



HAL
open science

Etude des mécanismes physiopathologiques à l'origine des dysfonctionnements du système nerveux central associés aux maladies rares du métabolisme de la vitamine B12 et innovation thérapeutique

Ziad Hassan

► **To cite this version:**

Ziad Hassan. Etude des mécanismes physiopathologiques à l'origine des dysfonctionnements du système nerveux central associés aux maladies rares du métabolisme de la vitamine B12 et innovation thérapeutique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0232 . tel-03664773

HAL Id: tel-03664773

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03664773v1>

Submitted on 7 Dec 2022

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Ecole doctorale BioSE (Biologie-Santé- Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par **Ziad HASSAN**

Etude des mécanismes physiopathologiques à l'origine des dysfonctionnements du système nerveux central associés aux maladies rares du métabolisme de la vitamine B12 et innovation thérapeutique.

Le 17 décembre 2021

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme Marie-Pierre Moisan	DR, INRA 1286, Bordeaux
M Jean-Christophe CASSEL	PU-PH, UMR CNRS 7365, Strasbourg

Examineurs :

Mme Stéphanie GRANDEMANGE	PU, UMR CNRS-UL 7039, Nancy
M Gregory POURIÉ	MCF, UMRS Inserm-UL 1256, Nancy (Directeur de thèse)

Membres invités :

M David COELHO	CRCN Inserm, UMRS Inserm-UL 1256, Nancy (Co-directeur de thèse)
M David MOULIN	CRCN CNRS, UMR CNRS-UL 7365, Nancy
M Jean-Louis GUEANT	PU-PH, UMRS Inserm-UL U1256, Nancy (Directeur de laboratoire, U1256)

UMRS 1256 INSERM, Laboratoire de nutrition, génétique et exposition aux risques environnementaux, 9 avenue de la Forêt de Haye-Faculté de médecine 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

Remerciements

A Monsieur Jean-Louis Guéant,

Directeur de l'Unité Inserm U1256 NGERE et Professeur de l'UL.

Pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire, pour vos nombreux conseils et votre suivi tout au long de ma thèse. Ce fut une véritable chance de pouvoir profiter de votre expertise. Vous avez inspiré l'étude de l'utilisation des agonistes de SIRT1 pour le traitement des maladies rares du métabolisme de la vitamine B12.

A Monsieur Gregory Pourié, mon directeur de thèse.

De m'avoir donné l'opportunité de poursuivre en thèse, pour ton encadrement durant ces trois ans, mais surtout pour m'avoir transmis ta passion des neurosciences. Ton côté pédagogue m'a énormément apporté durant cette thèse. Tes précieux conseils m'ont permis de mener à bien ce travail. Je t'en remercie très sincèrement.

A Monsieur David Coelho, mon co-directeur de thèse.

Pour tous tes encouragements, pour la confiance que tu m'as accordé dès le début, mais surtout pour ta disponibilité permanente dès que j'en ai eu besoin. Je te remercie aussi sincèrement pour ton soutien que ce soit sur le plan personnel ou professionnel. J'ai été ravi et chanceux de pouvoir travailler à tes côtés. A travers tes connaissances et ton esprit scientifique tu as su m'enseigner ce qu'était un chercheur passionné.

A Monsieur Jean-Christophe Cassel, Professeur de l'Université de Strasbourg.

De l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être rapporteur de ma thèse et de mon comité de suivi. Merci pour votre expertise et vos précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

A Madame Marie-Pierre Moisan, Directeur de recherche à l'Université de Bordeaux.

De l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être rapporteur de cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma considération.

A **Madame Stéphanie Grandemange**, Professeur de l'UL.

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse. Pour vos conseils et les discussions scientifiques enrichissantes que j'ai partagées avec vous. Je suis très ravi de finir la thèse en discutant avec vous de mon travail de trois ans.

A **Monsieur David Moulin**, Chargé de recherche CNRS à l'UL.

Je vous remercie profondément pour l'honneur que vous m'a fait d'avoir accepté d'être membre de mon jury et de mon comité de suivi de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect et de ma plus vive reconnaissance.

A **Madame Carine Bossenmeyer-Pourié**, Professeur de l'UL.

Pour vos précieux conseils et votre implication dans mes travaux de thèse. Pour vos brillantes idées mais aussi pour m'avoir accueilli durant mon stage de M2 et m'avoir fait découvrir l'Unité.

A **Monsieur David Meyre**, Co-directeur de l'Unité Inserm U1256 NGERE.

Pour votre bonne humeur permanente et vos nombreux conseils en particulier concernant l'après thèse.

A **Monsieur Christo Christov**, Professeur de l'UL.

Pour l'analyse des images dans l'étude de la morphologie mitochondriale, votre gentillesse, votre bonne volonté et votre disponibilité.

Je tiens à exprimer sincèrement ma profonde gratitude envers **Jean-Marc Alberto**, sans toi et sans ton intervention les choses deviennent très difficiles.

Je remercie **Aurélie Robert**, la personne la plus passionnée par son travail. J'étais content de travailler avec toi dans la même équipe. Un grand merci à **Rémy Umoret** aussi pour ton soutien et ton aide pour les tests comportementaux.

Un grand merci aussi à tous les collègues, ami(e)s et membres de l'unité 1256 : **Racha** tu m'as pris par la main jusqu'à ce que je sois autonome, je te serai reconnaissant pour toujours. « My Sista » **Viola** thank you for being around me, **Tunay** pour ta bonne

humeur, **Rashka** et **Pauline Renard** pour votre gentillesse, **Maelle** mon amie depuis le Master pour ta bienveillance infinie, **Benjamin** pour ton aide mec.

Karim et Youssef, « Les bros », merci d'avoir transformé les moments difficiles en moments plus faciles, en s'échappant mutuellement dans le bureau des uns ou des autres à chaque fois. Je vous aime les amis.

Ramia merci d'être là quand j'en avais besoin, **Basma** et **Camille** pour les bons moments au bureau, **Céline, Aline, Brigitte, Amélia, Audrey, Jérémie, Pauline D., Manon, Pierre....**

A tous, je vous suis très reconnaissant de votre contribution à mes travaux de recherche et à ma période au laboratoire durant ces 3 années.

Merci infiniment à ma famille d'être toujours là pour moi, **Mama Samira, Baba, Moussa et Rim** ! Cette thèse, je vous la dédie. Je ne pourrais JAMAIS assez vous remercier pour tout ce que vous faites pour moi ! Votre présence dans ma vie, votre patience, votre soutien et vos encouragements m'ont permis de tenir bon et surmonter les différentes épreuves tout au long de mon doctorat. Kel shi 3melto w lah a3mlo krmelkon ento then krmele.

A ma Famille Nancéenne, merci pour votre générosité introuvable ailleurs, merci pour les souvenirs inoubliables : ma famille de cœur (**Souha, abou Bilal, Nour et Dina**), ma collègue **Sara Nahle** la positivité, l'énergie et le soutien infini, **Hassuneeh** l'ami d'enfance, **Farhat** khaye l aslee, **Jano** la plus belle voisine, **Khaled H.** Ebn l amm, **Sara Elhaj** Atyab aleb, **Amani** tu as été un vrai support, **Rayane O.** l'amie des beaux voyages, **Sara Y., Wael, Jizzine, Hussayne, Mira, Omar, Julie, Ahmad, Rami, Taha** « ya m3allem », j'avais besoin de ces moments FOUS et inoubliables qu'on a passés haha.

Les amis overseas, au **Liban** et dans mon petit village **Akroum**, vous faites partie de mon enfance, de mes souvenirs et êtes dans mon cœur, Ekhwetee bhebkon.

Enfin, un profond merci à mes amis d'ici et d'ailleurs et à toutes les personnes que j'aurais oublié par mégarde mais qui se reconnaîtront.

À ma famille...

Publications et communications

Publications

- **Ziad Hassan**, David Coelho*, Tunay Kokten, Jean-Marc Alberto, Rémy Umoret, Daval JL, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourie, Grégory Pourie*. Brain susceptibility to methyl donor deficiency from fetal programming to aging outcome in rats.

Publié dans International Journal of Molecular Sciences, 2019. (IF=4.183)

- Charif Rashka, Sébastien Hergalant, Abderrahim Oussalah, Yuri Motorin, **Ziad Hassan**, Matthias R. Baumgartner, David S. Rosenblatt, François Feillet, Jean-Louis Guéant, David Coelho.

Transcriptomic analysis of fibroblasts from patients with cblC and cblG inherited defects of cobalamin metabolism reveals global dysregulation of alternative splicing.

Publié dans Journal of Human Molecular Genetics, 2020. (IF=4.544)

Deux articles sont en cours de préparation. Ils portent sur les aspects suivants :

- Pharmacological activation of SIRT1 restores the structural and functional alterations of mitochondria associated with inherited cobalamin disorders.
- The brain knock-down of methionine synthase (*Mtr*) leads to neuro-cognitive defects: a mouse model for the CNS one-carbon metabolism related diseases.

Communications orales

02th Juin 2021

Ziad Hassan, David Coelho, Grégory Pourié.

“Study of the molecular mechanisms at the origin of the neurocognitive impairment associated with rare genetic diseases of vitamin B12 metabolism and therapeutic innovation”.

Journée de l'école doctorale BIOSE, Vandoeuvre-les-Nancy, France.

12th Septembre 2021

Ziad Hassan, David Coelho, Grégory Pourié.

“Mitochondrial dysfunction associated with cbIC and cbIG inherited defects of cobalamin metabolism fibroblasts can be corrected by the SIRT1 activating compound SRT2104”.

13th International Conference One-Carbon Metabolism, B Vitamins and Homocysteine, Poznań, Pologne.

12th Septembre 2021

Manon Jeandel, David Coelho, **Ziad Hassan**, Rémy Umoret, Jean-Louis Guéant, Grégory Pourié.

“Prenatal administration of SRT2104, a SIRT1 activating compound, reduces the cognitive defects associated with methionine synthase deficiency in mice”.

13th International Conference One-Carbon Metabolism, B Vitamins and Homocysteine, Poznań, Pologne.

Communications affichées

21th Novembre 2019

Ziad Hassan, David Coelho, Grégory Pourié.

“Study of the molecular mechanisms at the origin of the neurocognitive impairment associated with rare genetic diseases of vitamin B12 metabolism and therapeutic innovation”.

Journée de l'école doctorale BIOSE, Vandoeuvre-les-Nancy, France.

28th Fevrier 2020

Ziad Hassan, David Coelho, Grégory Pourié.

« Etude des mécanismes physiopathologiques à l'origine des dysfonctionnements du système nerveux central associés aux maladies rares du métabolisme de la vitamine B12 et innovation thérapeutique ».

Fondation Maladies Rares (FMR), Strasbourg, France.

17th Aout 2020

Ziad Hassan, Rémy Umoret, Aurélie Robert, Carine Bossenmeyer-Pourié, Carole Arnold, Lu Peng, Jean-Louis Guéant, David Coelho, Grégory Pourié.

“Pharmacological inhibition of endoplasmic reticulum stress improves the neurocognitive disorders associated with impaired vitamin B12 metabolism in a Mtr KO neuron-specific mouse model”.

Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), Bethesda, United states.

18th Octobre 2021

Ziad Hassan, Grégory Pourié, Christo Christov, Jean-Louis Guéant, David Coelho.

“Mitochondrial dysfunction associated with cblC and cblG inherited defects of cobalamin metabolism fibroblasts can be corrected by the SIRT1 activating compound SRT2104”.

Automne School FASEB, online.

14th Octobre 2021

Manon Jeandel, David Coelho, **Ziad Hassan**, Rémy Umoret, Jean-Louis Guéant, Grégory Pourié.

« L'administration prénatale de SRT2104, un activateur de SIRT1, réduit les défauts cognitifs associés au déficit en méthionine synthase chez la souris ».

Congrès des Rencontres RARE 2021, Paris, France.

Table des matières

Publications et communications	8
Liste des figures	16
Liste des tableaux	18
Liste des abréviations	21
Introduction et Bibliographie	1
I. La vitamine B12 (Généralités)	2
1. La Vitamine B12 ou cobalamine (Définition et structure).....	2
1.1 Définition	2
1.2 Structure chimique	3
1.3 Métabolisme intracellulaire de la vitamine B12	3
2. Carence en vitamine B12, manifestations cliniques et traitements.....	5
2.1 Déficit d'apport	5
2.2 Défauts génétiques du métabolisme de la cbl.....	5
2.3 Manifestations cliniques et traitements classiques actuels	6
3. Métabolisme de la vitamine B12 et pathologies affectant le système nerveux central	7
4. Conséquences cellulaire et moléculaire des dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12.....	8
II. Stress oxydatif	8
1. Définition du stress oxydatif	8
2. Dommages oxydatifs et réparation	9
2.1 Oxydation des protéines.....	10
2.2 Oxydation de lipides.....	10
2.3 Acide nucléique.....	10
3. Rôle de la mitochondrie.....	11
4. Défense antioxydante	12
5. Troubles neurologiques	13
III. Stress du réticulum endoplasmique	13
1. Mécanismes du stress du RE	13
1.1 IRE1a.....	15
1.2 PERK.....	15
1.3 ATF6	15
2. Réponses au stress du RE	17
2.1 Stress du RE et NfKB	17

2.2. Stress du RE et apoptose	17
3. Stress du RE et pathologies	18
3.1. Stress du RE et longévité.....	18
3.2. Stress du RE et cerveau	18
4. SIRT1 et ER stress.....	20
4.1 SIRT1 et longévité.....	20
4.2 SIRT1 et régulation du métabolisme	23
4.3 SIRT1 et autophagie	24
IV. Activateurs SIRT1	25
1. Resvératrol	25
2. Les STACs.....	26
Aspects neurologiques dans le cadre des maladies rares du métabolisme de la Cbl 28	
V. L'hippocampe (Généralité et anatomie).....	29
VI. Plasticité synaptique	30
1. Généralités.....	30
2. Les acteurs de la plasticité synaptique	31
3. Conséquences de l'altération de la plasticité	32
VII. Travaux antérieurs du laboratoire sur les conséquences de la diminution de l'expression de SIRT1 dans les altérations du métabolisme de la vitamine B12 33	
1. Rôle de SIRT1 et de PGC-1 α dans les dérèglements métaboliques dans le foie, le cœur et le cerveau dans les modèles de carence en B12 et B9, et les modèles de maladies héréditaires.....	33
2. Le rôle du stress du réticulum endoplasmique, de la diminution de SIRT1 et de la modification de la navette nucléo-cytoplasmique des ARNm.....	36
Objectifs.....	41
Résultats I.....	44
1. Stress oxydatif et mesure des espèces réactives à l'oxygène.....	46
2. Etude de la physiologie mitochondriale (stress oxydant, morphologie et potentiel membranaire) :	48
2.1. Evaluation du stress oxydant mitochondrial.....	48
2.2. Etude de la morphologie mitochondriale	50
2.3. Etude du potentiel membranaire mitochondrial.....	52
3. Stress du réticulum endoplasmique	54
4. Sélection <i>in vitro</i> de l'activateur de SIRT1.....	63
4.1 Mesure de l'activation de SIRT1 par différents STACs <i>in vitro</i>	63
4.2 Etude de la toxicité des différents SRTs sur différentes lignées de fibroblastes	65

4.3 Expression d'un marqueur du stress du RE dans les fibroblastes : la protéine chaperonne Bip	67
4.4 Etude de l'effet de SRTs testés sur l'expression de Bip et le stress du réticulum endoplasmique	68
4.5 Effets du traitement sur la viabilité cellulaire :	71
5. Étude de l'effet de nos traitements sur la physiologie mitochondriale dans les cellules de patients cblC et cblG :	72
5.1 Effet des traitements sur le stress oxydant mitochondrial	72
5.2 Effet des traitements sur la morphologie mitochondriale	75
5.3 Effet des traitements sur le potentiel membranaire mitochondrial	76
5.4 Effet des traitements sur la respiration mitochondriale	78
Conclusion sur cette partie des résultats	84
Discussion I	85
Conclusion I	99
Résultats II	101
I. Approche phénotypique (caractérisation du modèle)	102
1. Génotypage des souris, expression de gène <i>Cre</i> par PCR.....	102
2. Expression de <i>Mtr</i> par Wes.....	102
II. Approche comportementale sur le modèle de souris KO-<i>Mtr</i>	104
1. Capacité d'apprentissage des souris <i>Mtr</i> KO avant le sevrage	107
2. Capacité d'apprentissage des souris <i>Mtr</i> KO après le sevrage	108
III. Approche structurale et biochimique	110
1. Etude histologique de mise en place des structures cérébrales.....	110
2. Etude du stress oxydatif et de SIRT1 chez les souris sur des extrait d'hippocampes.....	112
3. Etude de la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe chez les souris <i>Mtr</i> KO.....	114
IV. Approche comportementale après traitement	115
Discussion II	118
Conclusion II	126
Perspectives	129
Matériels et Méthodes	132
Fiche 1 : Mise culture des fibroblastes de patients cblC et cblG.....	133
Fiche 2 : Congélation et décongélation des cellules	136
Fiche 3 : Extraction des ARNs totaux (NuceloSpin RNA plus kit).....	137
Fiche 4 : Retro-transcription de l'ARN et expression génique par PCR quantitative	138
Fiche 5 : Extraction des protéines par letampond'extraction RIPA (WB/Wes)	139
Fiche 6 : Dosage des protéines par la méthode « BCA Assay »	140

Fiche 7 : Analyse des protéines par Western blot	141
Fiche 8 : Analyse des protéines par Wes.....	148
Fiche 9 : Marquage des protéines par immunofluorescence.....	150
Fiche 10 : Mesure d'activité enzymatique de Sirt1 par Fluor de Lys-SIRT1 (BML-AK555)	153
Fiche 11 : Mesure de taux de viabilité cellulaire par MTT (M655)	156
Partie : Mesure du stress oxydant dans les fibroblastes de patients	157
Fiche 12 : Coloration des cellules par le dihydroéthidium (Marqueur des ROS cellulaires) (ab236206)	157
Fiche 13 : Quantification des ROS cellulaire par ROS-Glo™ H2O2 Assay (G8820).....	158
Fiche 14 : Mesure de ROS mitochondriaux par Mitosox Red kit (M36008).....	160
Partie : Etude de la physiologie mitochondriale (Morphologie et fonctionnement).....	160
Fiche 15 : Evaluation de la morphologie mitochondriale par mitochondria-targeted green fluorescent proteins (GFP) (C10508).....	160
Fiche 16 : Mesure du potentiel du membrane mitochondriale par Tétraméthylrhodamine (TMRM Reagent) (I34361)	161
Fiche 17 : Mesure de la respiration mitochondriale par Seahorse XF Cell Mito stress kit (Agilent).....	162
Partie modèle animale :.....	166
Fiche 18 : Description du modèle murin transgénique.....	166
Fiche 19 : Application de traitements.....	167
Fiche 20 : Tests comportementaux	168
Fiche 21 : Analyses statistiques des données	173
Références	175

Liste des figures

<i>FIGURE 1 : STRUCTURE CHIMIQUE DES COBALAMINES (VITAMINE B12). LA VITAMINE B12 POSSEDE UNE PARTIE VARIABLE LIEE A L'ATOME COBALT CENTRAL DEFINISSANT SA FONCTION, AVEC UN GROUPEMENT ADENOSYL- OU METHYL- (FORMES ACTIVES), HYDROXY- OU CYANURE (FORME SYNTHETIQUE) (FROESE ET GRAVEL, 2010).....</i>	3
FIGURE 2 : METABOLISME DES MONOCARBONES ET CYCLE DE L'HOMOCYSTEINE/METHIONINE.....	4
FIGURE 3 : METABOLISME INTRACELLULAIRE DE LA COBALAMINE ET SES DEFAUTS GENETIQUES HEREDITAIRES (COELHO ET AL., 2008).....	6
<i>FIGURE 4 : SOURCES MITOCHONDRIALES DE H2O2.....</i>	12
FIGURE 5 : SCHEMA SIMPLIFIE DES ELEMENTS CENTRAUX DE LA VOIE DE SIGNALISATION UPR ...	16
FIGURE 6 : LA REGULATION DE L'APPRENTISSAGE ET DE LA MEMOIRE PAR SIRT1.....	20
FIGURE 7 : EFFETS DE SIRT1 SUR LES MALADIES LIEES A L'AGE.....	22
FIGURE 8 : ILLUSTRATION DES ROLES DE SIRT1 DANS LA REGULATION DES VOIES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME DU GLUCOSE	24
FIGURE 9 : ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DE LA REGULATION DU RESEAU DE SIGNALISATION SIRT1 DEPENDANT QUI REGULE L'AUTOPHAGIE.....	25
FIGURE 10 : MECANISME PROPOSE POUR L'ACTIVATION ALLOSTERIQUE DE SIRT1 PAR LES STAC	26
FIGURE 11: COMPOSES D'ACTIVATION DE SIRTUIN (STAC) QUI PROLONGENT LA DUREE DE VIE ET / OU LA SANTE	27
FIGURE 12 : ILLUSTRATION DES EFFETS DES STACs SUR LE VIEILLISSEMENT ET LES MALADIES LIEES A L'AGE.....	28
<i>FIGURE 13 : COUPE TRANSVERSALE AU NIVEAU DE L'HIPPOCAMPE DE SOURIS</i>	29
FIGURE 14 : LA SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE.....	32
<i>FIGURE 15 : MISE EN EVIDENCE DES ROS PAR MARQUAGE AU DHE.....</i>	46
FIGURE 16 : MESURE DU TAUX DE ROS (H2O2) DANS LES CELLULES DE PATIENTS	47
FIGURE 17 : EXPRESSION DE SOD2 DANS LES FIBROBLASTES DE PATIENTS CBLC ET CBLG.....	48
FIGURE 18 : MESURE DE LA PRODUCTION MITOCHONDRIALE DE SUPEROXYDE D'HYDROGENE DANS LES CELLULES DE PATIENTS CBLC ET CBLG.....	50
FIGURE 19 : ETUDE DE LA MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE.....	52
FIGURE 20 : QUANTIFICATION DE LA DEPOLARISATION DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL DANS LES CELLULES DE PATIENTS.....	54
FIGURE 21: MISE EN EVIDENCE DU STRESS DU RE CHEZ LES CELLULES CBLC ET CBLG PAR LA LOCALISATION NUCLEAIRE D'ATF6.....	55
<i>FIGURE 22 : EXPRESSION PROTEIQUE DE SIRT1.....</i>	56

<i>FIGURE 23: EXPRESSION ET LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE SIRT1 DANS LES FIBROBLASTES DE PATIENTS.</i>	57
FIGURE 24 : LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE HUR DANS LES FIBROBLASTES DE PATIENTS CBLC ET CBLG.	59
FIGURE 25 : CO-LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE SIRT1 ET HUR DANS LES FIBROBLASTES DE PATIENTS.	61
FIGURE 26 : EXPRESSION PROTEIQUE DE HSP70 ET HSP90.....	62
<i>FIGURE 27: EXPRESSION PROTEIQUE DE LA CASPASE-3 FORME CLIVEE ET TOTALE.....</i>	63
FIGURE 28 : FORMULES CHIMIQUES DES STACs CHOISIS (SRT1720, SRT2104, SRT2183 ET SRT3025)	64
FIGURE 29 : ETUDE DE L'EFFICACITE DES QUATRE SRTs SUR L'ACTIVATION IN VITRO DE SIRT1 A 1 ET 10 μ M	65
<i>FIGURE 30 : TESTS DE TOXICITE CELLULAIRE DE QUATRE DIFFERENTS STACs.....</i>	66
FIGURE 31 : EXPRESSION PROTEIQUE DE BIP DANS LES CONDITIONS STANDARDS ET EN PRESENCE DE TUNICAMYCINE.	68
FIGURE 32 : EXPRESSION PROTEIQUE DE BIP DANS LES FIBROBLASTES CBLG2 SOUS L'EFFET DE TRAITEMENT AVEC SRT1720 ET SRT2104.	69
FIGURE 33: VERIFICATION DE LA TOXICITE DU TRAITEMENT PAR SRT2104, HYDROXYCOBALAMINE ET N-ACETYL-CYSTEINE EN ETUDIANT SON EFFET SUR SUR LE TAUX DE VIABILITE DES FIBROBLASTES DE PATIENTS PAR MTT.....	71
FIGURE 34 : MESURE DE L'EFFET DE DIFFERENTS TRAITEMENTS SUR LE NIVEAU DE ROS MITOCHONDRIAL PAR MITOSOX RED.....	74
FIGURE 35 : ETUDE DE L'EFFET DE DIFFERENTS TRAITEMENTS SUR LA MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE PAR MITOCHONDRIA-GFP.	76
FIGURE 36 : QUANTIFICATION DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL SOUS L'EFFET DE DIFFERENTS TRAITEMENTS.....	77
FIGURE 37 : MECANISMES D'ACTION DES MOLECULES AGISSANT SUR LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE.	78
FIGURE 38 : RESPIRATION MITOCHONDRIALE DES FIBROBLASTES CBLC ET CBLG	83
<i>FIGURE 39 : EXPRESSION DU GENE CRE POUR L'ENZYME CRE RECOMBINASE PAR PCR.....</i>	102
FIGURE 40 : VERIFICATION DE L'INVALIDATION DE MTR AU NIVEAU DE L'HIPPOCAMPE DANS NOTRE MODELE KO, PAR WES.	103
FIGURE 41 : A. RESULTATS DU SUIVI DEVELOPPEMENTAL DES SOURICEAUX.....	104
FIGURE 42: : AXE D'ORGANISATION DU TRAVAIL DEPUIS LE JOUR DE NAISSANCE JUSQU'APRES LA DISSECTION.....	105
FIGURE 43: RESULTATS DE DIFFERENTS TESTS COMPORTEMENTAUX REALISES SUR LES SOURICEAUX.	106

FIGURE 44: RESULTATS DU TEST HOMING REALISE SUR LES SOURIS CONTROLES (WT) ET MTR KO AVANT SEVRAGE.....	107
FIGURE 45: RESULTATS DU TEST « OPEN FIELD » REALISE SUR LES SOURIS CONTROLES (WT) ET MTR KO AVANT SEVRAGE.	108
FIGURE 46 : RESULTATS DU TEST « ELEVATED PLUS MAZE » REALISE SUR LES SOURIS CONTROLES (WT) ET MTR KO AVANT SEVRAGE.	108
FIGURE 47: RESULTAT DU TEST DE LABYRINTHE AQUATIQUE REALISE SUR 5 SESSIONS SUR LES SOURIS CONTROLES (WT) ET MTR KO APRES SEVRAGE.	109
FIGURE 48 : MESURE DE L'EPaisseur DE LA COUCHE CELLULAIRE HIPPOCAMPIQUE AU NIVEAU DES ZONES CA1 ET GD.	111
FIGURE 49: QQUANTIFICATION DE NOMBRE DES NOYAUX AU NIVEAU DU CORTEX.....	112
FIGURE 50 : EXPRESSION DE SIRT1 DANS L'HIPPOCAMPE DES SOURIS.....	113
FIGURE 51: EXPRESSION DE SOD2 DANS L'HIPPOCAMPE DES SOURIS.....	113
FIGURE 52 : EXPRESSION DE AMPA-R1 ET AMPA-R2 EN FORME TOTALE ET PHOSPHORYLEE DANS L'HIPPOCAMPE DES SOURIS.	115
FIGURE 53: RESULTAT DU TEST DE LABYRINTHE AQUATIQUE CHEZ LES SOURIS CONTROLES (WT) ET MTR KO ET EFFET DU TRAITEMENT SRT2104 SEUL OU AVEC NAC.	116
FIGURE 54: PLAN DE DEPOT DANS LA PLAQUE WES.....	149
FIGURE 55: L'ACTIVITE SIRT1 A ETE MESUREE EN UTILISANT UN KIT DE DOSAGE FLUOROMETRIQUE DE SIRT1(1) COMME DECRIT PAR LE FABRICANT.	154
FIGURE 56 : PRINCIPE DU TEST ROS-GLO™ H2O2.	158
FIGURE 57 : MÉCANISME DE SYSTÈME CRE/LoxP POUR EXCISER LE GÈNE MTR DANS LES NEURONES.....	167

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : PHENOTYPES DES FIBROBLASTES DE PATIENTS CBLC ET CBLG	133
TABLEAU 2 : COMPOSITION DU MILIEU UTILISE POUR L'ENTRETIEN DES FIBROBLASTES DES PATIENTS	134
TABLEAU 3 : TABLEAU RECAPITULATIF DES DIFFERENTS VOLUMES DE REACTIFS UTILISES EN FONCTION DU SUPPORT DE CULTURE CELLULAIRE	135
TABLEAU 4 : LISTE DES AMORCES UTILISEES EN PCR QUANTITATIVE POUR LES GENES D'INTERRET ET LES GENES DE REFERENCES	138
TABLEAU 5 : COMPOSITION DU TAMPON RIPA	140
TABLEAU 6 : GAMME DE CONCENTRATION BCA ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	140

TABLEAU 7 : REFERENCES ET CONDITIONS D'UTILISATION DES ANTICORPS EN WESTERN BLOT	147
TABLEAU 8 : LISTE DES ANTICORPS UTILISES EN WES.....	150
TABLEAU 9 : LISTES DES ANTICORPS ETUDIES EN IMMUNOFLUORESCENCE	152

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

Adocbl : Adénosylcobalamine

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

B12 ou cbl : Vitamine B12 ou cobalamine

BCA : Dosage de l'acide bicinchoninique

BHMT : Bétaïne-homocystéine méthyltransférase

CA1 : Corne d'Ammon 1

CARM1 : Coactivator-associated arginine methyltransferase 1

CBS : Cystathionine β -synthase

CD320 : Récepteur de la Transcobalamine

cKO : conditional knock-out

CN-cbl : Cyanocobalamine

Co-IP : Co-immunoprécipitation

CRM : Chaîne respiratoire mitochondriale

D7 : Age par jours (jour 7 par exemple)

DHE : Dihydroéthidium

DHF : Dihydrofolate

DHFR : Dihydrofolate réductase

DMB : 5,6 diméthylbenzimidazole-cobamide

DMD : Dystrophie musculaire de duchenne (pathologie) ou Dystrophine (protéine)

DOA+ : Syndrome d'atrophie optique autosomique dominante plus

ELAVL1 ou HuR : Protéine de liaison à l'ARN ELAV1

EPM : Elevated plus maze

GD : Gyrus denté

HCl : Acide chlorhydrique

Hcy : Homocystéine

IECM : inborn errors of Cbl metabolism

IF : Immunofluorescence

IM : Intra-musculaire

IRF3 : Interferon Regulatory Factor 3

LTP : Long-term potentiation

MARS : methionine tRNA synthetase

MAT : Méthionine Adénosyl Transférase

Mecbl : Méthylcobalamine

Met : Méthionine

MeTHF : Méthyltétrahydrofolate

MMA : Acide méthylmalonique

MMACHC : Acidurie méthylmalonique type C avec homocystinurie

MMADHC : Acidurie méthylmalonique type D avec homocystinurie

MnSOD : mitochondrial (SOD2), manganese-dependent superoxide dismutase

MS : Méthionine Synthase

MT : Méthyle transférase(s)

MTHFD : 5, 10-méthylènetétrahydrofolate déhydrogénase

MTHFR : 5, 10-méthylènetétrahydrofolate réductase

MTR (gène), MS (protéine) : Méthionine synthase

MTR KO : MTR Knock-out

MTRR (gène) : 5-Méthyltétrahydrofolate-Homocysteine-Méthyltransférase

MUT : methylmalonylcoenzyme A mutase

Réductase ; MSR (protéine) : méthionine synthase réductase

NAC : N-acétylcystéine

NG : Negative geotaxis

OH-cbl : Hydroxocobalamine

OT : Construction Oléosine-Transcobalamine

PBS : Solution de tampon saline

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PDH : Pyruvate déshydrogénase

PGC1- α : PPAR γ co-activator 1 α

PP2A : Protéine phosphatase 2A

PRMT1 : Protein arginine N-methyltransferases

RBP : Protéine de liaison à l'ARN

RE : Réticulum endoplasmique

ROS : Espèces réactives à l'oxygène

RR : Righting reflex

RT-qPCR : Retro-transcription et PCR quantitative

SAH : S-adénylhomocystéine

SAHH : S- adénylhomocystéine hydrolase

SAM : S-adénylméthionine

SIRT1 : Sirtuine 1

STAC : Sirtuin activating compound

SO : Stress oxydatif

TC : Thy1.2-cre

THF : Tétrahydrofolate

TO : Construction de transcobalamine-oléosine

VO : Voie orale

WB : Western blot

WT : Wild type

Introduction et Bibliographie

I. La vitamine B12 (Généralités)

Depuis l'antiquité, le lien entre alimentation et santé est établi mais ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle avec l'essor de la biochimie et la chimie moderne que l'importance des micronutriments (vitamines et minéraux) est soulignée. La sous-consommation de certains aliments peut être à l'origine d'une carence en micronutriments pouvant entraîner des anomalies de développement, une croissance altérée et/ou perturber les mécanismes de régulation métabolique. C'est ainsi qu'il a été mis en évidence que le scorbut qui sévissait du XVI^{ème} au XVII^{ème} siècle, pouvait être soigné grâce à la vitamine C que contient les agrumes (Carpentier KJ., 2012).

De nombreuses études ont également mis en évidence une association entre les troubles du métabolisme des monocarbones et les maladies neurodégénératives (McCaddon A., 2013), comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson.

1. La Vitamine B12 ou cobalamine (Définition et structure)

1.1 Définition

La vitamine B12 est un des micronutriments essentiels, qui ne sont pas synthétisés chez l'Homme et doivent obligatoirement être présents dans l'alimentation. La vitamine B12 est retrouvée essentiellement dans les produits d'origine animale (œufs, poissons, produits laitiers...). Les apports journaliers recommandés (2,5 µg en Europe selon le règlement 1169/2011 et 6 µg aux USA selon le « Guidance for Industry: A Food Labeling Guide », sur U.S. Food and Drug Administration, janvier 2013) ne peuvent être atteints que grâce à l'alimentation.

La synthèse de cette vitamine est limitée uniquement par quelques micro-organismes comme les Archées et les eubactéries ; c'est peut-être parce que la synthèse de la cobalamine est si complexe impliquant plus de 25 étapes selon une procédure aérobie ou même anaérobie (Roth et al., 1996). Par conséquent, les mammifères et autres organismes supérieurs acquièrent la vitamine B12 de ces procaryotes, ce qui explique l'exclusivité de sa source pour l'homme par les aliments d'origine animale (Froese et Gravel, 2010).

1.2 Structure chimique

La structure de base de cette vitamine hydrosoluble comprend quatre parties (Figure 1) :

- Un atome de cobalt central
- Un noyau tétrapyrrolique, ou bien quatre cycles pyrrole possédant chacun un atome d'azote ; ces atomes sont liés à l'atome de cobalt et forment un cycle corrine
- Un nucléotide relié au cobalt
- Une partie variable reliée au cobalt

Cette dernière définit la fonction de la Cbl : groupement méthyl pour la méthylcobalamine (MeCbl) et groupement 5'-déoxadénosine pour l'adénosylcobalamine (AdoCbl). Les autres formes sont celles avec un groupement hydroxyle (hydroxycobalamine, OHCbl) ou un groupement cyanure caractérisant la cyanocobalamine (CNCbl), cette dernière forme n'est pas naturelle mais est plus stable que l'OHCbl (Froese et Gravel, 2010).

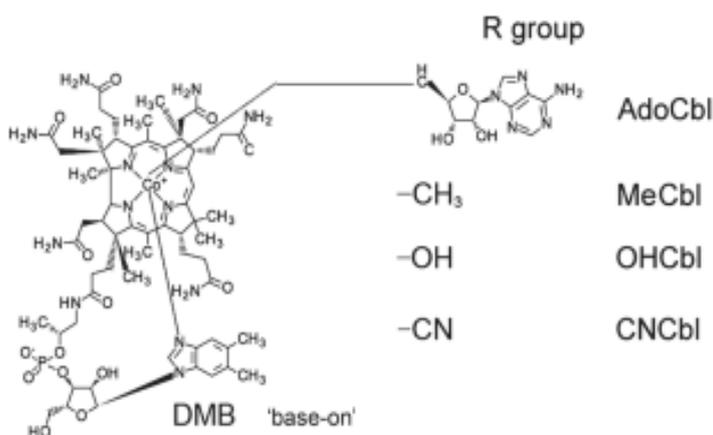


Figure 1 : Structure chimique des cobalamines (vitamine B12). La vitamine B12 possède une partie variable liée à l'atome de cobalt central définissant sa fonction, avec un groupement adénosyl- ou méthyl- (formes actives), hydroxy- ou cyanure (forme synthétique) (Froese et Gravel, 2010).

(Froese et Gravel, 2010).

1.3 Métabolisme intracellulaire de la vitamine B12

La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl) est un micronutriment donneur de méthyles impliqué dans le métabolisme des monocarbone ; elle intervient comme cofacteur essentiel dans le cycle de la méthionine (Guéant et al., 2013). Elle existe sous plusieurs formes : méthylcobalamine (MeCbl), adénosylcobalamine (AdoCbl), cyanocobalamine (CNCbl) et hydroxycobalamine (HOCbl), ces deux dernières étant les formes dites "stables" de la vitamine B12 (Raux et al., 2000). Elle est utilisée au

sein de la cellule comme cofacteur essentiel de deux enzymes : la méthylmalonyl-CoA mutase (MCM), qui va l'utiliser sous sa forme AdoCbl et la méthionine synthase (MS) qui l'utilise sous sa forme méthylée MeCbl pour transformer l'homocystéine en méthionine.

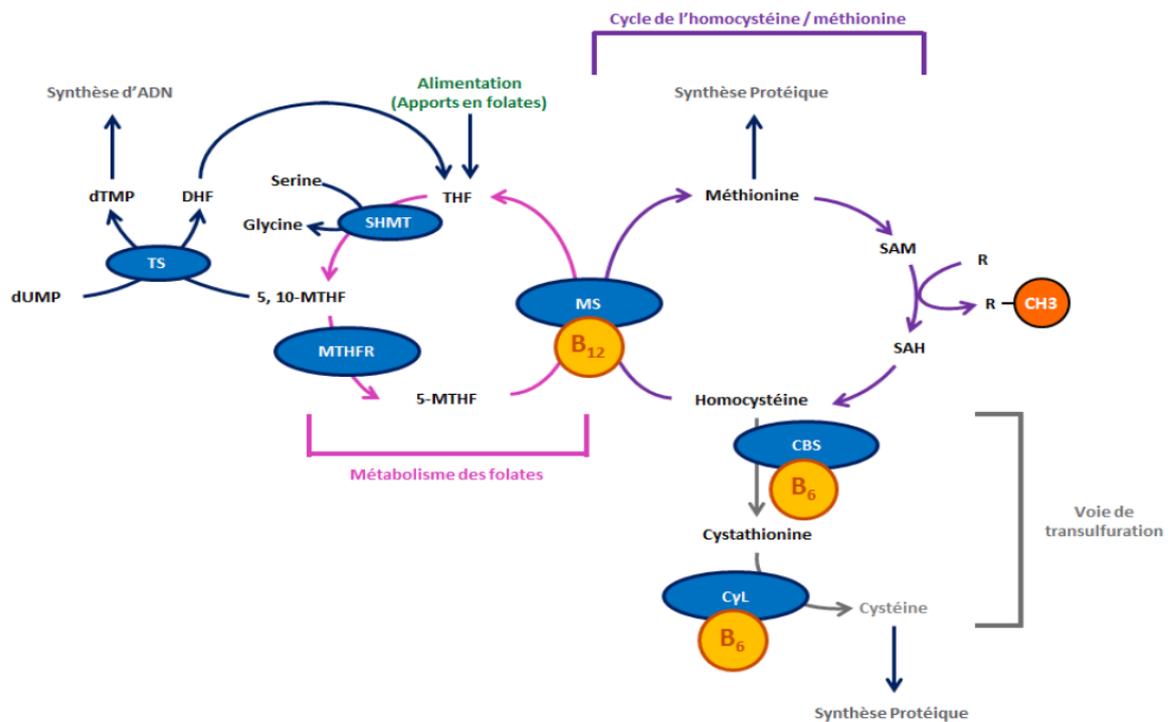


Figure 2 : Métabolisme des monocarbone et cycle de l'homocystéine/méthionine.

Les folates (ou vitamine B9 ou acide folique) jouent un rôle de cofacteur permettant l'apport de groupements méthyles. Ils sont nécessaires à la synthèse de novo des purines et de la thymidine ainsi qu'à la reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase (MS) utilisant comme cofacteur la vitamine B12 (cobalamine). La méthionine permet la biosynthèse de S-adénosylméthionine (SAM), une diminution du taux cellulaire de ce donneur universel de groupement méthyle peut directement affecter la méthylation des lipides, des protéines et des acides nucléiques (R). Des perturbations épigénétiques peuvent donc en découler, via des modifications de méthylation des protéines histones ou de l'ADN.

Abréviations : 5,10-MTHF : méthylène-tetrahydrofolate, 5-MTHF : méthyl-tetrahydrofolate, DHF : dihydrofolate, dTMP : désoxythymidine monophosphate, dUMP : désoxyuridine monophosphate, TS : thymidylate synthase, SAH : S-adénosyl-L-homocystéine, SHMT : sérine hydroxyméthyl-transférase, CBS : cystathionine-β-synthase, CyL : cystathionine-γ-lyase.

2. Carence en vitamine B12, manifestations cliniques et traitements

2.1 Déficit d'apport

Un régime alimentaire végétarien strict est de ce fait une des causes de déficience en Cbl fréquemment rencontrée (Rizzo et al., 2016). D'autre part, le déficit d'apport peut être dû

à des problèmes d'absorption comme chez les personnes qui ont subi une chirurgie bariatrique et les personnes âgées qui ont plus de 75 ans (Langan et Goodbred, 2017).

2.2 Défauts génétiques du métabolisme de la cbl

De même, des altérations dans le transport et l'absorption de la Cbl (Quadros, 2010) mais aussi des défauts génétiques de son métabolisme intracellulaire sont aussi à l'origine d'une déficience en vitamine B12 (Coelho et al., 2008). Ces défauts génétiques héréditaires sont au nombre de dix (CblA/B/C/D/E/F/G/J/X et mut) et peuvent toucher les différentes protéines impliquées dans le métabolisme de la Cbl (MMAA, MMAB, MMACHC, MMADHC, MSR, LMDB1, MS, ABCD4, HCFC1 et MCM respectivement, Figure 3).

La Cbl liée à son transporteur transcobalamine II (TCII) pénètre dans la cellule par endocytose après avoir été reconnue par son récepteur CD320. Elle est ensuite transférée du lysosome vers le cytoplasme grâce aux transporteurs ABCD4 et LMDB1 déficients chez les patients CblJ et CblF respectivement (Figure 3). Puis, elle est prise en charge par MMACHC (déficiente chez les patients CblC) et MMADHC (déficiente chez les patients CblD). Dans le cytoplasme, la Cbl est convertie en MeCbl par la méthionine synthase (MS) déficiente chez les patients CblG. La méthionine synthase réductase, déficient chez les patients CblE, réactive la méthionine synthase lorsque la cobalamine est oxydée en la reméthylant à partir de SAM. La Cbl peut de manière alternative être orientée vers la voie mitochondriale mettant en jeu les protéines MMAA et MMAB (déficientes chez les patients CblA et CblB respectivement) permettant sa réduction en AdoCbl où elle servira de cofacteur à la MCM, déficiente chez les patients mut.

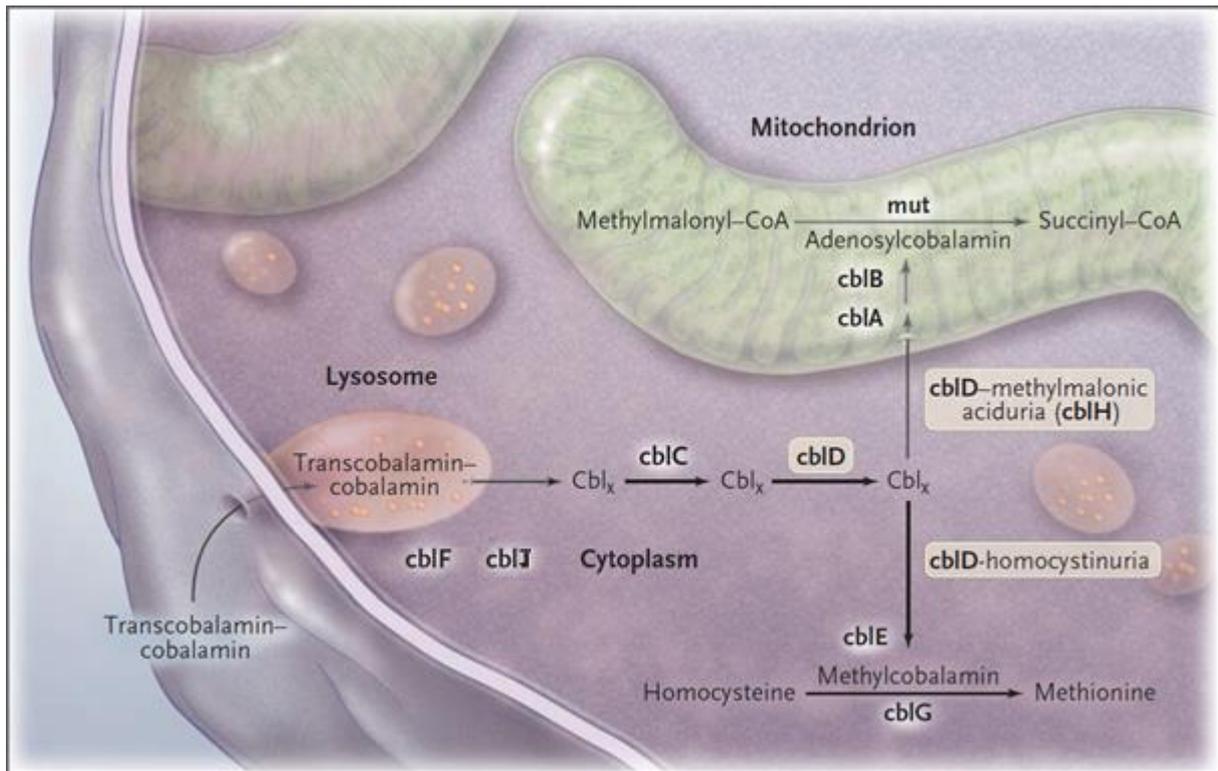


Figure 3 : Métabolisme intracellulaire de la cobalamine et ses défauts génétiques héréditaires (Coelho et al., 2008).

2.3 Manifestations cliniques et traitements classiques actuels

Les manifestations cliniques les plus fréquemment mises en évidence chez des patients atteints d'un défaut génétique dans le métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 sont d'ordre hématologique avec notamment des anémies mégaloblastiques (Vilaseca et al., 2003). En plus des problèmes vasculaires comme les thromboses artérielles et veineuses (Humer et al., 2015) et des problèmes ophtalmologiques (rétinopathie, nystagmus et strabisme) qui sont fréquents chez les patients et répondent mal au traitement classique (Matmat et al., 2021). En effet, la Cbl étant un cofacteur de la MS, sa déprivation chez les patients entraîne des défauts dans le cycle des folates (Figure 2) et donc une diminution de la synthèse de l'ADN dans les précurseurs érythroïdes, ce qui va se traduire par l'apparition de macrocytes (Green et al., 2017).

Actuellement, le traitement classique de ces patients comprend essentiellement des injections intra-musculaires de cobalamine (B12) et une supplémentation en folates (B9), choline, bétaïne et méthionine. Ce traitement vise à stimuler une éventuelle activité enzymatique résiduelle de la méthionine synthase.

De plus, la réponse à ce traitement est souvent incomplète, transitoire ou même inexistante et démontre la nécessité de développer des traitements alternatifs.

3. Métabolisme de la vitamine B12 et pathologies affectant le système nerveux central

Les déficiences en Cbl sont communément associées à des altérations neurologiques et notamment des neuropathies périphériques dont les causes restent à définir (Stabler, 2013). Le système nerveux central et périphérique ainsi que la moelle osseuse sont affectés. Des troubles neurocognitifs et développementaux, des symptômes neurologiques tels que convulsions, troubles du mouvement, tonus musculaire anormal et neuropathie sont présents dans la majorité des patients ayant des dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 (Huemer et Baumgartner, 2019). La sévérité de ces manifestations neurologiques peut être extrêmement variable et peut comporter pour un même défaut génétique, un retard intellectuel, un déficit d'attention et de mémorisation, des troubles du comportement, mais aussi des convulsions, des psychoses et des hallucinations (Huemer et al., 2015).

Par ailleurs, de nombreuses études ont associé un retard mental plus ou moins sévère aux défauts CblF (Rutsch et al., 2009), CblJ (Coelho et al., 2012), CblG et CblE (Watkins and Rosenblatt, 1989), CblD (Coelho et al., 2008) et CblC (Lerner-Ellis et al., 2006).

Dans un modèle de rat dépourvu de donneurs de groupes méthyle (cbl, folate et choline) pendant la gestation et la lactation, une perte de mémoire et des troubles neurocomportementaux associés à une hyperhomocystéinémie ont été observés dans les neurones et les astrocytes. Le retour à une alimentation normale a rétabli les taux plasmatiques d'homocystéine. Cependant, la persistance de troubles neurologiques du comportement suggère que l'homocystéine a un effet neurotoxique (Blaise et al., 2007 ; Daval et al., 2009). Chez les femmes enceintes, une carence en B12 a été associée à un risque élevé de défauts d'occlusion du tube neural et de perturbation des fonctions cognitives chez l'enfant (Molloy et al., 2009 ; Caramaschi et al., 2017).

4. Conséquences cellulaires et moléculaires des dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12

Au niveau cellulaire, une déficience en Cbl a pour conséquence directe une accumulation d'homocystéine cellulaire (Hcy) et une diminution de la synthèse de méthionine et de S-adénosylméthionine (SAM), le donneur universel de méthyles, ainsi qu'une augmentation de SAH, ce qui aura des effets délétères sur les réactions de méthylation (Figure 2). Par ailleurs, l'accumulation d'Hcy peut être à l'origine d'un stress cellulaire important (Škovierová et al., 2016), d'apoptose (Blaise et al., 2007) et d'homocystéinylation de protéines fonctionnelles (Sharma et al., 2014). Un stress oxydant dû à une perturbation du métabolisme de glutathion a été démontré chez les patients cblC et peut contribuer à des nombreuses physiopathologies (Pastore et al., 2014).

De plus, des travaux menés au laboratoire montrent que la déficience en Cbl a pour conséquence la mise en place d'un stress du réticulum endoplasmique mettant en jeu une diminution d'expression de la protéine déacétylase NAD⁺-dépendante sirtuine 1 (SIRT1) (Garcia et al., 2011). De ce fait, le facteur de transcription HSF1, qui est une cible de SIRT1, présente une augmentation de son acétylation ce qui entraîne une diminution de son activité nécessaire à la synthèse de chaperones, ce qui conduit à un stress du réticulum endoplasmique (RE) (Ghemrawi et al., 2013). Ces résultats ont été obtenus grâce à un modèle cellulaire innovant de carence en vitamine B12. Des neuroblastomes murins expriment une version chimérique de la transcobalamine possédant une très forte affinité pour la membrane du RE de par sa fusion avec une protéine végétale, l'oléosine (Pons et al., 2009). Cette construction génétique se traduit au niveau cellulaire par une diminution de la biodisponibilité de la vitamine B12 alors séquestrée au niveau du RE, qui ne pourra donc pas être utilisée comme cofacteur de la MCM et de la MS.

II. Stress oxydatif

1. Définition du stress oxydatif

L'utilisation précoce du terme semble commencer avec la chimie en 1956 (Ore, 1956). En 1970, « les cellules ont été soumises à un stress oxydatif » a été utilisé pour décrire

l'addition de H₂O₂ aux érythrocytes (Paniker et al., 1970). Depuis 1985, le terme désignait les dommages oxydatifs aux cellules et aux organes (Sies et Cadenas, 1985). Avec l'émergence du rôle de la signalisation redox, il était nécessaire de mettre à jour le concept, qui a abouti à la définition actuelle qui décrit le stress oxydatif, comme l'attaque de biomolécules dans la cellule telles que l'ADN, les lipides et les protéines par des radicaux libres, appelés aussi ROS (reactive oxygen species) (Sies et al., 2017).

Aujourd'hui, le concept général du stress oxydatif s'est concentré sur le déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, conduisant à une perturbation de la signalisation et de l'accumulation cellulaire de ces ROS (Sies, 2014).

Les niveaux des espèces réactives de l'oxygène (ROS), y compris les peroxydes (par exemple, H₂O₂), le superoxyde (O₂^{•-}) et les radicaux hydroxyles (•OH), sont modulés par un équilibre entre les éléments pro-oxydants et antioxydants. Lorsque des niveaux accrus de ROS ne sont pas limités par des augmentations d'activité antioxydante, la cellule subit un état de stress oxydatif. Des concentrations plus élevées de ROS représentent une source potentielle de dommages pour de nombreuses macromolécules en raison de l'induction de ruptures d'ADN simple et double brin et de la dénaturation irréversible des protéines par oxydation des résidus d'arginine, de proline, de lysine et de thréonine (Nathan et Ding, 2010).

Cependant, des facteurs externes tels que les xénobiotiques et les rayons UV ainsi que les hormones, les cytokines et d'autres stimuli physiologiques internes peuvent augmenter la production de ROS cellulaires jusqu'à des niveaux toxiques (Siauciunaite et al., 2019), (Klotz et Steinbrenner, 2017).

2. Dommages oxydatifs et réparation

Au début de la description de la biochimie du stress oxydatif, les dommages aux biomolécules et ses conséquences sont devenus un centre d'intérêt. Une énorme littérature s'est accumulée qui décrit le dommage des réactifs libres qui peuvent attaquer les protéines, les lipides et même l'ADN de la cellule, induisant ainsi le stress oxydatif (Halliwell et Gutteridge, 2015).

2.1 Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines forme une multitude de produits d'oxydation dans les chaînes latérales d'acides aminés (Davies, 2016).

En tant que modifications oxydatives réversibles, certaines protéines endommagées ou bien oxydées soutiennent les événements de signalisation.

Le réticulum endoplasmique (RE) est un site majeur de repliement oxydatif des protéines, introduisant des liaisons disulfures intra et intermoléculaires dans les protéines via des processus oxydatifs (Oka and Bulleid, 2013). L'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE (stress ER) active la réponse des protéines mal repliées (UPR : unfolded protein response).

Ainsi, il y a une intégration des signaux redox et des chaperones dans le stress ER, conduisant finalement au rétablissement de l'homéostasie redox ou à la mort cellulaire (Niforou et al., 2014).

2.2 Oxydation de lipides

De même, les produits de l'oxydation des lipides jouent un rôle central dans la signalisation oxydative et dans différentes pathologies. Différents produits ont été identifiés, parmi les principales classes on peut citer les phospholipides membranaires oxydés, les lipides hydroperoxydes, hydroxydes et époxydes lipidiques (y compris les produits d'oxydation du cholestérol), isoprostanes, malondialdéhyde (MDA) et autres aldéhydes, cétones et autres. Les produits d'oxydation des lipides sont des ligands du récepteur (PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor) (Spickett et Pitt, 2015).

2.3 Acides nucléiques

L'oxydation de l'ADN affecte sa stabilité et contribue aux dommages du génome. Parmi les bases d'ADN, la guanine est la plus sensible à l'attaque oxydative. La lésion mutagène majeure est la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (également appelée 8-oxoguanine ou 8-hydroxyguanine) qui s'apparie avec l'adénine plutôt qu'avec la cytosine et génère ainsi des mutations de transversion après réplication (Freudenthal et al., 2015). L'accumulation de 8-oxoguanine est oncogénique et provoque un dysfonctionnement mitochondrial et une dysrégulation de l'expression des gènes (Leon et al., 2016).

L'enzyme mutT homolog humaine (MTH1) qui détoxifie les nucléotides oxydés est considéré comme cible thérapeutique (Sies et al., 2017).

3. Rôle de la mitochondrie

Peu de temps après l'établissement de la production cellulaire de H₂O₂ dans des cellules intactes en 1970, les mitochondries isolées ont été identifiées comme une source majeure de H₂O₂ (Boveris et al., 1972).

La chaîne respiratoire mitochondriale fournit non seulement la proportion majeure d'ATP dans les cellules de mammifères, mais est également une source majeure des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Michael and Murphy, 2009). Alors qu'une augmentation de la production mitochondriale de ROS a été principalement associée à plusieurs conditions physiopathologiques (Finkel, 2012).

Les mitochondries produisent du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène dans deux catégories principales : les complexes des membranes internes mitochondriales I, II et III (Bleier et al., 2015) et la déshydrogénase liée à la matrice mitochondriale et/ou à la membrane interne (Goncalves et al., 2015).

Une douzaine de sources mitochondriales d'O₂⁻ / H₂O₂ ont été identifiées, comme le montre la figure 4. Un total de 31 enzymes générant du peroxyde d'hydrogène cellulaire a été compilé (Go et al., 2015).

Au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale, les complexes I et III sont généralement considérés comme les générateurs principaux de superoxyde rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et oxygène moléculaire (O₂) par les superoxydes dismutases SOD1 et SOD2 dans l'espace intermembraire et la matrice mitochondriale respectivement. Alors que le complexe I libère les superoxydes complètement dans la matrice mitochondriale, les superoxydes générés au niveau du complexe III sont principalement libérés dans l'espace intermembranaire, la contribution du complexe II dans la production des ROS semblait être négligeable (Siebels et Dröse, 2013).

Il a été suggéré que la dysfonction mitochondriale est un des mécanismes de base qui peuvent être à l'origine de l'induction du stress oxydatif comme l'accumulation de métaux et l'inflammation (Chen et Zhong, 2014).

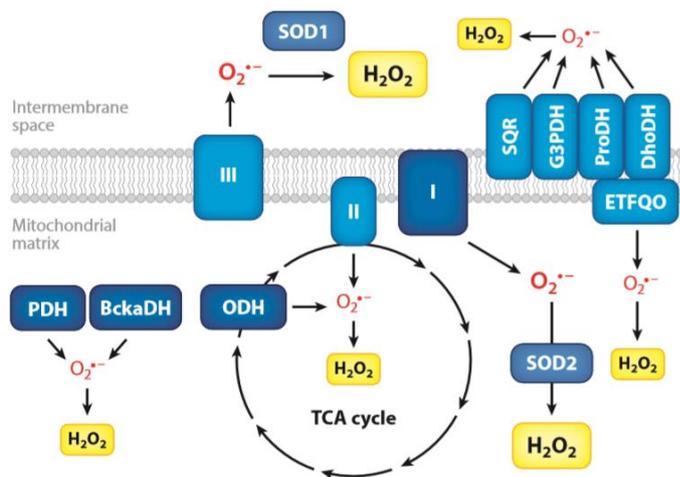


Figure 4 : Sources mitochondriales de H₂O₂.

Les complexes de la membrane mitochondriale interne I, II et III ainsi qu'un certain nombre d'enzymes dépendantes des flavines, liées à la membrane ou dans l'espace matriciel, produisent du superoxyde, qui est rapidement converti en H₂O₂ par la

SOD1 dans l'espace intermembranaire et par la SOD2 dans l'espace de la matrice mitochondriale.

Abréviations : Bckadh, branched-chain ketoacid dehydrogenase; DhoDH, dihydroorotate dehydrogenase; ETFQO, electron transfer flavoprotein oxidoreductase; G3PDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; ODH, 2-oxoglutarate dehydrogenase; PDH, pyruvate dehydrogenase; ProDH, proline dehydrogenase; SOD1, superoxide dismutase-1; SQR, succinate:quinone reductase; TCA cycle, tricarboxylic acid cycle (Sies et al., 2017).

4. Défense antioxydante

Une fois les espèces réactives formées, de puissants systèmes enzymatiques maintiennent un niveau physiologique bas de ces espèces. Cette catégorie comprend les superoxyde dismutases, la catalase, les glutathion peroxydases et les peroxirédoxines, qui neutralisent directement les oxydants par réduction chimique. Pourtant, d'autres protéines, comme les aquaporines ou les exportateurs de GSSG, facilitent le transport d'espèces réactives ou de leurs produits à travers les membranes biologiques.

Tous ces éléments sont sous contrôle transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel, formant la base des réponses adaptatives au stress oxydatif (Sinha et Dabla, 2017).

L'intervention non enzymatique se produit par des antioxydants de faible masse moléculaire, tels que la vitamine E ou la vitamine C (Stahl and Sies, 2012).

Il existe également des barrières macromoléculaires, telles que la mélanine dans l'épithélium pigmenté et la couche cornée de la peau des mammifères. Une teneur élevée en résidus de cystéine et de méthionine dans les protéines de mammifères a

été proposée pour protéger les sites actifs critiques contre les dommages oxydatifs (Sies et al., 2017).

5. Troubles neurologiques

Le cerveau consomme presque 20 % de l'oxygène fourni par le système respiratoire. La forte consommation d'énergie signifie que le cerveau est plus vulnérable que les autres organes au stress oxydatif. En tant qu'unité fonctionnelle de base du cerveau, le neurone est particulièrement vulnérable aux dommages oxydatifs car il a un taux métabolique plus élevé que les autres cellules, et par suite la plupart des composants des neurones (lipides, protéines et acides nucléiques) peuvent être oxydés (Chen et Zhong, 2014). Le stress oxydatif participe au développement de divers troubles neurologiques et des maladies neurodégénératives à long terme telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington ainsi que la sclérose en plaques. Toutes ces pathologies sont associées à des niveaux importants des composants oxydants (Dong et al., 2019).

Le ciblage du stress oxydatif et de la neuro-inflammation dans les maladies neurodégénératives pourrait avoir un potentiel thérapeutique dans la maladie de Parkinson. De même, la sclérose latérale amyotrophique est liée au stress oxydatif en raison de mutations dans le gène de la superoxyde dismutase-1 (SOD1) (Kaur et al., 2016).

Les astrocytes et les macrophages des tissus neuronaux jouent un rôle très important dans la neuroprotection contre l'accumulation des ROS. La communication intercellulaire par des jonctions riches en connexines est essentielle pour leur résistance au stress oxydatif (Freitas-Andrade et Naus, 2016).

III. Stress du réticulum endoplasmique

1. Mécanismes du stress du RE

Le réticulum endoplasmique (RE) remplit plusieurs fonctions cellulaires. Dans les cellules eucaryotes, la plupart des protéines sécrétées et transmembranaires se replient et subissent une maturation dans la lumière du RE (Ron et Walter 2007). La lumière est un environnement oxydant, essentiel à la formation de liaisons disulfure et au bon repliement des protéines destinées à la sécrétion ou bien à l'intégration dans

la membrane cellulaire (Schroder et Kaufman, 2005). D'autre part, la lumière du RE est l'environnement qui contient la concentration la plus élevée de Ca^{2+} dans la cellule en raison du transport actif des ions calcium par les ATPases Ca^{2+} (Orrenius et al., 2003).

