesity (Silver Spring) 16, 770–776.

Tognini P, Napoli D, Pizzorusso T (2015) Dynamic DNA methylation in the brain: a new epigenetic mark for experience-dependent plasticity. Front Cell Neurosci 9: 331.

Toth C, Breithaupt K, Ge S, Duan Y, Terris JM, Thiessen A, Wiebe S, Zochodne DW, Suchowersky O (2010) Levodopa, methylmalonic acid, and neuropathy in idiopathic Parkinson disease. Annals of neurology 68: 28-36.

Trippett TM, Garcia S, Manova K, Mody R, Cohen-Gould L, Flintoff W, Bertino JR (2001) Localization of a human reduced folate carrier protein in the mitochondrial as well as the cell membrane of leukemia cells. Cancer Res 61(5): 1941-7.

Tryndyak V, Kovalchuk O, Pogribny IP (2006) Identification of differentially methylated sites within unmethylated DNA domains in normal and cancer cells. Anal. Biochem 356: 202–7.

Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ (2006) The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. Am J Gastroenterol 101: 2629-2640.

Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ (2009) Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. Mediators Inflamm 831670.

Tsukamoto H et Lu SC (2001) Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. FASEB J 15: 1335 1349.

Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE (2000) The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. The American journal of clinical nutrition 72: 324-332.

Unger RH (2002) Lipotoxic diseases. Annu Rev Med 53: 319-36.

van der Leij FR, Bloks VW, Grefhorst A, Hoekstra J, Gerding A, Kooi K, Gerbens F, te Meerman G, Kuipers F (2007) Gene expression profiling in livers of mice after acute inhibition of betaoxidation. Genomics 90: 680–689.

van der Put NM et Blom HJ (2000) Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology 92: 57-61.

VanAerts LA, Poirot CM, Herberts CA, Blom HJ, De Abreu RA, Trijbels JM, Eskes TK, Peereboom-Stegeman JH, Noordhoek J (1995) Development of methionine synthase, cystathionine-beta-synthase and S-adenosyl-homocysteine hydrolase during gestation in rats. J Reprod Fertil 103(2): 227-32.

Vandermeers F, Kettmann F, Willems L (2008) Implication des modifications épigénétiques dans les cancers: développement de nouvelles approaches thérapeutiques. BiotechnolAgronSoc Environ 12 (2) 211-218.

VanSaun MN, Lee IK, Washington MK, Matrisian L, Gorden DL (2009) High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. Am J Pathol 175: 355-64.

Varley KE, Gertz J, Bowling KM, Parker SL, Reddy TE, Pauli-Behn F, et al (2013) Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. Genome Res 23, 555–567.

Vaz FM et Wanders RJA (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. Biochem J 361: 417–429.

Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, Petrasek J, Kodys K, Mandrekar P, Szabo G (2009) VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. Hepatology 49: 989-997.

Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2008) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1α. Cardiovasc Res 79: 208–217.

Vernon G, Baranova A, Younossi ZM (2011) Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. Aliment Pharmacol Ther 34(3): 274-85.

Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J (2004) Oxidative stress and depletion of hepatic longchain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. Free Radic Biol Med 37: 1499-1507.

Videla LA, Tapia G, Rodrigo R, Pettinelli P, Haim D, Santibanez C, Araya AV, et al (2009) Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients. Obesity Silver Spring 17: 973-979.

Villena JA et Kralli A (2008) ERR alpha: a metabolic function for the oldest orphan. Trends in Endocrinology & Metabolism 19(8): 269-276.

Viogt MN, Clarke JD, Jain AV, Ayres JC, Koehler PE, Hatch RC (1981) Abnormal concentrations of B vitamins and amino acids in plasma and B vitamins in bile of rabbits with aflatoxicosis. Appl Environ Microbiol 41(4): 919-23.

Wald DS, Law M, Morris JK (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. Bmj 325: 1202.