De nombreuses perturbations, y compris l'altération de régulation de Ca^{2+} dans le RE ainsi que celles de la régulation redox cellulaire, provoquent l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, signalant ainsi un stress du réticulum endoplasmique. De façon très schématique, le stress du réticulum endoplasmique est un état de déséquilibre entre la charge de protéines dépliées qui entrent dans le RE et la capacité de la machinerie cellulaire qui gère cette charge (Ron et Walter 2007).

Comme mécanisme d'adaptation, une réponse conservée évolutivement est déclenchée, appelée la réponse au stress lié à l'accumulation de protéines mal repliées (UPR : unfolded protein response).

Comme système de défense contre l'accumulation des protéines mal repliées, certaines quantités de ces protéines sont transportées dans le cytosol par le transport rétrograde de protéines mal repliées pour une dégradation dépendante du protéasome. Le but initial de l'UPR est de s'adapter à l'environnement changeant et de rétablir la fonction normale du RE.

Lorsque les protéines dépliées s'accumulent dans le RE, les chaperones résidentes deviennent occupées, libérant des protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique impliquées dans l'induction de la réponse au stress lié à l'accumulation de protéines mal repliées (UPR). Ces protéines chevauchent les membranes du RE, fournissant un pont qui relie les 2 compartiments intra- et extra-RE. Normalement, les terminaisons amino-terminales du côté intracellulaire de ces protéines transmembranaires sont détenues par la chaperone Grp78 (BiP), empêchant leur agrégation. Mais lorsque des protéines mal repliées s'accumulent, Grp78 se libère, permettant l'agrégation de ces protéines transmembranaires de signalisation et le lancement de l'UPR. Parmi les protéines transmembranaires de signalisation dans le réticulum endoplasmique, on peut citer les trois branches de l'UPR : PERK, IRE1 et ATF6 (Shen et al., 2004).

1.1 IRE1a

IRE1 s'oligomérisse dans les membranes du RE lorsqu'il est libéré par la chaperone Grp78. La protéine IRE1 α est une protéine transmembranaire qui contient à la fois un domaine kinase Ser/Thr et un domaine endoribonucléase ; ce dernier agit sur l'intron de l'ARNm de la protéine XBP-1 et le rend compétent pour la traduction afin de produire une protéine de 41 kDa, un facteur de transcription de la famille bZIP. XBP-1 se lie aux promoteurs de plusieurs gènes impliqués dans le transport rétrograde des protéines mal repliées du RE vers le cytosol et dans la dégradation des protéines induite par le stress du RE (Rao et al., 2004). XBP-1 hétérodimérise avec la protéine NF-Y et lie les éléments cis dans les promoteurs de gènes, y compris l'activateur de stress du RE (ERSE) et l'élément de réponse de protéines mal repliées (UPRE) (Yoshida et al., 2001). L'ablation de IRE1 α chez la souris produit un phénotype embryonnaire mortel. Les fibroblastes d'embryons IRE 1 α $-/-$ sont défectueux dans l'activation des gènes rapporteurs entraînés par UPR (Lee et al., 2002).

1.2 PERK

PERK (PKR-like ER kinase) est une protéine kinase Ser/Thr, dont le domaine catalytique partage une homologie substantielle avec d'autres kinases de la famille du facteur d'initiation eucaryote 2 α (eIF2 α) (Harding et al., 1999). Lors de l'élimination de Grp78, PERK s'oligomérisse dans les membranes du RE, induisant son autophosphorylation et activant le domaine kinase (Ron et Walter 2007).

PERK phosphoryle et inactive eIF2 α , bloquant ainsi globalement la traduction de l'ARNm et réduisant la charge protéique dans le RE. Cependant, certains ARNm sont activement traduits dans ces conditions, y compris l'ARNm codant pour le facteur de transcription ATF4. La protéine ATF4 est un membre de la famille des facteurs de transcription bZIP, qui régule les promoteurs de plusieurs gènes impliqués dans l'UPR (Xu et al., 2005).

1.3 ATF6

La libération de Grp78 de l'extrémité N-terminale d'ATF6 déclenche un mécanisme d'activation des protéines différent de celui de PERK et IRE1. Au lieu de

l'oligomérisation, Grp78 libère ATF6 pour se déplacer vers l'appareil de Golgi, où les protéases résidentes clivent ATF6, libérant ce facteur de transcription dans le cytosol qui est ensuite capable de migrer dans le noyau pour réguler l'expression des gènes (Ye et al., 2000). ATF6 collabore avec IRE1, induisant ainsi la transcription de l'ARNm de XBP-1, et l'activité d'endoribonucléase d'IRE1 traite ensuite cet ARNm afin que la protéine XBP-1 soit produite (Ron et Walter, 2007).

XBP-1 joue un rôle important dans la régulation des enzymes de biosynthèse lipidiques et des composants de dégradation associés aux réticulums endoplasmiques (Walter et Ron, 2011).

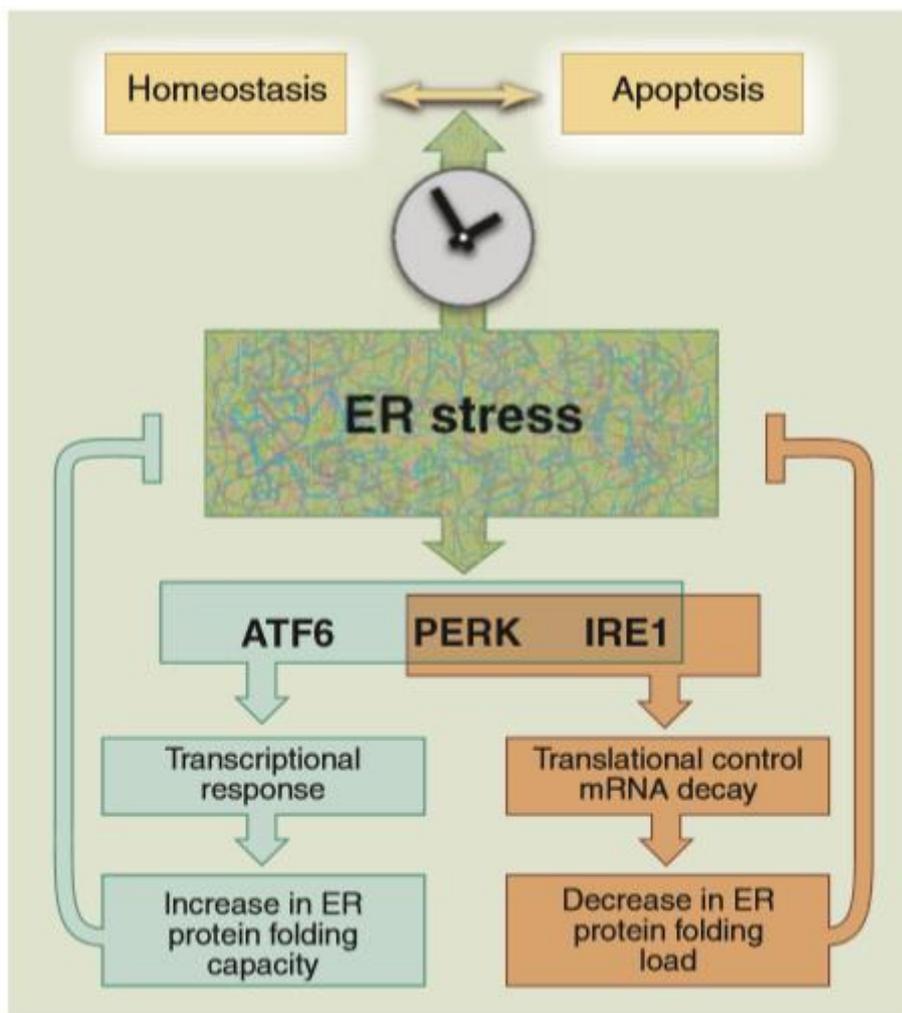


Figure 5 : Schéma simplifié des éléments centraux de la voie de signalisation UPR

Le stress du RE active les capteurs du stress ATF6, IRE1 et PERK, représentant les trois branches de l'UPR. L'activation de chaque capteur produit un facteur de transcription [ATF6 (N), XBP1 et ATF4, respectivement] qui active les gènes pour augmenter la capacité de repliement des protéines dans le RE. IRE1 et PERK diminuent également la charge de protéines entrant dans l'ER. Les deux résultats se traduisent par des boucles de rétroaction qui atténuent le taux du stress du RE. Si les cellules ne peuvent pas rétablir l'homéostasie

mais continuent à subir un stress du RE prolongé et non atténué, elles finissent par mourir par apoptose (Walter et Ron 2011).

2. Réponses au stress du RE

Le réticulum endoplasmique répond à l'accumulation de protéines mal repliées dans sa lumière suite à des perturbations dans ses fonctions normales en activant les voies de signalisation intracellulaire - cumulativement appelées la réponse aux protéines mal repliées (UPR : unfolded protein response) (Xu et al., 2005). La réponse UPR concerne la régulation de l'expression de nombreux gènes qui fonctionnent au sein de la voie sécrétoire mais affectent également les aspects du destin cellulaire et les métabolismes des protéines, des acides aminés et des lipides, en alignant ainsi la physiologie cellulaire aux exigences imposées par le stress ER (Ron et Walter, 2007). Ces mécanismes adaptatifs impliquent des programmes de transcription qui induisent l'expression de gènes qui améliorent la capacité de repliement des protéines de RE et favorisent la dégradation des protéines associées au stress du RE pour éliminer les protéines mal repliées. La traduction des ARNm est également initialement inhibée, réduisant l'influx de nouvelles protéines dans le RE pendant des heures jusqu'à ce que les ARNm codant pour les protéines UPR soient produits (Xu et al., 2005).

2.1 Stress du RE et NfKB

Lorsque l'adaptation échoue, les voies initiées par le RE signalent l'alarme en activant NF- κ B, un facteur de transcription qui induit l'expression de gènes codant pour les médiateurs de la défense de l'hôte (Xu et al., 2005). Un stress excessif et prolongé déclenche la mort cellulaire programmée, généralement sous forme d'apoptose (Xu et al., 2005).

2.2. Stress du RE et apoptose

Les réponses adaptatives aux protéines mal repliées dans le RE offrent une protection contre la mort cellulaire (Tanaka et al., 2000). Cependant, lorsque le mauvais repliement des protéines est persistant ou excessif, le stress du RE déclenche la mort cellulaire. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour relier la réponse au stress du RE à la mort cellulaire, y compris l'activation directe des protéases, des kinases, des

facteurs de transcription et des protéines de la famille Bcl-2 et de leurs modulateurs (Xu et al., 2005).

De même, le stress ER a été impliqué dans l'activation de divers effecteurs de la mort cellulaire tels que BAK et BAX qui signalent par les mitochondries (Wei et al., 2001), ou la caspase-12 qui est activée dans le cytoplasme (Nakagawa et al., 2000).

3. Stress du RE et pathologies

3.1. Stress du RE et longévité

Le processus de vieillissement contient en abondance des caractéristiques de mal fonctionnement, par exemple : augmentation du stress oxydatif et accumulation de modifications nocives des protéines, mauvais repliement et agrégation des protéines, perturbations de l'homéostasie Ca²⁺ et altération de la synthèse globale des protéines (Puzianowska-Kuznicka et Kuznicki, 2009). De plus, le système de nettoyage des protéines est altéré durant le vieillissement en raison de diminution de l'autophagie et de la dégradation protéasomique (Salminen et Kaarniranta, 2009). Tous ces changements liés à l'âge impliquent que la fonction efficace du système de qualité des protéines est compromise durant le vieillissement.

Le réticulum endoplasmique contient une gamme de protéines chaperones, y compris la protéine de choc thermique 70 (HSP70) BiP, le choc thermique GRP94 de type protéine 90 (HSP90) et autres, qui facilitent le bon repliement des protéines au sein du RE. Avec l'âge, ces chaperones accumulent des dommages oxydatifs, ce qui peut limiter leur capacité à assurer un repliement approprié des protéines (Nuss et al., 2008). Les niveaux de BiP, par exemple, diminuent dans le cortex murin, dans l'hippocampe du rat (Paz Gavilan et al., 2006), cortex, cervelet (Naidoo et al., 2008) et dans d'autres tissus du rat y compris les poumons, le foie, les reins, le cœur et la rate (Hussain and Ramaiah, 2007). Ces études suggèrent que l'UPR devient invalide avec l'âge, permettant potentiellement l'accumulation des protéines mal repliées et ensuite l'augmentation du niveau du stress de RE ce qui entraîne un dysfonctionnement cellulaire et des maladies associés au vieillissement (Taylor, 2016).

3.2. Stress du RE et cerveau

Le stress du réticulum endoplasmique est associé à différentes situations de formation des agrégats des protéines mal repliées entre elles, même avec des protéines normales de la cellule. L'accumulation de ces agrégats de protéines dans le cerveau ou bien dans les cellules neuronales périphériques peut provoquer des maladies associées à la neurodégénérescence (Oyadomari and Mori, 2004).

Le développement des synapses et la modulation de leur stabilité sont importants pour la mémorisation et l'apprentissage. SIRT1 joue un rôle important dans ce processus. Les animaux SIRT1 knock-out qui ont comme phénotype un taux élevé du stress de RE, présentent des altérations morphologiques de la structure neuronale comme par exemple : des dendrites avec une complexité réduite et des branches plus courtes (Michan et al., 2010). Des études utilisant la microscopie électronique pour examiner la morphologie synaptique montrent que l'inhibition de SIRT1 diminue le nombre des synapses connectés avec les neurones hippocampiques (Dietrich et al., 2010). D'un point de vue fonctionnel, les souris *SIRT1* KO ont une mémoire hippocampique altérée qui est associée à une diminution de la potentialisation à long terme dans la région CA1 de l'hippocampe. L'expression des gènes hippocampiques a été examinée par analyse de puces à ADN, les gènes pour la fonction synaptique, la myélinisation et la fonction métabolique ont été modifiés chez les souris knock-out (Michan et al., 2010).

D'autre part, les souris knock-out *SIRT1* dans le cerveau ont une plasticité synaptique réduite. SIRT1 interagit avec un complexe répresseur contenant le facteur de transcription YY qui régule négativement l'expression de miR-134, et ce microARN spécifique au cerveau régule à son tour l'expression de CREB (cAMP response binding protein) et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau BDNF (Gao et al., 2010) (figure 6). Une étude ultérieure a confirmé que les niveaux de miR-124 et miR-134 ont diminué après traitement au resvératrol (Zhao et al., 2013). CREB et BDNF ont augmenté tandis que la capacité de mémorisation et l'induction de potentialisation à long terme (LTP) se sont améliorées chez les animaux traités (Zhao et al., 2013).

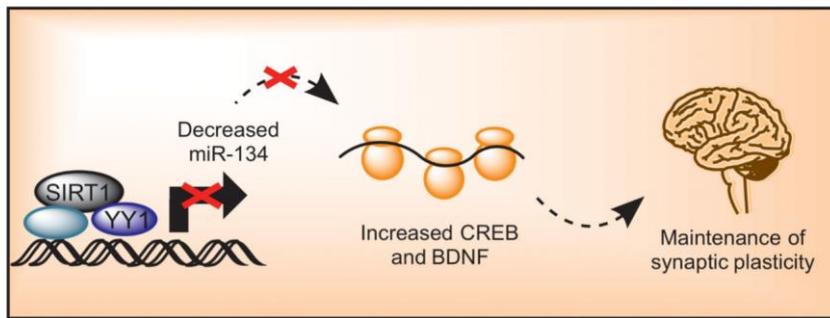


Figure 6 : La régulation de l'apprentissage et de la mémoire par SIRT1

Dans l'hippocampe, SIRT1 affecte la plasticité synaptique via un complexe répresseur contenant le facteur de transcription YY, qui régule le microARN-134 (miR-134). Ce microARN spécifique au cerveau régule l'expression de l'AMPc response binding protein (CREB) et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Gao et al., 2010). Ces protéines sont importantes pour la formation de synapses et la potentialisation à long terme. Les souris knock-out *SIRT1* ont une mémoire altérée qui est associée à une potentialisation à long terme diminuée dans la région CA1 de l'hippocampe (Gao et al., 2010).

4. SIRT1 et ER stress

4.1 SIRT1 et longévité

SIRT1 est une désacétylase, dépendante de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) qui est traditionnellement liée à la restriction calorique et au vieillissement chez les mammifères (Herskovits et Guarente, 2014). SIRT1 est l'une des sept sirtuines de mammifères.

Peu ou pas de thérapies pharmacologiques sont classifiées comme thérapies qui peuvent retarder systématiquement le vieillissement et prolonger la durée de vie.

Plus récemment, plusieurs études ont été faites pour exploiter les avantages reconnus de la restriction calorique sur la longévité et la préservation de la santé. La restriction calorique est la seule intervention connue pour retarder le vieillissement de la plupart des organismes et retarder l'apparition des maladies chez les mammifères (Baur et al., 2015).

Plusieurs voies de signalisation ont été rapportées, qui peuvent moduler les effets de la restriction calorique sur le vieillissement (Spindler, 2010). Divers composants

individuels de ces voies ont été validés comme cibles pour le développement de médicaments grâce à des études sur des modèles transgéniques. Parmi les cibles identifiées dans ces études, on peut citer SIRT1 qui joue des rôles réglementaires entre la détection des nutriments, le métabolisme énergétique et la stabilité du génome (Yu et Auwerx, 2010).

SIRT1 peut exercer de nombreux effets différents qui sont pertinents pour la santé et pourraient avoir un rôle dans la modulation de la durée de vie via la restriction calorique. Ceux-ci incluent : la promotion de la sensibilité à l'insuline (Bordone et al., 2007), la modulation des rythmes circadiens (Asher et al., 2008), l'amélioration de la stabilité du génome (Oberdoerffer et al., 2008), la suppression des tumeurs (Firestein et al., 2008), la réduction de l'inflammation (Yoshizaki et al., 2009), la protection contre les maladies neurodégénératives (Jeong et al., 2011) et même le contrôle de l'anxiété chez la souris (Libert et al., 2011). Cependant, le ciblage de SIRT1 peut finalement être intéressant, voire nécessaire, compte tenu de la pathogenèse multifactorielle du vieillissement et des maladies associées au vieillissement (Baur, 2010).

Comme le resvératrol ou la surexpression de SIRT1, les nouveaux activateurs SIRT1 comme SRT1720 peuvent augmenter la durée de vie, améliorer la sensibilité à l'insuline et atténuer les autres effets nocifs de l'obésité chez la souris (Minor et al., 2011). Les études chez les animaux knock-out ont montré que l'absence de SIRT1 provoque des troubles métaboliques (Boily et al., 2008) et altère la fonction cognitive normale (Michan et al., 2010), tandis que sa surexpression induit plusieurs effets protecteurs contre le stress métabolique, montrant clairement que cette enzyme a un rôle majeur dans la physiologie des mammifères.

SIRT1 désacétyle les résidus lysine dans l'histone 1, l'histone 3 et l'histone 4, indiquant un rôle potentiel pour SIRT1 dans la régulation de la transcription et de la stabilité génomique dépendante de l'âge via la modification de la chromatine (Vaquero et al., 2007), (Wang et al., 2008). Cependant, plusieurs rôles de SIRT1 impliquent la désacétylation de cibles non-histones pour réguler le métabolisme et les maladies métaboliques.

SIRT1 se situe à l'interface entre les diverses voies d'adaptation qui régulent la résistance au stress et le métabolisme cellulaire (dépense énergétique), ce qui suggère qu'il pourrait être bien sélectionné comme cible thérapeutique pour moduler la durée de vie pendant la restriction calorique (figure 7) (Baur et al., 2015).

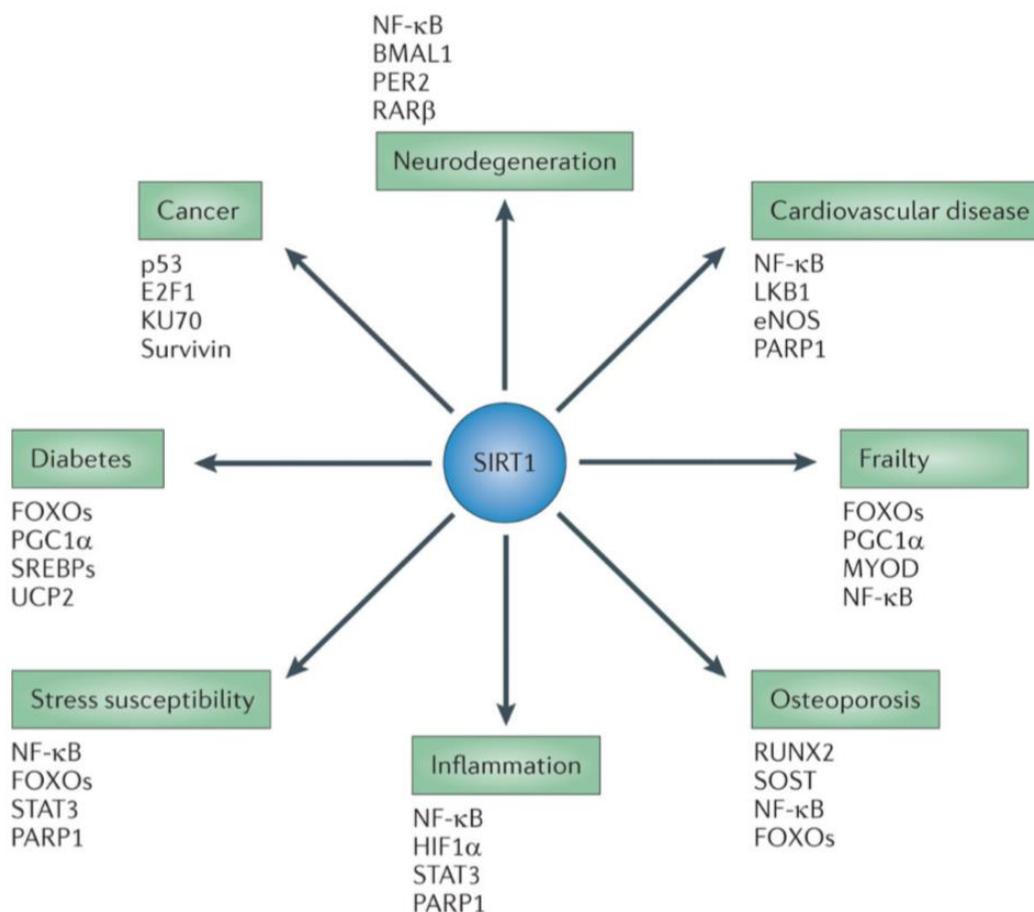


Figure 7 : Effets de SIRT1 sur les maladies liées à l'âge

SIRT1 est un médiateur crucial des réponses physiologiques adaptatives à la disponibilité énergétique. L'activation de SIRT1 a des effets bénéfiques dans plusieurs maladies liées à l'âge, en particulier celles associées à une dérégulation métabolique. Plusieurs cibles de SIRT1 associés à des pathologies ou conditions particulières. BMAL1 : brain and muscle ARNT-like 1; E2F1 : E2F transcription factor 1; eNOS : endothelial nitric oxide synthase; FOXO : forkhead box protein O; HIF1α : hypoxia-inducible factor 1α; KU70 : DNA repair factor KU70; LKB1 : liver kinase B1; MYOD : myoblast determination protein; NFκB : nuclear factor-κB; p53 : tumour suppressor p53; PARP1 : poly(ADP-ribose) polymerase 1; PER2 : period circadian protein homolog 2; PGC1α : PPARγ co-activator 1α; RARβ : retinoic acid receptor-β; RUNX2 : runt-related transcription factor 2; SOST : sclerostin; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3; UCP2 : uncoupling protein 2 (Baur et al., 2015).

Contrairement aux effets de l'augmentation de l'activité de SIRT1, la perte de fonction de SIRT1 altère le métabolisme énergétique (Boily et al., 2008), la cognition et la plasticité synaptique et peut affecter aussi la durée de vie (Michan et al., 2010). Des exemples de voies de signalisation clés contrôlées par SIRT1 qui sont susceptibles

d'être impliquées dans ses effets bénéfiques sur le métabolisme et le vieillissement comprennent: la régulation négative de l'activité de p53 (Luo et al., 2001), la suppression des voies inflammatoires médiées par le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) (Yeung et al., 2004), la modulation des facteurs de transcription FOXO (Brunet et al., 2004), la suppression des voies d'adipogénèse médiée par le récepteur (PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor- γ) (Picard et al., 2004), l'activation du co-activateur PPAR γ 1 α (PGC1 α), favorisant ainsi la mobilisation des graisses et augmentant la taille et le nombre de mitochondries (Nemoto et al., 2005).

Il existe de nombreuses autres cibles de SIRT1 qui sont impliquées dans la réponse au stress et la réparation de l'ADN, qui soutiennent le rôle de SIRT1 dans le vieillissement chez l'homme (Baur, 2010) (figure 7).

Compte tenu des nombreuses cibles et voies différentes qui sont connues pour être modulées par SIRT1, l'activation de cette enzyme a été suggérée comme ayant des effets bénéfiques dans plusieurs processus pathologiques.

4.2 SIRT1 et régulation du métabolisme

La gluconéogenèse est un processus cytosolique qui augmente la production de glucose, principalement du foie, dans des situations où l'apport d'énergie est limité, comme pendant le jeûne, la restriction caloriques et durant l'exercice (Bouche et al., 2004). Curieusement, SIRT1 a un rôle double et controversé dans le contrôle de la gluconéogenèse. D'une part, SIRT1 peut supprimer la production du glucose hépatique par désacétylation du facteur de transcription CRTC2 (CREB-regulated transcription coactivator 2), entraînant une dégradation de CRTC2 et une réduction conséquente de la transcription des gènes gluconéogéniques (figure 8) (Liu et al., 2008). D'autre part, SIRT1 peut également stimuler le programme de transcription gluconéogénique en désacétylant et en activant FOXO1 (Frescas et al., 2005) et PGC1 α (Rodgers et al., 2005) (figure 8).

SIRT1 est aussi impliqué dans le contrôle de la glycolyse en activant PGC1 α , qui atténue la transcription des gènes glycolytiques (Rodgers et al., 2005).

Concernant le métabolisme lipidique, SIRT1 désacétyle LXR, un récepteur du foie qui est impliqué dans la synthèse des lipides et augmente par la suite son activité (Li et al., 2007). Par conséquent, l'activation de SIRT1 pourrait théoriquement augmenter la synthèse des acides gras.

Dans les lignées cellulaires adipocytaires différenciées, SIRT1 inhibe l'adipogenèse et favorise la mobilisation de graisse par lipolyse (Picard et al., 2004) en supprimant l'activité de PPAR γ qui est un récepteur nucléaire et le régulateur principal de la différenciation des adipocytes (Heikkinen et al., 2007).

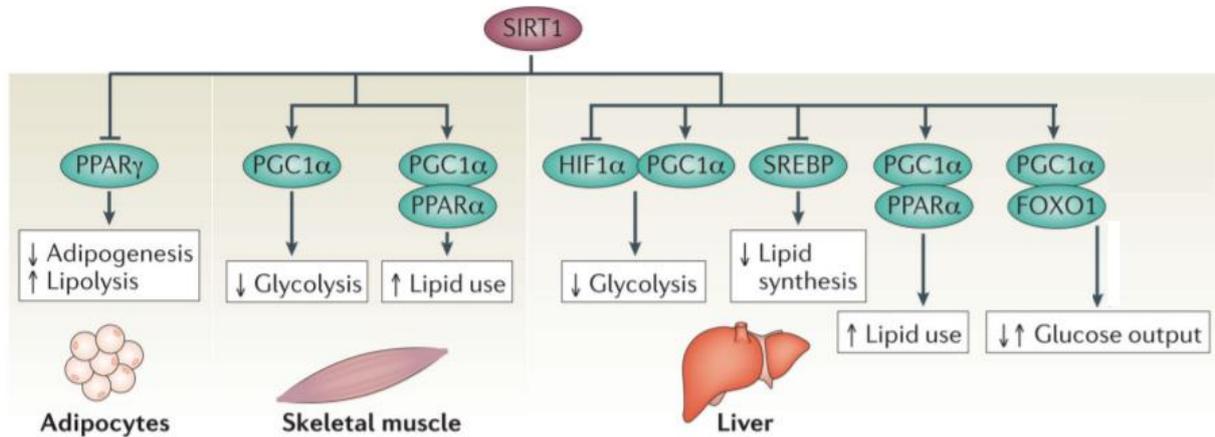


Figure 8 : Illustration des rôles de SIRT1 dans la régulation des voies impliquées dans le métabolisme du glucose

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ; PGC1-alpha : PPAR γ coactivator 1-alpha ; PPAR-alpha: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha ; HIF1alpha : Hypoxia-inducible factor 1-alpha ; SREBP: Sterol regulatory element-binding proteins (facteur de transcription) ; FOXO1: Forkhead box protein O1 (facteur de transcription) (Houtkooper et al., 2012).

4.3 SIRT1 et autophagie

L'autophagocytose est un mécanisme de nettoyage des cellules, qui peut dégrader et débarrasser la cellule des molécules et des organites aberrantes et non fonctionnelles (Salminen et Kaarniranta, 2009). L'autophagie est également un domaine émergent dans les études de longévité. Plusieurs études ont identifié un rôle direct de SIRT1 dans la régulation de l'autophagocytose (autophagie) (Lee et al., 2008).

La désacétylase SIRT1 est un régulateur important de la dégradation autophagique *in vitro* et *in vivo*. SIRT1 peut former des complexes moléculaires avec plusieurs des protéines ATG telles que Atg5, Atg7 et Atg8. Ces protéines sont les principaux régulateurs de la macroautophagie (Geng et Klionsky, 2008).

L'absence de SIRT1 augmente considérablement le niveau d'acétylation de ces protéines d'autophagie (ATG) et donc diminue son activation, non seulement dans les cellules cultivées mais aussi dans les tissus embryonnaires. Cohérent avec ces observations, les fibroblastes embryonnaires de souris SIRT1 $-/-$ sont incapables

d'entreprendre l'autophagie dans les conditions de carence nutritionnelles (Lee et al., 2008), ce qui confirme que la désacétylation des ATG par SIRT1 est nécessaire pour le déroulement de l'autophagie.

D'autre part, SIRT1 peut réguler par désacétylation la fonction de plusieurs facteurs de transcription, tels que les protéines FoxO et p53 (Feige et al., 2008). Ces protéines qui font partie des facteurs de longévité subissent des interactions avec SIRT1 pour réguler l'autophagie, comme il a été montré que SIRT1 peut désacétyler p53 et inactiver ainsi son activité transcriptionnelle (Vaziri et al., 2001). Des études ultérieures ont démontré que p53 est un répresseur de l'autophagie (Tavernakis et al., 2008). Cela montrant ainsi que SIRT1 est capable de réguler l'autophagie également via ces voies (Figure 9).

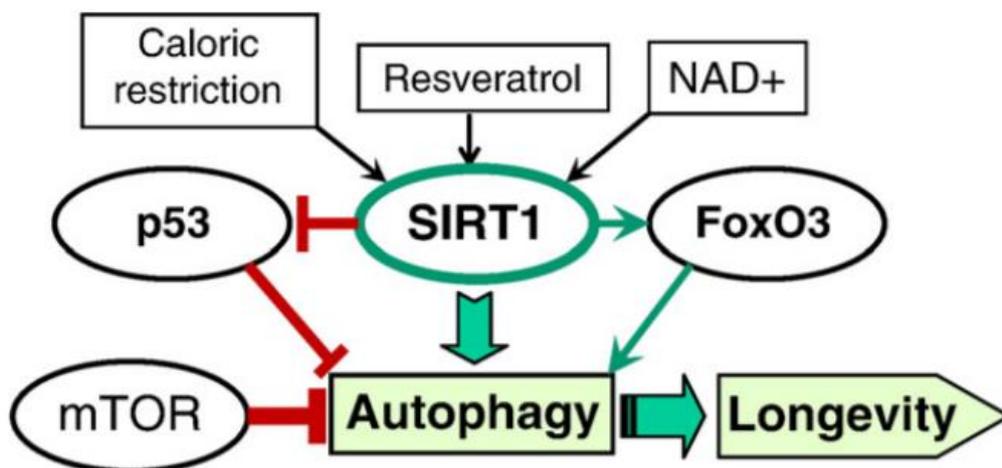


Figure 9 : Illustration schématique de la régulation du réseau de signalisation SIRT1 dépendant qui régule l'autophagie

Les flèches indiquent les voies d'activation tandis que les lignes rouges avec les barres d'arrêt représentent les interactions inhibitrices (Salminen et Kaarniranta, 2009).

IV. Activateurs de SIRT1

1. Resvératrol

À l'heure actuelle, le nombre d'études qui ont été menées sur les effets du resvératrol chez l'homme est limité, mais plusieurs résultats ont été publiés, suggérant qu'au moins certains des avantages métaboliques observés chez la souris peuvent être observés de manière similaire chez l'homme (Smoliga et al., 2011). L'administration d'une faible dose de resvératrol (5 mg) deux fois par jour pendant 4 semaines peut

améliorer la sensibilité à l'insuline et diminue le stress oxydatif (Brasnyo et al., 2011). Ainsi, les résultats à ce jour des études cliniques confirment que les effets métaboliques bénéfiques du resvératrol chez l'homme sont similaires à ceux observés dans les expérimentations animales.

Il a été démontré que le resvératrol amène une neuroprotection dans les modèles animaux de déficience cognitive vasculaire, y compris la prévention des lésions neuronales ainsi que des déficiences comportementales et/ou cognitives induites par l'ischémie cérébrale (Girbovan et al., 2012), et il a également été démontré qu'il protège les cellules neuronales contre la toxicité de la polyglutamine dans les modèles des cellules en culture (Della-Morte et al., 2009).

De nouvelles preuves suggèrent que le traitement avec le resvératrol ou la surexpression de SIRT1 ont également un effet protecteur dans des modèles de la maladie de Parkinson (Mudo et al., 2012).

2. Les STACs

Compte tenu de la controverse entourant le mécanisme d'action du resvératrol et sa spécificité (Kaeberlein et al., 2005), il y a eu un intérêt considérable pour la conception de nouveaux activateurs de SIRT1 qui sont potentiellement plus puissants et spécifiques. Les STACs (sirtuin-activating compounds) sont des petits composés synthétiques qui sont structurellement distincts du resvératrol et qui ont un puissant pouvoir activant SIRT1 (Milne et al., 2007). Il a été rapporté que ces composés se lient à SIRT1, abaissant la constante de Michaelis (K_m) pour les substrats acétylés et entraînant des améliorations des réponses physiologiques *in vivo* et *in vitro*.

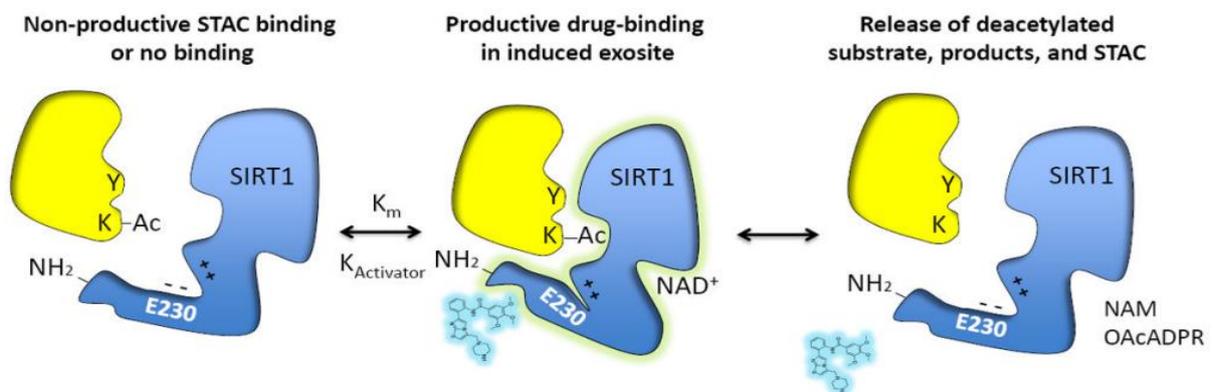


Figure 10 : Mécanisme proposé pour l'activation allostérique de SIRT1 par les STACs

(Hubbard et Sinclair, 2014). SIRT1 désacétyle les protéines cibles (jaune) en utilisant NAD⁺ comme cosubstrat pour générer un produit désacétylé. La liaison de substrats avec des motifs hydrophobes à proximité du le site acétyle induit un changement de conformation lors de la liaison, formant un exosite spécifique qui permet aux activateurs de se lier de manière productive et à leur tour de stabiliser le substrat ancré. L'extrémité C-terminales chargée positivement au niveau de E230K, interagit avec la charge négative de E230 pour aider le complexe enzyme-STAC-substrat.

Le développement des activateurs de SIRT1 (STACs) avec une biodisponibilité et une spécificité améliorée pour l'activation de SIRT1, montre que ces activateurs SIRT1 sont 1000 fois plus efficaces *in vitro* que le resvératrol (Milne et al., 2007). Parmi les STACs des différentes générations (figure 11), on peut citer : SRT1720, SRT2104, SRT1460, SRT2183, SRT3025 ...

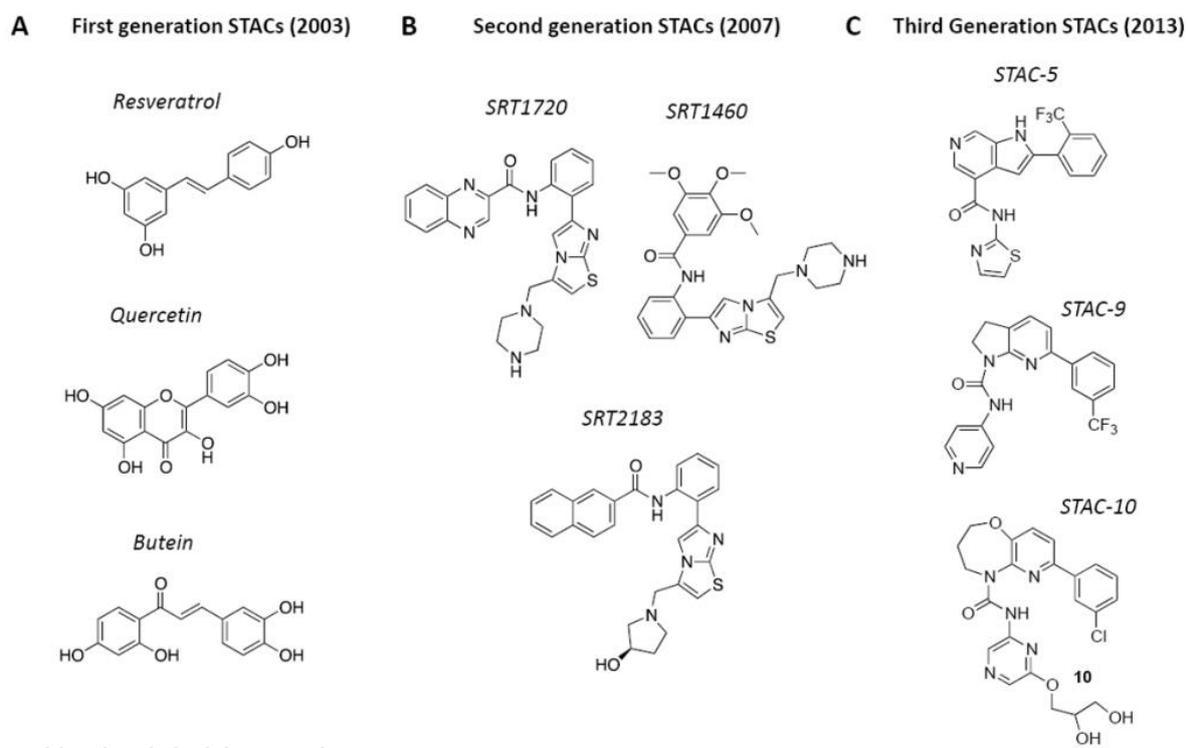


Figure 11: Composés d'activation des sirtuines (STAC) qui prolongent la durée de vie et / ou la santé

Les petites molécules activatrices de SIRT1 sont classées en (A) des molécules de première génération telles que le resvératrol et like polyphénols, (B) les STAC de deuxième génération tels que SRT1720, SRT1460 et SRT2183 et (C) STAC de troisième génération tels que les STAC-5, -9 et -10 (Hubbard et Sinclair, 2014).

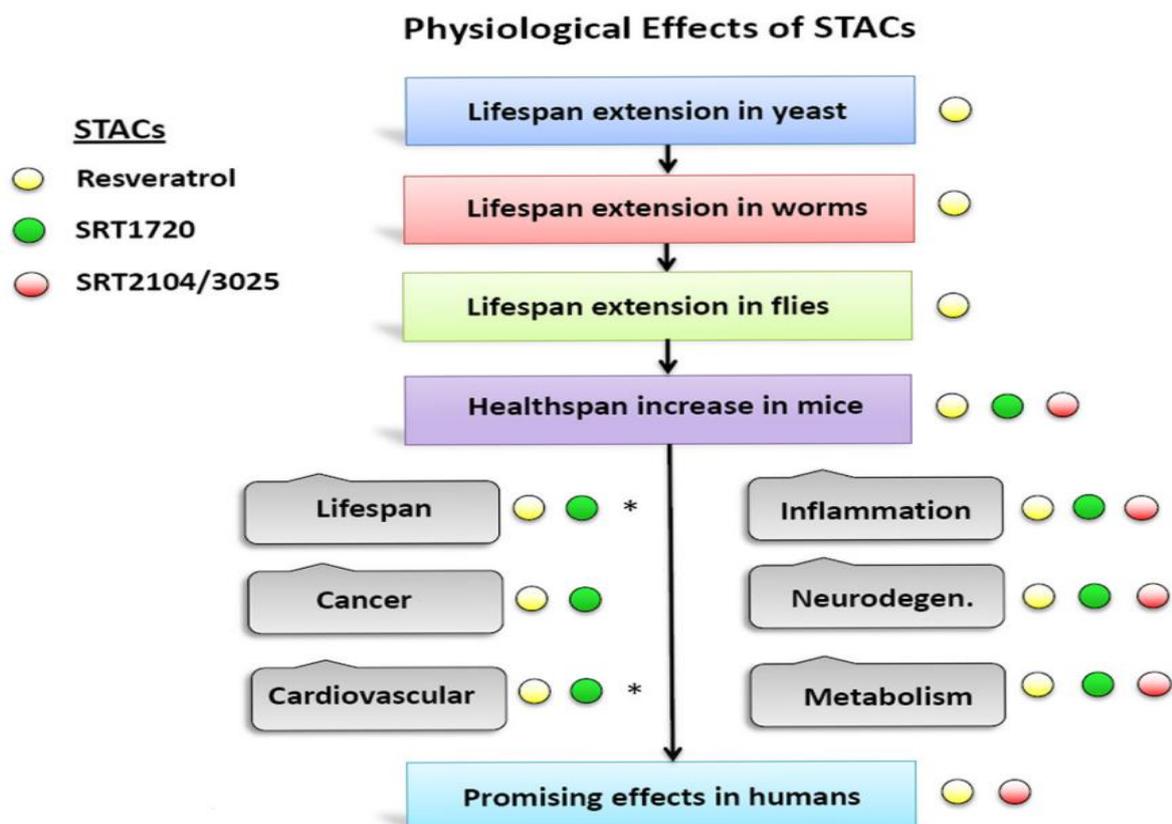


Figure 12 : Illustration des effets des STACs sur le vieillissement et les maladies liées à l'âge.

Resvératrol (jaune), SRT1720 (vert), SRT2104 et SRT3025 (rouge). Les maladies liées à l'âge sur le panneau de droite qui sont améliorées par les STAC sont indiqués avec les couleurs correspondantes aux STACs. Les astérisques indiquent des études en cours.

Aspects neurologiques dans le cadre des maladies rares du métabolisme de la Cbl

Après le développement des aspects moléculaires liés au stress oxydatif, stress du réticulum et les possibles approches mécanistiques envisagées, notre projet est centré sur la physiopathologie des patients ayant des maladies rares du métabolisme de la Cbl et leurs troubles neurofonctionnels et notamment cognitifs. Selon la littérature, le système limbique et particulièrement l'hippocampe sont des structures sensibles à toute modification de statut endogène (génétique, métabolique) et/ou exogène environnemental conduisant à des déficits de développement et/ou fonctionnels-comportementaux.

V. L'hippocampe (généralités et anatomie)

L'hippocampe est situé au niveau du télencéphale. Il fait partie du système limbique et est essentiel pour l'apprentissage, la mémoire et la cognition. C'est l'une des structures cérébrales les plus étudiées en neuroscience (Zeidman et Maguire, 2016). Elle se développe et mûrit principalement durant la période pré-natale. Sa ressemblance en dissection avec un hippocampe a inspiré son nom d'après cette créature marine (genre hippocampus).

L'hippocampe est une structure relativement grande en forme de noix de cajou située juste sous le néocortex. Une coupe transversale révèle la représentation anatomique de la connectivité classique de l'hippocampe, ce qui permet de raisonner sur les transmissions synaptiques successives sièges de la plasticité cognitive (Figure 13). Le cortex entorhinal fournit l'entrée corticale majeure à l'hippocampe, avec ses fortes projections via les fibres perforantes vers la région du gyrus denté (GD) (Synapse 1). La GD projette dans la région CA3 via la voie des fibres moussues (Synapse 2). Ensuite CA3 projette dans la région CA1 en passant par la région CA2 via les voies collatérales de Schaffer (Synapse 3). Enfin, CA1 projette à nouveau au cortex entorhinal, complétant ainsi la boucle pouvant réactiver l'hippocampe (Knierim, 2015).

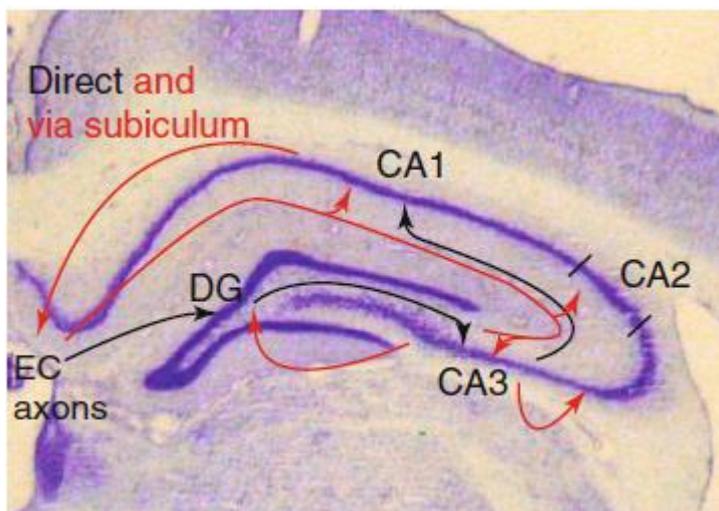


Figure 13 : Coupe transversale au niveau de l'hippocampe de souris

Les lignes noires retracent la boucle trisynaptique classique. Les lignes rouges représentent d'autres voies dans l'hippocampe, y compris les projections directes du cortex entorhinal (EC) vers les trois champs du CA, le retour

d'information au CE via le subiculum, le circuit collatéral récurrent de CA3, et la projection de rétroaction de CA3 à DG (Knierim, 2015).

VI. Plasticité synaptique

1. Généralités

La plasticité synaptique est un phénomène dynamique qui existe tout au long de la vie. Au cours du développement, elle permet de sélectionner les synapses les plus efficaces et d'établir des réseaux neuronaux performants. Elle permet de créer ou de détruire des synapses, d'augmenter ou de diminuer le niveau de transmission de certaines d'entre elles et ainsi de s'adapter aux conditions imposées par l'environnement. Ces modifications de fonctions passent par des changements de l'architecture des synapses, en particulier par des transitions très rapides de la localisation de récepteurs synaptiques comme les récepteurs au Gaba ou au glutamate (Anand and Scalzo, 2000).

Après leur création et selon le niveau de stimulation, certaines synapses sont renforcées tandis que d'autres sont éliminées pour à terme, conserver les circuits les plus efficaces. La plasticité synaptique est donc la faculté que les synapses ont de changer leurs propriétés en fonction du contexte et de l'usage qui en est fait (Postnikova et al., 2017).

La plasticité synaptique en période périnatale, l'apprentissage et la mémorisation sont sujets à une cinétique de régulation dépendante du neurodéveloppement. Un grand nombre de régulations épigénétiques et épigénomiques interviennent dans la modulation du programme neurogénique comme la méthylation de l'ADN, la méthylation et l'acétylation des histones ou la régulation par de petits ARN non-codants appelés microARNs (miRs) (Pourié et al., 2015 ; Kerek et al., 2017). De tels mécanismes peuvent être influencés par des facteurs nutritionnels, parmi lesquels les nutriments donneurs de méthyles comme la vitamine B12. Ainsi, l'exposition précoce à une déficience en nutriments donneurs de méthyles est susceptible de perturber les mécanismes épigénétiques et épigénomiques en lien avec la méthylation (James et al., 2002) et d'altérer le développement, avec des effets potentiels à long terme (Attig et al., 2010 ; Goeffroy et al., 2016, 2019).

2. Les acteurs de la plasticité synaptique

La plasticité synaptique dans ces structures implique une régulation très fine de l'expression, de la fonctionnalité et de la dynamique membranaire de ces récepteurs (Figure 14) :

- par des interactions avec des protéines auxiliaires qui régulent l'adressage à la membrane, la localisation/stabilisation des synapses, et les propriétés pharmacologiques en termes d'efficacité des récepteurs : PICK1 et TARP en lien avec PSD95 pour les récepteurs AMPA, Neto pour les récepteurs Kainate, PSD95 pour les récepteurs NMDA et géphyrine/neuréxine pour les récepteurs GABA_A (Copits et al, 2012).

- par différentes voies de signalisation (Stat3, PKA, Src, PKC, MAPK) ayant pour cibles directement les récepteurs, leurs protéines auxiliaires ou encore la néosynthèse de ces récepteurs via le noyau et l'activation du facteur de transcription CREB. Ces différentes voies de signalisation peuvent être régulées par des facteurs épigénétiques comme les micro-ARN (miR124, let7, miR132).

Les acteurs principaux de la plasticité synaptique hippocampique, intervenant dans les processus de mémorisation à court et long terme, sont les récepteurs au glutamate (NMDAR, AMPAR, KainateR) et au gaba (GABA_AR) (Carta et al., 2014). Ces mêmes neurotransmetteurs sont également impliqués dans la coordination motrice, l'équilibre et la psychomotricité impliquant des structures cérébrales comme le striatum et le cervelet. Cependant ces différentes structures cérébrales présentent des fenêtres de mise en place et de maturation différentes au cours du neurodéveloppement. L'hippocampe se développe et mature principalement durant la période pré-natale tandis que le cervelet se modifie encore beaucoup de manière structurale après la naissance. Ainsi, certains impacts environnementaux n'auront pas les mêmes effets sur toutes les structures cérébrales en fonction de ces fenêtres temporelles (Hassan et al., 2019).

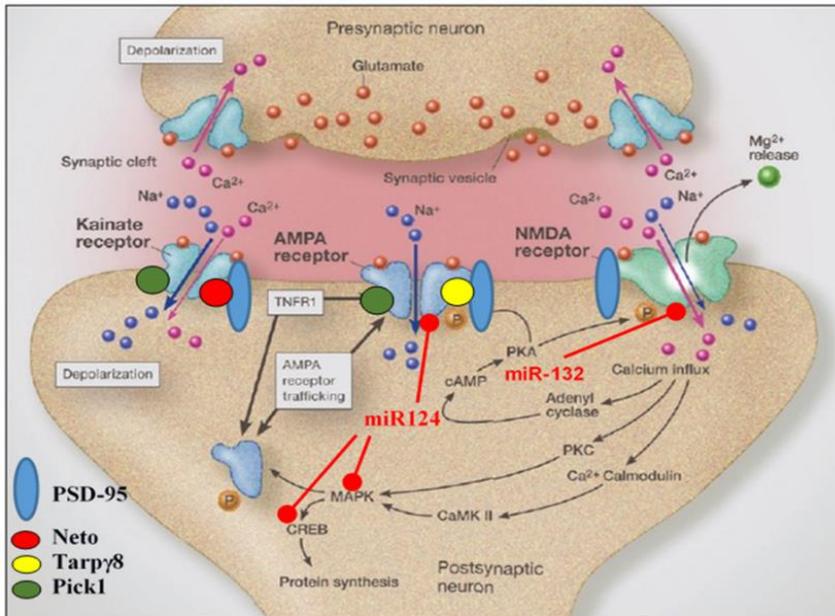


Figure 14 : La synapse glutamatergique

(modifié d'après *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science 2008).

3. Conséquences de l'altération de la plasticité

Ce processus est indispensable au bon fonctionnement cérébral et l'altération des mécanismes de la plasticité synaptique est souvent liée à des défauts d'apprentissage et de mémorisation, des problèmes psychomoteurs, comportementaux et à des déficiences intellectuelles, qui sont retrouvés dans un certain nombre de pathologies, comme l'autisme, la schizophrénie, l'épilepsie et les pathologies neurodégénératives (Edbauer et al., 2010 ; Wang et al., 2013). L'hippocampe joue un rôle crucial dans les phénomènes de mémorisation, et plus particulièrement par le biais d'une boucle de mémorisation appelée le circuit de Papez qui sera aussi affecté lors de l'altération de la plasticité synaptique (Papez, 1995 ; Eggers, 2007).

VII. Travaux antérieurs du laboratoire sur les conséquences de la diminution de l'expression de SIRT1 dans les altérations du métabolisme de la vitamine B12

SIRT1 régule le métabolisme énergétique cellulaire par la désacétylation des facteurs de transcription et des cofacteurs du métabolisme énergétique (Kaeberlein et al., 1999). Plusieurs études, dont celles réalisées dans notre laboratoire, ont confirmé le lien entre l'expression de SIRT1 et l'homéostasie du stress oxydant et du métabolisme énergétique mitochondrial d'une part, et le lien entre la diminution de cette expression et l'induction du stress du RE d'autre part.

1. Rôle de SIRT1 et de PGC-1 α dans les dérèglements métaboliques dans le foie, le cœur et le cerveau dans les modèles de carence en B12 et B9, et les modèles de maladies héréditaires.

Le modèle de rat mère-descendance ayant un régime pauvre en vitamine B12 et en folate pendant la grossesse et l'allaitement présente plusieurs syndromes métaboliques, y compris un petit poids à la naissance, une augmentation de la masse grasse centrale, du foie gras et du cœur gras (Garcia et al., 2011 ; Pooya et al., 2012 ; Guéant et al., 2013).

La stéatose hépatique résulte d'une altération de la β -oxydation des acides gras et d'une altération du métabolisme énergétique mitochondrial. Elle est réversible lorsque les animaux sont nourris par la suite avec une alimentation normale. La stéatose s'explique par un déficit de la synthèse de carnitine et par l'hypométhylation et la diminution de l'expression de PPAR- α , ERR- α , ER- α et du récepteur nucléaire spécifique du foie HNF-4 α , et une hypométhylation du co-activateur PGC1- α par diminution de l'activité de PRMT1 (Pooya et al., 2012). L'hypométhylation de PGC1- α participe à la dérégulation de la β -oxydation des acides gras et du métabolisme de la vitamine D en réduisant son partenariat et sa co-activation de PPAR- α , ERR- α , HNF-4 α (Guéant et al., 2013 ; Feigerlova et al., 2016).

Le déficit en vitamine B12 et en folate pendant la gestation et la lactation des rongeurs induit une hypertrophie cardiaque, avec une oxydation altérée des acides gras

mitochondriaux et une diminution de l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire, chez les rats (Garcia et al. 2011). L'analyse protéomique montre une abondance altérée de protéines associées au métabolisme des lipides. Ces protéines sont impliquées dans l'oxydation des acides gras et la respiration mitochondriale (Garcia et al. 2011). Ces changements sont liés à la diminution de l'expression de PPAR- α et du récepteur alpha associé aux œstrogènes (ERR- α) et à l'hypométhylation et l'hyperacétylation de PGC-1 α par une diminution de l'expression et de l'activité de PRMT1 et de SIRT1 et une diminution du rapport SAM/SAH. Il est à noter que la diminution de l'expression de SIRT1 est également une caractéristique moléculaire de la surnutrition.

La carence en vitamine B12 et en folate pendant la grossesse et la vie post-natale altère le bon développement du cerveau dans les modèles animaux. L'accumulation d'homocystéine déclenche un stress oxydant des protéines cargo fonctionnelles impliquées dans le transport des neurotransmetteurs par le biais de dérégulations des récepteurs nucléaires, comme observé dans le cœur et le foie. En particulier, la méthylation/acétylation déséquilibrée de PGC1- α perturbe l'activation de ER α avec une neuroplasticité du cervelet altérée par la suite par une altération de l'expression des synapsines (Pourié et al., 2015).

La souris *Cd320* KO est un modèle pour étudier les mécanismes pathologiques et les déficits comportementaux associés aux maladies héréditaires du métabolisme des monocarbones (Arora et al., 2019). Par rapport aux animaux contrôles, ce modèle de souris transgénique présente un apprentissage visuo-spatial altéré qui pourrait être atténué par une élévation de l'attention globale via un stress modéré avec une augmentation du cortisol plasmatique (Dreumont et al., 2021). Au niveau moléculaire, la voie du récepteur nucléaire des glucocorticoïdes (GR)/PPAR-gamma co-activateur-1 alpha (PGC-1 α) est altérée, avec une diminution de l'expression de GR, une diminution de la méthylation de GR et de PGC1- α et une diminution de la dimérisation et de l'interaction de GR avec PGC1- α (Dreumont et al., 2021). Cela conduit à une activité synaptique altérée mise en évidence par une interaction réduite entre le récepteur glutamatergique NMDA et la protéine post-synaptique PSD95 et une expression plus faible de Egr-1 et de la synapsine 1, par rapport aux animaux contrôles.

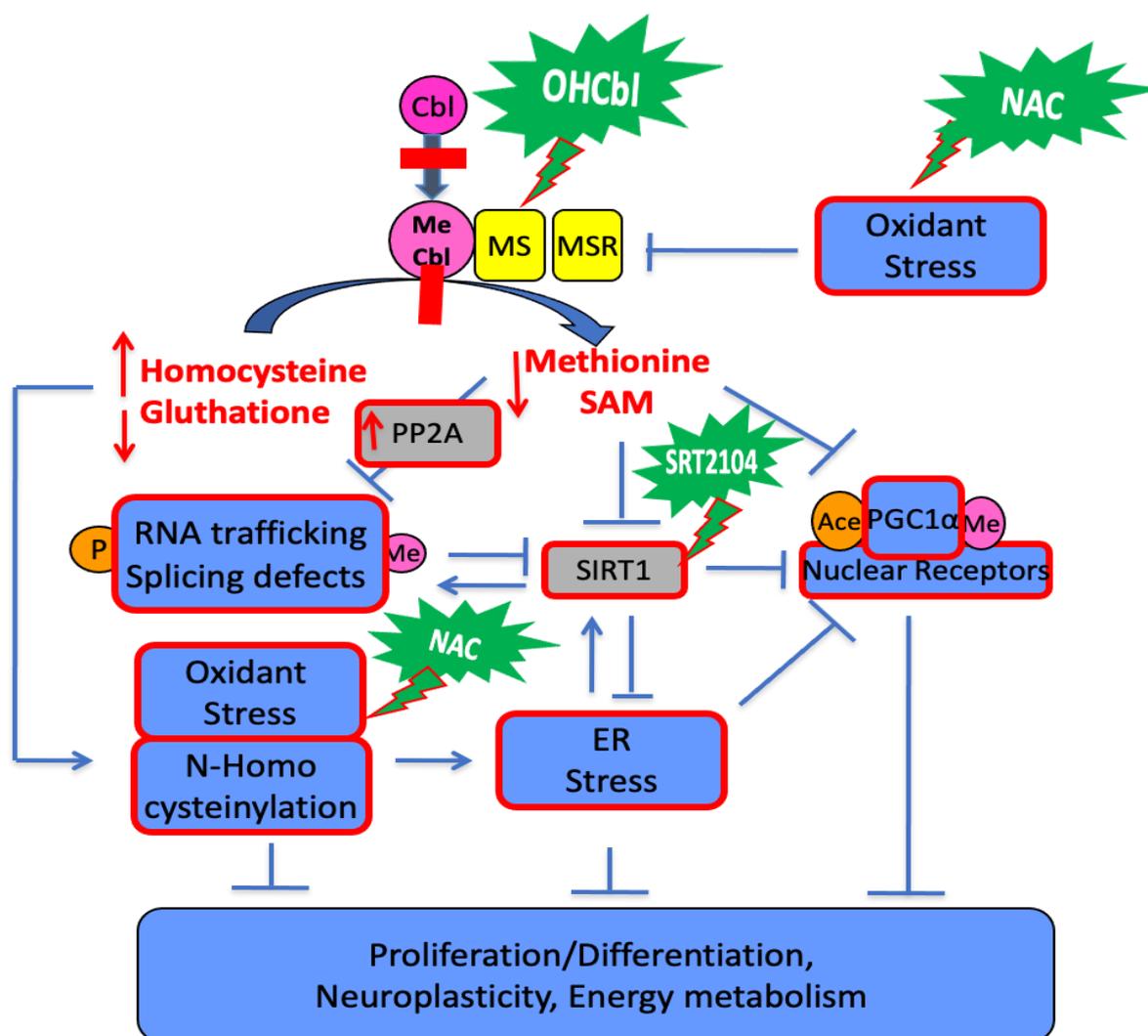


Figure VII. Pathomécanismes des causes nutritionnelles et héréditaires de l'altération de l'activité de la méthionine synthase (MS).

Les cellules sont plus sensibles au stress oxydant en raison de la diminution de la synthèse du glutathione et de l'accumulation d'homocystéine. La diminution de l'activité de la MS entraîne une augmentation de la protéine catalytique phosphatase 2A (PP2A) et une diminution de la synthèse de SAM qui produit une altération de la méthylation d'ADN et des protéines et une phosphorylation/méthylation déséquilibrée des protéines nucléocytoplasmiques de liaison à l'ARN, y compris ELAVL1/HuR, ce qui conduit à une diminution de l'expression de SIRT1. Le stress oxydant et la diminution de l'expression de SIRT1 déclenchent le stress du RE. La diminution de la synthèse de SAM et de l'activité de SIRT1 provoque une hypométhylation et une hyperacétylation du PGC1 α , qui désactive les récepteurs nucléaires PPAR- α , ER- α , ERR- α , HNF-4 α et VDR et entraînent une altération du métabolisme énergétique et de la neuroplasticité. La disponibilité réduite de Cbl conduit à la séquestration nucléaire

de HuR par un déséquilibre méthylation/acétylation. HuR est une protéine de liaison à l'ARNm connue pour stabiliser les ARNm riches en AU. La mauvaise localisation des protéines de liaison aux ARNm diminue l'expression de SIRT1 et des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique cellulaire et dans la neuroplasticité.

2. Le rôle du stress du réticulum endoplasmique, de la diminution de SIRT1 et de la modification de la navette nucléo-cytoplasmique des ARNm.

Les défauts génétiques du métabolisme du Cbl (IECM) impliquant des défauts de reméthylation produisent un stress oxydant, un niveau d'expression accru de MnSOD, des formes phosphorylées actives de kinases de stress p38 et JNK et un taux accru d'apoptose dans les fibroblastes de patients (Jorge-Finnigan et al., 2010 ; Richard et al., 2013). Ces données sont cohérentes avec la diminution significative du glutathion total et réduit, ainsi que l'augmentation significative du glutathion oxydé dans les lymphocytes des patients cblC par rapport aux témoins (Pastore et al. 2014). Richard et al ont montré une augmentation des niveaux d'ARNm et de protéines de HERP (protéine de stress du RE inducible par l'homocystéine) et d'autres marqueurs du stress du RE et des altérations de l'homéostasie et de l'autophagie du Ca²⁺ dans les fibroblastes des patients IECM (Martínez-Pizarro et al., 2016). La diminution de la disponibilité de la vitamine B12 induit spécifiquement un stress du RE par une diminution de l'activité d'expression de SIRT1. La désacétylation déficiente SIRT1-dépendante du facteur de choc thermique 1 (HSF1) diminue l'expression des protéines de choc thermique (HSP70 et HSP27) dans les cellules TO (Cellules ayant une disponibilité cellulaire altérée de la vitamine B12) et les fibroblastes de patients IECM (Ghemrawi et al., 2013). L'ajout de B12 ou des activateurs de SIRT1 et de HSF1, et la surexpression de SIRT1 et HSF1 réduisent considérablement l'activation des voies de stress du réticulum endoplasmique dans les cellules TO.

Inversement, altérer SIRT1 et HSF1 par siRNA ou ajouter un inhibiteur de SIRT1 conduit à un stress du RE dépendant de B12 dans les cellules témoins OT. L'ajout de B12 et de SAM abolit l'activation des transducteurs de stress et l'apoptose et augmente l'expression des chaperones protéiques dans les cellules OT cultivées en présence de thapsigargine, un puissant stimulateur de stress du RE. Ces données montrent que la vitamine B12 cellulaire et la SAM ont une forte influence modulatrice sur le stress du RE dans les cellules dopaminergiques N1E115 (Ghemrawi et al., 2013).

Le lien entre la diminution de l'expression de SIRT1 et le stress du RE des cellules ayant un dysfonctionnement du métabolisme de la B12 est lié à la localisation subcellulaire aberrante des protéines de liaison à l'ARN (RBP) dépendante du stress et à la perturbation du traitement de l'ARNm dans les cellules N1E115 TO vs OT (Battaglia-Hsu et al., 2018). La plupart des changements génomiques sont liés à la mauvaise localisation subcellulaire de HuR, dans ce modèle cellulaire, dans les fibroblastes IECM et chez les souris *Cd320* KO. La diminution de l'interaction de HuR avec le complexe de pores nucléaires CRM1/exportine et sa mauvaise localisation résultent de son hypométhylation par une diminution de la SAM et de la méthyltransférase CARM1 et de la déphosphorylation par une augmentation de la phosphatase PP2A. La phosphorylation joue un rôle de premier plan dans le transfert nucléocytoplasmique altéré des RBP et des ARNm dans les cellules de patients stressées, tandis que la diminution de la méthylation seule a un rôle modulateur mais non obligatoire dans ce transfert. HuR est le transporteur principal de l'ARNm de SIRT1 et d'autres transcrits cibles clés de gènes liés aux mécanismes pathologiques du déficit cellulaire en Cbl. Cela explique que la mauvaise localisation de HuR déclenche la diminution de l'expression de SIRT1 et d'autres gènes impliqués dans le développement du cerveau, la neuroplasticité, la formation de myéline et le vieillissement cérébral, dans l'analyse transcriptomique des cellules TO (Battaglia-Hsu et al., 2018). Les fibroblastes de patients cblC et cblG du métabolisme de la vitamine B12 présentent également un stress du réticulum endoplasmique, une méthylation altérée, une phosphorylation et une localisation subcellulaire anormale de HuR et d'autres RBP ainsi qu'une mauvaise localisation globale des ARNm (Ghemrawi et al., 2019). Nous avons étudié l'expression globale des gènes dans les fibroblastes de patients atteints de ces troubles héréditaires par RNA-seq. Les gènes les plus différenciellement exprimés sont fortement associés aux processus de développement, aux maladies neurologiques, ophtalmologiques et cardiovasculaires. Un nombre encore plus important de gènes sont différenciellement épissés et sont associés à des changements spectaculaires dans l'organisation du cytosquelette, la réponse au stress, la méthylation des macromolécules et la liaison à l'ARN.

Nous avons en outre évalué l'effet des activateurs de SIRT1 sur la correction de la localisation anormale des RBP comme stratégie potentielle dans le traitement des cas graves d'IECM résistant aux traitements classiques.

SRT1720, un activateur synthétique de SIRT1 inhibe le stress du RE et corrige la localisation des RBP et des ARNm ainsi que l'épissage du gène *IRF3* dans les fibroblastes des patients (Ghemrawi et al., 2019). Afin d'évaluer l'effet de SIRT1 in vivo, nous avons traité des souris *Mtr* KO et des souris Cd320 KO avec du SRT1720 tous les deux jours par administration orale pendant 2 semaines. Ce traitement est capable de restaurer le niveau de SIRT1 dans la région CA1 de l'hippocampe (Ghemrawi et al., 2019). SRT1720 a également diminué le stress cellulaire et la mauvaise localisation de HuR chez les souris *Mtr* KO par rapport aux souris contrôles. Il est à noter que SRT1720 améliore la capacité d'apprentissage déficiente dépendant de l'hippocampe des souris *Mtr* KO. Ainsi, nos travaux ouvrent des perspectives pour l'utilisation des composés activateurs de SIRT1 comme nouvelle stratégie thérapeutique pour traiter les IECM, en particulier pour les patients ayant une mauvaise réponse au traitement conventionnel (Ghemrawi et al., 2019).

Des contributions significatives sur les causes et les conséquences de l'activité altérée de la MS ont été produites au cours de la dernière décennie, mais nos connaissances à ce jour sont encore limitées. Malgré un lien direct entre le cycle de la méthionine et l'épigénome à travers la production de SAM, les conséquences de l'activité altérée de la MS sur la méthylation de l'ADN et des histones dans les organes et les tissus ont eu une attention insuffisante. Les conséquences cellulaires de l'augmentation de l'homocystéine produite par l'altération de l'activité de la MS devraient être étudiées plus en profondeur, en particulier la N-homocystéinylation de protéines fonctionnelles impliquées dans le cytosquelette et la signalisation cellulaire. On pourrait s'attendre à ce que la N-homocystéinylation des protéines cellulaires par MARS soit un mécanisme clé de la programmation et du vieillissement fœtal, comme l'illustrent les données récentes dans le cerveau humain et notre modèle de rat (Bossenmeyer-Pourie C et al., 2019).

Nos connaissances actuelles soulignent l'influence de la voie de reméthylation sur la prolifération cellulaire et la régénération tissulaire, la plasticité tissulaire, le métabolisme et l'adaptation au stress cellulaire. On peut donc supposer qu'une activité altérée de la méthionine synthase produit des conséquences spécifiques dans les organes et tissus impliqués dans les manifestations du déficit en B12 et des IECM en fonction de leur plasticité et de leur capacité à se régénérer. Ceci illustre la nécessité

d'étudier des modèles animaux avec invalidation sélective constitutive et inducible de la méthionine synthase, notamment dans le foie, le cerveau, le cœur et la moelle osseuse, en fonction de l'âge et des caractéristiques respectives des organes.

Un autre problème critique est de comprendre pourquoi certains patients présentent des manifestations neurologiques et des anomalies hématologiques limitées. L'influence de l'âge doit être considérée avec attention. Les mécanismes pathologiques des manifestations neurologiques ont été largement disséqués dans divers modèles cellulaires et animaux. En revanche, il y a un manque de connaissances dans la compréhension des mécanismes pathologiques de l'anémie macrocytaire ou mégaloblastique produite par les altérations de la voie de la reméthylation. La distribution de la vitamine B12 vers la MS ou la MUT via l'interactome de la MS avec ses partenaires protéiques dans le cytoplasme est l'un des mécanismes qui devrait être considéré en profondeur. Le fait qu'un excès d'acide folique puisse influencer la présentation métabolique et clinique des patients présentant un déficit en vitamine B12 et IECM devrait mériter davantage d'intérêt. Par exemple, des résultats récents montrent que l'acide folique inhibe l'activité de la méthionine synthase de *C. elegans* (Koseki et al., 2020).

En conclusion, la MS catalyse la reméthylation de l'homocystéine pour générer de la méthionine et du tétrahydrofolate, qui alimentent respectivement les cycles de la méthionine et du folate cytoplasmique et constitue une étape clé dans la synthèse de la S-adénosyl méthionine (SAM), le donneur de méthyle universel des réactions de transméthylation. L'activité altérée de la MS résulte d'un apport alimentaire inadéquat ou d'une malabsorption de B12 et d'erreurs innées du métabolisme de la Cbl (IECM). Depuis une décennie, les données sur les modèles cellulaires et animaux ont mis en évidence les principales conséquences de l'altération de l'activité de la MS, dans laquelle la diminution de SIRT1 joue un rôle central, notamment le stress du réticulum endoplasmique, l'altération de la navette nucléocytoplasmique des ARNm avec une altération dramatique de l'expression et de l'épissage des gènes et la désactivation des récepteurs nucléaires qui entraînent une altération du métabolisme énergétique et de la neuroplasticité. La réversibilité des mécanismes pathologiques clés de l'IECM dans les modèles cellulaires et animaux par les activateurs de SIRT1 ouvre des perspectives prometteuses dans le traitement des résultats des IECM résistantes aux

thérapies de supplémentation conventionnelles. Le défi permanent sera de traduire et de confirmer ces résultats en essais cliniques.

Objectifs

Les études précédentes de notre laboratoire ont montré dans différents modèles expérimentaux murins et humains que les dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 induisent un stress cellulaire important caractérisé par un stress du réticulum endoplasmique (RE) dans lequel la déacétylase SIRT1 joue un rôle majeur et un stress oxydatif (Battaglia-Hsu et al., 2018); (Ghemrawi et al., 2013) ; (Ghemrawi et al., 2019). De plus, des altérations structurelles et fonctionnelles des mitochondries associés à des dysfonctionnements du métabolisme des monocarbones avaient également été mises en évidence par l'étude du cœur et du foie de rats carencés en donneurs de méthyle (Garcia et al., 2011 ; Pooya et al., 2012). Ces différentes études ont montré que le stress du RE pouvait être inhibé par l'activation pharmacologique de SIRT1. Le rôle crucial de cette forme de stress cellulaire dans les mécanismes physiopathologiques associés aux dysfonctionnements du métabolisme de la cobalamine avait ensuite été démontré *in vivo*. En effet, l'utilisation de SRT1720, un activateur synthétique de SIRT1, dans un modèle de colite expérimental chez le rat carencé en vitamine B9 et B12 ou dans un modèle de déficit cognitif associé à une déficience en méthionine synthase dans les neurones de souris transgéniques a donné des résultats spectaculaires et très prometteurs (Melhem et al., 2015 ; Ghemrawi et al, 2019).

Suite à ces travaux de l'unité, mon sujet de thèse visait à continuer l'étude des effets de l'activation pharmacologique de SIRT1, *in vivo* et *in vitro* afin de contribuer au développement d'un traitement thérapeutique innovant pour les pathologies neurocognitives développées par les patients atteints par des maladies rares du métabolisme de la vitamine B12. Etant donné le rôle de SIRT1 dans la biogénèse des mitochondries et l'importance du métabolisme mitochondrial dans les manifestations neurologiques de nombreuses maladies rares, nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux aspects mitochondriaux. Notre objectif global est donc de traiter les symptômes neurologiques en appliquant une stratégie thérapeutique qui cible l'activité résiduelle de la MS mutée par l'OHcbl, le niveau élevé du stress oxydant par l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC) et l'activité de SIRT1 en lien avec le métabolisme énergétique mitochondrial via PGC1 α ainsi que le stress du RE par les activateurs de SIRT1. Cet aspect du sujet faisait partie intégrante d'un projet européen E-RARE, porté par JL Guéant et déposé en 2018.

Afin de réaliser cet objectif, mon sujet de thèse a été organisé en deux parties complémentaires :

1. La première partie de mon projet, réalisée avec des fibroblastes de patients cblC et cblG, porte sur la mise en évidence du stress cellulaire comme le stress oxydatif et le stress du réticulum endoplasmique ainsi que l'effet de ce stress sur la physiologie mitochondriale. D'autre part, cette partie consiste aussi à la sélection *in vitro* de l'activateur de SIRT1 qui sera utilisé pour la suite de nos expériences *in vitro* et *in vivo* en association avec l'antioxydant N-acétylcystéine et la cobalamine. Après la phase de sélection, le dernier objectif sera d'étudier l'efficacité de ce traitement sur les niveaux de stress et sur les altérations mitochondriales mises en évidence dans les cellules de ces patients.

2. La deuxième partie de mon projet a été réalisée avec des souris transgéniques déficientes en méthionine synthase au niveau neuronal. Un premier objectif visait à identifier les structures cérébrales atteintes et les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués par la mutation du gène *Mtr* dans le cerveau de souris transgéniques. Notre but était d'établir si ce dysfonctionnement du métabolisme de la vitamine B12 altère la mise en place fonctionnelle des réseaux neuronaux et la plasticité synaptique en perturbant les systèmes neurotransmetteurs-récepteurs l'expression, la localisation et/ou la fonctionnalité des récepteurs au glutamate et au Gaba.

Le deuxième objectif était de tester dans nos modèles animaux, l'efficacité de molécules innovantes qui auront été préalablement sélectionnées *in vitro* dans des fibroblastes de patients. Cet aspect du sujet faisait partie intégrante d'un projet européen E-RARE, porté par l'U1256 et déposé en 2018. La pertinence de l'activation pharmacologique de SIRT1 dans le traitement de maladies complexes est également illustrée par les nombreux essais cliniques de phase II ciblant l'inflammation, le diabète et la colite ulcéreuse (GSK).

Les résultats obtenus au cours de ma thèse seront présentés suivant la même organisation en deux parties complémentaires, bien que les deux parties du projet aient été réalisées en parallèle.

Résultats I

Collaborations

Au cours de ma thèse, j'ai également participé aux travaux sur des études comportementales sur les rats afin de vérifier la susceptibilité cérébrale à la carence en donneurs de méthyle chez ce modèle, (Hassan et al., 2019) ainsi qu'à l'article de Rashka et al portant sur l'analyse transcriptomique de fibroblastes cbIC et cbIG dans lequel j'ai réalisé l'analyse morphologique des fibroblastes (Rashka et al., 2019).

1. Stress oxydatif et mesure des espèces réactives à l'oxygène

Afin de mettre en évidence le stress oxydatif dû à une surproduction de ROS dans les fibroblastes des patients, nous avons analysé le niveau de production de ROS cellulaires par un marquage au dihydroéthidium (DHE). Ce kit utilise le DHE comme sonde fluorescente pour la détection des ROS et est spécifique au superoxyde et au peroxyde d'hydrogène. Le colorant DHE est oxydé en présence de ROS et produit ensuite une fluorescence rouge proportionnelle au niveau de ROS cellulaire. L'analyse par coloration au DHE semble montrer une augmentation de la production de ROS dans les lignées de patients cbIC et cbIG par rapport au contrôle (Figure 15).

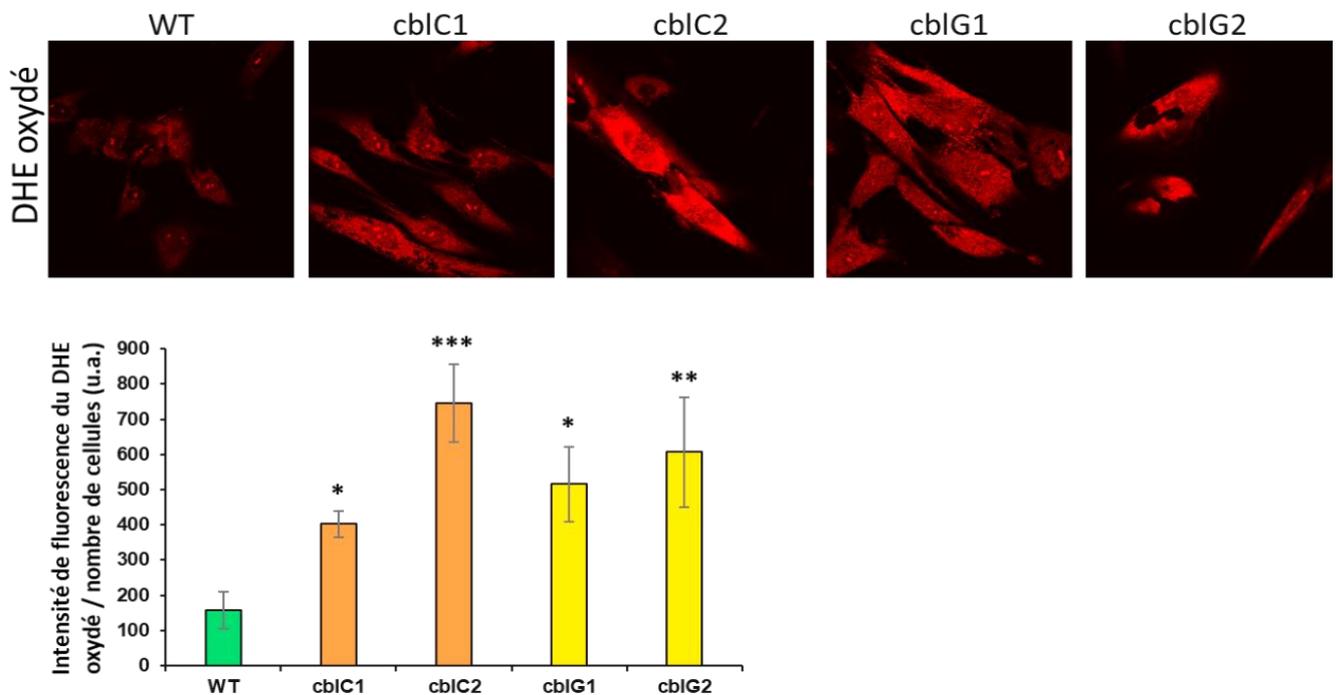


Figure 15 : Mise en évidence des ROS par marquage au DHE

Les cellules ont étéensemencées à raison de 30000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits et incubées à 37°C, 5% CO₂ une nuit. Le milieu de culture a été retiré et une solution de DHE à 5 µM a été ajoutée et les cellules ont été incubées 30 min à 37°C. L'acquisition des images de fluorescence a été effectuée en utilisant un microscope confocal et de laser de longueur d'onde de 535 nm (rouge). La quantification de l'intensité de fluorescence a été évaluée par le logiciel Image J.

Pour confirmer ces résultats, nous avons mesuré la quantité de ROS en utilisant le Kit ROS-Glo™ qui réagit directement avec l'H₂O₂ endogène en produisant un signal lumineux proportionnel à sa quantité dans les cellules. Les résultats montrent un taux

élevé de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ chez les cellules de patients cbIC2, cbIG1 et cbIG2 par rapport au WT (Figure 16). Ceci confirme les résultats obtenus avec la DHE qui montrent des taux élevés de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène chez ces patients. Par contre, le taux de H₂O₂ dans les cellules de patient cbIC1 ne montrent pas de différence significative par rapport au contrôle (Figure 16) ce qui est aussi en corrélation avec les résultats du marquage à la DHE qui ont montré que ces cellules expriment un niveau de ROS élevé bien que plus faible par rapport aux autres patients (Figure 15).

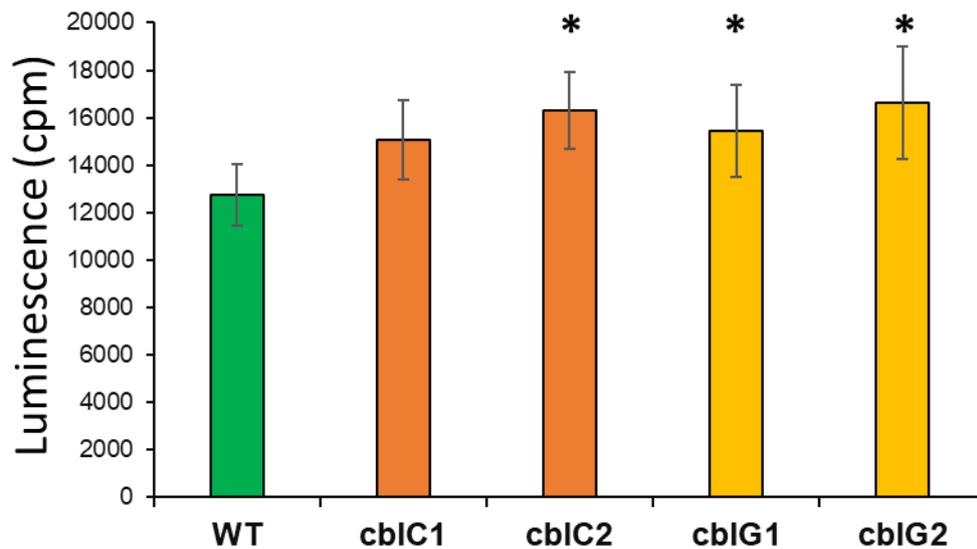


Figure 16 : Mesure du taux de ROS (H₂O₂) dans les cellules de patients

Le kit ROS-Glo utilise la luciférine qui réagit directement avec H₂O₂ et la solution de détection ROS-Glo™, pour produire un signal lumineux proportionnel à la quantité d'H₂O₂ dans les cellules. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-types de 3 expériences indépendantes. **p*<0,05.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons étudié l'expression protéique de la superoxyde dismutase SOD2, qui est une enzyme antioxydante mitochondriale.

Les résultats obtenus par Wes Simple Capillary ont montré une altération de l'expression de SOD2 dans les fibroblastes de patients par rapport au contrôle (WT) (Figure 17). Une augmentation importante de cette expression de trois fois dans les cellules de patients cbIC2 et deux fois dans les cellules de cbIG2 pourrait représenter une forme de la réponse cellulaire pour lutter contre le taux élevé de radicaux libres dans ces cellules. Par contre, une forte diminution est observée dans les cellules cbIG1

alors qu'aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les cellules cblC1 et le contrôle.

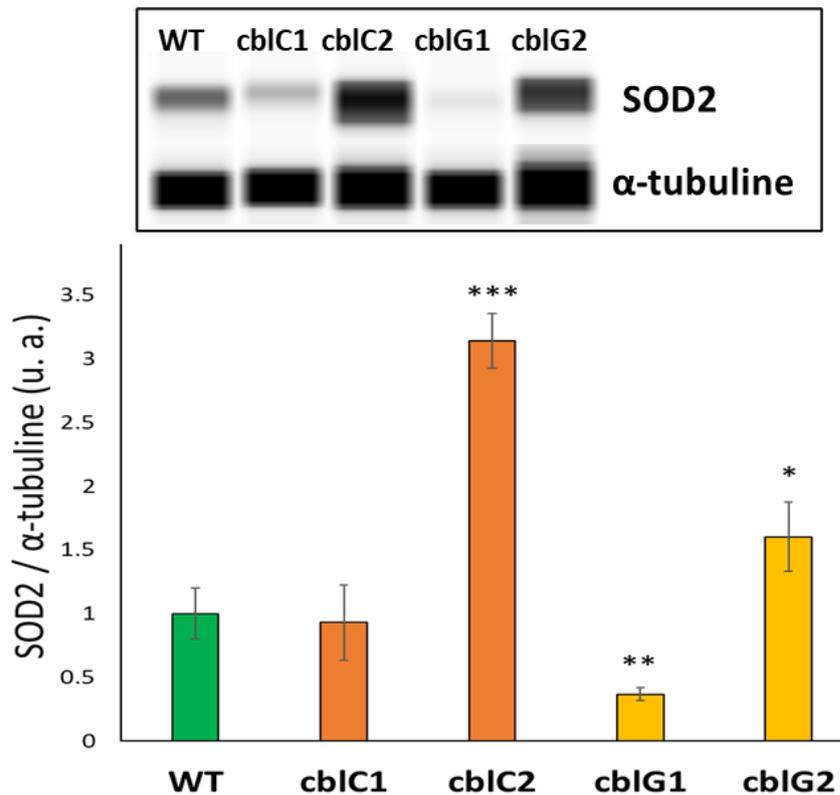


Figure 17 : Expression de SOD2 dans les fibroblastes de patients cblC et cblG.

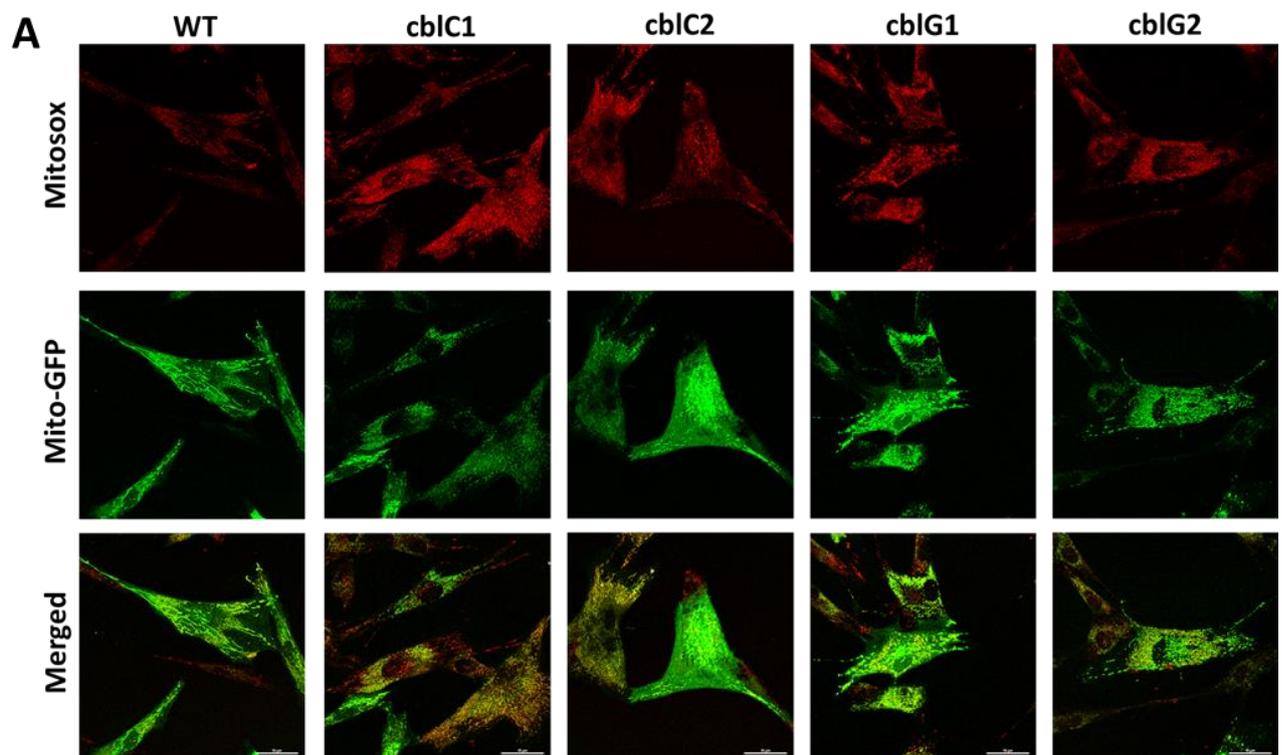
Analyse Wes Protein Simple de l'expression relative de SOD2. La figure montre l'expression de SOD2 dans des fibroblastes de patients cblC et cblG par rapport au contrôle (WT). Le niveau d'expression est normalisé avec l'alpha-tubuline comme protéine de référence. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écart-type. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; $n=3$.

2. Etude de la physiologie mitochondriale (stress oxydant, morphologie et potentiel membranaire) :

2.1. Evaluation du stress oxydant mitochondrial

Après l'obtention des résultats de l'expression de SOD2 qui joue un rôle crucial dans la défense contre la toxicité des radicaux anions superoxydes (O_2^{\bullet}) générés dans la mitochondrie comme sous-produit de la phosphorylation oxydative (Martin et al., 2006), nous avons décidé d'approfondir notre étude du stress oxydant mitochondrial

dans les cellules de ces patients. Afin de réaliser cet objectif, nous avons utilisé le kit Mitosox red, qui cible particulièrement les mitochondries, et qui est oxydé uniquement par le superoxyde mitochondrial pour produire une fluorescence rouge. Nous avons également transfecté les cellules avec le réactif CellLight Mito-GFP, des particules virales de baculovirus codants pour une protéine de fusion contenant une séquence de localisation mitochondriale et de la GFP, afin de marquer les mitochondries et de pouvoir normaliser l'intensité de Mitosox sur la masse mitochondriale totale des cellules (Figure 18.A). Le calcul du ratio Mitosox/Mito-GFP obtenu après analyse des images, a montré un taux très élevé de ROS mitochondriaux dans toutes les lignées de patients cb1C et cb1G par rapport aux cellules contrôles (WT) (Figure 18.B).



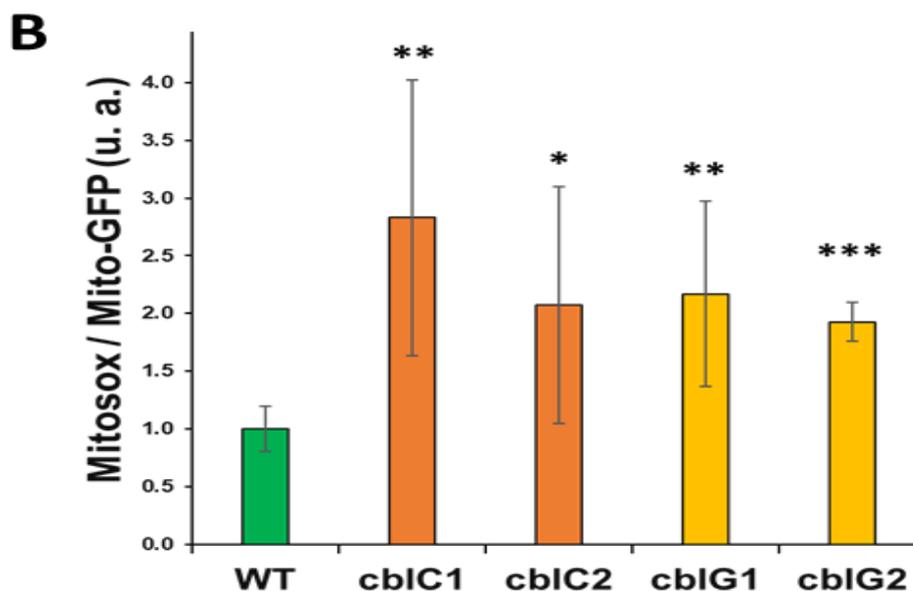


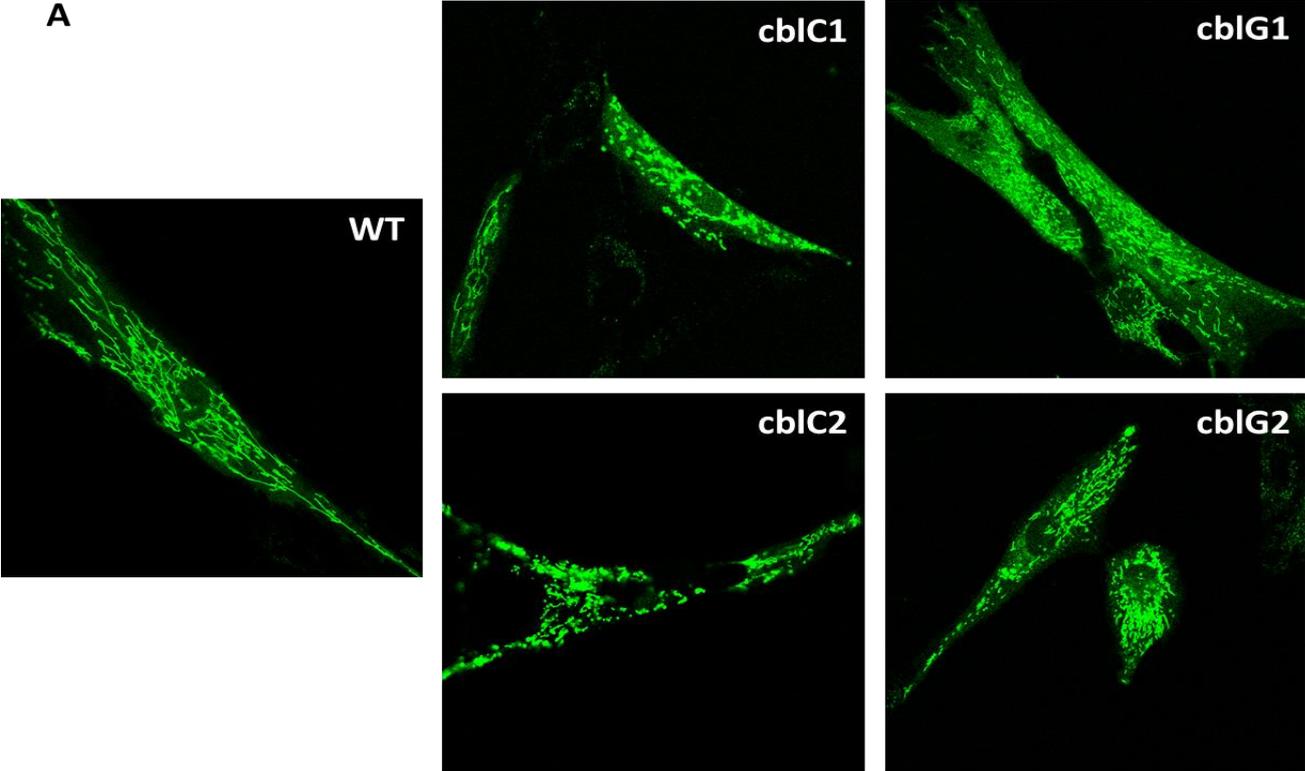
Figure 18 : Mesure de la production mitochondriale de superoxyde d'hydrogène dans les cellules de patients cbIC et cbIG.

Images réalisées par microscopie confocale ; l'intensité de fluorescence Mitosox et Mito-GFP a été mesurée à l'aide d'ImageJ. (A) Images représentatives des cellules de patients et de cellules témoins transfectées avec le réactif CellLight mito-GFP (en vert) et marquées avec le réactif Mitosox (rouge). (B) Histogrammes représentatifs du rapport entre l'intensité de fluorescence moyenne de Mitosox oxydé et l'intensité des mitochondries-GFP en tant que marqueur du corps mitochondrial. Données présentées sous forme de moyenne \pm écart type. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0,001$, $n = 3$.

2.2. Etude de la morphologie mitochondriale

En observant les images du marquage Mito-GFP, nous avons remarqué une modification de la morphologie des mitochondries entre les cellules de patients et les cellules contrôles. À la suite de ces observations, et après la mise en évidence d'un stress oxydant mitochondrial dans les cellules de patients, nous avons décidé d'analyser la morphologie mitochondriale en utilisant les images obtenues par l'expression de la protéine de fusion Mito-GFP. Les images montrent clairement une différence de l'aspect du réseau de mitochondries entre les cellules contrôles (WT) et les cellules de patients cbIC et cbIG (Figure 19.A). En effet, ce réseau mitochondrial est filamenteux, régulier et bien allongé (76% Network) dans les cellules contrôles, alors que dans les fibroblastes de patients, les mitochondries ont un aspect où prédominent les formes ponctuelles (Puncta) et les formes de tiges courtes (Rods)

avec un pourcentage de 20% environ pour la forme Network (Figure 19.C et D). Ainsi, le calcul de ratio (fusion/fission) a montré un déséquilibre important dans les cellules de patients cbIC1 et cbIG1 qui semble favoriser la voie de la fission (fragmentation mitochondriale) par rapport aux cellules normales (WT) (Figure 19.B).



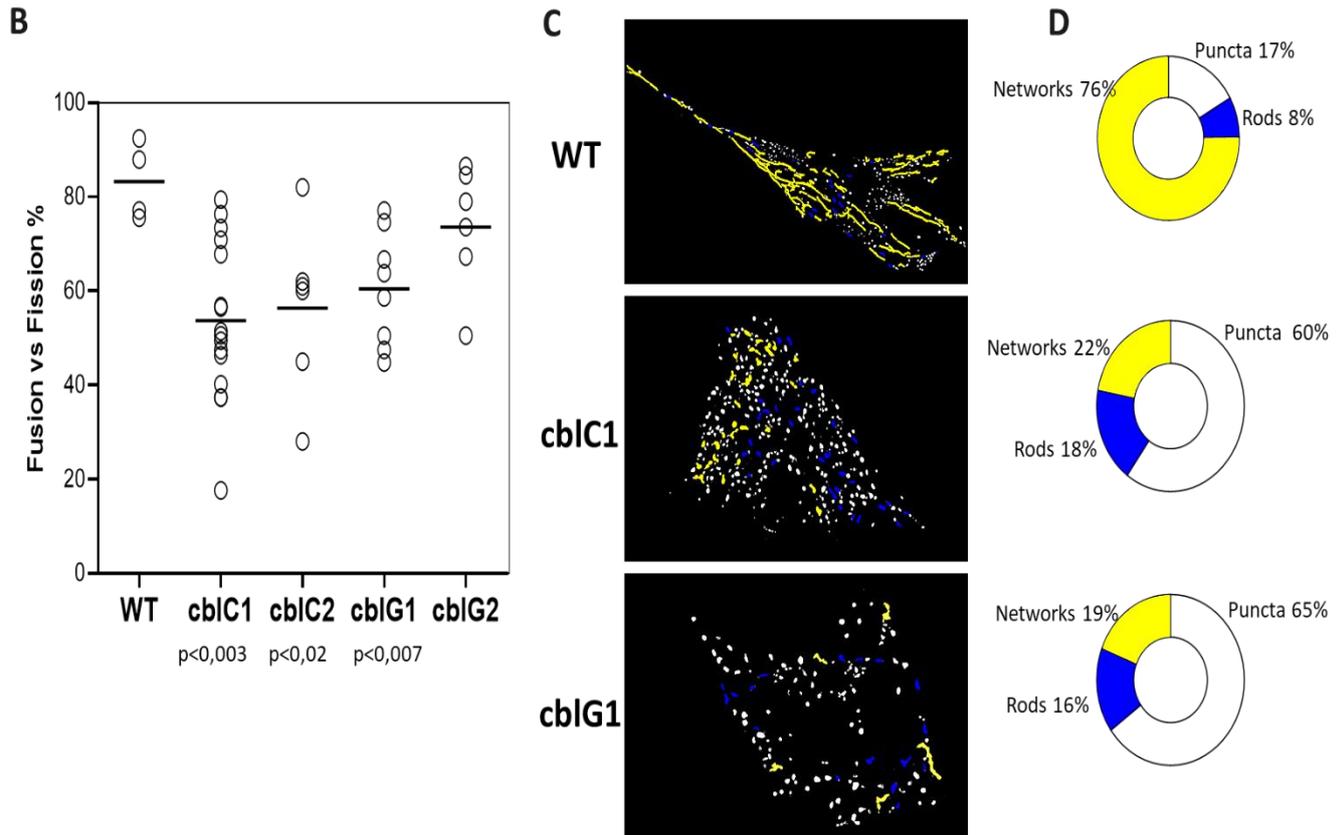


Figure 19 : Etude de la morphologie mitochondriale.

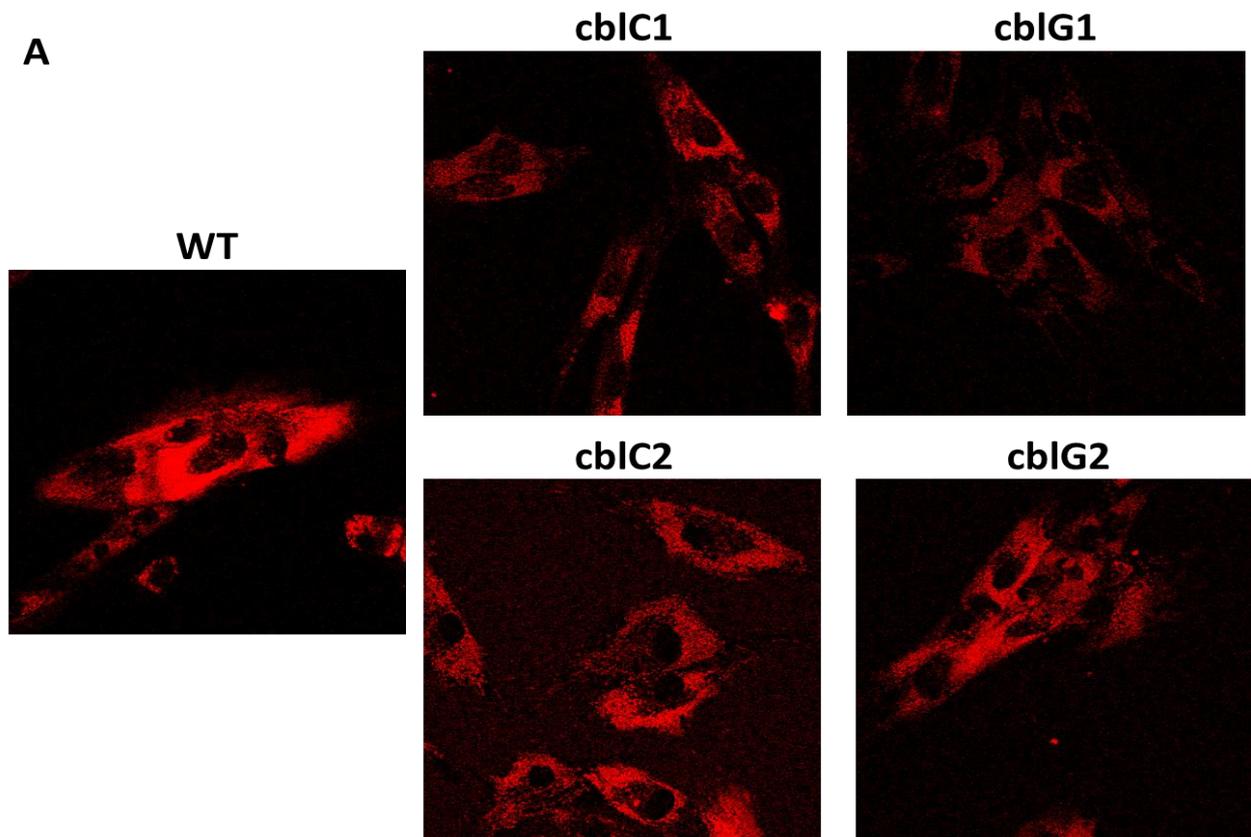
A. Images originales du marquage mitochondrial après transfection des cellules par le réactif CellLight Mito-GFP. **B.** Représentation du ratio fusion/fission dans les fibroblastes contrôles et de patients *cb1C* et *cb1G*. Les cercles représentent des cellules et les lignes les médianes de chacun des groupes ; test de Mann & Whitney. **C.** Le traitement des images squelettisées par le logiciel « Ilastik 1.3.2 » pour l'analyse du réseau mitochondrial. **D.** Histogrammes circulaires détaillant la subdivision des cellules en trois groupes selon le profil mitochondrial : Puncta (forme très fragmentée, en forme des points), Rods (forme intermédiaire ou en tige) ou Networks (filamenteuses). $n = 3$.

2.3. Etude du potentiel membranaire mitochondrial

Ces résultats suggèrent que dans les cellules de patients, l'accumulation des radicaux libres dans les mitochondries et l'altération de leur morphologie pourraient affecter des fonctions mitochondriales comme la phosphorylation oxydative. Pour répondre à cette question, nous avons commencé par vérifier l'état de la membrane mitochondriale en utilisant le réactif de tétraméthylrhodamine (TMRM) qui permet de mesurer le potentiel membranaire. En effet, ce colorant s'accumule dans les mitochondries actives ayant

un potentiel de membrane intact. Les résultats montrent une intensité de fluorescence significativement plus faible dans les cellules de tous les patients par rapport aux cellules contrôles, cette diminution est beaucoup plus forte dans les cellules de patients *cbIC1* et *cbIG1* (Figure 20). Cette diminution de l'accumulation du TMRM indique une réduction du potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules de patients (Figure 20.B).

Ensuite, nous avons voulu vérifier si ces altérations des mitochondries affectent la respiration mitochondriale dans les cellules de patients. Pour répondre à cette question, nous avons étudié la phosphorylation oxydative en utilisant un analyseur Seahorse Agilent avec le kit d'évaluation de la fonction des complexes de la chaîne respiratoire en condition de stress Seahorse XF Cell Mito stress Kit, Agilent.



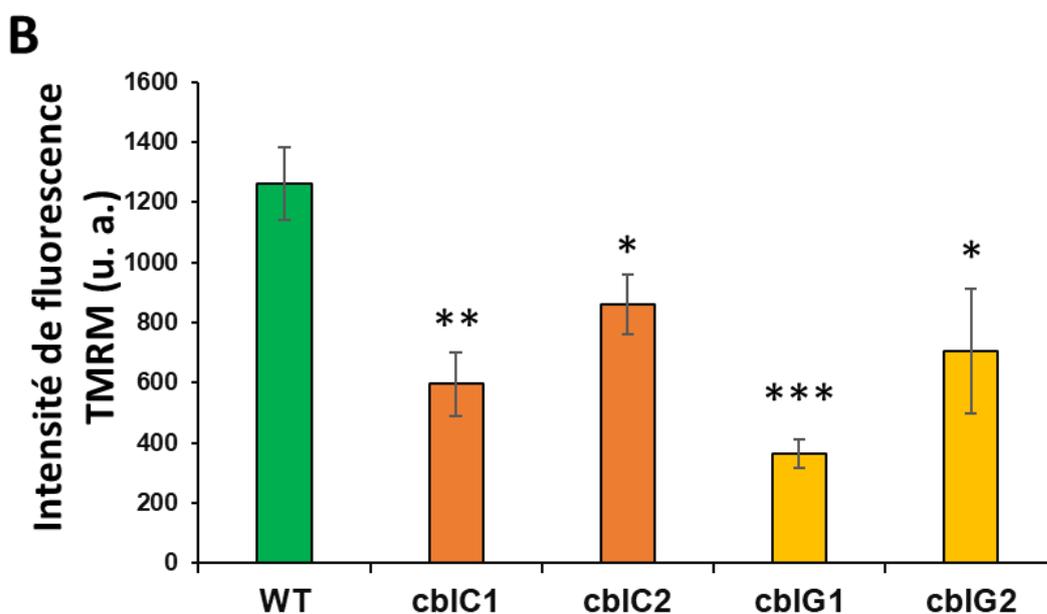


Figure 20 : Quantification de la dépolarisation du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules de patients.

Les mitochondries ont été marquées par le TMRM dans des fibroblastes de patients. L'intensité de fluorescence a été mesurée avec le logiciel ImageJ et normalisée par le nombre de cellules par champ. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type, $n=3$. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0.001$ par rapport au groupe NT (non traité) de la même lignée (test Anova).
Barre d'échelle : 10 μ m.

3. Stress du réticulum endoplasmique

Il a été montré dans notre laboratoire que l'indisponibilité cellulaire de la cbl dans des cellules de neuroblastome murin, induit un stress du réticulum endoplasmique dû à une diminution de l'expression de la déacétylase SIRT1 (Ghemrawi et al., 2013). Afin de vérifier cette hypothèse dans notre modèle de fibroblastes cbIC et cbIG, la présence du stress du réticulum endoplasmique a été étudié de différentes manières. Nous avons étudié d'abord, la délocalisation cellulaire d'ATF6. L'activation d'ATF6 pendant le stress du RE implique sa translocation du RE vers le noyau via l'appareil de Golgi pour servir comme facteur de transcription activateur de réponse au stress RE (Chen et al., 2002). Nous avons examiné la translocation d'ATF6 par immunofluorescence (Figure 21.A), pour trouver que dans le groupe contrôle (WT), les cellules qui montrent une translocation nucléaire d'ATF6 ne représentent que 18 % de la population

cellulaire, tandis qu'elles sont de 70 % chez les cbIC et autour 80 % chez les cbIG (Figure 21.B).

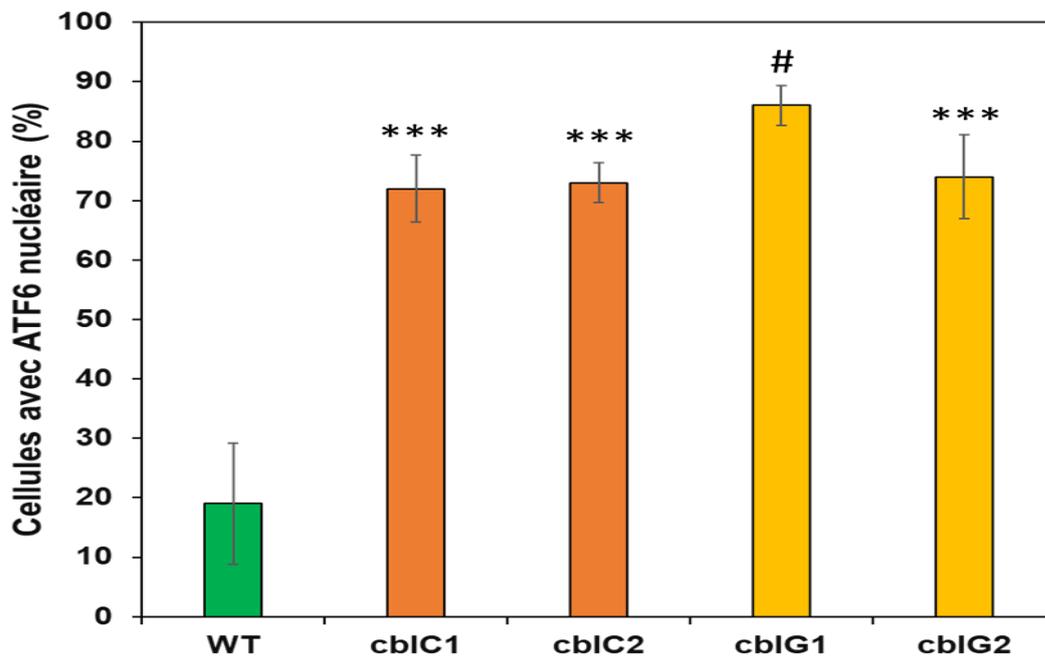
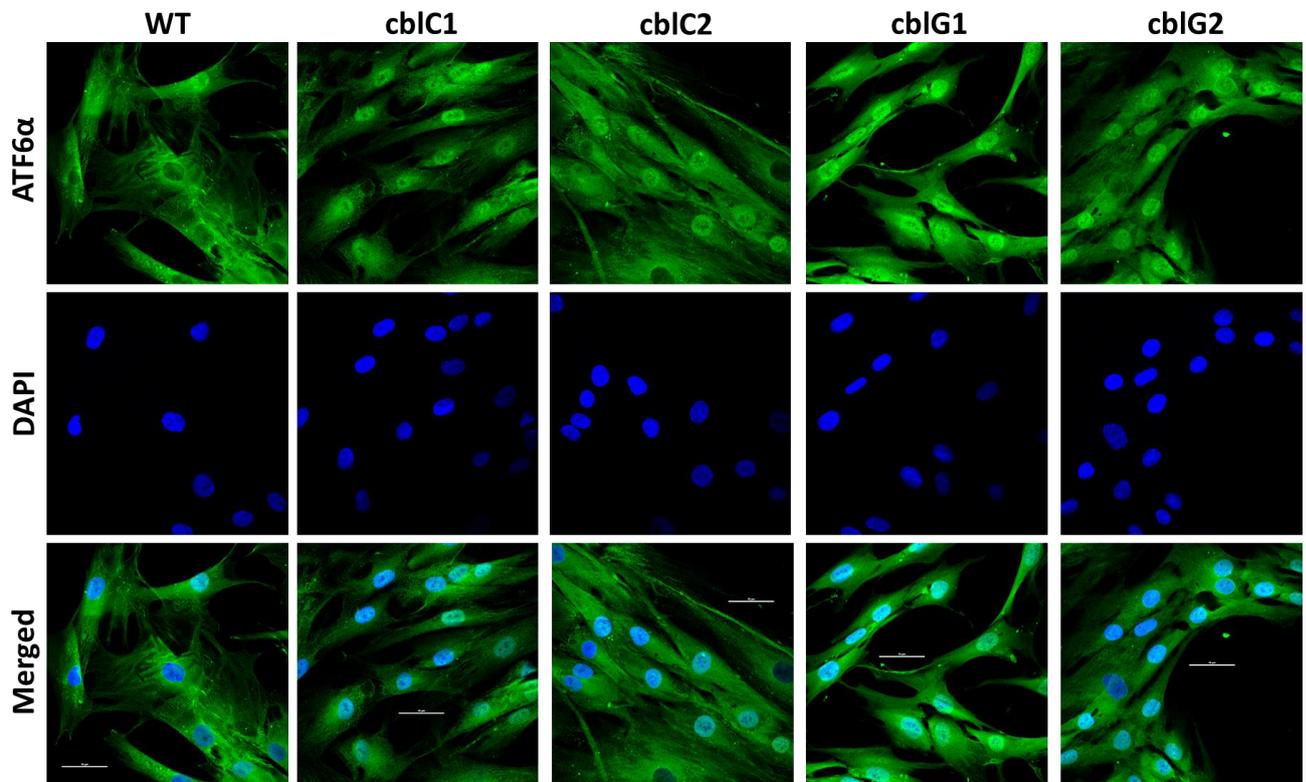


Figure 21: Mise en évidence du stress du RE chez les cellules cbIC et cbIG par la localisation nucléaire d'ATF6.

A. Exemples d'images obtenues par microscopie confocale de toutes les lignées cellulaires. Les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-ATF6 couplé à Alexa 488 (vert) et avec du DAPI (bleu). B. Le pourcentage a été calculé sur 285 cellules. *** $p < 0,001$; # $p < 0,0001$.

Pour continuer la validation de l'hypothèse de Ghemrawi et al. 2013, dans nos modèles cellulaires, nous avons étudié l'expression protéique de SIRT1 par Simple Capillary Wes. Les résultats montrent une diminution significative de l'expression de SIRT1 dans les lignées cbIC1 et 2 et la lignée cbIG1 comparées au contrôle. Cependant nous n'avons pas mis en évidence de modification significative d'expression dans la lignée cbIG2 (Figure 22).

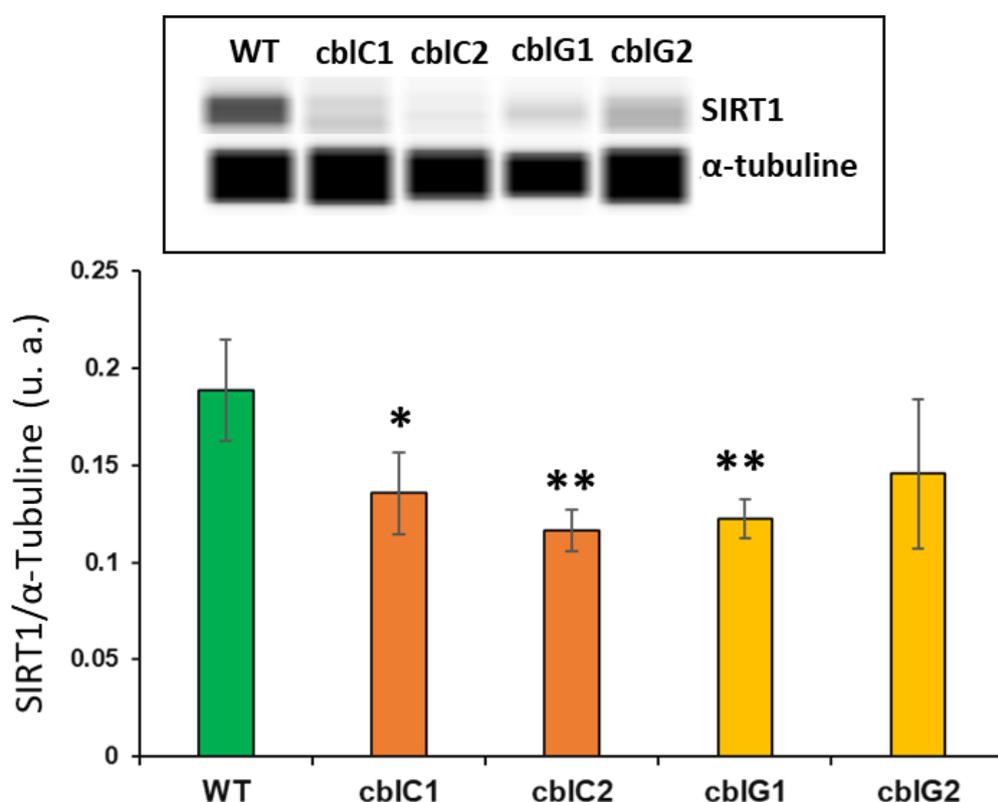


Figure 22 : Expression protéique de SIRT1

L'analyse protéique de l'expression de SIRT1 a été réalisée par Protein Simple Capillary Wes. Les valeurs densitométriques ont été normalisées par rapport à l'expression de l'alpha-Tubuline comme protéine de référence. Les valeurs représentent la moyenne +/- écart-type de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Afin de confirmer les résultats du Wes concernant l'expression de SIRT1, nous avons étudié l'expression de cette dernière et sa localisation par immunofluorescence (Figure 23). Nous avons trouvé une diminution significative de l'intensité de fluorescence rouge proportionnelle au niveau d'expression de SIRT1 dans les fibroblastes des patients cbIC et le patient cbIG1 (Figure 23.B), et une diminution non significative dans les cellules cbIG2 ce qui confirme les résultats de l'expression de SIRT1 en Wes

(Figure 22). D'autre part, une délocalisation subcellulaire de SIRT1 a été observée dans les cellules de patients (Figure 23.C) qui montre une expression cytoplasmique importante de SIRT1 contrairement à la lignée WT où SIRT1 est principalement localisé dans le noyau pour jouer son rôle comme désacétylase des histones (Tang, 2016).

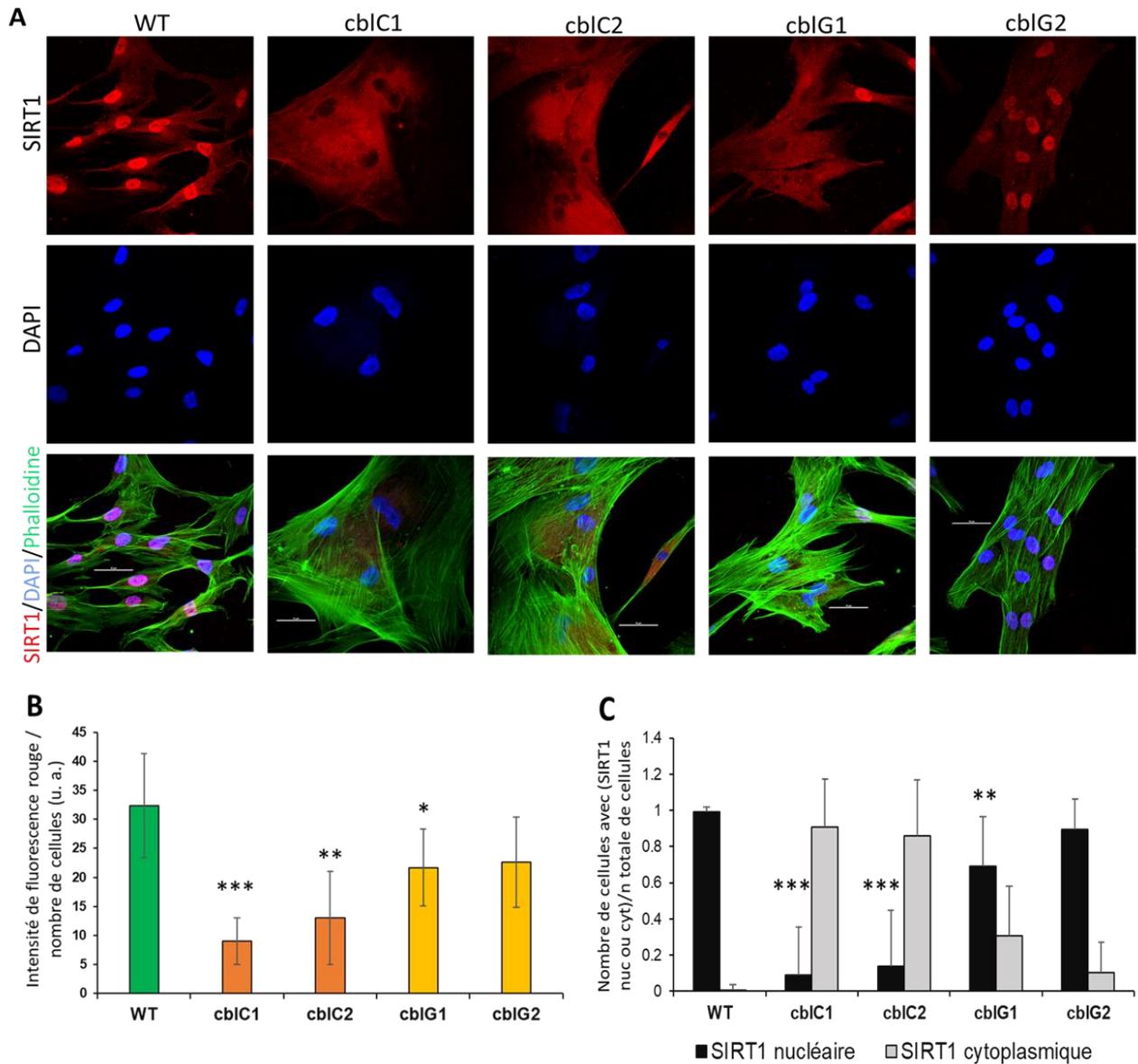
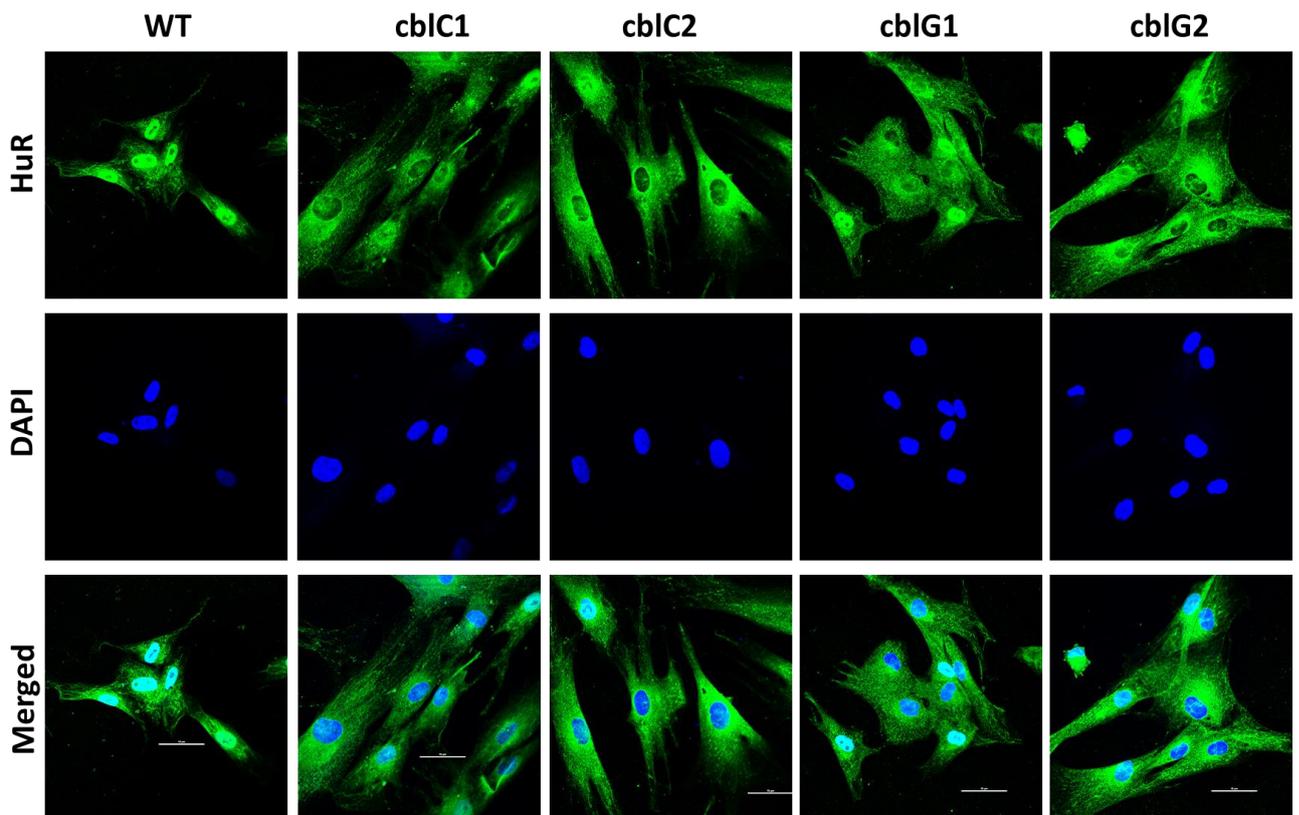


Figure 23: Expression et localisation subcellulaire de SIRT1 dans les fibroblastes de patients.