Walkinshaw DR, Tahmasebi S, Bertos NR, Yang XJ (2008) Histone deacetylases as transducers and targets of nuclear signaling. J Cell Biochem 104(5): 1541-52.

Waly MI, Kharbanda KK, Deth RC (2011) Ethanol lowers glutathione in rat liver and brain and inhibits methionine synthase in a cobalamin-dependent manner. Alcohol Clin Exp Res 35(2): 277-83.

Wang SL, Yang CQ, Qi XL, Yuan M, Chang YZ, Yang L, Gao HJ (2013) Inhibitory effect of bone morphogenetic protein-7 on hepatic fibrosis in rats. Int J Clin Exp Pathol 6: 897-903.

Wang Y, Zhao R, Russell RG, Goldman ID (2001) Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. Biochimica et biophysica acta 1513: 49-54.

Wanless IR, Albrecht S, Bilbao J, Frei JV, Heathcote EJ, Roberts EA, et al (1989) Multiple focal nodular hyperplasia of the liver associated with vascular malformations of various organs and neoplasia of the brain: a new syndrome. Mod Pathol 2: 456-462.

Wanless IR et Lentz JS (1990) Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. Hepatology 12: 1106-1110.

Wanless IR et Shiota K (2004) The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. Semin Liver Dis 24: 99-106.

Waterland RA et Michels KB (2007) Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. Annu Rev Nutr 27: 363-88.

Watkins D et Rosenblatt DS (1989) Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. American journal of medical genetics 34: 427-434.

Watkins D et Rosenblatt DS (2011) Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics 157: 33-44.

Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR (2008 c) Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol 294, R673–R680.

Wei Y, Clark SE, Morris EM, Thyfault JP, Uptergrove GM, Whaley-Connell AT, Ferrario CM, Sowers JR, Ibdah JA (2008 a) Angiotensin II-induced nonalcoholic fatty liver disease is mediated by oxidative stress in transgenic TG(mRen2)27(Ren2) rats. J. Hepatol 49, 417–428.

Wei Y, Sowers JR, Clark SE, Li W, Ferrario CM, Stump CS (2008 b) Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF-kappaB activation via NADPH oxidase. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab 294, E345–E351.

Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM, Clark SE, Morris EM, Szary N, Manrique C, Stump CS (2006) Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. J. Biol. Chem 281, 35137–35146.

Weickert MO et Pfeiffer AF (2006) Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. Diabetologia 49: 1732-1741.

Weidemann A et Johnson RS (2008) Biology of HIF-1alpha. Cell Death Differ 15: 621 627.

Weingartner J, Lotz K, Fanghanel J, Gedrange T, Bienengraber V, Proff P (2007) Induction and prevention of cleft lip, alveolus and palate and neural tube defects with special consideration of B vitamins and the methylation cycle. Journal of orofacial orthopedics = Fortschritte der Kieferorthopadie : Organ/official journal Deutsche Gesellschaft fur Kieferorthopadie 68: 266-277.

Welboren WJ, Sweep FC, Span PN, Stunnenberg HG (2009) Genomic actions of estrogen receptor α: what are the targets and how are they regulated? Endocrine-related cancer 16(4): 1073-1089.

Welzel TM, Katki HA, et al (2007) Blood folate levels and risk of liver damage and hepatocellular carcinoma in a prospective high-risk cohort. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16(6): 1279-82.

Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguère V, Kelly DP (2005) PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. Mol. Cell. Biol 25: 10684–10694.

Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC (2001) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. Journal of Clinical Investigation 107(10): 1263-1292.

Weston SR, Leyden W, Murphy R, Bass NM, Bell BP, Manos MM, Terrault NA (2005) Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. Hepatology 41: 372-379.

Wideroff L, Gridley G, Mellemkjaer L, Chow WH, Linet M, Keehn S, et al (1997) Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. J Natl Cancer Inst 89: 1360-1365.

Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE (2008) Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. Am. J. Gastroenterol 103, 1372–1379.