A. Mise en évidence de la localisation subcellulaire de SIRT1 par immunofluorescence et microscopie confocale. **B.** Mesure de l'intensité de fluorescence rouge sur ImageJ ; **C.** Quantification des cellules selon la localisation cellulaire de SIRT1 (nucléaire ou cytoplasmique). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, $n = 3$.

Il a été récemment démontré dans notre laboratoire que les défauts génétiques du métabolisme de la vitamine B12 sont associés à une localisation globale aberrante des ARNm probablement due à une localisation subcellulaire anormale des protéines de liaison aux ARNm (RBP) comme HuR, HnRNPA1 et SRSF1 (Ghemrawi et al., 2019). Pour vérifier ce paramètre dans nos cellules, nous avons analysé la localisation de HuR, une RBP connue pour fixer et stabiliser l'ARNm de SIRT1 pour qu'il puisse s'exprimer correctement dans le cytoplasme (Battaglia-Hsu et al., 2018). Nous avons donc étudié par immunofluorescence cette localisation subcellulaire (Figure 24). Nos résultats montrent une localisation essentiellement nucléaire de HuR dans les cellules contrôles. Par contre, la localisation de HuR est plutôt cytoplasmique dans les cellules de patients cblC et cblG. La quantification de nombre des cellules ayant une localisation nucléaire ou cytoplasmique de HuR montre que plus que 90% de cellules de patients cblC ont une délocalisation de HuR dans le cytoplasme. Ce pourcentage est de 70% dans les cellules de patients cblG.



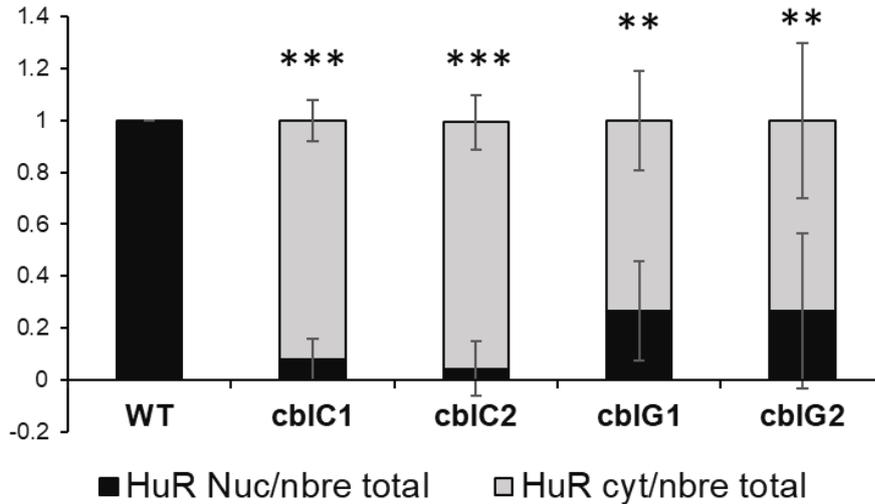
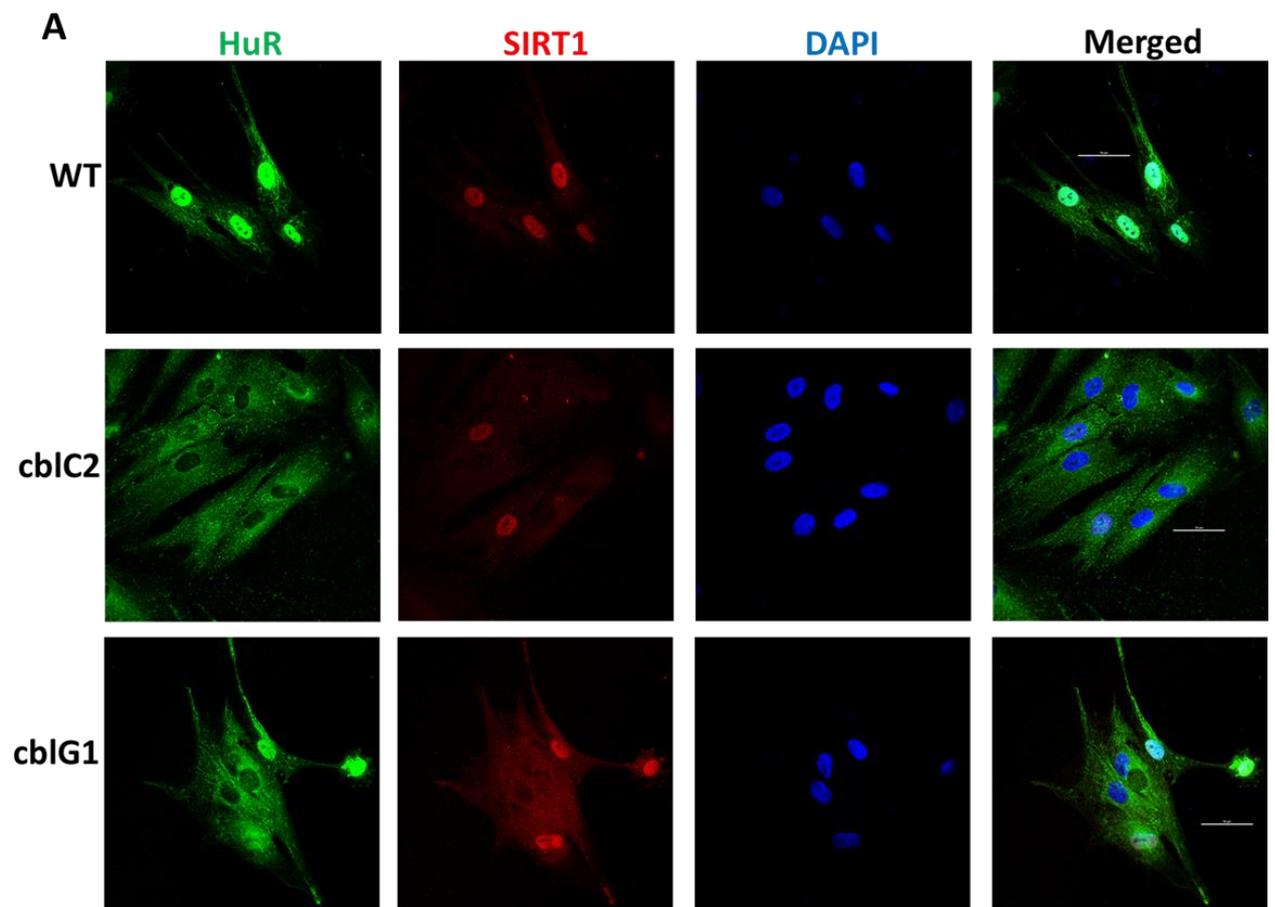


Figure 24 : Localisation subcellulaire de HuR dans les fibroblastes de patients cbIC et cbIG.

A. Mise en évidence de la localisation subcellulaire de HuR par immunofluorescence et microscopie confocale ; **B.** Quantification des cellules selon la localisation cellulaire de SIRT1 (nucléaire ou cytoplasmique). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, $n=3$.

Après avoir mis en évidence une localisation nucléo-cytoplasmique de SIRT1 et de HuR dans les fibroblastes des patients, nous avons voulu savoir s'il existait un lien entre leur délocalisation. Pour cela, nous avons effectué un co-marquage par immunofluorescence en utilisant des anticorps anti-SIRT1 et anti-HuR (Figure 25). L'analyse des images obtenues par microscopie confocale a montré que 89% des cellules des patients présentent une superposition de deux marquages et donc une délocalisation cytoplasmique de SIRT et de HuR, et que 11% des cellules ont une délocalisation de HuR seul et une expression nucléaire de SIRT1. Ces chiffres semblent confirmer l'association de la localisation subcellulaire de ces deux protéines, qui n'a encore jamais été mentionnée dans la littérature.



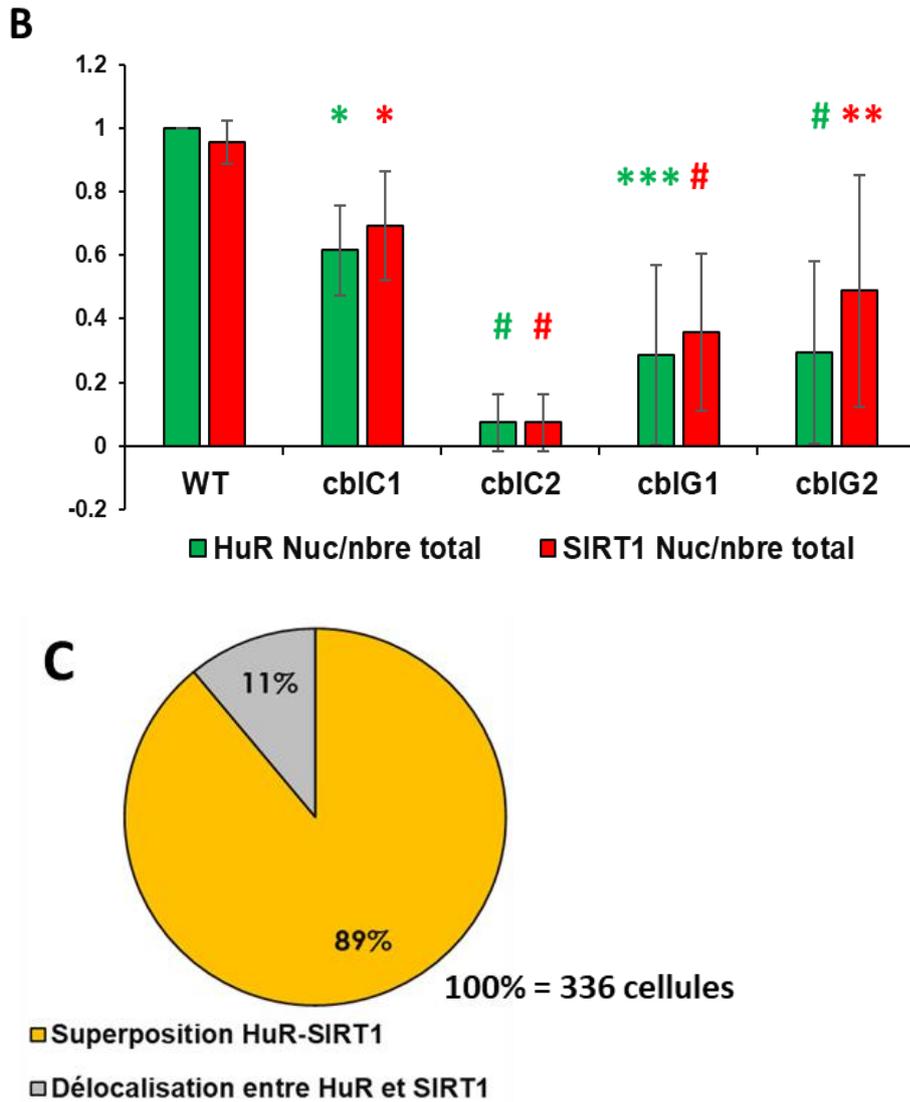


Figure 25 : Co-localisation subcellulaire de SIRT1 et HuR dans les fibroblastes de patients.

A. Images de microscopie confocale après double immunomarquage HuR (en vert) et SIRT1 (en rouge) avec le DAPI (en bleu) **B.** Quantification des cellules ayant une expression nucléaire de SIRT1 et de HuR par rapport du nombre totale des cellules de chaque lignée **C.** Représentation du pourcentage de cellules qui montrent une superposition HuR-SIRT1, notant que 100% est équivalent à 336 cellules.

Suite à la validation de la présence du stress de réticulum endoplasmique dans les cellules de patients provoqué par la diminution de l'expression de SIRT1 et la translocation d'ATF6 dans le noyau, nous avons voulu étudier la capacité de cellules à répondre au stress en étudiant deux protéines, Hsp70 et Hsp90, qui font partie de la

famille des « Heat Shock proteins » et qui sont impliquées dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique. L'expression de ces protéines est activée par le facteur de transcription HSF1 qui est à son tour activé par désacétylation par SIRT1 (Reddy et al., 2019). Les résultats du Wes ont montré une diminution de l'expression de Hsp70 dans les cellules de patients cblC1, cblC2 et cblG1 (Figure 26.A), et une diminution de l'expression de Hsp90 dans les fibroblastes cblC1 par rapport au contrôle (WT) (Figure 26.B).

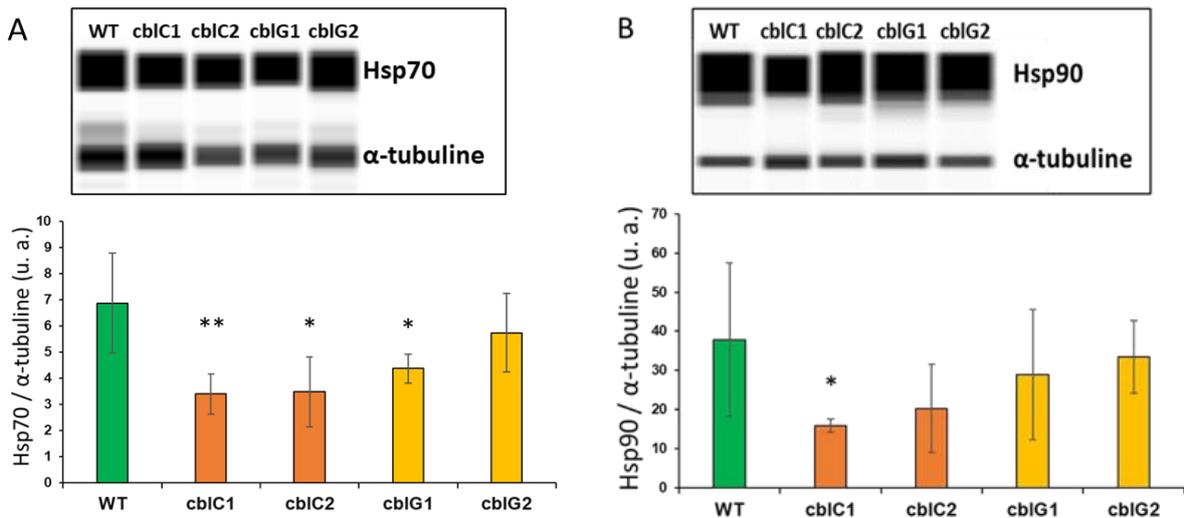


Figure 26 : Expression protéique de Hsp70 et Hsp90.

L'analyse protéique de l'expression de SIRT1 a été réalisée par Protein Simple Capillary Wes. Les valeurs densitométriques ont été normalisées par rapport à l'expression de l'alpha-tubuline. Les valeurs représentent la moyenne +/- écart-type de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Dans les cellules de patients, la présence de taux élevés de stress oxydant, de stress du réticulum endoplasmique et de la diminution d'expression de SIRT1, posent la question de leur impact sur la survie cellulaire. Nous avons alors quantifié le taux d'apoptose en mesurant l'expression de la caspase-3 clivée. Cette enzyme est un membre de la famille de protéases à cystéine, dont l'activation par clivage est un marqueur d'apoptose (Julien et Wells, 2017). Les résultats du Wes (Figure 27) ont montré une augmentation de l'expression de la caspase-3 clivée dans les cellules cblC2 et cblG2 par rapport au contrôle. Par contre, nous n'avons pas mis en évidence de modification significative de l'activation de la caspase-3 dans les fibroblastes cblC1 et cblG1.

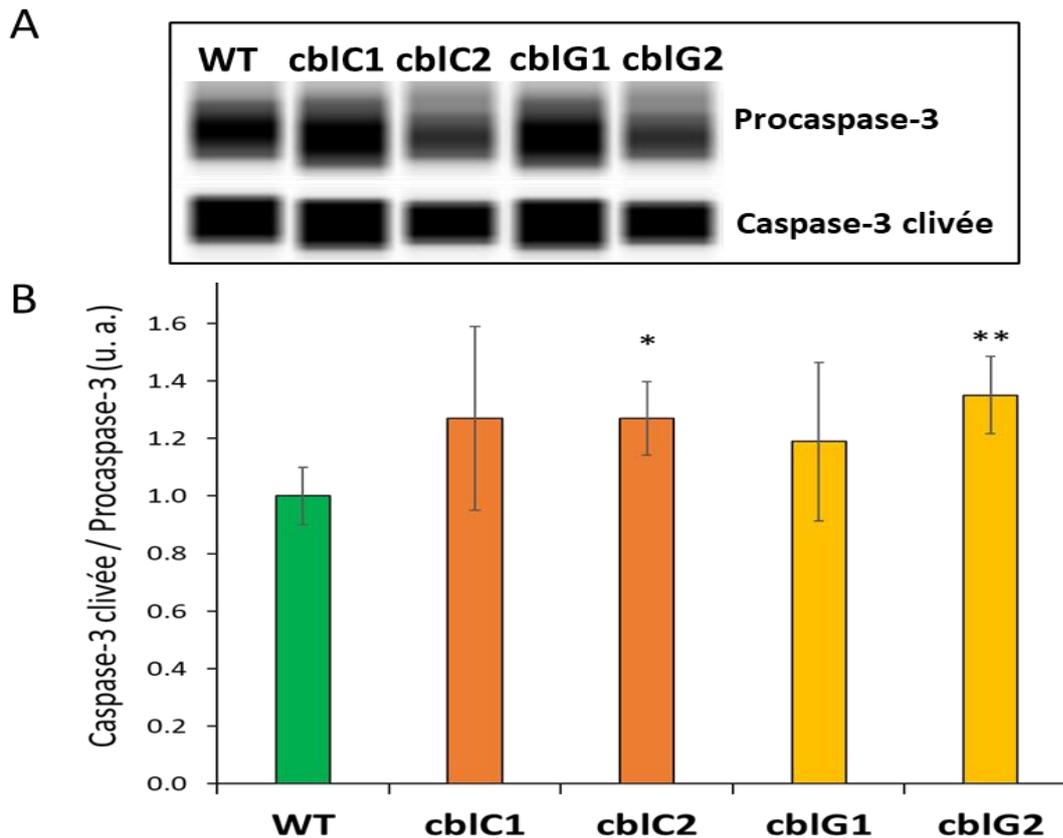


Figure 27: Expression protéique de la caspase-3 forme clivée et totale.

L'analyse protéique de l'expression de la caspase-3 a été réalisée par Protein Simple Capillary Wes. A. les bandes correspondent aux formes actives et inactives de la caspase-3. B. Les valeurs densitométriques de la caspase-3 clivée ont été normalisées par rapport à l'expression de la caspase-3 totale. Les valeurs représentent la moyenne +/- écart-type de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$.

4. Sélection *in vitro* de l'activateur de SIRT1

Après avoir identifié et phénotypé notre modèle cellulaire, nous sommes arrivés à la phase de sélection de l'activateur de SIRT1 qui va faire partie de notre traitement à utiliser pour la suite du projet et sur notre modèle murin *Mtr* KO.

4.1 Mesure de l'activation de SIRT1 par différents STACs *in vitro*

Afin de choisir la molécule activatrice de SIRT1 (SIRT1 activating compound ou STAC) pour la suite du projet, nous avons testé 4 molécules décrites dans le tableau X, en se

basant sur deux critères cruciaux, l'efficacité de l'activation de SIRT1 et la toxicité cellulaire sur les fibroblastes.

Les premiers STACs synthétiques ont été développés à la fin des années 1990 et dérivent d'un noyau imidazothiazole comme c'est le cas pour SRT1720 et SRT2183 par exemple. Il s'agit des SRTs de deuxième génération, la première génération de SRT étant constituée par le resvératrol (SRT50) et ses dérivés, formés à partir de polyphénols. Puis, au début des années 2000, une seconde génération de STACs basée sur le benzimidazole a été décrite. Il s'agit donc de la troisième génération de SRT, avec par exemple SRT2104 et SRT3025 (Milne et al., 2007).

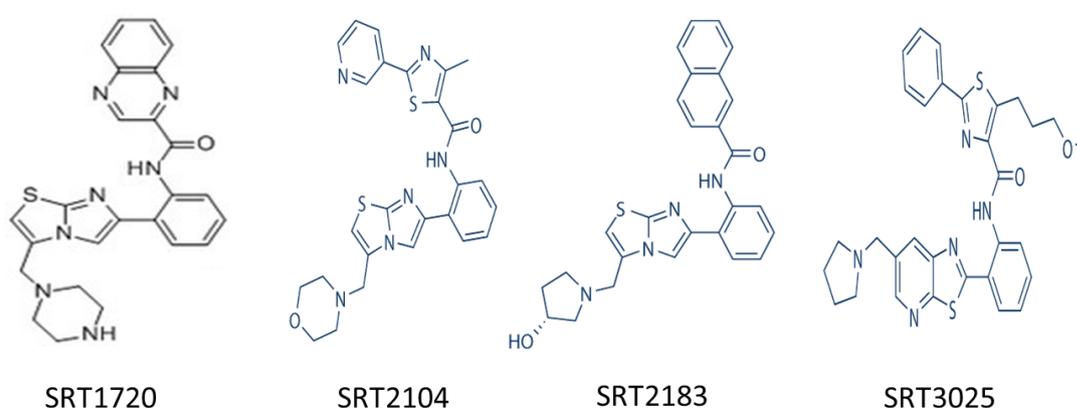


Figure 28 : Formules chimiques des STACs choisis (SRT1720, SRT2104, SRT2183 et SRT3025)

La littérature mentionne très peu les caractéristiques des différents STACs tels que le K_m par exemple. Ainsi, dans un premier temps, nous avons mesuré *in vitro* la capacité d'activation de SIRT1 par les quatre STACs que nous avons sélectionnés d'après leur utilisation dans la littérature (Figure 29) en utilisant l'enzyme recombinante humaine SIRT1. La désacétylation du substrat FLUOR DE LYS® par SIRT1, produit un signal lumineux proportionnel à l'activité de l'enzyme. A 1 μM de concentration (barres blanches), nos premiers résultats montrent une activation de SIRT1 par SRT1720 (5,71 U.A.) quasiment dix fois supérieure à celle engendrée par SRT2183 (0,64 U.A.) et SRT2104 (0,74 U.A.). A cette concentration de SRT3025, nous n'avons pas détecté d'activité de SIRT1. A 10 μM (barres noires), l'activation de SIRT1 par SRT1720 (6,45 U.A.), n'est plus que trois fois supérieure à celle causée par SRT2104 (2,26 U.A.) et près de six fois supérieure à celle induite par SRT3025 (1,16 U.A.).

Ces résultats semblent montrer une forte activation de SIRT1 *in vitro* par SRT1720 à 1 et 10 μ M. En revanche, SRT2183, un autre STAC de seconde génération n'activerait que très faiblement SIRT1, comme le suggèrent les données de la littérature (Milne et al., 2007). Concernant les STACs de troisième génération, SRT2104 entrainerait une activation de SIRT1 bien supérieure à celle engendrée par SRT3025 à 1 et 10 μ M.

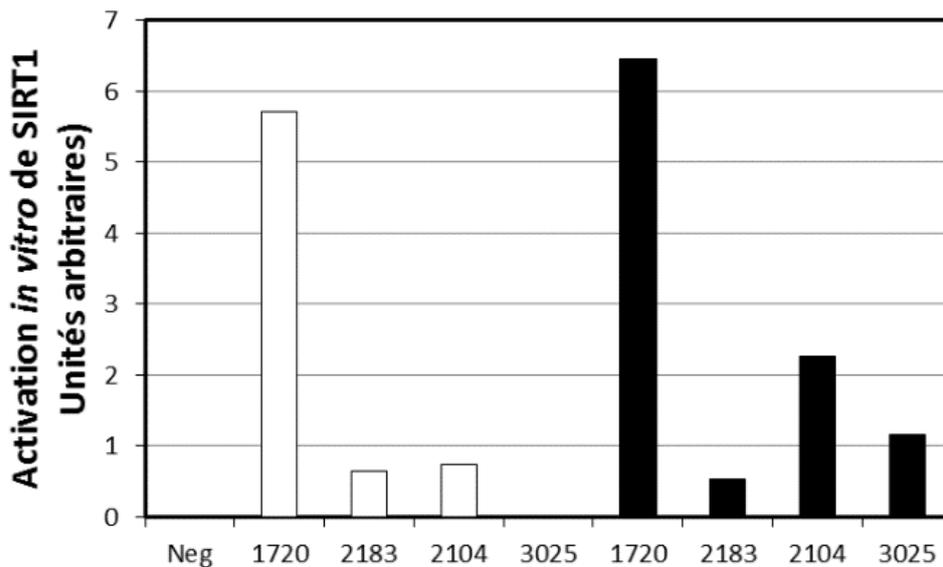


Figure 29 : Etude de l'efficacité des quatre SRTs sur l'activation *in vitro* de SIRT1 à 1 et 10 μ M

L'activation *in vitro* de l'enzyme recombinante humaine SIRT1 par des STACs de deuxième (SRT1720 et SRT2183) et de troisième génération (SRT2104 et SRT3025) a été mesurée ($n = 1$) grâce au kit Fluor de Lys (EnzoLifeSciences, Villeurbanne, France). Les barres blanches représentent des doses de 1 μ M de SRT et les barres noires 10 μ M. L'activité de hSir2^{SIRT1} a aussi été mesurée en présence de 5 mM de suramine, un inhibiteur connu de SIRT1 (Neg).

4.2 Etude de la toxicité des différents SRTs sur différentes lignées de fibroblastes

Dans un second temps, nous avons mesuré la cytotoxicité des quatre STACs sur trois lignées de fibroblastes afin de déterminer quelle molécule était la mieux tolérée par les cellules (Figure 30). Nous avons donc soumis les fibroblastes contrôles WT, cblG1 et cblC1 à une concentration croissante de SRT1720, SRT2104, SRT2183 et SRT3025 (de 1 μ M à 10 μ M) pendant 72 h et avons mesuré la survie cellulaire par test MTT.

Nous avons comparé les valeurs d'absorbance à celles obtenues pour des fibroblastes de la même lignée cultivés en conditions standard pendant 72 h.

Les résultats montrent une mortalité très forte induite par le SRT1720 dès 2 μM dans les fibroblastes WT (Figure 30.a ; 25 % de survie) et dès 5 μM dans les fibroblastes cblG1 (Figure 14.b ; 29 % de survie) et cblC1 (Figure 30c ; 27 %). Parmi les autres SRT testés, le traitement SRT2183 de 72 h à 10 μM entraîne une mort cellulaire de 53 % dans les fibroblastes WT (Figure 30.a). Cette mortalité est cependant moins marquée dans les cblG1 (Figure 30.b ; 65 % de survie) et dans les cblC1 (Figure 30.c ; 66 % de survie).

Ces résultats montrent tout d'abord une mortalité beaucoup plus importante provoquée par SRT1720 par rapport aux autres SRT. De plus, les fibroblastes WT semblent être plus sensibles que les cblG1 et cblC1 à la cytotoxicité induite par SRT1720. De même pour SRT2183, où dans une moindre mesure les fibroblastes contrôles présentent un taux de survie moins élevé que les fibroblastes cblG1 et cblC1. Enfin, de manière extrêmement intéressante, les SRT de troisième génération que nous avons testé (SRT2104 et SRT3025) sont beaucoup moins toxiques sur les trois lignées de fibroblastes.

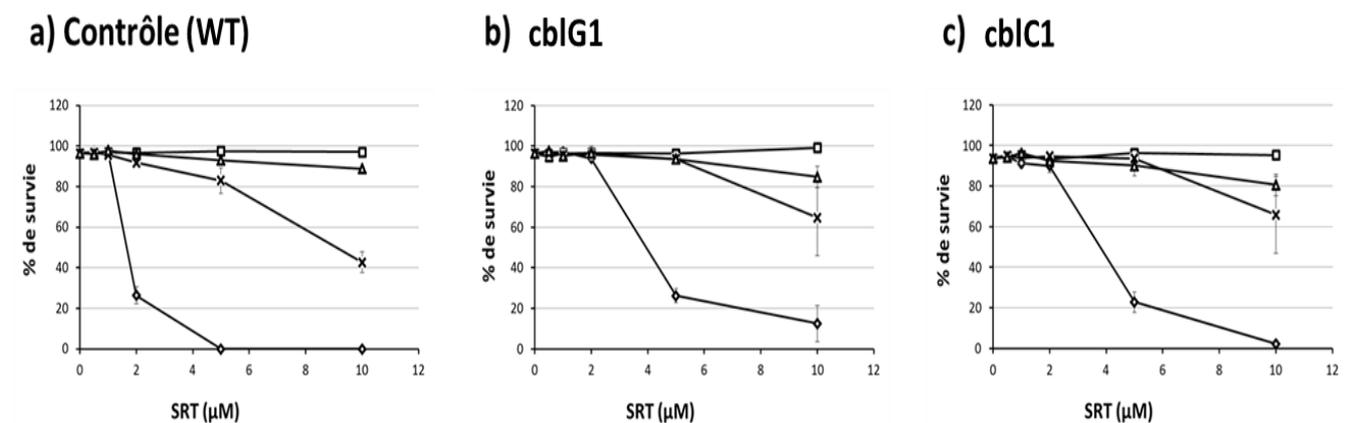


Figure 30 : Tests de toxicité cellulaire de quatre différents STACs.

Les SRTs de deuxième génération (SRT1720 et SRT2183) sont plus toxiques que les SRTs de troisième génération (SRT2104 et SRT3025) sur les fibroblastes.

Les fibroblastes (a) WT, (b) cblG1 et (c) cblC1 ont été traitées pendant 72 h avec différentes concentrations de SRT1720 (\diamond), SRT2104 (\square), SRT2183 (\times) ou SRT3025 (\triangle) et la survie

cellulaire a été mesurée par MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, États-Unis). La concentration 0 μM correspond au véhicule (DMSO) et les valeurs d'absorbance à 590 nm ont été comparées à celles obtenues pour des cellules non-traitées. Les tests de survie ont été réalisés lors de trois expériences indépendantes.

La cytotoxicité que nous avons mise en évidence dans les fibroblastes est donc plus marquée chez les contrôles (Figure 30). De plus, les fibroblastes traités avec des SRTs de troisième génération montrent un pourcentage de survie supérieur à 90 % pour SRT2104 et supérieur à 80 % pour SRT3025 (Figure 30), même à 10 μM .

Après l'obtention de ces résultats intéressants montrant l'efficacité de l'activation de SIRT1 par le SRT2104 et l'absence de toxicité sur les cellules aux concentrations testées, nous avons testé l'effet de cette molécule sur le niveau du stress du réticulum endoplasmique en étudiant l'expression de la protéine Bip impliquée dans la réponse à ce stress.

4.3 Expression d'un marqueur du stress du RE dans les fibroblastes : la protéine chaperonne Bip

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de la protéine GRP78/Bip par western blot (Figure 31). Bip est une protéine chaperonne appartenant à la famille des HSP70 (protéine de choc thermique de 70 KDa) dont l'expression augmente en condition de stress cellulaire et notamment lors du stress du RE (Pobre et al., 2018). Son expression basale est faible dans les fibroblastes WT (0,16 U.A.) et presque quatre fois supérieure dans les cbIC1 (0,62 U.A.) et six fois plus importante dans les cbIG2 (0,92 U.A. ; Figure 31.a). En condition de stress du RE induit par un traitement de 48 h à la tunicamycine (2,5 mg/mL), l'expression de Bip semble similaire entre les trois lignées WT (0,73 U.A.), cbIG2 (0,53 U.A) et cbIC1 (0,92 U.A.) comme le montre la Figure 31.b.

L'expression basale de Bip est plus élevée dans les fibroblastes de patients que dans les fibroblastes contrôles de facteur 4 chez cbIG2 et 3 chez cbIC1. En revanche, lorsque les fibroblastes de patients sont soumis à une importante induction de stress du RE par la tunicamycine (Figure 31.b), le niveau d'expression de Bip semble être similaire dans les trois lignées cellulaires.

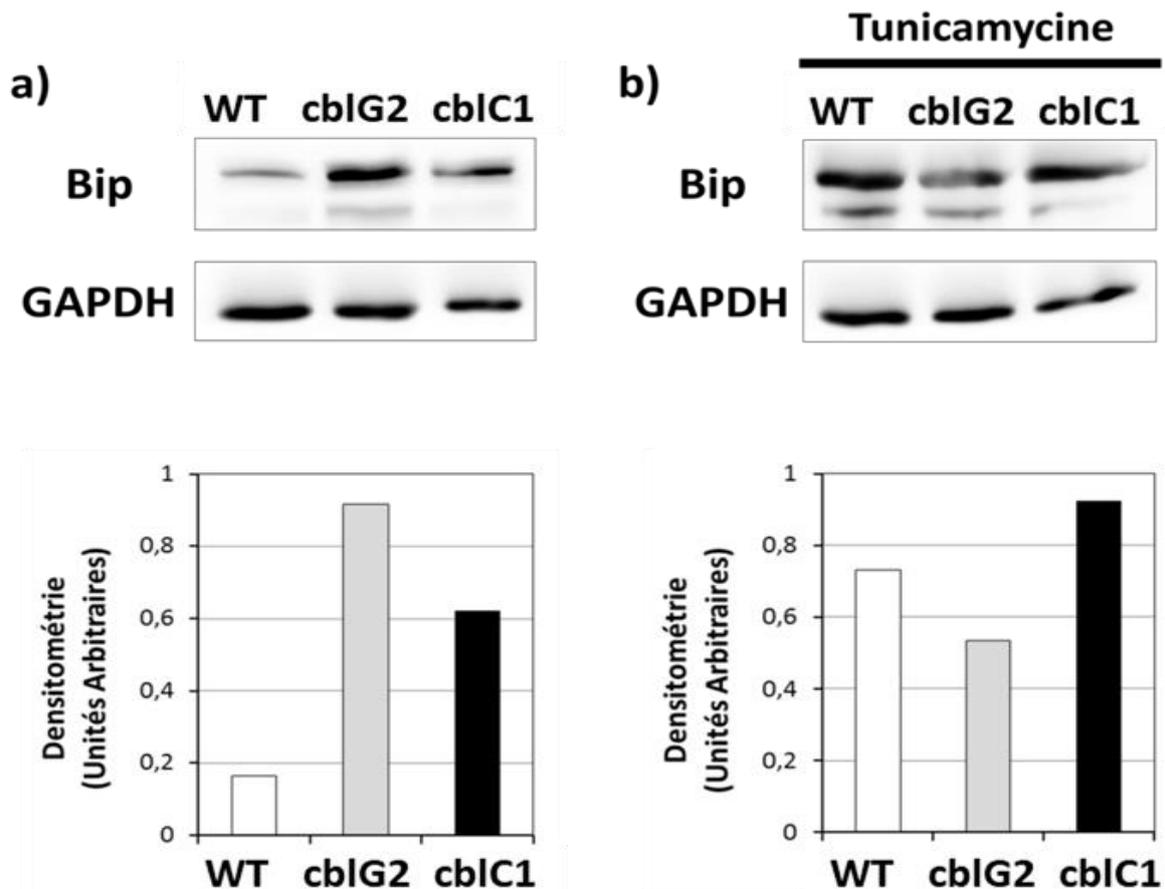


Figure 31 : Expression protéique de Bip dans les conditions standards et en présence de tunicamycine.

L'expression protéique de la chaperonne Bip a été déterminée par western blot dans les lignées de fibroblastes contrôles WT, cbIG2 et cbIC1 dans des conditions (a) standard ou (b) en présence de 2,5 mg/mL de tunicamycine pendant 48 h.

Les histogrammes représentent le résultat de l'analyse densitométrique. Les barres blanches représentent la lignée de fibroblastes contrôles, les barres grises représentent les fibroblastes cbIG2 et les barres noires les fibroblastes cbIC1.

4.4 Etude de l'effet de SRTs testés sur l'expression de Bip et le stress du réticulum endoplasmique

Notre but est d'observer et de mesurer l'effet d'une activation pharmacologique de SIRT1 dans les fibroblastes de patients ainsi que les conséquences de ce traitement sur le stress cellulaire, et notamment sur le stress du RE. Ainsi, nous avons traité des fibroblastes contrôles WT et CbIG2 avec 1 μ M de SRT1720 et 1 μ M de SRT2104 pendant 72 h. Cette dose de SRT a été choisie d'après la littérature (Ghemrawi et al., 2013), mais aussi car il s'agit de la dose la plus forte de SRT1720 pour laquelle nous

n'avons détecté de mort cellulaire dans aucune lignée de fibroblastes (Figure 30). Nous avons aussi traité ces fibroblastes avec 10 μM de SRT2104, car nous avons vu précédemment que cette dose était très bien tolérée par les trois lignées cellulaires (Figure 30). Nous avons ensuite mesuré l'expression de la protéine chaperonne Bip dans les fibroblastes contrôles et CblG2, traités ou non avec ces deux SRTs (Figure 32). Nous retrouvons l'expression très marquée de Bip dans les cblG2 non-traités (0,74 U.A.) par rapport aux contrôles (0,12 U.A.) que nous avons précédemment mis en évidence (Figure 31.a). Cette expression diminue d'environ 30 % (Figure 32) après un traitement avec SRT1720 (0,54 U.A.) et de 40 % avec un traitement avec SRT2104 (0,43 U.A. à 1 μM et 0,44 U.A à 10 μM). En revanche, les SRTs ne semblent pas avoir d'effet dans les fibroblastes contrôles, où le niveau basal de Bip est faible (0,12 U.A.) et le reste après un traitement de 1 μM de SRT1720 (0,21 U.A.), 1 μM de SRT2104 (0,17 U.A.) et 10 μM de SRT2104 (0,17 U.A.).

L'expression de la protéine chaperonne Bip qui est plus élevée au niveau basal dans les fibroblastes cblG2 est diminuée après un traitement avec SRT1720 et avec SRT2104. Cette diminution est plus forte avec SRT2104 même si nos premiers résultats ne semblent pas montrer de relation dose-effet. Par ailleurs, les deux SRTs testés n'ont pas d'effet sur l'expression de Bip dans les fibroblastes contrôles.

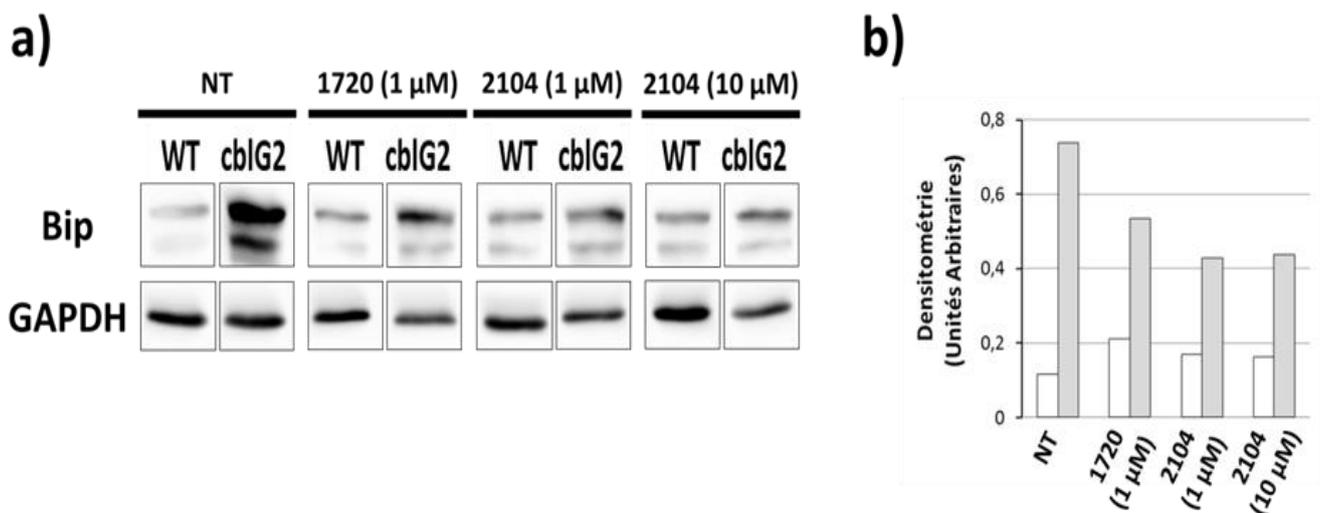


Figure 32 : Expression protéique de Bip dans les fibroblastes cblG2 sous l'effet de traitement avec SRT1720 et SRT2104.

L'expression protéique de Bip (a) a été déterminée par western blot dans les lignées de fibroblastes contrôles WT et cblG2. Les fibroblastes ont été traités pendant 72 h avec des

activateurs de SIRT1 à différentes concentrations ou n'ont pas été traités (NT). L'expression de Bip a été mesurée par rapport à la protéine de référence GAPDH. Les histogrammes (b) représentent le résultat de l'analyse densitométrique. Les barres blanches représentent la lignée de fibroblastes contrôles et les barres grises représentent les fibroblastes cblG2.

Ces résultats sont prometteurs quant au choix du SRT que nous avons utilisé pour la suite de nos travaux. En effet, SRT2104 semble être au moins aussi efficace que SRT1720 en termes d'inhibition du stress du RE, tout en étant mieux toléré par les différentes lignées de fibroblastes à plus forte concentration. De plus, nos premiers résultats *in vitro* semblent indiquer que SRT2104 est le deuxième SRT favorisant la plus forte activation de SIRT1.

Ainsi, ces résultats nous ont permis de choisir SRT2104 dans la suite du projet, étant la molécule la moins toxique et avec une efficacité importante sur l'activation de SIRT1. De plus, SRT2104 est le SRT le plus représenté dans la littérature portant sur des études cliniques en phase I et en phase II. Il est en effet extrêmement bien toléré chez l'animal (Mercken et al., 2014) et chez l'être humain (Hoffmann et al., 2013). Nos résultats préliminaires semblent confirmer cette tendance avec une mortalité quasi nulle dans les trois lignées de fibroblastes testées et aux concentrations testées.

4.5 Effets du traitement sur la viabilité cellulaire :

Après avoir sélectionné SRT2104, nous avons testé son effet sur la viabilité des fibroblastes en associant l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC), qui permet également de stimuler la production de glutathion, le SRT2104 et l'hydroxocobalamine qui vise à stimuler l'activité résiduelle des enzymes du métabolisme de la vitamine B12. Les résultats du test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) ne montrent aucune cytotoxicité aux concentrations testées. Par contre, une amélioration de la viabilité cellulaire en comparaison avec les autres groupes dans les cellules de patients cbIC2 et cbIG1 par exemple, où on voit un effet important de la combinaison de ces trois traitements (groupe 3T) sur l'augmentation du taux de viabilité cellulaire en comparaison avec l'effet de chacune de ces molécules utilisées individuellement (Figure 33).

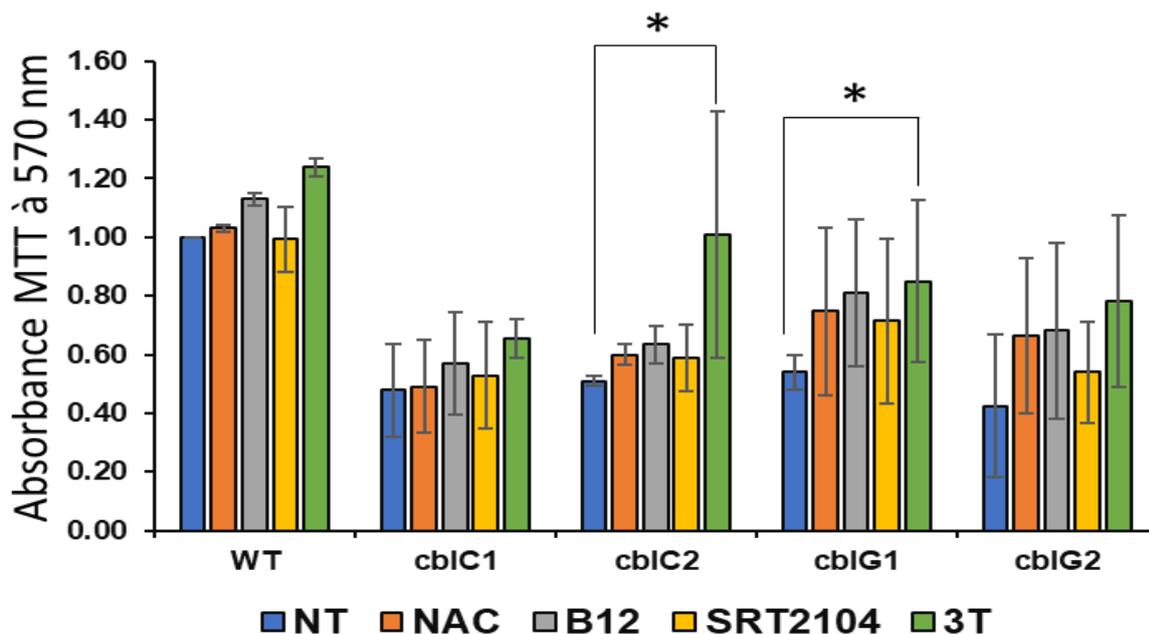


Figure 33: Vérification de la toxicité du traitement par SRT2104, hydroxocobalamine et N-acétylcystéine en étudiant son effet sur le taux de viabilité des fibroblastes de patients par MTT.

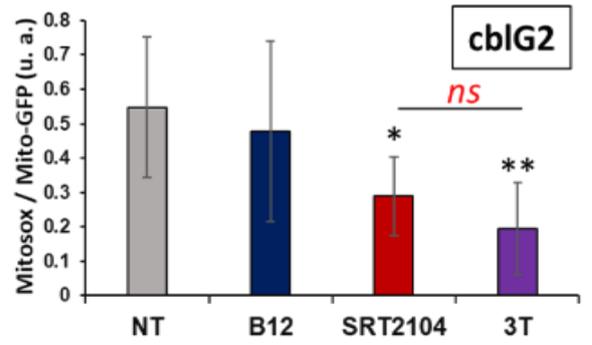
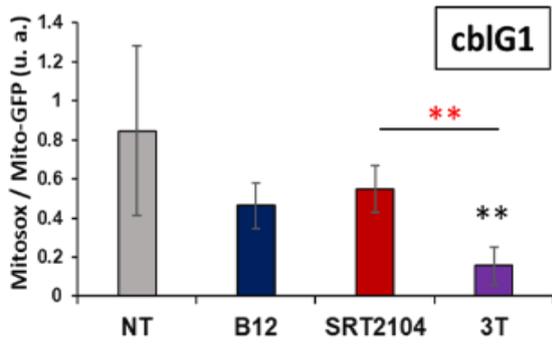
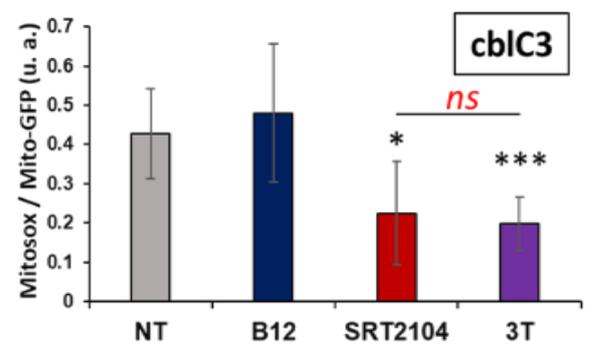
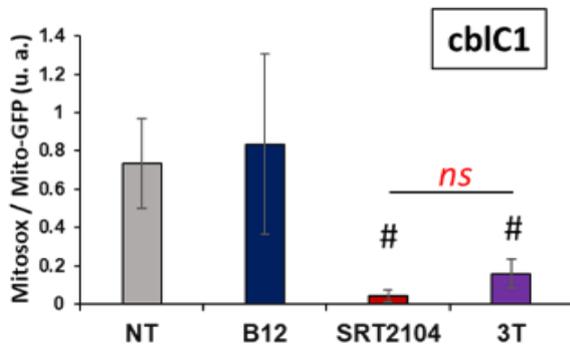
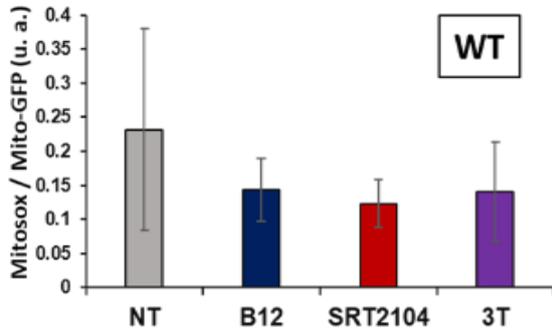
Les fibroblastes ont été traités avec 30 μ M OHcbl, 30 μ M NAC, 1 μ M SRT2104 or NAC+SRT2104+OHcbl (3T) pendant 72h. L'absorbance MTT est mesurée à 570 nm. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm SEM. T-student test * $p < 0.05$, $n=3$.

5. Étude de l'effet de nos traitements sur la physiologie mitochondriale dans les cellules de patients cb1C et cb1G :

5.1 Effet des traitements sur le stress oxydant mitochondrial

Ensuite, nous avons testé l'efficacité du traitement choisi sur la physiologie mitochondriale et le niveau du stress dans les cellules de patients. Nous avons répété nos expérimentations avec le MitoSox pour étudier le taux de ROS mitochondrial, le Mito-GFP pour analyser la morphologie mitochondriale, ainsi que le TMRM pour évaluer l'effet sur le potentiel membranaire mitochondrial. Nous avons créé quatre groupes par lignée comme décrit auparavant : le groupe NT (non-traité), le groupe B12 qui représente le traitement classique, le groupe SRT2104 et le dernier groupe appelé 3T traité avec la combinaison du SRT2104, NAC et B12.

Le taux du stress oxydant mitochondrial qui est plus élevé au niveau basal dans les fibroblastes de patients (Figure 18, Figure 34) est diminué chez les groupes traités avec SRT2104 que ce soit +SRT2104 seul ou bien le groupe +3T, même si cette diminution est plus importante dans le groupe 3T (Figure 34). Cependant dans les cellules cb1G1, SRT2104 seul ne semble pas montrer un effet important sur le niveau de ROS mitochondrial (Figure 34. A). Par ailleurs, le traitement avec B12 seul n'a pas montré d'effet bénéfique à ce point.

A

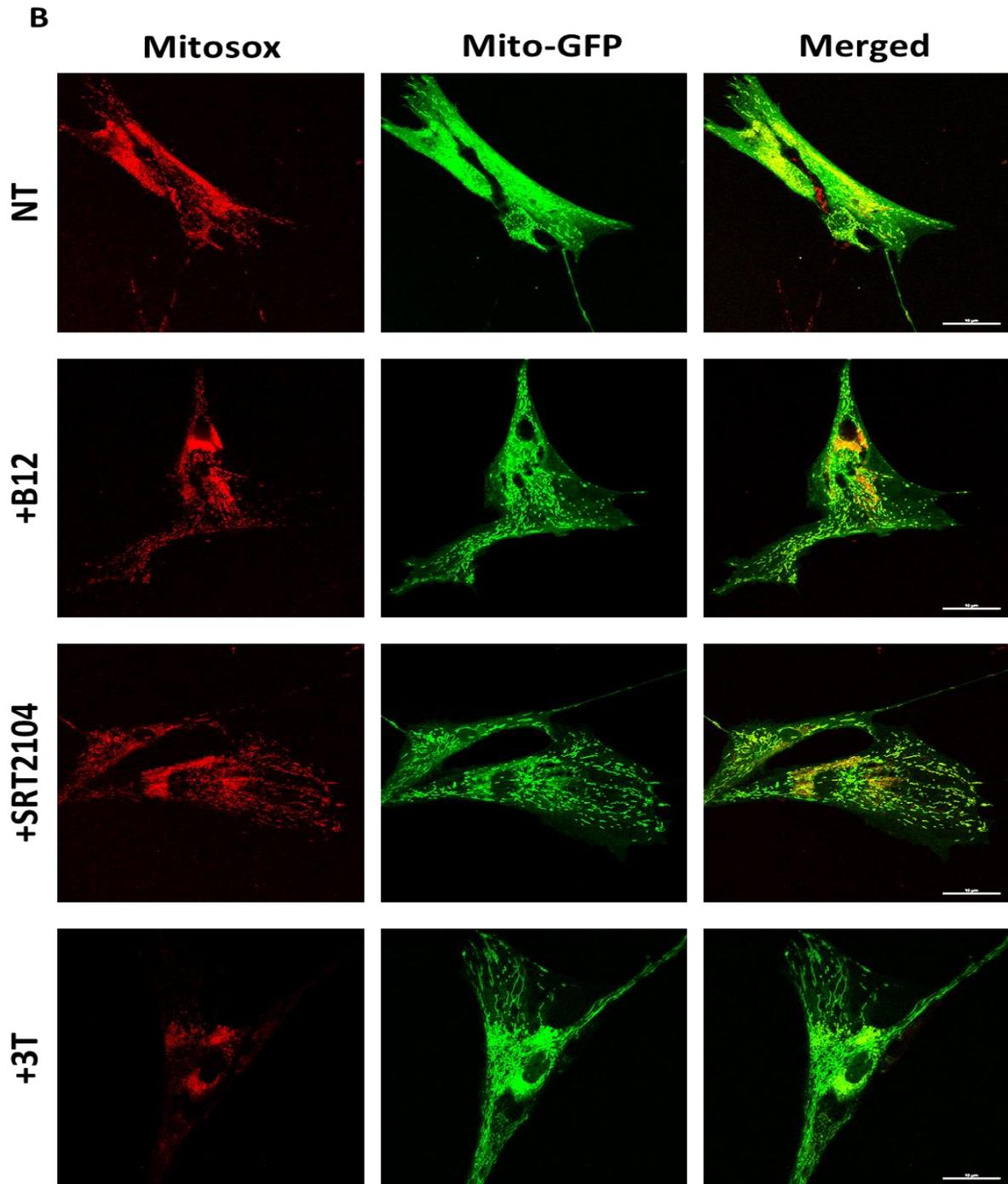
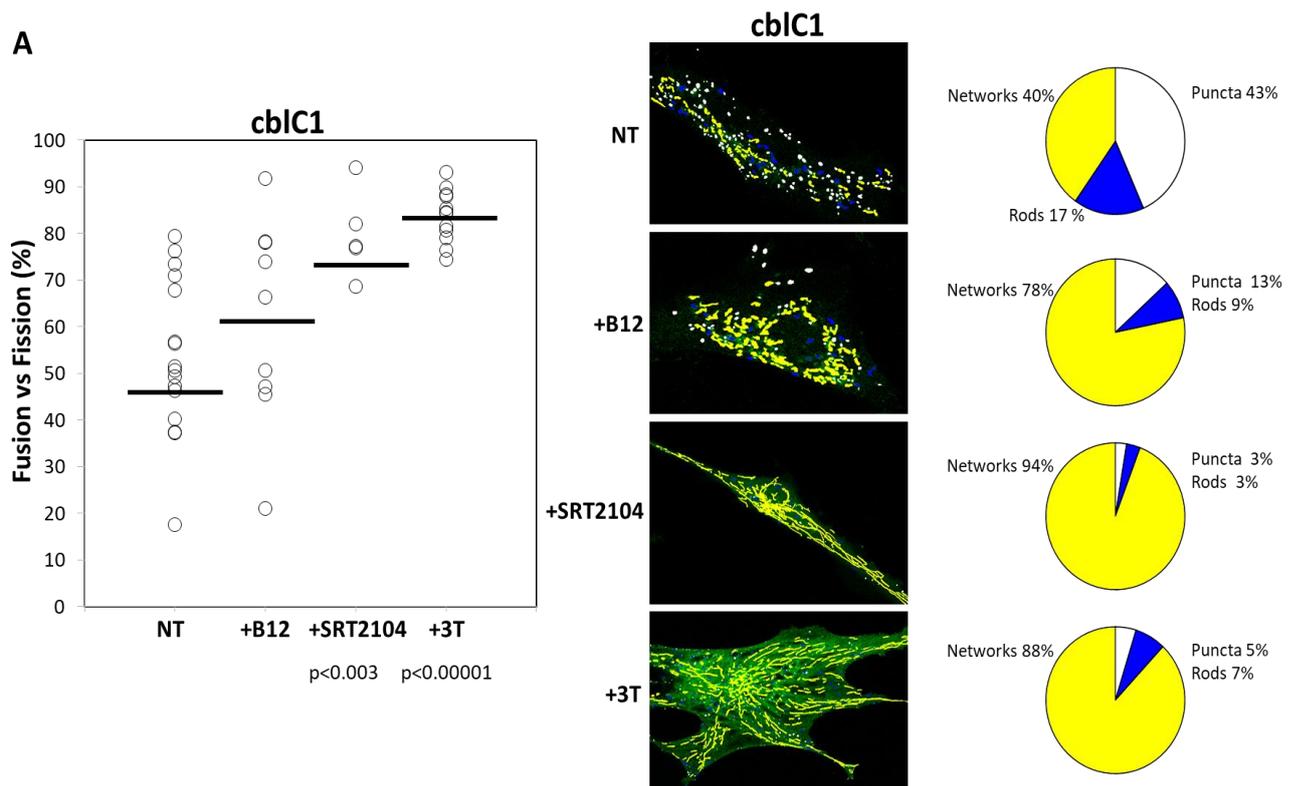


Figure 34 : Mesure de l'effet de différents traitements sur le niveau de ROS mitochondrial par Mitosox red.

Les cellules ont été traitées avec 30 μM de vitamine B12 (OHCbl), 30 μM de NAC, 1 μM de SRT2104 ou les trois ensembles pour le groupe +3T pendant 3 jours avant l'expérience. A. les histogrammes de la quantification des ROS mitochondriaux calculés en faisant le rapport entre l'intensité de fluorescence MitoSOX et Mitochondria-GFP. B. Les images de microscopie confocale de la lignée cbIG1. Les résultats sont représentés en moyenne \pm écart type. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.0001$, $n=3$.

5.2 Effet des traitements sur la morphologie mitochondriale

De même, concernant la morphologie mitochondriale étudiée avec Mito-GFP (Figure 35), le traitement avec SRT2104 a montré un changement important de l'aspect mitochondrial dans les cellules de cbIC1 (Figure 35.A) et cbIG1 (Figure 35.B). Nous avons détecté un changement du profil avec 40% de Networks dans le groupe NT des cellules cbIC1 (Figure 35.A) vers un profil de réseau plus filamentueux dans le groupe +SRT2104 et le groupe +3T avec ~90% de Networks. Le traitement avec SRT2104 seul et le traitement combiné 3T favorisent la formation d'un réseau mitochondrial bien allongé et organisé de façon similaire à celui dans les cellules WT (Figure 19). A noter que toutes les lignées de patients ont été analysées et les résultats sont similaires pour les cellules cbIC2 et cbIG2 (Images non représentées).