Wiklund O, Fager G, Andersson A, Lundstam U, Masson P, Hultberg B (1996) N-acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels. Atherosclerosis 119: 99-106.

Wilcken DE et Wilcken B (1976) The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. J Clin Invest 57(4):1079-82.

Wilcken DE et Wilcken B (1997) The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment. Journal of inherited metabolic disease 20(2): 295-300.

Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, Harrison SA (2011) Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. Gastroenterology 140, 124–131.

Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R (1999) A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. Mol Genet Metab 67(4): 317-23.

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

Wolk A, Gridley G, Svensson M, Nyren O, McLaughlin JK, Fraumeni JF, et al (2001) A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). Cancer Causes Control 12:13-21.

Worm J, Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, Guldberg P (2001) Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells. J Biol Chem 276(43): 39990-40000.

Xie W, Barr CL, Kim A, Yue F, Lee AY, Eubanks J, et al (2012) Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome. Cell 148, 816–831.

Yadav A, Saini V, Arora S (2010) MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. Clin. Chim. Acta 411, 1570–1579.

Yajnik CS et Deshmukh US (2012) Fetal programming: maternal nutrition and role of one-carbon metabolism. Rev Endocr Metab Disord 13: 121-127.

Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, Refsum H, Rao S, Fisher DJ, Bhat DS, Naik SS, Coyaji KJ, Joglekar CV, Joshi N, Lubree HG, Deshpande VU, Rege SS, Fall CH (2008) Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. Diabetologia 51: 29–38.

Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al (2013) Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. Clin. Chim. Acta 424: 99–103.

Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzmán M, Brownlee M (2001) Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. J Biol Chem 276(27): 25096 100.

Yamanishi M, Vlasie M, Banerjee R (2005) Adenosyltransferase: an enzyme and an escort for coenzyme B12? Trends in biochemical sciences 30: 304-308.

Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, et al (2007) Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. Nat Med 13: 332-339.

Yang IV et Schwartz DA (2011) Epigenetic control of gene expression in the lung. Am J RespirCrit Care Med 183: 1295-1301.

Yao R, Nimec Z, Ryan TJ, Galivan J (1996) Identification, cloning, and sequencing of a cDNA coding for rat gamma-glutamyl hydrolase. J Biol Chem 271(15): 8525-8.

Yew NS, Zhao H, Hong EG, Wu IH, Przybylska M, Siegel C, Shayman JA, Arbeeny CM, Kim JK, Jiang C, Cheng SH (2010). Increased hepatic insulin action in diet-induced obese mice following inhibition of glucosylceramide synthase. PLoS ONE 5, e11239.

Yokohama S, Tokusashi Y, Nakamura K et al (2006) Inhibitory effect of angiotensin II receptor antagonist on hepatic stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis. World Journal of Gastroenterology 12(2): 322–326.

Yokohama S, Yoneda M, Haneda M et al (2004) Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 40 (5) : 1222–1225.

You M, Considine RV, Leone TC, Kelly DP, Crabb DW (2005) Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. Hepatology 42: 568-577.

Yvan-Charvet L, Even P, Bloch-Faure M, Guerre-Millo M, Moustaid-Moussa N, Ferre P, Quignard-Boulange A (2005) Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes 54, 991–999.

Yvan-Charvet L et Quignard-Boulange A (2011) Role of adipose tissue renin– angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. Kidney Int 79, 162 168.

Zhang D, Liu ZX, Choi CS, Tian L, Kibbey R, Dong J et al (2007) Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. Proc Natl Acad Sci USA 104: 17075-17080.

Zhang XM, Huang GW, Tian ZH, Ren DL, Wilson JX (2009) Folate stimulates ERK1/2 phosphorylation and cell proliferation in fetal neural stem cells. Nutritional neuroscience 12: 226-232.

Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID (2011) Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. Annu Rev Nutr 31: 177-201.

Zhao R, Matherly LH, Goldman ID (2009) Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. Expert Rev Mol Med 11: e4.