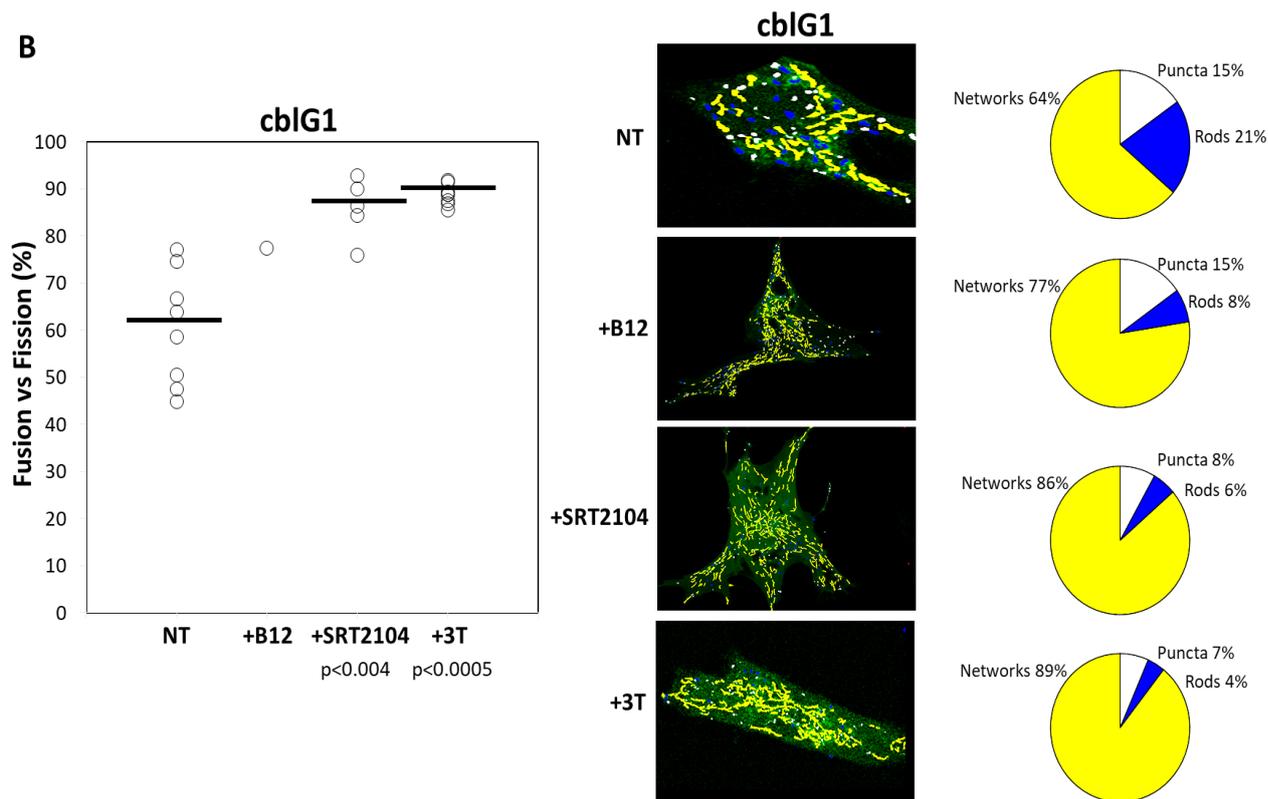


Figure 35 : Etude de l'effet de différents traitements sur la morphologie mitochondriale par Mitochondria-GFP.

A. Résultats des patients *cbIC1*, à gauche : histogramme représentant le ration fusion/fission, les cercles sont des cellules et les lignes sont des médianes, test de Mann & Whitney ; au milieu : Le traitement des images squelettisées par le logiciel « Ilastik 1.3.2 » ; à droite : histogrammes circulaires détaillant la subdivision des cellules en trois groupes selon le profil mitochondrial : Puncta (très fragmentée en forme des point), Rods (intermédiaire ou tiges) ou Networks (filamenteuses). **B.** Résultats des cellules *cbIG1*. $n = 3$.

5.3 Effet des traitements sur le potentiel membranaire mitochondrial

D'autre part, le potentiel de membrane mitochondrial mesuré par l'intensité de fluorescence de TMRM dans les cellules de patients (Figure 36), a été réduit suite au traitement avec SRT2104 et 3T dans toutes les lignées (juste *cbIC1* et *cbIG2* sont représentés dans la figure 36). La combinaison du traitement entre NAC, la B12 (OHCbl) et SRT2104 dans le groupe 3T présente un effet supérieur à celui du SRT2104 seul dans les cellules de patients *cbIC1* et *cbIG2*. Par contre, aucune amélioration au niveau du potentiel membranaire n'a été mesurée dans le groupe traité avec B12 seul.

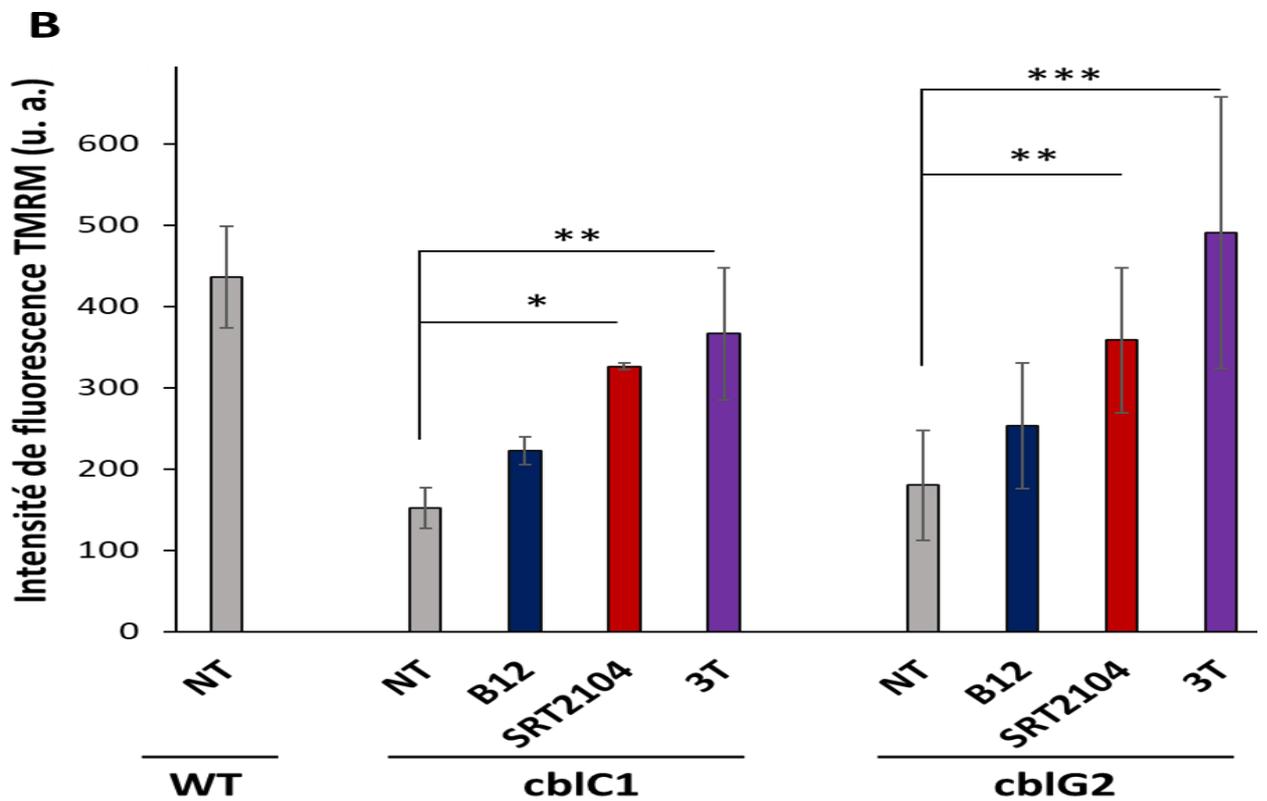
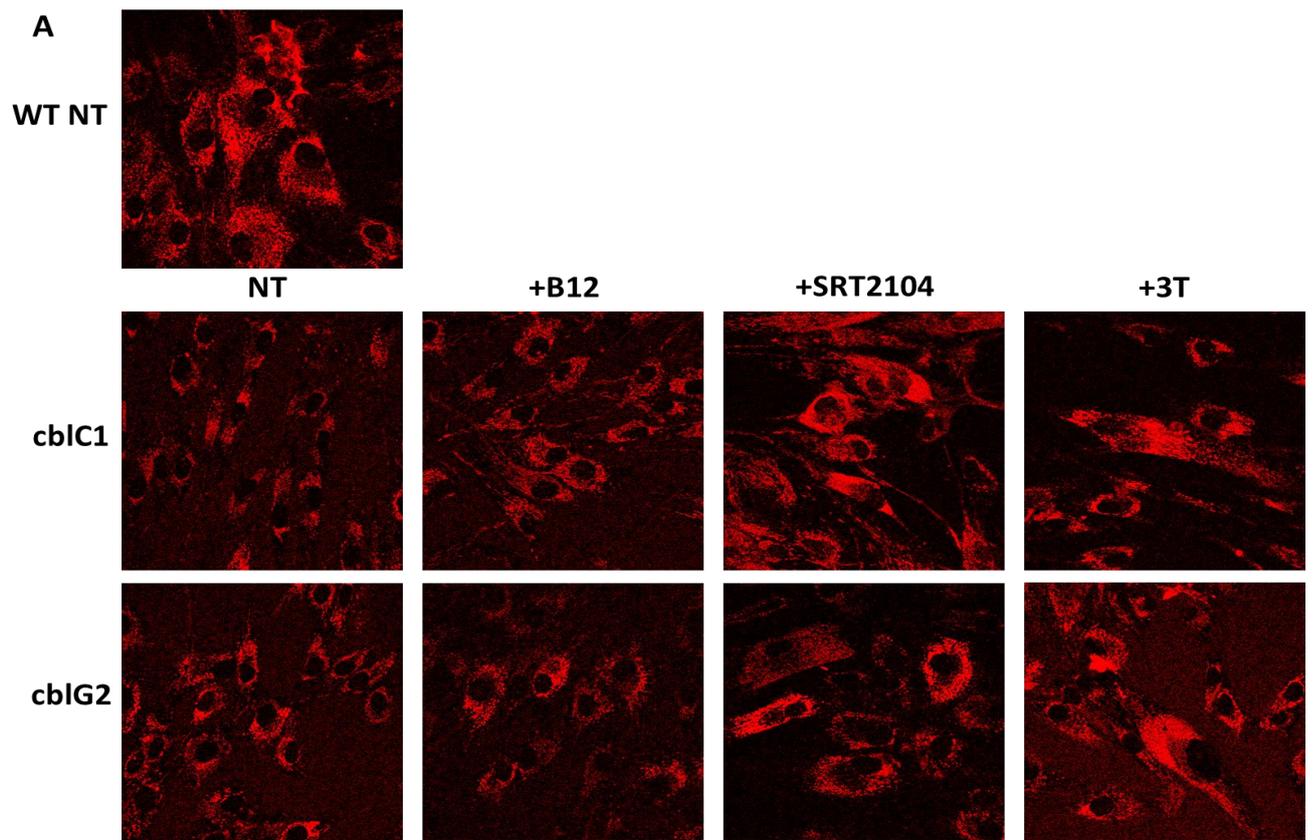


Figure 36 : Quantification du potentiel membranaire mitochondrial sous l'effet de différents traitements.

Mitochondries marquées par TMRM dans les fibroblastes de patients avec ou sans traitement par 30 μM OHCbI, 1 μM SRT2104 ou (B12+NAC+SRT2104 ensemble) pour le groupe 3T pendant 3 jours. A. Les images de microscopie confocale. B. Histogramme montrant les valeurs de mesure de l'intensité de la fluorescence par ImageJ. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type, $n=3$. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0.001$ par rapport au groupe NT (non traité) de la même lignée (test Anova). Barre d'échelle : 10 μm .

5.4 Effet des traitements sur la respiration mitochondriale

Ensuite nous avons étudié l'effet du traitement SRT2104 sur la respiration mitochondriale. Pour cela, nous avons analysé la fonction mitochondriale en mesurant les paramètres de la respiration mitochondriale (taux de consommation d'oxygène) au cours du temps. La quantification du taux de la consommation d'oxygène a été mesurée en condition basale et en condition de stress par l'analyseur « Seahorse XFp ». En condition de stress, la fonction de chaque complexe impliqué dans la chaîne respiratoire a été évaluée grâce à l'utilisation du kit Seahorse XF Cell Mito stress Kit, Agilent qui contient les trois inhibiteurs suivants (Fig. 37) :

- l'oligomycine bloque le complexe V qui permet la production d'ATP
- la FCCP est un protonophore permettant une diffusion passive des protons à travers la bicouche lipidique.
- la roténone et l'antimycine A bloquent respectivement les complexes I et III.

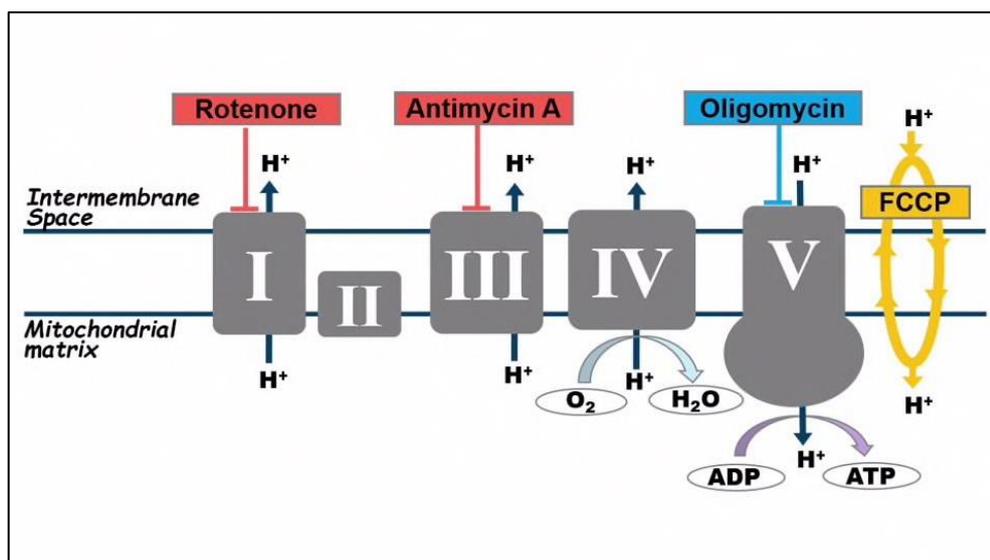


Figure 37 : Mécanismes d'action des molécules agissant sur la chaîne respiratoire mitochondriale.

La roténone et l'antimycine sont des inhibiteurs des complexes I et III empêchant la fuite des protons par diminution de la respiration de la mitochondrie ; l'oligomycine est un inhibiteur du complexe V qui bloque ainsi la production d'ATP et enfin la FCCP utilisée comme protonophore, pour faire entrer des protons dans la mitochondrie et accélérer la respiration mitochondriale.

La figure 38.A. montre un profil test d'évaluation de la respiration mitochondriale au niveau basal (avant l'injection des inhibiteurs) et en conditions de stress mitochondrial (à la suite des injections des inhibiteurs) ainsi que les profils de chacun de nos patients dans les trois conditions (NT, +B12 et +SRT2104) et de notre contrôle WT en réplicats biologiques nommés WT1 et WT2 sans traitement. Le test présente plusieurs paramètres clés, dont la respiration basale, la respiration liée à la production d'ATP (complexe V) et la capacité de réserve respiratoire (CRR). La mesure de la CRR est souvent utilisée pour évaluer la capacité des cellules à fournir de l'énergie en cas de besoin accru ; elle est calculée en faisant la différence entre la respiration maximale et celle liée à la production d'ATP. Grâce aux inducteurs de stress (inhibiteurs des complexes de la mitochondrie), d'autres paramètres de la fonction mitochondriale peuvent également être calculés, à savoir la fuite de protons et la respiration non mitochondriale.

L'observation générale des profils de respiration mitochondriale (Figure 38, A) montre une diminution significative du taux de consommation d'oxygène dans les fibroblastes NT de patients cblC et cblG au cours du temps en condition basale et en condition de stress par rapport au contrôle.

Parmi les résultats que l'on peut retirer de ces profils, le niveau de respiration basale est le plus faible chez les patients (cblC2 : 40 pmol/min ; cblC3 : 30 pmol/min ; cblG1 : 25 pmol/min ; cblG2 : 27 pmol/min) par rapport au contrôle (WT1 : 48 pmol/min), (Figure 38, A). Le traitement avec SRT2104 augmente d'une façon très importante le niveau de la respiration basale chez les patients (ex : de 40 jusqu'à 65 pmol/min chez le patient cblC2 et de 25 jusqu'à 65 pmol/min chez le patient cblG1). Le traitement avec B12 ne semble pas montrer d'effet important sauf dans les fibroblastes cblG2 qui répondent de la même manière au traitement B12 qu'au traitement SRT2104.

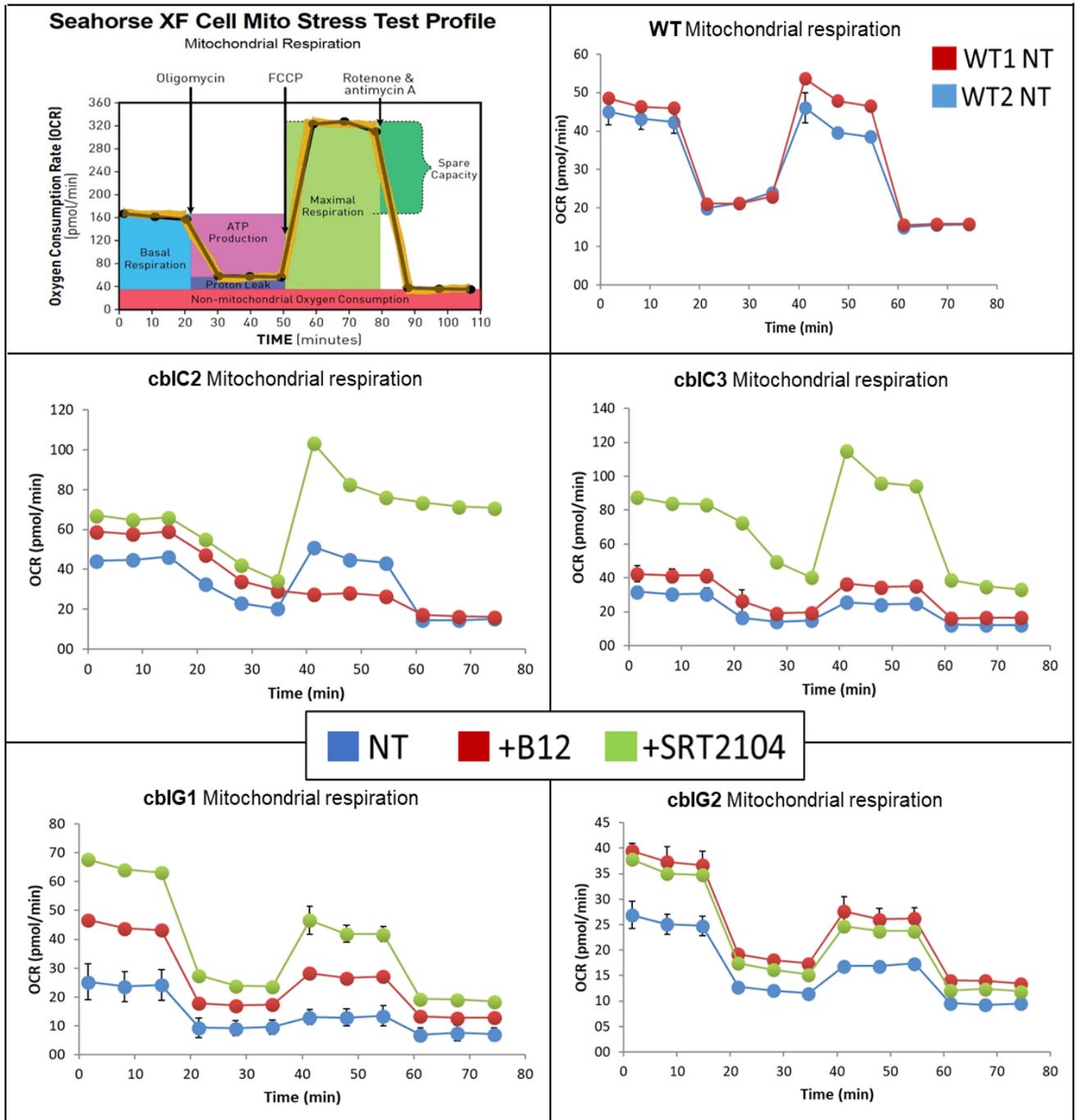
Le taux de production d'ATP est un des paramètres étudiés. Les résultats de la Figure 38.B montrent que dans les cellules de patients le niveau de production d'ATP (cblC3 :

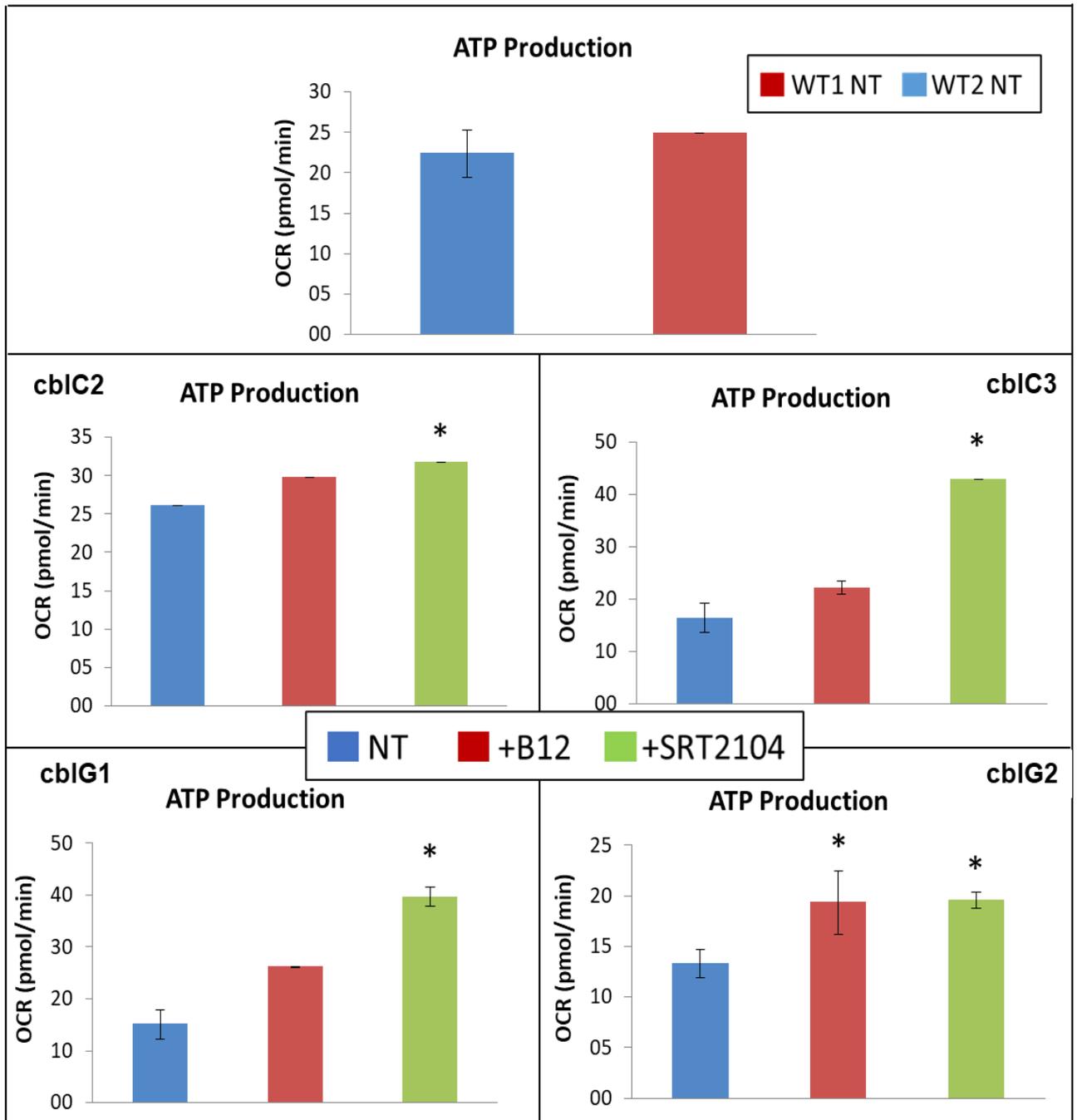
19 pmol/min ; cblG1 : 17 pmol/min ; cblG2 : 13 pmol/min) est plus faible que chez les contrôles (25 pmol/min) à l'exception du patient cblC2 qui présente le même niveau que le contrôle (25 pmol/min).

Le traitement avec SRT2104 active d'une façon significative la production d'ATP dans les cellules de tous les patients. Par contre, le traitement B12 ne semble pas avoir un grand effet sauf dans les cellules cblG2 où les traitements B12 et SRT2104 ont le même effet sur la production d'ATP.

La comparaison des cartes énergétiques montre que les cellules WT ont un profil énergétique aérobie et glycolytique très actif. Contrairement aux cellules de patients cblC2 et cblG2 qui présentent un profil moins énergétique, et aux cellules cblG1 et cblC3 qui ont un profil plutôt quiescent. Le traitement avec SRT2104 active la production d'énergie via la chaîne respiratoire et via la glycolyse d'une manière très importante par rapport au traitement par B12 qui a aussi un effet bénéfique dans les cellules cblC2 et cblG2 mais moins important que celui du SRT2104, et des effets négligeables chez cblC3 et cblG1.

A



B

C

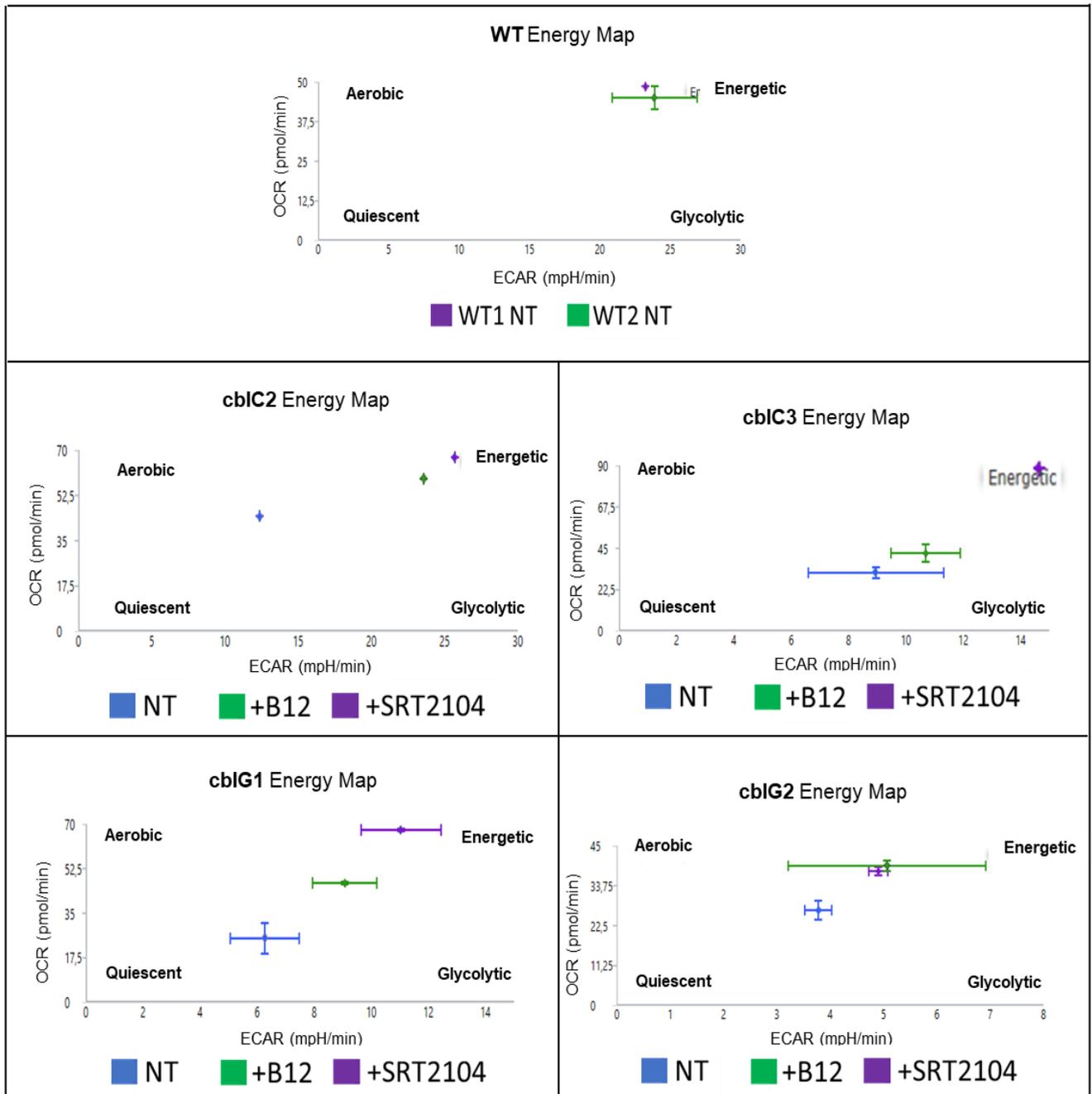


Figure 38 : Respiration mitochondriale des fibroblastes *cbIC* et *cbIG*

La respiration mitochondriale a été mesurée avec le kit Seahorse (Cell mito stress) **A**. Profils de la respiration mitochondriale des cellules WT et de cellules *cbIC* et *cbIG* dans trois conditions expérimentales (NT, +B12 et +SRT2104). **B**. et **C**. Paramètres clés calculables de la respiration mitochondriale. B. Mesure de la production d'ATP. C. Carte énergétique des lignées de patients montrant quatre profils différents (Quiescent, Énergétique, Aérobie et Glycolytique). Résultats présentés en moyennes \pm écart-type. * $p < 0.05$. $n = 3$.

Conclusion sur cette partie des résultats

Dans leur ensemble, ces résultats ont montré dans les fibroblastes de patients cblC et cblG, une diminution de l'expression et un défaut de localisation subcellulaire de SIRT1 ainsi qu'un niveau élevé du stress oxydant cytoplasmique et mitochondrial et un stress du réticulum endoplasmique. Ces différentes formes de stress cellulaire ont été associées à des altérations mitochondriales : la morphologie des réseaux de mitochondries ainsi que le fonctionnement mitochondrial (potentiel de membrane et respiration) sont considérablement altérés dans les cellules de patients. De plus, l'utilisation de SRT2104 seule ou associée à la NAC et à la B12 a souvent été plus efficace que la vitamine B12 seule, ce qui confirme l'intérêt d'une telle association. Les résultats obtenus avec les fibroblastes provenant de quatre patients différents ont montré quelques différences qui reflètent peut-être la grande hétérogénéité de symptômes et de réponse aux traitements qui peut exister même entre les patients d'un même groupe de défaut génétique.

Discussion I

Dans le cycle des monocarbones, le tétrahydrofolate et la méthionine sont générés par un transfert du groupe méthyle du méthyltétrahydrofolate à l'homocystéine (Hcy) par la méthionine synthase (MS) qui est Cbl-dépendante (McCaddon et al., 2002). Les mutations du gène *MTR* codant pour la MS comme dans le cas des patients cblG entraînent donc une accumulation de l'homocystéine dans la cellule d'une part, et une diminution de la synthèse de méthionine, le précurseur de la S-adénosylméthionine, le donneur universel de groupements de méthyles, ce qui peut affecter les réactions de méthylations des acides nucléiques, des protéines et des lipides.

Localisation subcellulaire de SIRT1

Les sirtuines sont une famille d'enzymes NAD⁺ dépendantes qui contiennent sept membres (SIRT1-7). SIRT1 est une désacétylase impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique, la réponse au stress cellulaire, la mort cellulaire et la durée de vie (Aquilano et al, 2010). Les résultats précédents du laboratoire avaient montré que les dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 pouvaient conduire à une altération des modifications post-transcriptionnelles, et post-traductionnelles, phosphorylation et méthylation, des RBPs tel que HuR, HnRNPA1 et SRSF1 nécessaires à leur transport nucléo-cytoplasmique (Rashka et al., 2020). La localisation aberrante de RBPS comme HuR entraîne par la suite une perte de fonction de ces protéines, dont la stabilisation de l'ARNm de SIRT1. La diminution de l'expression de SIRT1 conduit ensuite à une diminution de l'expression des chaperonnes et donc à au développement du stress du RE (Battaglia-Hsu et al, 2018 ; Ghemrawi et al. 2019).

Nos résultats confirment les problèmes de localisation cellulaire d'HuR identifiés dans les fibroblastes de patients cblC et cblG ainsi que la diminution de l'expression de SIRT1 dans la plupart des lignées étudiées. En effet, la diminution de l'expression de SIRT1 n'a pas été détectée dans toutes les lignées mais nous avons pu mettre en évidence des altérations de la localisation subcellulaire de SIRT1. Ainsi, la diminution de l'expression et/ou la diminution de la localisation nucléaire de SIRT1 pourraient participer à la perte de fonction de cette protéine et contribuer au développement du stress du RE.

Concernant la localisation subcellulaire de SIRT1, la présence de deux signaux de localisation nucléaire et cytoplasmique et de signal d'exportation nucléaire a conduit

certain auteurs à suggérer que SIRT1 faisait la navette entre le noyau et le cytoplasme (Tanno et al., 2007). Cette translocation nucléaire de SIRT1 a été associée à ses fonctions cytoprotectrices dans différents modèles cellulaires (Hou et al, 2010 ; Tanno et al, 2010). En effet, il a été rapporté que dans les cardiomyocytes de différentes espèces, SIRT1 est principalement localisé dans le cytoplasme et doit être localisé dans le noyau pour induire l'expression de MnSOD à la suite d'un stress oxydant (Tanno et al, 2010). Le rôle de la localisation nucléaire de SIRT1 avec l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress a également été décrit pour le gène de l'hémoxygénase (HO-1), de SOD3 et de la NADPH quinone oxidoreductase (NQO-1) (Yanagisawa et al, 2018). Fait intéressant, il a été démontré que des niveaux accrus de stress oxydatif en altérant la navette nucléocytoplasmique de SIRT1 pourraient réduire les effets cytoprotecteurs de SIRT1 (Tong et al, 2013). Des preuves d'une localisation cytoplasmique de SIRT1 ont également été rapportées dans des modèles murins de maladie d'Alzheimer et de sclérose latérale amyotrophique dans lesquels SIRT1 est surexprimé comme une réponse adaptative à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (Zhang et al., 2020).

Par contre, l'association des délocalisations de HuR et de SIRT1 que nous avons mis en évidence n'a encore jamais été décrite dans la littérature. Il est possible que ces deux molécules utilisent le même type de mécanismes moléculaires pour assurer leur transport nucléocytoplasmique. La caractérisation des altérations du transport nucléocytoplasmique de HuR associés aux défauts du métabolisme de la vitamine B12 a été étudiée au laboratoire (Battaglia-Hsu et al., 2018) où il avait été montré que les altérations des modifications post-traductionnelles de HuR (méthylation et phosphorylation) conduisaient à une diminution ou à une augmentation des interactions entre HuR et certains composants du pore nucléaire comme CRM1 et PP2A, ce qui se traduit également par une modification de la composition de ce complexe multiprotéique. Bien que le transport nucléocytoplasmique de SIRT1 soit moins étudié que celui de HuR, il a été démontré qu'il pouvait être inhibé par la leptomycine B, un inhibiteur de CRM1 (Tanno et al., 2007). Ceci suggère que les problèmes de localisation subcellulaire de HuR et de SIRT1 pourraient, au moins en partie, partager certains mécanismes moléculaires communs. En effet, pour ces deux protéines, nos résultats montrent que les dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 peuvent conduire à une altération de leur localisation subcellulaire et à

une réduction de leur fonction de réponse au stress. L'étude des modifications post-traductionnelles de SIRT1 ne faisait pas partie de mon sujet de thèse mais les résultats obtenus suggèrent qu'il serait intéressant d'étudier ces mécanismes dans le cadre des dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12. Ils montrent aussi que la perte de fonction de protéines importantes dans le métabolisme cellulaire, comme HuR ou SIRT1, n'est pas nécessairement due à une diminution de leur expression mais aussi à une altération de leur localisation subcellulaire.

Homocystéine et ROS

L'importance du stress oxydatif dans la pathogenèse des maladies liées à l'altération du métabolisme de la Cbl a été rapportée par plusieurs études (Richard et al., 2007 ; Richard et al., 2013). En effet, la corrélation entre le niveau de ROS et le phénotype a révélé que les patients atteints du défaut génétique cblB néonatal sévère avaient une teneur en ROS intracellulaire élevée. De plus, les fibroblastes de plusieurs de ces patients ont montré une augmentation significative de ROS intracellulaires et un niveau d'expression de MnSOD élevé par rapport aux témoins, suggérant la mise en place d'une réponse cellulaire à un stress oxydant (Richard et al., 2007). Il a même été suggéré que l'augmentation observée de la teneur en ROS pourrait induire des modifications du potentiel membranaire mitochondrial, conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial et à l'activation d'un processus de mort cellulaire. Le stress oxydatif a également été décrit dans le cadre d'autres défauts génétiques associés à une élévation de l'homocystéine, comme le défaut cblC (Richard et al., 2013). Toutes les lignées cellulaires testées ont montré une augmentation significative de la teneur en ROS, du niveau d'expression de MnSOD, ainsi qu'un taux d'apoptose plus élevé

De plus, certaines études ont montré qu'une concentration faible de vitamine B12 est liée à une augmentation des pro-oxydants et à une diminution du statut antioxydant, à la fois dans l'ensemble de la population et chez les personnes présentant une déficience infraclinique par rapport à ceux qui ont un statut B12 normal (Van de Lagemaat et al., 2019). Une analyse métabolomique récente a trouvé des liens entre le déficit subclinique en vitamine B12 et des marqueurs sériques responsables de la diminution de la stabilité de la myéline, de la fonction des neurones périphériques, de la fonction mitochondriale, et un stress oxydatif (Brito et al., 2017).

Il a été montré que le taux élevé d'homocystéine est associé à un dysfonctionnement des cellules endothéliales et favorise la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), principalement par un mécanisme impliquant le monoxyde d'azote synthase endothélial, mais aussi par auto-oxydation (Ginnan et al., 2008). L'Hcy inhibe également les enzymes antioxydantes superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase et active les voies de signalisation pro-inflammatoires endothéliales (Biswas et al., 2006). L'accumulation d'homocystéine résultant d'une diminution de l'activité de la méthionine synthase ou d'un déficit en cystathionine bêta-synthase entraîne aussi une augmentation du stress oxydatif via la formation de liaisons disulfures mixtes d'homocystéine et d'homocystéinylation des protéines. Les fibroblastes de patients cblC et cblG présentent une accumulation d'homocystéine et une augmentation du stress oxydant. Par contre, nous n'avons pas établi de corrélation entre des différences de concentrations cellulaires d'homocystéine et celles de ROS. Il est très probable que d'autres mécanismes moléculaires contribuent également à la production accrue de ROS dans ces cellules, comme les dysfonctionnements de la chaîne respiratoire mitochondriale.

SIRT1 et les mitochondries

Les mitochondries sont l'une des principales sources cellulaires de ROS et, à son tour, un stress oxydant accru entraîne une fragmentation mitochondriale. En effet, des défauts dans la chaîne de transfert d'électrons conduisent à une augmentation de la production de ROS (Pacelli et al., 2011).

A part des résultats de l'analyse protéomique chez les rats carencés en B12 montrant une altération d'expression des protéines impliquées dans la β -oxydation et la chaîne respiratoire comme la diminution de l'expression de complexe 1 et 2 (Garcia et al. 2011), la physiologie mitochondriale et sa morphologie n'ont pas été suffisamment analysées dans le contexte de l'altération du métabolisme de la vitamine B12. D'autre part, les altérations mitochondriales sont communes à plusieurs pathologies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, et sont liées à de nombreuses manifestations neurologiques, comme la fragmentation du réseau mitochondrial, la perturbation de la dynamique mitochondriale et l'altération de la phosphorylation oxydative mitochondriale trouvées dans les fibroblastes de patients

DOA+, une pathologie d'atrophie optique associée à des manifestations neurologiques (Yu-Wai-Man P. et al., 2011), et le syndrome de MELAS, une encéphalomyopathie mitochondriale due à une mutation du gène *MT-TL1* qui provoque une altération de la phosphorylation oxydative et la production d'ATP (El-Hattab AW. et al., 2015).

Deux raisons majeures pour lesquelles nous nous sommes intéressés aux altérations mitochondriales dans les cellules de patients ainsi que l'effet du traitement avec SRT2104 sur la correction de ces altérations.

L'un des mécanismes compensatoires déclenchés par l'augmentation des ROS consiste en une surexpression de MnSOD, la superoxyde dismutase 2 (SOD2) comme chez les fibroblastes cblC2 et cblG2. La MnSOD est une enzyme antioxydante intra-mitochondriale (Zelko et al., 2002). En raison de sa localisation dans les mitochondries, la SOD2 est la principale défense contre la toxicité des radicaux anions superoxydes ($O_2\bullet$) générés comme sous-produit de la phosphorylation oxydative. Malgré l'augmentation importante du stress oxydant dans toutes les lignées de fibroblastes de patients cblC et cblG que nous avons testés, nous n'avons pas détecté d'augmentation systématique de l'expression de SOD2. Cette absence d'induction de l'expression de la MnSOD pourrait être liée à la diminution des capacités de réponse au stress associée à la diminution d'expression et à la délocalisation de SIRT1, de HuR et d'autres RBP impliquées dans la réponse au stress (Ghemrawi et al., 2019 ; Rashka et al., 2020).

Le rôle de SIRT1 dans la régulation de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme oxydatif est médié par son interaction avec PGC-1 α , le coactivateur 1 α du récepteur γ activé par le proliférateur du peroxisome (PPAR γ), qui régule l'expression de nombreux gènes mitochondriaux. SIRT1 a une double localisation subcellulaire dans le noyau et dans les mitochondries et interagit avec PGC-1 α dans les deux compartiments contribuant à la régulation des gènes nucléaires et mitochondriaux. Des preuves expérimentales ont montré que la diminution de l'expression de SIRT1 réduit l'expression de PGC-1 α et altère la biogenèse mitochondriale dans un modèle de rat épileptique expérimental (Chuang et al., 2019). D'autres études de notre laboratoire, sur des myocardiocytes extraits du modèle de rats avec une alimentation dépourvue de donneurs de méthyle ont montrés une acétylation/méthylation déséquilibrée de PGC-1 α , due à une diminution de l'expression de SIRT1 et du PMRT1. PGC-1 α est l'un des trois régulateurs majeurs du métabolisme oxydatif des

mitochondries cardiaques avec PPAR α et PPAR γ . Cela a expliqué la diminution de l'expression des enzymes mitochondriales impliquées dans l'oxydation des acides gras et des complexes I et II de la respiration dans ce modèle (Garcia et al., 2011). Les altérations subséquentes de la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été associées à une augmentation du stress oxydatif et de l'apoptose. Nos résultats soutiennent cette relation entre l'activité réduite de SIRT1, des perturbations mitochondriales et le stress oxydatif. Ils démontrent également que cette voie contribue au développement d'un stress cellulaire déclenché par des défauts génétiques du métabolisme de la Cbl.

Le traitement au SRT1720 a entraîné une diminution des niveaux de superoxyde mitochondrial mesurés par le réactif MitoSox (Zeng et al., 2021). Fait intéressant, dans les ostéoblastes de souris, l'angiotensine II induit un stress oxydatif mitochondrial tout en inhibant également l'expression de la catalase et de la MnSOD via une diminution de l'expression de SIRT1 (Li et al., 2014). En effet, la surexpression de SIRT1 ou le traitement avec le STAC SRT3025 ont restauré l'expression de MnSOD dans ces cellules.

SIRT1 et le réseau mitochondrial

Les mitochondries sont des organites dynamiques qui subissent une fission et une fusion constantes en réponse aux besoins cellulaires et à l'état métabolique de la cellule. Un stress cellulaire léger peut favoriser la fusion mitochondriale pour augmenter la production d'ATP et un stress prolongé ou sévère est associé à la fragmentation mitochondriale. Alors que le réseau mitochondrial normal est caractérisé par des mitochondries allongées, tubulaires et ramifiées, le dysfonctionnement mitochondrial est associé à un réseau fragmenté de petites mitochondries de forme ronde. Les altérations de cette dynamique mitochondriale sont liées à un dysfonctionnement mitochondrial couramment observé lors d'un stress cellulaire élevé et de diverses conditions pathologiques (Tilokani et al., 2018). Les données de la littérature ont confirmé le lien entre le stress cellulaire et le changement de la morphologie mitochondriale dans le cas de certaines pathologies (Shah et al., 2019) (Brooks et al., 2011). En effet, des mutations dans les gènes codant pour des composants critiques de la machinerie de fission et de fusion ont été associées à diverses maladies graves affectant principalement le système nerveux central (Zemirli

et al., 2018). En revanche, plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie de Huntington et la maladie d'Alzheimer, et le diabète de type 2 ont été associées à des processus anormaux de fusion/fission.

Le rôle de SIRT1 dans le maintien du réseau mitochondrial et dans les fonctions mitochondriales normales a été documenté dans différents modèles cellulaires. Il a été montré que les effets protecteurs de l'acide chlorogénique dans les cellules hépatiques de souris exposées à un stress oxydatif nécessitaient une activité SIRT1 qui contribuait à diminuer la production de ROS, à augmenter la masse mitochondriale et à restaurer une morphologie mitochondriale normale (Yang et al., 2019). Une déficience en SIRT1 associée au vieillissement cardiaque a entraîné des altérations de la phosphorylation oxydative mitochondriale et une altération de la respiration mitochondriale à la suite d'un stress oxydatif (Zhang et al., 2020). En revanche, le rôle de SIRT1 dans l'induction de la fragmentation mitochondriale a également été rapporté dans les cellules Hela traitées avec un inhibiteur du transfert de calcium (Lovy et al., 2020).

SIRT1 et respiration mitochondriale

Nos résultats ont montré une réduction significative des paramètres de la respiration mitochondriale dans les cellules cbIC et G par rapport au contrôle. En se basant sur la littérature on peut créer le lien entre cette diminution et les taux élevés des ROS d'après Douiev et al (Douiev et al., 2016) qui dit que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont supposées être impliquées dans la pathogenèse des maladies mitochondriales innées affectant ainsi la phosphorylation oxydative.

En condition de respiration basale, les lignées cbIC et cbIG semblent consommer moins d'oxygène par rapport aux témoins. Cette diminution semble être associée à une diminution de la respiration basale en premier temps, à une diminution importante de la production d'ATP ainsi qu'à une diminution significative de la respiration maximale et de la capacité de réserve en oxygène (résultats non présentés). Ces résultats semblent être la conséquence de l'altération de la morphologie, du potentiel membranaire mitochondrial et du taux élevé des ROS mitochondriaux. En d'autres termes, le stress mitochondrial ne semble pas seulement affecter la morphologie mais aussi la respiration et la production d'ATP.

L'activation de SIRT1 par SRT21041 a conduit à une activation générale de la respiration mitochondriale (respiration basale et maximale) ainsi qu'à une

augmentation de la production d'ATP que ce soit par phosphorylation oxydative ou bien par glycolyse.

Activateurs de SIRT1 et activité mitochondriale

En plus de réguler le réseau mitochondrial, l'activité de SIRT1 contribue également à réguler la fonction mitochondriale. En effet, il a été démontré que le traitement au SRT1720 augmentait les niveaux du potentiel de la membrane mitochondriale et le taux de consommation d'oxygène basal mitochondrial des cellules souches mésenchymateuses âgées de singes cynomolgus (Zeng et al., 2021). Dans ces cellules, l'activation de SIRT1 a également diminué le taux de mort cellulaire induite par H₂O₂ en inhibant la voie apoptotique à médiation mitochondriale.

L'activation pharmacologique de SIRT1 par SRT1720 a stimulé aussi la biogenèse mitochondriale dans des cultures primaires de cellules des tubules proximaux rénaux (Funk et al., 2010). Cet activateur de SIRT1 a également augmenté la capacité mitochondriale mesurée par l'activité de la citrate synthase dans un modèle murin de diabète de type 2 (Milne et al., 2017). Il a été suggéré que l'activation pharmacologique de SIRT1 était capable d'imiter les effets de la restriction calorique sur la capacité mitochondriale et la fonction métabolique *in vivo*. De plus, le rôle de SIRT1 dans la prévention des dommages oxydatifs et du dysfonctionnement mitochondrial a également été documenté dans les cellules endothéliales (Tsai et al., 2018).

Les différents traitements que nous avons utilisés sur les cellules de patients cblC et cblG démontrent l'implication de SIRT1 sur le stress oxydatif mitochondrial, la diminution du potentiel de membrane mitochondrial, la morphologie du réseau de mitochondries et la respiration mitochondriale. De plus, l'ajout d'un antioxydant comme la NAC semble améliorer l'effet bénéfique de l'activation pharmacologique de SIRT1, ce qui suggère que le stress oxydant joue un rôle non négligeable dans les perturbations structurales et fonctionnelles des mitochondries.

Stress du RE

Un autre mécanisme qui participe dans la physiopathologie de ces défauts génétiques innés du métabolisme de la Cbl associées au déficit en méthionine synthase, est le développement du stress du réticulum endoplasmique et d'une altération de la réponse

au stress cellulaire à travers plusieurs mécanismes moléculaires associant des altérations des modifications post-traductionnelles des RBP avec la diminution de l'activité de SIRT1. (Battaglia Hsu et al., 2018 ; Ghemrawi et al., 2019). De plus, l'accumulation d'homocystéine suite au déficit en méthionine synthase peut déclencher la N-homocystéinylation des protéines, qui perdent ainsi leurs fonctions suite à un mauvais repliement et à la désorganisation de leurs structures. L'accumulation de ces protéines non fonctionnelles peut s'évaluer jusqu'à la formation des agrégats protéiques perturbant ainsi le bon fonctionnement du réticulum endoplasmique et déclenchant le stress dans cet organe (Schröder, 2008). Ce stress a été vérifié dans notre modèle par la surexpression de protéines HSP70 telle que compris Bip qui joue un rôle important dans la réponse au stress du RE.

Nous avons ensuite montré que la protéine chaperonne Bip était surexprimée dans les fibroblastes de patients cblC et encore plus chez les patients cblG. Les protéines HSP voient leur expression augmenter très fortement en condition de stress cellulaire et notamment de stress du RE. Concernant Bip, ces résultats suggèrent que les fibroblastes cblC1 et surtout cblG2 présentent un stress endogène plus marqué que chez les contrôles. Ces résultats confirment les travaux précédents du laboratoire (Battaglia-Hsu et al., 2018). De plus, après une activation exogène du stress du RE par un traitement à la tunicamycine, nous n'avons pas observé de différence d'expression de la chaperonne Bip dans nos trois lignées de fibroblastes, ce qui pourrait suggérer que les cellules cblC et cblG possèdent une réponse altérée aux stress exogène, en plus d'un stress endogène très marqué.

Nous avons alors essayé de mettre en évidence d'autres marqueurs de stress du RE tels que ATF6. En effet, la localisation nucléaire d'ATF6 est un marqueur du stress du RE. L'activation d'ATF6 pendant le stress du RE conduit à son clivage par les protéines SP1 et SP2 et à la translocation de sa partie cytosolique vers le noyau via l'appareil de Golgi pour agir ensuite comme facteur de transcription pour l'expression de protéines chaperonnes impliqués dans la réponse au stress (Chen et al., 2002).

STACs

Un des objectifs principaux de mon sujet de thèse consistait à étudier l'activation pharmacologique de SIRT1 *in vivo* sur un modèle murin de déficience génétique du

métabolisme intracellulaire de la vitamine B12. Pour cela, nous avons préalablement testé *in vitro* quatre activateurs pharmacologiques de SIRT1 ou STACs de seconde (SRT1720 et SRT2183) et de troisième génération (SRT2104 et SRT3025) sur des modèles de fibroblastes cblC et cblG. Nous avons mis en évidence une toxicité plus importante des SRTs de deuxième génération par rapport aux SRTs de troisième génération. De manière surprenante, la mortalité induite par ces SRTs de seconde génération est plus marquée dans les fibroblastes contrôles.

Par ailleurs, si le STAC le plus efficace *in vitro* semble être SRT1720 aux doses testées, SRT2104 reste tout de même relativement efficace. En effet, la méthode que nous avons utilisée ici pour mesurer l'activation de SIRT1 est réalisée avec une enzyme recombinante purifiée, et ne peut pas être utilisée avec des extraits cellulaires. Il est difficile de trouver dans la littérature une méthode permettant une quantification précise de l'activité de SIRT1 dans les cellules. En effet, bien que certaines publications s'intéressent au niveau d'expression protéique de SIRT1 (Jiao et al., 2018; Wu et al., 2018), les STACs permettent de stabiliser le complexe enzyme-substrat en diminuant le K_m , et ne modifient pas directement le niveau d'expression de SIRT1 (Hubbard et al., 2013). Une autre méthode pourrait consister à analyser le niveau d'acétylation des cibles de SIRT1 par western blot. Ainsi, on trouve certaines études qui portent sur le niveau d'acétylation de l'histone H₃ (Kim et al., 2015) par western blot afin de quantifier de manière semi-quantitative l'activité de SIRT1. Cependant, dans le cadre d'une déficience en vitamine B12, de précédents résultats du laboratoire montrent une altération globale des marques histones de méthylation (Pellanda et al., 2012) et d'acétylation (Rashka et al., 2020).

Il semblerait par ailleurs que SRT1720 et SRT2104 permettent de diminuer le stress endogène dans les lignées de fibroblastes cblC et cblG sans pour autant avoir d'effets délétères sur les fibroblastes contrôles. Ces résultats suggèrent que le SRT2104 pourrait être également utilisé *in vivo*. SRT2104 est donc le plus prometteur des quatre SRTs que nous avons testé, comme le confirme la littérature où de nombreuses études cliniques portent sur son utilisation thérapeutique dans diverses pathologies comme les maladies cardiovasculaires (Venkatasubramanian et al., 2013) et le diabète de type II (Baksi et al., 2014). D'autres études réalisées avec des modèles murins d'obésité

ou de diabète ont également fait part de l'efficacité du SRT2104 (Qi et al., 2011) ou du SRT1720 (Wang et al., 2019).

Traitement 3T : vitamine B12, SRT2104 et N-acétylcystéine

L'idée de tester un traitement combiné associant le SRT2104, la Cbl et un antioxydant comme la NAC, SRT2104 et le Cbl, était basée sur plusieurs données bibliographiques :

La vitamine B12 est utilisée actuellement comme traitement classique pour stimuler une éventuelle activité résiduelle de la méthionine synthase. Dans le cas de patients cblG, cette supplémentation a pu avoir des effets bénéfiques sur l'anémie et les symptômes hématologiques (Huemer et Baumgartner, 2019) mais elle ne présente aucun effet bénéfique notable sur les autres symptômes comme les symptômes neurologiques et ophtalmologiques. Partant de ces données nous avons donc décidé d'associer la vitamine B12 à un SRT dans un groupe de traitement.

Bien que l'implication du stress oxydatif dans les maladies liées aux défauts génétiques du métabolisme de la Cbl ait été décrite par plusieurs études, aucune étude n'avait encore testé l'efficacité d'un antioxydant dans ces cellules (Richard et al., 2007 ; Richard et al., 2013). Le lien entre le stress oxydatif et le stress du RE induit par SIRT1 n'a jamais été étudié. De plus, la littérature a décrit récemment des effets protecteurs de la cobalamine liés à des autres fonctions non co-enzymatiques. En effet, la Cbl peut avoir une réaction directe avec les ROS et peut avoir des propriétés antioxydantes en séquestrant ces radicaux libres dans la cellule (Green et al., 2017). C'est pourquoi nous avons voulu associer un antioxydant à la vitamine B12 et au SRT2104 dans un même groupe de traitement.

Le N-acétylcystéine (NAC) est un antioxydant bien étudié qui traverse la membrane cellulaire facilement et qui n'a pas d'effets toxiques même à des doses élevées (Sambo et al., 2001). Cette molécule a deux rôles dans la protection contre le stress oxydant, le premier rôle est indirect car la NAC peut servir de précurseur à la synthèse de glutathion. Le deuxième rôle est direct en interagissant directement avec les ROS pour les séquestrer et les réduire afin de les inactiver (Orihuela-Campos et al., 2015). De nombreuses études ont démontré le rôle cytoprotecteur de la NAC vis-à-vis des ROS cellulaires (Miquel et al., 1995 ; Douiev et al., 2016). D'autre part, la diminution du taux de glutathion total et réduit dans les lymphocytes des patients cblC par rapport

aux témoins (Pastore et al. 2014), avec la réponse inadaptée au stress oxydant nous a amené à tester l'association du SRT2104 avec l'antioxydant NAC.

Nos résultats concernant l'importance du stress oxydant cytoplasmique et mitochondrial, ainsi que l'importance des altérations fonctionnelles des mitochondries dans ces cellules ouvrent de nouvelles perspectives visant à développer un traitement innovant en associant une molécule activatrice de SIRT1 et un antioxydant. De plus, les données de la littérature suggèrent que certains antioxydants semblent plus spécifiques du stress mitochondrial comme MitoTempo qui a montré de bons résultats sur la protection du modèle des cellules épithéliales rénales contre les lésions rénales induites par l'oxalate ainsi que contre la lithiase urinaire (Zhang et al., 2017). Ainsi, il semblerait très pertinent de tester l'association d'un antioxydant plus spécifique du stress mitochondrial et d'un activateur de SIRT1.

En effet, une de nos hypothèses de départ consistait à lutter contre différentes formes de stress cellulaire, stress du RE et stress oxydant. Ainsi, l'association de la vitamine B12, qui en plus de ses activités antioxydantes peut également stimuler l'activité résiduelle de la méthionine synthase, un activateur de SIRT1 comme le SRT2104 et un ou plusieurs antioxydants ciblant différentes formes de ROS ou différents compartiments subcellulaires pourrait constituer une nouvelle stratégie potentielle dans le traitement des cas graves de résistance aux traitements classiques en réduisant les taux élevés de stress cellulaire et en rétablissant ainsi le bon fonctionnement des cellules, et en particulier le métabolisme énergétique. Cette approche a fait ensuite l'objet de la deuxième partie de mon projet visant à évaluer l'efficacité du traitement par l'agoniste de SIRT1 sélectionné, le SRT2104 sur les capacités cognitives du modèle murin de la maladie cblG.

En résumé, le traitement avec NAC a pour but de cibler le stress oxydant en diminuant le niveau des ROS cellulaires qui à leur tour peuvent amplifier le stress du RE déclenché par la diminution de l'expression de SIRT1. Cette diminution de SIRT1 résulte de la diminution de SAM et de la méthylation des RBP. Nous avons également gardé le traitement par OHcbl qui va cibler l'activité résiduelle de la MS et augmenter la production de SAM pour rétablir l'équilibre de méthylation des RBP et de PGC1 α . L'effet du traitement avec SRT2104 peut s'expliquer par une diminution du stress du

RE et par ses effets sur le métabolisme énergétique et la morphologie mitochondriale. Ces différents mécanismes aboutissent *in vivo* à l'amélioration des problèmes cognitifs et des troubles de la mémoire observés dans la deuxième partie du projet sur notre modèle des souris *Mtr* KO dans le cerveau.

Conclusion I

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont montré que le SRT1720, bien qu'il soit efficace *in vitro* et *in vivo* aux concentrations testées, était rapidement très toxique *in vitro* dès que les concentrations utilisées étaient supérieures. Cette toxicité étant rédhibitoire pour la poursuite du projet et pour la perspective d'essais cliniques chez l'humain, nous avons testé *in vitro* plusieurs molécules activatrices de SIRT1 et nous avons sélectionné le SRT2104 pour la suite du projet.

Les analyses *in vitro* que j'ai réalisées ont permis de mieux caractériser le stress cellulaire et en particulier le stress oxydatif cytoplasmique et mitochondrial dans les fibroblastes de patients. Ils ont également mis en évidence de nouveaux mécanismes moléculaires dans la physiopathologie de cette maladie. En effet, nous avons montré pour la première fois que les défauts génétiques associés à un défaut de méthylation de l'homocystéine affectaient également le métabolisme mitochondrial. En plus du stress oxydatif mitochondrial que nous avons mis en évidence, nos travaux ont montré que le potentiel de membrane était diminué et que la fonction de respiration mitochondriale était également réduite. Ces altérations fonctionnelles ont pu être associées à une altération globale de la morphologie du réseau mitochondrial. Ces résultats ont montré que l'utilisation d'antioxydant pouvait avoir un effet bénéfique sur cette forme de stress cellulaire et ils suggèrent aussi que l'utilisation d'antioxydant plus spécifique du stress oxydant mitochondrial pourrait être envisagé. D'un point de vue mécanistique, nos résultats ont démontré que l'activation pharmacologique de SIRT1 était non seulement capable d'inhiber le développement du stress du RE mais qu'il pouvait aussi avoir un effet sur le stress oxydant mitochondrial et sur ses conséquences fonctionnelles et structurales.

Résultats II

I. Approche phénotypique (caractérisation du modèle)

1. Génotypage des souris, expression de gène Cre par PCR

La première étape d'identification des individus est la vérification de l'expression du gène *cre* codant l'enzyme cre-recombinase du système cre-lox, par PCR comme montré dans la figure 39, Sur ce gel les individus TC+ sont ceux qui expriment le gène TC (gène codant la cre-recombinase sous contrôle du promoteur Thy1.2). Les individus TC-, n'expriment pas le gène TC donc sont des individus contrôles. Un contrôle positif interne nous permet de valider le génotypage même en cas de TC-. Ces résultats sont ensuite confirmés par la mesure de l'expression protéique de MS par Wes.

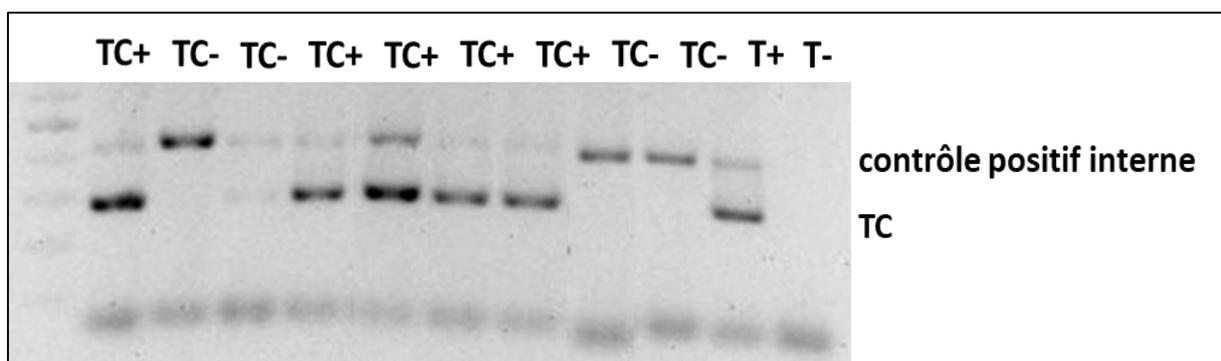


Figure 39 : Expression du gène Cre pour l'enzyme Cre recombinase par PCR.

Le gel d'agarose montrant les bandes d'expression du gène TC avec le gène contrôle, sur des ADN extraits des bouts de queue des souris quelques jours après la naissance.