Zhou MS, Liu C, Tian R, Nishiyama A, Raij L (2015) Skeletal muscle insulin resistance in salt-sensitive hypertension: role of angiotensin II activation of NFkappaB. Cardiovasc Diabetol 14: 45.

Ziller MJ, Müller F, Liao J, Zhang Y, Gu H, Bock C, et al (2011) Genomic distribution and inter sample variation of non-CpG methylation across human cell types. PLoS Genet 7: e1002389.

Résumé : L'influence de l'hypothèse de la programmation fœtale sur la stéato-hépatite non-alcoolique (NASH) n'a pas été suffisamment étudiée. La carence en donneurs de méthyles pendant la grossesse et l'allaitement est fréquente dans la population et est un modèle expérimental de programmation fœtale. Dans ce modèle, elle entraîne une stéatose hépatique chez les ratons de 21 jours, résultant notamment d'une déficience de l'oxydation des acides gras. Nous avons évalué les effets de la programmation fœtale sur la NASH chez des rats Wistar nés de mères recevant soit un régime standard, soit un régime carencé en donneurs de méthyles (iMDD), pendant la gestation et l'allaitement. Les ratons sevrés ont ensuite reçu un régime standard (D21 à D50), puis une partie de ces rats devenus adultes ont ensuite été soumis à un régime hyper-énergétique (HF) (D50 à D185). Les animaux ont été sacrifiés à D50 et D185.
Nous avons observé une augmentation de la graisse abdominale et du rapport ASAT/ALAT, mais aucune anomalie histologique hépatique chez les rats D50 iMDD. En revanche, les rats D185 iMDD/HF ont développé une NASH, avec les caractéristiques d'une insulino-résistance ainsi qu'une augmentation de l'expression de nombreux gènes et protéines impliqués dans l'inflammasome, l'activation des cellules étoilées hépatiques, la fibrose et le remodelage tissulaire, incluant l'AngII, TGFβ1 et NFκB.
En conclusion, la carence en donneurs de méthyles pendant la gestation et l'allaitement produit une NASH chez des animaux soumis ultérieurement à un régime hyper-énergétique à l'âge adulte, malgré le retour préalable à une alimentation standard. Ces résultats suggèrent qu'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles est un facteur de risque de NASH chez les individus exposés ultérieurement à un régime hyper-énergétique.

Mots-clés : Carence en donneurs de méthyles - Programmation fœtale - Epigénomique - Stéatose - Stéato-hépatite.

Summary: The influence of fetal programming hypothesis on non-alcoholic steato-hepatitis (NASH) has deserved insufficient interest. Methyl donor deficiency during pregnancy and lactation is frequent in population and is an experimental model of fetal programming. In this model, it produces a liver steatosis in 21 days old pups, which results from decreased fatty acid oxidation. We evaluated the effects of fetal programming on NASH in Wistar rats born from mothers fed either a control or a methyl donor deficient (iMDD) diet during pregnancy and lactation. Pups received a control diet after weaning (D21 to D50) and a part from adult rats were fed with an high-fat diet (HF) (D50 to D185). Animals were sacrificed at D50 and D185.
In D50 iMDD rats, we observed an increased abdominal fat and ASAT/ALAT ratio, but no liver histological abnormality. However, D185 iMDD/HF rats have developed NASH, with hallmarks of insulin resistance and increased expression of several genes and proteins involved in inflammasome, stellate cell stimulation, fibrosis and tissu remodelling, including AngII, TGFβ1 and NFκB.
In conclusion, MDD during pregnancy and lactation produces NASH in animals subjected subsequently to an high-fat diet during adulthood, despite the recovery of a control diet. These results suggest that MDD during pregnancy is a risk factor of NASH development in subjects subsequently exposed to high-fat diet.

Keywords: Methyl donor deficiency - Fetal programming - Epigenomics - Steatosis - Steato-hepatitis.