TC : Thy1.2-cre, T+ : témoin positif, T- : témoin négatif (H₂O à la place d'ADN).

2. Expression de Mtr par Wes

L'objectif de cette partie du projet est de suivre le développement post-natal de jeunes souriceaux portant ou non une délétion dans le gène codant pour la méthionine synthase (*Mtr*).

Dans un premier temps, nous avons vérifié la délétion de *Mtr* dans les cerveaux des souris *Mtr* cKO par une analyse WES des échantillons de l'hippocampe.

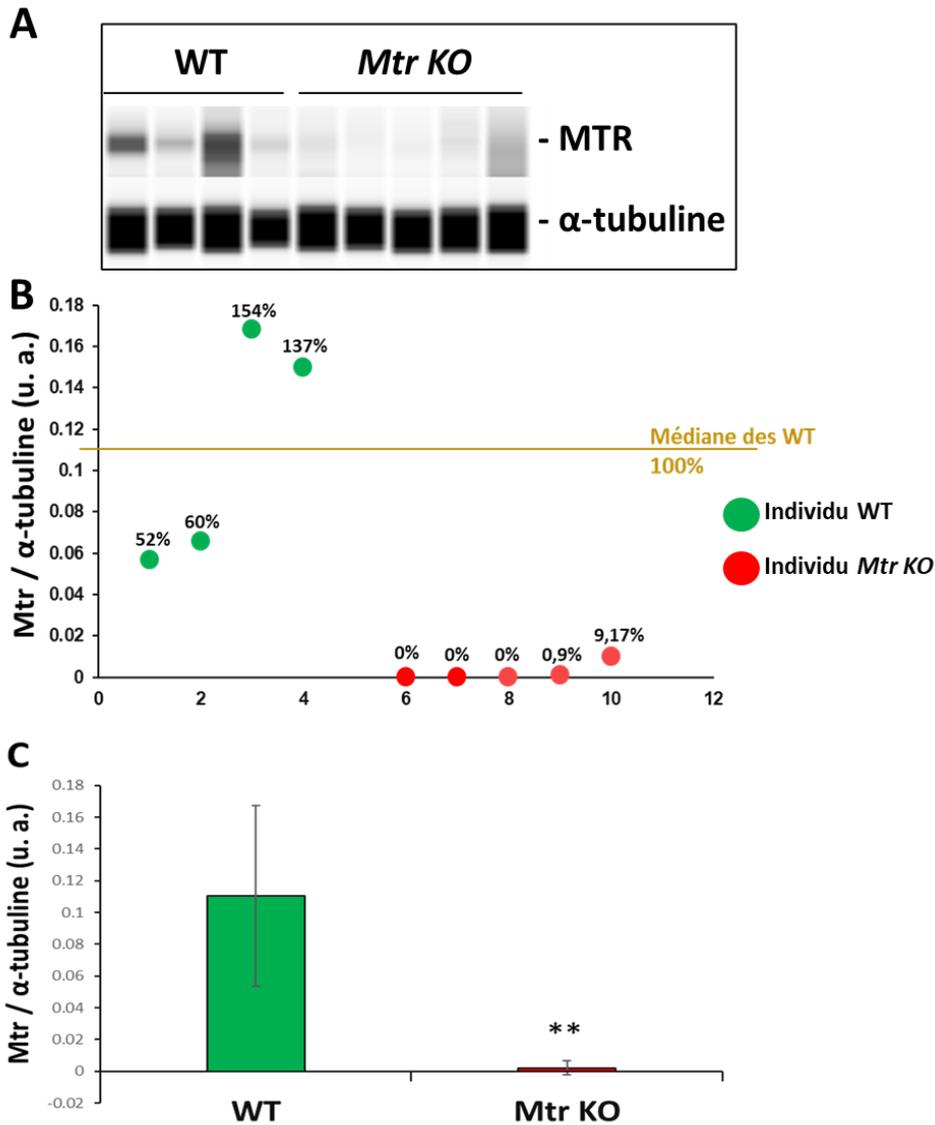


Figure 40 : Vérification de l'invalidation de *Mtr* au niveau de l'hippocampe dans notre modèle KO, par Wes.

A. Représentation des résultats WES montrant les bandes d'expression de *Mtr* et de l'alpha-tubuline comme protéine de référence. **B.** : Quantification de l'expression de *Mtr* chez les deux groupes contrôle (vert) et muté (rouge), avec l'expression de *Mtr* de chaque individu en pourcentage, par rapport à la médiane des WT qui représente 100% de l'expression. **C.** : Histogramme collectant les résultats par groupe WT et *Mtr* KO. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écart-type. ** $p < 0.001$.

Ces graphes (Figure 40) sont des illustrations de la démarche du travail, en présentant 4 WT et 5 *Mtr* KO. Par contre, tous les individus ont été caractérisés de la même manière et certains ont été retirés puisqu'ils expriment *Mtr* (jusqu'à 30% par rapport au contrôle par exemple) en présence de cre, même si cette expression est plus faible

que chez les contrôles, donc il semble que la cre recombinase présente un pourcentage d'efficacité qui n'atteint pas 100% chez les trois individus retirés. Le suivi du développement des souriceaux ne montre pas de différence de prise de poids, ni au niveau du poids total des cerveaux lors de la dissection (Figure 41).

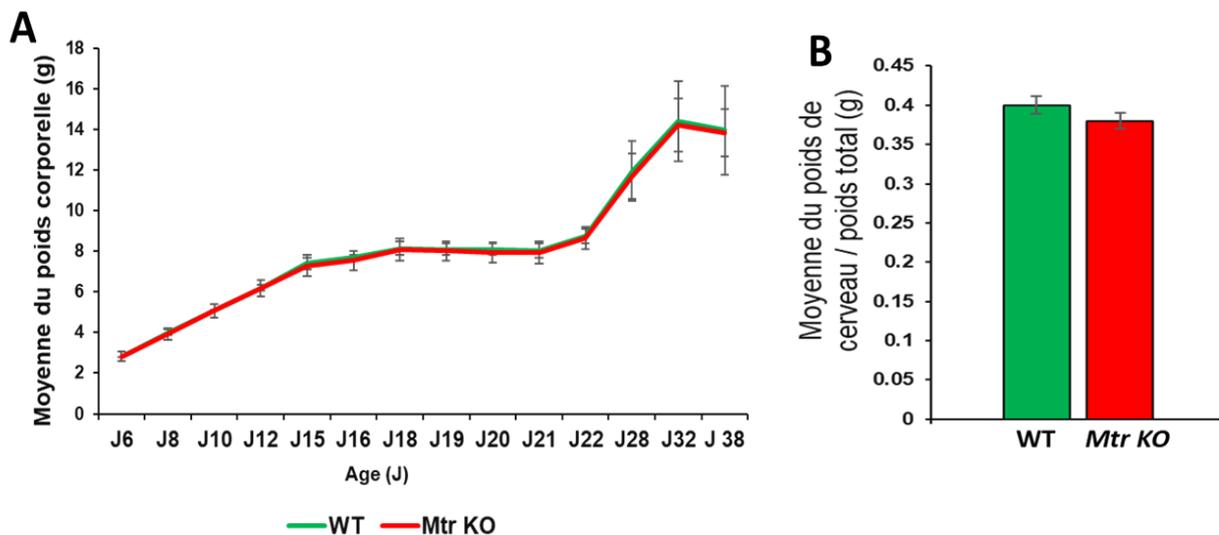
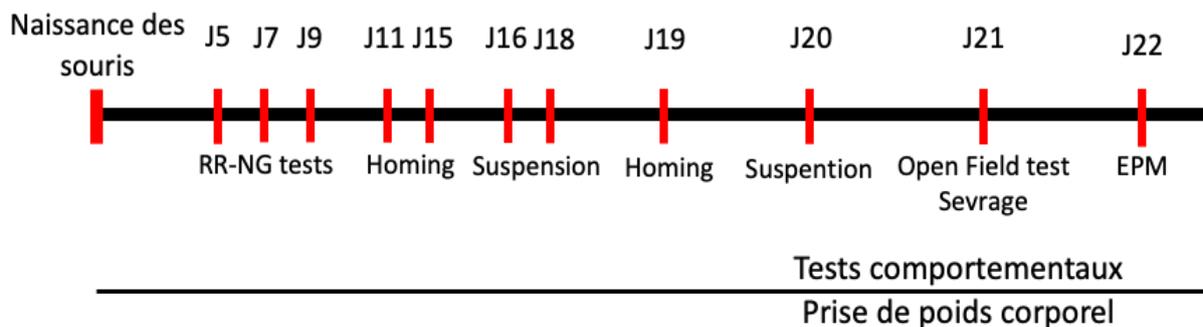


Figure 41 : A. Résultats du suivi développemental des souriceaux.

A : Poids corporel entre D8 et D37 et **B**. Poids des cerveaux au moment de la dissection à D37. Aucune différence significative n'a été mesurée entre les deux groupes.

II. Approche comportementale sur le modèle de souris KO-Mtr



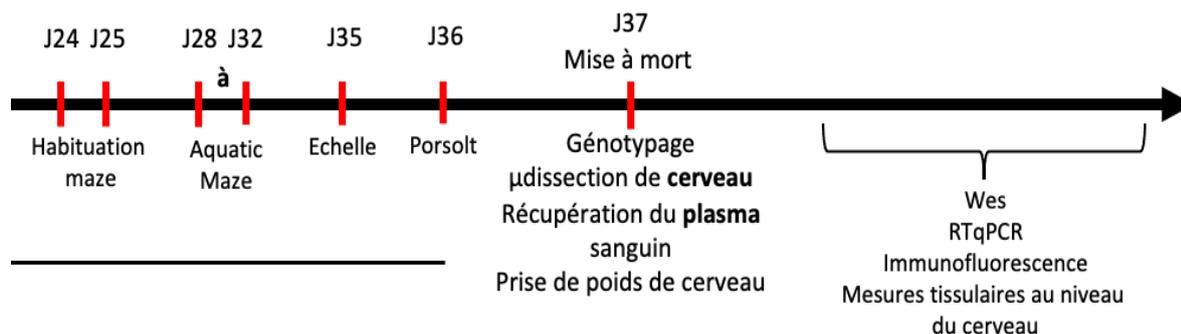


Figure 42: : Axe d'organisation du travail depuis le jour de naissance jusqu'après la dissection.

Axe montrant l'enchaînement de travail sur les tests comportementaux jusqu'au J37 et sur l'étude d'expression protéique et génétique, ainsi que les études histologiques suite à la récupération des échantillons des souris après la dissection. J : jour (équivalent à D pour days dans le texte).

Plusieurs portées ont déjà été obtenues et un screening comportemental a été effectué (Figure 42) grâce à des tests validés qui permettent de suivre la mise en place et la maturation de fonctions de D5 à D37 post-natal. Ainsi nous avons évalué des fonctions telles que les réflexes végétatifs, la coordination et la puissance musculaire, les premières fonctions cognitives via l'olfaction, le niveau de stress et d'anxiété et l'apprentissage en labyrinthe.

Les premiers résultats des tests comportementaux (Righting reflex et Negative geotaxis) montrent que les souris KO-Mtr accusent un retard d'acquisition des réflexes de retournement par rapport aux souris témoins du même âge et des mêmes portées à un âge très précoce de D5 à D9 (Figure 43.A et B). Ce retard d'acquisition est rétabli à J9 (D9) le troisième jour des tests RR et NG. D'autre part, un retard de performance est également retrouvé à un âge plus avancé lors du test de suspension qui est aussi rétabli le troisième jour du test à D20 (Figure 43.C).

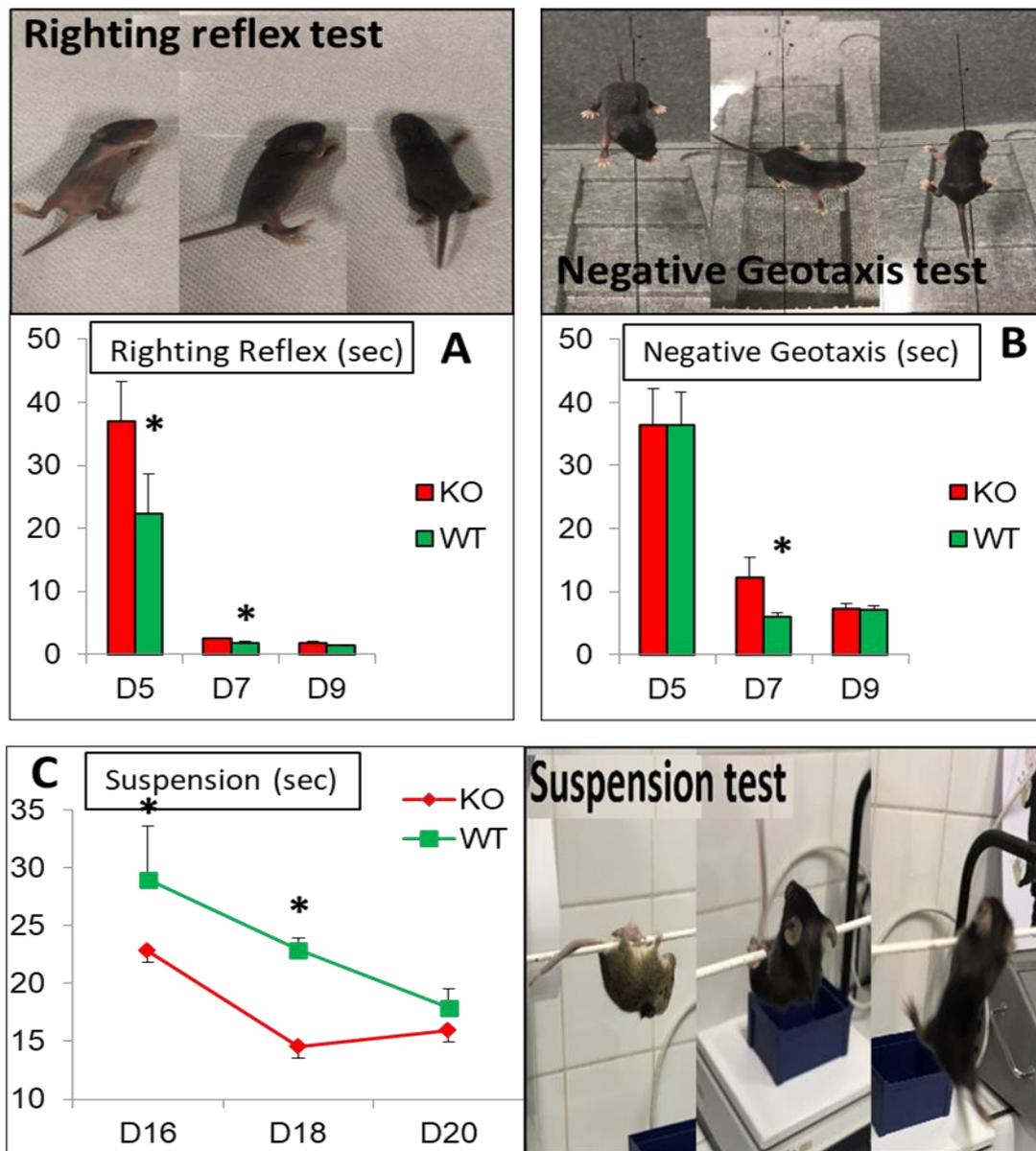


Figure 43: Résultats de différents tests comportementaux réalisés sur les souris.

A. Righting reflex test du D5 à D9. **B.** Negative reflex test du D5 à D9. **C.** Suspension test réalisé du D16 à D20. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ANOVA fisher's post-hoc. $n = 7$ à 9 par groupe.

Il est intéressant de noter que ces premiers résultats comportementaux semblent indiquer que la sous-expression de la méthionine synthase, engendre non pas des effets délétères irréversibles, mais plutôt des modulations qui impactent la mise en place des fonctions neuro-comportementales.

1. Capacité d'apprentissage des souris *Mtr* KO avant le sevrage

Nous avons poursuivi notre étude afin d'évaluer les performances d'apprentissage et de mémorisation de ces souris à l'âge précoce (avant sevrage, soit J11 à J20), pour cela, un test « Homing » est réalisé, ce test est basé sur les aptitudes des individus à reconnaître et suivre les informations environnementales, notamment olfactives, afin de retrouver leur environnement maternel habituel, noté par « S » pour désigner la litière sale prélevée de la cage d'élevage (Figure 44). Les résultats de ce test montrent une incapacité chez les souriceaux KO de connaître et de mémoriser leur environnement maternel en se basant sur la sensation d'olfaction à D11. Par contre, cette incapacité a disparu à D19. D'autres tests classiques ont également été réalisés comme le test de l'Open-field (Figure 45) et le test du labyrinthe en croix surélevé (EPM) (Figure 46) afin d'évaluer l'exploration, l'activité globale et le niveau d'anxiété. Aucune de ces fonctions ne s'est révélée affectée chez les souris *Mtr* KO par rapport aux témoins, malgré quelques significativités pour les zones non-protégées (Unprotected zone distance and duration) qui auraient pu indiquer un effet d'anxiété chez les KO (Figure 45) ; mais le test plus spécifique de l'EPM n'a pas validé cet indice issu de l'Open-Field.

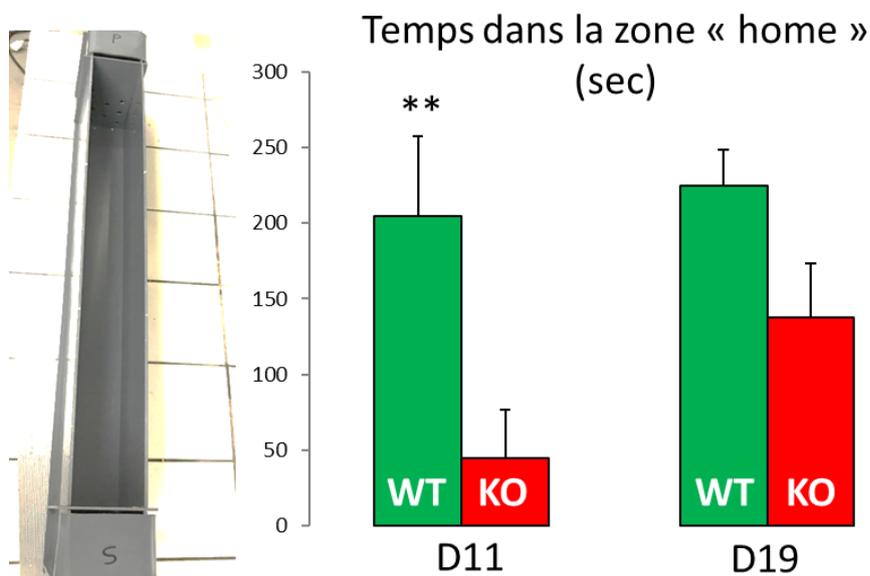


Figure 44: Résultats du test Homing réalisé sur les souris contrôles (WT) et *Mtr* KO avant sevrage

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm S.E.M. ; Anova test. ** $p < 0.01$. $n=7$ à 9 par groupe.

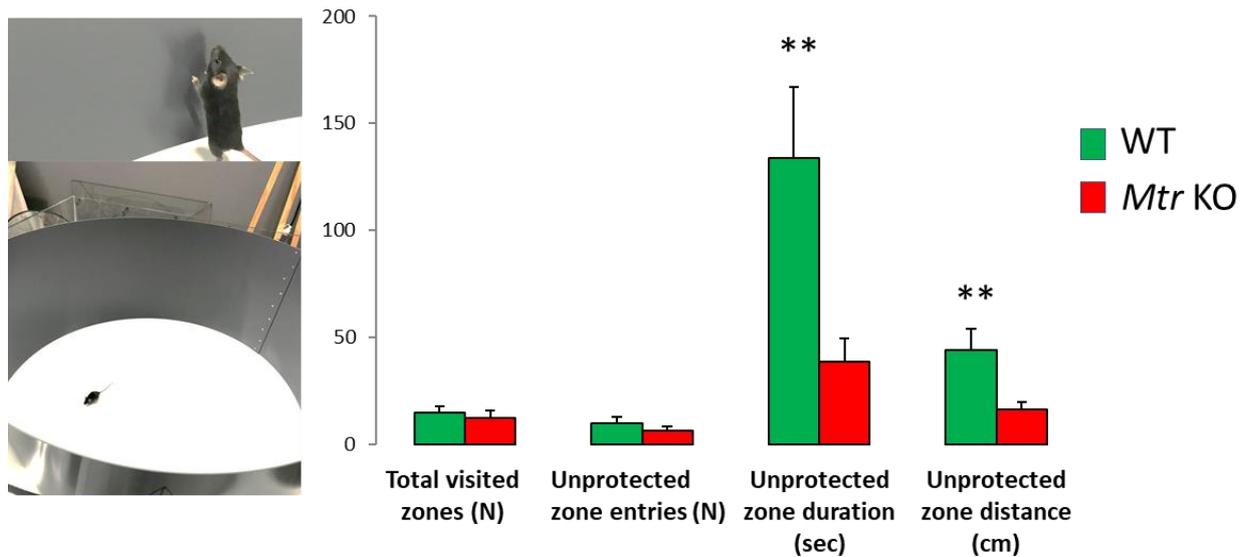


Figure 45: Résultats du test « Open field » réalisé sur les souris contrôles (WT) et Mtr KO avant sevrage.

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm S.E.M; Anova test. ** $p < 0.01$. $n=7$ à 9 par groupe.

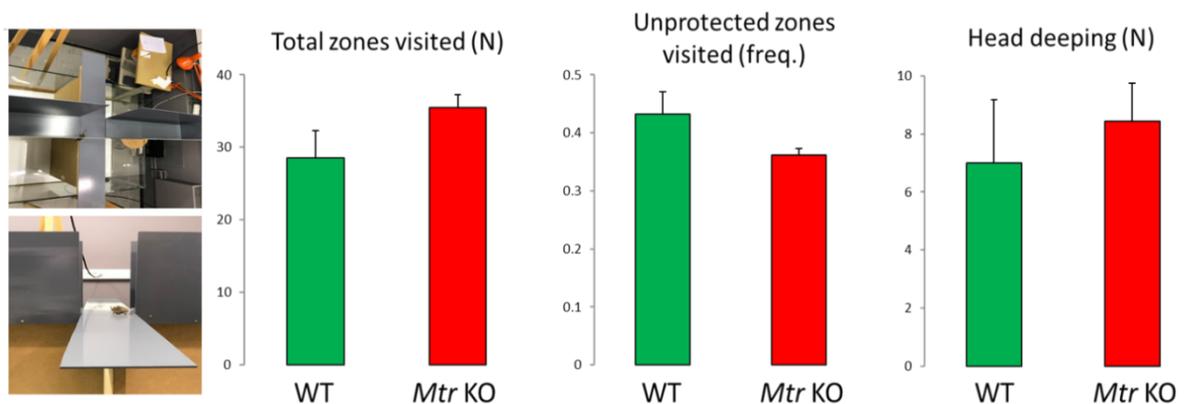


Figure 46 : Résultats du test « Elevated plus maze » réalisé sur les souris contrôles (WT) et Mtr KO avant sevrage.

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm S.E.M. ; Anova test. $n=7$ à 9 par groupe.

2. Capacité d'apprentissage des souris Mtr KO après le sevrage

Nous avons poursuivi notre étude afin d'évaluer les performances d'apprentissage et de mémorisation de ces souris à un âge plus avancé (après le sevrage, soit du D28 à D32).

Afin de vérifier si l'altération de l'apprentissage/mémorisation détectée dans le groupe Mtr KO par le "Homing test" (Figure 44), est un phénotype persistant et irréversible,

comme c'est le cas chez les patients cblG, un test de labyrinthe aquatique a été réalisé sur cinq sessions à un âge plus avancé (D28 à D32). Les résultats montrent une diminution du temps pris par les souris contrôles pour s'échapper du labyrinthe à partir de la troisième session (« Latence d'échappement » ; Figure 47) ; ce qui atteste de l'apprentissage. Par contre, aucune variation de temps n'est détectée chez les souris *Mtr* KO après les cinq sessions (Figure 47).

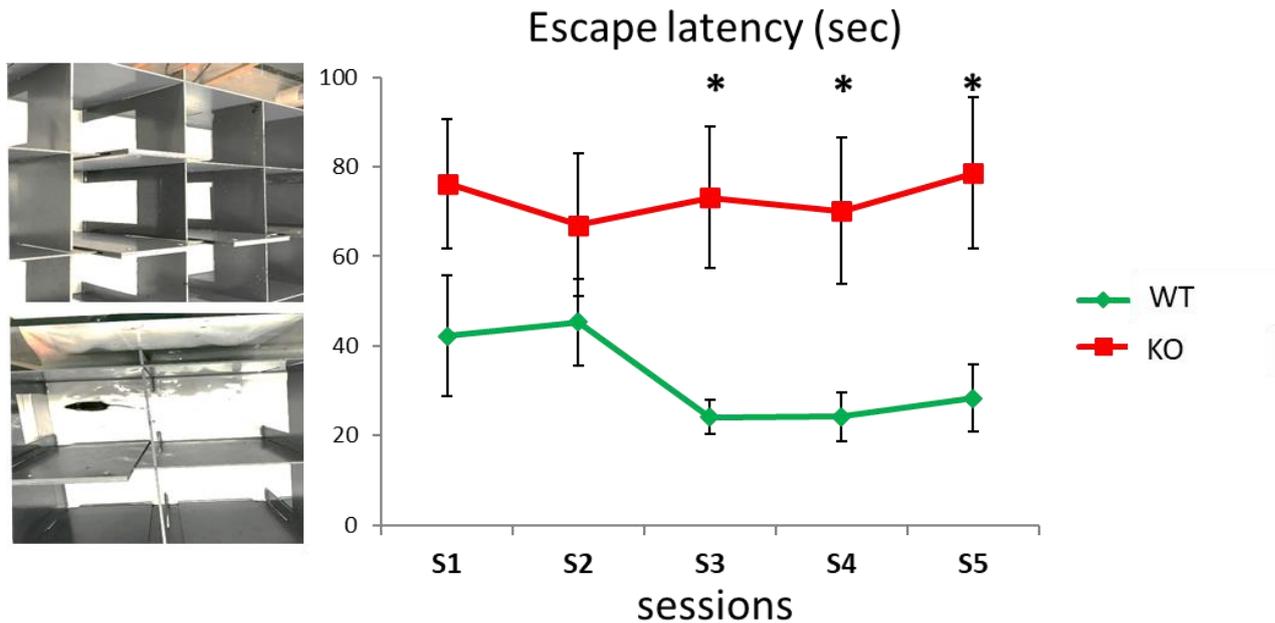


Figure 47: Résultat du test de labyrinthe aquatique réalisé sur 5 sessions sur les souris contrôles (WT) et *Mtr* KO après sevrage.

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm S.E.M ; Anova test. * $p < 0.05$. $n=7$ à 9 par groupe.

D'autres paramètres issus du logiciel de suivi "video-tracking" sont disponibles et significatifs. Nous choisissons de présenter la latence d'échappement car c'est le paramètre continu principal attestant de l'apprentissage ; alors que d'autres paramètres discontinus dépendent plutôt de la stratégie des souris et peuvent alterner significativité et non-significativité (ex. le nombre d'erreurs).

III. Approche structurale et biochimique

1. Etude histologique de mise en place des structures cérébrales

Afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels la déficience en méthionine synthase cause des déficits comportementaux, différentes structures cérébrales ont été étudiées par une approche histologique après la mise à mort des animaux à D37. Différentes mesures tissulaires ont été réalisées au niveau de différentes zones cérébrales (méthodes stéréotaxique reproductible entre les groupes / standardisation) pour valider ou non l'hypothèse selon laquelle les déficits comportementaux seraient relatifs à des défauts de développement et d'organisation des réseaux nerveux (mise en place développementale et maturation). Nous n'avons détecté aucun effet sur le nombre de cellules au niveau du cortex en mesurant la densité cellulaire (Figure 49), ni sur l'épaisseur des couches cellulaires au niveau du gyrus denté de l'hippocampe (Figure 48). La seule différence tissulaire observée est une diminution de l'épaisseur de la zone CA1 de l'hippocampe chez les souris *Mtr* KO par rapport au groupe contrôle (Figure 48).

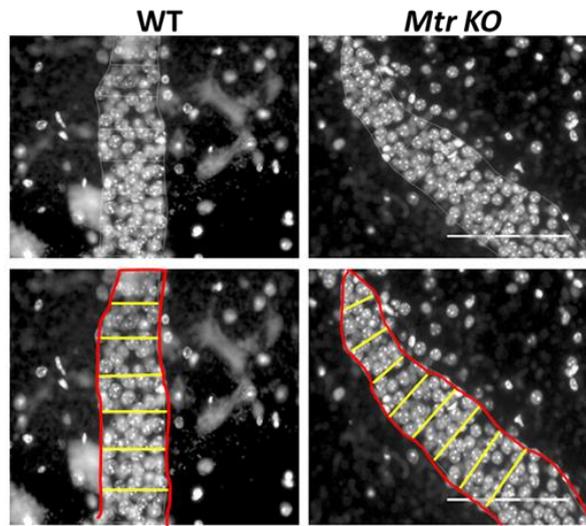
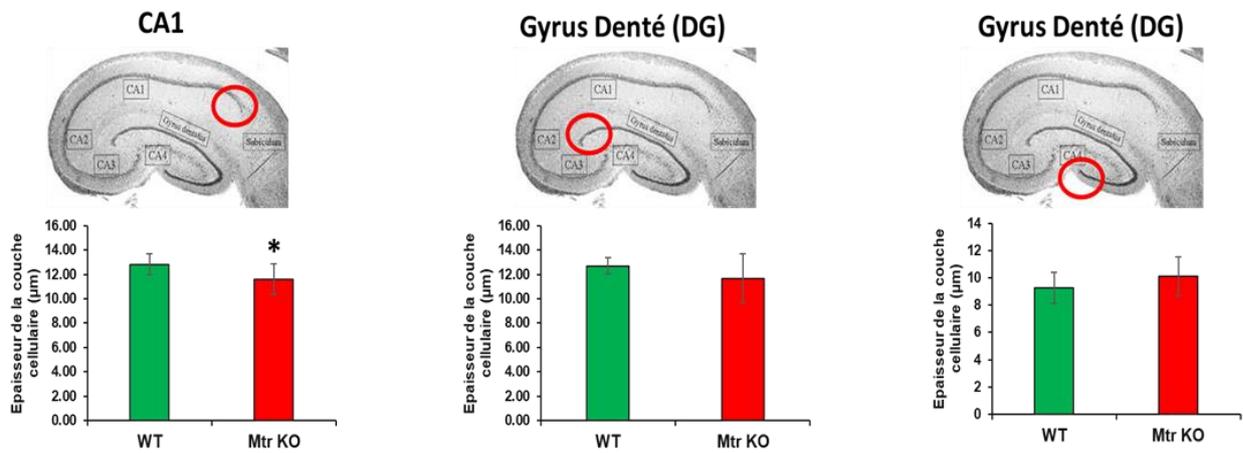
A**B**

Figure 48 : Mesure de l'épaisseur de la couche cellulaire hippocampique au niveau des zones CA1 et GD.

Mesures faites sur Image J. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm Ecart-type ; Anova. * $p < 0.05$. $n = 4$ à 5 par groupe.

Cortex cérébral

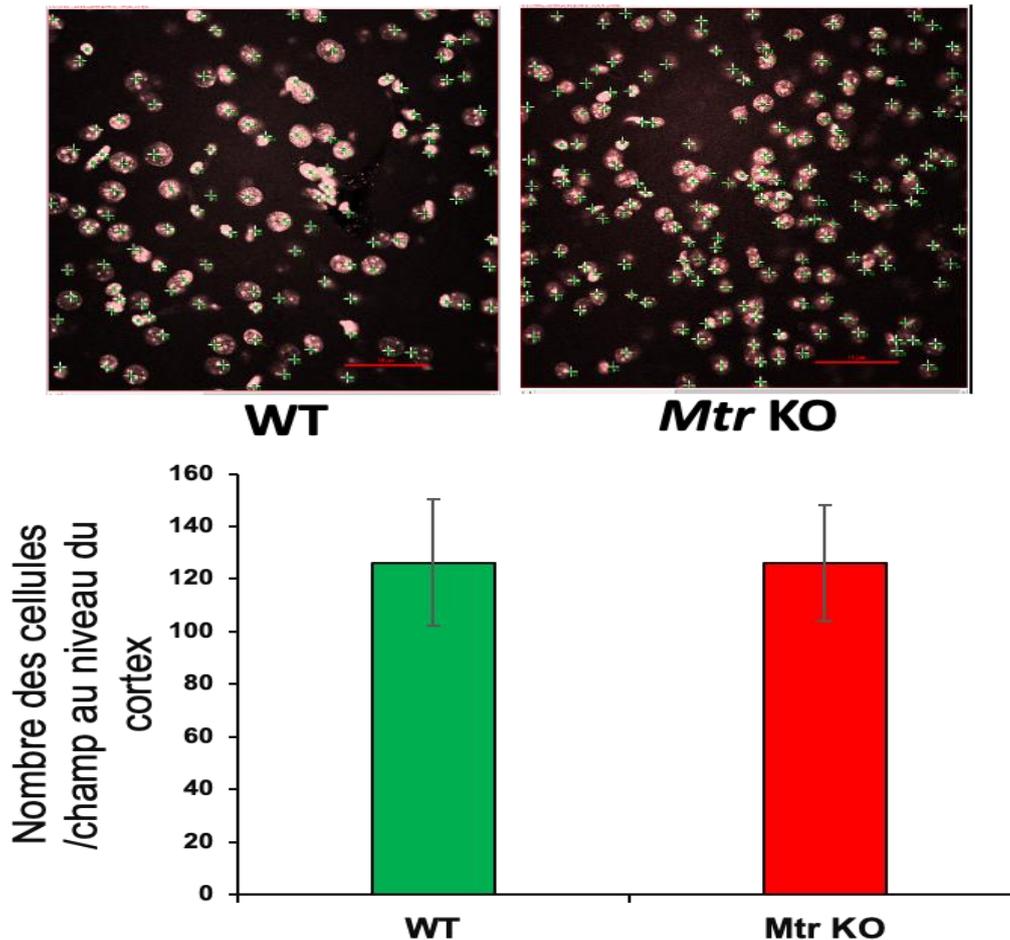


Figure 49: Quantification de nombre des noyaux au niveau du cortex.

Quantification fait sur Image J. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm Ecart-type ; $n = 4$ à 5 par groupe.

2. Etude du stress oxydatif et de SIRT1 chez les souris sur des extraits d'hippocampe.

La présence de stress oxydatif a été vérifiée par la mesure de l'expression de la superoxyde dismutase 2 (SOD2), une enzyme dont l'expression peut être induite par une augmentation du stress oxydatif. L'expression de SOD2 et de SIRT1 a été quantifiée par la technique de WES Protein Simple. Les résultats montrent une augmentation de l'expression de SOD2 au niveau de l'hippocampe chez les souris *Mtr* KO par rapport aux contrôles (Figure 51), ainsi qu'une diminution de l'expression de SIRT1 dans l'hippocampe des souris *Mtr* KO par rapport aux contrôles (Figure 50).

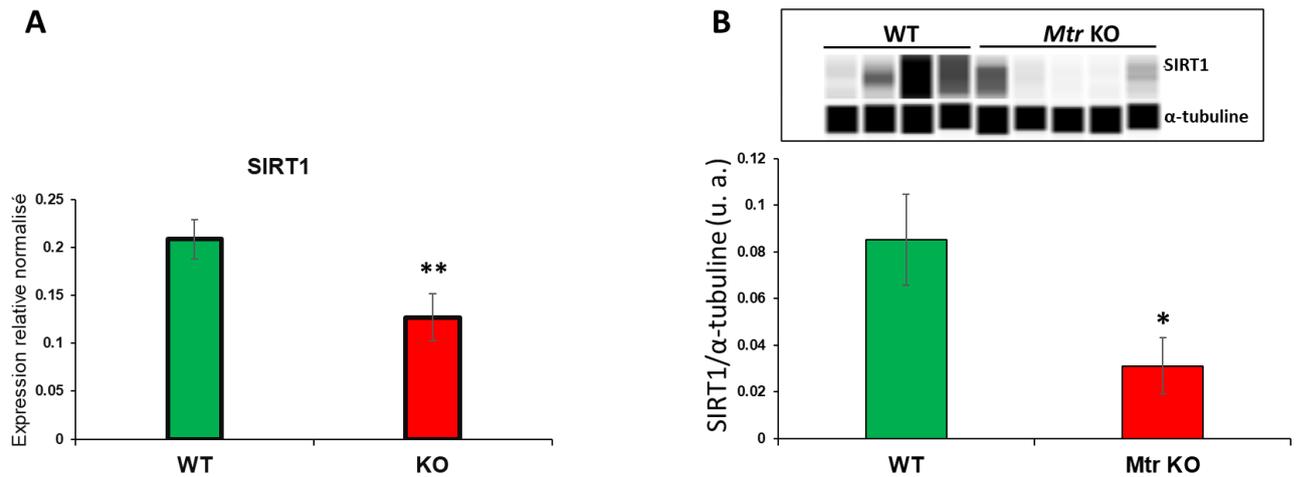


Figure 50 : Expression de SIRT1 dans l'hippocampe des souris.

A. Expression génétique en RTqPCR. **B.** Expression protéique du SIRT1, la protéine alpha-tubuline est mesuré comme protéine de référence. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm Ecart-type; Anova test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. $n = 4$ à 5 par groupe.

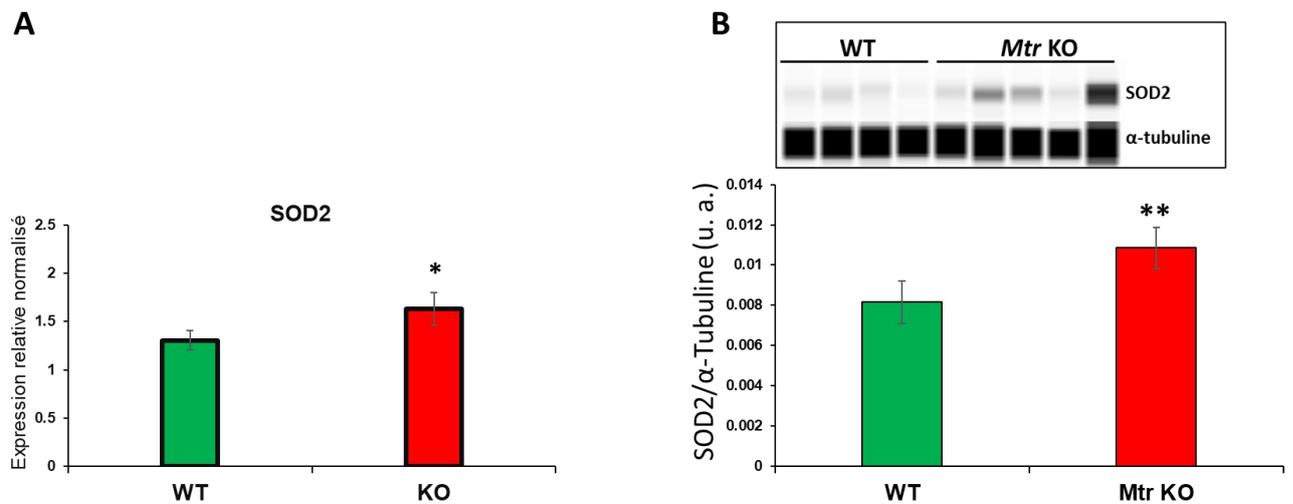
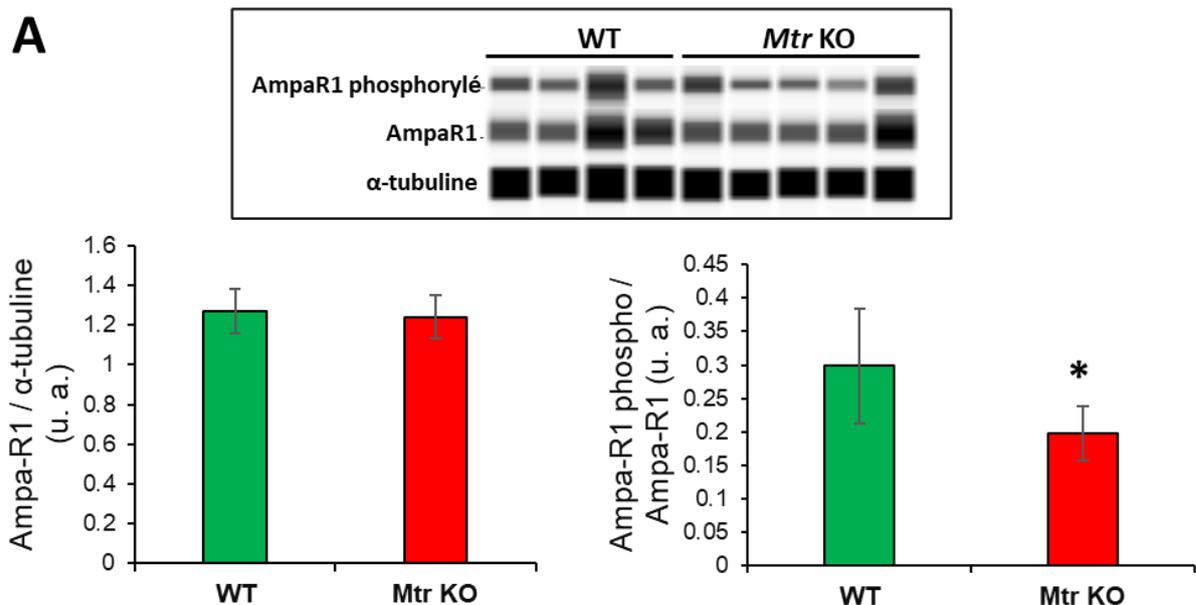


Figure 51: Expression de SOD2 dans l'hippocampe des souris.

A. Expression génétique en RTqPCR. **B.** Expression protéique du SOD2, la protéine alpha-tubuline est mesuré comme protéine de référence. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm Ecart-type ; Anova test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. $n = 4$ à 5 par groupe.

3. Etude de la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe chez les souris *Mtr* KO

Les acteurs principaux de la plasticité synaptique hippocampique, intervenant dans les processus de mémorisation à court et long terme, sont les récepteurs au glutamate (NMDAR, AMPAR, KainateR) et au gaba (GABAaR) (Carta et al., 2014). Afin d'étudier l'effet de l'inactivation de *Mtr* dans les neurones sur la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe, nous avons étudié l'expression protéique des récepteurs glutamatergiques Ampa-R 1 et 2 dans leur forme totale et active par phosphorylation. Les résultats du Wes ne montrent aucun changement au niveau de l'expression des récepteurs Ampa-R1 et Ampa-R2 en leur forme totale (Figure 52.A et B) contrairement à une diminution de l'expression de la forme active, phosphorylée de ces deux récepteurs Ampa chez le groupe *Mtr* KO par rapport au contrôle.



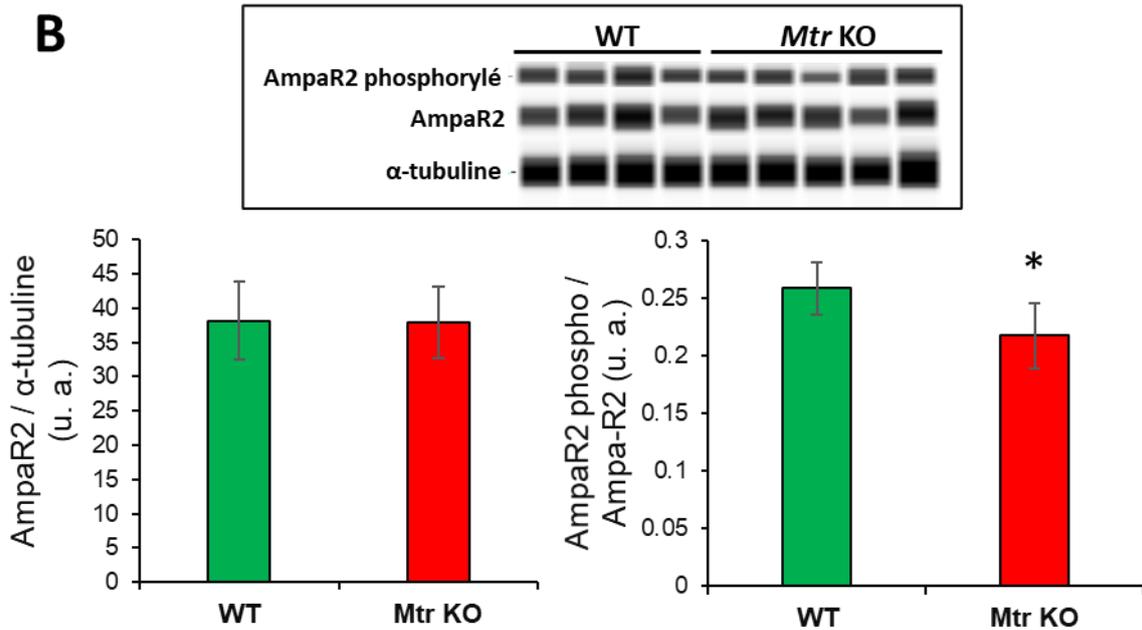


Figure 52 : Expression de Ampa-R1 et Ampa-R2 en forme totale et phosphorylée dans l'hippocampe des souris.

A. Expression protéique du Ampa-R1 et Ampa-R1 phosphorylé. **B.** Expression protéique du Ampa-R2 et Ampa-R2 phosphorylé. La protéine alpha-tubuline est mesurée comme protéine de référence. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm Ecart-type ; Anova test. * $p < 0.05$. $n = 4$ à 5 par groupe effectifs à noter dans chaque légende.

IV. Approche comportementale après traitement

Afin d'étudier l'effet du traitement avec l'antioxydant NAC et l'activateur de SIRT1, SRT2104, sur la capacité d'apprentissage et de mémorisation des souris *Mtr KO*, nous avons réalisé le test de labyrinthe aquatique à nouveau dans les mêmes conditions méthodologiques que précédemment, mais après traitement des souris avec NAC et SRT2104. Les résultats présentés ici ne différencient pas les sexes de souris. Pour une question d'effectif global, nous ne pouvons pour le moment tester l'éventualité d'un "effet sexe". Cependant, la variabilité des résultats obtenus est relativement faible, ce qui indique que les résultats des mâles et des femelles sont du même niveau à ce stade de notre étude.

Les résultats, exprimés en latence de sortie du labyrinthe, montrent que les souris témoins WT présentent des performances d'apprentissage visuo-spatial qui

s'améliorent de session en session quelque que soit le traitement (véhicule, SRT2104 seul ou SRT+NAC ; Figure 53 B). Au sein de ces groupes de souris témoins, une seule différence significative apparaît lors de la session 2 où les souris WT véhicule présentent une latence supérieure aux autres groupes (ANOVA, $p < 0.005$). En revanche, pour les souris *Mtr* KO, les traitements montrent des effets significatifs sur les performances d'apprentissage. En effet, à partir de la session 3, les souris KO des deux groupes traités SRT seul et SRT+NAC présentent une latence de sortie inférieure aux souris *Mtr* KO non-traités, avec des significativités aux deux dernières sessions (ANOVA, $p < 0.04$ (S4) et $p < 0.03$ (S5) ; Figure 53 C). Il est à noter que le niveau de performance à la session 5 des souris *Mtr* KO traités SRT ou SRT+NAC atteint celui des souris WT, avec des latences de sorties de l'ordre de 20 à 30 secondes, alors que les souris *Mtr* KO non-traitées s'établissent à cette même session 5 d'apprentissage, à près de 80 secondes.

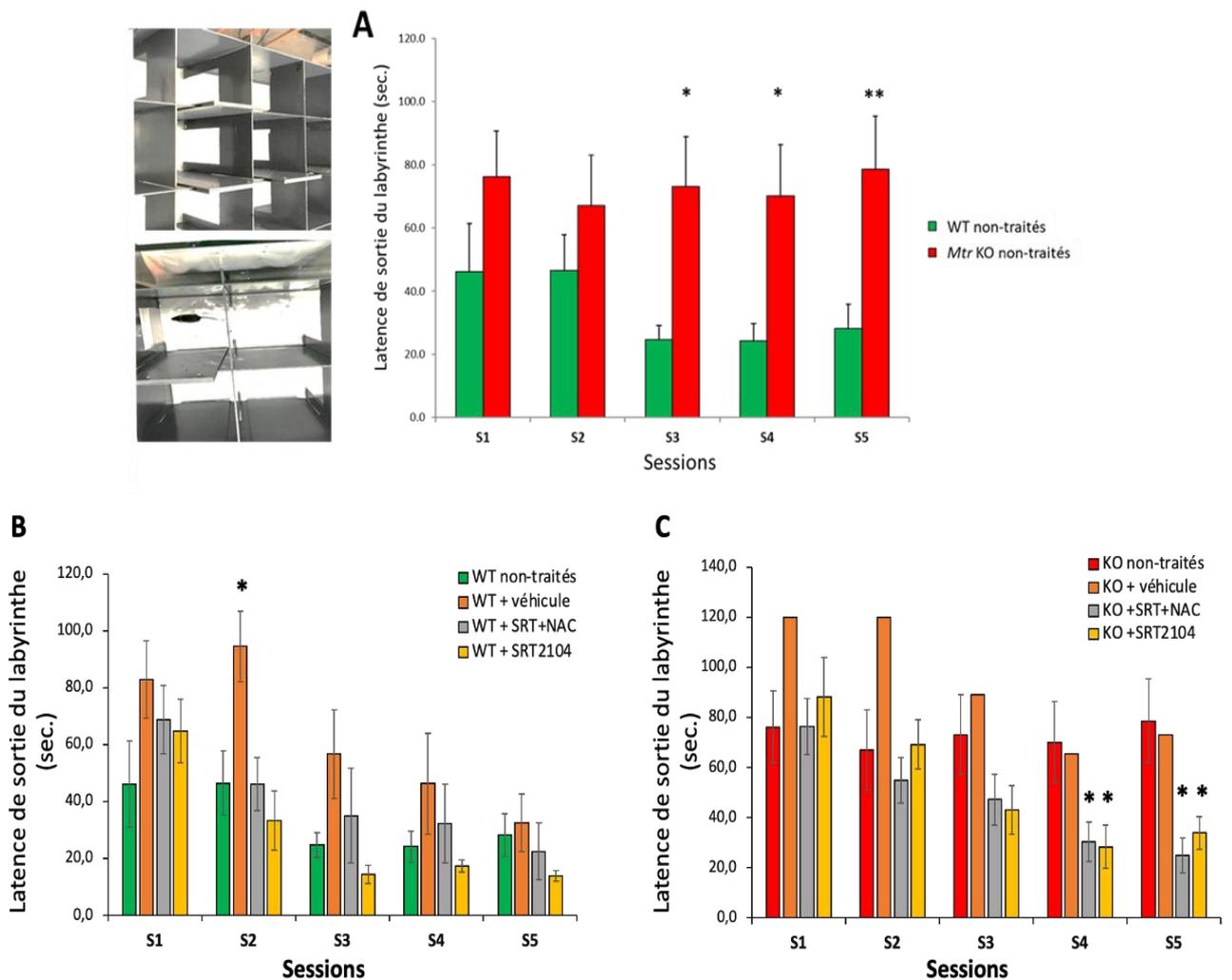


Figure 53: Résultat du test de labyrinthe aquatique chez les souris contrôles (WT) et *Mtr* KO et effet du traitement SRT2104 seul ou avec NAC.

Les histogrammes représentent le temps nécessaire à la souris pour sortir du labyrinthe aquatique. WT : souris de type sauvage ; Mtr KO : KO cérébral Mtr souris ; SRT2104, NAC : souris traitées par SRT2104 et par NAC. **A.** Rappel du résultat obtenu avec les souris WT et Mtr KO sans traitement. **B.** Effet du traitement sur la latence de sortie du labyrinthe chez les souris WT. **C.** Effet du traitement sur la latence de sortie du labyrinthe chez les souris Mtr KO. Chaque groupe est composé de 5 à 9 souris (sauf le groupe KO véhicule pour lequel nous n'avons qu'une souris au moment du dépôt du manuscrit). Moyennes \pm S.E.M. ; ANOVA, * $P < 0,05$.

Discussion II

La validation du knock-out du gène *Mtr* et l'étude de l'expression protéique de l'enzyme méthionine synthase ont montré que l'invalidation du gène par le système cre-lox était très efficace, vu que la majorité des souris *Mtr* KO ont une expression de la MS proche de zéro en analyse protéique Wes et au moins 50 fois plus faible que chez les individus contrôles au niveau de l'hippocampe. Cette quantification protéique nécessaire à l'inclusion des individus dans les groupes expérimentaux a été réalisée en parallèle de la mesure de l'expression de Cre en PCR pour chaque individu afin de valider les deux expressions à chaque fois.

Alors que la plupart des modèles de rat ou de souris de déplétion du cycle des monocarbones sont des modèles nutritionnels et/ou gestationnels, nous proposons un modèle génétique qui correspond plus précisément aux problématiques des erreurs congénitales du métabolisme de la vitamine B12. Cependant, les modèles plus classiques non-génétiques attestent d'effets significatifs sur le développement périnatal (Blaise et al., 2007). Nous avons donc, à titre de comparaison, suivi les éventuels effets de cette délétion de *Mtr* sur le développement que ce soit du corps en entier ou bien du cerveau des individus KO. Pour cela, nous avons suivi le développement post-natal de jeunes souriceaux KO et WT en mesurant le poids corporel de l'âge D8 jusqu'au D37 (jour de dissection). Aucune différence significative n'a été mesurée suite à cette comparaison, ce qui était attendu car la mutation n'est présente que dans les neurones et n'est pas systématique, donc elle n'a pas affecté le développement corporel. La comparaison phénotypique visuelle ne montre aucune anomalie de mise en place des organes ou de développement chez le groupe *Mtr* KO. De plus, la comparaison des poids des cerveaux entre les deux groupes WT et KO, le jour de dissection n'a pas montré de différence significative, ce qui nous a laissé penser que cette invalidation du gène *Mtr* uniquement dans le tissu nerveux, n'a pas d'effet sur le développement et la mise en place des différentes zones cérébrales mais plutôt, selon notre hypothèse initiale, sur le fonctionnement des circuits neuronaux et la mise en place des réseaux (Greene et Copp, 2014).

A ce titre, nous avons évalué des items comportementaux assez classiques pour attester de la mise en place des fonctions cérébrales pendant le post-développement (après la naissance, pendant l'allaitement et après le sevrage). Cette batterie de tests successifs est paramétrée pour correspondre aux fenêtres post-développementales des souriceaux, ce qui permet une approche structure-fonction prédictive (Blaise et al., 2007 ; Pourié et al., 2015). Les tests les plus précoces à D5 (RR et NG tests) mettent

en jeu la fonction motrice ainsi que la coordination des mouvements entre les 4 membres des individus. Les résultats de ces deux tests psychomoteurs basés sur le malaise de position des individus, montrent une mauvaise acquisition temporelle du reflex de retournement à D7 suggérant un retard d'acquisition - et non une absence totale - des fonctions motrices et de coordination au moment du test chez les KO. En effet, les KO comme les WT finissent par réussir le test.

En complément de ces premiers tests dits de "psychodéveloppement", la capacité musculaire maximale des souris a été évaluée par le test de suspension réalisé à un âge plus avancé D16. Les circuits principaux mis alors en jeu sont les circuits nerveux des zones motrices primaires, du striatum et du cervelet. Là encore, les résultats de ce test semblent montrer soit un retard de maturation des circuits nerveux impliqués soit un retard d'acquisition sensori-motrice.

La délétion de la méthionine synthase, n'engendre donc pas d'effets délétères irréversibles à ce point, mais plutôt des modulations qui impactent la mise en place des fonctions neuro-comportementales végétatives et motrices aux jeunes âges pendant l'allaitement.

Dans un deuxième temps, l'étude des paramètres d'apprentissage et de mémorisation, dans le cadre de fonctions plus cognitives a été réalisé. Ces fonctions correspondant à la physiopathologie des patients souffrants de défauts génétiques du métabolisme de la vitamine B12 (notamment CblC et CblG). Elles représentaient notre hypothèse majeure dans le cadre de mutations de *MTR* (Huemer et al., 2014).

Un test Homing permet de vérifier la mémoire associative des souriceaux en croissance et avant le sevrage. Ce test met en jeu la première fonction cognitive évaluable chez les jeunes en jouant sur le mémoire olfactivo-hippocampo-dépendante. L'amélioration des performances entre D11 et D19 chez les souris KO suggère un fort retard dans l'acquisition cognitive que l'on peut rapprocher d'un retard mental chez l'Homme.

Afin de vérifier si la locomotion globale des souris influençait nos autres résultats comportementaux, l'activité générale exploratoire ainsi que l'état émotionnel ont été testé par l'Open field. Aucune différence majeure n'a été mesurée, mis à part une diminution significative de la distance parcourue et du temps de visite exprimés par les souris KO dans la zone non protégée de l'open-field (au milieu du dispositif). Nous avons pu conclure que la locomotion ou l'exploration ne pouvaient expliquer les différences mnésiques issues du test "Open field", mais auraient pu refléter un signe

d'anxiété plus élevée. Les résultats non significatifs du test EPM (évaluant typiquement l'anxiété) ont éliminé cette hypothèse, ce qui oriente plutôt vers un léger retard de maturation et le besoin de la protection de la mère même après le sevrage.

Le point majeur apporté par l'indice de déficit mnésique chez les jeunes KO avant le sevrage, et qui correspondrait aux marqueurs fonctionnels des patients, a dû être confirmé par le test du labyrinthe aquatique après le sevrage. Ce test met en jeu principalement l'hippocampe et la fonction d'apprentissage visuo-spatiale, pour voir si après la phase d'habituation et plusieurs sessions répétitives du test, les souris sont capables d'apprendre et de mémoriser le chemin pour s'échapper du labyrinthe et atteindre la plateforme sèche.

Si on compare les performances entre les deux groupes de souris, il apparaît que les souris KO ne progressent pas au cours des sessions d'apprentissage successives, alors que les souris WT s'échappent de plus en plus rapidement. Les performances mnésiques des souris KO sont donc nettement plus faibles, car elles présentent des latences d'échappement relativement constantes quelles que soient les sessions.

Ce résultat obtenu chez des souris âgées de 36 jours confirme les mauvais résultats pour le génotype KO obtenus avec le test Homing à D11 / D19 avant le sevrage. Ces résultats confirment donc la persistance du phénotype de déficit d'apprentissage déjà enregistré avant le sevrage.

Ces résultats d'altération des capacités d'apprentissage et de mémorisation à l'âge jeune chez les souris KO valide le choix de notre modèle animal puisqu'il mime les patients CblG ayant des mutations de ce gène et qui présentent des symptômes neurologiques comparables comme les troubles de mémoires qui commencent à s'exprimer à un âge très précoce (3 mois) et persistent au cours du développement (Huemer et al., 2014).

L'interprétation globale de tous ces résultats comportementaux montre que l'invalidation du gène *Mtr* dans les neurones n'a aucun effet sur le poids corporel, ni le poids du cerveau, et qu'elle n'affecte pas l'activité générale locomotrice ni le niveau d'anxiété basale des animaux. Cependant, nous avons montré un retard développemental d'acquisition de fonctions de coordination motrice chez les souris KO, avec des effets transitoires sur les réflexes psychomoteurs et la puissance musculaire. La fonction nerveuse majoritairement affectée de façon non-transitoire et

irréversible est une fonction cognitive, l'apprentissage visuo-spatial hippocampo-dépendant.

L'ensemble de ces résultats confirme notre hypothèse initiale qui proposait que les déficits comportementaux seraient relatifs à des défauts de temps de maturation et de plasticité synaptique des réseaux nerveux, plutôt qu'à des défauts développementaux de structure. Même si notre hypothèse initiale ne plaide pas en faveur d'un effet sur le développement (croissance corporelle et poids des cerveaux), une telle vérification nous apparaissait essentielle. Afin d'argumenter dans ce sens, des études histologiques ont été réalisées au niveau du cortex, de l'hippocampe, du striatum et du cervelet. Aucune différence n'a été détectée entre les deux groupes WT et KO concernant la densité cellulaire au niveau du cortex, ainsi qu'au niveau de l'épaisseur de la couche cellulaire du striatum et du cervelet (résultats non représentés). La seule différence significative concerne l'épaisseur de la couche cellulaire de la zone CA1 hippocampique. Cette zone est impliquée dans la sortie des messages nerveux de l'hippocampe afin de terminer la boucle cognitive, notamment vers le cortex créant ainsi la mémoire et les souvenirs. CA1 appartient au système limbique et joue un rôle central dans la mémorisation et la navigation spatiale (Jeong et al., 2018). Nous concluons à un effet sur la plasticité fonctionnelle plutôt que sur un effet développemental de type "programmation fœtale", car seul la couche CA1 semble touchée structurellement. Une diminution de la plasticité fonctionnelle de l'hippocampe pourrait conduire à une perte soit de certains neurones, soit de connexions synaptiques selon le "postulat de Hebb" connu depuis les années 1960 (Turrigiano & Nelson, 2000).

Nous avons focalisé nos travaux sur l'hippocampe en raison des résultats d'apprentissage obtenus précédemment, dont le déficit semble majeur et persistant chez les *Mtr* KO, alors que seuls des effets transitoires ont été obtenus dans les tests non-cognitifs plus précoces chez les jeunes individus.

Il a été montré dans la littérature (Ghemrawi et al., 2019) ainsi que dans nos résultats de la première partie du projet la présence d'un stress oxydant élevé dans les fibroblastes des patients ayant des anomalies du métabolisme de la cobalamine comme les patients *cblC* et *cblG*. Ce stress est accompagné par une diminution de l'expression de SIRT1. Cette modification d'expression a été validée au niveau de

l'hippocampe de notre modèle animal, ainsi que très certainement une élévation du stress oxydant à laquelle le tissu nerveux répondrait par la sur-expression de l'enzyme anti-oxydante SOD2 (Richard et al.,2007). Ces résultats valident une fois de plus la fiabilité de notre modèle animal par rapport aux données des fibroblastes de patients. De plus, le stress cellulaire pourrait représenter un facteur affectant les performances mnésiques des souris KO, via la plasticité fonctionnelle.

Afin de valider cette dernière hypothèse mécanistique et pour étudier la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe, de nombreux marqueurs peuvent être investigués à partir des données transcriptomiques obtenues précédemment dans nos modèles de cellules et notre modèle animal. Dans ce cadre, les neurones glutamatergiques représentent des acteurs clés via leurs récepteurs NMDA, AMPA, Kaïnate et mGluR (Alkadhi, 2019). L'un des mécanismes primaires conduisant à la plasticité synaptique est le contrôle de la force synaptique, via les récepteurs de type AMPA (AMPA ; Huganir et Nicoll, 2013). L'altération de cette plasticité dans notre modèle serait confirmée par la diminution de l'expression de forme phosphorylé active des récepteurs glutamatergiques Ampa-R1 et Ampa-R2 qui jouent un rôle crucial au niveau des synapses dans le mécanisme de mémorisation. Au cours de la LTP hippocampique (Synapsis longterm potentiation), la protéine kinase C (PKC) est activée pour augmenter la phosphorylation de récepteurs Ampa (Diering et Huganir, 2018). Il a été montré ainsi que cette augmentation est nécessaire pour maintenir la LTP (Lin et al., 2009). D'autres marqueurs de plasticité devaient être étudiés comme les autres récepteurs glutamatergiques et certains facteurs trophiques comme le BDNF ou NT-3, mais nous n'avons pas encore pu présenter ces résultats suite à la mise au point non satisfaisante de ces anticorps en Wes, à l'indisponibilité des anticorps pour ces protéines compatibles avec cette technique et d'autre part l'impossibilité de pouvoir tester nos échantillons en western blot classique vu la très faible quantité des protéines par hippocampe. Par contre, ces investigations devront être réalisées prochainement.

Afin de nous orienter vers une approche thérapeutique innovante qui faisait partie intégrante de ce projet, nous avons voulu utiliser des activateurs de SIRT1 chez nos souris. L'activation pharmacologique de SIRT1 par des STACs a constitué des approches thérapeutiques importantes pour plusieurs maladies. Par exemple, chez les

souris obèses induites par le régime (DIO : diet induced obesity), le traitement par SRT2104 montre une amélioration de l'homéostasie du glucose, augmente la sensibilité à l'insuline et réduit les triglycérides plasmatiques et la stéatose hépatique. De plus, chez ces souris obèses, le SRT2104 augmente la dépense énergétique en améliorant l'oxydation des glucides et des acides gras (Qi et al., 2011).

Dans un modèle de rats diabétiques de type II, le traitement avec SRT1720 a pu réduire significativement le déclin cognitif chez les rats T2DM grâce à une action antioxydante et anti-inflammatoire via des mécanismes dépendants de NFκB et AMPK (Wang et al., 2019).

En se basant sur ces données bibliographiques et après la sélection de *SRT2104 in vitro* sur notre modèle de fibroblastes de patients, nous avons appliqué ce traitement à notre modèle murin afin d'étudier son effet sur la fonction cognitive altérée chez les souris KO. Alors que les quelques données bibliographiques relatives aux molécules SRT indiquaient des doses de traitement aiguës à sub-chroniques de l'ordre de 10 à 80 mg/kg chez les rongeurs, nous avons choisi une administration chronique médiane de 50 mg/kg/48h, ce qui place notre approche dans des normes physiologiques acceptables.

Le choix de la NAC a été discuté dans la partie *in vitro*, en se basant sur les données bibliographiques mais aussi sur nos résultats montrant des effets bénéfiques de la NAC sur le stress endogène et la physiologie mitochondriale dans les fibroblastes de patients cblC et cblG.

D'autre part, plusieurs améliorations ont été signalées pour l'administration systémique de NAC dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson, telles que l'amélioration du niveau cérébral de glutathion, la réduction des marqueurs de dommages oxydatifs, l'amélioration des activités cérébrales synaptiques et non synaptiques du complexe mitochondrial cérébral I, et la protection contre la mort cellulaire induite par la dopamine (Martinez-Banclocha, 2012).

Nos résultats issus du test du labyrinthe aquatique montrent que le traitement des souris KO Mtr rétablit le niveau de performance d'apprentissage de ces souris traitées à celui exprimé par les souris contrôles. D'autre part, les souris contrôles ne semblent pas du tout perturbées dans cette fonction nerveuse avec le traitement, signe que celui-ci semble être bien toléré. A ce stade, nous ne pouvons différencier le traitement

avec l'activateur SRT2104 seul à celui de l'association entre le SRT2104 et la N-acétylcobalamine.

D'après nos résultats *in vitro*, il est probable que cette amélioration pourrait être due à la capacité de SRT2104 de diminuer les niveaux de stress cellulaire qui pourraient altérer le bon fonctionnement des neurones et de ce fait, le fonctionnement plastique de l'hippocampe à la base d'un apprentissage efficace.

Conclusion II

Le choix et l'utilisation d'un modèle apporte des éléments de réponses aux problématiques posées mais aussi des réserves et limites scientifiques. Le modèle *Mtr* KO dans les neurones, semble être un modèle transgénique bien adapté pour l'étude des symptômes neurologiques chez les patients ayant des erreurs congénitales du métabolisme de la vitamine B12.

D'un point de vue biochimique et moléculaire, la mise en évidence de la diminution d'expression de SIRT1 accompagnée des taux élevés du stress oxydant dans les cellules de patients et dans le cerveau du modèle murin nous ont conduit à tester l'hypothèse selon laquelle un antioxydant comme la NAC pourrait compléter l'effet potentiel de l'activateur de SIRT1 sur la diminution du stress cellulaire chez les souris *Mtr* KO et la correction des problèmes cognitifs précoces et persistants.

Les résultats de la partie *in vitro* montrent des effets bénéfiques importants sur la diminution des niveaux de stress endogènes ainsi que sur la correction des altérations de la physiologie mitochondriale dans les cellules des patients cblC et cblG. Ces résultats nous ont confirmé la pertinence de notre approche expérimentale visant à cibler SIRT1 et les ROS endogènes *in vivo*. L'étude de ce modèle animal de la maladie cblG indique que le développement post-natal et la croissance ne sont pas ou peu affectés par la délétion de *Mtr*. Ainsi, nos résultats montrent essentiellement des effets transitoires au niveau psychomoteur mais un retard majeur dans l'acquisition cognitive et des troubles de la mémoire. L'analyse histologique des coupes de cerveau suggère que ces déficits comportementaux ne seraient pas dus à des défauts de mise en place des structures cérébrales. Malgré tout, un marqueur anatomique a été retrouvé au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe. Cependant nous formulons l'hypothèse qu'étant le seul aspect tissulaire affecté chez les KO, ce moins bon état histologique de CA1 serait lié à un fonctionnement synaptique réduit selon le paradigme de plasticité de Hebb. D'ailleurs, nous avons pu obtenir des résultats en ce sens avec des défauts de fonctionnement ou de neuroplasticité synaptique illustrés par la diminution de l'activation des récepteurs glutaminergiques Ampa R1 et 2 au niveau de l'hippocampe.

Le traitement des souris avec NAC et SRT2104 a corrigé les problèmes cognitifs en améliorant les capacités d'apprentissage et de mémorisation qui ne peuvent pas être

corrigés par le traitement classique basé sur des suppléments en vitamine B12, d'après les résultats de ce traitement chez l'homme. Dans leur ensemble, ces résultats confirment la pertinence de notre modèle animal ainsi que l'efficacité de notre traitement pour constituer une approche thérapeutique innovante et prometteuse pour les patients atteints par des maladies rares du métabolisme de la vitamine B12.

Ainsi, mon travail de thèse, en caractérisant le modèle de souris transgénique Mtr cerveau et en approfondissant l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'activation de SIRT1 aura permis de contribuer au projet global de cette thématique visant à développer un traitement thérapeutique innovant pour les pathologies neurocognitives développées par les patients atteints par des maladies rares du métabolisme de la vitamine B12.

Perspectives

Dans leur ensemble, les résultats obtenus au cours de ma thèse ont contribué à la réalisation de ce projet mais ils pourraient également être complétés par l'étude de plusieurs aspects importants.

Ainsi, le modèle cellulaire pourrait être utilisé afin de tester l'effet du traitement combiné sur le développement du stress cellulaire et sur les paramètres de la respiration mitochondriale. Il serait également intéressant de tester les effets d'un antioxydant ciblant plus spécifiquement le stress oxydatif mitochondrial et son association avec le SRT2014. Des résultats préliminaires non présentés ici suggèrent également une altération de l'autophagique dans les fibroblastes de patients. L'implication de ce processus sur le stress du RE étant bien documentée, l'étude des effets de l'activation de SIRT1 sur l'autophagie pourrait être intéressante.

Des résultats antérieurs du laboratoire avaient permis de mettre au point une technique de transdifférenciation des fibroblastes en neurones. L'efficacité de cette technique avait été validée mais le rendement encore faible en cellules utilisables n'avait pas permis leur utilisation au cours de ma thèse. Ces neurones humains provenant des cellules de patients et portant donc les mêmes mutations pourrait être très utile dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués et constituerait un modèle cellulaire de choix pour faire le lien entre les dysfonctionnements cellulaires étudiés dans les fibroblastes et les résultats obtenus avec le modèle murin transgénique.

Une autre perspective prometteuse et actuellement en cours de développement au sein du laboratoire est le développement de cellules pluripotentes à partir des fibroblastes de patients permettant là aussi l'obtention de neurones humains.

L'étude du modèle murin transgénique pourrait aussi être complétée par une analyse plus détaillée de la plasticité synaptique. L'expression, la localisation et l'activation des acteurs de la plasticité synaptique tels que NMDA Rec, Ampa Rec, CREB et leurs formes phosphorylées pourrait apporter des résultats complémentaires. L'étude de ces mécanismes pourrait ensuite être étendue aux animaux traités par l'association vitamine B12, NAC et SRT2104.

L'étude *in vivo* de ce traitement pourrait également être complétée par l'utilisation d'un plus grand nombre de souris transgéniques, ce qui permettrait éventuellement d'évaluer un effet lié au sexe des animaux.

D'autre part, et concernant l'effet du traitement sur la physiologie mitochondriale, nous avons obtenu des résultats intéressants dans nos études *in vitro*. Nous avons prévu de poursuivre ces investigations et notamment les aspects liés à la respiration mitochondriale par oxygraphie sur les souris traitées au niveau de l'hippocampe, mais ces investigations n'ont pas pu être réalisées par manque de temps avant la soutenance. Cependant, ce travail devra être réalisé pour valider les corrélations entre modèles cellulaires et animaux.

Enfin, un suivi du SRT2104 pourrait être réalisée dans les souris traitées par une étude par LC-MS/MS. En effet, un suivi quantitatif des molécules du traitement au sein des tissus (plasma, cerveau) apporterait un argument solide pour valider ce type d'approche.

Dans l'ensemble, ces résultats ont contribué à projet de développement d'un traitement innovant dans le traitement des patients ayant un dysfonctionnement inné ou acquis du métabolisme de la vitamine B12. Dans ce contexte, ces travaux seront utiles à la mise en place d'une étude clinique.

Matériels et Méthodes

Fiche 1 : Mise culture des fibroblastes de patients cb1C et cb1G

Les fibroblastes de 3 patients cb1C, 2 cb1G et 2 lignées témoins ont été obtenus auprès du Centre de référence pour les maladies métaboliques héréditaires de l'Inter-région Grand Est, de l'Hôpital universitaire de Nancy, de l'Hôpital universitaire pour enfants de Zürich et de l'Université McGill. Les caractéristiques cliniques de chaque lignée cellulaire se trouvent dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Phénotypes des fibroblastes de patients cb1C et cb1G

Lignée cellulaire	Gène muté	ADNc muté	Effet prédit sur la protéine	Référence bibliographique
WT	-	-	-	Fofou-Caillierez et al 2013
cb1C1	<i>MMACHC</i>	c.271dupA	p.Arg91LysfsX14	Fofou-Caillierez et al 2013
		c.616C>T	p.Arg206Trp	
cb1C2	<i>MMACHC</i>	c.394C>T	p.Arg132*	MR Baumgartner (non publié)
		c.394C>T	p.Arg132*	
cb1C3	<i>MMACHC</i>	c.271dupA	p.Arg91LysfsX14	MR Baumgartner (non publié)
		c.271dupA	p.Arg91LysfsX14	
cb1G1	<i>MTR</i>	c.3518C>T	p.Pro1173Leu	Fofou-Caillierez et al 2013
		c.3518C>T	p.Pro1173Leu	
cb1G2	<i>MTR</i>	c.3008-4A>G	Splicing	JL Guéant (non publié)
		c.3518C>T	p.Pro1173Leu	

Les fibroblastes ont été cultivés dans du milieu de culture DMEM (D5796, Sigma Aldrich) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (F7524, Sigma Aldrich) inactivé par la chaleur à 56°C pendant 30 min, 1% de pyruvate de sodium à 100 nM (S8636, Sigma Aldrich), 1% de solution d'antibiotique à 10.000 unités de pénicilline et 10 mg/mL de streptomycine (P4333, Sigma Aldrich) (Tableau 18) puis incubés à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture a été changé tous les 4 jours et les cellules ont été récoltées à confluence pour des études ultérieures.

Tableau 2 : Composition du milieu utilisé pour l'entretien des fibroblastes des patients

Milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Glucose 4500mg/mL (Sigma Alrich, D5796)
10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté par la chaleur (Eurobio, CVFSVF0001)
1% pyruvate de sodium (Sigma Aldrich, S8636)
1% pénicilline-streptomycine (Sigma Aldrich, P4333)

Trypsination des fibroblastes de patients cblC et cblG

- Éliminer le milieu de culture
- Rincer le tapis cellulaire une fois avec du PBS 1X stérile
- Ajouter le volume adéquat de trypsine (cf tableau 2)
- Incuber à 37°C sous atmosphère humide et 5% CO₂ pendant 8 minutes
- Inhiber l'action de la trypsine en ajoutant du SVF (le SVF contient des inhibiteurs naturels de la trypsine (α 1-antitrypsine et α 2-macroglobuline))
- Ajouter 1 volume du SVF pour 1 volume de trypsine
- Réaliser une dizaine d'arcs de cercle avec la suspension cellulaire afin de décoller les dernières cellules du support
- Transférer la suspension cellulaire dans un tube Falcon adapté
- Centrifuger 5 minutes à 200g à température ambiante (T°amb)
- Éliminer le surnageant
- Resuspendre le culot cellulaire dans du milieu de culture complet (cf Tableau 2) pour le maintien des cellules à une dilution au 1/6 de la suspension cellulaire, ou pour les analyses cellulaires et immunofluorescence après comptage.
- Le nombre de cellules dans une suspension cellulaire est déterminé grâce à l'appareil Luna TM Automated cell en mélangeant 10 μ l de suspension cellulaire avec 10 μ l de Bleu de Trypan, ensuite 10 μ l du mélange précédent est placé dans une cellule de comptage pour être analysé.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents volumes de réactifs utilisés en fonction du support de culture cellulaire

Support de culture	Surface (cm ²)	Milieu de culture (mL)	Volume de PBS 1X stérile (mL)	Volume de trypsine (mL)	Volume milieu, inactivation trypsine (5X volume de trypsine) (mL)	Volume pur, inactivation trypsine (mL)	SVF
24 puits / 4 puits	1,9	1	0,5	0,5	2,5	0,2	
6 puits	9,6	3	1	0,5	2,5	0,2	
T25	25	5	2	1	5	0,5	
P100	57	10	3	2	10	1	
T75	75	15	5	3	15	1	

Traitement des cellules

Les cellules sont divisées en 4 groupes :

Groupe NT (non-traité) : un simple changement du milieu de culture est fait à chaque fois le traitement est lancé.

Groupe +B12 : traité avec 30 µM d'OHCB1 durant trois nuits, soit 72 heures

Groupe +SRT2104 : traité avec 1 µM de SRT2104 pendant 72 heures.

Groupe +3T (3 traitements) : traité avec 30 μM d'OHCbl, 30 μM NAC (N-acétylcystéine) et 1 μM SRT2104 pendant 72 heures.

A la fin du traitement, le milieu de culture est changé et les cellules sont utilisées pour les différentes expériences (extraction protéines, IF...).

Fiche 2 : Congélation et décongélation des cellules

1. Congélation :

- Après trypsination des cellules, reprendre le culot cellulaire dans 400 μL de milieu de culture
- Transférer les 400 μL dans un cryotube de 1 mL
- Ajouter goutte à goutte un mélange de 600 μL (500 μL SVF + 100 μL diméthylsulfoxyde (DMSO))
- Placer le cryotube dans une boîte de congélation à l'isopropanol
- Mettre la boîte de congélation à -80°C pendant 24h minimum
- Transférer le cryotube dans l'azote liquide (-196°C)

2. Décongélation :

- Remplir un tube Falcon de 15 mL avec 12 mL de milieu de culture
- Décongeler le cryotube rapidement par friction entre les mains jusqu'au dernier glaçon
- Décontaminer l'extérieur du cryotube à l'éthanol 70%
- Transférer le contenu du cryotube dans le falcon contenant les 12 mL de milieu de culture
- Agiter doucement
- Centrifuger 5 min à 200g à $T^{\circ}\text{amb}$
- Eliminer le surnageant
- Reprendre le culot dans le volume adéquat et placer la suspension cellulaire dans le support de culture adapté.

Fiche 3 : Extraction des ARNs totaux (NuceloSpin RNA plus kit)

Etape de lyse

Ajouter le tampon de lyse dans le tube contenant le culot et re-suspendre le culot.

Jeter la colonne et garder le liquide.

Mélanger avec reflux puis récupérer la totalité du liquide (350 µL liquide + 100 µL de solution de liaison **BS**). Faire des reflux jusqu'à ne plus observer de petites vagues et que tout soit homogène.

Prendre un nouveau tube 2 ml sans bouchon et mettre la colonne bleue dedans.

Verser le liquide sur la colonne bleue et centrifuger (11000 g pendant 30s).

Verser le liquide du tube dans la poubelle liquide et remettre la colonne dans un tube vide.

Etape de lavages

1^{er} lavage : 200 µL de tampon de lavage WB1 puis centrifuger (11000 g pendant 30s).

Après le 1^{er} lavage : prendre un nouveau tube de 2mL sans bouchon, mettre la colonne dedans et jeter le liquide et l'ancien tube.

2^{ème} lavage : 600 µL de tampon de lavage WB2 puis centrifuger (11000 g pendant 30s).

3^{ème} lavage : 250 µL de tampon de lavage WB2 puis centrifuger (11000 g pendant 2 min).

Etape d'élution

Remettre la colonne dans un nouveau tube annoté et élimination du liquide et de l'ancien tube.

Lors de l'élution avec l'eau RNase-free, bien déposer 30 µL directement sur le filtre sans le toucher afin de bien hydrater le filtre et la silice puis centrifuger (11000 g pendant 1 min).

Répéter l'étape précédente sans enlever l'élution.

Placer le tube dans la glace. Cette manipe doit se faire assez rapidement pour ne pas dégrader les ARN qui ne sont pas stables à T°C ambiante.

Fiche 4 : Retro-transcription de l'ARN et expression génique par PCR quantitative

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées en PCR quantitative pour les gènes d'intérêt et les gènes de références

Amorce	Orientation	Séquence	Longueur	Tm (°C)
Sirt1	Sens	CGGCTACCGAGGTCCATATAC	21	60
	Anti-sens	CAGCTCAGGTGGAGGAATTGT	21	60
Sod2	Sens	CAGACCTGCCTTACGACTATGG	22	60
	Anti-sens	CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT	21	60
RPS29	Sens	ATGGGTCACCAGCAGCTCTA	20	63
	Anti-sens	CATGTTTCAGCCCGTATTTGC	20	63

La première étape de rétrotranscription sur 500 ng d'ARN total est effectuée grâce au kit Prime Script RT Master Mix (TAKARA, Saint-Quentin-En-Yvelines, France) en suivant le protocole fournisseur afin de récupérer l'ADNc. Pour cela, dans chaque tube est déposé 8 µL d'échantillon d'ARN ainsi que 2 µL de Master Mix 5X.

Les tubes passent ensuite dans un thermocycler (Thermocycler C1000 Touch Dual 48/48, Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis) où ils sont incubés à 37°C durant 15 minutes, et pour finir l'enzyme subit ensuite une étape d'inactivation à 85°C durant 5 secondes.

L'étape de qPCR fut réalisée en utilisant le kit TB Green qPCR Premix Ex Taq (TAKARA, Saint-Quentin-En-Yvelines, France).

Les amorces (tableau 23) nécessaires pour la suite de la procédure ont été désigné via l'outil en ligne Primerblast, puis commandées chez le fournisseur Eurogentec (Liège, Belgique).

Pour vérifier l'efficacité des amorces utilisées pour chaque gène, des gammes de dilutions au 1/5eme avec 5 points de gammes furent préparées.

Les gammes de dilution à 5 points (1/5eme) sont déposées en triplicat afin d'évaluer la bonne efficacité des amorces (comprise entre en 90% et 100%). Pour cela 18 µL de mix sont préparés (10 µL de Premix SYBR, 0,4 µL/amorces (sens et antisens) /gènes

et 7,2 μL d'eau), et sont déposés dans chaque puits ainsi que 2 μL d'ADNc par échantillon, le tout en triplicat.

La plaque fut ensuite scellée par un film adhésif et centrifugée 10 secondes à 500 G dans une centrifugeuse à microplaque (BenchMark Scientifique, Sayreville, New Jersey, Etats-Unis). Elle fut ensuite chargée dans un thermocycler en temps réel (Thermocycler CFX Connect, Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis) où les échantillons ont subi une première étape de dénaturation initiale et d'activation de l'enzyme à 95°C durant 30 secondes. Ensuite 40 cycles de dénaturation (95°C durant 5 secondes) et d'hybridation/ élongation (60°C durant 30 secondes) sont effectués.

L'analyse des résultats est effectuée via le logiciel Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis).

Fiche 5 : Extraction des protéines par letampond'extraction RIPA (WB/Wes)

Les cellules ont été reprises avec 1 ml de tampon RIPA (Tableau 24) supplémenté avec 1% de PMSF, 1% de Na_3VO_4 et 1% de PIC. La suspension cellulaire a été homogénéisée par des mouvements d'allers retours avec la pipette pour les cellules et une seringue de 1 ml et une aiguille à 0.8 mm pour les tissus pour lyser les membranes cellulaires et libérer le contenu cellulaire. Ensuite, le lysat a été soumis à des ultrasonifications pendant 15 min puis à 2 cycles de congélation-décongélation avec de l'azote liquide et un bain marie à 37°C, puis centrifugé 30 min à 4°C/12000g et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube. Les concentrations en protéines ont été dosées par la méthode BCA assay (Thermo Fischer).

Tableau 5 : Composition du tampon RIPA

Produits	Fournisseur	Référence	Quantité	
NaCl	SigmaAldrich	S9888	8g/L	dans PBS 1X sans Ca, Mg
Na ₂ HPO ₄	SigmaAldrich	S0876	1,44g/L	
KH ₂ PO ₄	Merck	646A148973	0,24 g/L	
NP40	Euromedex	UN3500-A	1%	
DOC	SigmaAldrich	D6750	0,50%	
SDS	SigmaAldrich	L4509	0,10%	
PMSF (10 mg/mL d'éthanol)	SigmaAldrich	P7626	10 µL/mL de RIPA	
Na ₃ VO ₄ (18,39 mg/mL d'H ₂ O)	SigmaAldrich	S6508	10 µL/mL de RIPA	
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	SigmaAldrich	P8340	10 µL/mL de RIPA	

Fiche 6 : Dosage des protéines par la méthode « BCA Assay »

1. Préparer une gamme étalon en triple exemplaire :

Tableau 6 : Gamme de concentration BCA et préparation des échantillons

Cf (µg/mL)	VBSA µL	VH ₂ O (µL)	Vf (µL)	Ci BSA µg/mL
0	0	25	25	2000
96	1,20	23,8	25	2000
200	2,5	22,5	25	2000
400	5	20	25	2000
800	10	15	25	2000
1200	15	10	25	2000
1600	20	5	25	2000
2000	25	0	25	2000

2. Préparer le réactif de travail

- Mélanger 50 volumes du réactif A (BCA) avec 1 volume de solution B (CuSO₄)

$V_{\text{réactif de travail}} = (\text{nombre de tube de gamme} \times \text{nombre de réplicats}) + (\text{nombre d'échantillons} \times \text{nombre de réplicat}) \times V_{\text{mix BCA}}$

3. Distribuer 25 µL de chaque dilution de BSA ou d'échantillon à doser dans une plaque 96 puits

4. Ajouter 200 µL de réactif de travail dans chaque puit et agiter la plaque
5. Couvrir la plaque et laisser 30 min à 37°C
6. Laisser refroidir la plaque à température ambiante
7. Mesurer l'absorbance à 570 nm sur un spectrophotomètre Multiskan GO

Fiche 7 : Analyse des protéines par Western blot

ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN CONDITION DENATURANTE (SDS-PAGE) – WESTERN BLOTTING

Produits utilisés :

Trizma®Base (<i>Tris-Hcl</i>)	Sigma	ref : T-6066	FW=121,1
Lauryl sulfate (<i>SDS</i>)	Sigma	ref : L-4509	FW=288,4
Ammonium persulfate	Sigma	réf : A-3678	FW=228,2
Temed	Carlo Erba	réf : 600461	
2-mercaptoethanol	Merck	réf : 12006	FW=78,13
Bromophenol blue sodium salt	Sigma	réf : B-8026	FW=692
Glycine	Sigma	réf : G-7126	FW=75,07
Sample Buffer Laemmli x2	Sigma	réf : S-3401	
Methyl Alcohol	Carlo Erba	réf : 525101	
Sodium chloride (<i>NaCl</i>)	Sigma	réf : S-9888	FW=58,44
Tween 20	Sigma	réf : P-1379	
Isopropanol	Sigma	réf : I-9516	FW=60,10
Immobilon™-P (<i>PVDF</i>)	Millipore	réf : IPVH00010	
Mini Trans-Blot filter paper	Bio-Rad	réf : 1703932	
Ponceau S (<i>rouge Ponceau</i>)	Sigma	réf : P-3504	FW=760,6
Albumine Bovine, fractionV	Euromedex	réf : 04-100-810C	
Acide acétique 100%	Prolabo	réf : 20-104.323	
ECL™	Amersham Biosciences	réf: RPN2106	

Western Blotting Detection Reagents

Kodak LX24 (révélateur)	Merck Eurolab	réf : 5070933
Kodak AL4 (fixateur)	Merck Eurolab	réf : 5071071

Préparation des solutions :

Solutions pour la préparation des gels de concentration et de séparation

Tris-HCl 1,5M pH 8,8

18,165 g de Tris/100 ml H₂O MQ, ajuster à pH 8,8 avec HCl, filtrer sur 0,22 µm et conserver à 4°C

Tris-HCl 0,5M pH 6,8

6,055 g de Tris/100 ml H₂O MQ, ajuster à pH 6,8 avec HCl, filtrer sur 0,22 µm et conserver à 4°C

SDS 10%

10 g de SDS/100 ml H₂O MQ, sous agitation douce pour éviter que cela mousse, conserver à température ambiante

Persulfate d'ammonium 10%

1g/10 ml H₂O MQ, aliquoter par 400 µl, conserver à -20°C

Tampon de dépôt de Laemmli 2X

Tris à 125 mM (0,151g/10ml H₂O MQ) contenant :

SDS 4% (p/v)

2-mercaptoéthanol 10% (v/v)

Bleu de bromophénol 0,004% (p/v)

Ou Solution prête à l'emploi (Sample Buffer Laemmli X2)

Tampon de migration : pour 1 litre 10X concentré

Tris 250 mM 30g

Glycine 1,92 M 144g

SDS 1 % 10g

qsp H₂O MQ

A utiliser 1X concentré : diluer 100ml de la solution 10X et compléter à 1 litre.

pH \approx 8,3 - ne pas ajuster avec HCl

Conserver à 4°C

Utiliser à température ambiante

Tampon de transfert : pour 1 litre 10X concentré

Tris 480 mM 58,1g

Glycine 390 mM 29,3g

SDS 0,375 % (13 mM) 3,75g

qsp H₂O MQ

A utiliser 1X concentré : 100ml de la solution 10X + 200ml d'éthanol + qsp H₂O MQ

pH \approx 9,2 – ne pas ajuster avec HCl –

Conserver à 4°C

Utiliser froid

Tampon de lavage TBS: pour 1 litre 10X concentré

Tris 200 mM 24,2g

NaCl 1,5 M 87,5g

pH 7,4 à ajuster avec HCl

qsp H₂O MQ

Conserver à 4°C

A utiliser 1X concentré : **TBST** :100ml de la solution 10X + qsp H₂O MQ + 1ml de Tween 20 à 0,1%

Conserver à 4°C.

Electrophorèse :

Préparation des gels

Passer les plaques de verre à l'alcool

Monter l'appareil d'électrophorèse Mini-Protean III : plaques de verre et espaceurs (en général 1,5mm)

Préparer le gel de séparation -voir tableau- à la concentration souhaitée. Pour 2 gels prévoir 20 ml de solution
Couler les gels et s'arrêter au niveau bas du plastique vert en dessous de l'emplacement du peigne
Déposer un fin film (~ 500 µl) d'isopropanol (ou isobutanol)
Attendre la polymérisation à température ambiante (pour gel 12%, si t° ~ 20-22°C compter 20mn)
Rincer abondamment à l'eau distillée et éliminer toutes traces d'eau
Couler le gel de concentration à 5% -voir tableau- Pour 2 gels prévoir 8ml
Positionner le peigne en Téflon en évitant la formation de bulles : polymérisation
Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration
Monter l'appareil en assemblant les deux supports de gel sur le système central
Remplir le réservoir central (cathode) jusqu'en haut ainsi que la cuve (à moitié) avec le tampon de migration

Préparation des échantillons :

Les échantillons récupérés dans un tampon de lyse doivent être préalablement dosés.

Pour un premier essai, prévoir un dépôt de 20 à 30µg de protéines par puits.

Pour une plus belle migration, déposer à quantité et volume constants (pour une même quantité de protéines par échantillon, compléter avec le tampon de lyse ou de l'eau miliQ pour obtenir le même volume)

Dans des tubes Eppendorf, ajouter 1 volume de tampon Laemmli 2X à 1 volume d'échantillon

Chauffer 5 mn à 100°C les échantillons et les marqueurs de taille (si nécessaire)

Charger les puits avec les échantillons et les marqueurs

Migration :

Voltage constant

Gel de concentration : 80 V, environ 15 mn

Gel de séparation : 110 V, ~1 h30

Arrêter la migration quand le front de migration arrive en bas des plaques

Electro-transfert liquide :

Préparation de la membrane

Découper la membrane à la dimension du gel : 7x8,5 cm minimum (gants)

Mettre la membrane PVDF au moins 30 sec dans du méthanol

Equilibrer la membrane dans le tampon de transfert froid (5 mn max) ainsi que les éponges et les filtres

Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et équilibrer les gels dans le tampon de transfert froid (5 mn max)

(Permet de retirer le SDS contenu dans le gel et qui peut interférer dans la fixation des protéines à la membrane durant le transfert, il peut être nécessaire d'ajouter un peu de SDS au tampon de transfert si la protéine n'est que partiellement insoluble due à son poids moléculaire élevé ou si elle contient beaucoup d'acides aminés hydrophobes)

Transfert :

Préparation du sandwich : placer la face blanche en haut et noire en bas, superposer sur la face blanche dans l'ordre :

- Une éponge
- 2 papiers filtres
- La membrane
- Le gel (vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air sinon les expulser doucement au doigt)
- 2 papiers filtres : **expulser les bulles d'air à l'aide d'une pipette plastique**
- Une éponge

Fermer le sandwich

Placer les cassettes dans le module de transfert, face noire vers face noire

Mettre le glaçon

Remplir la cuve avec du tampon froid

Transfert à ampérage constant :

350 mA pendant 45 mn

Ou 90 mA toute une nuit

Vérification du transfert (en option)

Quand on sort les membranes de la cassette on observe des bandes sur la membrane si le transfert à fonctionné.

Ou

Coloration de la membrane avec une solution de Rouge Ponceau S (solution aqueuse de Rouge Ponceau S à 0.2% (p/v), acide acétique 0.1% (v /v), filtrée 0.2 µm, 4°C) pendant 5 mn puis décoloration à l'eau distillée.

A ce stade on peut laisser sécher la membrane et la conserver au frigo pour une révélation ultérieure.

Avant de réutiliser une membrane sèche, la repasser dans un bain de méthanol.

Blocage :

Repérer de quel côté sont les protéines

Mettre les membranes dans **25 mL** de solution de TBST/lait écrémé 5% (ou BSA) sous agitation pendant 1 heure à température ambiante

Nota : suivant les anticorps, la solution de blocage peut être faite soit avec de la BSA soit avec du lait écrémé (idem pour la dilution des anticorps)

1^{er} anticorps :

Préparer une pochette plastique légèrement supérieure à la surface de la membrane
Préparer la solution avec le premier anticorps dilué à la concentration souhaitée dans TBST/lait 5% (4 à 5 ml au total)

Placer la membrane dans la pochette plastique, mettre la solution d'anticorps, souder la pochette et incuber pendant 1 nuit à 4°C sous agitation lente

Lavage :

Sortir la membrane de sa pochette plastique et la mettre dans un petit bac
Faire 1 rinçage rapide avec du TBST, puis rincer avec du TBST 4X10 mn sous agitation rapide à température ambiante

2^{ème} anticorps :

Procéder de la même façon qu'avec le 1^{er} anticorps

Incuber 1 heure sous agitation lente à température ambiante

Lavage :

Idem lavage ci-dessus

Révélation ECL :

Sur un film Saran déposer 1 mL d'ECL/ membrane complète

Sortir la membrane du tampon de lavage, la secouer pour éliminer l'excès de tampon, la poser sur l'ECL, protéines vers le bas en évitant la formation de bulles

Incuber 2 à 5 min

Bien sécher la membrane entre deux papiers absorbants et la mettre dans une pochette plastique.

Déposer la membrane dans l'appareil de détection « fusion » et se référer aux instructions du fournisseur

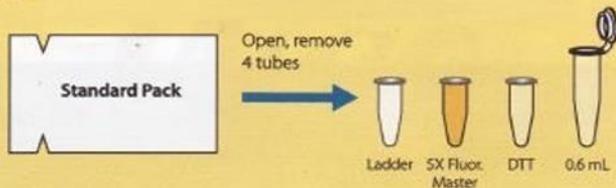
Les mesures de densitométrie en Western Blot ont été faites grâce au logiciel ImageJ en faisant le rapport de l'intensité de la bande (aire sous la courbe) de la protéine d'intérêt sur la bande d de la protéine de référence.

Tableau 7 : Références et conditions d'utilisation des anticorps en Western blot

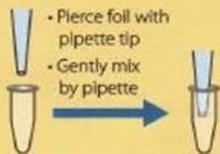
Anticorps	Fournisseur	Référence	Conditions d'utilisation de l'anticorps		Source
Bip	Cell Signaling Technology	C50B12	1/600	BSA	Rabbit
GAPDH	Abcam	ab49483	1/1000	BSA	Mouse

Fiche 8 : Analyse des protéines par Wes

A Préparer les réactifs du sachet

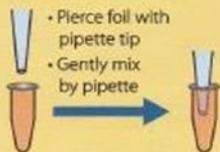


DTT (tube incolore)



- Ajouter 40 μ l d'eau déminéralisée pour obtenir une solution de 400 mM

Master Mix 5x fluorescent (tube rose)

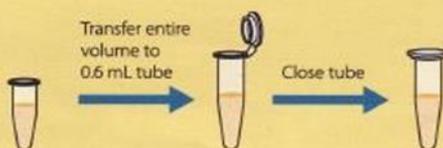


- Ajouter 20 μ l de Sample buffer 10X
- Ajouter 20 μ l de la solution DTT 400 mM préparée

Biotinylated Ladder (tube vert, culot rose)



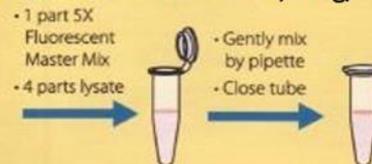
- Ajouter 20 μ l d'eau déminéralisée



B Préparer vos échantillons (protéines)

La concentration finale recommandée des protéines est de 0,2 mg/ml. la concentration optimale dépend du niveau d'expression de votre protéine. si nécessaire, diluer vos échantillons avec Sample Buffer 1X (diluer le Sample Buffer 10X 1:10 avec de l'eau)

Mélanger une unité (ex. 1 μ l) du Master Mix avec 4 unités (ex. 4 μ l) de protéines dans un microtube (concentration finale = 0,2 mg/ml)



C Dénaturer vos protéines



D Préparer vos anticorps

Anticorps primaire : commencer par une dilution de 1:50 dans le diluant d'anticorps II. la concentration optimale d'anticorps peut être réglée ultérieurement, si nécessaire.

Anticorps secondaire : l'anticorps fourni est prêt à l'utilisation sans dilution.

E Mélanger Luminol-S avec le peroxyde

Ajouter 200 μ l Luminole-S avec 200 μ l Peroxyde dans un microtube et vortexer bien



- Après la préparation des réactifs et des échantillons (manip à 4°C), déposer dans la plaque du Wes le volume correspondant à chaque solution selon le code de couleur comme indiqué dans le guide ci-dessous.

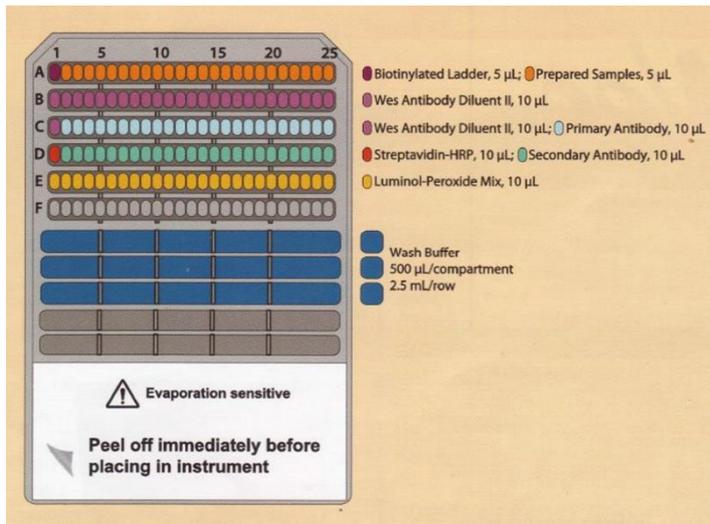
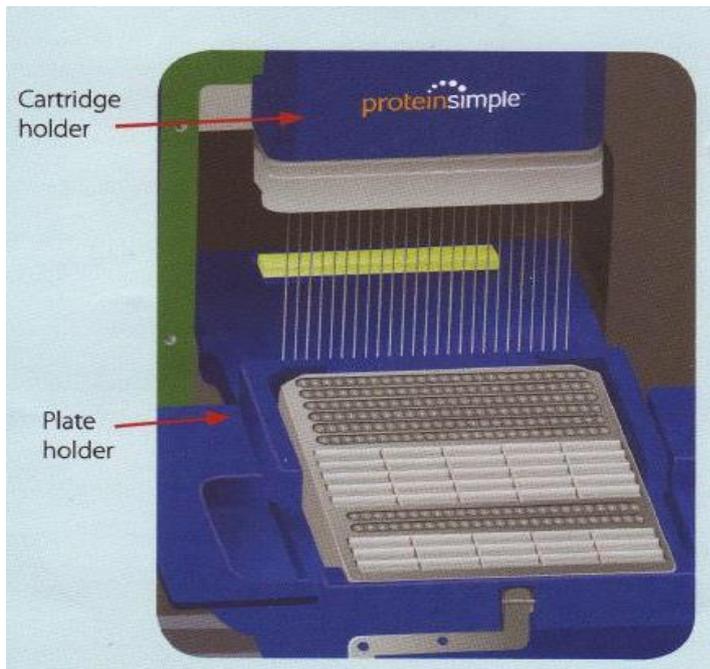


Figure 54: Plan de depot dans la plaque Wes

- Couvrir la plaque et la centrifuger pour 5 minutes à 2500 rpm (~1000 xg) à température ambiante.



1. Charger le plan de votre dosage souhaité dans le logiciel Compass.

2. Ouvrir la porte de la machine Wes

3. Retirer le couvercle de la plaque de dosage. Tenir la plaque par les bords et retirer soigneusement le film de protection. Faire éclater les bulles d'air observées dans les puits de la matrice de séparation avec une

pointe de pipette.

4. Placer la plaque de dosage sur le support de plaque.
5. Insérez une cartouche capillaire dans le porte-cartouche. la lumière intérieure passera de l'orange au bleu, pour confirmer la bonne positionnement.
6. Fermer la porte de la machine.

7. Connecter la machine avec le logiciel Compass et cliquer sur le bouton démarrer.

8. Une fois l'analyse est terminée, retirer la plaque et la cartouche et les jeter.

Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés en Wes

Anticorps	Fournisseur	Référence	Concentration utilisée	Source
Ampa R1	Abcam	ab31232	1/100	Rabbit
Ampa R1 phospho	PhosphoSolutions	P1160-845	1/100	Rabbit
Ampa R2	Abcam	ab133477	1/700	Rabbit
Ampa R2 phospho	ThermoFisher	Pa5-17096	1/10	Rabbit
Caspase 3	Santa Cruz	sc-56053	1/100	Mouse
Hsp 70	Enzo	N27F3-4	1/300	Mouse
Hsp 90	Cell Signaling	C45G5	1/100	Rabbit
MS	ThermoFisher	25896-1-AP	1/100	Rabbit
Sirt1	Cell Signaling	8469 S	1/100	Mouse
SOD2	Abcam	ab 13533	1/100	Rabbit
Alpha-tubuline	Cell Signaling	2144S	1/100	Rabbit

Fiche 9 : Marquage des protéines par immunofluorescence

Fixation

Cellules	Coupes paraffinées
10min PAF 4% (sous hotte) Lavage 3x 5 min PBS 1x	<u>Déparaffinage</u> Histo clear : 2x 3 min Ethanol 100% : 2x 3 min Ethanol 95% : 3 min Ethanol 70% : 3 min Ethanol 50% : 3 min H2O distillée : 5 min

	Démasquage des sites antigéniques 20 min tampon citrate 10 mM à 95°C (en bain marie) Lavages PBS 1X 3x5 min (solution à température ambiante pour éviter les chocs thermiques)
--	--

Perméabilisation des membranes

10 min triton 0.1% PBS 1x (0.01% pour des cellules)

Lavage PBS 3x5 min

Blocage

BSA 1% PBS 1X 1h à T° amb (peut arriver jusqu'à 5% pour des tissus, dépend de l'anticorps utilisé)

Anticorps Ir

Diluer les anticorps au 1/200 dans la BSA 1% PBS 1X

Incuber 1 nuit à 4°C en chambre humide sous agitation

Lavage PBS 3x5 min

Jour 2 : Anticorps IIr (manip sensible à la lumière)

Diluer l'anticorps IIr au 1/1000 dans la BSA 1% PBS 1X

Incuber 2 h à T° amb dans une chambre humide dans le noir

Lavages PBS 3x5 min

Pour le marquage de cytosquelette cellulaire (optionnel) : Diluer la phalloïdine au 1/1000 dans BSA 1% PBS 1X pendant 15 min

Lavages PBS 3x5min

Coloration des noyaux

Diluer la solution de DAPI au 1/3000 dans H₂O MQ et Incuber 5 min

Lavage PBS 3x5 min

Rincer à l'ED

Montage des lames

Conserver les lames à l'abri de la lumière

NB : PENSEZ AU TEMOINS NEGATIFS !!!

Témoins Ab Ilr seuls (remplacer l'Ab Ir par de la BSA)

Témoins Autofluo (si possible mais pas obligatoire) remplacer l'Ab Ir et Ilr par de la BSA

Tableau 9 : Listes des anticorps étudiés en immunofluorescence

Anticorps	Fournisseur	Référence	Conditions d'utilisation de l'anticorps		Source
ATF6	Abcam	ab203119	1/100	BSA	Rabbit
HuR	Merck Millipore	07-468	1/150	BSA	Rabbit
SIRT1	Cell Signaling	8469S	1/160	BSA	Mouse
Anti Rabbit AlexaFluor 594	Abcam	ab150076	1/1000	BSA	rabbit
Anti-Mouse 488	Jackson ImmunoResearch	715-545-151	1/1000	BSA	mouse

Des lysats de cellules ont été préparés en utilisant un tampon de lyse/lavage d'immunoprécipitation (IP) constitué de Tris 0,025 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,001 M, 1% de NP-40, glycérol à 5%, pH 7,4. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 12 000 tr / min pendant 10 min. Les extraits protéiques ont été dosés en utilisant le kit de dosage BCA Assay et 500 µg de protéine totale a été incubée avec 5 µg d'anticorps purifié mono-diméthyle arginine (ab412) et le volume a été complété à 500 µl avec du tampon

de lyse/lavage d'IP. Le mélange a été incubé à 4 ° C toute la nuit avec rotation pour former le complexe immun.

Ensuite, le mélange protéine/anticorps a été ajouté à 50 µl de billes d'agarose en résine préalablement rincées 2 fois avec du tampon de lyse/lavage IP et incubé 2 heures à température ambiante (T°Amb) sous agitation lente.

Le complexe étant à présent fixé sur les billes, nous avons lavé les billes de résine 4 fois avec 200 µl de tampon de lyse/lavage d'IP, puis avec 100 µl de solution saline (NaCl). Le complexe protéique a été décroché des billes par ajout d'un tampon d'éluion additionné avec 5 µl de bleu de charge 5X. Le mélange a été chauffé à 100 ° C pendant 5 min puis analysé par WB.

Les mesures de densitométrie en Western Blot ont été faites grâce au logiciel ImageJ en faisant le rapport de l'intensité de la bande (aire sous la courbe) de la protéine d'intérêt sur la bande de la protéine de référence.

[Fiche 10 : Mesure d'activité enzymatique de Sirt1 par Fluor de Lys-SIRT1 \(BML-AK555\)](#)

Principe : Le SIRT1 Fluorescent Activity Assay/Drug Discovery Kit est un système de dosage conçu pour mesurer l'activité Lysyl-désacétylase par SIRT1. La mesure de l'activité fluorescente de SIRT1 est basée sur la combinaison unique Substrat Fluor de Lys-SIRT1 / Développeur II. Le substrat Fluor de Lys-SIRT1 est un peptide comprenant les acides aminés 379-382 de la protéine p53 humaine (Arg-His-Lys-Lys (Ac)). Le signal fluorescent est généré en fonction de la quantité de désacétylation de la lysine correspondant à Lys-382, une cible connue en vivo de l'activité de SIRT1. Fluor de Lys-SIRT1 était le substrat désacétylé plus efficacement en SIRT1 parmi un panel de substrats issus du site d'actéylation de p53, de l'histone H3 et de l'histone H4.

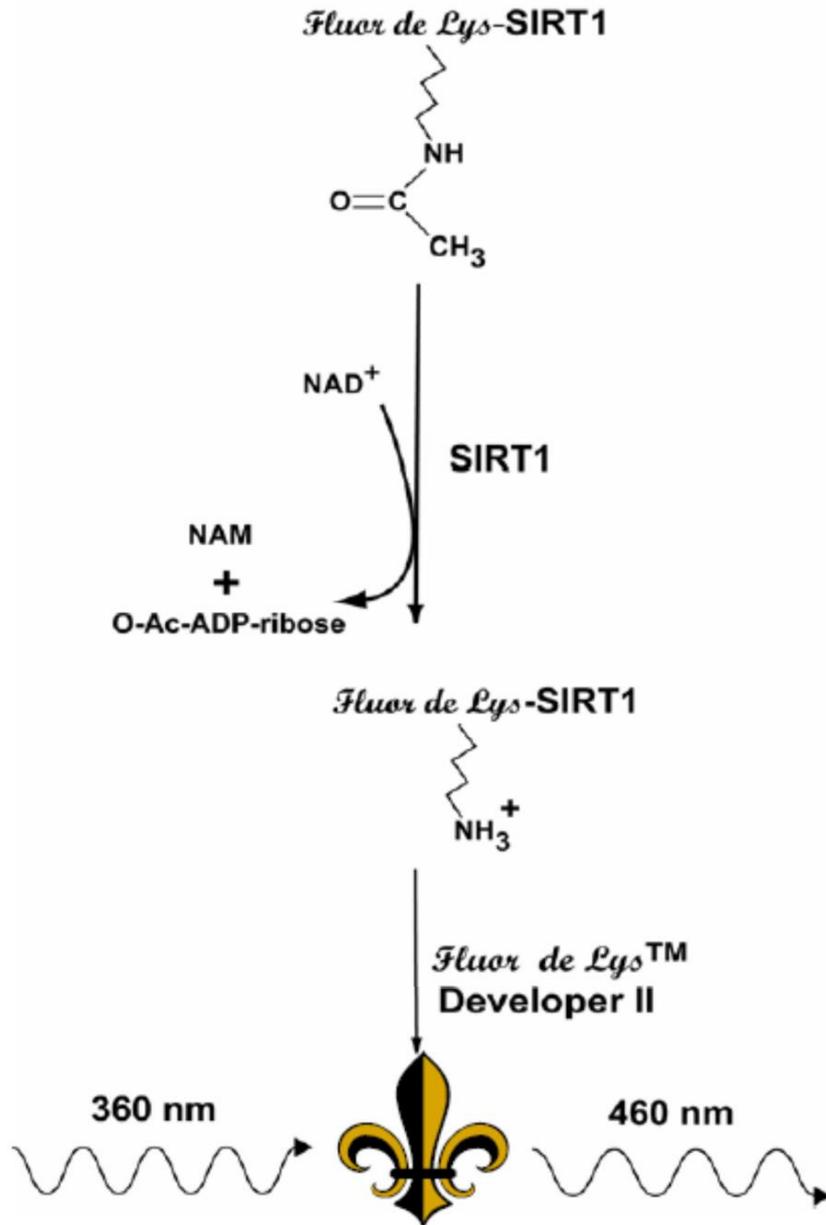


Figure 55: L'activité SIRT1 a été mesurée en utilisant un kit de dosage fluorométrique de SIRT1(1) comme décrit par le fabricant.

Préparation d'échantillon :

- Afin d'éliminer toute trace de milieu de culture, rincer avec du PBS 1x environ 25 mg de cellules et congelés à -80°C.
- Centrifuger à 600 g /5 min/4°C et éliminer le surnageant,
- Ajouter 500 µL de tampon C(2) (low salt) pour un 2ème rinçage suivi d'une centrifugation à 600 g /5 mn/4°C et éliminer le surnageant
- Homogénéiser les échantillons avec un tampon N (high salt) (3)
- Déposer les échantillons sur un lit de glace les transférer dans un broyeur de Dounce

- Broyer une quinzaine de fois avec piston A ou Loose
- Compléter l'extraction des protéines en plongeant les tubes dans de l'azote liquide (-196°C) puis dans un bain marie (37°C), suivie d'une centrifugation à 12000g /4°C/30 min.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- Doser la concentration de protéines à l'aide du kit BCA

Mesure de l'activité SIRT1

- Incuber 10 µL d'homogénat avec 15 µL de substrats Fluor de Lys-SIRT1® (100 µM) et NAD+ (100 µM) pendant 30 min à 37 °C dans une plaque noire de 96 puits (4).
- Stopper la réaction en ajoutant 50 µL de réactif développeur et le nicotinamide (2 mM)
- Mesurer la fluorescence pendant 45 min à 355nm (excitation) et 460nm (émission) à l'aide du lecteur de plaques Victor3 (5)
- Normaliser le changement de fluorescence (unités arbitraires de fluorescence (AFU)) par minute et en rapportant à la quantité de protéines totales dans les échantillons

(1) SIRT1 Fluorescent Activity Assay/Drug Discovery Kit (BIOMOL, à Plymouth Meeting, PA, USA)

(2) Tampon C (low salt)

<i>Sol stock</i>	<i>Concentration finale</i>	<i>Vol. à prélever en µl</i>
Tris HCl 2M, pH 8,0	10 mM	50
KCL 3M	20mM	60
EDTA 0,5M Ph=8	1,5mM	30
Co, inh 500X	1X	20
PMSF 0,1M	1mM	100
MgCl ₂ 1M	1mM	10
Glycérol 99%	10%	1000
H ₂ O qsp 10mL		

(3) Tampon N (High salt)

<i>Sol stock</i>	<i>Concentration finale</i>	<i>Vol. à prélever en µl</i>
Tris HCl 2M, pH 8,0	10 mM	50
KCL 3M	0,5M	1660
EDTA 0,5M Ph=8	1,5mM	30
Co. inh 500X	1X	20
PMSF 0,1M	1mM	100
H2O qsp 10mL		

(4) Plaques de 96 puits noire, stériles : PerkinElmer; Courtaboeuf cedex, France

(5) Lecteur de plaques Victor3, 1420 Multilable Counter, PERKIN ELMER Wallac Multilabel : Perkin Elmer.

Fiche 11 : Mesure de taux de viabilité cellulaire par MTT (M655)

Matériel :

- PSM-II
- Incubateur CO₂
- Plaques de culture 96 puits
- Filtre stérile (0.22 µm) pour seringue
- Seringue à usage unique

Solutions de travail :

Milieux de culture adaptés à la croissance des cellules étudiées

PBS 1x (Sigma, ref D1408)

EBSS 10x (Earle's Balanced Salt Solution, filtrée à 0.22 µ et stockée à +4°C) :

EBSS 10x	PM (g/mol)	mg/100 mL	C (mol/L)
KCl	75	400	0.05
NaHCO ₃	84	2200	0.26
NaCl	58	6800	1.17
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	136	140	0.01
D-Glucose	180	1000	0.06

Solution **MTT 5 mg/mL** (Sigma, ref M5655, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide,  ) préparée extemporanément dans l'**EBSS 1x**. Solution filtrée
MTT Solvent utilisé c'est le DMSO.

Ensemencer les cellules 4400 cellules/ puit une nuit avant dans une plaque 96 puits

Préparer la quantité de MTT nécessaire pour chaque jour. La solution est préparée extemporanément dans l'EBSS 1x (5 mg/mL). Filtrer cette solution de travail

1. Distribuer 100 µL de solution MTT (5 mg/mL) dans les différents puits et incubé à 37°C dans l'incubateur CO2 pendant 3h.
2. Aspirer délicatement et entièrement la solution de MTT en excès (les cristaux formés par la métabolisation du MTT provoquent une lyse cellulaire)
3. Ajouter 100 µL de solution MTT solvant (HCl/Isopropanol) ; laisser dissoudre en agitant délicatement.
4. Mesurer l'absorbance à 570 nm (lecteur de plaque MultiskanGO, Thermo).
La croissance est proportionnelle à la coloration.

Partie : Mesure du stress oxydant dans les fibroblastes de patients

[Fiche 12 : Coloration des cellules par le dihydroéthidium \(Marqueur des ROS cellulaires\) \(ab236206\)](#)

Marquage de cellules vivantes

Une fois internalisé, le dihydroéthidium (DHE) ou hydroéthidine est déshydrogéné en éthidium, qui s'intercale ensuite sur l'ADN. Le bromure d'éthidium marque sélectivement les cellules mortes avec une fluorescence rouge.

Le dihydroéthidium colore le cytoplasme des cellules vivantes en bleu (370 nm/émission 420 nm) et la chromatine (noyau) des cellules vivantes en rouge (535 nm/610 nm) en 30-40 min

Solution stock à préparer à 10mM (ajouter 317 µl de DMSO et mélanger par aspiration-refoulement).

Dilution du DHE dans du DMEM (solution de travail à 10 µM) :

1. Cultiver les cellules dans des lamelles avec du milieu DMEM complet et les incubé une nuit à 37°C
2. Ajouter le DHE à une concentration finale de 10 µg/ml (10 µM) dilué dans du milieu de culture et laisser incubé 30 min à 37°C, 5% CO2

3. Rinçage une fois avec PBS 1X
4. Fixation pas possible
5. Lire au microscope confocal

Fiche 13 : Quantification des ROS cellulaire par ROS-Glo™ H2O2 Assay (G8820)

Le mécanisme de dosage ROS-Glo™ pour la mesure du H2O2 est illustré à la figure 56. Un substrat H2O2 est utilisé pour réagir directement avec H2O2 et générer un précurseur de luciférine. Après ajout du réactif de détection ROS-Glo™ contenant la Luciférase recombinante Ultra-Glo™ et de la d-cystéine, le précurseur est converti en luciférine par la d-cystéine, et la luciférine produite réagit avec la luciférase recombinante Ultra-Glo™ pour générer un signal luminescent qui est proportionnel à la concentration en H2O2.

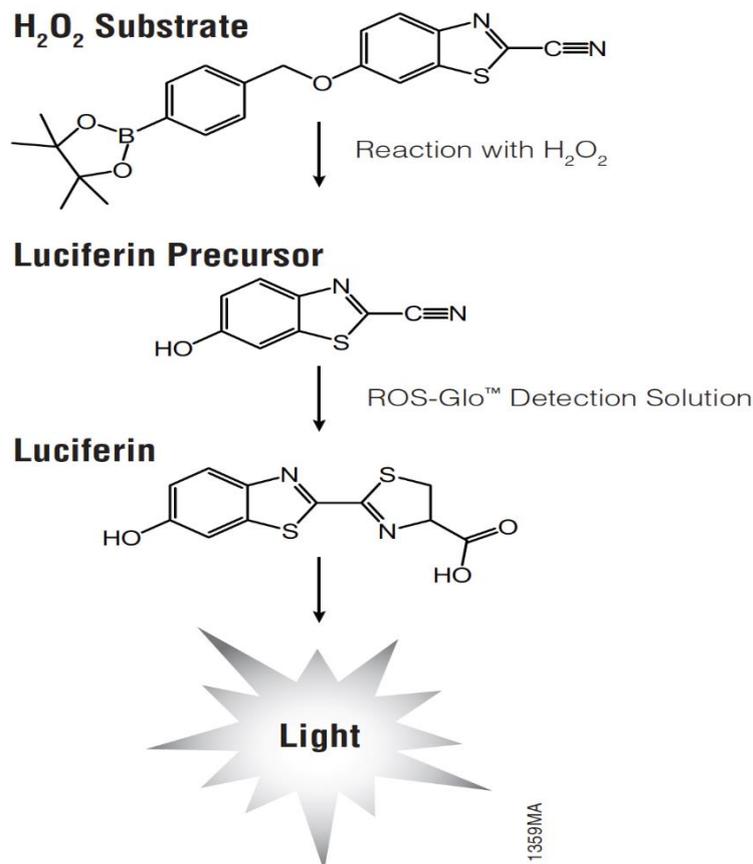


Figure 56 : Principe du test ROS-Glo™ H2O2.

1. Ensemencer les cellules dans une plaque de 96 puits à parois opaques (10,000 cellules dans 80 µl de milieu / puit) ; et les incuber une nuit à 37°C

1. Décongeler le tampon de dilution du substrat H₂O₂ et placez-le sur de la glace.

2. Diluer le substrat H₂O₂ 10 mM fourni dans le kit à 125 µM dans le tampon de dilution de substrat H₂O₂. Juste avant utilisation, préparer une quantité de solution de substrat H₂O₂ suffisante pour tous les échantillons y compris les contrôles. Pour une plaque à 96 puits, préparez ce qui suit :

Number of Wells	H₂O₂ Substrate Dilution Buffer	H₂O₂ Substrate
10	200µl	2.5µl
50	1.0ml	12.5µl
100	2.0ml	25µl

3. Ajouter 20 µl de solution de substrat H₂O₂ aux cellules et mélanger. Le volume final du puits sera de 100 µl et la concentration finale du substrat H₂O₂ sera de 25 µM.

4. Placer les cellules dans un incubateur (par exemple, 37°C, incubateur à 5 % de CO₂) pour 6 heures.

5. Ajoutez 100 µl de solution de détection ROS-Glo™ à chaque puit.

6. Incuber pendant 20 minutes à température ambiante (22°–25°C).

7. Enregistrer les unités de luminescence relative à l'aide d'un luminomètre à lecture de plaque.

Fiche 14 : Mesure de ROS mitochondriaux par Mitosox Red kit (M36008)

Marquage de cellules vivantes

Une fois internalisé, le Mitosox red qui est un colorant fluorogénique, cible particulièrement les mitochondries, et il est oxydé uniquement par le superoxyde pour produire une fluorescence rouge (émission : ~510 à 580 nm) en 20 min.

Solution stock à préparer à 5 mM (ajouter 13 µl de DMSO dans un tube de Mitosox red et mélanger par aspiration-refoulement).

Dilution du Mitosox red dans du DMEM (solution de travail à 5 µM) :

1. Cultiver les cellules dans des lamelles avec du milieu DMEM complet et les incuber une nuit à 37°C
2. Ajouter le Mitosox red à une concentration finale de 5 µM dilué dans du milieu de culture
3. Laisser incuber 20 min à 37°C, 5% CO₂
4. Rinçage avec PBS 1X
5. Remettre dans du DMEM
6. Lire au microscope confocal sans fixation (cellules toujours vivantes)

Partie : Etude de la physiologie mitochondriale (Morphologie et fonctionnement)

Fiche 15 : Evaluation de la morphologie mitochondriale par mitochondria-targeted green fluorescent proteins (GFP) (C10508)

Marquage de cellules vivantes

Cette construction prête à l'utilisation contient du baculovirus d'insecte, où elle exprime la GFP fusionnée à la séquence leader de l'alpha pyruvate déshydrogénase E1 fournissant un ciblage précis et spécifique aux mitochondries.

1. Cultiver les cellules dans des lamelles avec du milieu DMEM complet
2. Calculer le volume approprié de réactif CellLight® pour le nombre de cellules

$$\text{Volume of CellLight}^{\circledR} \text{ Reagent (mL)} = \frac{\text{number of cells} \times \text{desired PPC}}{1 \times 10^8 \text{ CellLight}^{\circledR} \text{ particles/mL}}$$

PPC est le nombre de particules par cellule, et 1×10^8 est le nombre de particules par ml du réactif.

3. Mélanger le réactif CellLight® plusieurs fois par inversion pour assurer une solution homogène. Ne pas vortexer
4. Ajouter le volume de réactif CellLight® calculé directement aux cellules dans du DMEM complet et mélanger doucement.
5. Remettre les cellules dans l'incubateur de culture pendant la nuit à 37°C, 5% CO2 (≥16 heures)
6. Lire au microscope confocal sans ou avec fixation

Les profils mitochondriaux colorés par CellLight Mito-GFP ont été segmentés à l'aide d'Ilastik 1.3.2 (Berg et al. 2019). Ils ont ensuite été subdivisés en 3 catégories : puncta, tiges et réseaux suivant l'approche introduite par (Leonard et al. 2015). En bref, des filtres de surface, de rondeur et, dans certains cas, de longueur (après squelettisation) ont été appliqués aux masques binaires aux Fijji (Schindelin et al. 2012) pour définir les 3 classes.

[Fiche 16 : Mesure du potentiel de la membrane mitochondriale par Tétraméthylrhodamine \(TMRM Reagent\) \(I34361\)](#)

Marquage de cellules vivantes

La tétraméthylrhodamine (TMRM) est un colorant perméable aux cellules qui s'accumule dans les mitochondries actives avec des potentiels membranaires intacts et produit une fluorescence entre le rouge et l'orange (pic d'absorbance : 548 nm, pic d'émission : 574 nm).

Solution stock à préparer à 10 mM (ajouter 5 ml de DMSO dans un tube de TMRM et mélanger par aspiration-refoulement).

Pour préparer une solution stock à 100 µM, ajouter 10 µL de la solution 10 mM dans 990 µL de DMSO.

Dilution du TMRM dans du DMEM (solution de travail à 100nM) :

1. Cultiver les cellules dans des lamelles avec du milieu DMEM complet et les incubent une nuit à 37°C

2. Diluer le TMRM à une concentration finale de 100 nM dans du milieu de culture (DMEM)
3. Ajouter la solution de travail et laisser incuber 30 min à 37°C, 5% CO₂
4. Rinçage avec PBS 1X
5. Remettre dans du DMEM
6. Lire au microscope confocal sans fixation (cellules toujours vivantes).

Fiche 17 : Mesure de la respiration mitochondriale par Seahorse XF Cell Mito stress kit (Agilent).

A. Ensemencement de cellules adhérentes dans les Mini plaques de culture cellulaire Agilent Seahorse XFp

1. Retirer un paquet de mini plaque de la boîte bleue. Retirer le film du paquet.
2. Remplir chaque chambre du fossé avec 400 µL d'eau stérile (total 3200 µL).
3. 180 µL de milieu de croissance (pas de cellules) dans les puits A et H. Ce sont des puits de correction de fond.
4. Déterminer la concentration cellulaire souhaitée.
Le nombre de cellules peut varier considérablement mais se situe généralement entre 5×10^3 et 4×10^4 cellules par puits. Les cellules sont ensemencées dans 180 µL de milieu de croissance.
5. Recolter les cellules en utilisant les procédures standards. Resuspendre les cellules dans 5 ml de milieu de croissance, comptez, puis diluer à la concentration désirée. Pour les fibroblastes : ensemencement à 12500 cellules/180 µL (83333 cellules/ml).
6. Homogénéiser et distribuer 180 µL de la suspension cellulaire aux puits B-G.
7. Incuber les cellules toute la nuit à 37°C, 5% CO₂

B. Hydratation des cartouches Agilent Seahorse XFp Sensor

Matériels

Agilent Seahorse XFp FluxPak containing :

7. Extracellular Flux Cartridges box:
 - a) Sensor cartridge (12x)
 - b) Utility plate (12x)

- c) Cartridge lid (12x)
- 2. Cell Culture Miniplates box :
 - a) Agilent Seahorse XFp Miniplate with lid (12x)
- 3. Agilent Seahorse XF Calibrant (100 mL)

Matériels supplémentaires requis (non inclus):

- 1. 200 µL Multi Channel pipette
- 2. 10 mL Conical tubes
- 3. Cell culture grade sterile water
- 4. Non-CO2 incubator at 37 °C
- 5. Glucose 1M (solution mère à 450g/l (2.49 M)) : dilution dans de l'eau stérile (2 ml d-glucose+3 ml H2O)
- 6. Pyruvate 100mM
- 7. L-Glutamine 200mM

Protocole

Jour avant le dosage :

- 1. Retirer un paquet de la boîte des cartouches de flux extracellulaires. Retirer le film d'étanchéité de la ou des cartouches qui seront utilisée(s).
- 2. Séparer la plaque (blanc) de la cartouche de capteur Seahorse Agilent (vert). Placer la cartouche du capteur à l'envers sur le plan de travail.
- 3. Remplir chaque puit de la plaque avec 200 µL de calibrant
- 4. Remplir les fossés autour des puits avec 400 µL de calibrant
- 5. Remettre la cartouche de capteur XFp (vert) sur la plaque (blanc) contenant du calibrant
- 6. Placer l'assemblage cartouche/plaque dans un incubateur sans CO2 à 37°C toute la nuit.

C. Lavage des cellules adhérentes dans des mini plaques de culture de cellules Agilent Seahorse XFp

- 1. Pour une plaque XFp : préparer 10 ml de milieu de dosage : 9.7 ml de milieu de dosage + 100 µl de glucose (1M), 100µl de pyruvate (100 mM) et 100 µl de L-glutamine (200 mM). Chauffer au bain marie le milieu de dosage à 37°C et ajuster le PH à 7.4 ± 0.1 avec du NaOH 0.1 N. Filtrer

le milieu de dosage avec un filtre 0.2 μM → garder le milieu à 37°C avant utilisation.

2. Retirer la mini plaque XFp Cell Culture de l'incubateur à 37°C
3. Observer les cellules sous microscope et vérifier l'adhérence, la morphologie, la pureté (contamination), l'apparence (monocouche), l'uniformité des cellules et vérifier l'absence de cellules dans les puits A et H.
4. Laver les cellules avec le milieu de dosage :
 - a. Retirer tout le milieu mais laisser 20 μL dans chaque puit. Ce volume sert à éviter de dessécher complètement les cellules.
 - b. Rincer 2 fois avec 160 μL de milieu de dosage en laissant à chaque fois 20 μL dans le puit.
 - c. Ajouter 160 μL de milieu de dosage pour avoir un volume final de 180 μL /puits.
 - d. Visualiser les cellules sous microscope pour voir si elles ne se sont pas décollées.
 - e. Placer la mini plaque dans l'incubateur à 37°C sans CO₂ pendant 1h avant le dosage.

D. Préparation des solutions stocks et chargements des composants dans la cartouche

Important : utiliser les composés reconstitués le jour même. Ne pas recongeler et jeter tout le reste. Le kit de test de stress Seahorse XF Cell Mito comprend six feuilles de sachets contenant chacun trois tubes de :

- Oligomycine (bouchon bleu)
- FCCP (bouchon jaune)
- Roténone / antimycine A (bouchon rouge)

Les réactifs du kit sont suffisants pour six cellules Seahorse XF complètes.

1. Retirer un sachet et laisser les composés se réchauffer à température ambiante dans le sachet scellé pendant environ 15 minutes.
2. Ouvrez un sachet en aluminium et retirez les trois tubes contenant l'oligomycine (bouchon bleu), FCCP (bouchon jaune) et roténone/antimycine A (bouchon rouge).
3. Placer les tubes dans un portoir.

4. À l'aide d'une pipette p1000, remettez en suspension le contenu de chaque tube avec le milieu de dosage chauffé et équilibré à pH7.4± 0.1 (volumes décrits dans le tableau ci-dessous).
5. Pipetez doucement en faisant des aspirations-refoulements (~ 10 fois) pour solubiliser les composés.
6. Préparer les dilutions des composants à la concentration indiquée dans le tableau ci-dessous (ajouter le volume indiqué) :

Compound	Volume of assay medium	Final concentration
Oligomycin	252 µL	50 µM
FCCP	288 µL	50 µM
Rotenone/antimycin A	216 µL	25 µM

7. Bien homogénéiser et charger les puits avec les volumes indiqués dans le tableau ci-dessous :

1. Préparer les dilutions des composants à la concentration désirée

Port designation	[Final Well] (µM)	Stock volume (µL)	Media volume (µL)	10X [Port] (µM)	Add to port volume (µL)
Port A Oligomycin	1.0	60	240	10	20
Port B FCCP	0.125	7.5	292.5	1.25	22
	0.25	15	285	2.5	22
	0.5	30	270	5	22
	1.0	60	240	10	22
	2.0	120	180	20	22
Port C Rotenone/ antimycin A	0.5	60	240	5	25

8. Tapoter pour enlever les bulles d'air, enlever le couvercle et procéder au dosage grâce à l'appareil « Agilent Seahorse XFP » en suivant les instructions préconisées par le fournisseur.
9. Extraire les protéines avec le tampon NaCl (25 µL), gratter avec le cône et incubé 30 min sur glace puis doser au BCA assay. Le nombre de cellules ensemencées ou la quantité protéique peut servir à la normalisation des résultats.

Partie modèle animale :

Fiche 18 : Description du modèle murin transgénique

Le modèle de souris transgénique dans lequel le gène *Mtr* est spécifiquement invalidé dans les cellules neuronales (Mtr c-KO) a été obtenu en collaboration avec la Clinique de la Souris de Strasbourg et est disponible au laboratoire. Le croisement des souris Mtr avec des souris Thy-1.2/Cre conduit à une délétion spécifique du gène *Mtr* dans les neurones de la progéniture. Autorisations Comité d'éthique Local APAFIS N°2015081911577729.

Les souris sont maintenues en conditions standard d'élevage, avec un cycle d'alternance jour/nuit de 12 h, à température ambiante ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), et avec eau et nourriture à volonté. Tous les animaux de laboratoire ont été gardés selon les exigences du Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale.

Système Cre/Lox

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

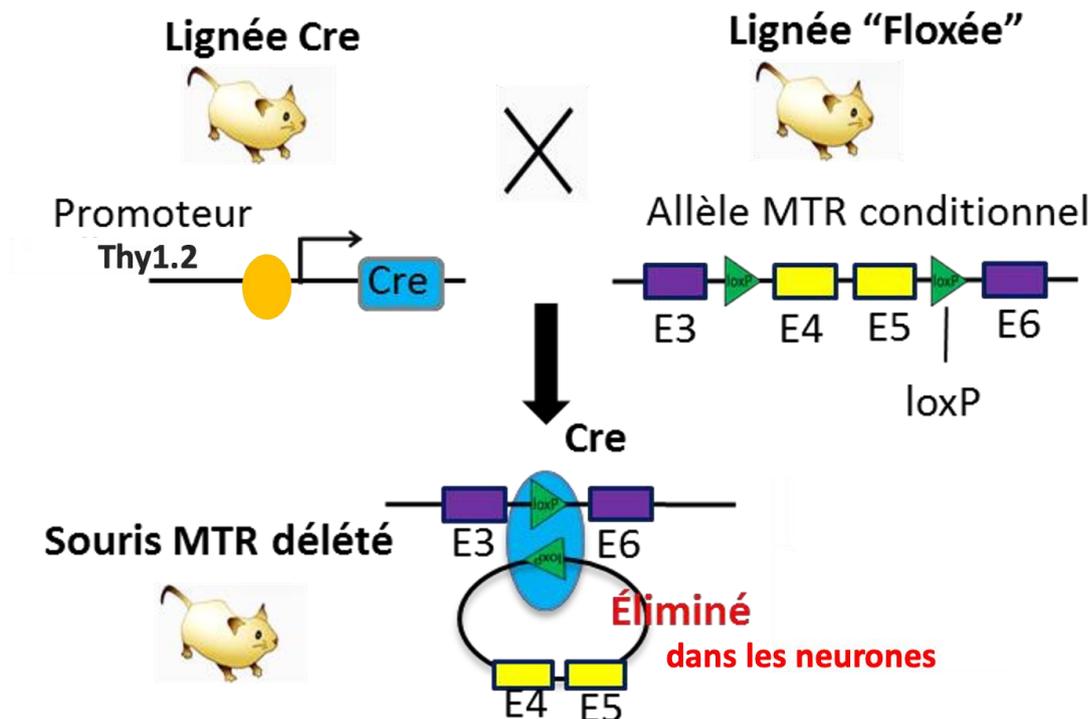


Figure 57 : Mécanisme de système Cre/LoxP pour exciser le gène MTR dans les neurones.

[Fiche 19 : Application de traitements](#)

Selon le traitement 50 animaux (WT et *Mtr* KO) sont classés par groupes :

Groupe véhicule

Groupe +B12

Groupe +SRT2104

Groupe +NAC +SRT2104

Administration de SRT2104 par gavage

L'agent SRT2104 est préparé le jour même, dissout dans du DMSO (10 mg/100 µL) et administré par gavage dans le mélange DMSO : PEG 40% (10 :90), à raison de 50 mg/kg tous les 2 jours de D20 jusqu'à D37 (l'âge de mise à mort). Le geste est pratiqué en utilisant une sonde de gavage prévu à cet effet.

Les animaux témoins (groupe véhicule) seront traités avec le mélange DMSO :PEG40% (10 :90) en absence du SRT2104 (principe actif).

Administration de NAC (N-acétylcystéine) par gavage

L'agent NAC est préparé le jour même, dissout dans de l'eau distillée (10 mg/100 µL) et administré par gavage, à raison de 2g/kg tous les 2 jours de D20 jusqu'à D37 (l'âge de mise à mort). Le geste est pratiqué en utilisant une sonde de gavage prévu à cet effet.

Les animaux témoins (groupe véhicule) seront traités avec de l'eau distillée en absence du NAC (principe actif).

Administration de la supplémentation en vitamine B12 dans l'eau de boisson (hydroxocobalamine)

Le traitement à l'hydroxocobalamine est préparé le jour même, dissous dans l'eau de boisson (5mg dans 100mL). Le biberon est recouvert d'aluminium afin de le protéger de la lumière et sera changé deux fois par semaine. Ce groupe expérimental n'a pas pu être inclus dans le manuscrit de thèse à la date d'octobre 2021, mais fait partie intégrante du projet.

En fin de protocole, les souriceaux âgés de 37 jours seront mis à mort et des organes prélevés par microdissection du cerveau pour permettre des analyses histologiques et biochimiques.

Fiche 20 : Tests comportementaux

Les animaux testés pour leurs comportements passent dans des dispositifs adaptés aux questions scientifiques posées. Certains tests peuvent être ponctuels, d'autres nécessitent plusieurs passages successifs dans le même dispositif. Les tests sont effectués sur des souriceaux depuis l'âge de 5 jours post-natal (D5, pour Day 5) jusqu'au l'âge de 37jour post-natal (D37).

Au moment d'un test, une boîte d'élevage, qui peut contenir plusieurs animaux, est prise en charge et apportée dans une pièce dédiée exclusivement aux tests comportementaux.

Tous les tests sont réalisés entre 8h et 12h du matin, tandis que le cycle jour (12/12) reprend à 7h. Les jeunes individus sont testés un à un. Pour les souriceaux avant le

sevrage, la mère allaitante est séparée de sa portée pendant le temps de réalisation du test. A la fin du test chaque individu rejoint sa cage d'élevage.

Test 1 : Réflexe de retournement (noté RR)

Ce test psychomoteur de retournement est un test de retournement des rongeurs depuis la position « couché sur le dos » vers la position quadrupède. Il met en jeu la fonction neuronale motrice nécessaire à l'opération de retournement ainsi que la coordination des mouvements entre « l'avant-main » et « l'arrière-main » des individus. Ce test se base sur le malaise de position des individus retournés et reposés dorsalement, ce qui engendre un réflexe de retournement de ceux-ci afin de retrouver une position naturelle et préférée (position quadrupède) (Schroeder et al., 1995).

Le jour du test (5^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} jour après la naissance). Les individus sont placés délicatement sur le dos en position allongée et maintenus par l'expérimentateur sur une surface plane. Sans latence, les individus sont lâchés et laissés libre de leurs mouvements et un chronomètre est déclenché. Le temps nécessaire pour reprendre une position quadrupède (les quatre plantes des pattes en contact avec le support) est mesuré. En général, quelques secondes suffisent, avec en plus une diminution de ce temps en fonction de l'avancée en âge des individus. Ainsi, un temps maximum pour réaliser le test est fixé à 60 secondes ("cut-off" du test).

Test 2 : RETOURNEMENT ANTI-GRAVITAIRE (noté NG pour NEGATIVE GEOTAXIS)

Ce test psychomoteur est un test de retournement des souris depuis la position « tête en bas » vers la position « tête en haut ». Ce test se base sur le malaise de position des individus positionnés la tête en bas sur un plan incliné, ce qui engendre un réflexe de retournement de ceux-ci afin de retrouver une position naturelle et préférée (position « tête en haut ») (Schroeder et al., 1995). Ce test est effectué à D5, D7 et D9 après la naissance.

Procédure

Les individus sont placés délicatement sur leurs quatre pattes en position « tête en bas » sur une surface plane inclinée à 20%. Sans latence, les individus sont lâchés et laissés libre de leurs mouvements et un chronomètre est déclenché. Le temps nécessaire pour reprendre une position « tête en haut » sur le plan incliné est mesuré. En général, quelques secondes suffisent, avec en plus une diminution de ce temps en

fonction de l'avancée en âge des individus. Ainsi, un temps maximum pour réaliser le test est fixé à 60 secondes.

Test 3 : Test de Homing

Ce test correspond à une étude des capacités d'apprentissage et de mémoire olfactivo-hippocampo-dépendantes chez les jeunes individus avant le sevrage. Il est basé sur les aptitudes des souris à reconnaître et suivre les informations environnementales afin de retrouver leur environnement maternel habituel. Le parcours est caractérisé par un couloir de progression à deux extrémités correspondant à deux zones opposées. Dans chacune de ces zones d'arrivée est déposée une quantité équivalente de litière soit fraîche, soit provenant de la cage maternelle d'élevage des jeunes individus testés.

Le dispositif est composé d'un couloir de 9 cm de large et 30 cm de hauteur et dont la longueur est de 60 cm. Les individus sont testés un à un aux jours 11 et 19 après la naissance. Au moment du test, chaque zone d'arrivée reçoit la même quantité de litière soit fraîche, soit "sale/odorante". Chaque individu est déposé au centre du couloir et il est laissé libre de ces mouvements pendant 5 minutes. Le dispositif est débarrassé de la litière et nettoyé à l'alcool 30% entre chaque souris. Les paramètres enregistrés sont la latence d'entrée dans le compartiment contenant la litière connue (entrée avec les quatre pattes dans le compartiment) et le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans le bras contenant la litière fraîche ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière »).

Test 4 : LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE (noté EPM pour Elevated plus maze)

Ce test correspond à une évaluation du niveau d'anxiété des rongeurs. Ce test n'a pas été mis au point pour générer un stress, mais correspond à une mesure ponctuelle l'état anxieux basal chez l'individu. Il est basé sur deux caractéristiques chez les souris ; (i) l'exploration « naturelle » dans le dispositif et (ii) la préférence de positionnement vers les zones plus protégées au détriment des zones libres ou non protégées.

Le dispositif est un labyrinthe simple formant une croix à 4 branches organisées en angles droits. Ce labyrinthe est surélevé au-dessus du sol à 60cm. Deux des branches, opposées l'une de l'autre, possèdent des murs verticaux (dits « protecteurs ») opaques. Les deux autres branches ne sont constituées que du chemin de progression (non protégées). Le chemin de progression est large de 6 cm, alors que chaque

branche est longue de 50cm. Les murs doivent être suffisamment hauts pour que les individus ne puissent voir ou s'échapper au-dessus de ceux-ci. Au centre de la croix matérialisée par les quatre branches est délimitée une zone en forme de carré dite zone neutre où les individus s'orientent vers une branche libre ou protégée. Cette zone est aussi utilisée pour déposer chaque individu au début de chaque test.

Le test se déroule en une seule phase. Chaque animal est déposé au centre du dispositif (face à une branche non protégée) et est laissé libre de ces mouvements pendant un temps déterminé de 5min. Les paramètres enregistrés sont le nombre d'entrées et le temps passé dans chaque branche. Pour une analyse ultérieure plus fine, chaque branche peut être considérée selon deux demi-zones. D'autres items comportementaux éthologiques peuvent être relevés comme le temps et le nombre de freezing (immobilité totale de l'individu), le nombre de redressements, le nombre de regards dans le vide (head dipping) ...etc.

L'acquisition des paramètres est effectuée manuellement.

Test 5 : Test de suspension

Ce test correspond à une étude des capacités musculaires chez les jeunes individus avant le sevrage. Ce test est généralement effectué à partir du moment où l'activité générale des individus commence à se développer. Il est basé sur les aptitudes des souris à rester accrochées par les pattes antérieures à une barre métallique. Nous avons choisi les jours J16, J18 et J20. Le dispositif est une barre métallique, de 1 mm de diamètre, fixée à deux portiques latéraux et positionnée à 30 cm de la surface de la paille. Une épaisseur de mousse ou de coton est positionnée largement sous la barre pour réceptionner délicatement les souris qui chuteraient. Au moment du tests l'animal est présenté au milieu de la barre par les 2 pattes avant. L'individu est lâché et le temps de suspension est mesuré.

Test 6 : Test de l'Open Field

Ce test est celui de l'observation libre des comportements animaux dans une enceinte close homogène sans autre dispositifs particuliers. Ce test met en avant l'observation et la quantification des items comportementaux qui composent les grandes fonctions comportementales, selon le principe « l'animal montre lui-même son niveau d'activité en fonction du milieu dans lequel il se trouve ». C'est une des

méthodes pour l'évaluation des comportements locomoteur, exploratoire, ainsi que l'état émotionnel chez le rongeur (Tobach, 1969). Ce test est effectué à J 21.

Le dispositif se compose d'une arène circulaire de 1 m de diamètre et dont la hauteur des murs est de 35 cm. Le sol est constitué d'une plaque en verre sur laquelle a été dessiné au milieu un cercle dit central de 50 cm laissant apparaître entre ce cercle et les murs du dispositif un deuxième cercle dit périphérique de 100 cm. Plusieurs lignes radiales traversent les deux zones divisant la surface de l'arène en 8 quartiers centraux et 8 quartiers périphériques. Les animaux testés sont délicatement placés au milieu du dispositif et l'explorent librement pendant un temps fixé à 5 minutes. Le dispositif est nettoyé à l'alcool 30% entre chaque souris. Les paramètres mesurés sont le nombre d'entrée dans les quartiers périphériques et centraux (quatre pattes dans le quartier) ainsi que le nombre de redressement (les deux pattes antérieures décollées du sol et les deux pattes postérieures au sol). A la fin du test, chaque individu rejoint sa cage d'élevage. Les paramètres de locomotion et de position sont enregistrés via un système de video-tracking rendant possible une bonne standardisation entre individus.

Test 7 : Labyrinthe en multi-T aquatique

Ce test correspond à une étude des capacités d'apprentissage et mémorisation hippocampo-dépendantes. Il est basé sur les aptitudes des individus à mémoriser un parcours dans lequel ils naviguent librement en fonction de repères environnementaux. Le fait de considérer un environnement aquatique permet de maintenir une bonne motivation chez les individus et de se passer du nettoyage minutieux du dispositif entre chaque individu. Les deux précautions à respecter avec les souris sont le maintien de la température de l'eau autour de 24 à 25 °C, et l'utilisation du labyrinthe en "pseudo-nage" ; c'est à dire que les souris peuvent prendre appui au fond (= niveau d'eau faible, environ 5-6 cm).

Le parcours du labyrinthe est caractérisé par un couloir de progression composé par l'enchaînement linéaire de 13 cases formant labyrinthe en multi-T associés les uns aux autres. Les deux zones de départ et d'arrivée « sortie » du labyrinthe sont bien définies. Afin de conserver une motivation optimale homogène chez tous les individus d'une étude, il est nécessaire de procéder à une habituation préalable au test pour que les individus prennent connaissance du dispositif (environnement aquatique, murs

verticaux...) et de la possibilité de s'échapper par une voie unique (« sortie ») qui les ramène vers (1) une boîte intermédiaire de séchage et (2) leur cage d'élevage usuelle. Cette phase d'habituation se déroule selon 2 jours consécutifs (notés j-2 et j-1), juste avant le début de la phase d'apprentissage (noté j1). Les animaux sont « mis à l'eau » à l'endroit correspondant à la future zone de départ mais sans le parcours type. Ils sont laissés libres de leurs mouvements et rejoignent la voie de sortie. Si au bout de 2 minutes, l'animal n'a pas trouvé la voie de sortie, il est guidé manuellement vers celle-ci. L'animal est laissé 0,5 à 1 minute dans la boîte+litière d'arrivée (récupération, toilettage), puis il rejoint une boîte intermédiaire garnie de papier absorbant (1 à 2 min), puis sa cage d'élevage. Chaque animal passe minimum deux fois cette habituation avec un intervalle de temps compris entre 30 min et 1 heure. La même opération est renouvelée le lendemain (j-1).

L'apprentissage se déroule en plusieurs jours consécutifs (5 sessions), afin de constater une amélioration des performances cognitives matérialisée par une diminution des principaux paramètres (latences de sortie et nombre de cul-de-sacs visités).

L'acquisition des paramètres se fait par l'utilisation d'un système de Video-tracking précis, standardisé et apporte une quantité suffisante de variables caractérisant les fonctions nerveuses mises en jeu.

[Fiche 21 : Analyses statistiques des données](#)

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R avec des tests paramétriques (T-Student ou Anova one variance) après avoir vérifié la normalité et la variance des données. Les résultats dont la valeur du p est inférieure à 0,05 sont considérés comme significatifs. Les valeurs représentées dans les histogrammes représentent les moyennes +/- les écart-types ou erreur standard moyennées d'au moins 3 expériences indépendantes pour les données moléculaires et d'au moins 5 individus pour les tests comportementaux (nous étofferons ce chiffre vers 9 à 10 individus/groupe dans la mesure des naissances).

Références

Alkadhi KA. Cellular and Molecular Differences Between Area CA1 and the Dentate Gyrus of the Hippocampus. *Mol Neurobiol.* 2019 Sep;56(9):6566-6580.

Anand KJ, Scalzo FM. Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? *Biol Neonate.* 2000 Feb;77(2):69-82.

Annals of Nutrition and Metabolism 61, no. 3 (2012) : 259-64.

Arora K, Sequeira JM, Alarcon JM, Wasek B, Arning E, Bottiglieri T, Quadros EV. Neuropathology of vitamin B12 deficiency in the Cd320-/- mouse. *FASEB J.* 2019 Feb;33(2):2563-2573.

Asher G, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell.* 2008; 134:317–328.

Attig L, Gabory A, Junien C. Nutritional developmental epigenomics: immediate and long-lasting effects. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 221-231.

Baksi A, Kraydashenko O, Zalevkaya A, Stets R, Elliott P, Haddad J, Hoffmann E, Vlasuk GP, Jacobson EW. A phase II, randomized, placebo-controlled, double-blind, multi-dose study of SRT2104, a SIRT1 activator, in subjects with type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol.* 2014 Jul;78(1):69-77.

Battaglia-Hsu S, Akchiche N, Noel N, Alberto J-M, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Dec 22;106(51):21930–5.

Battaglia-Hsu SF, Ghemrawi R, Coelho D, Dreumont N, Mosca P, Hergalant S, Gauchotte G, Sequeira JM, Ndiongue M, Houlgatte R, Alberto JM, Umoret R, Robert A, Paoli J, Jung M, Quadros EV, Guéant JL. Inherited disorders of cobalamin metabolism disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA through impaired methylation/phosphorylation of ELAVL1/HuR. *Nucleic Acids Res.* 2018 Sep 6;46(15):7844-7857.

Baur JA, Ungvari Z, Minor RK, Le Couteur DG, de Cabo R. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Jun 1;11(6):443-61.

Baur JA. Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1804:1626– 1634.

Baur JA. Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. *Mech. Ageing Dev.* 2010; 131:261–269.

Biswas, S.; Chida, A. S.; Rahman, I. Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 71:551–564.

Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant JL, Daval JL. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol.* 2007 Feb ;170(2):667-79.

Bleier L, Wittig I, Heide H, Steger M, Brandt U, Dröse S. Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2015 Jan;78:1-10.

Boily G, Seifert EL, Bevilacqua L, He XH, Sabourin G, Estey C, Moffat C, Crawford S, Saliba S, Jardine K, Xuan J, Evans M, Harper ME, McBurney MW. SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS One.* 2008 Mar 12;3(3):e1759.

Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe H, Marmor S, Luo J, Gu W, Guarente L. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell*. 2007 Dec;6(6):759-67.

Bouche C, Serdy S, Kahn CR, Goldfine AB. The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2004; 25:807–830.

Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 1972 Jul;128(3):617-30.

Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei A, Halmai R, Mészáros LG, Sümegi B, Wittmann I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr*. 2011 Aug;106(3):383-9.

Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol*. 2003 Mar 31;160(7):1115-27.

Brooks C, Cho SG, Wang CY, Yang T, Dong Z. Fragmented mitochondria are sensitized to Bax insertion and activation during apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 Mar;300(3):C447-55.

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 2004 Mar 26;303(5666):2011-5.

Caramaschi D, Sharp GC, Nohr EA, Berryman K, Lewis SJ, Davey Smith G, et al. Exploring a causal role of DNA methylation in the relationship between maternal vitamin B12 during pregnancy and child's IQ at age 8, cognitive performance and educational attainment: a two-step Mendelian randomization study. *Hum Mol Genet*. 2017 Aug 1;26(15):3001–13.

Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on Cobalamin, Folate, and Homocysteine. *Hematology*. 2003 Jan 1;2003(1):62–81.

Carta M, Fièvre S, Gorlewicz A, Mulle C. Kainate receptors in the hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2014 Jun;39(11):1835-44.

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

Coelho D, Kim JC, Miousse IR, Fung S, du Moulin M, Buers I, Suormala T, Burda P, Frapolli M, Stucki M, Nürnberg P, Thiele H, Robenek H, Höhne W, Longo N, Pasquali M, Mengel E, Watkins D, Shoubridge EA, Majewski J, Rosenblatt DS, Fowler B, Rutsch F, Baumgartner MR. Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet*. 2012 Oct;44(10):1152-5.

Coelho D, Suormala T, Stucki M, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS, Newbold RF, Baumgartner MR, Fowler B. Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. *N Engl J Med*. 2008 Apr 3;358(14):1454-64.

Copits BA, Swanson GT. Dancing partners at the synapse: auxiliary subunits that shape kainate receptor function. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Oct;13(10):675-86.

Daval J-L, Blaise S, Guéant J-L. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 6;106(1):E1.

Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J.* 2016 Apr 1;473(7):805-25.

Della-Morte D, Dave KR, DeFazio RA, Bao YC, Raval AP, Perez-Pinzon MA. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience.* 2009 Mar 31;159(3):993-1002.

Diering GH, Haganir RL. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron.* 2018 Oct 24;100(2):314-329.

Dietrich MO, Antunes C, Geliang G, Liu ZW, Borok E, Nie Y, Xu AW, Souza DO, Gao Q, Diano S, Gao XB, Horvath TL. Agrp neurons mediate Sirt1's action on the melanocortin system and energy balance: roles for Sirt1 in neuronal firing and synaptic plasticity. *J Neurosci.* 2010 Sep 1;30(35):11815-25.

Dong P, Ji X, Han W, Han H. Oxymatrine attenuates amyloid beta 42 (A β 1-42)-induced neurotoxicity in primary neuronal cells and memory impairment in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019 Feb;97(2):99-106.

Douiev L, Soiferman D, Alban C, Saada A. The Effects of Ascorbate, N-Acetylcysteine, and Resveratrol on Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Disorders. *J Clin Med.* 2016 Dec 22;6(1):1.

Dreumont N, Mimoun K, Pourié C, Quadros EV, Alberto JM, Umoret R, Helle D, Robert A, Daval JL, Guéant JL, Pourié G. Glucocorticoid Receptor Activation Restores Learning Memory by Modulating Hippocampal Plasticity in a Mouse Model of Brain Vitamin B12 Deficiency. *Mol Neurobiol.* 2021 Mar;58(3):1024-1035.

Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang CF, Seeburg DP, Batterton MN, Tada T, Dolan BM, Sharp PA, Sheng M. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron.*, 2010 Feb 11;65(3):373-84.

Eggers AE. Redrawing Papez' circuit: a theory about how acute stress becomes chronic and causes disease. *Med Hypotheses.* 2007;69(4):852-7.

Ei-Hattab AW, Adesina AM, Jones J, Scaglia F. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol Genet Metab.* 2015 Sep-Oct;116(1-2):4-12.

Feigerlova E, Demarquet L, Melhem H, Ghemrawi R, Battaglia-Hsu SF, Ewu E, Alberto JM, Helle D, Weryha G, Guéant JL. Methyl donor deficiency impairs bone development via peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α -dependent vitamin D receptor pathway. *FASEB J.* 2016 Oct;30(10):3598-3612.

Finkel T. Signal transduction by mitochondrial oxidants. *J Biol Chem.* 2012 Feb 10;287(7):4434-40

Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, Bhimavarapu A, Luikenhuis S, de Cabo R, Fuchs C, Hahn WC, Guarente LP, Sinclair DA. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One.* 2008 Apr 16;3(4):e2020.

Freitas-Andrade M, Naus CC. Astrocytes in neuroprotection and neurodegeneration : The role of connexin43 and pannexin1. *Neuroscience.* 2016 May 26;323:207-21.

Frescas D, Valenti L, Accili D. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem.* 2005; 280:20589–20595.

Freudenthal BD, Beard WA, Perera L, Shock DD, Kim T, Schlick T, Wilson SH. Uncovering the polymerase-induced cytotoxicity of an oxidized nucleotide. *Nature*. 2015 Jan 29;517(7536):635-9.

Froese DS, Gravel RA. Genetic disorders of vitamin B₁₂ metabolism: eight complementation groups--eight genes. *Expert Rev Mol Med*. 2010 Nov 29;12:e37.

Gao J, Wang WY, Mao YW, Graff J, Guan JS, Pan L, Mak G, Kim D, Su SC, Tsai LH. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature*. 2010; 466:1105–1109.

Garcia MM, Guéant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Gueguen N, Marie PY, Lacolley P, Herrmann M, Juillièrè Y, Malthiery Y, Guéant JL. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol*. 2011 Nov;225(3):324-35.

Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*. 2008 Sep;9(9):859-64.

Geoffroy A, Kerek R, Pourié G, Helle D, Guéant JL, Daval JL, Bossenmeyer-Pourié C. Late Maternal Folate Supplementation Rescues from Methyl Donor Deficiency-Associated Brain Defects by Restoring Let-7 and miR-34 Pathways. *Mol Neurobiol*. 2016 Aug 17.

Geoffroy A, Saber-Cherif L, Pourié G, Helle D, Umoret R, Guéant JL, Bossenmeyer-Pourié C, Daval JL. Developmental Impairments in a Rat Model of Methyl Donor Deficiency: Effects of a Late Maternal Supplementation with Folic Acid. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 23;20(4):973.

Ghemrawi R, Arnold C, Battaglia-Hsu SF, Pourié G, Trinh I, Bassila C, Rashka C, Wiedemann A, Flayac J, Robert A, Dreumont N, Feillet F, Guéant JL, Coelho D. SIRT1 activation rescues the mislocalization of RNA-binding proteins and cognitive defects induced by inherited cobalamin disorders. *Metabolism*. 2019 Dec;101:153992.

Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant JL, Battaglia-Hsu SF. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis*. 2013 Mar 21;4(3):e553.

Ginnan, R.; Guikema, B. J.; Halligan, K. E.; Singer, H. A.; Jourd'heuil, D. Regulation of smooth muscle by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in vascular proliferative diseases. *Free Radic. Biol. Med*. 2008; 44:1232–1245.

Girbovan C, Morin L, Plamondon H. Repeated resveratrol administration confers lasting protection against neuronal damage but induces dose-related alterations of behavioral impairments after global ischemia. *Behav. Pharmacol*. 2012; 23:1–13.

Go YM, Chandler JD, Jones DP. The cysteine proteome. *Free Radic Biol Med*. 2015 Jul;84:227-245.

Goncalves RL, Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Brand MD. Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. *J Biol Chem*. 2015 Jan 2;290(1):209-27.

Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL, Brito A, Guéant JL, Miller JW, Molloy AM, Nexø E, Stabler S, Toh BH, Ueland PM, Yajnik C. Vitamin B₁₂ deficiency. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jun 29;3:17040.

Greene ND, Copp AJ. Neural tube defects. *Annu Rev Neurosci*. 2014;37:221-42.

Guéant JL, Namour F, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming : a play in epigenomics ? *Trends Endocrinol Metab.* 2013 Jun;24(6):279-89.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford: Oxford Univ. Press. 5th ed. 2015.

Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 1999 Jan 21;397(6716):271-4.

Hassan Z, Coelho D, Kokten T, Alberto JM, Umoret R, Daval JL, Guéant JL, Bossenmeyer-Pourie C, Pourie G. Brain Susceptibility to Methyl Donor Deficiency: From Fetal Programming to Aging Outcome in Rats. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 14;20(22):5692.

Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1771:999–1013.

Herskovits AZ, Guarente L. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. *Neuron.* 2014 Feb 5;81(3):471-83.

Hoffmann E, Wald J, Lavu S, Roberts J, Beaumont C, Haddad J, Elliott P, Westphal C, Jacobson E. Pharmacokinetics and tolerability of SRT2104, a first-in-class small molecule activator of SIRT1, after single and repeated oral administration in man. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Jan;75(1):186-96.

Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Mar 7;13(4):225-238.

Hubbard BP, Gomes AP, Dai H, Li J, Case AW, Considine T, Riera TV, Lee JE, E SY, Lamming DW, Pentelute BL, Schuman ER, Stevens LA, Ling AJ, Armour SM, Michan S, Zhao H, Jiang Y, Sweitzer SM, Blum CA, Disch JS, Ng PY, Howitz KT, Rolo AP, Hamuro Y, Moss J, Perni RB, Ellis JL, Vlasuk GP, Sinclair DA. Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science.* 2013 Mar 8;339(6124):1216-9.

Hubbard BP, Sinclair DA. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2014 Mar;35(3):146-54.

Huemer M, Baumgartner MR. The clinical presentation of cobalamin-related disorders: From acquired deficiencies to inborn errors of absorption and intracellular pathways. *J Inherit Metab Dis.* 2019 Jul;42(4):686-705.

Huemer M, Bürer C, Ješina P et al (2015). Clinical onset and course, response to treatment and outcome in 24 patients with the cbIE or cbIG remethylation defect complemented by genetic and in vitro enzyme study data. *J Inherit Metab Dis.* 2015 Sep ;38:957–967

Huemer M, Diodato D, Schwahn B, Schiff M, Bandeira A, Benoist JF, Burlina A, Cerone R, Couce ML, Garcia-Cazorla A, la Marca G, Pasquini E, Vilarinho L, Weisfeld-Adams JD, Kožich V, Blom H, Baumgartner MR, Dionisi-Vici C. Guidelines for diagnosis and management of the cobalamin-related remethylation disorders cbIC, cbID, cbIE, cbIF, cbIG, cbIJ and MTHFR deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2017 Jan;40(1):21-48.

Huganir RL, Nicoll RA. AMPARs and synaptic plasticity : the last 25 years. *Neuron.* 2013 Oct 30;80(3):704-17.

Hussain SG, Ramaiah KV. Reduced eIF2alpha phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Apr 6;355(2):365-70.

James SJ., Melnyk S., Pogribna M., Pogribny IP., Caudill MA. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J. Nutr.*, 2002 Aug, 132 (8 Suppl): 2361S-2366S.

Jeong H, Cohen DE, Cui L, Supinski A, Savas JN, Mazzulli JR, Yates JR 3rd, Bordone L, Guarente L, Krainc D. Sirt1 mediates neuroprotection from mutant huntingtin by activation of the TORC1 and CREB transcriptional pathway. *Nat Med.* 2011 Dec 18;18(1):159-65.

Jeong Y, Huh N, Lee J, Yun I, Lee JW, Lee I, Jung MW. Role of the hippocampal CA1 region in incremental value learning. *Sci Rep.* 2018 Jun 29;8(1):9870.

Jiao D, Zhang H, Jiang Z, Huang W, Liu Z, Wang Z, Wang Y, Wu H. MicroRNA-34a targets sirtuin 1 and leads to diabetes-induced testicular apoptotic cell death. *J Mol Med (Berl).* 2018 Sep ;96(9):939-949.

Jorge-Finnigan A, Gámez A, Pérez B, Ugarte M, Richard E. Different altered pattern expression of genes related to apoptosis in isolated methylmalonic aciduria cblB type and combined with homocystinuria cblC type. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Nov;1802(11):959-67.

Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 2017 Aug;24(8):1380-1389.

Kaerberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, Napper A, Curtis R, DiStefano PS, Fields S, Bedalov A, Kennedy BK. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17038-45.

Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene.* 2016 Feb 15;577(2):109-18.

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(8):e755.

Kim HN, Han L, Iyer S, de Cabo R, Zhao H, O'Brien CA, Manolagas SC, Almeida M. Sirtuin1 Suppresses Osteoclastogenesis by Deacetylating FoxOs. *Mol Endocrinol.* 2015 Oct ;29(10):1498-509.

Klotz L.O.; Steinbrenner H. Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox Biol.* 2017, 13, 646–654

Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol.* 2015 Dec 7;25(23):R1116-21.

Koseki K, Maekawa Y, Bito T, Yabuta Y, Watanabe F. High-dose folic acid supplementation results in significant accumulation of unmetabolized homocysteine, leading to severe oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biol.* 2020 Oct;37:101724.

Langan RC, Goodbred AJ. Vitamin B12 Deficiency: Recognition and Management. *Am Fam Physician.* 2017 Sep 15;96(6):384-389. PMID: 28925645.

Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW, Finkel T. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Mar 4;105(9):3374-9.

Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2002 Feb 15;16(4):452-66.

Leon J, Sakumi K, Castillo E, Sheng Z, Oka S, Nakabeppu Y. 8-Oxoguanine accumulation in mitochondrial DNA causes mitochondrial dysfunction and impairs neuritogenesis in cultured adult mouse cortical neurons under oxidative conditions. *Sci Rep*. 2016 Feb 25;6:22086.

Lerner-Ellis JP, Tirone JC, Pawelek PD, Doré C, Atkinson JL, Watkins D, Morel CF, Fujiwara TM, Moras E, Hosack AR, Dunbar GV, Antonicka H, Forgetta V, Dobson CM, Leclerc D, Gravel RA, Shoubbridge EA, Coulton JW, Lepage P, Rommens JM, Morgan K, Rosenblatt DS. Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nat Genet*. 2006 Jan;38(1):93-100.

Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, Guarente L. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell*. 2007 Oct 12;28(1):91-106.

Libert S, Pointer K, Bell EL, Das A, Cohen DE, Asara JM, Kapur K, Bergmann S, Preisig M, Otowa T, Kendler KS, Chen X, Hetteima JM, van den Oord EJ, Rubio JP, Guarente L. SIRT1 activates MAO-A in the brain to mediate anxiety and exploratory drive. *Cell*. 2011 Dec 23;147(7):1459-72.

Lin DT, Makino Y, Sharma K, Hayashi T, Neve R, Takamiya K, Huganir RL. Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nat Neurosci*. 2009 Jul;12(7):879-87.

Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, Milne J, Meyers DJ, Cole P, Yates J 3rd, Olefsky J, Guarente L, Montminy M. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature*. 2008 Nov 13;456(7219):269-73.

Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. 2001 Oct 19;107(2):137-48.

Martin FM, Bydlon G, Friedman JS. SOD2-deficiency sideroblastic anemia and red blood cell oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Jul-Aug;8(7-8):1217-25.

Martinez-Banclocha MA. N-acetyl cysteine in the treatment of Parkinson's disease. What are we waiting for? *Med Hypotheses*. 2012; 79(1): 8-12.

Martínez-Pizarro A, Desviat LR, Ugarte M, Pérez B, Richard E. Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Homocystinuria Patients with Remethylation Defects. *PLoS One*. 2016 Mar 9;11(3):e0150357.

Matmat K, Guéant-Rodriguez RM, Oussalah A, Wiedemann-Fodé A, Dionisi-Vici C, Coelho D, Guéant JL, Conart JB. Ocular manifestations in patients with inborn errors of intracellular cobalamin metabolism: a systematic review. *Hum Genet*. 2021 Oct 15.

McCaddon, A.; Regland, B.; Hudson, P.; Davies, G. Functional vitamin B12 deficiency and Alzheimer disease. *Neurology* 2002; 58:1395–1399.

Mercken EM, Mitchell SJ, Martin-Montalvo A, Minor RK, Almeida M, Gomes AP, Scheibye-Knudsen M, Palacios HH, Licata JJ, Zhang Y, Becker KG, Khraiwesh H, González-Reyes JA, Villalba JM, Baur JA, Elliott P, Westphal C, Vlasuk GP, Ellis JL, Sinclair DA, Bernier M, de Cabo R. SRT2104 extends survival of male mice on a standard diet and preserves bone and muscle mass. *Aging Cell*. 2014 Oct;13(5):787-96.

Michael P. Murphy; How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 1 January 2009; 417 (1): 1–13.

Michan S, Li Y, Chou MM, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W, et al. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci.* 2010; 30:9695–9707.

Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature.* 2007 Nov 29;450(7170):712-6.

Minor RK, Baur JA, Gomes AP, Ward TM, Csiszar A, Mercken EM, Abdelmohsen K, Shin YK, Canto C, Scheibye-Knudsen M, Krawczyk M, Irusta PM, Martín-Montalvo A, Hubbard BP, Zhang Y, Lehrmann E, White AA, Price NL, Swindell WR, Pearson KJ, Becker KG, Bohr VA, Gorospe M, Egan JM, Talan MI, Auwerx J, Westphal CH, Ellis JL, Ungvari Z, Vlasuk GP, Elliott PJ, Sinclair DA, de Cabo R. SRT1720 improves survival and healthspan of obese mice. *Sci Rep.* 2011;1:70.

Molloy AM, Kirke PN, Troendle JF, Burke H, Sutton M, Brody LC, et al. Maternal Vitamin B12 Status and Risk of Neural Tube Defects in a Population With High Neural Tube Defect Prevalence and No Folic Acid Fortification. *Pediatrics.* 2009 Mar;123(3):917–23.

Momoi, T. 2004. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J. Chem. Neuroanat.* 28:101–105.
Naidoo N, Ferber M, Master M, Zhu Y, Pack AI. Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. *J Neurosci.* 2008 Jun 25;28(26):6539-48.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):98-103.
Nathan C.; Ding A. SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI). *Cell* 2010, 140, 951.

Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* 2005; 280:16456–16460.

Ng FW, Nguyen M, Kwan T, Branton PE, Nicholson DW, Cromlish JA, Shore GC. p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 1997 Oct 20;139(2):327-38.

Niforou K, Cheimonidou C, Trougakos IP. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol.* 2014 Jan 30;2:323-32.

Nuss JE, Choksi KB, DeFord JH, Papaconstantinou J. Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Jan 11;365(2):355-61.

Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, Hartlerode A, Stegmuller J, Hafner A, Loerch P, Wright SM, Mills KD, Bonni A, Yankner BA, Scully R, Prolla TA, Alt FW, Sinclair DA. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell.* 2008 Nov 28;135(5):907-18.

Oka OB, Bulleid NJ. Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Nov;1833(11):2425-9.

Orihuela-Campos RC, Tamaki N, Mukai R, Fukui M, Miki K, Terao J, Ito HO. Biological impacts of resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine on oxidative stress in human gingival fibroblasts. *J Clin Biochem Nutr.* 2015 May;56(3):220-7.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):552-65.

Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004 Apr;11(4):381-9.

Pacelli C, De Rasmio D, Signorile A, Grattagliano I, di Tullio G, D'Orazio A, Nico B, Comi GP, Ronchi D, Ferranini E, Pirolo D, Seibel P, Schubert S, Gaballo A, Villani G, Cocco T. Mitochondrial defect and PGC-1 α dysfunction in parkin-associated familial Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Aug;1812(8):1041-53.

Paniker NV, Srivastava SK, Beutler E. Glutathione metabolism of the red cells. Effect of glutathione reductase deficiency on the stimulation of hexose monophosphate shunt under oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 1970 Sep 22;215(3):456-60.

Papez J. W. A proposed mechanism of emotion. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, 1995, 7(1) : 103-112.

Pastore A, Martinelli D, Piemonte F, Tozzi G, Boenzi S, Di Giovamberardino G, Petrillo S, Bertini E, Dionisi-Vici C. Glutathione metabolism in cobalamin deficiency type C (cb1C). *J Inher Metab Dis.* 2014 Jan;37(1):125-9.

Paz Gavilán M, Vela J, Castaño A, Ramos B, del Río JC, Vitorica J, Ruano D. Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus. *Neurobiol Aging.* 2006 Jul;27(7):973-82.

Pellanda H, Forges T, Bressenot A, Chango A, Bronowicki JP, Guéant JL, Namour F. 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.* 2012 Jun;56(6):976-85.

Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature.* 2004 Jun 17;429(6993):771-6.

Pobre KFR, Poet GJ, Hendershot LM. The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem.* 2019 Feb 8;294(6):2098-2108.

Pons L, Battaglia-Hsu SF, Orozco-Barrios CE, Ortiou S, Chery C, Alberto JM, Arango-Rodriguez ML, Dumas D, Martinez-Fong D, Freund JN, Gueant JL. Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin. *PLoS One.* 2009 Jul 22;4(7):e6325.

Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, Giudicelli J, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Jeannesson E, Gueguen N, Bressenot A, Nicolas B, Malthiery Y, Daval JL, Peyrin-Biroulet L, Bronowicki JP, Guéant JL. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypomethylation and decreased ER- α , ERR- α , and HNF-4 α in the rat liver. *J Hepatol.* 2012 Aug;57(2):344-51.

Postnikova TY, Zubareva OE, Kovalenko AA, Kim KK, Magazanik LG, Zaitsev AV. Status Epilepticus Impairs Synaptic Plasticity in Rat Hippocampus and Is Followed by Changes in Expression of NMDA Receptors. *Biochemistry (Mosc).* 2017 Mar;82(3):282-290.

Pourié G, Martin N, Bossenmeyer-Pourié C, Akchiche N, Guéant-Rodriguez RM, Geoffroy A, Jeannesson E, El Hajj Chehadeh S, Mimoun K, Brachet P, Koziel V, Alberto JM, Helle D, Debard R, Leininger B, Daval JL, Guéant JL. Folate- and vitamin B12-deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor α . *FASEB J.* 2015 Sep;29(9):3713-25.

Pourié G, Martin N, Bossenmeyer-Pourié C, Akchiche N, Guéant-Rodriguez RM, Geoffroy A, Jeannesson E, El Hajj Chehadeh S, Mimoun K, Brachet P, Koziel V, Alberto JM, Helle D, Debard R, Leininger B, Daval JL, Guéant JL. Folate- and vitamin B12-deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor α . *FASEB J*. 2015 Sep;29(9):3713-25.

Pourié G, Martin N, Bossenmeyer-Pourié C, Akchiche N, Guéant-Rodriguez RM, Geoffroy A, Jeannesson E, El Hajj Chehadeh S, Mimoun K, Brachet P, Koziel V, Alberto JM, Helle D, Debard R, Leininger B, Daval JL, Guéant JL. Folate- and vitamin B12-deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor α . *FASEB J*. 2015 Sep;29(9):3713-25.

Puzianowska-Kuznicka M, Kuznicki J. The ER and ageing II: calcium homeostasis. *Ageing Res Rev*. 2009 Jul;8(3):160-72.

Qi Y, Davis M, Lainez E, et al. SRT2104, a Novel Small Molecule SIRT1 Activator Ameliorates Insulin Resistance and Promotes Glucose Utilization Measured under a Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamp by Enhancing Both Glycolysis and Carbohydrate Oxidation in Mice Fed a High Fat Diet. *Diabetes*. 2011;60(Suppl 1):1007–P.

Quadros EV. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br J Haematol*. 2010 Jan;148(2):195-204.

Rao RV, Bredesen DE. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Dec;16(6):653-62.

Rashka C, Hergalant S, Dreumont N, Oussalah A, Camadro JM, Marchand V, Hassan Z, Baumgartner MR, Rosenblatt DS, Feillet F, Guéant JL, Flayac J, Coelho D. Analysis of fibroblasts from patients with cblC and cblG genetic defects of cobalamin metabolism reveals global dysregulation of alternative splicing. *Hum Mol Genet*. 2020 Jul 29;29(12):1969-1985.

Raux E, Schubert HL, Warren MJ. Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): a bacterial conundrum. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Dec;57(13-14):1880-93.

Reddy VS, Trinath J, Reddy GB. Implication of homocysteine in protein quality control processes. *Biochimie*. 2019 Oct;165:19-31.

Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol*. 2006 Nov; 5(11):949-60.

Richard E, Alvarez-Barrientos A, Pérez B, Desviat LR, Ugarte M. Methylmalonic acidaemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway. *J Pathol*. 2007 Dec;213(4):453-61.

Richard E, Desviat LR, Ugarte M, Pérez B. Oxidative stress and apoptosis in homocystinuria patients with genetic remethylation defects. *J Cell Biochem*. 2013 Jan;114(1):183-91.

Rizzo G, Laganà AS, Rapisarda AM, La Ferrera GM, Buscema M, Rossetti P, Nigro A, Muscia V, Valenti G, Sapia F, Sarpietro G, Zigarelli M, Vitale SG. Vitamin B12 among Vegetarians: Status, Assessment and Supplementation. *Nutrients*. 2016 Nov 29;8(12):767.

Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*. 2005 Mar 3;434(7029):113-8.

- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):519-29. Review.
- Roth JR, Lawrence JG, Bobik TA. Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:137-81.
- Rutsch F, Gailus S, Miousse IR, Suormala T, Sagné C, Toliat MR, Nürnberg G, Wittkamp T, Buers I, Sharifi A, Stucki M, Becker C, Baumgartner M, Robenek H, Marquardt T, Höhne W, Gasnier B, Rosenblatt DS, Fowler B, Nürnberg P. Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet.* 2009 Feb;41(2):234-9.
- Salminen A, Kaarniranta K. SIRT1: regulation of longevity via autophagy. *Cell Signal.* 2009 Sep;21(9):1356-60.
- Salminen A, Kaarniranta K. ER stress and hormetic regulation of the aging process. *Ageing Res Rev.* 2010 Jul;9(3):211-7.
- Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, Paroncini P, Dusi S, Orlandini G, Gabrielli A. Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. *Arthritis Rheum.* 2001 Nov;44(11):2653-64.
- Schröder M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Mar;65(6):862-94.
- Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res.* 2005 Jan 6;569(1-2):29-63.
- Shah SI, Paine JG, Perez C, Ullah G. Mitochondrial fragmentation and network architecture in degenerative diseases. *PLoS One.* 2019 Sep 26;14(9):e0223014.
- Sharma GS, Kumar T, Singh LR. N-homocysteinylation induces different structural and functional consequences on acidic and basic proteins. *PLoS One.* 2014 Dec 31;9(12):e116386.
- Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat.* 2004 Sep;28(1-2):79-92.
- Siebels I, Dröse S. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Oct;1827(10):1156-64.
- Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017 Jun 20;86:715-748.
- Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985 Dec 17;311(1152):617-31.
- Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem.* 2014 Mar 28;289(13):8735-41.
- Sinha N, Dabla PK. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. *Curr Hypertens Rev.* 2015;11(2):132-42.
- Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, Halašová E, Lehotský J. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci.* 2016 Oct 20;17(10):1733.

Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas HA. Resveratrol and health — a comprehensive review of human clinical trials. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; 55:1129–1141

Spickett CM, Pitt AR. Oxidative lipidomics coming of age: advances in analysis of oxidized phospholipids in physiology and pathology. *Antioxid Redox Signal.* 2015 Jun 20;22(18):1646-66.

Spindler SR. Caloric restriction: from soup to nuts. *Ageing Res. Rev.* 2010; 9:324–353.

Stabler SP. Clinical practice. Vitamin B12 deficiency. *N Engl J Med.* 2013 Jan 10;368(2):149-60.

Stahl W, Sies H. β -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *Am J Clin Nutr.* 2012 Nov;96(5):1179S-84S.

Tanaka S, Uehara T, Nomura Y. Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *J Biol Chem.* 2000 Apr 7;275(14):10388-93.

Tang BL. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol Cells.* 2016 Feb;39(2):87-95.

Taylor RC. Aging and the UPR(ER). *Brain Research* 1648 (2016) 588-593.

Turrigiano GG, Nelson SB. Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 2000 Jun;10(3):358-64.

Vaquero A, Scher M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Serrano L, Reinberg D. SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature.* 2007 Nov 15;450(7168):440-4.

Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell.* 2001 Oct 19;107(2):149-59.

Venkatasubramanian S, Noh RM, Daga S, Langrish JP, Joshi NV, Mills NL, Hoffmann E, Jacobson EW, Vlasuk GP, Waterhouse BR, Lang NN, Newby DE. Cardiovascular effects of a novel SIRT1 activator, SRT2104, in otherwise healthy cigarette smokers. *J Am Heart Assoc.* 2013 Jun 14;2(3):e000042.

Vilaseca MA, Vilarinho L, Zavadakova P, Vela E, Cleto E, Pineda M, Coimbra E, Suormala T, Fowler B, Kozich V. CblE type of homocystinuria: mild clinical phenotype in two patients homozygous for a novel mutation in the MTRR gene. *J Inherit Metab Dis.* 2003;26(4):361-9.

Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 2011 Nov 25;334(6059):1081-6.

Wang F, Shang Y, Zhang R, Gao X, Zeng Q. A SIRT1 agonist reduces cognitive decline in type 2 diabetic rats through antioxidative and anti-inflammatory mechanisms. *Mol Med Rep.* 2019 Feb;19(2):1040-1048.

Wang RH, Zheng Y, Kim HS, Xu X, Cao L, Luhasen T, Lee MH, Xiao C, Vassilopoulos A, Chen W, Gardner K, Man YG, Hung MC, Finkel T, Deng CX. Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Mol Cell.* 2008 Oct 10;32(1):11-20.

Wang X, Zhao Y, Zhang X, Badie H, Zhou Y, Mu Y, Loo LS, Cai L, Thompson RC, Yang B, Chen Y, Johnson PF, Wu C, Bu G, Mobley WC, Zhang D, Gage FH, Ranscht B, Zhang YW, Lipton SA, Hong W, Xu H. Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction by modulating glutamate

receptor recycling in Down's syndrome. *Nat Med.*, 2013 Apr;19(4):473-80. doi: 10.1038/nm.3117. Epub 2013 Mar 24.

Watkins D, Rosenblatt DS. Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. *Am J Med Genet.* 1989 Nov;34(3):427-34.

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001 Apr 27;292(5517):727-30.

Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem.* 1973 Jul 10;248(13):4793-6.

Wu H, Wu J, Zhou S, Huang W, Li Y, Zhang H, Wang J, Jia Y. SRT2104 attenuates diabetes-induced aortic endothelial dysfunction via inhibition of P53. *J Endocrinol.* 2018 Apr;237(1):1-14.

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005 Oct;115(10):2656-64. Review.

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* 2000 Dec;6(6):1355-64.

Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004 Jun 16;23(12):2369-80.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001 Dec 28;107(7):881-91.

Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, Schenk S, Sonoda N, Babendure JL, Lu JC, Smith JJ, Jirousek MR, Olefsky JM. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol.* 2009 Mar;29(5):1363-74.

Yu J, Auwerx J. Protein deacetylation by SIRT1: an emerging key post-translational modification in metabolic regulation. *Pharmacol. Res.* 2010; 62:35–41.

Yu-Wai-Man P, Trenell MI, Hollingsworth KG, Griffiths PG, Chinnery PF. OPA1 mutations impair mitochondrial function in both pure and complicated dominant optic atrophy. *Brain.* 2011 Apr;134(Pt 4):e164.

Zeidman P, Maguire EA. Anterior hippocampus: the anatomy of perception, imagination and episodic memory. *Nat Rev Neurosci.* 2016 Mar;17(3):173-82.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002 Aug 1;33(3):337-49.

Zhang Y, Anoopkumar-Dukie S, Arora D, Davey AK. Review of the anti-inflammatory effect of SIRT1 and SIRT2 modulators on neurodegenerative diseases. *Eur J Pharmacol.* 2020 Jan 15;867:172847.

Zhang J, Wang Q, Xu C, Lu Y, Hu H, Qin B, Wang Y, He D, Li C, Yu X, Wang S, Liu J. MitoTEMPO Prevents Oxalate Induced Injury in NRK-52E Cells via Inhibiting Mitochondrial Dysfunction and Modulating Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 7528090.

Zhao YN, Li WF, Li F, Zhang Z, Dai YD, Xu AL, Qi C, Gao JM, Gao J. Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 435:597–602.

Résumé :

Les défauts génétiques du métabolisme de la vitamine B12 ou cobalamine (cbl) conduisent à une diminution de l'activité de la méthionine synthase associée avec des modifications d'expressions géniques comme la diminution de l'expression de SIRT1. Les symptômes de ces patients sont d'ordre hématologique mais aussi neurologiques persistants malgré le traitement classique et la correction des paramètres biochimiques. L'objectif global de ce projet est de développer un traitement thérapeutique innovant pour les pathologies neurocognitives développées par ces patients, en utilisant deux modèles expérimentaux : un modèle de souris transgéniques *Mtr* KO dans les neurones et un modèle cellulaire de fibroblastes de patients touchés par les défauts génétiques cblC et cblG.

Nos résultats montrent que la déficience de l'activité de la méthionine synthase est associée à des dysfonctionnements mitochondriaux dans les cellules des patients et à des troubles cognitifs dans le modèle de souris *Mtr* KO, avec des niveaux élevés de stress cellulaire dans ces deux modèles. Nos résultats après traitement par SRT2104 seul ou bien combiné avec la N-acétylcystéine démontrent que l'activation pharmacologique de SIRT1 et l'utilisation d'antioxydants améliorent les déficits cognitifs chez les souris et diminuent les niveaux de stress dans les cellules de patients. Ceci suggère que ce traitement pourrait représenter une approche innovante et complémentaire pour traiter les patients cblC et cblG qui répondent mal au traitement classique à la vitamine B12.

Ces résultats pourraient être considérés comme une preuve de concept à d'éventuelles études cliniques ultérieures et ainsi contribuer au développement d'un traitement innovant dans le traitement des patients ayant un dysfonctionnement inné ou acquis du métabolisme de la vitamine B12.

Mots-clés :

Maladies rares, métabolisme B12, troubles neurologiques, déficits neurocognitifs, innovation thérapeutique, activateur SIRT1.

Abstract:

Genetic defects in vitamin B12 or cobalamin (cbl) metabolism lead to a decrease in methionine synthase activity associated with changes in genes expression such as decreased expression of SIRT1. Patients with inherited defects affecting methionine synthase activity present mainly with hematological but also neurological symptoms that persist despite conventional treatment and correction of biochemical parameters. The overall objective of this project is to develop an innovative therapeutic treatment for the neurocognitive pathologies developed by these patients using two experimental models: a model of transgenic *Mtr* KO mice in neurons and a cellular model of fibroblasts from patients affected by the cblC and cblG genetic defects.

Our results show that the deficiency of methionine synthase activity is associated with mitochondrial dysfunctions in patient cells and cognitive impairment in the *Mtr* KO mouse model, with high levels of cellular stress in both models. Our results after treatment with SRT2104 alone or combined with N-acetylcysteine demonstrate that pharmacological activation of SIRT1 and the use of antioxidants could improve the cognitive deficits in mice and decrease stress levels in patients' cells, suggesting that this treatment could represent an additional and innovative approach to treat cblC and cblG patients who respond poorly to vitamin B12 treatment.

These results could be considered as a proof of concept for possible subsequent clinical studies and thus contribute to the development of an innovative treatment for patients with innate or acquired dysfunction of vitamin B12 metabolism.

Keywords:

Rare diseases, B12 metabolism, neurological disorders, neurocognitive deficits, therapeutic innovation, SIRT1 activator.